

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-18141

(P2017-18141A)

(43) 公開日 平成29年1月26日(2017.1.26)

| (51) Int.Cl.            | F I                   | テーマコード (参考) |
|-------------------------|-----------------------|-------------|
| C 1 2 N 15/09 (2006.01) | C 1 2 N 15/00 Z N A A | 2 G 0 4 5   |
| C 1 2 N 1/15 (2006.01)  | C 1 2 N 1/15          | 4 B 0 5 0   |
| C 1 2 N 1/19 (2006.01)  | C 1 2 N 1/19          | 4 B 0 6 3   |
| C 1 2 N 1/21 (2006.01)  | C 1 2 N 1/21          | 4 B 0 6 5   |
| C 1 2 N 5/10 (2006.01)  | C 1 2 N 5/10          | 4 C 0 8 4   |

審査請求 未請求 請求項の数 65 O L (全 92 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-195911 (P2016-195911)  
 (22) 出願日 平成28年10月3日 (2016. 10. 3)  
 (62) 分割の表示 特願2013-505074 (P2013-505074) の分割  
 原出願日 平成23年4月13日 (2011. 4. 13)  
 (31) 優先権主張番号 12/761, 050  
 (32) 優先日 平成22年4月15日 (2010. 4. 15)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 512264013  
 セント ジュード チルドレンズ リサーチ ホスピタル  
 アメリカ合衆国 テネシー州 38105-2794 メンフィス ダニー トーマス プレイス 262  
 (74) 代理人 100092093  
 弁理士 辻居 幸一  
 (74) 代理人 100082005  
 弁理士 熊倉 禎男  
 (74) 代理人 100084663  
 弁理士 箱田 篤  
 (74) 代理人 100093300  
 弁理士 浅井 賢治

最終頁に続く

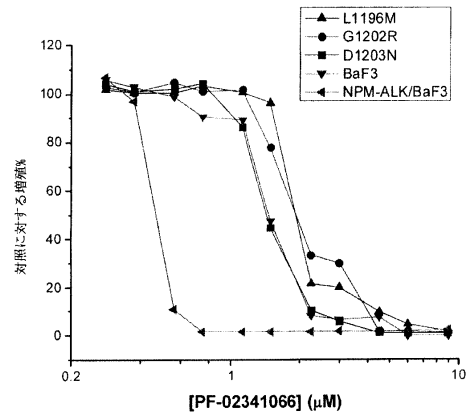
(54) 【発明の名称】 未分化リンパ腫キナーゼ (ALK) キナーゼ阻害剤に耐性である癌の診断および治療のための方法および組成物

(57) 【要約】

【課題】 少なくとも1つの未分化リンパ腫キナーゼ (ALK) キナーゼ阻害剤に耐性である癌の診断および治療のための組成物および方法を提供する。

【解決手段】 少なくとも1つの未分化リンパ腫キナーゼ (ALK) キナーゼ阻害剤に耐性である癌の診断および治療のための組成物および方法が、本明細書に提供される。本発明は、少なくとも1つのALKキナーゼ阻害剤に対して耐性を付与する、ALK内での突然変異の発見に基づく。少なくとも1つのALK阻害剤耐性突然変異を有するポリヌクレオチドおよびポリペプチドが提供され、異常なALK活性に関連する疾患、より詳細には、少なくとも1つのALKキナーゼ阻害剤に耐性である疾患の診断、予後、および/または治療において有用な方法および組成物に使用される。キナーゼ活性を阻害するかつ/または前記ALK耐性突然変異体の発現レベルを低減することができる、薬剤の特定のための方法および組成物もまた提供される。

【選択図】 図1



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

以下からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む、単離されたポリヌクレオチド

a) 配列番号 5、7、9、11、13、15、17、19、21、25、27、29、31、98、100、または 102 に記載されるヌクレオチド配列、

b) 配列番号 6、8、10、12、14、16、18、20、22、26、28、30、32、99、101、または 103 に記載されるアミノ酸配列をコードする、ヌクレオチド配列、

c) 配列番号 5 に対して少なくとも 90% の配列同一性を有するヌクレオチド配列、または配列番号 6 に対して少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列であって、前記ポリヌクレオチドは、配列番号 2 のアミノ酸残基 1123 位に対応する位置にセリン残基を有するポリペプチドをコードし、また前記ポリヌクレオチドは、少なくとも 1 つの未分化リンパ腫キナーゼ (ALK) 小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする、ヌクレオチド配列、

d) 配列番号 7 に対して少なくとも 90% の配列同一性を有するヌクレオチド配列、または配列番号 8 に対して少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列であって、前記ポリヌクレオチドは、配列番号 2 のアミノ酸残基 1123 位に対応する位置にアラニン残基を有するポリペプチドをコードし、また前記ポリヌクレオチドは、少なくとも 1 つの ALK 小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする、ヌクレオチド配列、

e) 配列番号 9 に対して少なくとも 90% の配列同一性を有するヌクレオチド配列、または配列番号 10 に対して少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列であって、前記ポリヌクレオチドは、配列番号 2 のアミノ酸残基 1129 位に対応する位置にそのバリン残基を有するポリペプチドをコードし、また前記ポリヌクレオチドは、少なくとも 1 つの ALK 小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする、ヌクレオチド配列、

f) 配列番号 11 に対して少なくとも 90% の配列同一性を有するヌクレオチド配列、または配列番号 12 に対して少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列であって、前記ポリヌクレオチドは、配列番号 2 のアミノ酸残基 1132 位に対応する位置にリジン残基を有するポリペプチドをコードし、また前記ポリヌクレオチドは、少なくとも 1 つの ALK 小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする、ヌクレオチド配列、

g) 配列番号 13 に対して少なくとも 90% の配列同一性を有するヌクレオチド配列、または配列番号 14 に対して少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列であって、前記ポリヌクレオチドは、配列番号 2 のアミノ酸残基 1151 位に対応する位置にメチオニン残基を有するポリペプチドをコードし、また前記ポリヌクレオチドは、少なくとも 1 つの ALK 小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする、ヌクレオチド配列、

h) 配列番号 15 に対して少なくとも 90% の配列同一性を有するヌクレオチド配列、または配列番号 16 に対して少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列であって、前記ポリヌクレオチドは、配列番号 2 のアミノ酸残基 1156 位に対応する位置にチロシン残基を有するポリペプチドをコードし、また前記ポリヌクレオチドは、少なくとも 1 つの ALK 小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする、ヌクレオチド配列、

i) 配列番号 17 に対して少なくとも 90% の配列同一性を有するヌクレオチド配列、または配列番号 18 に対して少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列であって、前記ポリヌクレオチドは、配列番号 2 のアミノ酸残基 1174 位に対応する位置にシステイン残基を有するポリペプチドをコードし、また前記ポリヌクレオチドは、少なくとも 1 つの ALK 小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキ

10

20

30

40

50



配列、または配列番号 103 に対して少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列であって、前記ポリヌクレオチドは、配列番号 2 のアミノ酸残基 1174 位に対応する位置にロイシン残基を有するポリペプチドをコードし、また前記ポリヌクレオチドは、少なくとも 1 つの ALK 小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする、ヌクレオチド配列。

【請求項 2】

以下からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項 1 に記載の単離されたポリヌクレオチド：

a) 配列番号 5 に対して少なくとも 95% の配列同一性を有するヌクレオチド配列、または配列番号 6 に対して少なくとも 95% の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列であって、前記ポリヌクレオチドは、配列番号 2 のアミノ酸残基 1123 位に対応する位置にセリン残基を有するポリペプチドをコードし、また前記ポリヌクレオチドは、少なくとも 1 つの未分化リンパ腫キナーゼ (ALK) 小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする、ヌクレオチド配列、

b) 配列番号 7 に対して少なくとも 95% の配列同一性を有するヌクレオチド配列、または配列番号 8 に対して少なくとも 95% の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列であって、前記ポリヌクレオチドは、配列番号 2 のアミノ酸残基 1123 位に対応する位置にアラニン残基を有するポリペプチドをコードし、また前記ポリヌクレオチドは、少なくとも 1 つの ALK 小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする、ヌクレオチド配列、

c) 配列番号 9 に対して少なくとも 95% の配列同一性を有するヌクレオチド配列、または配列番号 10 に対して少なくとも 95% の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列であって、前記ポリヌクレオチドは、配列番号 2 のアミノ酸残基 1129 位に対応する位置にそのバリン残基を有するポリペプチドをコードし、また前記ポリヌクレオチドは、少なくとも 1 つの ALK 小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする、ヌクレオチド配列、

d) 配列番号 11 に対して少なくとも 95% の配列同一性を有するヌクレオチド配列、または配列番号 12 に対して少なくとも 95% の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列であって、前記ポリヌクレオチドは、配列番号 2 のアミノ酸残基 1132 位に対応する位置にリジン残基を有するポリペプチドをコードし、また前記ポリヌクレオチドは、少なくとも 1 つの ALK 小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする、ヌクレオチド配列、

e) 配列番号 13 に対して少なくとも 95% の配列同一性を有するヌクレオチド配列、または配列番号 14 に対して少なくとも 95% の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列であって、前記ポリヌクレオチドは、配列番号 2 のアミノ酸残基 1151 位に対応する位置にメチオニン残基を有するポリペプチドをコードし、また前記ポリヌクレオチドは、少なくとも 1 つの ALK 小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする、ヌクレオチド配列、

f) 配列番号 15 に対して少なくとも 95% の配列同一性を有するヌクレオチド配列、または配列番号 16 に対して少なくとも 95% の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列であって、前記ポリヌクレオチドは、配列番号 2 のアミノ酸残基 1156 位に対応する位置にチロシン残基を有するポリペプチドをコードし、また前記ポリヌクレオチドは、少なくとも 1 つの ALK 小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする、ヌクレオチド配列、

g) 配列番号 17 に対して少なくとも 95% の配列同一性を有するヌクレオチド配列、または配列番号 18 に対して少なくとも 95% の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列であって、前記ポリヌクレオチドは、配列番号 2 のアミノ酸残基 1174 位に対応する位置にシステイン残基を有するポリペプチドをコードし、また前記ポリヌクレオチドは、少なくとも 1 つの ALK 小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする、ヌクレオチド配列、

10

20

30

40

50



列をコードするヌクレオチド配列であって、前記ポリヌクレオチドは、配列番号2のアミノ酸残基1174位に対応する位置にロイシン残基を有するポリペプチドをコードし、また前記ポリヌクレオチドは、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする、ヌクレオチド配列。

【請求項3】

以下からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項1に記載の単離されたポリヌクレオチド：

a) 配列番号33、35、37、39、41、43、45、47、49、53、55、57、59、61、63、または104に記載されるヌクレオチド配列、

b) 配列番号34、36、38、40、42、44、46、48、50、54、56、58、60、62、64、または105に記載されるアミノ酸配列をコードする、ヌクレオチド配列、

c) 配列番号33、35、37、39、41、43、45、47、49、53、55、57、59、61、63、または104に対して少なくとも90%の配列同一性を有するヌクレオチド配列であって、前記ポリヌクレオチドは、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする、ヌクレオチド配列、

d) 配列番号34、36、38、40、42、44、46、48、50、54、56、58、60、62、64、または105に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、前記ポリヌクレオチドは、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする、ヌクレオチド配列。

【請求項4】

ALK発癌性融合タンパク質パートナーをコードするヌクレオチド配列を更に含み、また前記ポリヌクレオチドは、ALK発癌性融合タンパク質をコードする、請求項3に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項5】

前記ALK発癌性融合タンパク質パートナーは、ヌクレオホスミン(NPM)、非筋肉トロポミオシン3(TPM3)、5-アミノイミダゾール-4-カルボキサミドリボヌクレオチドホルミルトランスフェラーゼ/IMPシクロヒドロラーゼ(ATIC)、クラスリン重鎖(CLTC)、TRK-融合遺伝子(TFG)、非筋肉トロポミオシン4(TPM4)、モエシン(MSN)、Ran結合タンパク質2(RanBP2)、微小管会合タンパク質様4(EML4)、システイニルトRNA合成酵素(CARS)、キネシンファミリーメンバー5B(KIF5B)、非筋肉ミオシン重鎖9(MYH9)、SEC31ホモログA(SEC31L1)、およびリングフィンガータンパク質213(RNF213)/染色体17上のALKリンパ腫オリゴマー化パートナー(ALO17)からなる群から選択される、請求項4に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項6】

前記ALK発癌性融合タンパク質パートナーは、配列番号97に記載されるアミノ酸配列を有する、請求項5に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項7】

以下からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項1に記載の単離されたポリヌクレオチド：

a) 配列番号65、67、69、71、73、75、77、79、81、85、87、89、91、93、95、または106に記載されるヌクレオチド配列、

b) 配列番号66、68、70、72、74、76、78、80、82、86、88、90、92、94、96、または107に記載されるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列、および

c) 配列番号65、67、69、71、73、75、77、79、81、85、87、89、91、93、95、または106に対して少なくとも90%の配列同一性を有

するヌクレオチド配列であって、前記ポリヌクレオチドは、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする、ヌクレオチド配列、

d) 配列番号66、68、70、72、74、76、78、80、82、86、88、90、92、94、96、または107に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、前記ポリヌクレオチドは、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする、ヌクレオチド配列。

【請求項8】

前記ALK小分子キナーゼ阻害剤は、PF-0234166、NVP-TAE684、スタウロスポリン、7-ヒドロキシスタウロスポリン、CEP-14083、CEP-14513、CEP-28122、ピリドン14、ピリドン15、CRL151104A、およびWZ-5-126からなる群から選択される、請求項1~7のいずれか1項に記載の単離されたポリヌクレオチド。

10

【請求項9】

前記ALK小分子キナーゼ阻害剤は、PF-02341066である、請求項8に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項10】

プロモーターに作動可能に連結される請求項1~9のいずれか1項に記載の単離されたポリヌクレオチドを含む、発現カセット。

20

【請求項11】

請求項10に記載の発現カセットを含む、宿主細胞。

【請求項12】

以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド：

a) 配列番号6、8、10、12、14、16、18、20、22、26、28、30、32、99、101、103に記載されるアミノ酸配列、

b) 配列番号6に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、前記ポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸残基1123位に対応する位置にセリン残基を有し、また前記ポリペプチドは、少なくとも1つの未分化リンパ腫キナーゼ(ALK)小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列、

30

c) 配列番号8に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、前記ポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸残基1123位に対応する位置にアラニン残基を有し、また前記ポリペプチドは、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列、

d) 配列番号10に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、前記ポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸残基1129位に対応する位置にバリン残基を有し、また前記ポリペプチドは、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列、

e) 配列番号12に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、前記ポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸残基1132位に対応する位置にリジン残基を有し、また前記ポリペプチドは、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列、

40

f) 配列番号14に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、前記ポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸残基1151位に対応する位置にメチオニン残基を有し、また前記ポリペプチドは、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列、

g) 配列番号16に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、前記ポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸残基1156位に対応する位置にチロシン残基を有し、また前記ポリペプチドは、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列、

50

h) 配列番号 18 に対して少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、前記ポリペプチドは、配列番号 2 のアミノ酸残基 1174 位に対応する位置にシステイン残基を有し、また前記ポリペプチドは、少なくとも 1 つの A L K 小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列、

i) 配列番号 20 に対して少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、前記ポリペプチドは、配列番号 2 のアミノ酸残基 1174 位に対応する位置にイソロイシン残基を有し、また前記ポリペプチドは、少なくとも 1 つの A L K 小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列、

j) 配列番号 22 に対して少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、前記ポリペプチドは、配列番号 2 のアミノ酸残基 1174 位に対応する位置にバリン残基を有し、また前記ポリペプチドは、少なくとも 1 つの A L K 小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列、

k) 配列番号 26 に対して少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、前記ポリペプチドは、配列番号 2 のアミノ酸残基 1202 位に対応する位置にアルギニン残基を有し、また前記ポリペプチドは、少なくとも 1 つの A L K 小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列、

l) 配列番号 28 に対して少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、前記ポリペプチドは、配列番号 2 のアミノ酸残基 1203 位に対応する位置にアスパラギン残基を有し、また前記ポリペプチドは、少なくとも 1 つの A L K 小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列、

m) 配列番号 30 に対して少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、前記ポリペプチドは、配列番号 2 のアミノ酸残基 1210 位に対応する位置にリジン残基を有し、また前記ポリペプチドは、少なくとも 1 つの A L K 小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列、

n) 配列番号 32 に対して少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、前記ポリペプチドは、配列番号 2 のアミノ酸残基 1269 位に対応する位置にアラニン残基を有し、また前記ポリペプチドは、少なくとも 1 つの A L K 小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列、

o) 配列番号 99 に対して少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、前記ポリペプチドは、配列番号 2 のアミノ酸残基 1406 位に対応する位置にリジン残基を有し、また前記ポリペプチドは、少なくとも 1 つの A L K 小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列、

p) 配列番号 101 に対して少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、前記ポリペプチドは、配列番号 2 のアミノ酸残基 1408 位に対応する位置にリジン残基を有し、また前記ポリペプチドは、少なくとも 1 つの A L K 小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列、および

q) 配列番号 103 に対して少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、前記ポリペプチドは、配列番号 2 のアミノ酸残基 1174 位に対応する位置にロイシン残基を有し、また前記ポリペプチドは、少なくとも 1 つの A L K 小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列。

【請求項 13】

以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 12 に記載の単離されたポリペプチド：

a) 配列番号 6 に対して少なくとも 95% の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、前記ポリペプチドは、配列番号 2 のアミノ酸残基 1123 位に対応する位置にセリン残基を有し、また前記ポリペプチドは、少なくとも 1 つの未分化リンパ腫キナーゼ (A L K) 小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列、

b) 配列番号 8 に対して少なくとも 95% の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、前記ポリペプチドは、配列番号 2 のアミノ酸残基 1123 位に対応する位置にアラニン残基を有し、また前記ポリペプチドは、少なくとも 1 つの A L K 小分子キナーゼ阻害

10

20

30

40

50



剤に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列、

c) 配列番号10に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、前記ポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸残基1129位に対応する位置にバリン残基を有し、また前記ポリペプチドは、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列、

d) 配列番号12に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、前記ポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸残基1132位に対応する位置にリジン残基を有し、また前記ポリペプチドは、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列、

e) 配列番号14に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、前記ポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸残基1151位に対応する位置にメチオニン残基を有し、また前記ポリペプチドは、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列、

f) 配列番号16に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、前記ポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸残基1156位に対応する位置にチロシン残基を有し、また前記ポリペプチドは、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列、

g) 配列番号18に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、前記ポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸残基1174位に対応する位置にシステイン残基を有し、また前記ポリペプチドは、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列、

h) 配列番号20に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、前記ポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸残基1174位に対応する位置にイソロイシン残基を有し、また前記ポリペプチドは、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列、

i) 配列番号22に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、前記ポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸残基1174位に対応する位置にバリン残基を有し、また前記ポリペプチドは、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列、

j) 配列番号26に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、前記ポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸残基1202位に対応する位置にアルギニン残基を有し、また前記ポリペプチドは、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列、

k) 配列番号28に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、前記ポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸残基1203位に対応する位置にアスパラギン残基を有し、また前記ポリペプチドは、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列、

l) 配列番号30に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、前記ポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸残基1210位に対応する位置にリジン残基を有し、また前記ポリペプチドは、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列、

m) 配列番号32に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、前記ポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸残基1269位に対応する位置にアラニン残基を有し、また前記ポリペプチドは、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列、

n) 配列番号99に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、前記ポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸残基1406位に対応する位置にリジン残基を有し、また前記ポリペプチドは、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列、

o) 配列番号101に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列

10

20

30

40

50

であって、前記ポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸残基1408位に対応する位置にリジン残基を有し、また前記ポリペプチドは、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列、および

p) 配列番号103に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、前記ポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸残基1174位に対応する位置にロイシン残基を有し、また前記ポリペプチドは、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列。

【請求項14】

以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項12に記載の単離されたポリペプチド：

a) 配列番号34、36、38、40、42、44、46、48、50、54、56、58、60、62、64、または105に記載されるアミノ酸配列、および

b) 配列番号34、36、38、40、42、44、46、48、50、54、56、58、60、62、64、または105に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、前記ポリペプチドは、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列。

【請求項15】

ALK発癌性融合タンパク質パートナーを更に含み、故にALK発癌遺伝子融合タンパク質を形成する、請求項14に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項16】

前記ALK発癌性融合タンパク質パートナーは、ヌクレオホスミン(NPM)、非筋肉トロポミオシン3(TPM3)、5-アミノイミダゾール-4-カルボキサミドリボヌクレオチドホルミルトランスフェラーゼ/IMPシクロヒドロラーゼ(ATIC)、クラスリン重鎖(CLTC)、TRK-融合遺伝子(TFG)、非筋肉トロポミオシン4(TPM4)、モエシン(MSN)、Ran結合タンパク質2(RanBP2)、微小管会合タンパク質様4(EML4)、システイニルトRNA合成酵素(CARS)、キネシンファミリーメンバー5B(KIF5B)、非筋肉ミオシン重鎖9(MYH9)、SEC31ホモログA(SEC31L1)、およびリングフィンガータンパク質213(RNF213)/染色体17上のALKリンパ腫オリゴマー化パートナー(ALO17)からなる群から選択される、請求項15に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項17】

前記ALK発癌性融合タンパク質パートナーは、配列番号97に記載されるアミノ酸配列を有する、請求項16に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項18】

以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項12に記載の単離されたポリペプチド：

a) 配列番号66、68、70、72、74、76、78、80、82、86、88、90、92、94、96、または107に記載されるアミノ酸配列、および

b) 配列番号66、68、70、72、74、76、78、80、82、86、88、90、92、94、96、または107に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、前記ポリペプチドは、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列。

【請求項19】

前記ALK小分子キナーゼ阻害剤は、PF-0234166、NVP-TAE684、スタウロスポリン、7-ヒドロキシスタウロスポリン、CEP-14083、CEP-14513、CEP-28122、ピリドン14、ピリドン15、CRL151104A、およびWZ-5-126からなる群から選択される、請求項12~18のいずれか1項に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項20】

前記ALK小分子キナーゼ阻害剤は、PF-02341066である、請求項19に記載

10

20

30

40

50

載の単離されたポリペプチド。

【請求項 2 1】

少なくとも 1 つの A L K 小分子キナーゼ阻害剤に耐性である A L K 耐性突然変異体ポリペプチドを発現するように変化させられた非ヒトトランスジェニック動物であって、前記 A L K 耐性突然変異体ポリペプチドは、以下からなる群から選択される少なくとも 1 つの A L K キナーゼ阻害剤耐性突然変異体残基を有する、非ヒトトランスジェニック動物：

- a) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 1 2 3 位に対応する位置におけるセリン残基、
  - b) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 1 2 3 位に対応する位置におけるアラニン残基、
  - c) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 1 2 9 位に対応する位置におけるバリン残基、
  - d) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 1 3 2 位に対応する位置におけるリジン残基、
  - e) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 1 5 1 位に対応する位置におけるメチオニン残基
- 、
- f) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 1 5 6 位に対応する位置におけるチロシン残基、
  - g) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 1 7 4 位に対応する位置におけるシステイン残基
- 、
- h) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 1 7 4 位に対応する位置におけるイソロイシン残基、
  - i) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 1 7 4 位に対応する位置におけるバリン残基、
  - j) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 1 7 4 位に対応する位置におけるロイシン残基、
  - k) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 2 0 2 位に対応する位置におけるアルギニン残基
- 、
- l) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 2 0 3 位に対応する位置におけるアスパラギン残基、
  - m) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 2 1 0 位に対応する位置におけるリジン残基、
  - n) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 2 6 9 位に対応する位置におけるアラニン残基、
  - o) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 4 0 6 位に対応する位置におけるリジン残基、および
  - p) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 4 0 8 位に対応する位置におけるリジン残基。

【請求項 2 2】

少なくとも 1 つの A L K 小分子キナーゼ阻害剤に耐性である A L K 耐性突然変異体ポリペプチドに特異的に結合する抗体であって、前記 A L K 耐性突然変異体ポリペプチドは、以下からなる群から選択される少なくとも 1 つの A L K キナーゼ阻害剤耐性突然変異体残基を有する、抗体：

- a) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 1 2 3 位に対応する位置におけるセリン残基、
  - b) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 1 2 3 位に対応する位置におけるアラニン残基、
  - c) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 1 2 9 位に対応する位置におけるバリン残基、
  - d) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 1 3 2 位に対応する位置におけるリジン残基、
  - e) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 1 5 1 位に対応する位置におけるメチオニン残基
- 、
- f) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 1 5 6 位に対応する位置におけるチロシン残基、
  - g) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 1 7 4 位に対応する位置におけるシステイン残基
- 、
- h) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 1 7 4 位に対応する位置におけるイソロイシン残基、
  - i) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 1 7 4 位に対応する位置におけるバリン残基、
  - j) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 1 7 4 位に対応する位置におけるロイシン残基、
  - k) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 2 0 2 位に対応する位置におけるアルギニン残基
- 、
- l) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 2 0 3 位に対応する位置におけるアスパラギン残基、

- m) 配列番号2のアミノ酸残基1210位に対応する位置におけるリジン残基、
- n) 配列番号2のアミノ酸残基1269位に対応する位置におけるアラニン残基、
- o) 配列番号2のアミノ酸残基1406位に対応する位置におけるリジン残基、お

よび

- p) 配列番号2のアミノ酸残基1408位に対応する位置におけるリジン残基。

【請求項23】

前記ALK耐性突然変異体ポリペプチドは、請求項12～20のいずれか1項に記載の単離されたポリペプチドを含む、請求項22に記載の抗体。

【請求項24】

請求項22または23に記載の抗体を含む、生物学的試料中のALK阻害剤耐性突然変異を検出するためのキット。

10

【請求項25】

ALKに結合する抗体の検出のための化学物質を更に含む、請求項24に記載のキット。

【請求項26】

ALK阻害剤耐性突然変異を有するALK耐性突然変異体ポリヌクレオチドを特異的に検出または特異的に増幅することができる少なくとも1つのポリヌクレオチドを含む試薬を含む、生物学的試料中のALK阻害剤耐性突然変異を検出するためのキットであって、前記ALK耐性突然変異体ポリヌクレオチドは、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるALK耐性突然変異体ポリペプチドをコードし、前記ALK耐性突然変異体ポリペプチドは、以下からなる群から選択される少なくとも1つのALKキナーゼ阻害剤耐性突然変異体残基を有する、キット：

20

- a) 配列番号2のアミノ酸残基1123位に対応する位置におけるセリン残基、
- b) 配列番号2のアミノ酸残基1123位に対応する位置におけるアラニン残基、
- c) 配列番号2のアミノ酸残基1129位に対応する位置におけるバリン残基、
- d) 配列番号2のアミノ酸残基1132位に対応する位置におけるリジン残基、
- e) 配列番号2のアミノ酸残基1151位に対応する位置におけるメチオニン残基

、

- f) 配列番号2のアミノ酸残基1156位に対応する位置におけるチロシン残基、
- g) 配列番号2のアミノ酸残基1174位に対応する位置におけるシステイン残基

30

、

- h) 配列番号2のアミノ酸残基1174位に対応する位置におけるイソロイシン残

基、

- i) 配列番号2のアミノ酸残基1174位に対応する位置におけるバリン残基、
- j) 配列番号2のアミノ酸残基1174位に対応する位置におけるロイシン残基、
- k) 配列番号2のアミノ酸残基1202位に対応する位置におけるアルギニン残基

、

- l) 配列番号2のアミノ酸残基1203位に対応する位置におけるアスパラギン残

基、

- m) 配列番号2のアミノ酸残基1210位に対応する位置におけるリジン残基、
- n) 配列番号2のアミノ酸残基1269位に対応する位置におけるアラニン残基、
- o) 配列番号2のアミノ酸残基1406位に対応する位置におけるリジン残基、
- p) 配列番号2のアミノ酸残基1408位に対応する位置におけるリジン残基。

40

【請求項27】

ALK耐性突然変異体ポリヌクレオチドを特異的に検出または特異的に増幅することができる前記少なくとも1つのポリヌクレオチドは、請求項1～9のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドを特異的に検出または特異的に増幅することができる、請求項26に記載のキット。

【請求項28】

前記試薬は、前記ALK阻害剤耐性突然変異を含むアンプリコンを増幅する一対のブラ

50

イマーを含む、請求項 26 に記載のキット。

【請求項 29】

前記試薬は、ストリンジェントな条件下で前記 A L K 耐性突然変異体ポリヌクレオチドとハイブリッド形成し、それによって前記 A L K 阻害剤耐性突然変異を検出するポリヌクレオチド配列を含む少なくとも 1 つのプローブを含む、請求項 26 に記載のキット。

【請求項 30】

A L K 阻害剤耐性突然変異について生物学的試料をアッセイするための方法であって、前記生物学的試料を請求項 22 に記載の抗体と接触させることと、前記抗体の、前記 A L K 阻害剤耐性突然変異を有する A L K への結合を検出することと、を含む、方法。

【請求項 31】

異常な A L K 活性に関連する癌を有する患者において、少なくとも 1 つの A L K 小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるかまたは耐性を発達させる可能性が高い癌を診断するための方法であって、A L K 阻害剤耐性突然変異の存在について、前記患者からの生物学的試料をアッセイすることを含み、前記方法は、前記生物学的試料を請求項 22 に記載の抗体と接触させることと、前記抗体の、前記 A L K 阻害剤耐性突然変異を有する A L K への結合を検出することと、を含み、前記 A L K 阻害剤耐性突然変異を有する前記 A L K の存在は、前記患者が、少なくとも 1 つの A L K 小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるかまたは耐性を発達させる可能性が高い癌を有することを示す、方法。

【請求項 32】

A L K 阻害剤耐性突然変異について生物学的試料をアッセイするための方法であって、前記生物学的試料を、A L K 阻害剤耐性突然変異を有する A L K 耐性突然変異体ポリヌクレオチドを特異的に検出または特異的に増幅することができる少なくとも 1 つのポリヌクレオチドを含む試薬と接触させることを含み、前記 A L K 耐性突然変異体ポリヌクレオチドは、少なくとも 1 つの A L K 小分子キナーゼ阻害剤に耐性である A L K 耐性突然変異体ポリペプチドをコードし、前記 A L K 耐性突然変異体ポリペプチドは、以下からなる群から選択される少なくとも 1 つの A L K キナーゼ阻害剤耐性突然変異体残基を有する、方法

- a) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 1 2 3 位に対応する位置におけるセリン残基、
- b) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 1 2 3 位に対応する位置におけるアラニン残基、
- c) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 1 2 9 位に対応する位置におけるバリン残基、
- d) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 1 3 2 位に対応する位置におけるリジン残基、
- e) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 1 5 1 位に対応する位置におけるメチオニン残基

、

- f) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 1 5 6 位に対応する位置におけるチロシン残基、
- g) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 1 7 4 位に対応する位置におけるシステイン残基

、

- h) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 1 7 4 位に対応する位置におけるイソロイシン残

基、

- i) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 1 7 4 位に対応する位置におけるバリン残基、
- j) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 1 7 4 位に対応する位置におけるロイシン残基、
- k) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 2 0 2 位に対応する位置におけるアルギニン残基

、

- l) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 2 0 3 位に対応する位置におけるアスパラギン残

基、

- m) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 2 1 0 位に対応する位置におけるリジン残基、
- n) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 2 6 9 位に対応する位置におけるアラニン残基、
- o) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 4 0 6 位に対応する位置におけるリジン残基、お

よび

- p) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 4 0 8 位に対応する位置におけるリジン残基。

【請求項 33】

10

20

30

40

50

異常な A L K 活性に関連する癌を有する患者において、少なくとも 1 つの A L K 小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるかまたは耐性を発達させる可能性が高い癌を診断するための方法であって、A L K 阻害剤耐性突然変異の存在について、前記患者からの生物学的試料をアッセイすることを含み、前記方法は、前記生物学的試料を、A L K 阻害剤耐性突然変異を有する A L K 耐性突然変異体ポリヌクレオチドを特異的に検出または特異的に増幅することができる少なくとも 1 つのポリヌクレオチドを含む試薬と接触させることであって、前記 A L K 耐性突然変異体ポリヌクレオチドは、少なくとも 1 つの A L K 小分子キナーゼ阻害剤に耐性である A L K 耐性突然変異体ポリペプチドをコードし、前記 A L K 耐性突然変異体ポリペプチドは、以下 a ) ~ p ) からなる群から選択される少なくとも 1 つの A L K キナーゼ阻害剤耐性突然変異体残基を有することと：

- a ) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 1 2 3 位に対応する位置におけるセリン残基、
- b ) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 1 2 3 位に対応する位置におけるアラニン残基、
- c ) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 1 2 9 位に対応する位置におけるバリン残基、
- d ) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 1 3 2 位に対応する位置におけるリジン残基、
- e ) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 1 5 1 位に対応する位置におけるメチオニン残基、
- f ) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 1 5 6 位に対応する位置におけるチロシン残基、
- g ) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 1 7 4 位に対応する位置におけるシステイン残基、
- h ) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 1 7 4 位に対応する位置におけるイソロイシン残基、
- i ) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 1 7 4 位に対応する位置におけるバリン残基、
- j ) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 1 7 4 位に対応する位置におけるロイシン残基、
- k ) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 2 0 2 位に対応する位置におけるアルギニン残基、
- l ) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 2 0 3 位に対応する位置におけるアスパラギン残基、
- m ) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 2 1 0 位に対応する位置におけるリジン残基、
- n ) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 2 6 9 位に対応する位置におけるアラニン残基、
- o ) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 4 0 6 位に対応する位置におけるリジン残基、お
- p ) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 4 0 8 位に対応する位置におけるリジン残基、

および前記生物学的試料中の前記 A L K 阻害剤耐性突然変異の存在または不在を検出することと、を含み、前記 A L K 阻害剤耐性突然変異の存在は、前記患者が、少なくとも 1 つの A L K 小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるかまたは耐性を発達させる可能性が高い癌を有することを示す、方法。

#### 【請求項 3 4】

A L K 耐性突然変異体ポリヌクレオチドを特異的に検出または特異的に増幅することができる前記少なくとも 1 つのポリヌクレオチドは、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチドを特異的に検出または特異的に増幅することができる、請求項 3 2 または 3 3 に記載の方法。

#### 【請求項 3 5】

対象において、少なくとも 1 つの A L K 小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるかまたは耐性を発達させる可能性が高い癌を診断するための方法であって、A L K 阻害剤耐性突然変異を有する A L K 発癌性融合タンパク質の存在について、前記対象からの生物学的試料をアッセイすることを含み、前記方法は、前記生物学的試料を、請求項 1 5 ~ 1 7 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドに特異的に結合する抗体と接触させることと、前記抗体の、A L K 耐性突然変異を有する前記 A L K 発癌性融合タンパク質への結合を検出することと、を含み、前記 A L K 阻害剤耐性突然変異を有する A L K 発癌性融合タンパク質の存在は、前記対象が、少なくとも 1 つの A L K 小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるかまたは耐性

10

20

30

40

50

を発達させる可能性が高い癌を有することを示す、方法。

【請求項 36】

対象において、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるかまたは耐性を発達させる可能性が高い癌を診断するための方法であって、ALK阻害剤耐性突然変異を有するALK発癌性融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドの存在について、前記対象からの生物学的試料をアッセイすることを含み、前記方法は、前記生物学的試料を、ALK阻害剤耐性突然変異を有するALK発癌性融合タンパク質をコードする前記ポリヌクレオチドを特異的に検出または特異的に増幅することができる少なくとも1つのポリヌクレオチドを含む試薬と接触させることであって、前記少なくとも1つのポリヌクレオチドは、請求項4～6のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドを特異的に検出または特異的に増幅することが可能であることと、前記生物学的試料中の、前記ALK阻害剤耐性突然変異を有するALK発癌性融合タンパク質をコードする前記ポリヌクレオチドの存在または不在を検出することと、を含み、前記ALK阻害剤耐性突然変異を有する前記ALK発癌性融合タンパク質をコードする前記ポリヌクレオチドの存在は、前記対象が、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるかまたは耐性を発達させる可能性が高い癌を有することを示す、方法。

10

【請求項 37】

前記ALK小分子キナーゼ阻害剤は、PF-0234166、NVP-TAE684、スタウロスポリン、7-ヒドロキシスタウロスポリン、CEP-14083、CEP-14513、CEP-28122、ピリドン14、ピリドン15、CRL151104A、およびWZ-5-126からなる群から選択される、請求項30～36のいずれか1項に記載の方法。

20

【請求項 38】

前記ALK小分子キナーゼ阻害剤は、PF-02341066である、請求項37に記載の方法。

【請求項 39】

異常なALK活性に関連する癌を有する患者において、PF-02341066に耐性であるかまたは耐性を発達させる可能性が高い癌を診断するための方法であって、ALK阻害剤耐性突然変異の存在について、前記患者からの生物学的試料をアッセイすることを含み、前記方法は、前記生物学的試料を、PF-02341066に耐性であるALK耐性突然変異体ポリペプチドに特異的に結合する抗体と接触させることであって、前記ALK耐性突然変異体ポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸残基1196位に対応する位置にメチオニン残基を有することと、前記抗体の、前記ALK耐性突然変異を有するALKへの結合を検出することと、を含み、前記ALK阻害剤耐性突然変異を有する前記ALKの存在は、前記患者が、PF-02341066に耐性であるかまたは耐性を発達させる可能性が高い癌を有することを示す、方法。

30

【請求項 40】

前記ALK耐性突然変異体ポリペプチドは、以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項39に記載の方法：

a) 配列番号24に記載されるアミノ酸配列、および

40

b) 配列番号24に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、前記ポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸残基1196位に対応する位置にメチオニン残基を有し、また前記ポリペプチドは、PF-02341066に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列。

【請求項 41】

前記ALK耐性突然変異体ポリペプチドは、以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項39に記載の方法：

a) 配列番号52に記載されるアミノ酸配列、および

b) 配列番号52に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、前記ポリペプチドは、PF-02341066に耐性であるキナーゼ活性を有す

50

る、アミノ酸配列。

【請求項 4 2】

前記 A L K 耐性突然変異体ポリペプチドは、A L K 発癌性融合タンパク質パートナーを更に含み、故に A L K 発癌性融合タンパク質を含む、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 3】

前記 A L K 耐性突然変異体ポリペプチドは、以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 3 9 に記載の方法：

- a) 配列番号 8 4 に記載されるアミノ酸配列、および
- b) 配列番号 8 4 に対して少なくとも 9 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、前記ポリペプチドは、P F - 0 2 3 4 1 0 6 6 に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列。

10

【請求項 4 4】

異常な A L K 活性に関連する癌を有する患者において、P F - 0 2 3 4 1 0 6 6 に耐性であるかまたは耐性を発達させる可能性が高い癌を診断するための方法であって、A L K 阻害剤耐性突然変異の存在について、前記対象からの生物学的試料をアッセイすることを含み、前記方法は、以下を含む、方法：

- a) 前記生物学的試料を、A L K 阻害剤耐性突然変異を有する A L K 耐性突然変異体ポリヌクレオチドを特異的に検出または特異的に増幅することができる少なくとも 1 つのポリヌクレオチドを含む試薬と接触させることであって、前記 A L K 耐性突然変異体ポリヌクレオチドは、P F - 0 2 3 4 1 0 6 6 に耐性である A L K 耐性突然変異体ポリペ

20

- チドをコードし、前記 A L K 耐性突然変異体ポリペプチドは、配列番号 2 のアミノ酸残基 1 1 9 6 位に対応する位置にメチオニン残基を有する、および
- b) 前記生物学的試料中の前記 A L K 阻害剤耐性突然変異の存在または不在を検出することであって、前記 A L K 阻害剤耐性突然変異の存在は、前記患者が、P F - 0 2 3 4 1 0 6 6 に耐性であるかまたは耐性を発達させる可能性が高い癌を有することを示す。

【請求項 4 5】

前記 A L K 耐性突然変異体ポリヌクレオチドは、以下からなる群から選択されるポリヌクレオチドを含む、請求項 4 4 に記載の方法：

- a) 配列番号 2 3、5 1、または 8 3 に記載されるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド、
- b) 配列番号 2 4、5 2、または 8 4 に記載されるアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド、および

30

- c) 配列番号 2 3、5 1、もしくは 8 3 に対して少なくとも 9 0 % の配列同一性を有するポリヌクレオチド、または配列番号 2 4、5 2、もしくは 8 4 に対して少なくとも 9 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドであって、前記ポリヌクレオチドは、配列番号 2 のアミノ酸残基 1 1 2 3 位に対応する位置にメチオニン残基を有するポリペプチドをコードし、また前記ポリヌクレオチドは、P F - 0 2 3 4 1 0 6 6 に耐性であるキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド。

【請求項 4 6】

対象において、P F - 0 2 3 4 1 0 6 6 に耐性であるかまたは耐性を発達させる可能性が高い癌を診断するための方法であって、A L K 阻害剤耐性突然変異を有する A L K 発癌性融合タンパク質の存在について、前記対象からの生物学的試料をアッセイすることを含み、前記方法は、以下を含む、方法：

40

- a) 前記生物学的試料を、以下 i) および i i) からなる群から選択されるポリペプチドを含む A L K 発癌性融合タンパク質に特異的に結合する抗体と接触させることと：

- i) 配列番号 5 2 に記載されるアミノ酸配列、および
- i i) 配列番号 5 2 に対して少なくとも 9 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、前記ポリペプチドは、P F - 0 2 3 4 1 0 6 6 に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列、および

50



b) 前記抗体の、A L K 耐性突然変異を有する前記 A L K 発癌性融合タンパク質への結合を検出することであって、前記 A L K 阻害剤耐性突然変異を有する A L K 発癌性融合タンパク質の存在は、前記対象が、P F - 0 2 3 4 1 0 6 6 に耐性であるかまたは耐性を発達させる可能性が高い癌を有することを示すこと。

【請求項 4 7】

対象において、P F - 0 2 3 4 1 0 6 6 に耐性であるかまたは耐性を発達させる可能性が高い癌を診断するための方法であって、A L K 阻害剤耐性突然変異を有する A L K 発癌性融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドの存在について、前記対象からの生物学的試料をアッセイすることを含み、前記方法は、以下を含む、方法：

a) 前記生物学的試料を、A L K 発癌性融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを特異的に検出または特異的に増幅することができる少なくとも一つのポリヌクレオチドを含む試薬と接触させることであって、A L K 発癌性融合タンパク質をコードする前記ポリヌクレオチドは、以下 i) ~ i i i) からなる群から選択されるポリヌクレオチドを含むこと：

- i) 配列番号 5 1 に記載されるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド、
- i i) 配列番号 5 2 に記載されるアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド

、および

i i i) 配列番号 5 1 に対して少なくとも 9 0 % の配列同一性を有するポリヌクレオチド、または配列番号 5 2 に対して少なくとも 9 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドであって、前記ポリヌクレオチドは、配列番号 2 のアミノ酸残基 1 1 2 3 位に対応する位置にメチオン残基を有するポリペプチドをコードし、また前記ポリヌクレオチドは、P F - 0 2 3 4 1 0 6 6 に耐性であるキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド、および

b) 前記生物学的試料中の、前記 A L K 阻害剤耐性突然変異を有する A L K 発癌性融合タンパク質をコードする前記ポリヌクレオチドの存在または不在を検出することであって、前記 A L K 阻害剤耐性突然変異を有する前記 A L K 発癌性融合タンパク質をコードする前記ポリヌクレオチドの存在は、前記対象が、P F - 0 2 3 4 1 0 6 6 に耐性であるかまたは耐性を発達させる可能性が高い癌を有することを示す。

【請求項 4 8】

前記 A L K 発癌性融合タンパク質は、ヌクレオホスミン ( N P M )、非筋肉トロポミオシン 3 ( T P M 3 )、5 - アミノイミダゾール - 4 - カルボキサミドリボヌクレオチドホルミルトランスフェラーゼ / I M P シクロヒドロラーゼ ( A T I C )、クラスリン重鎖 ( C L T C )、T R K - 融合遺伝子 ( T F G )、非筋肉トロポミオシン 4 ( T P M 4 )、モエシン ( M S N )、R a n 結合タンパク質 2 ( R a n B P 2 )、微小管会合タンパク質様 4 ( E M L 4 )、システニル t R N A 合成酵素 ( C A R S )、キネシンファミリーメンバー 5 B ( K I F 5 B )、非筋肉ミオシン重鎖 9 ( M Y H 9 )、S E C 3 1 ホモログ A ( S E C 3 1 L 1 )、およびリングフィンガータンパク質 2 1 3 ( R N F 2 1 3 ) / 染色体 1 7 上の A L K リンパ腫オリゴマー化パートナー ( A L O 1 7 ) からなる群から選択される A L K 発癌性融合タンパク質パートナーを含む、請求項 4 6 または 4 7 に記載の方法。

【請求項 4 9】

前記発癌性融合タンパク質パートナーは、配列番号 9 7 に記載されるアミノ酸配列を有する、請求項 4 8 に記載の方法。

【請求項 5 0】

前記ポリヌクレオチドを検出することは、核酸配列決定技術、核酸増幅方法、または核酸ハイブリダイゼーション技術を含む、請求項 3 2 ~ 3 4、3 6、4 4、4 5、および 4 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 1】

前記癌は、大細胞型 B 細胞リンパ腫、未分化大細胞リンパ腫 ( A L C L )、悪性組織球症、炎症性筋線維芽細胞性腫瘍肉腫、食道扁平上皮癌、乳癌、結腸直腸癌、非小細胞肺癌、神経芽細胞腫、膀胱癌、腎臓癌、および膠芽腫からなる群から選択される、請求項 3 1

10

20

30

40

50

、 33、 35、 36、 および 39 ~ 49 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 2】

前記患者のために治療法を選択することを更に含む、請求項 31、 33、 35、 36、 および 39 ~ 49 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 3】

少なくとも 1 つの A L K 小分子キナーゼ阻害剤に耐性である A L K 耐性突然変異体の発現を特異的に低減する方法であって、前記方法は、前記 A L K 耐性突然変異体を発現する細胞中に、前記 A L K 耐性突然変異体をコードする遺伝子を標的とするサイレンシング因子を導入することを含み、前記サイレンシング因子の前記導入または発現は、前記 A L K 耐性突然変異体の前記発現を特異的に低減し、前記 A L K 耐性突然変異体は、請求項 12 ~ 20 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドである、方法。

10

【請求項 5 4】

少なくとも 1 つの A L K 小分子キナーゼ阻害剤に耐性である異常な A L K 活性に関連する癌を治療する方法であって、前記方法は、前記少なくとも 1 つの A L K 小分子キナーゼ阻害剤に耐性である A L K 耐性突然変異体をコードする遺伝子を標的とする、有効量のサイレンシング因子を投与することを含み、前記サイレンシング因子の前記導入または発現は、前記 A L K 耐性突然変異体の発現を低減し、前記 A L K 耐性突然変異体は、請求項 12 ~ 20 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドである、方法。

【請求項 5 5】

P F - 02341066 に耐性である異常な A L K 活性に関連する癌を治療する方法であって、前記方法は、P F - 02341066 に耐性である A L K 耐性突然変異体をコードする遺伝子を標的とする、有効量のサイレンシング因子を投与することを含み、前記サイレンシング因子の前記導入または発現は、前記 A L K 耐性突然変異体の発現を低減し、前記 A L K 耐性突然変異体は、以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドである、方法：

20

a) 配列番号 24 に記載されるアミノ酸配列、および

b) 配列番号 24 に対して少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、前記ポリペプチドは、配列番号 2 のアミノ酸残基 1196 位に対応する位置にメチオニン残基を有し、また前記ポリペプチドは、P F - 02341066 に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列。

30

【請求項 5 6】

前記ポリペプチドは、以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 55 に記載の方法

a) 配列番号 52 に記載されるアミノ酸配列、および

b) 配列番号 52 に対して少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、前記ポリペプチドは、P F - 02341066 に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列。

【請求項 5 7】

前記ポリペプチドは、A L K 発癌性融合タンパク質パートナーを更に含む、故に A L K 発癌性融合タンパク質を含む、請求項 56 に記載の方法。

40

【請求項 5 8】

前記ポリペプチドは、以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 55 に記載の方法：

a) 配列番号 84 に記載されるアミノ酸配列、および

b) 配列番号 84 に対して少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、前記ポリペプチドは、P F - 02341066 に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列。

【請求項 5 9】

前記癌は、大細胞型 B 細胞リンパ腫、未分化大細胞リンパ腫 (A L C L)、悪性組織球症、炎症性筋線維芽細胞性腫瘍肉腫、食道扁平上皮癌、乳癌、結腸直腸癌、非小細胞肺癌

50

、神経芽細胞腫、膀胱癌、腎臓癌、および膠芽腫からなる群から選択される、請求項 5 4 ~ 5 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 0】

a) 候補薬剤を請求項 1 2 ~ 2 0 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドと接触させることと、

b) 前記候補薬剤が、前記ポリペプチドのキナーゼ活性を阻害するかどうかを決定することと、

を含む、A L K 耐性突然変異体または A L K 融合タンパク質のキナーゼ活性を阻害することが可能な薬剤を特定する方法。

【請求項 6 1】

前記ポリペプチドは、真核細胞中で発現され、前記ポリペプチドは、請求項 1 5 ~ 1 7 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドであり、前記薬剤が前記ポリペプチドのキナーゼ活性を阻害するかどうかを決定することは、前記細胞を、

a) 細胞増殖の阻害と、

b) 細胞死の刺激と、

c) 足場非依存性増殖の阻害と、

d) 細胞遊走または浸潤の阻害と、

からなる群から選択される、細胞活性における少なくとも 1 つの変化について監視することを含み、

細胞活性における前記変化のうちの少なくとも 1 つを誘導する薬剤が、前記 A L K 耐性突然変異体の阻害剤として特定される、請求項 6 0 に記載の方法。

【請求項 6 2】

非ヒト動物は、前記ポリペプチドを発現するように変化させられているか、または前記ポリペプチドを発現する真核細胞は、非ヒト動物中に導入されており、前記ポリペプチドは、請求項 1 5 ~ 1 7 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドであり、前記薬剤が前記ポリペプチドのキナーゼ活性を阻害するかどうかを決定することは、前記非ヒト動物を腫瘍増殖について監視することを含み、腫瘍増殖の低減は、薬剤が、前記ポリペプチドのキナーゼ活性を阻害することを示す、請求項 6 0 に記載の方法。

【請求項 6 3】

前記ポリペプチドは、真核細胞中で発現され、前記ポリペプチドは、請求項 1 2 または 1 8 に記載の単離されたポリペプチドであり、前記ポリペプチドのキナーゼ活性は、活性化され、前記薬剤が前記ポリペプチドのキナーゼ活性を阻害するかどうかを決定することは、前記細胞を、

a) 細胞増殖の阻害と、

b) 細胞死の刺激と、

c) 足場非依存性増殖の阻害と、

d) 細胞遊走または浸潤の阻害と、からなる群から選択される、細胞活性における少なくとも 1 つの変化について監視することを含み、

細胞活性における前記変化のうちの少なくとも 1 つを誘導する薬剤は、前記 A L K 耐性突然変異体の阻害剤として特定される、請求項 6 0 に記載の方法。

【請求項 6 4】

a) 候補薬剤を請求項 1 3 ~ 2 1 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドと接触させるステップと、

b) 前記候補薬剤が前記ポリペプチドに特異的に結合するかどうかを決定するステップと、

を含む、請求項 1 2 ~ 2 0 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドに特異的に結合することが可能な薬剤を特定する方法。

【請求項 6 5】

前記ポリペプチドは、活性または不活性状態にある、請求項 6 4 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

10

20

30

40

50

## 【技術分野】

## 【0001】

連邦政府による資金提供を受けた研究開発

本発明は、国立衛生研究所の一部門である、国立癌研究所によって授与された認可番号 C A 6 9 1 2 9 の下で、米国政府支援により行われた。米国政府は本発明において一定の権利を有する。

## 【0002】

E F S - W E B を介してテキストファイルで提出された配列表への参照

配列表の正式な写しは、404108SEQLIST.TXTと名付けられ、2011年4月12日に作成され、951キロバイトのサイズを有するファイルにより、ASCII形式の配列表として、EFS-Webを介して電子的に提出され、また本明細書と同時に  
10  
出願される。このASCII形式の文書に含まれる配列表は、本明細書の一部であり、ここで参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

## 【0003】

本発明は、一般に、未分化リンパ腫キナーゼ (ALK) キナーゼ阻害剤に耐性である癌の検出および治療に関する。

## 【背景技術】

## 【0004】

未分化リンパ腫キナーゼ (ALK) は、当初、未分化大細胞リンパ腫中において構成性  
20  
活性型の発癌性融合型のうちの1つの形態、すなわちヌクレオホスミン (NPM) ALK  
で同定された、インスリン受容体スーパーファミリーにおける受容体型チロシンキナーゼ  
(RTK) である (Morris et al. (1994) Science 263 :  
1281 - 1284 ; Morris et al. (1997) Oncogene 14  
: 2175 - 2188)。その後の研究により、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、悪性  
組織球症、炎症性筋線維芽細胞性腫瘍肉腫、食道扁平上皮癌、乳癌、結腸直腸癌、および  
非小細胞肺癌のサブセットにおけるALK融合が特定されている (Webb et al.  
(2009) Expert Rev Anticancer Ther 9 : 331 -  
356 に概説される)。より最近では、ALKのゲノムDNA増幅およびタンパク質過剰  
30  
発現、ならびに活性化点突然変異が、神経芽細胞腫を引き起こすことが示されている (W  
ebb et al. (2009) Expert Rev Anticancer Ther  
9 : 331 - 356、George et al. (2008) Nature 4  
55 : 975 - 979)。癌の原因となる異常なALK活性の役割が十分に検証されてい  
るこれらの癌に加えて、さらなる状況的な関連によって、報告されているALKリガンド  
であるプレイオトロフィン、およびミッドカインと共に、自己分泌および/または傍分泌  
成長ループが関与する受容体活性化の機構を介した、膠芽腫等のなおも他の悪性腫瘍の発  
生にALKが関連することが示される (Webb et al. (2009) Ex per  
t Rev Anticancer Ther 9 : 331 - 356)。

## 【0005】

この広範囲の癌におけるALKの突然変異、構成性活性型の関与は、それぞれ、Abe  
40  
lson (ABL) キナーゼおよび上皮成長因子受容体 (EGFR) キナーゼを標的とす  
る、小分子キナーゼ阻害剤イマチニブ (Gleevec, Novartis) およびエル  
ロチニブ (Tarceva, Genentech/OSI) に類似したALK阻害剤の開  
発において、製薬企業および生物学企業の間で大きな関心を生み出している。2001  
年以來、8つのATP競合小分子キナーゼ阻害剤 (イマチニブおよびエルロチニブを含む  
) が、米国において種々の癌適応症に承認されている (Webb et al. (200  
9) Expert Rev Anticancer Ther 9 : 331 - 356 に概  
説される)。これらの薬剤は、恐らく、メシル酸イマチニブ (Gleevec, Nova  
50  
rtis) の投与に続く、慢性骨髄性白血病 (CML) および消化管間質腫瘍 (GIST  
) を有する患者における治療効果によって最もよく例示されるように、抗癌剤として非常  
に有益であることが判明しているが、診療所でのこれらの阻害剤の使用は、薬剤耐性の腫

瘍の出現をもたらしている(O'Hare et al. (2007) Blood 110:2242-2249、Engelman and Settleman (2008) Curr Opin Genet Dev 18:1-7、Bikker et al. (2009) J Med Chem 52:1493-1509)。この耐性は、発癌性キナーゼをコードする遺伝子の増幅、ならびに代替的なシグナル伝達経路の活性化を含む幾つかの機構に起因しているが、ATP競合キナーゼ阻害剤耐性を媒介する最も一般的な機構は、キナーゼ標的のキナーゼ触媒ドメイン内またはその近くでの個々の突然変異または突然変異の群の発生である(O'Hare et al. (2007) Blood 110:2242-2249、Engelman and Settleman (2008) Curr Opin Genet Dev 18:1-7、Bikker et al. (2009) J Med Chem 52:1493-1509)。これらの突然変異は、それらの触媒ドメインによるATP結合を未変化に保ちながら、阻害剤のそれらのキナーゼ標的との高親和性相互作用を妨げる。キナーゼ阻害剤に対する臨床耐性の出現およびかかる耐性を付与するキナーゼドメイン突然変異の特定は、腫瘍が第一世代の薬剤での治療にもはや反応しなくなった患者を治療するための、後続薬の設計および開発を生み出している。

#### 【0006】

ALKキナーゼドメインにおける耐性突然変異の存在を検出するための堅牢な診断アッセイが、ALKキナーゼ阻害剤での治療に耐性となる癌患者における耐性の機構を確認するために、および第一世代の阻害剤耐性腫瘍を有する患者の管理のための第二世代の阻害剤の医師による、情報を得た上での選択を可能にするために、臨床適用に必要とされる。ALK阻害剤耐性の検出のためのアッセイは、現在、何ら存在しない。これらの突然変異の特定はまた、第一世代の阻害剤に耐性であるALKのこれらの突然変異型を阻害するために開発される、ALKの第二世代および後期世代阻害剤の、情報を得た上での設計および合成を先導する役割を果たすであろう。

#### 【発明の概要】

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0007】

ALKキナーゼ阻害剤に耐性であるかまたは遺伝的に耐性となる素因がある癌の特定、予後、診断、および治療のための組成物および方法が提供される。本発明は、PF-0234166等のALKキナーゼ阻害剤に耐性を付与する、ALKにおける新規突然変異の発見に基づく。ALK阻害剤耐性突然変異を含むポリペプチドおよびそれをコードするポリヌクレオチドが提供され、耐性突然変異を検出するための方法において、およびALKキナーゼ阻害剤に耐性であるかまたは耐性を発達させる可能性が高い癌を診断するために使用するためのバイオマーカーとして使用される。本開示の耐性突然変異を含むALKポリペプチドに特異的に結合する抗体、本抗体を含むキット、およびALK阻害剤耐性突然変異を有するALKをコードするポリヌクレオチドを特異的に検出または特異的に増幅することが可能なポリヌクレオチド(複数可)を含むキットもまた、生物学的試料中の耐性突然変異の検出のために、本明細書に提供される。耐性突然変異を含むALKまたはALK発癌性融合タンパク質に特異的に結合するかつ/またはそれらの活性を阻害する薬剤を特定するための方法が更に提供される。

#### 【0008】

次の実施形態が、本発明によって包含される。

1. 以下からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む、単離されたポリヌクレオチド:

a) 配列番号5、7、9、11、13、15、17、19、21、25、27、29、31、98、100、または102に記載されるヌクレオチド配列、

b) 配列番号6、8、10、12、14、16、18、20、22、26、28、30、32、99、101、または103に記載されるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列、

c) 配列番号5に対して少なくとも90%の配列同一性を有するヌクレオチド配列、または配列番号6に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列であって、該ポリヌクレオチドが、配列番号2のアミノ酸残基1123位に対応する位置にセリン残基を有するポリペプチドをコードし、また該ポリヌクレオチドが、少なくとも1つの未分化リンパ腫キナーゼ(ALK)小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする、ヌクレオチド配列、

d) 配列番号7に対して少なくとも90%の配列同一性を有するヌクレオチド配列、または配列番号8に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列であって、該ポリヌクレオチドが、配列番号2のアミノ酸残基1123位に対応する位置にアラニン残基を有するポリペプチドをコードし、また該ポリヌクレオチドが、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする、ヌクレオチド配列、

e) 配列番号9に対して少なくとも90%の配列同一性を有するヌクレオチド配列、または配列番号10に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列であって、該ポリヌクレオチドが、配列番号2のアミノ酸残基1129位に対応する位置にそのパリン残基を有するポリペプチドをコードし、また該ポリヌクレオチドが、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする、ヌクレオチド配列、

f) 配列番号11に対して少なくとも90%の配列同一性を有するヌクレオチド配列、または配列番号12に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列であって、該ポリヌクレオチドが、配列番号2のアミノ酸残基1132位に対応する位置にリジン残基を有するポリペプチドをコードし、また該ポリヌクレオチドが、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする、ヌクレオチド配列、

g) 配列番号13に対して少なくとも90%の配列同一性を有するヌクレオチド配列、または配列番号14に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列であって、該ポリヌクレオチドが、配列番号2のアミノ酸残基1151位に対応する位置にメチオン残基を有するポリペプチドをコードし、また該ポリヌクレオチドが、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする、ヌクレオチド配列、

h) 配列番号15に対して少なくとも90%の配列同一性を有するヌクレオチド配列、または配列番号16に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列であって、該ポリヌクレオチドが、配列番号2のアミノ酸残基1156位に対応する位置にチロシン残基を有するポリペプチドをコードし、また該ポリヌクレオチドが、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする、ヌクレオチド配列、

i) 配列番号17に対して少なくとも90%の配列同一性を有するヌクレオチド配列、または配列番号18に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列であって、該ポリヌクレオチドが、配列番号2のアミノ酸残基1174位に対応する位置にシステイン残基を有するポリペプチドをコードし、また該ポリヌクレオチドが、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする、ヌクレオチド配列、

j) 配列番号19に対して少なくとも90%の配列同一性を有するヌクレオチド配列、または配列番号20に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列であって、該ポリヌクレオチドが、配列番号2のアミノ酸残基1174位に対応する位置にイソロイシン残基を有するポリペプチドをコードし、また該ポリヌクレオチドが、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする、ヌクレオチド配列、

k) 配列番号21に対して少なくとも90%の配列同一性を有するヌクレオチド配列、または配列番号22に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を

10

20

30

40

50

コードするヌクレオチド配列であって、該ポリヌクレオチドが、配列番号2のアミノ酸残基1174位に対応する位置にバリン残基を有するポリペプチドをコードし、また該ポリヌクレオチドが、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする、ヌクレオチド配列、

l) 配列番号25に対して少なくとも90%の配列同一性を有するヌクレオチド配列、または配列番号26に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列であって、該ポリヌクレオチドが、配列番号2のアミノ酸残基1202位に対応する位置にアルギニン残基を有するポリペプチドをコードし、また該ポリヌクレオチドが、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする、ヌクレオチド配列、

m) 配列番号27に対して少なくとも90%の配列同一性を有するヌクレオチド配列、または配列番号28に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列であって、該ポリヌクレオチドが、配列番号2のアミノ酸残基1203位に対応する位置にアスパラギン残基を有するポリペプチドをコードし、また該ポリヌクレオチドが、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする、ヌクレオチド配列、

n) 配列番号29に対して少なくとも90%の配列同一性を有するヌクレオチド配列、または配列番号30に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列であって、該ポリヌクレオチドが、配列番号2のアミノ酸残基1210位に対応する位置にリジン残基を有するポリペプチドをコードし、また該ポリヌクレオチドが、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする、ヌクレオチド配列、

o) 配列番号31に対して少なくとも90%の配列同一性を有するヌクレオチド配列、または配列番号32に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列であって、該ポリヌクレオチドが、配列番号2のアミノ酸残基1269位に対応する位置にアラニン残基を有するポリペプチドをコードし、また該ポリヌクレオチドが、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする、ヌクレオチド配列、

p) 配列番号98に対して少なくとも90%の配列同一性を有するヌクレオチド配列、または配列番号99に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列であって、該ポリヌクレオチドが、配列番号2のアミノ酸残基1406位に対応する位置にリジン残基を有するポリペプチドをコードし、また該ポリヌクレオチドが、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする、ヌクレオチド配列、

q) 配列番号100に対して少なくとも90%の配列同一性を有するヌクレオチド配列、または配列番号101に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列であって、該ポリヌクレオチドが、配列番号2のアミノ酸残基1408位に対応する位置にリジン残基を有するポリペプチドをコードし、また該ポリヌクレオチドが、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする、ヌクレオチド配列、および

r) 配列番号102に対して少なくとも90%の配列同一性を有するヌクレオチド配列、または配列番号103に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列であって、該ポリヌクレオチドが、配列番号2のアミノ酸残基1174位に対応する位置にロイシン残基を有するポリペプチドをコードし、また該ポリヌクレオチドが、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする、ヌクレオチド配列。

#### 【0009】

2. 以下からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む、実施形態1に記載の単離されたポリヌクレオチド:

a) 配列番号5に対して少なくとも95%の配列同一性を有するヌクレオチド配列

10

20

30

40

50





基 1 1 7 4 位に対応する位置にバリン残基を有するポリペプチドをコードし、また該ポリヌクレオチドが、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする、ヌクレオチド配列、

j) 配列番号25に対して少なくとも95%の配列同一性を有するヌクレオチド配列、または配列番号26に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列であって、該ポリヌクレオチドが、配列番号2のアミノ酸残基1202位に対応する位置にアルギニン残基を有するポリペプチドをコードし、また該ポリヌクレオチドが、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする、ヌクレオチド配列、

k) 配列番号27に対して少なくとも95%の配列同一性を有するヌクレオチド配列、または配列番号28に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列であって、該ポリヌクレオチドが、配列番号2のアミノ酸残基1203位に対応する位置にアスパラギン残基を有するポリペプチドをコードし、また該ポリヌクレオチドが、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする、ヌクレオチド配列、

l) 配列番号29に対して少なくとも95%の配列同一性を有するヌクレオチド配列、または配列番号30に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列であって、該ポリヌクレオチドが、配列番号2のアミノ酸残基1210位に対応する位置にリジン残基を有するポリペプチドをコードし、また該ポリヌクレオチドが、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする、ヌクレオチド配列、

m) 配列番号31に対して少なくとも95%の配列同一性を有するヌクレオチド配列、または配列番号32に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列であって、該ポリヌクレオチドが、配列番号2のアミノ酸残基1269位に対応する位置にアラニン残基を有するポリペプチドをコードし、また該ポリヌクレオチドが、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする、ヌクレオチド配列、

n) 配列番号98に対して少なくとも95%の配列同一性を有するヌクレオチド配列、または配列番号99に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列であって、該ポリヌクレオチドが、配列番号2のアミノ酸残基1406位に対応する位置にリジン残基を有するポリペプチドをコードし、また該ポリヌクレオチドが、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする、ヌクレオチド配列、

o) 配列番号100に対して少なくとも95%の配列同一性を有するヌクレオチド配列、または配列番号101に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列であって、該ポリヌクレオチドが、配列番号2のアミノ酸残基1408位に対応する位置にリジン残基を有するポリペプチドをコードし、また該ポリヌクレオチドが、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする、ヌクレオチド配列、および

p) 配列番号102に対して少なくとも95%の配列同一性を有するヌクレオチド配列、または配列番号103に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列であって、該ポリヌクレオチドが、配列番号2のアミノ酸残基1174位に対応する位置にロイシン残基を有するポリペプチドをコードし、また該ポリヌクレオチドが、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする、ヌクレオチド配列。

#### 【0010】

3. 以下からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む、実施形態1に記載の単離されたポリヌクレオチド:

a) 配列番号33、35、37、39、41、43、45、47、49、53、55、57、59、61、63、または104に記載されるヌクレオチド配列、

10

20

30

40

50

b) 配列番号 34、36、38、40、42、44、46、48、50、54、56、58、60、62、64、または 105 に記載されるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列、

c) 配列番号 33、35、37、39、41、43、45、47、49、53、55、57、59、61、63、または 104 に対して少なくとも 90% の配列同一性を有するヌクレオチド配列であって、該ポリヌクレオチドが、少なくとも 1 つの ALK 小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする、ヌクレオチド配列、および

d) 配列番号 34、36、38、40、42、44、46、48、50、54、56、58、60、62、64、または 105 に対して少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、該ポリヌクレオチドが、少なくとも 1 つの ALK 小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする、ヌクレオチド配列。

10

【0011】

4. ALK 発癌性融合タンパク質パートナーをコードするヌクレオチド配列を更に含み、また該ポリヌクレオチドが、ALK 発癌性融合タンパク質をコードする、実施形態 3 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【0012】

5. 該 ALK 発癌性融合タンパク質パートナーが、ヌクレオホスミン (NPM)、非筋肉トロポミオシン 3 (TPM3)、5-アミノイミダゾール-4-カルボキサミドリボヌクレオチドホルミルトランスフェラーゼ / IMP シクロヒドロラーゼ (ATIC)、クラスリン重鎖 (CLTC)、TRK-融合遺伝子 (TFG)、非筋肉トロポミオシン 4 (TPM4)、モエシン (MSN)、Ran 結合タンパク質 2 (RanBP2)、微小管会合タンパク質様 4 (EML4)、システイニル tRNA 合成酵素 (CARS)、キネシンファミリーメンバー 5B (KIF5B)、非筋肉ミオシン重鎖 9 (MYH9)、SEC31 ホモログ A (SEC31L1)、およびリングフィンガータンパク質 213 (RNF213) / 染色体 17 上の ALK リンパ腫オリゴマー化パートナー (ALO17) からなる群から選択される、実施形態 4 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

20

【0013】

6. 該 ALK 発癌性融合タンパク質パートナーが、配列番号 97 に記載されるアミノ酸配列を有する、実施形態 5 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

30

【0014】

7. 以下からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む、実施形態 1 に記載の単離されたポリヌクレオチド：

a) 配列番号 65、67、69、71、73、75、77、79、81、85、87、89、91、93、95、または 106 に記載されるヌクレオチド配列、

b) 配列番号 66、68、70、72、74、76、78、80、82、86、88、90、92、94、96、または 107 に記載されるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列、

c) 配列番号 65、67、69、71、73、75、77、79、81、85、87、89、91、93、95、または 106 に対して少なくとも 90% の配列同一性を有するヌクレオチド配列であって、該ポリヌクレオチドが、少なくとも 1 つの ALK 小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする、ヌクレオチド配列、および

40

d) 配列番号 66、68、70、72、74、76、78、80、82、86、88、90、92、94、96、または 107 に対して少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、該ポリヌクレオチドが、少なくとも 1 つの ALK 小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする、ヌクレオチド配列。

【0015】

50

8. 該 A L K 小分子キナーゼ阻害剤が、P F - 0 2 3 4 1 6 6、N V P - T A E 6 8 4、スタウロスポリン、7 - ヒドロキシスタウロスポリン、C E P - 1 4 0 8 3、C E P - 1 4 5 1 3、C E P - 2 8 1 2 2、ピリドン 1 4、ピリドン 1 5、C R L 1 5 1 1 0 4 A、および W Z - 5 - 1 2 6 からなる群から選択される、実施形態 1 ~ 7 のいずれか 1 つに記載の単離されたポリヌクレオチド。

【 0 0 1 6 】

9. 該 A L K 小分子キナーゼ阻害剤が、P F - 0 2 3 4 1 0 6 6 である、実施形態 8 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【 0 0 1 7 】

10. プロモーターに作動可能に連結される実施形態 1 ~ 9 に記載のいずれか 1 つの単離されたポリヌクレオチドを含む、発現カセット。

【 0 0 1 8 】

11. 実施形態 10 に記載の発現カセットを含む、宿主細胞。

【 0 0 1 9 】

12. 以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド：

a) 配列番号 6、8、10、12、14、16、18、20、22、26、28、30、32、99、101、103 に記載されるアミノ酸配列、

b) 配列番号 6 に対して少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、該ポリペプチドが、配列番号 2 のアミノ酸残基 1 1 2 3 位に対応する位置にセリン残基を有し、また該ポリペプチドが、少なくとも 1 つの未分化リンパ腫キナーゼ ( A L K ) 小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列、

c) 配列番号 8 に対して少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、該ポリペプチドが、配列番号 2 のアミノ酸残基 1 1 2 3 位に対応する位置にアラニン残基を有し、また該ポリペプチドが、少なくとも 1 つの A L K 小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列、

d) 配列番号 10 に対して少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、該ポリペプチドが、配列番号 2 のアミノ酸残基 1 1 2 9 位に対応する位置にバリン残基を有し、また該ポリペプチドが、少なくとも 1 つの A L K 小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列、

e) 配列番号 12 に対して少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、該ポリペプチドが、配列番号 2 のアミノ酸残基 1 1 3 2 位に対応する位置にリジン残基を有し、また該ポリペプチドが、少なくとも 1 つの A L K 小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列、

f) 配列番号 14 に対して少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、該ポリペプチドが、配列番号 2 のアミノ酸残基 1 1 5 1 位に対応する位置にメチオニン残基を有し、また該ポリペプチドが、少なくとも 1 つの A L K 小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列、

g) 配列番号 16 に対して少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、該ポリペプチドが、配列番号 2 のアミノ酸残基 1 1 5 6 位に対応する位置にチロシン残基を有し、また該ポリペプチドが、少なくとも 1 つの A L K 小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列、

h) 配列番号 18 に対して少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、該ポリペプチドが、配列番号 2 のアミノ酸残基 1 1 7 4 位に対応する位置にシステイン残基を有し、また該ポリペプチドが、少なくとも 1 つの A L K 小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列、

i) 配列番号 20 に対して少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列ポリペプチドが、配列番号 2 のアミノ酸残基 1 1 7 4 位に対応する位置にイソロイシン残基を有し、また該ポリペプチドが、少なくとも 1 つの A L K 小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列、

j) 配列番号 22 に対して少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列で

10

20

30

40

50

あって、該ポリペプチドが、配列番号2のアミノ酸残基1174位に対応する位置にバリン残基を有し、また該ポリペプチドが、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列、

k) 配列番号26に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、該ポリペプチドが、配列番号2のアミノ酸残基1202位に対応する位置にアルギニン残基を有し、また該ポリペプチドが、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列、

l) 配列番号28に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、該ポリペプチドが、配列番号2のアミノ酸残基1203位に対応する位置にアスパラギン残基を有し、また該ポリペプチドが、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列、

m) 配列番号30に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、該ポリペプチドが、配列番号2のアミノ酸残基1210位に対応する位置にリジン残基を有し、また該ポリペプチドが、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列、

n) 配列番号32に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、該ポリペプチドが、配列番号2のアミノ酸残基1269位に対応する位置にアラニン残基を有し、また該ポリペプチドが、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列、

o) 配列番号99に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、該ポリペプチドが、配列番号2のアミノ酸残基1406位に対応する位置にリジン残基を有し、また該ポリペプチドが、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列、

p) 配列番号101に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、該ポリペプチドが、配列番号2のアミノ酸残基1408位に対応する位置にリジン残基を有し、また該ポリペプチドが、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列、および

q) 配列番号103に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、該ポリペプチドが、配列番号2のアミノ酸残基1174位に対応する位置にロイシン残基を有し、また該ポリペプチドが、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列。

#### 【0020】

13. 該ポリペプチドが、以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態12に記載の単離されたポリペプチド：

a) 配列番号6に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、該ポリペプチドが、配列番号2のアミノ酸残基1123位に対応する位置にセリン残基を有し、また該ポリペプチドが、少なくとも1つの未分化リンパ腫キナーゼ(ALK)小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列、

b) 配列番号8に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、該ポリペプチドが、配列番号2のアミノ酸残基1123位に対応する位置にアラニン残基を有し、また該ポリペプチドが、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列、

c) 配列番号10に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、該ポリペプチドが、配列番号2のアミノ酸残基1129位に対応する位置にバリン残基を有し、また該ポリペプチドが、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列、

d) 配列番号12に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、該ポリペプチドが、配列番号2のアミノ酸残基1132位に対応する位置にリジン残基を有し、また該ポリペプチドが、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列、

10

20

30

40

50

e) 配列番号14に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、該ポリペプチドが、配列番号2のアミノ酸残基1151位に対応する位置にメチオニン残基を有し、また該ポリペプチドが、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列、

f) 配列番号16に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、ポリペプチドが、配列番号2のアミノ酸残基1156位に対応する位置にチロシン残基を有し、また該ポリペプチドが、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列、

g) 配列番号18に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、該ポリペプチドが、配列番号2のアミノ酸残基1174位に対応する位置にシステイン残基を有し、また該ポリペプチドが、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列、

h) 配列番号20に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、該ポリペプチドが、配列番号2のアミノ酸残基1174位に対応する位置にイソロイシン残基を有し、また該ポリペプチドが、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列、

i) 配列番号22に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、ポリペプチドが、配列番号2のアミノ酸残基1174位に対応する位置にバリン残基を有し、また該ポリペプチドが、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列、

j) 配列番号26に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、ポリペプチドが、配列番号2のアミノ酸残基1202位に対応する位置にアルギニン残基を有し、また該ポリペプチドが、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列、

k) 配列番号28に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、該ポリペプチドが、配列番号2のアミノ酸残基1203位に対応する位置にアスパラギン残基を有し、また該ポリペプチドが、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列、

l) 配列番号30に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、該ポリペプチドが、配列番号2のアミノ酸残基1210位に対応する位置にリジン残基を有し、また該ポリペプチドが、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列、

m) 配列番号32に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、該ポリペプチドが、配列番号2のアミノ酸残基1269位に対応する位置にアラニン残基を有し、また該ポリペプチドが、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列、

n) 配列番号99に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、該ポリペプチドが、配列番号2のアミノ酸残基1406位に対応する位置にリジン残基を有し、また該ポリペプチドが、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列、

o) 配列番号101に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、該ポリペプチドが、配列番号2のアミノ酸残基1408位に対応する位置にリジン残基を有し、また該ポリペプチドが、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列、および

p) 配列番号103に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、該ポリペプチドが、配列番号2のアミノ酸残基1174位に対応する位置にロイシン残基を有し、また該ポリペプチドが、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列。

【0021】

14. 以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態12に記載の単離

10

20

30

40

50

されたポリペプチド：

a) 配列番号 34、36、38、40、42、44、46、48、50、54、56、58、60、62、64、または 105 に記載されるアミノ酸配列、および

b) 配列番号 34、36、38、40、42、44、46、48、50、54、56、58、60、62、64、または 105 に対して少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、該ポリペプチドが、少なくとも 1 つの A L K 小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列。

【0022】

15. A L K 発癌性融合タンパク質パートナーを更に含み、故に A L K 発癌遺伝子融合タンパク質を形成する、実施形態 14 に記載の単離されたポリペプチド。

10

【0023】

16. 該 A L K 発癌性融合タンパク質パートナーが、ヌクレオホスミン (N P M)、非筋肉トロポミオシン 3 (T P M 3)、5 - アミノイミダゾール - 4 - カルボキサミドリボヌクレオチドホルミルトランスフェラーゼ / I M P シクロヒドロラーゼ (A T I C)、クラスリン重鎖 (C L T C)、T R K - 融合遺伝子 (T F G)、非筋肉トロポミオシン 4 (T P M 4)、モエシン (M S N)、R a n 結合タンパク質 2 (R a n B P 2)、微小管会合タンパク質様 4 (E M L 4)、システイニル t R N A 合成酵素 (C A R S)、キネシンファミリーメンバー 5 B (K I F 5 B)、非筋肉ミオシン重鎖 9 (M Y H 9)、S E C 3 1 ホモログ A (S E C 3 1 L 1)、およびリングフィンガータンパク質 2 1 3 (R N F 2 1 3) / 染色体 17 上の A L K リンパ腫オリゴマー化パートナー (A L O 17) からなる群から選択される、実施形態 15 に記載の単離されたポリペプチド。

20

【0024】

17. 該 A L K 発癌性融合タンパク質パートナーが、配列番号 97 に記載されるアミノ酸配列を有する、実施形態 16 に記載の単離されたポリペプチド。

【0025】

18. 以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態 12 に記載の単離されたポリペプチド：

a) 配列番号 66、68、70、72、74、76、78、80、82、86、88、90、92、94、96、または 107 に記載されるアミノ酸配列、

b) 配列番号 66、68、70、72、74、76、78、80、82、86、88、90、92、94、96、または 107 に対して少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、該ポリペプチドが、少なくとも 1 つの A L K 小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列。

30

【0026】

19. 該 A L K 小分子キナーゼ阻害剤が、P F - 0 2 3 4 1 6 6、N V P - T A E 6 8 4、スタウロスポリン、7 - ヒドロキシスタウロスポリン、C E P - 1 4 0 8 3、C E P - 1 4 5 1 3、C E P - 2 8 1 2 2、ピリドン 14、ピリドン 15、C R L 1 5 1 1 0 4 A、および W Z - 5 - 1 2 6 からなる群から選択される、実施形態 12 ~ 18 のいずれか 1 つに記載の単離されたポリペプチド。

【0027】

20. 該 A L K 小分子キナーゼ阻害剤が、P F - 0 2 3 4 1 0 6 6 である、実施形態 19 に記載の単離されたポリペプチド。

40

【0028】

21. 少なくとも 1 つの A L K 小分子キナーゼ阻害剤に耐性である A L K 耐性突然変異体ポリペプチドを発現するように変化させられており、該 A L K 耐性突然変異体ポリペプチドが、以下からなる群から選択される少なくとも 1 つの A L K キナーゼ阻害剤耐性突然変異体残基を有する、非ヒトトランスジェニック動物：

a) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 1 2 3 位に対応する位置におけるセリン残基、

b) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 1 2 3 位に対応する位置におけるアラニン残基、

c) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 1 2 9 位に対応する位置におけるバリン残基、

50

- d) 配列番号2のアミノ酸残基1132位に対応する位置におけるリジン残基、  
 e) 配列番号2のアミノ酸残基1151位に対応する位置におけるメチオニン残基  
 、  
 f) 配列番号2のアミノ酸残基1156位に対応する位置におけるチロシン残基、  
 g) 配列番号2のアミノ酸残基1174位に対応する位置におけるシステイン残基  
 、  
 h) 配列番号2のアミノ酸残基1174位に対応する位置におけるイソロイシン残  
 基、  
 i) 配列番号2のアミノ酸残基1174位に対応する位置におけるバリン残基、  
 j) 配列番号2のアミノ酸残基1174位に対応する位置におけるロイシン残基、 10  
 k) 配列番号2のアミノ酸残基1202位に対応する位置におけるアルギニン残基  
 、  
 l) 配列番号2のアミノ酸残基1203位に対応する位置におけるアスパラギン残  
 基、  
 m) 配列番号2のアミノ酸残基1210位に対応する位置におけるリジン残基、  
 n) 配列番号2のアミノ酸残基1269位に対応する位置におけるアラニン残基、  
 o) 配列番号2のアミノ酸残基1406位に対応する位置におけるリジン残基、お  
 よび  
 p) 配列番号2のアミノ酸残基1408位に対応する位置におけるリジン残基。

## 【0029】

20

22. 少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるALK耐性突然変異体ポリペプチドに特異的に結合する抗体であって、該ALK耐性突然変異体ポリペプチドが、以下からなる群から選択される少なくとも1つのALKキナーゼ阻害剤耐性突然変異体残基を有する、抗体：

- a) 配列番号2のアミノ酸残基1123位に対応する位置におけるセリン残基、  
 b) 配列番号2のアミノ酸残基1123位に対応する位置におけるアラニン残基、  
 c) 配列番号2のアミノ酸残基1129位に対応する位置におけるバリン残基、  
 d) 配列番号2のアミノ酸残基1132位に対応する位置におけるリジン残基、  
 e) 配列番号2のアミノ酸残基1151位に対応する位置におけるメチオニン残基  
 、  
 f) 配列番号2のアミノ酸残基1156位に対応する位置におけるチロシン残基、  
 g) 配列番号2のアミノ酸残基1174位に対応する位置におけるシステイン残基  
 、  
 h) 配列番号2のアミノ酸残基1174位に対応する位置におけるイソロイシン残  
 基、  
 i) 配列番号2のアミノ酸残基1174位に対応する位置におけるバリン残基、  
 j) 配列番号2のアミノ酸残基1174位に対応する位置におけるロイシン残基、  
 k) 配列番号2のアミノ酸残基1202位に対応する位置におけるアルギニン残基  
 、  
 l) 配列番号2のアミノ酸残基1203位に対応する位置におけるアスパラギン残 40  
 基、  
 m) 配列番号2のアミノ酸残基1210位に対応する位置におけるリジン残基、  
 n) 配列番号2のアミノ酸残基1269位に対応する位置におけるアラニン残基、  
 o) 配列番号2のアミノ酸残基1406位に対応する位置におけるリジン残基、お  
 よび  
 p) 配列番号2のアミノ酸残基1408位に対応する位置におけるリジン残基。

## 【0030】

23. 該ALK耐性突然変異体ポリペプチドが、実施形態12～20のいずれか1つに記載の単離されたポリペプチドを含む、実施形態22に記載の抗体。

## 【0031】

50

24．実施形態22または23に記載の抗体を含む、生物学的試料中のALK阻害剤耐性突然変異を検出するためのキット。

【0032】

25．ALKに結合する抗体の検出のための化学物質を更に含む、実施形態24に記載のキット。

【0033】

26．ALK阻害剤耐性突然変異を有するALK耐性突然変異体ポリヌクレオチドを特異的に検出または特異的に増幅することができる少なくとも1つのポリヌクレオチドを含む試薬を含む、生物学的試料中のALK阻害剤耐性突然変異を検出するためのキットであって、該ALK耐性突然変異体ポリヌクレオチドが、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるALK耐性突然変異体ポリペプチドをコードし、該ALK耐性突然変異体ポリペプチドが、以下からなる群から選択される少なくとも1つのALKキナーゼ阻害剤耐性突然変異体残基を有する、キット：

- a) 配列番号2のアミノ酸残基1123位に対応する位置におけるセリン残基、
- b) 配列番号2のアミノ酸残基1123位に対応する位置におけるアラニン残基、
- c) 配列番号2のアミノ酸残基1129位に対応する位置におけるバリン残基、
- d) 配列番号2のアミノ酸残基1132位に対応する位置におけるリジン残基、
- e) 配列番号2のアミノ酸残基1151位に対応する位置におけるメチオニン残基、
- f) 配列番号2のアミノ酸残基1156位に対応する位置におけるチロシン残基、
- g) 配列番号2のアミノ酸残基1174位に対応する位置におけるシステイン残基、
- h) 配列番号2のアミノ酸残基1174位に対応する位置におけるイソロイシン残基、
- i) 配列番号2のアミノ酸残基1174位に対応する位置におけるバリン残基、
- j) 配列番号2のアミノ酸残基1174位に対応する位置におけるロイシン残基、
- k) 配列番号2のアミノ酸残基1202位に対応する位置におけるアルギニン残基、
- l) 配列番号2のアミノ酸残基1203位に対応する位置におけるアスパラギン残基、
- m) 配列番号2のアミノ酸残基1210位に対応する位置におけるリジン残基、
- n) 配列番号2のアミノ酸残基1269位に対応する位置におけるアラニン残基、
- o) 配列番号2のアミノ酸残基1406位に対応する位置におけるリジン残基、および
- p) 配列番号2のアミノ酸残基1408位に対応する位置におけるリジン残基。

【0034】

27．ALK耐性突然変異体ポリヌクレオチドを特異的に検出または特異的に増幅することができる、該少なくとも1つのポリヌクレオチドが、実施形態1～9のいずれか1つに記載のポリヌクレオチドを特異的に検出または特異的に増幅することが可能である、実施形態26に記載のキット。

【0035】

28．該試薬が、該ALK阻害剤耐性突然変異を含むアンプリコンを増幅する一対のプライマーを含む、実施形態26に記載のキット。

【0036】

29．該試薬が、ストリンジেন্টな条件下で該ALK耐性突然変異体ポリヌクレオチドとハイブリッド形成し、それによってALK阻害剤耐性突然変異を検出する、ポリヌクレオチド配列を含む少なくとも1つのプローブを含む、実施形態26に記載のキット。

【0037】

30．ALK阻害剤耐性突然変異について生物学的試料をアッセイするための方法であって、該生物学的試料を実施形態22に記載の抗体と接触させることと、該抗体の、ALK

10

20

30

40

50



K 阻害剤耐性突然変異を有する A L K への結合を検出することを含む、方法。

【 0 0 3 8 】

3 1 . 異常な A L K 活性に関連する癌を有する患者において、少なくとも 1 つの A L K 小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるかまたは耐性を発達させる可能性が高い癌を診断するための方法であって、A L K 阻害剤耐性突然変異の存在について患者からの生物学的試料をアッセイすることを含み、該方法は、該生物学的試料を、実施形態 2 2 に記載の抗体と接触させることと、該抗体の、該 A L K 阻害剤耐性突然変異を有する A L K への結合を検出することを含み、該 A L K 阻害剤耐性突然変異を有する該 A L K の存在は、該患者が、少なくとも 1 つの A L K 小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるかまたは耐性を発達させる可能性が高い癌を有することを示す、方法。

10

【 0 0 3 9 】

3 2 . A L K 阻害剤耐性突然変異について生物学的試料をアッセイするための方法であって、該生物学的試料を、A L K 阻害剤耐性突然変異を有する A L K 耐性突然変異体ポリヌクレオチドを特異的に検出または特異的に増幅することができる少なくとも 1 つのポリヌクレオチドを含む試薬と接触させることを含み、該 A L K 耐性突然変異体ポリヌクレオチドは、少なくとも 1 つの A L K 小分子キナーゼ阻害剤に耐性である A L K 耐性突然変異体ポリペプチドをコードし、該 A L K 耐性突然変異体ポリペプチドは、以下からなる群から選択される少なくとも 1 つの A L K キナーゼ阻害剤耐性突然変異体残基を有する、方法

:

- a ) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 1 2 3 位に対応する位置におけるセリン残基、
- b ) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 1 2 3 位に対応する位置におけるアラニン残基、
- c ) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 1 2 9 位に対応する位置におけるバリン残基、
- d ) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 1 3 2 位に対応する位置におけるリジン残基、
- e ) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 1 5 1 位に対応する位置におけるメチオニン残基

20

、

- f ) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 1 5 6 位に対応する位置におけるチロシン残基、
- g ) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 1 7 4 位に対応する位置におけるシステイン残基

、

- h ) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 1 7 4 位に対応する位置におけるイソロイシン残基、

30

- i ) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 1 7 4 位に対応する位置におけるバリン残基、
- j ) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 1 7 4 位に対応する位置におけるロイシン残基、
- k ) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 2 0 2 位に対応する位置におけるアルギニン残基

、

- l ) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 2 0 3 位に対応する位置におけるアスパラギン残基、

基、

- m ) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 2 1 0 位に対応する位置におけるリジン残基、
- n ) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 2 6 9 位に対応する位置におけるアラニン残基、
- o ) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 4 0 6 位に対応する位置におけるリジン残基、お

よび

40

- p ) 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 4 0 8 位に対応する位置におけるリジン残基。

【 0 0 4 0 】

3 3 . 異常な A L K 活性に関連する癌を有する患者において、少なくとも 1 つの A L K 小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるかまたは耐性を発達させる可能性が高い癌を診断するための方法であって、A L K 阻害剤耐性突然変異の存在について、該患者からの生物学的試料をアッセイすることを含み、該方法は、該生物学的試料を、A L K 阻害剤耐性突然変異を有する A L K 耐性突然変異体ポリヌクレオチドを特異的に検出または特異的に増幅することができる少なくとも 1 つのポリヌクレオチドを含む試薬と接触させることであって、該 A L K 耐性突然変異体ポリヌクレオチドは、少なくとも 1 つの A L K 小分子キナーゼ阻害剤に耐性である A L K 耐性突然変異体ポリペプチドをコードし、該 A L K 耐性突然変

50

異体ポリペプチドは、以下からなる群から選択される少なくとも1つのALKキナーゼ阻害剤耐性突然変異体残基を有することと：

- a) 配列番号2のアミノ酸残基1123位に対応する位置におけるセリン残基、
- b) 配列番号2のアミノ酸残基1123位に対応する位置におけるアラニン残基、
- c) 配列番号2のアミノ酸残基1129位に対応する位置におけるバリン残基、
- d) 配列番号2のアミノ酸残基1132位に対応する位置におけるリジン残基、
- e) 配列番号2のアミノ酸残基1151位に対応する位置におけるメチオニン残基

- f) 配列番号2のアミノ酸残基1156位に対応する位置におけるチロシン残基、
- g) 配列番号2のアミノ酸残基1174位に対応する位置におけるシステイン残基

、  
h) 配列番号2のアミノ酸残基1174位に対応する位置におけるイソロイシン残基、

- i) 配列番号2のアミノ酸残基1174位に対応する位置におけるバリン残基、
- j) 配列番号2のアミノ酸残基1174位に対応する位置におけるロイシン残基、
- k) 配列番号2のアミノ酸残基1202位に対応する位置におけるアルギニン残基

、  
l) 配列番号2のアミノ酸残基1203位に対応する位置におけるアスパラギン残基、

- m) 配列番号2のアミノ酸残基1210位に対応する位置におけるリジン残基、
- n) 配列番号2のアミノ酸残基1269位に対応する位置におけるアラニン残基、
- o) 配列番号2のアミノ酸残基1406位に対応する位置におけるリジン残基、お

よび

- p) 配列番号2のアミノ酸残基1408位に対応する位置におけるリジン残基、

該生物学的試料中の該ALK阻害剤耐性突然変異の存在または不在を検出することとを含み、該ALK阻害剤耐性突然変異の存在は、該患者が、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるかまたは耐性を発達させる可能性が高い癌を有することを示す、方法。

#### 【0041】

34. ALK耐性突然変異体ポリヌクレオチドを特異的に検出または特異的に増幅することができる該少なくとも1つのポリヌクレオチドは、実施形態1~9のいずれか1つに記載のポリヌクレオチドを特異的に検出または特異的に増幅することが可能である、実施形態32または33に記載の方法。

#### 【0042】

35. 対象において、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるかまたは耐性を発達させる可能性が高い癌を診断するための方法であって、ALK阻害剤耐性突然変異を有するALK発癌性融合タンパク質の存在について、該対象からの生物学的試料をアッセイすることを含み、該方法は、該生物学的試料を、実施形態15~17のいずれか1つに記載のポリペプチドに特異的に結合する抗体と接触させることと、該抗体の、ALK耐性突然変異を有する該ALK発癌性融合タンパク質への結合を検出することとを含み、該ALK阻害剤耐性突然変異を有するALK発癌性融合タンパク質の存在は、該対象が、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるかまたは耐性を発達させる可能性が高い癌を有することを示す、方法。

#### 【0043】

36. 対象において、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるかまたは耐性を発達させる可能性が高い癌を診断するための方法であって、ALK阻害剤耐性突然変異を有するALK発癌性融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドの存在について、該対象からの生物学的試料をアッセイすることを含み、該方法は、該生物学的試料を、ALK阻害剤耐性突然変異を有するALK発癌性融合タンパク質をコードする該ポリヌクレオチドを特異的に検出または特異的に増幅することができる少なくとも1つのポリ

10

20

30

40

50

ヌクレオチドを含む試薬と接触させることであって、該少なくとも1つのポリヌクレオチドは、実施形態4～6のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドを特異的に検出または特異的に増幅することが可能であることと、該生物学的試料中の、該ALK阻害剤耐性突然変異を有するALK発癌性融合タンパク質をコードする該ポリヌクレオチドの存在または不在を検出することを含み、該ALK阻害剤耐性突然変異を有する該ALK発癌性融合タンパク質をコードする該ポリヌクレオチドの存在は、該対象が、少なくとも1つのALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性であるかまたは耐性を発達させる可能性が高い癌を有することを示す、方法。

【0044】

37. 該ALK小分子キナーゼ阻害剤が、PF-0234166、NVP-TAE684、スタウロスポリン、7-ヒドロキシスタウロスポリン、CEP-14083、CEP-14513、CEP-28122、ピリドン14、ピリドン15、CRL151104A、およびWZ-5-126からなる群から選択される、実施形態30～36のいずれか1つに記載の方法。

10

【0045】

38. 該ALK小分子キナーゼ阻害剤が、PF-02341066である、実施形態37に記載の方法。

【0046】

39. 異常なALK活性に関連する癌を有する患者において、PF-02341066に耐性であるかまたは耐性を発達させる可能性が高い癌を診断するための方法であって、ALK阻害剤耐性突然変異の存在について、該患者からの生物学的試料をアッセイすることを含み、該方法は、該生物学的試料を、PF-02341066に耐性であるALK耐性突然変異体ポリペプチドに特異的に結合する抗体と接触させることであって、該ALK耐性突然変異体ポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸残基1196位に対応する位置にメチオニン残基を有することと、該抗体の、該ALK耐性突然変異を有するALKへの結合を検出することを含み、該ALK阻害剤耐性突然変異を有する該ALKの存在は、該患者が、PF-02341066に耐性であるかまたは耐性を発達させる可能性が高い癌を有することを示す、方法。

20

【0047】

40. 該ALK耐性突然変異体ポリペプチドが、以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態39に記載の方法：

30

a) 配列番号24に記載されるアミノ酸配列、および

b) 配列番号24に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、該ポリペプチドが、配列番号2のアミノ酸残基1196位に対応する位置にメチオニン残基を有し、またポリペプチドが、PF-02341066に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列。

【0048】

41. 該ALK耐性突然変異体ポリペプチドが、以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態39に記載の方法：

a) 配列番号52に記載されるアミノ酸配列、および

40

b) 配列番号52に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、該ポリペプチドが、PF-02341066に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列。

【0049】

42. 該ALK耐性突然変異体ポリペプチドが、ALK発癌性融合タンパク質パートナーを更に含み、故にALK発癌性融合タンパク質を含む、実施形態41に記載の方法。

【0050】

43. 該ALK耐性突然変異体ポリペプチドが、以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態39に記載の方法：

a) 配列番号84に記載されるアミノ酸配列、および

50

b) 配列番号 84 に対して少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、該ポリペプチドが、PF - 02341066 に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列。

【0051】

44. 異常な ALK 活性に関連する癌を有する患者において、PF - 02341066 に耐性であるかまたは耐性を発達させる可能性が高い癌を診断するための方法であって、ALK 阻害剤耐性突然変異の存在について、該対象からの生物学的試料をアッセイすることを含み、該方法が以下を含む、方法：

a) 該生物学的試料を、ALK 阻害剤耐性突然変異を有する ALK 耐性突然変異体ポリヌクレオチドを特異的に検出または特異的に増幅することができる少なくとも 1 つのポリヌクレオチドを含む試薬と接触させることであって、該 ALK 耐性突然変異体ポリヌクレオチドは、PF - 02341066 に耐性である ALK 耐性突然変異体ポリペプチドをコードし、該 ALK 耐性突然変異体ポリペプチドは、配列番号 2 のアミノ酸残基 1196 位に対応する位置にメチオニン残基を有する、および

b) 該生物学的試料中の該 ALK 阻害剤耐性突然変異の存在または不在を検出し、該 ALK 阻害剤耐性突然変異の存在は、該患者が、PF - 02341066 に耐性であるかまたは耐性を発達させる可能性が高い癌を有することを示す。

【0052】

45. 該 ALK 耐性突然変異体ポリヌクレオチドが、以下からなる群から選択されるポリヌクレオチドを含む、実施形態 44 に記載の方法：

a) 配列番号 23、51、または 83 に記載されるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド、

b) 配列番号 24、52、または 84 に記載されるアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド、および

c) 配列番号 23、51、もしくは 83 に対して少なくとも 90% の配列同一性を有するポリヌクレオチド、または配列番号 24、52、もしくは 84 に対して少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドであって、該ポリヌクレオチドは、配列番号 2 のアミノ酸残基 1123 位に対応する位置にメチオニン残基を有するポリペプチドをコードし、またポリヌクレオチドは、PF - 02341066 に耐性であるキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド。

【0053】

46. 対象において、PF - 02341066 に耐性であるかまたは耐性を発達させる可能性が高い癌を診断するための方法であって、ALK 阻害剤耐性突然変異を有する ALK 発癌性融合タンパク質の存在について、該対象からの生物学的試料をアッセイすることを含み、該方法は以下を含む、方法

a) 該生物学的試料を、以下 i) および ii) からなる群から選択されるポリペプチドを含む ALK 発癌性融合タンパク質に特異的に結合する抗体と接触させることと：

i) 配列番号 52 に記載されるアミノ酸配列、および

ii) 配列番号 52 に対して少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、該ポリペプチドが、PF - 02341066 に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列、

b) 該抗体の、ALK 耐性突然変異を有する該 ALK 発癌性融合タンパク質への結合を検出することであって、該 ALK 阻害剤耐性突然変異を有する ALK 発癌性融合タンパク質の存在は、該対象が、PF - 02341066 に耐性であるかまたは耐性を発達させる可能性が高い癌を有することを示すこと。

【0054】

47. 対象において、PF - 02341066 に耐性であるかまたは耐性を発達させる可能性が高い癌を診断するための方法であって、ALK 阻害剤耐性突然変異を有する ALK 発癌性融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドの存在について、該対象からの生物学的試料をアッセイすることを含み、該方法は以下を含む、方法：

a) 該生物学的試料を、A L K 発癌性融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを特異的に検出または特異的に増幅することができる少なくとも1つのポリヌクレオチドを含む試薬と接触させることであって、A L K 発癌性融合タンパク質をコードする該ポリヌクレオチドは、以下 i ) ~ i i i ) からなる群から選択されるポリヌクレオチドを含むことと：

i ) 配列番号 5 1 に記載されるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド、

i i ) 配列番号 5 2 に記載されるアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド

、および

i i i ) 配列番号 5 1 に対して少なくとも 9 0 % の配列同一性を有するポリヌクレオチド、または配列番号 5 2 に対して少なくとも 9 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドであって、該ポリヌクレオチドが、配列番号 2 のアミノ酸残基 1 1 2 3 位に対応する位置にメチオニン残基を有するポリペプチドをコードし、またポリヌクレオチドが、P F - 0 2 3 4 1 0 6 6 に耐性であるキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド、

b) 該生物学的試料中の、該 A L K 阻害剤耐性突然変異を有する A L K 発癌性融合タンパク質をコードする該ポリヌクレオチドの存在または不在を検出することを含み、該 A L K 阻害剤耐性突然変異を有する該 A L K 発癌性融合タンパク質をコードする該ポリヌクレオチドの存在は、該対象が、P F - 0 2 3 4 1 0 6 6 に耐性であるかまたは耐性を発達させる可能性が高い癌を有することを示す。

【 0 0 5 5 】

4 8 . 該 A L K 発癌性融合タンパク質が、ヌクレオホスミン ( N P M ) 、非筋肉トロポミオシン 3 ( T P M 3 ) 、5 - アミノイミダゾール - 4 - カルボキサミドリボヌクレオチドホルミルトランスフェラーゼ / I M P シクロヒドロラーゼ ( A T I C ) 、クラスリン重鎖 ( C L T C ) 、T R K - 融合遺伝子 ( T F G ) 、非筋肉トロポミオシン 4 ( T P M 4 ) 、モエシン ( M S N ) 、R a n 結合タンパク質 2 ( R a n B P 2 ) 、微小管会合タンパク質様 4 ( E M L 4 ) 、システイニル t R N A 合成酵素 ( C A R S ) 、キネシンファミリーメンバー 5 B ( K I F 5 B ) 、非筋肉ミオシン重鎖 9 ( M Y H 9 ) 、S E C 3 1 ホモログ A ( S E C 3 1 L 1 ) 、およびリングフィンガータンパク質 2 1 3 ( R N F 2 1 3 ) / 染色体 1 7 上の A L K リンパ腫オリゴマー化パートナー ( A L O 1 7 ) 、からなる群から選択される A L K 発癌性融合タンパク質パートナーを含む、実施形態 4 6 または 4 7 に記載の方法。

【 0 0 5 6 】

4 9 . 該発癌性融合タンパク質パートナーは、配列番号 9 7 に記載されるアミノ酸配列を有する、実施形態 4 8 に記載の方法。

【 0 0 5 7 】

5 0 . 該ポリヌクレオチドを検出することが、核酸配列決定技術、核酸増幅方法、または核酸ハイブリダイゼーション技術を含む、実施形態 3 2 ~ 3 4 、3 6 、4 4 、4 5 、および 4 7 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 0 5 8 】

5 1 . 該癌が、大細胞型 B 細胞リンパ腫、未分化大細胞リンパ腫 ( A L C L ) 、悪性組織球症、炎症性筋線維芽細胞性腫瘍肉腫、食道扁平上皮癌、乳癌、結腸直腸癌、非小細胞肺癌、神経芽細胞腫、膀胱癌、腎臓癌、および膠芽腫からなる群から選択される、実施形態 3 1 、3 3 、3 5 、3 6 、および 3 9 ~ 4 9 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 0 5 9 】

5 2 . 該患者のために治療法を選択することを更に含む、実施形態 3 1 、3 3 、3 5 、3 6 、および 3 9 ~ 4 9 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 0 6 0 】

5 3 . 少なくとも 1 つの A L K 小分子キナーゼ阻害剤に抵抗性である A L K 抵抗性突然変異体の発現を特異的に低減する方法であって、該方法は、該 A L K 抵抗性突然変異体を発現する細胞中に、該 A L K 抵抗性突然変異体をコードする遺伝子を標的とするサイレン

10

20

30

40

50

シング因子を導入することを含み、該サイレンシング因子の該導入または発現は、該 A L K 抵抗性突然変異体の該発現を特異的に低減し、該 A L K 抵抗性突然変異体は、実施形態 1 2 ~ 2 0 のいずれか 1 つに記載のポリペプチドである、方法。

【 0 0 6 1 】

5 4 . 少なくとも 1 つの A L K 小分子キナーゼ阻害剤に耐性である異常な A L K 活性に関連する癌を治療する方法であって、該方法は、該少なくとも 1 つの A L K 小分子キナーゼ阻害剤に耐性である A L K 耐性突然変異体をコードする遺伝子を標的とする、有効量のサイレンシング因子を投与することを含み、該サイレンシング因子の該導入または発現は、該 A L K 耐性突然変異体の発現を低減し、該 A L K 耐性突然変異体は、実施形態 1 2 ~ 2 0 のいずれか 1 つに記載のポリペプチドである、方法。

10

【 0 0 6 2 】

5 5 . P F - 0 2 3 4 1 0 6 6 に耐性である異常な A L K 活性に関連する癌を治療する方法であって、該方法は、P F - 0 2 3 4 1 0 6 6 に耐性である A L K 耐性突然変異体をコードする遺伝子を標的とする、有効量のサイレンシング因子を投与することを含み、該サイレンシング因子の導入または発現は、該 A L K 耐性突然変異体の発現を低減し、該 A L K 耐性突然変異体は、以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドである、方法：

a ) 配列番号 2 4 に記載されるアミノ酸配列、および

b ) 配列番号 2 4 に対して少なくとも 9 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、該ポリペプチドが、配列番号 2 のアミノ酸残基 1 1 9 6 位に対応する位置にメチオニン残基を有し、またポリペプチドが、P F - 0 2 3 4 1 0 6 6 に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列。

20

【 0 0 6 3 】

5 6 . 該ポリペプチドが、以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態 5 5 に記載の方法：

a ) 配列番号 5 2 に記載されるアミノ酸配列、および

b ) 配列番号 5 2 に対して少なくとも 9 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、該ポリペプチドが、P F - 0 2 3 4 1 0 6 6 に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列。

30

【 0 0 6 4 】

5 7 . 該ポリペプチドが、A L K 発癌性融合タンパク質パートナーを更に含み、故に A L K 発癌性融合タンパク質を含む、実施形態 5 6 に記載の方法。

【 0 0 6 5 】

5 8 . 該ポリペプチドが、以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態 5 5 に記載の方法：

a ) 配列番号 8 4 に記載されるアミノ酸配列、

b ) 配列番号 8 4 に対して少なくとも 9 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、該ポリペプチドが、P F - 0 2 3 4 1 0 6 6 に耐性であるキナーゼ活性を有する、アミノ酸配列。

40

【 0 0 6 6 】

5 9 . 該癌が、大細胞型 B 細胞リンパ腫、未分化大細胞リンパ腫 ( A L C L ) 、悪性組織球症、炎症性筋線維芽細胞性腫瘍肉腫、食道扁平上皮癌、乳癌、結腸直腸癌、非小細胞肺癌、神経芽細胞腫、膀胱癌、腎臓癌、および膠芽腫からなる群から選択される、実施形態 5 4 ~ 5 8 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 0 6 7 】

6 0 . 以下を含む、A L K 耐性突然変異体または A L K 融合タンパク質のキナーゼ活性を阻害することが可能な薬剤を特定する方法：

a ) 候補薬剤を実施形態 1 2 ~ 2 0 のいずれか 1 つに記載のポリペプチドと接触させること、および

b ) 該候補薬剤が、該ポリペプチドのキナーゼ活性を阻害するかどうかを決定する

50

こと。

【0068】

61. 該ポリペプチドが、真核細胞中で発現され、該ポリペプチドが、実施形態15～17のいずれか1つに記載のポリペプチドであり、該薬剤が該ポリペプチドのキナーゼ活性を阻害するかどうかを決定することは、該細胞を、

- a) 細胞増殖の阻害、
- b) 細胞死の刺激、
- c) 足場非依存性増殖の阻害、および

d) 細胞遊走または浸潤の阻害、からなる群から選択される細胞活性における少なくとも1つの変化について監視することを含み、

細胞活性における該変化のうちの少なくとも1つを誘導する薬剤が、ALK耐性突然変異体の阻害剤として特定される、実施形態60に記載の方法。

10

【0069】

62. 非ヒト動物が、該ポリペプチドを発現するように変化させられているか、または該ポリペプチドを発現する真核細胞が、非ヒト動物中に導入されており、該ポリペプチドが、実施形態15～17のいずれか1つに記載のポリペプチドであり、該薬剤が該ポリペプチドのキナーゼ活性を阻害するかどうかを決定することが、該非ヒト動物を腫瘍増殖について監視することを含み、腫瘍増殖の低減が、薬剤が該ポリペプチドのキナーゼ活性を阻害することを示す、実施形態60に記載の方法。

20

【0070】

63. 該ポリペプチドが、真核細胞中で発現され、該ポリペプチドが、実施形態12または18に記載の単離されたポリペプチドであり、該ポリペプチドのキナーゼ活性が、活性化され、該薬剤が該ポリペプチドのキナーゼ活性を阻害するかどうかを決定することが、該細胞を、

- a) 細胞増殖の阻害、
- b) 細胞死の刺激、
- c) 足場非依存性増殖の阻害、および

d) 細胞遊走または浸潤の阻害、からなる群から選択される細胞活性における少なくとも1つの変化について監視することを含み、

細胞活性における該変化のうちの少なくとも1つを誘導する薬剤が、ALK耐性突然変異体の阻害剤として特定される、実施形態60に記載の方法。

30

【0071】

64. 以下のステップを含む、実施形態12～20のいずれか1つに記載のポリペプチドに特異的に結合することが可能な薬剤を特定する方法：

a) 候補薬剤を実施形態13～21のいずれか1つに記載の該ポリペプチドと接触させること、および

b) 該候補薬剤が該ポリペプチドに特異的に結合するかどうかを決定すること。

【0072】

65. 該ポリペプチドが、活性または不活性状態にある、実施形態64に記載の方法。

【0073】

本発明のこれらのおよび他の態様は、下記に提供される本発明の説明でより詳細に開示される。

40

【図面の簡単な説明】

【0074】

【図1】天然NPM-ALK(「NPM-ALK/BaF3」)、またはキナーゼドメインにおいて3つの阻害剤耐性突然変異(L1196M、G1202R、またはD1203N)のうちの1つを含有するように操作されたNPM-ALKのいずれかを発現する、BaF3細胞クローンに対する72時間XTTアッセイを用いて、既述のように行われた(Lagiseti et al. (2009) J Med Chem 52:6979-6990)、PF-02341066に反応した死滅曲線の結果を示す。親BaF3細胞

50

胞(「BaF3」)もまた、正常な非ALK依存性細胞対照として試験した。細胞クローンの各々についてのPF-02341066のIC<sub>50</sub>値は、表3に見出すことができる。

【発明を実施するための形態】

【0075】

本発明の組成物は、ALK小分子キナーゼ阻害剤に耐性である、ALKポリペプチド、それをコードするポリヌクレオチド、ならびにその変異体および断片を含む。表面抗原分類CD246としても知られる、ALKまたは未分化リンパ腫キナーゼは、受容体型チロシンキナーゼのインスリン受容体スーパーファミリーの成員である。ALKポリペプチドは、細胞外リガンド結合領域、膜貫通ドメイン、および細胞質キナーゼ触媒領域を含む、1本鎖膜貫通タンパク質である。ALKは、ヒトにおける染色体編2p23で(Morris et al. (1994) Science 263:1281-1284、Shiota et al. (1994) Oncogene 9:1567-1574)、およびマウス遠位染色体17上で(Mathew et al. (1995) Cytogenet. Cell. Genet. 70:143-144)見出されるゲノム遺伝子座によってコードされる。

10

【0076】

ALKポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、当該技術分野において、様々な種について知られている。ヒトALKについてのゲノム配列は、Genbank受入番号NC\_000002.11に記載される。ヒトALKについてのコード配列は、Genbank受入番号U62540に見出すことができ、配列番号1に記載されており、コードされたヒトALKポリペプチドは、配列番号2に記載される。マウスおよびショウジョウバエALK cDNAは、それぞれ、D83002およびAAF36990のGenbank受入番号を有する。ヒトALKは、1620アミノ酸の(aa)ポリペプチドである一方で、マウスALKは、1621 aa長であり、ミバエALKポリペプチドは、1701 aaである。ヒトALK cDNAは、177kDaのポリペプチドをコードするが、N-グリコシル化等の翻訳後修飾を伴うと、成熟ALKは、およそ200~220kDaである。

20

【0077】

ALKポリペプチドは、多様な保存された構造ドメインを含む。ヒトALKの1030アミノ酸長の細胞外ドメインは、26アミノ酸アミノ末端シグナルペプチド配列、ならびに内在性リガンドプレイオトロフィンおよびミッドカインのための結合部位(残基391~401に位置する)を含む、複数のモチーフを含有する。28アミノ酸の膜貫通ドメイン(配列番号2の残基1031~1058に位置する)には、IR基質-1とのホスホチロシン依存性相互作用のための結合部位(残基1093~1096に位置する)を含む、64アミノ酸の細胞質膜近傍セグメントが続く。ミニマルキナーゼドメイン(残基1116~1383)は、その活性化ループ内に3つのチロシン含有モチーフ(チロシン1278、1282、および1283)を含む。これらのチロシン残基は、活性化ループ立体配座を調節する自己リン酸化部位であり、ATPの、その非リン酸化状態にあるATP結合ポケットへのアクセスを遮断し、結合ポケットから離れて外側に揺れ、トリプレットチロシンのリン酸化に続く、キナーゼ活性化プロセス中のATPの無妨害の進入を可能にする(Tartari et al. (2008) J Biol Chem 283:3743-3750)。ALKの残基1116~1383がミニマルキナーゼドメインを包含するが、残基E1406およびE1408が、最適な活性に必要とされ、伸長キナーゼドメインの一部と考えられる。244アミノ酸のALKカルボキシ末端は、基質タンパク質Src相同性2ドメイン含有(SHC)のためのホスホチロシン依存性結合部位(残基1504~1507)およびホスホリパーゼC-のホスホチロシン依存性結合のための相互作用部位(残基1603~1606)を含有する。

30

40

【0078】

ALKの神経系優性発現プロフィールは、キナーゼが神経系の発達または機能において役割を果たすことを示唆するが、ALKノックアウトマウスは、生存可能であり、容易に

50



明白な異常を何ら示さない (Iwahara et al. (1997) Oncogene 14:439-449、Morris et al. (1997) Oncogene 14:2175-2188、Loren et al. (2001) Genes Cells 6:531-544、Pulford et al. (1997) Blood 89:1394-1404)。ALKノックアウトマウスの更なる研究により、このマウスが「抗うつプロフィール」を示すことが明らかとなり、ALKが認知および/または気分障害の病態生理に関与し得ることを示唆する (Bilsland et al. (2008) Neuropsychopharmacology 33:684-700)。

#### 【0079】

ALKのゲノムDNA増幅およびタンパク質過剰発現、ならびに点突然変異の活性化は、神経芽細胞腫を引き起こすことが示されており (Webb et al. (2009) Expert Rev Anticancer Ther 9:331-356、George et al. (2008) Nature 455:975-979)、完全長ALKは、膠芽腫等のなおも他の悪性腫瘍の発生と関連があるとされているが (Webb et al. (2009) Expert Rev Anticancer Ther 9:331-356)、異常なALK活性に関連するほとんどの癌は、構成性キナーゼ活性を示す発癌性ALK融合タンパク質の形成に起因する。故に、本開示の耐性突然変異を検出するための方法、キナーゼ阻害剤に耐性であるかまたは耐性を発達させる可能性が高い癌を診断する際、ならびに耐性突然変異を含むALKまたはALK発癌性融合タンパク質に特異的に結合するかつ/またはそれらの活性を阻害する薬剤を特定するための方法において有用なALKポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、キナーゼドメイン、完全長ALK、またはALK発癌性融合タンパク質を含むALKポリヌクレオチドおよびポリペプチドを含む。

#### 【0080】

「ALK発癌性融合」または「ALK発癌性融合タンパク質」は、アミノ末端融合パートナー、およびカルボキシ末端においてALKポリペプチドの断片を含む、ポリペプチドである。この2つのタンパク質の融合は、アミノ末端融合パートナーにおけるオリゴマー化ドメインによって媒介されるオリゴマー化、および成長促進細胞シグナルのその後の構成的な伝達を通じて、ALKのキナーゼ活性の構成的な活性化をもたらす。ALK活性化は、タンパク質キナーゼC (PKC)、マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ (MAPK)、およびホスホイノシチド3-キナーゼ (PI3K) 経路の活性化に少なくとも部分的に起因して、増加された細胞増殖およびアポトーシスを引き起こす。加えて、ALKの活性化は、細胞遊走および浸潤を増大させ、細胞の足場非依存性増殖を促進する。幾つかの実施形態では、アミノ末端パートナータンパク質は、正常な細胞中で幅広く発現されるタンパク質であり、そのプロモーターが、コードされる融合タンパク質の異常な発現に関与する。天然に生じるALK発癌性融合は、染色体転座の結果である。

#### 【0081】

本明細書で使用されるとき、「ALK発癌性融合パートナー」または「ALK発癌性融合タンパク質パートナー」は、オリゴマー化ドメインを含むALK発癌性融合のアミノ末端断片を指す。

#### 【0082】

天然に生じる発癌性融合パートナーは、当該技術分野で既知であり、ヌクレオホスミン (NPM)、非筋肉トロポミオシン3 (TPM3)、5-アミノイミダゾール-4-カルボキサミドリボヌクレオチドホルミルトランスフェラーゼ/IMPシクロヒドロラーゼ (ATIC)、クラスリン重鎖 (CLTC)、TRK-融合遺伝子 (TFG)、非筋肉トロポミオシン4 (TPM4)、モエシン (MSN)、Ran結合タンパク質2 (RanBP2)、微小管会合タンパク質様4 (EML4)、システイニルトRNA合成酵素 (CAR5)、キネシンファミリーメンバー5B (KIF5B)、非筋肉ミオシン重鎖9 (MYH9)、SEC31ホモログA (SEC31L1)、およびリングフィンガータンパク質213 (RNF213)/染色体17上のALKリンパ腫オリゴマー化パートナー (ALO

17)を含むが、これらに限定されない(概説については、Webb et al. (2009) Expert Rev Anticancer Ther 9:331-356を参照されたく、それは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。表1は、ALKと融合する断片のコード配列への参照と共に、各ALK発癌性融合パートナーのゲノム配列およびコード配列についての受入番号を提供する。

【0083】

表1. ALK発癌性融合パートナー

【表 1】

| 名称                 | ゲノムDNA受<br>入番号 | コード配列受入<br>番号 | ALK発癌性パート<br>ナー融合断片に<br>ついてのコード<br>配列の配列番号 |
|--------------------|----------------|---------------|--|
| AL017/RNF213       | NT_010783      | NM_020914     | 108  |
| AT1C               | NT_005403      | NM_004044     | 109  |
| CARS               | NT_009237      | NM_001014437  | 110  |
| CLTC               | NT_010783      | NM_004859     | 111  |
| EML4変異体1           | NT_022184      | NM_019063     | 112  |
| EML4変異体2           | NT_022184      | NM_019063     | 113  |
| EML4変異体3a          | NT_022184      | NM_019063     | 114  |
| EML4変異体3b          | NT_022184      | NM_019063     | 115  |
| EML4変異体4           | NT_022184      | NM_019063     | 116  |
| EML4変異体5           | NT_022184      | NM_019063     | 117  |
| EML4変異体5a          | NT_022184      | NM_019063     | 118  |
| EML4変異体5b          | NT_022184      | NM_019063     | 119  |
| EML4変異体6           | NT_022184      | NM_019063     | 120  |
| EML4変異体7           | NT_022184      | NM_019063     | 121  |
| KIF5B              | NT_008705      | NM_004521     | 122  |
| MSNa               | NT_011669      | NM_002444     | 123  |
| MSNb               | NT_011669      | NM_002444     | 124  |
| MYH9               | NT_011520      | NM_002473     | 125  |
| NPM                | NT_034772      | NM_002520     | 126  |
| RanBP2             | NT_022171      | NM_006267     | 127  |
| SEC31L1 1型         | NT_016354      | NM_014933     | 128  |
| SEC31L1 2型         | NT_016354      | NM_014933     | 129  |
| TFG <sub>s</sub>   | NT_005612      | NM_006070     | 130  |
| TFG <sub>t</sub>   | NT_005612      | NM_006070     | 131  |
| TFG <sub>SXL</sub> | NT_005612      | NM_006070     | 132  |
| TPM3               | NT_004487      | NM_152263     | 133  |
| TPM4 1型            | NT_011295      | NM_003290     | 134  |
| TPM4 2型            | NT_011295      | NM_003290     | 135  |

## 【 0 0 8 4 】

未分化大細胞リンパ腫（ALCL）のおよそ60%、および主に小児および若年成人を侵す遅延増殖性肉腫である、炎症性筋線維芽細胞性腫瘍（IMT）の約60%が、NPM - ALK融合タンパク質を有する。（Armitage et al. (2001) Ca

10

20

30

40

50

ncer: Principle and Practice of Oncology, 6th edition, 2256-2316、Kutok and Aster (2002) J. Clin. Oncol. 20:3691-3702、Lawrence et al. (2000) Am. J. Pathol. 157:377-384)。NPM - ALK融合のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列は、それぞれ、配列番号3および4に記載され、NPM - ALK発癌性融合タンパク質中でALKに融合されるNPMの断片は、配列番号97に記載される。MSN - ALKおよびTPM3 / TPM4 - ALK(それらに組み込まれるALKの部分に関して、全ての他のALK融合から若干異なるのみである)を除いて、全ての既知のキメラALKタンパク質は、ALKのアミノ酸残基1058~1620に対応する(配列番号2)、ALKの細胞質内部分全体を含有する。かかるALKの断片は、本明細書で「ALK融合断片」と称される。

10

#### 【0085】

本明細書ではALK阻害剤耐性突然変異体またはALK耐性突然変異体とも称される、ALKキナーゼ阻害剤に耐性であるALK突然変異体が、本明細書に記載される。ALK耐性突然変異体ポリペプチドは、配列番号6、8、10、12、14、16、18、20、22、26、28、30、32(突然変異ALKキナーゼドメイン)、配列番号34、36、38、40、42、44、46、48、50、54、56、58、60、62、64(突然変異ALK融合断片)、ならびに配列番号66、68、70、72、74、76、78、80、82、86、88、90、92、94、および96(突然変異完全長ALKポリペプチド)に記載されるアミノ酸配列と、それらの変異体および断片とを含む。同様に、ALK耐性突然変異体ポリヌクレオチドは、配列番号5、7、9、11、13、15、17、19、21、25、27、29、31(突然変異ALKキナーゼドメイン)、配列番号33、35、37、39、41、43、45、47、49、53、55、57、59、61、63(突然変異ALK融合断片)、ならびに配列番号65、67、69、71、73、75、77、79、81、85、87、89、91、93、および95(突然変異完全長ALKポリヌクレオチド)に記載されるヌクレオチド配列と、それらの変異体および断片、ならびに配列番号6、8、10、12、14、16、18、20、22、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、86、88、90、92、94、および96に記載されるALK耐性突然変異体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと、その変異体および断片とを含む。

20

30

#### 【0086】

「ALK耐性突然変異」または「ALK阻害剤耐性突然変異」は、ALKポリペプチドの、少なくとも1つのALKキナーゼ阻害剤への耐性を付与する、天然ALKの、ヌクレオチド配列またはアミノ酸配列における変化である。ポリヌクレオチドレベルおよびポリペプチドレベルの両方で特定されるALK耐性突然変異(それらは単一アミノ酸残基の置換をもたらす点突然変異である)は、表1に開示される。更なるポリヌクレオチド突然変異が、コドン縮重に起因して同じアミノ酸置換をもたらし得ることが理解される。

#### 【0087】

本明細書で使用されるとき、「ポリヌクレオチド」という用語は、単一の核酸、ならびに複数形の核酸を包含することが意図され、核酸分子または構築物、例えば、メッセンジャーRNA(mRNA)、プラスミドDNA(pDNA)、または短干渉RNA(siRNA)を指す。ポリヌクレオチドは、1本鎖または2本鎖、線状または環状であることができ、DNA、RNA、またはそれらの組み合わせからなることができる。ポリヌクレオチドは、従来のホスホジエステル結合または非従来の結合(例えば、ペプチド核酸(PNA)に見出されるもの等のアミド結合)を含むことができる。「核酸」という用語は、ポリヌクレオチド中に存在する、任意の1つ以上の核酸セグメント、例えば、DNAまたはRNA断片を指す。「ポリヌクレオチド」は、ホスホロチオエート等の修飾された核酸、リン酸塩、環原子修飾誘導体等を含み得る。「ポリヌクレオチド」は、天然に生じるポリヌクレオチド(すなわち、人間の介入なしに天然に存在するもの)、組み換えポリヌクレ

40

50

オチド（すなわち、人間の介入によってのみ存在するもの）、または合成的に誘導されるポリヌクレオチドであり得る。

【0088】

ポリヌクレオチドは、ポリペプチドまたはタンパク質をコードすることができる。指定される核酸に関して、「コードする」または「コードされる」とは、RNAへの転写のため、および幾つかの実施形態では、指定されるタンパク質への翻訳のための情報を含むことを意味する。タンパク質をコードする核酸は、核酸の翻訳領域内で非翻訳配列を含んでもよく（例えば、イントロン）、またはかかる介入非翻訳配列を欠いていてもよい（例えば、cDNAにおけるように）。タンパク質がコードされる情報は、コドンの使用によって指定される。典型的には、アミノ酸配列は、「普遍的」遺伝コードを使用して、核酸によってコードされる。しかしながら、一部の植物、動物、および真菌ミトコンドリア、細菌マイコプラズマ・カプリコルム（Yamao, et al., (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:2306-9）、または織毛虫大核中に存在するもの等の、普遍的コードの変異体が、これらの生物を使用して核酸が発現されるときに使用されてもよい。

10

【0089】

本明細書で使用されるとき、「ポリペプチド」または「タンパク質」という用語は、単一の「ポリペプチド」ならびに複数形の「ポリペプチド」を包含することが意図され、アミド結合（ペプチド結合としても知られる）によって線状で連結された単量体（アミノ酸）から構成される分子を指す。「ポリペプチド」という用語は、2つ以上のアミノ酸の任意の鎖（単数または複数）を指し、産物の特定の長さを指しているわけではない。故に、2つ以上のアミノ酸の鎖（単数または複数）を指すために使用される、ペプチド、ジペプチド、トリペプチド、オリゴペプチド、「タンパク質」、「アミノ酸鎖」、または任意の他の用語が「ポリペプチド」の定義内に含まれ、「ポリペプチド」という用語は、これらの用語のいずれの代わりに、またはこれらの用語のいずれとも交換可能に、使用され得る。

20

【0090】

「単離された」または「精製された」ポリヌクレオチドもしくはタンパク質、またはこれらの生物学的に活性な部分は、通常、その天然に生じる環境で見出される、ポリヌクレオチドまたはタンパク質に伴うか、またはそれらと相互作用する構成成分が実質的にまたは本質的にない。故に、単離されたまたは精製されたポリヌクレオチドまたはタンパク質は、組み換え技術によって産生されるとき、他の細胞物質または培養媒体が実質的にないか、または化学的に合成されるとき、化学的前駆体または他の化学物質が実質的にない。最適には、「単離された」ポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチドが由来する生物のゲノムDNA中のポリヌクレオチドに天然に隣接した配列（すなわち、ポリヌクレオチドの5'末端および3'末端に位置する配列）（最適にはタンパク質コード配列）がない。例えば、種々の実施形態では、単離されたポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチドが由来する細胞のゲノムDNA中のポリヌクレオチドに天然に隣接する、約5 kb、4 kb、3 kb、2 kb、1 kb、0.5 kb、または0.1 kb未満のヌクレオチド配列を含有し得る。実質的に細胞物質のないタンパク質には、約30%、20%、10%、5%、または1%（乾燥重量で）未満の汚染タンパク質を有するタンパク質の調製物が含まれる。本発明のタンパク質またはその生物学的に活性な部分が、組み換えにより産生されるとき、最適には、培養媒体は、約30%、20%、10%、5%、または1%（乾燥重量で）未満の化学的前駆体または目的のタンパク質ではない化学物質を示す。

30

40

【0091】

ALK耐性突然変異体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの断片および変異体、ならびにポリペプチド自体の断片および変異体は、ALK耐性突然変異体ポリペプチドの生物学的に活性な変異体および断片を含めて、本発明の種々の方法および組成物に用いることができる。かかる活性な変異体および断片は、少なくとも1つのALKキナーゼ阻害剤に耐性である機能キナーゼドメインを保持するであろう。キナーゼ活性についてアッ

50

セイするための方法は知られており、本明細書の他の箇所に記載される。

【0092】

「断片」とは、ポリヌクレオチドの部分、したがって、それによってコードされるタンパク質またはポリペプチドの部分が意図される。ポリヌクレオチドの断片は、ALK耐性突然変異体タンパク質の生物学的活性を保持するタンパク質断片をコードし得、したがって、少なくとも1つのALKキナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有する。故に、ポリヌクレオチドの断片は、少なくとも約20ヌクレオチド、約50ヌクレオチド、約100ヌクレオチド、約150、約200、約250、約300、約350、約400、約450、約500、約600、約700、約800、約900、約1000、約1500、約2000、約2500、約3000、約3500、約4000、約4500隣接ヌクレオチドから、最大で、ALK耐性突然変異体ポリペプチドをコードする完全長ポリヌクレオチドの範囲であってもよい。

10

【0093】

ALK耐性突然変異体ポリペプチドの生物学的に活性な部分をコードするポリヌクレオチドの断片は、少なくとも約15、約25、約30、約50、約100、約150、約200、約250、約300、約350、約400、約450、約500、約600、約700、約800、約900、約1000、約1100、約1200、約1300、約1400、約1500、約1600隣接アミノ酸、または最大で、完全長ALK耐性突然変異体ポリペプチド中に存在するアミノ酸の総数をコードするであろう。

20

【0094】

ALK耐性突然変異体ポリペプチドの生物学的に活性な部分は、ALK耐性突然変異体ポリペプチドの部分をコードするポリヌクレオチドの1つの一部分を単離すること、およびポリペプチドのコードされる部分を発現させること（例えば、体外での組み換え発現によって）、およびALKポリペプチドの部分の活性を査定することによって、調製することができる。ALK耐性突然変異体ポリペプチドの断片をコードするポリヌクレオチドは、少なくとも15、20、50、75、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、800、900、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500隣接ヌクレオチド、または最大で、本明細書に開示される完全長ALK耐性突然変異体ヌクレオチド配列中に存在する数のヌクレオチドを含む、ヌクレオチド配列を含むことができる。

30

【0095】

「変異体」配列は、高度な配列類似性を有する。ポリヌクレオチドについて、保存的変異体は、遺伝コードの縮重のため、ALK耐性突然変異体ポリペプチドの1つのアミノ酸配列をコードする配列を含む。これらのような変異体は、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）およびハイブリダイゼーション技術等の、周知の分子生物学技術の使用により特定することができる。変異体ポリヌクレオチドはまた、例えば、部位特異的突然変異誘発を使用することによって生成されるが、依然としてALK耐性突然変異体ポリペプチドをコードするもの等の、合成的に誘導されるヌクレオチド配列を含む。一般に、特定のポリヌクレオチドの変異体は、本明細書の他の箇所に記載される配列アライメントプログラムおよびパラメータによって決定するとき、その特定のポリヌクレオチドに対して少なくとも約40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを超える配列同一性を有するであろう。

40

【0096】

特定のポリヌクレオチドの変異体はまた、変異体ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドと、参照ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドとの間の配列同一性パーセントの比較によって評価することもできる。故に、変異体は、例えば、本明細書に記載されるALKポリペプチドに対して所与の配列同一性パーセントを有するポリペプチドをコードする、単離されたポリヌクレオチドを含む。任意の2つのポリペプチドの間の配列同一性パーセントは、本明細書に記載される配列アライメントプログラムお

50

よびパラメータを使用して算出することができる。ポリヌクレオチドの任意の所定の対が、それらがコードする2つのポリペプチドによって共有される配列同一性パーセントの比較によって評価される場合、2つのコードされたポリペプチドの間の配列同一性パーセントは、少なくとも約40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを超える配列同一性である。

【0097】

「変異体」ポリペプチドとは、ポリペプチドのN末端および/もしくはC末端への1つ以上のアミノ酸の欠失（いわゆるトランケーション）もしくは付加、ポリペプチド中の1つ以上の部位での1つ以上のアミノ酸の欠失もしくは付加、またはポリペプチド中の1つ以上の部位での1つ以上のアミノ酸の置換によって、ALK耐性突然変異体ポリペプチドに由来するポリペプチドが意図される。変異体ALK耐性突然変異体ポリペプチドは、生物学的に活性であり、つまりそれらは少なくとも1つのALKキナーゼ阻害剤に耐性であるキナーゼ活性を有し続ける。かかる変異体は、例えば、遺伝的多型から、または人間による操作からもたらされてもよい。ALK耐性突然変異体ポリペプチドの生物学的に活性な変異体は、本明細書の他の箇所に記載される配列アライメントプログラムおよびパラメータによって決定するとき、ALK耐性突然変異体ポリペプチドのためのアミノ酸配列に対して少なくとも約40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを超える配列同一性を有するであろう。本発明のタンパク質の生物学的に活性な変異体は、わずか1～15アミノ酸残基、6～10等のわずか1～10、わずか5、わずか4、3、2、または更に1アミノ酸残基分だけ、そのタンパク質から異なってもよい。

【0098】

ALK耐性突然変異体ポリペプチドの生物学的に活性な変異体および断片は、少なくとも1つのALKキナーゼ阻害剤への耐性に関する点突然変異を保持する。したがって、ALK耐性突然変異体ポリペプチドの変異体および断片は、次のアミノ酸残基のうちの少なくとも1つを含む：

a) 配列番号2のアミノ酸残基1123位に対応する位置におけるセリン残基またはその保存的置換、

b) 配列番号2のアミノ酸残基1123位に対応する位置におけるアラニン残基またはその保存的置換、

c) 配列番号2のアミノ酸残基1129位に対応する位置におけるバリン残基またはその保存的置換、

d) 配列番号2のアミノ酸残基1132位に対応する位置におけるリジン残基またはその保存的置換、

e) 配列番号2のアミノ酸残基1151位に対応する位置におけるメチオニン残基またはその保存的置換、

f) 配列番号2のアミノ酸残基1156位に対応する位置におけるチロシン残基またはその保存的置換、

g) 配列番号2のアミノ酸残基1174位に対応する位置におけるシステイン残基またはその保存的置換、

h) 配列番号2のアミノ酸残基1174位に対応する位置におけるイソロイシン残基またはその保存的置換、

i) 配列番号2のアミノ酸残基1174位に対応する位置におけるバリン残基またはその保存的置換、

j) 配列番号2のアミノ酸残基1174位に対応する位置におけるロイシン残基またはその保存的置換、

k) 配列番号2のアミノ酸残基1196位に対応する位置におけるメチオニン残基またはその保存的置換、

l) 配列番号2のアミノ酸残基1202位に対応する位置におけるアルギニン残基またはその保存的置換、

m) 配列番号2のアミノ酸残基1203位に対応する位置におけるアスパラギン残基またはその保存的置換、

n) 配列番号2のアミノ酸残基1210位に対応する位置におけるリジン残基またはその保存的置換、

o) 配列番号2のアミノ酸残基1269位に対応する位置におけるアラニン残基またはその保存的置換、

p) 配列番号2のアミノ酸残基1406位に対応する位置におけるリジン残基またはその保存的置換、および

q) 配列番号2のアミノ酸残基1408位に対応する位置におけるリジン残基またはその保存的置換。

#### 【0099】

同様に、変異体ALK耐性突然変異体ポリヌクレオチドは、かかる変異体ALK耐性突然変異体ポリペプチドをコードするものであり得る。

#### 【0100】

本明細書で使用されるとき、アミノ酸残基の「保存的置換」は、別のアミノ酸残基とサイズおよび/または電荷において同様である、他のアミノ酸残基を含む。アミノ酸残基の保存的置換は、天然ALK配列内のその特定の位置で見出されるアミノ酸残基(配列番号2に開示される)を包含しない。

#### 【0101】

本明細書で使用されるとき、天然ALKの特定のアミノ酸残基(配列番号2)に対応する位置におけるALK突然変異体ポリペプチドのアミノ酸残基は、ALK突然変異体配列が、当該技術分野で既知のプログラム(例えば、BLOSUM62マトリックスまたはPAM250マトリックスのいずれかを使用する、GCGソフトウェアパッケージにおけるGAPプログラム)等のアライメントプログラムを使用して、最大限の相同性のために天然ALK配列(配列番号2)と揃えられるとき、天然ALK配列中の特定の位置におけるアミノ酸残基と反対であると思われる、ALK突然変異体ポリペプチド内のアミノ酸残基を指す。

#### 【0102】

ポリペプチドは、アミノ酸置換、欠失、トランケーション、および挿入を含む、種々の方法で変化させられてもよい。かかる操作のための方法は、当該技術分野で一般に既知である。例えば、ALK耐性突然変異体ポリペプチドのアミノ酸配列変異体は、DNA中の突然変異によって調製することができる。突然変異誘発およびヌクレオチド配列変更のための方法は、当該技術分野で周知である。例えば、Kunkel(1985)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488-492、Kunkel et al.(1987)Methods in Enzymol. 154:367-382、米国特許第4,873,192号、Walker and Gaastra, eds.(1983)Techniques in Molecular Biology(MacMillan Publishing Company, New York)、およびそこで引用される参考文献を参照されたい。目的のポリペプチドの生物学的活性に影響を及ぼさない適切なアミノ酸置換に関する手引きは、参照により本明細書に組み込まれるDayhoff et al.(1978)Atlas of Protein Sequence and Structure(Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.)のモデルに見出され得る。1つのアミノ酸を、同様の特性を有する別のアミノ酸と置換する等の、保存的置換が好ましい場合がある。

#### 【0103】

故に、本明細書に使用されるポリヌクレオチドは、天然に生じる配列ならびに合成的に誘導または修飾される配列を含むことができる。同様に、本発明の方法に使用されるポリペプチドは、天然に生じるポリペプチドならびにその変形および修飾型を包含する。一般

10

20

30

40

50



に、変異体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド中でなされる突然変異は、配列をリーディングフレームの外に配置すべきではなく、かつ/または二次mRNA構造を産生する可能性のある相補的領域を作り出すべきではない。欧州特許出願公開第75,444号を参照されたい。

【0104】

本明細書に包含されるポリペプチド配列の欠失、挿入、および置換は、ポリペプチドの特徴の根本的な変化をもたらすことが予想されていない。しかしながら、置換、欠失、または挿入を行う前にそれらの正確な影響を予測することが困難な場合、当業者であれば、日常的なスクリーニングアッセイによってその影響が評価されるであろうことを理解するであろう。

【0105】

変異体ポリヌクレオチドおよびポリペプチドはまた、DNAシャフリング等の突然変異誘発および組み換え誘導手順に由来する配列およびポリペプチドを包含する。かかる手順を用いて、1つ以上の異なるALK耐性突然変異体コード配列を、所望の特性を有する新たなALK耐性突然変異体ポリペプチドを作り出すように操作することができる。このようにして、組み換えポリヌクレオチドのライブラリが、実質的な配列同一性を有し、体外または体内で相同に組み換えることができる、配列領域を含む関連する配列ポリヌクレオチドの集団から生成される。かかるDNAシャフリングのための戦略は、当該技術分野で既知である。例えば、Stemmer (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:10747-10751、Stemmer (1994) Nature 370:389-391、Cramer et al. (1997) Nature Biotech. 15:436-438、Moore et al. (1997) J. Mol. Biol. 272:336-347、Zhang et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:4504-4509、Cramer et al. (1998) Nature 391:288-291、ならびに米国特許第5,605,793号および第5,837,458号を参照されたい。

【0106】

本明細書で使用されるとき、2つのポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列の文脈における「配列同一性」または「同一性」は、指定される比較のウィンドウにわたって最大限に一致するように揃えられるとき、同じである2つの配列中の残基を指す。タンパク質を参照して配列同一性の百分率が使用されるとき、同一でない残基位置は、保存的アミノ酸置換によってしばしば異なり、ここでアミノ酸残基は、同様の化学特性（例えば、電荷または疎水性）を有する他のアミノ酸残基の代わりに置換され、したがって分子の機能的特性を変化させないことが認識される。配列が保存的置換において異なるとき、配列同一性パーセントは、置換の保存的性質について補正するために上方に調整されてもよい。かかる保存的置換によって異なる配列は、「配列類似性」または「類似性」を有するとされる。この調整をなすための手段は、当業者に周知である。典型的には、これは保存的置換を完全なミスマッチよりはむしろ部分的なミスマッチとしてスコア化し、それによって配列同一性百分率を増加させることを伴う。故に、例えば、同一のアミノ酸が1のスコアを与えられ、および非保存的置換がゼロのスコアを与えられる場合、保存的置換は、ゼロから1の間のスコアを与えられる。保存的置換のスコア化は、例えば、プログラムPC/GENE (Intelligentics, Mountain View, California) において実装されるように算出される。

【0107】

本明細書で使用されるとき、「配列同一性の百分率」は、比較のウィンドウにわたって最適に揃えられた2つの配列を比較することによって決定される値を意味する。ここで比較のウィンドウ内のポリヌクレオチド配列の部分は、2つの配列の最適な整列について参照配列（付加または欠失を含まない）と比較して、付加または欠失（すなわち、ギャップ）を含み得る。百分率は、両方の配列中で同一の核酸塩基またはアミノ酸残基が生じる位置の数を決定してマッチした位置の数を得、マッチした位置の数を、比較のウィンドウ内

10

20

30

40

50

の位置の総数で割り、その結果に100を掛けて配列同一性の百分率を得ることによって算出される。

【0108】

別段の定めのない限り、本明細書に提供される配列同一性/類似性値は、GAP Version 10を使用して、次のパラメータを使用して得られる値を指す：50のGAP Weightおよび3のLength Weightならびにnws gap dna . cmpスコアリングマトリックスを使用したヌクレオチド配列についての同一性%および類似性%、8のGAP Weightおよび2のLength WeightならびにBLOSUM62スコアリングマトリックスを使用したアミノ酸配列についての同一性%および類似性%、または任意のその等価のプログラム。「等価のプログラム」とは、問題となる任意の2つの配列について、GAP Version 10によって生成される対応する整列と比較するとき、同一のヌクレオチドまたはアミノ酸残基マッチならびに配列同一性の同一のパーセントを有する整列を生成する、任意の配列比較プログラムが意図される。

10

【0109】

ALKキナーゼ阻害剤に耐性を付与するALK内の新規突然変異が本明細書に開示される。本明細書で使用されるとき、「ALKキナーゼ阻害剤」は、ALKポリペプチドのキナーゼ活性を阻害することができる化合物である。幾つかの実施形態では、ALK突然変異体は、ALK小分子キナーゼ阻害剤に対して耐性である。本明細書で使用されるとき、「小分子」は、補助なしに細胞膜を容易に通過することができるような、サイズが十分に小さい化学化合物を指す。一般に、小分子は、核酸、ポリペプチド、または多糖類等の、ポリマーでない化学化合物を指すが、この用語は、細胞膜を容易に横断することができる小ポリマーを包含することができる。

20

【0110】

ALKのキナーゼ活性は、天然産または合成のいずれであれ、ALK自体および他の下流基質（例えば、SHC）を含む、基質のチロシン残基をリン酸化するALKの能力を指す。オリゴマー化されると、ALKは、3個のALKチロシン残基を自己リン酸化するが、それは酵素を完全に活性化し、ALKがSHC等の更なる基質をリン酸化することを可能にする。ALKキナーゼ阻害剤は、ALKポリペプチドのキナーゼ活性を阻害し、これは阻害剤化合物の不在下でのキナーゼと比較して、キナーゼ活性が部分的にまたは完全に低減されることを意味する。幾つかの実施形態では、ALKキナーゼ活性は、阻害剤の不在下でのキナーゼの活性と比較したとき、ALKキナーゼ阻害剤によって、少なくとも約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%、または約100%低減される。

30

【0111】

ALKポリペプチドのキナーゼ活性をアッセイするための方法は、当該技術分野で知られており、体外でのキナーゼアッセイを含み、この場合、ALKポリペプチドは、親和性精製または免疫沈降法を介して単離され、ALKの自己リン酸化または基質タンパク質もしくはペプチドのリン酸化が、ATPの存在下で測定される。細胞ベースのアッセイもまた使用することができるが、この場合、ALK自己リン酸化またはALK基質のリン酸化は、例えば、免疫プロット法または酵素結合免疫測定法を使用して決定される。ALKキナーゼ活性を分析するための方法の非限定的な例は、米国出願公開第2008/0090776号および第2009/0099193号に見出すことができ、それらの各々は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

40

【0112】

ALKキナーゼ阻害剤は、活性化ループにおける3個のチロシン残基がリン酸化されないALKの不活性型に、またはALKの活性な自己リン酸化型に結合してもよい。ALKキナーゼ阻害剤は、キナーゼの自己リン酸化および更なる基質のリン酸化の両方を阻害する。臨床的に有用であるために、多くのALKキナーゼ阻害剤は、ALKにかなり特異的であるが、ALKキナーゼ阻害剤という用語は、METキナーゼ等の他のキナーゼを阻害

50

することもできる阻害剤も包含する。

【0113】

当該技術分野で既知であるALKのキナーゼ阻害剤の非限定的な例としては、PF-0234166 (Zou et al. (2007) Cancer Res 67:4408-4417、Christensen et al. (2007) Mol Cancer Ther 6:3314-3322、米国出願公開第2008/0051419号)、NVP-TAE684 (Galkin et al. (2007) Proc Natl Acad Sci USA 104:270-275)、スタウロスポリン、7-ヒドロキシスタウロスポリン、CEP-14083、CEP-14513、CEP-28122 (Wan et al. (2006) Blood 107:1617-1623、Piva et al. (2006) J Clin Invest 116:3171-31821)、ピリドン14 (Li et al. (2006) J Med Chem 49:1006-1015)、ピリドン15、CRL151104A (米国出願公開第2008/0171769号)、およびWZ-5-126 (McDermott et al. (2008) Cancer Res 68:3389-3395)が挙げられ、それらの各々は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。具体的な実施形態では、本開示のALK耐性突然変異は、PF-0234166に耐性を付与する。

10

【0114】

ALK耐性突然変異体ポリヌクレオチドは、発現カセットに見出すことができる。発現カセットは、ポリヌクレオチドの発現を促進するALK耐性突然変異体ポリヌクレオチドに作動可能に連結された、1つ以上の調節配列を含むことができる。「調節配列」は、コード配列の上流(5'非コード配列)、コード配列内、またはコード配列の下流(3'非コード配列)に位置し、関連するコード配列の転写、RNAプロセッシングまたは安定性、または翻訳に影響を及ぼす、ヌクレオチド配列を指す。例えば、Goeddel (1990) in Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185 (Academic Press, San Diego, California)を参照されたい。調節配列は、プロモーター、翻訳リーダー配列、イントロン、およびポリアデニル化認識配列を含んでもよい。

20

【0115】

調節配列は、コード配列によってコードされるポリペプチドの発現を可能にするために、コード配列と作動可能に連結される。「作動可能に連結」とは、コード配列が、ヌクレオチド配列の発現を可能にする状態で、調節配列(複数可)に機能的に連結されることを意味することが意図される。作動可能に連結された要素は、隣接していても隣接していなくてもよい。ポリヌクレオチドは、センスまたはアンチセンス配向で、調節配列に作動可能に連結されてもよい。

30

【0116】

調節領域(すなわち、プロモーター、転写調節領域、および翻訳終結領域)および/またはコードポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチドが導入されている細胞に対して、または互いに対して天然/類似していてもよい。代替的に、調節領域および/またはコードポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチドが導入されている細胞に対して、または互いに対して異種性であってもよい。

40

【0117】

本明細書で使用されるとき、配列に言及する場合の「異種性」は、外来種に由来する配列であるか、または、同じ種に由来する場合、人間の意図的な介入によって、組成および/もしくはゲノム遺伝子座においてその天然型から大幅に修飾された配列である。例えば、異種性ポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーターは、ポリヌクレオチドが由来する種とは異なる種に由来するか、または、同じ/類似した種に由来する場合、1つまたは双方は、それらの原型および/またはゲノム遺伝子座から大幅に修飾されるか、あるいはプロモーターは、作動可能に連結されたポリヌクレオチドのための天然プロモーターでない。

50

## 【0118】

調節配列は、多くの種類の宿主細胞中のヌクレオチド配列の構成性発現を導く配列、およびある種の宿主細胞中のみの（例えば、組織特異的調節配列）もしくは発達分化の特定の段階における（例えば、発達特異的調節配列）ヌクレオチド配列の発現を導く配列、または化学的に誘導される配列を含む。発現カセットの設計が、ポリヌクレオチドが導入されるべき宿主細胞の選択、所望されるポリペプチドの発現のレベル等のような要因に依存し得ることは、当業者によって理解されるであろう。かかる発現カセットは、典型的には、核酸のベクター中への導入を促進するために、制限酵素のために適切に位置付けられた1つ以上の部位を含む。

## 【0119】

適切なプロモーターおよび/または調節要素は、目的の細胞中の、および特定の発達/分化状態における、コード配列の発現を可能にするために容易に選択することができることが更に理解されるであろう。幾つかの実施形態では、RNAポリメラーゼIIによって認識されるプロモーターを使用することができる。

## 【0120】

調節配列はまた、ウイルス調節要素によって提供することができる。例えば、一般に使用されるプロモーターは、ポリオーマ、アデノウイルス2、サイトメガロウイルス、およびシミアンウイルス40に由来する。真核細胞のための他の好適な発現系については、Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York) の16および17章を参照されたい。Goeddel (1990) in *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185 (Academic Press, San Diego, California) を参照されたい。

## 【0121】

種々の構成性プロモーターが知られている。例えば、種々の実施形態では、ヒトサイトメガロウイルス(CMV)最初期遺伝子プロモーター、SV40初期プロモーター、ラウス肉腫ウイルスの長い末端反復、ラットインスリンプロモーター、およびグリセルアルデヒド-3-リン酸塩デヒドロゲナーゼを使用して、目的のコード配列の高レベルの発現を得ることができる。当該技術分野で周知である他のウイルスまたは哺乳類細胞または細菌ファージプロモーターの使用を用いて、目的のコード配列の発現を達成することができる。使用され得るプロモーターには、Squinto et al. (1991) *Cell* 65:120)に記載される長い末端反復、SV40初期プロモーター領域(Bernoist and Chambon (1981) *Nature* 290:304-310)、CMVプロモーター、M-MuLV 5'末端反復、ラウス肉腫ウイルスの長い3'末端反復中に含有されるプロモーター(Yamamoto et al. (1980) *Cell* 22:787-797)、およびヘルペスチミジンキナーゼプロモーター(Wagner et al. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:144-1445)が含まれるが、これらに限定されない。

## 【0122】

誘導性プロモーターもまた知られている。誘導性プロモーターおよびそれらの誘導因子の非限定的な例としては、MT II/ホルボールエステル(TPA) (Palmiter et al. (1982) *Nature* 300:611) および重金属 (Haslinger and Karin (1985) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA.* 82:8572、Searle et al. (1985) *Mol. Cell Biol.* 5:1480、Stuart et al. (1985) *Nature* 317:828、Imagawa et al. (1987) *Cell* 51:251、Karin et al. (1987) *Mol. Cell Biol.* 7:606、Angel et al. (1987) *Cell* 49:729、McNeall et al

10

20

30

40

50

. (1989) Gene 76:8)、MMTV(マウス乳腺腫瘍ウイルス)/糖質コ  
 チコイド(Huang et al. (1981) Cell 27:245、Lee et  
 al. (1981) Nature 294:228、Majors and Var  
 mus (1983) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA. 80:5866  
 、Chandler et al. (1983) Cell 33:489、Ponta  
 et al. (1985) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA. 82:1  
 020、Sakai et al. (1988) Genes and Dev. 2:11  
 44)、 $\beta$ -インターフェロン/ポリ(rI)Xおよびポリ(rc)(Tavernie  
 r et al. (1983) Nature 301:634)、アデノウイルス5 E  
 2/E1A(Imperiale and Nevins (1984) Mol. Cell  
 . Biol. 4:875)、c-jun/ホルボールエステル(TPA)、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、コラ  
 ゲナーゼ/ホルボールエステル(TPA)(Angel et al. (1987) Mo  
 l. Cell. Biol. 7:2256)、ストロメリシン/ホルボールエステル(TP  
 A)、IL-1(Angel et al. (1987) Cell 49:729)、S  
 V40/ホルボールエステル(TPA)(Angel et al. (1987) Cel  
 l 49:729)、マウスMX遺伝子/インターフェロン、ニューカッスル病ウイルス  
 、GRP78遺伝子/A23187(Resendez Jr. et al. (1988  
 ) Mol. Cell. Biol. 8:4579)、 $\beta$ -2-マクログロブリン/IL-6  
 、ビメンチン/血清(Kunz et al. (1989) Nucl. Acids Re  
 s. 17:1121)、MHCクラスI遺伝子H-2 kB/インターフェロン(Bla  
 nar et al. (1989) EMBO J. 8:1139)、HSP70/ela  
 、SV40大型T抗原(Taylor and Kingston (1990) Mol.  
 Cell. Biol. 10:165、Taylor and Kingston (199  
 0) Mol. Cell. Biol. 10:176、Taylor et al. (1989  
 ) J. Biol. Chem. 264:15160)、プロリフェリン/ホルボールエステ  
 ル-TPA(Mordacq and Linzer (1989) Genes and  
 Dev. 3:760)、腫瘍壊死因子/PMA(Hensel et al. (1989  
 ) Lymphokine Res. 8:347)、甲状腺刺激ホルモン 遺伝子/甲状腺  
 ホルモン(Chatterjee et al. (1989) Proc. Nat'l A  
 cad. Sci. USA. 86:9114)、ならびにインスリンEボックス/グルコー  
 スが挙げられる。

#### 【0123】

多様な翻訳制御要素が当業者に知られており、本開示の方法および組成物に使用す  
 ることができる。これらには、リボソーム結合部位、翻訳開始および終結コドン、ならびにピ  
 コルナウイルスに由来する要素(特に、CITE配列とも称される内部リボソーム進入部  
 位またはIRES)が含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0124】

一般に、組み換えDNA技術において有用な発現ベクターは、しばしばプラスミド(ベ  
 クター)の形態である。しかしながら、本発明は、ウイルスベクター(例えば、複製欠損  
 レトロウイルス、アデノウイルス、レンチウイルス、およびアデノ関連ウイルス)等の、  
 発現ベクターのかかる他の形態を含むことが意図される。例えば、参照により本明細書に  
 組み込まれる米国公開第2005214851号を参照されたい。レトロウイルスベクタ  
 ー、特に、レンチウイルスベクターは、細胞との接触前に、ベクターをピリオン中にパッ  
 ケージングすることによって形質導入される。

#### 【0125】

発現カセットは、選択マーカーを更に含むことができる。本明細書で使用されるとき、  
 「選択マーカー」という用語は、細胞中で発現されるとき、ベクターにより形質転換され  
 た細胞の選択を可能にする、任意のポリヌクレオチドを含む。例えば、選択マーカーは、  
 薬物、栄養要求量、または細胞傷害性薬物に耐性を付与することができる。選択マーカー  
 はまた、蛍光または色素堆積等の選択可能な表現型を誘導することができる。「陽性選択

マーカー」は、マーカーを発現する細胞が、選択剤に対して生存することを可能にし、故にそのマーカーを発現する細胞に対して陽性選択特徴を付与する。陽性選択マーカー/薬剤には、例えば、neo/G418、neo/カナマイシン、hyg/ハイグロマイシン、hisD/ヒスチジノール、gpt/キサンチン、ble/ブレオマイシン、HPRT/ヒポキサンチンが含まれる。他の陽性選択マーカーには、膜結合ポリペプチドをコードするDNA配列が含まれる。かかるポリペプチドは、当業者に周知であり、例えば、分泌性配列、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞内ドメインを含むことができる。陽性選択マーカーとして発現されるとき、かかるポリペプチドは、細胞膜と会合する。細胞外ドメインに特異的な蛍光標識された抗体は次いで、膜結合ポリペプチドを発現する細胞について選択するために、蛍光標識式細胞分取器(FACS)において使用されてもよい。発現カセットが選択可能なマーカーを更に含む実施形態の幾つかでは、CITE配列とも称される、内部リボソーム進入部位またはIRESを使用して、選択可能なマーカーおよび目的のポリペプチド(poly peptide)のコード配列を分離することができ、それは同じプロモーター配列の制御下での2つの配列の同時転写を可能にするが、転写物のポリペプチドへの別個の翻訳を可能にする。

10

20

30

40

50

#### 【0126】

また、本発明の宿主細胞を使用して、非ヒトトランスジェニック動物を産生することもできる。例えば、一実施形態では、本発明の宿主細胞は、ALK耐性突然変異体ポリペプチドをコードする配列が導入された、受精卵母細胞または胚性幹細胞である。次いで、かかる宿主細胞を使用して、ALK耐性突然変異体ポリペプチドをコードする外来性配列がゲノム中に導入された、非ヒトトランスジェニック動物、または相同組み換え動物を作り出すことができる。幾つかの実施形態では、ALK耐性突然変異体は、ALK発癌性融合タンパク質の一部である。かかる動物は、本明細書の他の箇所に記載されるアッセイを使用して、本開示のALK耐性突然変異体を阻害することが可能である薬剤を特定するために、または少なくとも1つのALKキナーゼ阻害剤に耐性である異常なALK活性に関連する癌の増殖を阻害する、新規阻害剤の能力を更に検証するために、ALK耐性突然変異体を阻害する候補薬剤をスクリーニングするのに有用である。

#### 【0127】

本明細書で使用されるとき、「トランスジェニック動物」は、非ヒト動物、具体的な実施形態では、哺乳動物、ラットまたはマウス等の齧歯類であり、ここでその動物の細胞の1つ以上は導入遺伝子を含む。トランスジェニック動物の他の例としては、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ウシ、ヤギ、ニワトリ、両生類等が挙げられる。導入遺伝子は、トランスジェニック動物が発達する元の細胞のゲノム中に組み込まれ、成熟動物のゲノム中に残る、外来性DNAであり、それによってトランスジェニック動物の1つ以上の細胞型または組織中での、コードされる遺伝子産物の発現を導く。本明細書で使用されるとき、「相同組み換え動物」は、非ヒト動物、具体的な実施形態では、哺乳動物であり、他の実施形態では、マウスであるが、ここで内在性ALK遺伝子は、動物の発達前に、内在性遺伝子と、動物の細胞、例えば、動物の胚性細胞中に導入される外来性DNA分子との間の相同組み換えによって変化させられている。

#### 【0128】

本発明のトランスジェニック動物は、ALK耐性突然変異体ポリペプチドをコードする核酸を、受精卵母細胞の雄性前核中に、例えば、マイクロインジェクション、レトロウイルス感染によって導入し、卵母細胞が偽妊娠雌育成用動物中で発達することを可能にすることによって、作り出すことができる。かかる配列は、非ヒト動物のゲノム中へ導入遺伝子として導入することができる。介在配列およびポリアデニル化シグナルもまた、導入遺伝子の発現の効率を増加させるために、導入遺伝子に含めることができる。組織特異的調節配列(複数可)は、配列に特定の細胞の発現を導くために、導入遺伝子に作動可能に連結することができる。胚操作およびマイクロインジェクションを介してトランスジェニック動物、特にマウス等の動物を生成するための方法は、当該技術分野で慣習となっており、例えば、米国特許第4,736,866号、第4,870,009号、および第4,8

73, 191号、ならびにHogan (1986) *Manipulating the Mouse Embryo* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1986)に記載される。同様の方法が、他のトランスジェニック動物の産生に使用される。トランスジェニック初代動物は、ゲノム中にALK耐性突然変異を含むALK耐性突然変異体タンパク質もしくはポリヌクレオチドの存在、および/または動物の組織もしくは細胞中でのかかる配列のmRNAの発現に基づいて特定することができる。次いでトランスジェニック初代動物を使用して、導入遺伝子を担持する更なる動物を繁殖させることができる。更に、導入遺伝子を担持するトランスジェニック動物を、他の導入遺伝子を担持する他のトランスジェニック動物に更に繁殖させることができる。

10

## 【0129】

相同組み換え動物を作り出すために、ALK耐性突然変異体ポリペプチドをコードする配列の少なくとも一部分を含有するベクターを調製して、それによってALK耐性突然変異体ポリペプチドの発現を可能にする。一実施形態では、ALK遺伝子の変化した部分である、相同組み換えベクターには、相同組み換えが、ベクターによって担持される外来性ALK遺伝子と胚性幹細胞中の内在性ALK遺伝子との間で生じるのを可能にするために、その5'末端および3'末端において、ALK遺伝子の更なる核酸が隣接する。更なる隣接ALK核酸は、内在性遺伝子との相同組み換えの成功のために十分な長さである。典型的には、数キロベースの隣接DNA (5'末端および3'末端の両方における) がベクターに含まれる (相同組み換えベクターの説明については、例えば、Thomas and Capecci (1987) *Cell* 51:503を参照されたい)。ベクターは、胚性幹細胞株 (例えば、エレクトロポレーションによって) 中に導入され、導入されたALK遺伝子が内在性ALK遺伝子により相同組み換えされた細胞が選択される (例えば、Li et al. (1992) *Cell* 69:915を参照されたい)。選択された細胞は次いで、凝集キメラを形成するために、動物 (例えば、マウス) の胚盤胞中に注射される (例えば、Bradley (1987) *in Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, ed. Robertson (IRL, Oxford pp. 113-152を参照されたい)。キメラ胚は次いで、好適な偽妊娠雌育成用動物中に移植され、胚が出生に至る (brought to term) ことが可能である。それらの生殖細胞中に相同組み換えされたDNAを抱く子孫を使用して、動物の全ての細胞が、導入遺伝子の生殖系列伝達によって相同組み換えされたDNAを含有する、動物を繁殖させることができる。相同組み換えベクターおよび相同組み換え動物を構築するための方法は、Bradley (1991) *Current Opinion in Bio/Technology* 2:823-829、ならびにPCT公開第WO90/11354号、第WO91/01140号、第WO92/0968号、および第WO93/04169号に更に記載される。

20

30

## 【0130】

別の実施形態では、導入遺伝子の調節された発現を可能にする、選択された系を含有するトランスジェニック非ヒト動物を産生することができる。かかる系の一例は、バクテリオファージP1のcre/loxPリコンビナーゼ系である。cre/loxPリコンビナーゼ系の説明については、例えば、Lakso et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:6232-6236を参照されたい。リコンビナーゼ系の別の例は、出芽酵母 (O'Gorman et al. (1991) *Science* 251:1351-1355) のFLPリコンビナーゼ系である。cre/loxPリコンビナーゼ系を使用して、導入遺伝子の発現を調節する場合、Creリコンビナーゼおよび選択されたタンパク質の両方をコードする導入遺伝子を含有する動物が必要とされる。かかる動物は、「二重」トランスジェニック動物の構築を通じて、例えば、一方が選択されたタンパク質をコードする導入遺伝子を含有し、他方がリコンビナーゼをコードする導入遺伝子を含有する、2つのトランスジェニック動物を交配させることによ

40

50

って、提供することができる。

【0131】

また、本明細書に記載される非ヒトトランスジェニック動物のクローンを、Wilmut et al. (1997) Nature 385: 810-813、ならびにPCT公開第WO97/07668号および第WO97/07669号に記載される方法に従って産生することもできる。

【0132】

本明細書で述べられるように、本発明は、ALK耐性突然変異体ポリペプチドに特異的に結合する抗体を含む。本明細書で考察されるように、これらの抗体は、「抗ALK耐性突然変異体抗体」と称される。故に、「抗ALK耐性突然変異体抗体」とは、少なくとも1つのALKキナーゼ阻害剤に耐性である、本明細書に開示されるALKポリペプチドに特異的な抗体が意図される。この用語はまた、ALK阻害剤耐性突然変異を有するALKポリペプチドを含むALK発癌性融合タンパク質に特異的な抗体も包含する。それぞれの抗体は、本発明の方法において、単独でまたは組み合わせて使用することができる。

10

【0133】

モノクローナル抗体(mAbs)を含む、抗体は、標準的なプロトコルによって作製することができる。例えば、Harlow and Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual, CSHL, New York, 1999を参照されたい。簡潔に述べると、マウス、ハムスター、またはウサギ等の哺乳動物は、ペプチドまたはペプチド複合体の免疫原性型により免疫化することができる。タンパク質またはペプチド上に免疫原性を付与するための技術には、担体との共役、または当該技術分野で周知である他の技術が含まれる。

20

【0134】

「特異的に結合する抗体」とは、その抗体が別のポリペプチドと実質的に交差反応しないであろうことが意図される。「実質的に交差反応しない」とは、抗体または断片が、特定のALK耐性突然変異体ポリペプチドに対する結合親和性の10%未満、5%未満、または1%未満である、異なるポリペプチドに対する結合親和性を有することが意図される。

【0135】

具体的な実施形態では、抗ALK耐性突然変異体抗体は、特定のALK耐性突然変異体ポリペプチドに特異的に結合し、キナーゼのキナーゼ活性を低減する。故に、具体的な実施形態では、抗ALK耐性突然変異体抗体は、ALK耐性突然変異体阻害剤である。

30

【0136】

本明細書に開示される、および本発明の方法に使用するための、抗ALK耐性突然変異体抗体は、当業者に知られている任意の抗体産生方法を使用して産生することができる。故に、ポリクローナル血清は、従来の方法によって調製することができる。一般に、ALK耐性突然変異体ポリペプチドまたはその断片を含有する溶液が、好適な動物、好ましくは、マウス、ラット、ウサギ、またはヤギを免疫化するために最初に使用される。得ることができる血清の量、ならびに標識された抗ウサギおよび抗ヤギ抗体の入手のし易さに起因して、ウサギまたはヤギがポリクローナル血清の調製のために好ましい。

40

【0137】

ポリクローナル血清は、トランスジェニック動物、好ましくは、ヒト免疫グロブリン遺伝子座を担持するマウス中で、調製することができる。好ましい実施形態では、ALK耐性突然変異体ポリペプチドを発現するSf9(Spodoptera frugiperda)細胞またはその断片が、免疫原として使用される。免疫化はまた、食塩水中、好ましくは、フロイント完全アジュバント等のアジュバント中で、抗原含有溶液を混合または乳化し、混合物または乳剤を非経口で(一般に皮下または筋肉内に)注射することによって行うこともできる。50~200µg/注射の用量が、典型的には十分である。免疫化は一般に、好ましくはフロイント不完全アジュバントを使用して、食塩水中のタンパク質の1つ以上の注射により、2~6週後に追加免疫される。代替的に、体外免疫化によって

50



、当該技術分野において知られる方法を使用して、抗体を生成してもよく、それは本発明の目的のためには、体内免疫化と同等であるとみなされる。ポリクローナル抗血清は、免疫化された動物からの血液をガラスまたはプラスチック容器中に採取し、血液を25で1時間インキュベートし、続いて4で2～18時間インキュベートすることによって得られる。血清は、遠心分離（例えば、1,000×g、10分間）によって回収される。ウサギから、1回血液採取当たり約20～50mLが得られ得る。

#### 【0138】

Sf9細胞の産生は、米国特許第6,004,552号に開示される。簡潔に述べると、ALK耐性突然変異体ポリペプチドをコードする配列が、導入ベクターを使用してバキュロウイルス中に組み換えられる。プラスミドは、野生型バキュロウイルスとともにSf9細胞中に共トランスフェクトされる。組み換えバキュロウイルス感染Sf9細胞が特定され、クローニング的に精製される。

10

#### 【0139】

幾つかの実施形態では、抗体は、モノクローナルの性質を有する。「モノクローナル抗体」とは、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体が意図され、つまり、その集団を含む個々の抗体は、少量で存在し得る潜在的な天然に生じる突然変異を除いて同一である。この用語は、抗体の種または源に関して限定されない。この用語は、全免疫グロブリンならびにFab、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、および抗体の抗原結合機能を保持するその他の断片を包含する。モノクローナル抗体は、高度に特異的であり、標的ポリペプチド上の単一の抗原部位に対して向けられる。更に、異なる決定基（エピトープ）に対して向けられる異なる抗体を典型的に含む従来（ポリクローナル）抗体調製物と対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対して向けられる。「モノクローナル」という修飾語は、実質的に均一な抗体の集団から得られるという抗体の特徴を示しており、任意の特定の方法による抗体の産生を必要とするものとして解釈されないものとする。例えば、本発明において使用されるべきモノクローナル抗体は、KohlerおよびMilstein（Nature 256:495-97, 1975）によって最初に記載されたハイブリドーマ法によって作製されてもよく、または組み換えDNA法によって作製されてもよい（例えば、米国特許第4,816,567号を参照されたい）。「モノクローナル抗体」はまた、例えば、Clackson et al.（Nature 352:624-28, 1991）、Marks et al.（J. Mol. Biol. 222:581-97, 1991）、および米国特許第5,514,548号に記載される技術を使用して、ファージ抗体ライブラリから単離されてもよい。

20

30

#### 【0140】

「エピトープ」とは、抗体が産生され、抗体が結合するであろう、抗原分子の一部が意図される。エピトープは、線状アミノ酸残基（すなわち、エピトープ内の残基は、線状様式で次々に順番に配置される）、非線状アミノ酸残基（本明細書で「非線状エピトープ」と称され、これらのエピトープは、順番に配置されない）、または線状アミノ酸残基および非線状アミノ酸残基の両方を含む可能性がある。本開示の主題の目的のために、特異的な抗ALK耐性突然変異体抗体によって認識されるエピトープは、特定のALK耐性突然変異体に見出され、天然ALKポリペプチド中に存在しないものである。

40

#### 【0141】

本明細書で考察されるように、mAbsは、KohlerおよびMilsteinの方法、またはその修正を使用して調製することができる。典型的には、マウスは、抗原を含有する溶液により免疫化される。免疫化は、食塩水中、好ましくは、フロイント完全アジュバント等のアジュバント中で、抗原含有溶液を混合または乳化し、混合物または乳剤を非経口で注射することによって行うことができる。当該技術分野で知られる任意の免疫化の方法を使用して、本発明のモノクローナル抗体を得てもよい。動物の免疫化後、脾臓（および任意に、複数の大きいリンパ節）が取り出され、単一細胞へと解離される。脾臓細胞は、細胞懸濁液を目的の抗原でコーティングしたプレートまたはウェルに適用することによってスクリーニングされてもよい。抗原に特異的な膜結合免疫グロブリンを発現する

50

B細胞は、プレートに結合し、すすぎ流されない。結果として生じるB細胞、または全ての解離した脾臓細胞は次いで、骨髓腫細胞と融合してハイブリドーマを形成するように誘導され、選択培地中で培養される。結果として生じた細胞は、連続希釈によってプレートされ、目的の抗原に特異的に結合する（かつ関連のない抗原に結合しない）抗体の産生についてアッセイされる。選択されたmAb分泌ハイブリドーマは次いで、体外（例えば、組織培養瓶または中空繊維反応器中で）、または体内（マウスの腹水として）のいずれかで培養される。

#### 【0142】

本発明の抗ALK耐性突然変異体抗体が組み換えDNA法を使用して調製されることになる場合、モノクローナル抗体をコードするDNAは、従来の手順を使用して（例えば、マウス抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することが可能である、オリゴヌクレオチドプローブを使用することによって）、容易に単離され、配列決定される。本明細書に記載されるハイブリドーマ細胞は、かかるDNAの源としての機能を果たすことができる。一旦単離されると、DNAは、発現ベクター中に配置することができ、それは次いで、さもなければ免疫グロブリンタンパク質を産生しない大腸菌細胞、サルCOS細胞、チャニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、または骨髓腫細胞等の宿主細胞中にトランスフェクトされて、組み換え宿主細胞中でモノクローナル抗体の合成を得る。抗体をコードするDNAの細菌中での組み換え発現に関する概説論文には、Skerra（1993）*Curr. Opin. Immunol.* 5: 256-62、およびPhickthun（1992）*Immunol. Revs.* 130: 151-88が含まれる。代替的に、抗体は、米国特許第5,545,403号、第5,545,405号、および第5,998,144号に開示されるように、CHO細胞株等の細胞株中で産生することができる。簡潔に述べると、細胞株は、それぞれ、軽鎖および重鎖を発現することが可能なベクターでトランスフェクトされる。別個のベクター上で2つのタンパク質をトランスフェクトすることによって、キメラ抗体を産生することができる。別の利点は、抗体の正しいグリコシル化である。

#### 【0143】

更に、本明細書で使用される「抗ALK耐性突然変異体抗体」という用語は、キメラおよびヒト化抗ALK耐性突然変異体抗体を包含する。「キメラ」抗体とは、最も好ましくは組み換えデオキシリボ核酸技術を使用して誘導され、ヒト（免疫学的に「関連する」種、例えば、チンパンジーを含む）および非ヒト構成成分の両方を含む、抗体が意図される。故に、キメラ抗体の定常領域は、最も好ましくは天然ヒト抗体の定常領域と実質的に同一であり、キメラ抗体の変換領域は、最も好ましくは非ヒト源に由来し、ALK耐性突然変異体抗原に対して所望の抗原特異性を有する。非ヒト源は、それを使用してヒトALK耐性突然変異体抗原またはヒトALK耐性突然変異体抗原を含む物質に対する抗体を生成することができる、任意の脊椎動物源であることができる。かかる非ヒト源には、齧歯類（例えば、ウサギ、ラット、マウス等、例えば、米国特許第4,816,567号を参照されたい）および非ヒト霊長類（例えば、旧世界ザル、類人猿等、例えば、米国特許第5,750,105号および第5,756,096号を参照されたい）が含まれるが、これらに限定されない。本明細書で使用されるとき、「免疫学的に活性」という語句は、キメラ/ヒト化抗ALK耐性突然変異体抗体を参照して使用されるとき、特定のALK耐性突然変異体に結合するキメラ/ヒト化抗体を意味する。

#### 【0144】

「ヒト化」とは、非ヒト免疫グロブリン配列に由来する最小配列を含有する、抗ALK耐性突然変異体抗体の形態が意図される。ほとんどの場合、ヒト化抗体は、レシピエントの超可変領域（相補性決定領域またはCDRとしても知られる）からの残基が、所望の特異性、親和性、および能力を有するマウス、ラット、ウサギ、または非ヒト霊長類等の非ヒト種（ドナー抗体）の超可変領域からの残基によって置換される、ヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）である。「相補性決定領域」という語句は、天然免疫グロブリン結合部位の天然Fv領域の結合親和性および特異性を一緒に定める、アミノ酸配列を指す。

例えば、Chothia et al. (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-17、および Kabat et al. (U.S. Dept. of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, 1991) を参照されたい。「定常領域」という語句は、エフェクター機能を付与する抗体分子の部分を目指す。

【0145】

ヒト化は本質的に、Jones et al. (1986) Nature 321: 522-25、Riechmann et al. (1988) Nature 332: 323-27、および Verhoeyen et al. (1988) Science 239: 1534-36 によって記載される方法に従って、齧歯類または突然変異体齧歯類 CDR または CDR 配列を、ヒト抗体の対応する配列の代わりに置換することによって行うことができる。また、米国特許第 5,225,539 号、第 5,585,089 号、第 5,693,761 号、第 5,693,762 号、および第 5,859,205 号も参照されたい。場合によっては、ヒト免疫グロブリンの 1 つ以上の可変領域のフレームワーク領域内の残基は、対応する非ヒト残基によって置換される（例えば、米国特許第 5,585,089 号、第 5,693,761 号、第 5,693,762 号、および第 6,180,370 号を参照されたい）。更に、ヒト化抗体は、レシピエント抗体中またはドナー抗体中に見出されない残基を含んでもよい。これらの修飾は、抗体性能を更に改良するため（例えば、所望の親和性を得るため）に行われる。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも 1 つ、典型的には 2 つの可変ドメインの実質的に全てを含むことになり、ここで超可変領域の全てまたは実質的に全ては、非ヒト免疫グロブリンのそれらに対応し、フレームワーク領域の全てまたは実質的に全ては、ヒト免疫グロブリン配列のそれらである。ヒト化抗体はまた、任意に、免疫グロブリン定常領域 (Fc) の少なくとも一部分、典型的には、ヒト免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部分を含むことになる。したがって、かかる「ヒト化」抗体は、実質的に無傷のヒト可変ドメイン未満 (substantially less than an intact human variable domain) が、非ヒト種からの対応する配列によって置換されている抗体を含んでもよい。

【0146】

また、「抗 ALK 耐性突然変異体抗体」という用語は、非ヒト哺乳類宿主、より詳細には、不活性化された内在性免疫グロブリン遺伝子座を特徴とするトランスジェニックマウス中で産生される、異種のまたは修飾された抗 ALK 耐性突然変異体抗体を包含する。かかるトランスジェニック動物において、宿主免疫グロブリンの軽鎖および重鎖サブユニットの発現のためのコンピテント内在性遺伝子は、非機能的にされ、類似したヒト免疫グロブリン遺伝子座で置換される。これらのトランスジェニック動物は、軽鎖または重鎖宿主免疫グロブリンサブユニットの実質的な不在下で、ヒト抗体を産生する。例えば、米国特許第 5,877,397 号および第 5,939,598 号を参照されたい。好ましくは、特定の ALK 耐性突然変異体に対する完全ヒト抗体が、トランスジェニックマウスを免疫化することによって得ることができる。1 つのかかるマウスは、米国特許第 6,075,181 号、第 6,091,001 号、および第 6,114,598 号に開示される。

【0147】

抗 ALK 耐性突然変異体抗体の断片は、それらが、完全長抗体の所望の親和性を保持する限り、本発明の方法における使用に好適である。故に、抗 ALK 耐性突然変異体抗体の断片は、特定の ALK 耐性突然変異体ポリペプチドに特異的に結合する能力を保持するであろう。かかる断片は、対応する完全長抗 ALK 耐性突然変異体抗体と同様の特性を特徴とし、つまり、断片は、特定の ALK 耐性突然変異体ポリペプチドに特異的に結合するであろう。かかる断片は、本明細書で「抗原結合性」断片と称される。

【0148】

好適な抗体の抗原結合性断片は、完全長抗体の一部分、一般には、その抗原結合性または可変領域を含む。抗体断片の例としては、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、および Fv 断片、ならびに 1 本鎖抗体分子が挙げられるが、これらに限定されない。「Fab」とは、軽鎖

10

20

30

40

50

および重鎖の一部から構成される、免疫グロブリンの一価抗原結合性断片が意図される。 $F(ab')_2$ とは、両方の軽鎖および両方の重鎖の一部を含有する、免疫グロブリンの二価抗原結合性断片が意図される。「1本鎖Fv」または「sFv」抗体断片とは、抗体の $V_H$ および $V_L$ ドメインを含む断片が意図され、ここでこれらのドメインは、単一のポリペプチド鎖中に存在する。例えば、米国特許第4,946,778号、第5,260,203号、第5,455,030号、および第5,856,456号を参照されたい。一般に、Fvポリペプチドは、sFvが抗原結合のために所望の構造を形成するのを可能にする、 $V_H$ ドメインと $V_L$ ドメインとの間のポリペプチドリンカーを更に含む。sFvの概説については、Pluckthun (1994) in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, Vol. 113, ed. Rosenberg and Moore (Springer-Verlag, New York), pp. 269 - 315を参照されたい。

10

20

30

40

50

**【0149】**

抗体または抗体断片は、例えば、McCafferty et al. (1990) *Nature* 348:552-54、および米国特許第5,514,548号に記載される技術を使用して生成される抗体ファージライブラリから単離することができる。Clackson et al. (1991) *Nature* 352:624-28、およびMarks et al. (1991) *J. Mol. Biol.* 222:581-97は、それぞれ、ファージライブラリを使用したマウスおよびヒト抗体の単離を記載する。その後の刊行物は、鎖シャフリングによる高親和性(nM範囲)ヒト抗体の産生(Marks et al. (1992) *Bio/Technology* 10:779-83)、ならびに非常に大きいファージライブラリを構築するための戦略としてのコンビナトリアル感染および体内組み換え(Waterhouse et al. (1993) *Nucleic Acids Res.* 21:2265-66)を記載する。故に、これらの技術は、モノクローナル抗体の単離のための伝統的なモノクローナル抗体ハイブリドーマ技術に対する実行可能な代替手段である。

**【0150】**

種々の技術が、抗体断片の産生のために開発されている。伝統的には、これらの断片は、無傷の抗体のタンパク質分解消化を介して誘導された(例えば、Morimoto et al. (1992) *J. Biochem. Biophys. Methods* 24:107-17、およびBrennan et al. (1985) *Science* 229:81-3を参照されたい)。しかしながら、これらの断片は、現在、組み換え宿主細胞によって直接に産生することができる。例えば、抗体断片は、上述の抗体ファージライブラリから単離することができる。代替的には、Fab断片は大腸菌から直接に回収することができ、化学的にカップリングして、 $F(ab')_2$ 断片を形成することができる(Carter et al. (1992) *Bio/Technology* 10:163-67)。別のアプローチによれば、 $F(ab')_2$ 断片は、組み換え宿主細胞培養物から直接に単離することができる。抗体断片の産生のための他の技術は、当業者に明らかであろう。

**【0151】**

本発明は、特定の本開示のALK耐性突然変異体の特異的結合剤および/または阻害剤を特定するための方法(本明細書で「スクリーニングアッセイ」とも称される)を提供する。本明細書で考察されるように、ALK耐性突然変異体特異的結合剤およびALK耐性突然変異体阻害剤を含む、種々のALK耐性突然変異体ポリペプチド結合剤の特定を目的とする。

**【0152】**

ALK耐性突然変異体結合剤またはALK耐性突然変異体阻害剤をスクリーニングするための方法には、試験化合物が、ALK耐性突然変異体に特異的もしくは非特異的に結合し得るかどうかを決定すること、および/または試験化合物が、特定のALK耐性突然変異体のキナーゼ活性を低減し得るかどうかを決定することが含まれる。

## 【0153】

種々のスクリーニングアッセイに用いられる候補薬剤は、例えば、ペプチド、ペプチド模倣体、ポリヌクレオチド、小分子、抗体、または他の薬剤を含む、任意の化合物が含まれ得る。ある実施形態では、候補薬剤は、小分子である。かかる候補薬剤は、生物学的ライブラリ、空間的にアドレス可能な平行 (spatially addressable parallel) 固相または溶液相ライブラリ、デコンボリューションを必要とする合成ライブラリ法、「1ビーズ1化合物」ライブラリ法、および親和性クロマトグラフィー選択を使用した合成ライブラリ法を含む、当該技術分野で既知のコンビナトリアルライブラリ法における多数のアプローチのいずれを使用しても得ることができる。生物学的ライブラリアプローチは、ペプチドライブラリに限定されるが、他の4つのアプローチは、

10

## 【0154】

分子ライブラリの合成のための方法の例は、当該技術分野、例えば、DeWitt et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6909、Erb et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:11422、Zuckermann et al. (1994) J. Med. Chem. 37:2678、Cho et al. (1993) Science 261:1303、Carrell et al. (1994) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33:2059、Carell et al. (1994) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33:2061、およびGallop et al. (1994) J. Med. Chem. 37:1233に見出すことができる。

20

## 【0155】

既知の薬理的薬剤、また更に既知のALK阻害剤も、ALK耐性突然変異体のうちの少なくとも1つのキナーゼ活性阻害する能力について試験され得る構造的類似体産生するために、アシル化、アルキル化、エステル化、アミド化 (amidification) 等の指向性または無作為化学修飾に供されてもよい。代替的に、候補薬剤は、細菌、真菌、植物、または動物を含む任意の生物に由来し得る。

## 【0156】

化合物のライブラリは、溶液中 (例えば、Houghten (1992) Bio/Techniques 13:412-421)、またはビーズ (Lam (1991) Nature 354:82-84)、チップ (Fodor (1993) Nature 364:555-556)、細菌 (米国特許第5,223,409号)、孢子 (米国特許第5,571,698号、第5,403,484号、および第5,223,409号)、プラスミド (Cull et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:1865-1869)、またはファージ (Scott and Smith (1990) Science 249:386-390、Devlin (1990) Science 249:404-406、Cwirlla et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6378-6382、およびFelicci (1991) J. Mol. Biol. 222:301-310) 上で提示されてもよい。

30

40

## 【0157】

候補薬剤の特定のALK耐性突然変異体に結合する能力を決定することは、候補薬剤のALK耐性突然変異体ポリペプチドへの結合が、複合体中で標識された薬剤を検出することによって決定され得るように、例えば、候補薬剤を放射性同位体または酵素標識でカップリングすることによって、達成することができる。例えば、候補薬剤は、直接または間接のいずれかで、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、または $^3\text{H}$ で標識することができ、放射性同位体が、電波放出の直接計数によって、またはシンチレーション計数によって検出される。代替的に、候補薬剤は、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、またはルシフェラーゼで酵素的に標識することができ、酵素標識は、適切な基質の産物への

50

変換を決定することによって検出される。

【0158】

一実施形態では、ALK耐性突然変異体に対する特異的結合剤を特定するためのアッセイは、ALK耐性突然変異体ポリペプチドを候補薬剤と接触させること、および候補薬剤のALK耐性突然変異体ポリペプチドに結合する能力を決定することを含む、無細胞アッセイである。候補薬剤のALK耐性突然変異体ポリペプチドへの結合は、直接的にまたは間接的に決定することができる。間接アッセイは、ALKキナーゼ活性の低減（例えば、ALK基質のリン酸化）についてアッセイすることを含み得る。

【0159】

幾つかのアッセイでは、アッセイの自動化を促進するために、ALK耐性突然変異体または候補薬剤のいずれかを固定化することが望ましい場合がある。一実施形態では、ALK耐性突然変異体は、細胞のライセートから免疫沈殿させることができ、ここで複合体は、マトリックス（例えば、ビーズ）に結合する。別の実施形態では、候補薬剤またはALK耐性突然変異体がマトリックスに結合することを可能にする、ドメインを候補薬剤またはALK耐性突然変異体ポリペプチドに付加する、融合タンパク質を提供することができる。例えば、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ/ALK耐性突然変異体融合タンパク質を含むALK耐性突然変異体ポリペプチドは、グルタチオンセファロースビーズ（Sigma Chemical, St. Louis, MO）またはグルタチオン誘導体化マイクロタイタープレート上に吸着させることができ、それらは次いで、候補薬剤と組み合わせられ、混合物は、候補薬剤とALK耐性突然変異体との間の複合体形成を促す条件下で（例えば、塩およびpHに関して生理学的条件で）インキュベートされる。インキュベーションに続いて、ビーズまたはマイクロタイタープレートウェルが洗浄されて、いずれの非結合構成成分も除去され、候補薬剤およびALK耐性突然変異体ポリペプチドの複合体形成が、例えば、上述のように、直接にまたは間接的に測定される。

10

20

【0160】

タンパク質をマトリックス上に固定化するための他の技術もまた、本発明のスクリーニングアッセイにおいて使用することができる。例えば、ALK耐性突然変異体ポリペプチドまたは候補薬剤のいずれかを、ビオチンおよびストレプトアビジンの共役を利用して固定化することができる。ビオチン化されたALK耐性突然変異体または候補薬剤は、当該技術分野で周知の技術（例えば、ビオチン化キット、Pierce Chemicals, Rockford, IL）を使用して、ビオチン-NHS（N-ヒドロキシ-スクシンイミド）から調製し、ストレプトアビジンコーティングプレート（Pierce Chemicals）のウェル中に固定化することができる。

30

【0161】

本発明のなおも別の態様では、ALK耐性突然変異体ポリペプチドを、ツーハイブリッドアッセイまたはスリーハイブリッドアッセイにおいて「釣り餌タンパク質」として使用して（例えば、米国特許第5,283,317号、Zervos et al. (1993) Cell 72:223-232、Madura et al. (1993) J. Biol. Chem. 268:12046-12054、Bartel et al. (1993) Bio/Techniques 14:920-924、Iwabuchi et al. (1993) Oncogene 8:1693-1696、およびPCT公開第WO94/10300号を参照されたい）、ALK耐性突然変異体ポリペプチドに結合またはそれと相互作用する、また幾つかの実施形態では、ALK耐性突然変異体キナーゼ活性を阻害する、他のタンパク質を特定することができる。

40

【0162】

ALK阻害剤耐性突然変異体に特異的に結合する候補薬剤が所望される場合の実施形態では、ALK阻害剤耐性突然変異体は、候補薬剤と接触させられるとき、活性または不活性のいずれの状態にあってもよい。活性状態は、活性化ドメイン内の3個のチロシン残基（完全長ALKのチロシン1278、1282、および1283）がリン酸化されている状態である。逆に、不活性状態は、活性化ドメインチロシン残基がリン酸化されず、活性

50

化ドメインが閉鎖立体配座にある状態である。

【0163】

A L K 耐性突然変異体阻害剤が所望される場合の実施形態では、アッセイは、A L K 耐性突然変異体ポリペプチドを候補薬剤と接触させること、および候補薬剤の、A L K 耐性突然変異体のキナーゼ活性を低減または完全に阻害する能力を決定することを含む。候補薬剤のA L K 耐性突然変異体の活性を阻害する能力を決定することは、例えば、A L K 耐性突然変異体が、A L K 基質をリン酸化するまたは試験化合物の存在下で自己リン酸化する能力を決定することによって達成することができる。A L K 耐性突然変異体のキナーゼ活性をアッセイするための方法は、本明細書の他の箇所では考察され、体外でのキナーゼアッセイを含み、この場合、A L K ポリペプチドは、親和性精製または免疫沈降法を介して単離され、A L K の自己リン酸化または基質タンパク質もしくはペプチドのリン酸化が、A T P の存在下で測定される。

10

【0164】

特異的結合剤についてのスクリーニングアッセイと同様に、A L K 耐性突然変異体は、耐性突然変異体の阻害剤についてのスクリーニングにおいて候補薬剤と接触させられるとき、活性または不活性状態にあり得る。不活性であるときの受容体型チロシンキナーゼのキナーゼドメインの構造は、一般に、活性化されたキナーゼの立体配座よりも固有であるため、不活性状態にあるA L K に結合する阻害剤が特に望ましい。A L K 耐性突然変異体が不活性状態で候補薬剤と接触させられる場合の実施形態では、キナーゼは、候補薬剤のキナーゼ活性に対する効果を試験する前に活性化される。A L K 阻害剤耐性突然変異体は、A L K 突然変異体ポリペプチドがリガンド結合ドメインを含む場合、リガンド（例えば、プレイオトロフィン（pleiotropin）、ミッドカイン）の付加を通じて活性化することができる。代替的に、A L K 耐性突然変異体ポリペプチドは、キナーゼドメインと共に、誘導性二量体化またはオリゴマー化ドメインと融合される下流エフェクターと相互作用するために必要なドメインを含む、キナーゼの細胞質ドメイン（例えば、アミノ酸1058~1620）を含むことができる。誘導性二量体化ドメインまたは誘導性オリゴマー化ドメインは、二量体化またはオリゴマー化リガンドの存在下で刺激されて、二量体化またはオリゴマー化され得るポリペプチド配列である。誘導性二量体化ドメインの非限定的な例としては、細胞透過性合成二量体化リガンドFK1012の付加を通じて二量体化され得る、少なくとも1つのFKBP12ポリペプチドを含むドメインがある（Spencer et al. (1993) Science 262:989、それは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。二量体化またはオリゴマー化されると、A L K 耐性突然変異体誘導性二量体化/オリゴマー化ドメイン融合タンパク質は、活性化される。

20

30

【0165】

また、細胞ベースのアッセイを使用して、A L K キナーゼ活性を測定することもでき、この場合、A L K 自己リン酸化またはA L K 基質のリン酸化は、例えば、免疫プロット法または酵素結合免疫測定法を使用して決定される。A L K キナーゼ活性の阻害もまた、細胞ベースのアッセイにより間接に査定することができる。かかる実施形態では、A L K 耐性突然変異体は、真核細胞中で発現される（内在性で、または例えば、配列が形質転換を介して導入される外来性でのいずれにかにより）。完全長A L K 耐性突然変異体ポリペプチドが、かかる実験のために使用される場合、活性化リガンド（例えば、プレイオトロフィン、ミッドカイン）が培養物に付加される。他の実施形態では、A L K 耐性突然変異体は、構成的に活性なA L K 耐性突然変異体-発癌性融合タンパク質である。なおも他の実施形態では、A L K 耐性突然変異体ポリペプチドは、誘導性二量体化またはオリゴマー化ドメインに融合された細胞質ドメイン（例えば、アミノ酸1058~1620）を含み、融合タンパク質は、細胞透過性二量体化またはオリゴマー化リガンドの付加を通じて活性化される（Spencer et al. (1993) Science 262:989）。A L K の活性化は、細胞増殖の刺激、細胞生存、足場非依存性増殖の促進、ならびに細胞遊走および浸潤をもたらす。したがって、A L K 耐性突然変異体のキナーゼ活性を阻

40

50

害する候補薬剤は、候補薬剤が、細胞増殖を阻害する、細胞死を刺激する、足場非依存性増殖を阻害する、および/または活性化されたALK耐性突然変異体を発現する細胞の細胞遊走もしくは浸潤を阻害する能力に基づいて、選択することができる。

#### 【0166】

本明細書で使用されるとき、「細胞増殖」は、細胞増殖、細胞分化、または細胞周期を通じた進行を指す。「細胞死」には、アポトーシスおよび壊死の両方が含まれる。かかる細胞ベースのアッセイは、当該技術分野で既知であり(von Bubnoff et al. (2005) Blood 105:1652-1659、von Bubnoff et al. (2006) Blood 108:1328-1333、Kancha et al. (2009) Clin Cancer Res 15:460-467、von Bubnoff et al. (2009) Cancer Res 69:3032-3041、von Bubnoff et al. (2005) Cell Cycle 4:400-406、それらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)、本明細書の他の箇所に記載される(実施例1を参照されたい)。

10

#### 【0167】

光学密度(OD<sub>600</sub>)、CO<sub>2</sub>産生、O<sub>2</sub>消費、テトラゾリウム塩(例えば、MTT、XTT)または他の比色試薬(例えば、Rocheから入手可能なWST-1試薬)を使用するもの等のミトコンドリア機能を測定するアッセイ、蛍光色素Hoechst 33258を利用するもの等の蛍光定量的(fluorometric)アッセイを含むが、これらに限定されないDNA含量を測定または概算するアッセイ、スルホロダミンB(SRB)アッセイを含むが、これらに限定されないタンパク質含量を測定または概算するアッセイ、手動または自動細胞計数(生細胞を識別するためのトリパンブルー染色を用いるまたは用いない)、手動または自動コロニー計数を用いるクローン原性アッセイを含むが、これらに限定されない、当該技術分野で既知の任意の方法を使用して、細胞の増殖率または細胞生存への効果を測定することができる。アポトーシスのレベルを測定するために使用され得るアッセイの非限定的な例としては、DNA断片化の測定、カスパーゼ活性化アッセイ、TUNEL染色、アネキシンV染色が挙げられるが、これらに限定されない。

20

#### 【0168】

「足場非依存性増殖」は、それらの生存および増殖のために細胞外マトリックス(足場)に接着しなければならない接着正常細胞とは対照的に、かかる足場を用いなくても増殖が可能な癌細胞の一般的な本質的性質を指す。足場依存性細胞を測定するための方法は、当該技術分野で知られており、細胞を軟寒天培地中で増殖させること、またはスフェロイド(細胞凝集体)が形成され得る条件下で細胞を培養することを含む。かかるアッセイは、米国特許出願公開第2008/0090776号および第2009/0099193号に記載される。

30

#### 【0169】

「細胞遊走」は、幾つかの実施形態では、標的に向かい得る(例えば、増殖因子)、細胞の移動を指し、それは化学走性とも称される。「細胞浸潤」は、細胞外マトリックス等のマトリックスを通る細胞移動を指す。細胞遊走および浸潤を測定する方法は、当該技術分野で既知であり、1つのチャンバから第2のチャンバへの細胞の移動が、第2のチャンバ中の細胞の数の定量化を通じて測定される、トランスウェルアッセイを含む。このアッセイの変形では、化学誘引物質が第2のチャンバ中で提供され、かつ/またはチャンバが、細胞外マトリックスの種々の構成成分(例えば、コラーゲン)を含むマトリックスによって分離される。

40

#### 【0170】

ALK耐性突然変異体の阻害剤についてスクリーニングするために使用され得る他のアッセイは、ALK耐性突然変異体を発現する異常なALK活性に関連する癌に対する体内動物モデル(例えば、異種移植片)の使用を含む。非ヒト動物モデルは、例えば、マウス(例えば、ヌードマウス)、ラット、またはハムスターであり得る。ALK耐性突然変異体ポリペプチドを内在性で発現する癌細胞、またはALK耐性突然変異体の発現によって

50



形質転換された細胞を、皮下に、皮内に、もしくは腹腔内に、または各臓器中に移植することができる。本明細書の他の箇所に記載される動物等の、A L K耐性突然変異体 - 発癌性融合タンパク質を発現するように遺伝子操作された非ヒトトランスジェニック動物もまた、使用することができる。候補薬剤のA L Kキナーゼ活性を阻害する能力は、候補薬剤を経口、静脈内、皮下、および腹腔内投与等の多様な投与方法によって投与すること、ならびに動物モデルの腫瘍の容量もしくは重量、または疾患の進行を測定することによって、確認することができる。かかる方法は、当該技術分野で既知であり、米国特許出願公開第2008/0090776号および第2009/0099193号に記載される。

#### 【0171】

幾つかの実施形態では、A L K耐性突然変異体のキナーゼ活性を阻害する薬剤についてのスクリーニングアッセイは、本開示のA L K耐性突然変異体またはA L K耐性突然変異体 - 発癌性融合タンパク質の発現を特異的に低減する薬剤についてスクリーニングすることを含む。それによってコードされるポリヌクレオチドまたはポリペプチドの発現レベルを「低減する」または「低減すること」とは、A L K耐性突然変異体のポリヌクレオチドまたはポリペプチドレベルが、サイレンシング因子に曝露されていない適切な対照における同じ標的配列のポリヌクレオチドレベルまたはポリペプチドレベルよりも、統計的に低いことを意味することが意図される。特定の実施形態では、本開示の主題に従って、標的配列のポリヌクレオチドレベルおよび/またはポリペプチドレベルを低減することは、適切な対照における同じ標的配列の95%未満、90%未満、80%未満、70%未満、60%未満、50%未満、40%未満、30%未満、20%未満、10%未満、または5% 20

#### 【0172】

故に、本発明は更に、A L K耐性突然変異体を発現する細胞中に、サイレンシング因子の導入または発現時にA L K耐性突然変異体標的ポリヌクレオチドまたはそれによってコードされるポリペプチドの発現のレベルを低減または排除する、サイレンシング因子を導入することによって、A L K耐性突然変異体の発現のレベルを低減するための方法および組成物を提供する。更に、A L K耐性突然変異体発現を特異的に低減するものについて、候補薬剤をスクリーニングするための方法は、A L K耐性突然変異体を発現する細胞中に、候補薬剤（例えば、サイレンシング因子）を導入すること、およびA L K耐性突然変異体の発現のレベルを決定することを含む。 30

#### 【0173】

A L K耐性突然変異体の発現は、A L K耐性突然変異体の発現を阻害するポリペプチドの導入、A L K突然変異体遺伝子中へのトランスポゾン挿入に有用なポリヌクレオチドをコードするサイレンシング因子を含むヌクレオチド配列、A L K突然変異体遺伝子の相同組み換え/遺伝子のノックアウト、A L K突然変異体遺伝子に結合し、その発現を低減する亜鉛フィンガータンパク質をコードするサイレンシング因子、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはd s R N A分子（例えば、s h R N A、s i R N A）をコードするサイレンシング因子、またはN r l発現もしくは活性を阻害する抗体もしくは他のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の導入を含む、当該技術分野で知られている任意の手段によって阻害することができる。 40

#### 【0174】

一実施形態では、サイレンシング因子は、A L K耐性突然変異体遺伝子に結合する亜鉛フィンガータンパク質をコードし、その遺伝子の低減された発現をもたらす。特定の実施形態では、亜鉛フィンガータンパク質は、A L K耐性突然変異体遺伝子の調節領域に結合する。他の実施形態では、亜鉛フィンガータンパク質は、A L K耐性突然変異体をコードするメッセンジャーR N A（すなわち、転写物）に結合し、その翻訳を阻止する。亜鉛フィンガータンパク質が標的とするための部位を選択する方法は、例えば、米国特許第6、 50

453, 242号に記載されており、それは参照により本明細書に組み込まれる。

【0175】

本発明の幾つかの実施形態では、ALK耐性突然変異体の発現は、ALK耐性突然変異体遺伝子を攪乱することによって低減または排除される。ALK耐性突然変異体遺伝子は、当該技術分野で知られる任意の方法によって攪乱され得る。例えば、一実施形態では、遺伝子は、トランスポゾンタギングによって攪乱される。別の実施形態では、遺伝子は、無作為または標的化突然変異誘発を使用して細胞を突然変異誘発すること、およびALK活性を低減した細胞について選択することによって攪乱される。

【0176】

本発明の一実施形態では、トランスポゾンタギングを使用して、ALK耐性突然変異体の発現を低減または排除する。トランスポゾンタギングは、ALK耐性突然変異体の発現を低減または排除するために、トランスポソンを内在性ALK耐性突然変異体遺伝子内に導入することを含む。この実施形態では、ALK耐性突然変異体遺伝子の発現は、トランスポソンをALK耐性突然変異体遺伝子の調節領域またはコード領域内に導入することによって低減または排除される。ALK耐性突然変異体遺伝子のエクソン、イントロン、5'もしくは3'非翻訳配列、プロモーター、または任意の他の調節配列内のトランスポソンを使用して、コードされるALK耐性突然変異体の発現および/または活性を低減または排除してもよい。これらの実施形態では、サイレンシング因子は、ALK耐性突然変異体遺伝子内に導入することができる標的化トランスポソンを含むか、またはそれをコードする。

10

20

【0177】

他の実施形態では、サイレンシング因子は、ALK耐性突然変異体遺伝子の領域との相同組み換えを介した部位特異的突然変異誘発に有用なヌクレオチド配列を含む。遺伝子エクソン中の挿入突然変異は、通常、ヌル突然変異体をもたらす。本発明は、プロモーターベースのサイレンシングを伴うもの等の、ALK耐性突然変異体の活性または発現を低減または排除するための更なる方法を包含する。例えば、Mette et al. (2000) EMBO J. 19: 5194-5201、Sijen et al. (2001) Curr. Biol. 11: 436-440、Jones et al. (2001) Curr. Biol. 11: 747-757を参照されたい。

【0178】

本明細書で使用されるとき、「サイレンシング因子」という用語は、発現または細胞中に導入されるとき、標的ポリヌクレオチド配列またはそれによってコードされるポリペプチドの発現のレベルを低減または排除することができるポリヌクレオチドを指す。サイレンシング因子は、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたは干渉RNA (RNAi) を含むか、またはそれをコードすることができる。「干渉RNA」または「RNAi」という用語は、RNAi経路に入り、それによって標的遺伝子の発現を低減することができる、任意のRNA分子を指す。RNAi経路は、標的mRNAの翻訳を分解または遮断するように機能する、ダイサーヌクレアーゼ酵素およびRNA誘導サイレンシング複合体 (RISC) を特徴とする。RNAiは、典型的にはRNase H媒介型経路を通じる1本鎖オリゴヌクレオチドによる標的転写物の障害を伴う「アンチセンス」機構を通じて機能する、アンチセンスオリゴヌクレオチドとは異なる。Crooke (ed.) (2001) "Antisense Drug Technology: Principles, Strategies, and Applications" (1st ed), Marcel Dekker; ISBN: 0824705661; 1st editionを参照されたい。

30

40

【0179】

本明細書で使用されるとき、「遺伝子」という用語は、当該技術分野で理解されるような意味を有する。一般に、遺伝子は、コード配列 (オープンリーディングフレーム) に加えて、遺伝子調節配列 (例えば、プロモーター、エンハンサー等) および/またはイントロン配列を含むとされる。「遺伝子」の定義は、タンパク質をコードしないが、むしろマ

50

マイクロRNAまたはsiRNA前駆体、tRNAs等の機能的RNA分子、またはその前駆体をコードする、核酸への参照を含むことが更に理解されるであろう。

【0180】

本明細書で使用されるとき、「標的遺伝子」は、発現のレベルを減少させることが望まれる任意の遺伝子を含む。遺伝子の発現レベルを「低減する」または「低減すること」とは、コードされるポリヌクレオチド（すなわち、標的転写物）またはコードされるポリペプチドのレベルが、サイレンシング因子に曝露されていない適切な対照においてコードされるポリヌクレオチドレベルまたはコードされるポリペプチドレベルよりも、統計的に低いことを意味することが意図される。特定の実施形態では、ALK耐性突然変異体遺伝子の発現を低減することは、適切な対照（例えば、サイレンシング因子の導入/発現前の同じ細胞または同様の分化の段階、同じ表現型、同じ遺伝子型における同様の細胞等）におけるALK耐性突然変異体転写物のレベルまたはALK耐性突然変異体ポリペプチドのレベルの95%未満、90%未満、80%未満、70%未満、60%未満、50%未満、40%未満、30%未満、20%未満、10%未満、または5%未満をもたらす。RNA転写物のレベル、コードされるポリペプチドのレベル、またはポリヌクレオチドまたはポリペプチドの活性についてアッセイするための方法は、当該技術分野で既知であり、本明細書の他の箇所に記載される。

10

【0181】

「相補的」という用語は、当該技術分野で受け入れられる意味に従って、2つのヌクレオチド、ヌクレオチド、または核酸等の間の水素結合（例えば、ワトソンクリック塩基対形成またはフーグスティーン塩基対形成）を介した正確な対形成のための能力を指すために本明細書で使用される。例えば、第1の核酸のある位置におけるヌクレオチドが、第2の核酸中のヌクレオチドの反対に位置するヌクレオチドと安定に水素結合することができる場合、核酸が5'から3'の反対の配向で整列されるとき（すなわち、逆平行配向にある）、核酸は、その位置で相補的であるとされる（ここで位置は、いずれかの核酸のいずれかの末端に対して、一般に5'末端に対して、定義され得る）。互いに反対に位置するヌクレオチドは、「塩基対」と称され得る。相補的塩基対は、例えば、AとU、AとT、GとC等の2つの相補的ヌクレオチドを含有するが、非相補的塩基対は、2つの非相補的ヌクレオチド（ミスマッチとも称される）を含有する。2つのポリヌクレオチドは、各分子中の十分な数の対応する位置が、相互に水素結合するヌクレオチドによって占有されるとき、すなわち、十分な数の塩基対が相補的であるとき、相互に相補的であると言われる。

20

30

【0182】

本明細書で使用される「ハイブリッド形成」という用語は、2つの配列が適切な条件下で互いに関連したままである、2つの相補的核酸配列の間の相互作用を指す。

【0183】

サイレンシング因子は、干渉RNAもしくはアンチセンスオリゴヌクレオチド、干渉RNAもしくはアンチセンスオリゴヌクレオチドに対する前駆体、干渉RNAもしくはアンチセンスオリゴヌクレオチドの転写のためのテンプレート、または前駆体干渉RNAもしくはアンチセンスオリゴヌクレオチドの転写のためのテンプレートを含むことができ、ここで前駆体は、細胞内でプロセスされて、干渉RNAもしくはアンチセンスオリゴヌクレオチドを産生する。故に、例えば、dsRNAサイレンシング因子は、dsRNA分子、dsRNAを形成することができる転写物もしくはポリリボヌクレオチド、dsRNAを形成することができる1つを超える転写物もしくはポリリボヌクレオチド、dsRNA分子をコードするDNA、またはdsRNA分子の1本の鎖をコードするDNAを含む。サイレンシング因子が干渉RNAをコードするDNA分子を含むとき、DNAは、細胞中で一過性に発現され得るか、または細胞のゲノム中に安定に組み込まれることが認識される。かかる方法は、本明細書の他の箇所で更に詳細に考察される。

40

【0184】

サイレンシング因子は、標的RNA転写物のレベルに影響を及ぼすことによって、標的

50

RNA 転写物の翻訳に影響を及ぼすことによって、またはプレ転写レベルでの発現に影響を及ぼすことによって(すなわち、遺伝子発現を変化させるために、クロマチン構造の調節、メチル化パターン等を介して)、標的遺伝子の発現レベルを低減または排除することができる。例えば、Verdel et al. (2004) Science 303: 672 - 676、Pal-Bhadra et al. (2004) Science 303: 669 - 672、Allshire (2002) Science 297: 1818 - 1819、Volpe et al. (2002) Science 297: 1833 - 1837、Jenuwein (2002) Science 297: 2215 - 2218、および Hall et al. (2002) Science 297: 2232 - 2237 を参照されたい。標的遺伝子の発現を低減または排除することができる、機能的干渉 RNA についてアッセイするための方法は、当該技術分野で知られており、本明細書の他の箇所で開示される。

10

**【0185】**

標的遺伝子からの転写物(すなわち、標的転写物)の任意の領域を使用して、サイレンシング因子が、標的遺伝子によってコードされるポリヌクレオチドまたはポリペプチドのレベルを減少させることを可能にするための十分な配列同一性を共有する、サイレンシング因子のドメインを設計することができる。例えば、サイレンシング因子は、標的転写物の5'非翻訳領域、標的転写物の3'非翻訳領域、標的転写物のエクソン領域、標的転写物のイントロン領域、およびそれらの任意の組み合わせとの配列同一性を共有するように設計することができる。

20

**【0186】**

サイレンシング因子の、標的転写物のレベルを低減する能力は、例えば、ノーザンブロット、ヌクレアーゼ保護アッセイ、逆転写(RT)-PCR、リアルタイムRT-PCR、マイクロアレイ解析等を使用して、標的転写物の量を測定することによって直接に査定することができる。代替的に、サイレンシング因子の、標的遺伝子および標的転写物によってコードされるポリペプチドのレベルを低減する能力は、ウェスタンブロット、免疫測定法、ELISA、フローサイトメトリー、タンパク質マイクロアレイ等を含むが、これらに限定されない多様な親和性ベースのアプローチを使用して(例えば、標的ポリペプチドに特異的に結合するリガンドまたは抗体を使用して)、直接に測定することができる。更に他の方法では、サイレンシング因子の、標的遺伝子によってコードされる標的ポリペ

30

**【0187】**

当業者であれば、サイレンシング因子が、化学合成、体内もしくは体外での酵素もしくは化学開裂、体内もしくは体外でのテンプレート転写、または前述の組み合わせを含むが、これらに限定されない任意の利用可能な技術に従って調製され得ることを容易に理解するであろう。

**【0188】**

種々の種類のサイレンシング因子は、下記に更に詳細に考察される。

40

**【0189】**

一実施形態では、サイレンシング因子は、2本鎖RNA分子を含むか、またはそれをコードする。本明細書で使用される時、「2本鎖RNA」または「dsRNA」は、単一の自己相補的RNA分子によって形成されるポリリボヌクレオチド構造、または少なくとも2つの別々のRNA鎖の発現によって形成されるポリリボヌクレオチド構造のいずれかを指す。したがって、本明細書で使用される時、「dsRNA」という用語は、例えば、小さなRNA(sRNA)、短干渉RNA(siRNA)、2本鎖RNA(dsRNA)、マイクロRNA(miRNA)、ヘアピンRNA、短ヘアピンRNA(shRNA)、およびその他を含む、RNA干渉または遺伝子サイレンシングを媒介することができる核酸分子を説明するために使用される、他の用語を包含することが意図される。例えば、

50

Meister and Tuschl (2004) Nature 431:343-349 および Bonetta et al. (2004) Nature Methods 1:79-86 を参照されたい。

【0190】

具体的な実施形態では、dsRNAの二重鎖の少なくとも1本の鎖または2本鎖領域は、dsRNAが標的遺伝子の発現のレベルを低減することを可能にするために、標的遺伝子との十分な配列同一性または配列相補性を共有する。本明細書で使用されるとき、標的転写物に相補的である鎖は、「アンチセンス鎖」であり、標的転写物と相同な鎖は、「センス鎖」である。

【0191】

一実施形態では、dsRNAは、ヘアピンRNAを含む。ヘアピンRNAは、それ自体の上に折り返されて、2本鎖構造を形成することができるRNA分子を含む。多構造をヘアピン要素として用いることができる。例えば、それ自体とハイブリッド形成して、ヘアピン構造を形成するヘアピンRNA分子は、1本鎖ループ領域および塩基対ステムを含むことができる。塩基対ステム領域は、標的転写物の全てまたは一部に対応するセンス配列を含み得、センス配列と完全にまたは部分的に相補的であるアンチセンス配列を更に含む。故に、サイレンシング因子の塩基対ステム領域は、サイレンシングの特異性を決定し得る。例えば、参照により本明細書に組み込まれる Chuang and Meyerowitz (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:4985-4990 を参照されたい。体内での遺伝子発現をサイレンシングする hpRNA 構築物の効率についての一過性アッセイは、参照により本明細書に組み込まれる Panstruga et al. (2003) Mol. Biol. Rep. 30:135-140 によって記載されている。

【0192】

「短干渉RNA」または「siRNA」は、RNA二重鎖(2本鎖領域)を含み、1つまたは2つの1本鎖オーバーハング、例えば、3'または5'オーバーハングを更に含む可能性がある。二重鎖は、およそ19塩基対(bp)長であり得るが、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、および29ヌクレオチドを含む、17~29ヌクレオチドの間の長さが、使用され得る。siRNAは、一緒にハイブリッド形成する2つのRNA分子から形成することができるか、または代替的に、自己ハイブリッド形成部分を含む単一のRNA分子から生成することができる。siRNAの二重鎖部分は、二重鎖の1つもしくは両方の鎖中に1つ以上の不對および/もしくはミスマッチヌクレオチドを含有する1つ以上のバルジを含み得るか、または1つ以上の非相補的ヌクレオチド対を含有し得る。siRNAの1本の鎖(本明細書でアンチセンス鎖と称される)は、標的転写物とハイブリッド形成する部分を含む。ある実施形態では、siRNAの1本の鎖(アンチセンス鎖)は、標的転写物の領域と、少なくとも約17ヌクレオチド、18ヌクレオチド、19ヌクレオチド、20ヌクレオチド、21ヌクレオチド、またはそれを超えるヌクレオチドにわたって正確に相補的であり、siRNAアンチセンス鎖が、その長さにわたって単一のミスマッチを伴わずに(すなわち、単一の非相補的塩基対を伴わずに)標的転写物とハイブリッド形成することを意味する。他の実施形態では、siRNAアンチセンス鎖と標的転写物の標的化部分との間に1つ以上のミスマッチが存在し得る。完全な相補性が達成されない場合の実施形態では、siRNAアンチセンス鎖と標的転写物との間の任意のミスマッチは、siRNAアンチセンス鎖の3'末端またはその近くに位置することができる。例えば、ある実施形態では、アンチセンス鎖のヌクレオチド1~9、2~9、2~10、および/または1~10が、標的と完全に相補的である。

【0193】

有効なsiRNA分子の設計のための考慮事項は、McManus et al. (2002) Nature Reviews Genetics 3:737-747、および Dykxhoorn et al. (2003) Nature Reviews Mo

10

20

30

40

50

lecular Cell Biology 4:457-467に考察される。かかる考慮事項には、siRNAの塩基組成物、転写物の5'末端および3'末端に対するsiRNAのアンチセンス鎖に相補的である標的転写物の部分の位置等が含まれる。多様なコンピュータプログラムもまた、siRNA配列の選択を支援するために、例えば、Ambion (URL [www.ambion.com](http://www.ambion.com)のウェブサイト)から、URL [www.sinc.sunysb.edu/Stu/shilin/rnai.html](http://www.sinc.sunysb.edu/Stu/shilin/rnai.html)のウェブサイトにて利用可能である。同様に用いられ得る更なる設計検討は、Semizarov et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 100:6347-6352に記載される。

#### 【0194】

「短ヘアピンRNA」または「shRNA」という用語は、RNAiを媒介するために十分に長い2本鎖(二重鎖)構造(一般に、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、および29ヌクレオチド長を含む、およそ17~29ヌクレオチド長、および幾つかの実施形態では、典型的に少なくとも19塩基対長)を形成するためにハイブリッド形成されるか、またはハイブリッド形成能力のある、少なくとも2つの相補的部分、ならびに二重鎖部分の1つの末端で塩基対を形成する2つのヌクレオチドを接続するループを形成する、典型的におよそ1~20または1~10ヌクレオチド長である、少なくとも1つの1本鎖部分を含む、RNA分子を指す。二重鎖部分は、1つ以上の不對ヌクレオチドからなる1つ以上のバルジを有し得るが、必要ではない。具体的な実施形態では、shRNAsは、3'オーバーハングを含む。故に、shRNAsは、siRNAの前駆体であり、一般に、同様に標的転写物の発現を阻害することが可能である。

#### 【0195】

特に、ヘアピン(ステム-ループ)構造を有するRNA分子を、ダイサーによって細胞内でプロセスして、短ヘアピンRNAs (shRNAs)と称されるsiRNA構造を得ることができ、それは、互いにハイブリッド形成して(自己ハイブリッド形成)ステムと称される2本鎖(二重鎖)領域を形成する2つの相補的領域、二重鎖の1つの末端で塩基対を形成するヌクレオチドを接続する1本鎖ループ、および任意にオーバーハング、例えば、3'オーバーハングを含有する。ステムは、約19、20、または21bp長を含むことができるが、より短いステムおよびより長いステム(例えば、最大約29nt)が使用され得る。ループは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20ntを含む約1~20、約4~10、または約6~9ntを含む可能性がある。オーバーハングは、存在する場合、およそ1~20ntまたはおよそ2~10ntを含み得る。ループは、阻害が所望される標的転写物に相補的である領域の5'末端または3'末端のいずれにも位置し得る(すなわち、shRNAのアンチセンス部分)。

#### 【0196】

shRNAsは、自己ハイブリッド形成する単一のRNA分子を含有するが、結果として生じる二重鎖構造は、センス鎖およびアンチセンス鎖または標的mRNAに対する部分を含むとされ得、故に2本鎖とされ得ることが理解されるであろう。したがって、本明細書でshRNAのセンス鎖およびアンチセンス鎖、またはセンス部分およびアンチセンス部分を指すことは簡便となり、ここでアンチセンス鎖または部分は、標的ポリヌクレオチドの標的化部分と二重鎖を形成するか、形成することができ、またそれに相補的である分子のセグメントであり、センス鎖または部分は、アンチセンス鎖または部分と二重鎖を形成するか、形成することができ、配列において標的転写物の標的化部分と実質的に同一である分子のセグメントである。一般に、shRNA分子のアンチセンス鎖の配列の選択のための考慮事項は、同じ転写物を標的とするsiRNA分子のアンチセンス鎖の配列の選択のための考慮事項に類似している。

#### 【0197】

幾つかの実施形態では、サイレンシング因子は、アンチセンスオリゴヌクレオチドを含

10

20

30

40

50

むか、またはそれをコードする。「アンチセンスオリゴヌクレオチド」は、標的遺伝子に全体的または部分的に相補的な1本鎖核酸配列であり、DNA、またはそのRNA相対物（すなわち、ここでDNAのT残基は、RNA相対物中のU残基である）であり得る。

【0198】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、標的RNA（例えば、mRNA）またはDNAとハイブリッド形成可能であるように設計される。例えば、mRNA分子とハイブリッド形成するオリゴヌクレオチド（例えば、DNAオリゴヌクレオチド）を使用して、mRNAをRNaseH消化のための標的とすることができる。代替的に、mRNA分子の翻訳開始部位とハイブリッド形成するオリゴヌクレオチドを使用して、mRNAの翻訳を阻止することができる。別のアプローチでは、2本鎖DNAに結合するオリゴヌクレオチドを投与することができる。かかるオリゴヌクレオチドは、三重鎖構築物を形成することができ、DNAの転写を阻害する。三重ヘリックス対形成は、ポリメラーゼ、転写因子、または調節分子の結合を可能にするために二重ヘリックスが十分に開くのを阻止する。本発明のかかるオリゴヌクレオチドは、三重ヘリックス形成塩基対形成規則および標的遺伝子のヌクレオチド配列を使用して構築することができる。

10

【0199】

非限定的な例として、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、次の領域とハイブリッド形成するように標的化することができる：mRNAキャップ領域、翻訳開始部位、翻訳終結部位、転写開始部位、転写終結部位、ポリアデニル化シグナル、3'非翻訳領域、5'非翻訳領域、5'コード領域、中央コード領域（mid coding region）、および3'コード領域。幾つかの実施形態では、相補的オリゴヌクレオチドは、5'コード配列にまたがる約15~35ヌクレオチドのいずれも含む、遺伝子の最も固有の5'配列とハイブリッド形成するように設計される。

20

【0200】

したがって、本発明によるアンチセンスオリゴヌクレオチドは、約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、約17、約18、約19、約20、約21、約22、約23、約24、約25、約30、約40、約50、約60、約70、約80、約90、または約100ヌクレオチドを含むが、これらに限定されない、約10~約100ヌクレオチドを含み得る。

【0201】

アンチセンス核酸は、標準的な技術によって産生することができる（例えば、Shewmaker et al.、米国特許第5,107,065号を参照されたい）。適切なオリゴヌクレオチドは、OLIGOソフトウェア（Molecular Biology Insights, Inc., Cascade, Colo., <http://www.oliigo.net>）を使用して設計することができる。

30

【0202】

本発明の方法に従って、ALK耐性突然変異体遺伝子は、サイレンシング因子によって標的化される。本明細書で使用されるとき、標的遺伝子または標的転写物は、サイレンシング因子の導入または発現が、標的遺伝子および標的転写物の発現の実質的に特異的な低減または阻害をもたらすとき、サイレンシング因子によって「標的化」される。サイレンシング因子と実質的な配列同一性もしくは類似性を有するか、またはサイレンシング因子に相補的である、標的遺伝子または標的転写物の特異的領域が、サイレンシング因子によって「標的化」されている領域である。

40

【0203】

サイレンシング因子によって標的化されるALK耐性突然変異体の領域は、少なくとも1つのALKキナーゼ阻害剤に耐性を付与する突然変異を含む。具体的な実施形態では、サイレンシング因子の導入または発現は、ALK耐性突然変異体のレベルを特異的に低減し、これは天然または野生型ALK配列の発現レベルがサイレンシング因子によって影響を受けないか、または最小限に影響を受けることを意味する。

【0204】

50

上で考察されるように、本発明の方法および組成物に用いられるサイレンシング因子は、*dsRNA*（例えば、*shRNA*）またはアンチセンス*RNA*のための*DNA*テンプレートを含み得るか、亜鉛フィンガー結合タンパク質をコードすることができる。かかる実施形態では、*dsRNA*、アンチセンス*RNA*、または亜鉛フィンガー結合タンパク質をコードする*DNA*分子は、発現カセットに見出される。

#### 【0205】

本発明は更に、上述のスクリーニングアッセイによって特定される新規薬剤、および本明細書に記載されるようなその使用に関する。簡潔に述べると、*ALK*耐性突然変異体特異的結合剤は、*ALK*耐性突然変異体の検出、および少なくとも1つの*ALK*キナーゼ阻害剤に耐性であるかまたは耐性を発達させる可能性が高い癌の診断のための方法において使用することができる。*ALK*耐性突然変異体阻害剤およびサイレンシング因子は、かかる癌を有する患者の治療において有用である。

10

#### 【0206】

*ALK*耐性突然変異体をコードするポリヌクレオチドを検出するため、または試料中（例えば、生物学的試料）の*ALK*耐性突然変異体ポリペプチドを検出するための、種々の方法および組成物が提供される。生物学的試料は、特定の*ALK*耐性突然変異体または突然変異体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを検出することが所望される、任意の試料を含むことができる。「生物学的試料」という用語は、対象から単離された組織、細胞、および生体液、ならびに対象またはそのライセート内に存在する組織、細胞、および流体を含むことが意図される。試料は、骨髄試料、腫瘍生検、細針吸引、または血液、血漿、血清、リンパ、腹水、嚢胞液、もしくは尿等の体液の試料等であるが、これらに限定されない、任意の臨床的に意義のある組織を含んでもよい。

20

#### 【0207】

生物学的試料を*ALK*阻害剤耐性突然変異体についてアッセイするための方法は、生物学的試料を、抗*ALK*耐性突然変異体抗体または特定の*ALK*耐性突然変異体ポリペプチドに特異的に結合する他の薬剤と接触させること、続いて抗体または結合剤の*ALK*耐性突然変異体への結合の検出を含む。抗体または結合剤の*ALK*耐性突然変異体への結合は、抗体もしくは結合剤と共役させられた検出可能な標識（例えば、放射性同位体、蛍光タグ、酵素タグ、化学発光タグ）の存在を通じて、または*ALK*特異的結合剤に特異的に結合する標識された二次抗体もしくは二次結合剤の使用を通じて、検出することができる。特異的結合剤を使用して*ALK*耐性突然変異体ポリペプチドを検出するために使用され得るアッセイの非限定的な例としては、免疫沈降法、ウェスタンブロット、*ELISA*、免疫組織化学、免疫細胞化学、およびフローサイトメトリーが挙げられる。

30

#### 【0208】

本発明は更に、生物学的試料を、*ALK*阻害剤耐性突然変異体（例えば、*mRNA*またはゲノム*DNA*）をコードするポリヌクレオチドを特異的に検出または特異的に増幅することができる少なくとも1つのポリヌクレオチドを含む試薬と接触させること、および突然変異体をコードするポリヌクレオチドを検出することを含む、生物学的試料を*ALK*阻害剤耐性突然変異体についてアッセイするための方法を提供する。試薬は、*ALK*阻害剤耐性突然変異体をコードするゲノム*DNA*または突然変異体をコードする*RNA*転写物を特異的に検出または増幅することができる。

40

#### 【0209】

一実施形態では、試料中の*ALK*耐性突然変異体ポリペプチドまたはその活性変異体および断片をコードするポリヌクレオチドを検出するための方法は、試料を、*ALK*耐性突然変異体ポリペプチドまたはその活性変異体もしくは断片をコードするポリヌクレオチドのアンプリコンを特異的に増幅することができるプライマー対と接触させること、およびアンプリコンを増幅し次いで検出することを含む。ある実施形態では、アンプリコンは、*ALK*耐性突然変異体ポリペプチドまたはその活性変異体もしくは断片をコードするポリヌクレオチドを特異的に検出するために十分に長い。

#### 【0210】

50



他の実施形態では、試料中の A L K 耐性突然変異体ポリペプチドまたはその活性変異体および断片をコードするポリヌクレオチドを検出するための方法は、試料を、A L K 耐性突然変異体ポリペプチドまたはその活性変異体もしくは断片をコードするポリヌクレオチドを特異的に検出することができるポリヌクレオチドと接触させること、および A L K 耐性突然変異体ポリペプチドまたはその活性変異体もしくは断片をコードするポリヌクレオチドを検出することを含む。

#### 【0211】

具体的な実施形態では、試料は、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で検出対象の標的配列とハイブリッド形成するポリヌクレオチドプローブと接触させられる。試料およびプローブは次いで、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件に供され、プローブの標的配列とのハイブリダイゼーションが検出される。

10

#### 【0212】

本明細書で使用されるとき、「プローブ」は、従来の検出可能な標識またはレポーター分子、例えば、放射性同位体、リガンド、化学発光剤、酵素等が結合される、単離されたポリヌクレオチドである。かかるプローブは、標的ポリヌクレオチドの鎖に相補的であり、それは本発明の具体的な実施形態において、A L K 耐性突然変異体をコードするポリヌクレオチドを含む。デオキシリボ核酸プローブは、A L K 耐性突然変異体特異的プライマー、体外で合成されるオリゴヌクレオチドプローブ、または細菌人工染色体、フォスミドもしくはコスミドライブラリから得られる DNA を使用した、PCR によって生成されるものを含んでもよい。プローブは、デオキシリボ核酸またはリボ核酸だけでなく、標的 DNA 配列の存在を特異的に検出することができるポリアミドおよび他のプローブ物質もまた含む。核酸プローブのために、検出試薬の例としては、放射標識化プローブ、酵素標識化プローブ（西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ）、親和性標識化プローブ（ビオチン、アビジン、またはストレプトアビジン（*streptavidin*））、および蛍光標識化プローブ（6-FAM、VIC、TAMRA、MGB、フルオレセイン、ローダミン、テキサスレッド [BAC / フォスミドについて]）が挙げられるが、これらに限定されない。当業者であれば、本発明に記載される核酸プローブが、当該技術分野で周知である確立されたキット形式の 1 つに容易に組み込まれ得ることを容易に認識するであろう。

20

#### 【0213】

本明細書で使用されるとき、「プライマー」は、核酸ハイブリダイゼーションによって相補的な標的 DNA 鎖とアニリングされて、プライマーと標的 DNA 鎖との間にハイブリッドを形成し、次いでポリメラーゼ、例えば、DNA ポリメラーゼによって、標的 DNA 鎖に沿って伸長される、単離されたポリヌクレオチドである。本発明のプライマー対は、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）または他の慣習的核酸増幅法による、標的ポリヌクレオチドの増幅のためのそれらの使用を指す。「PCR」または「ポリメラーゼ連鎖反応」は、特異的 DNA セグメントの増幅のために使用される技術である（参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第 4,683,195 号および第 4,800,159 号を参照されたい）。

30

#### 【0214】

「特異的に検出する」とは、ポリヌクレオチドが、ストリンジェントな条件下で A L K 耐性突然変異体をコードするポリヌクレオチドとハイブリッド形成するプローブとして使用され得ること、またはポリヌクレオチドが、A L K 耐性突然変異体を含む領域を配列決定するために核酸配列決定技術において使用され得ることが意図される。「特異的に増幅する」とは、ポリヌクレオチド（複数可）が、A L K 耐性突然変異体をコードするポリヌクレオチドのアンプリコンを特異的に増幅するためにプライマーとして使用得ることが意図される。A L K 耐性突然変異体をコードするポリヌクレオチドの特異的な検出を可能にするハイブリダイゼーションのレベルまたは度合いは、A L K 耐性突然変異体をコードするポリヌクレオチドを、列挙されたポリペプチド（例えば、天然 A K T、配列番号 1）をコードしないポリヌクレオチドから識別するために十分である。「A L K 耐性突然変異体

40

50

をコードするポリヌクレオチドの増幅を可能にするために十分な配列同一性または相補性を共有する」とは、配列が、A L K 耐性突然変異体をコードするポリヌクレオチドの断片に対してまたはその全長にわたって、少なくとも 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または 100% の同一性または相補性を共有することが意図される。

#### 【0215】

プローブおよびプライマーは、標的 DNA 配列に結合し、A L K 耐性突然変異体をコードするポリヌクレオチドを特異的に検出および/または増幅するために十分なヌクレオチドの長さである。ハイブリダイゼーション条件または反応条件は、この結果を達成するために操作者によって決定することができることが認識される。この長さは、選択した検出方法において有用であるために十分に長い、任意の長さであってもよい。一般に、8、11、14、16、18、20、22、24、26、28、30、40、50、75、100、200、300、400、500、600、700、もしくはそれを超えるヌクレオチド、または約 11~20、20~30、30~40、40~50、50~100、100~200、200~300、300~400、400~500、500~600、600~700、700~800 の間、もしくはそれを超えるヌクレオチド長が使用される。

#### 【0216】

本明細書で使用されるとき、「増幅された DNA」または「アンプリコン」は、核酸テンプレートの一部である標的ポリヌクレオチドのポリヌクレオチド増幅の産物を指す。例えば、生物学的試料が A L K 耐性突然変異を含むかどうかを決定するために、生物学的試料の核酸補体が、A L K 耐性突然変異体を天然または野生型 A L K から識別することができるアンプリコンを産生するために、A L K 耐性突然変異に隣接した 5' 隣接配列に由来する第 1 のプライマー、および A L K 耐性突然変異に隣接した 3' 隣接配列に由来する第 2 のプライマーを含むプライマー対を使用したポリヌクレオチド増幅法に供されてもよい。増幅されたポリヌクレオチド (アンプリコン) は、A L K 耐性突然変異体をコードするポリヌクレオチドの検出を可能にする、任意の長さであり得る。例えば、アンプリコンは、約 10、50、100、200、300、500、700、1000、2000、3000、4000 ヌクレオチド長であるか、またはより長い可能性がある。更に、幾つかの実施形態では、ポリヌクレオチドの特異的な検出を可能にする、A L K 耐性突然変異体をコードするポリヌクレオチドの増幅された領域 (アンプリコン) の長さまたは配列は、A L K 耐性突然変異体をコードするポリヌクレオチドを、列挙されたポリペプチドをコードしないポリヌクレオチドから識別するために十分である。隣接配列に由来するプライマー対の成員は、耐性突然変異からの一定の距離に位置してもよい。この距離は、1 ヌクレオチド塩基対から最大で増幅反応の限度、または約 2 万 ヌクレオチド塩基対までに及ぶ可能性がある。「アンプリコン」という用語の使用は、DNA 熱増幅反応において形成され得るプライマー二量体を明確に除外する。

#### 【0217】

プローブおよびプライマーを調製および使用するための方法は、例えば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> ed, vol. 1-3, ed. Sambrook et al, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 1989 (これ以降、「Sambrook et al, 1989」)、Current Protocols in Molecular Biology, ed. Ausubel et al, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, 1992 (周期的更新を含む) (これ以降、「Ausubel et al, 1992」)、および Innis et al, PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press: San Diego, 1990 に記載される。PCR プライマー対は、例えば、Vector NTI version 10 (Informax Inc., Bethesda Md.) における P

10

20

30

40

50

CRプライマー分析ツール、Primer Select (DNASTAR Inc., Madison, Wis.)、およびプライマー3 (Version 0.4.0. COPYRIGHT, 1991, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, Mass.)等の、その目的に向けたコンピュータプログラムを使用することによる、既知の配列に由来し得る。更に、配列は、可視的に走査することができ、プライマーは、当業者に既知のガイドラインを使用して手動で特定することができる。

【0218】

ALK阻害剤耐性突然変異は、核酸配列決定、核酸ハイブリダイゼーション、および核酸増幅を含むが、これらに限定されない、当業者に既知の多様な核酸技術を使用して検出されてもよい。

10

【0219】

核酸配列決定技術の例証的な非限定的例としては、鎖ターミネーター (Sanger) 配列決定およびダイターミネーター配列決定が挙げられるが、これらに限定されない。鎖ターミネーター配列決定は、修飾されたヌクレオチド基質を使用した、DNA合成反応の配列特異的終結を使用する。伸長は、その領域のテンプレートに相補的な、短放射性または他の標識化オリゴヌクレオチドプライマーを使用することによって、テンプレートDNA上の特異的部位で開始される。オリゴヌクレオチドプライマーは、DNAポリメラーゼ、標準的な4デオキシヌクレオチド塩基、および低濃度の1鎖終結ヌクレオチド、最も一般的にはジ-デオキシヌクレオチドを使用して伸長される。この反応は、塩基の各々がジ-デオキシヌクレオチドとして交替する、4つの別個の管中で反復される。DNAポリメラーゼによる鎖終結ヌクレオチドの限定された組み込みは、その特定のジ-デオキシヌクレオチドが使用される位置でのみ終結される、一連の関連するDNA断片をもたらす。各反応管について、断片は、電気泳動によって、ポリアクリルアミド平板ゲル、または粘性ポリマーを充填したキャピラリー管中でサイズ分離される。配列は、ゲルの最上部から底部まで走査するとき、どの列が標識化プライマーからの可視化された印をもたらすかを読み取ることによって決定される。ダイターミネーター配列決定は、代替的にこのターミネーターを標識する。完全な配列決定は、ジ-デオキシヌクレオチド鎖ターミネーターの各々を、異なる波長で蛍光を発する別個の蛍光色素で標識することによって、単一の反応において行うことができる。

20

30

【0220】

本発明は更に、核酸ハイブリダイゼーション技術を使用して、生物学的試料をALK耐性突然変異についてアッセイするための方法を提供する。核酸ハイブリダイゼーションは、精製されたDNA、増幅されたDNA、および固定化細胞調製物 (蛍光インサイツハイブリダイゼーション) に対して向けられる標識化プローブを使用する方法を含む。核酸ハイブリダイゼーション技術の非限定的な例としては、適切なプローブを使用した、サザン (DNA:DNA) プロットハイブリダイゼーション、インサイツハイブリダイゼーション、および染色体物質のFISHの既知の方法が挙げられる。ALK耐性突然変異に近位のヌクレオチド配列を含むような核酸プローブが、使用される可能性がある。「に近位の」とは、ALK耐性突然変異の約100キロベース (kb) 以内であることが意図される。

40

【0221】

インサイツハイブリダイゼーション (ISH) は、特異的DNAまたはRNA配列を、組織の部分または切片中 (インサイツ) で、あるいは組織が十分に小さい場合、組織全体 (ホールマウントISH) において局在化するために、標識された相補的DNAまたはRNA鎖をプローブとして使用する、ハイブリダイゼーションの一種である。DNAISHを使用して、染色体の構造を決定することができる。試料細胞および組織は通常、標的転写物を定置に固定するため、およびプローブのアクセスを増加させるために処理される。プローブは、昇温で標的配列とハイブリッド形成し、次いで過剰のプローブは、洗い流される。放射標識、蛍光標識、または抗原標識塩基のいずれかで標識されたプローブは、そ

50

れぞれ、オートラジオグラフィー、蛍光顕微鏡、または免疫組織化学のいずれかを使用して、組織中で局在化され、定量化される。ISHはまた、2つ以上の転写物を同時に検出するために、放射能またはその他の非放射性標識で標識された2つ以上のプローブを使用することができる。幾つかの実施形態では、ALK耐性突然変異体は、蛍光インサイツハイブリダイゼーション(FISH)を使用して検出される。

#### 【0222】

核酸ハイブリダイゼーションための特異的プロトコルは、当該技術分野で周知であり、本発明のために容易に適合させることができる。手法に関する手引きは、*In situ Hybridization: Medical Applications* (eds. G. R. Coulton and J. de Bellerocche), Kluwer Academic Publishers, Boston (1992)、*In situ Hybridization: In Neurobiology; Advances in Methodology* (eds. J. H. Eberwine, K. L. Valentino, and J. D. Barchas), Oxford University Press Inc., England (1994)、*In situ Hybridization: A Practical Approach* (ed. D. G. Wilkinson), Oxford University Press Inc., England (1992)、Kuo et al. (1991) *Am. J. Hum. Genet.* 42: 112 - 119、Klinger et al. (1992) *Am. J. Hum. Genet.* 51: 55 - 65、およびWard et al. (1993) *Am. J. Hum. Genet.* 52: 854 - 865)を含む、多くの参考文献から得てもよい。市販されており、FISHアッセイを行うためのプロトコルを提供するキットもまた存在する(例えば、Oncor, Inc., Gaithersburg, MDから入手可能)。手法についての手引きを提供する特許には、米国第5,225,326号、第5,545,524号、第6,121,489号、および第6,573,043号が含まれる。これらの参考文献の全ては、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれ、当該技術分野における同様の参考文献と共に使用されてもよい。

#### 【0223】

サザンブロッティングを使用して、特異的DNA配列を検出することができる。かかる方法において、試料から抽出されたDNAは、断片化され、マトリックスゲル上で電気泳動的に分離され、膜フィルターに移される。フィルターに結合したDNAは、目的の配列に相補的な標識化プローブでのハイブリダイゼーションに供される。フィルターに結合した、ハイブリッド形成されたプローブが検出される。更に、当該技術分野で既知であるノーザンブロッティング技術を使用して、ALK耐性突然変異体をコードする特異的RNA配列を検出することができる。

#### 【0224】

また、マイクロアレイを使用して、ALK耐性ポリヌクレオチドを特異的に検出してもよい。各配列は、固体支持体に結合された捕捉プローブの再現可能なパターンからなる。標識されたRNAは、配列上の相補的プローブとハイブリッド形成され、次いでレーザー走査によって検出される。配列上の各プローブについてのハイブリダイゼーション強度が決定され、相対的な遺伝子発現レベルを表す定量値に変換される。例えば、米国特許第6,040,138号、第5,800,992号および第6,020,135号、第6,033,860号、ならびに第6,344,316号を参照されたく、それらの各々は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

#### 【0225】

ハイブリダイゼーション技術において、ALK耐性突然変異体ポリペプチドをコードする標的ポリヌクレオチドと選択的にハイブリッド形成する、ポリヌクレオチドの全てまたは一部が用いられる。「ストリンジェントな条件」または「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」とは、ポリヌクレオチドプローブに言及する場合、プローブが、他の配列よりも検出可能なほどに高い度合いで(例えば、バックグラウンドの少なくとも2

10

20

30

40

50

倍)、その標的配列とハイブリッド形成するであろう条件が意図される。ストリンジェントな条件は、配列依存性であり、異なる状況において異なる。ハイブリダイゼーションおよび/または洗浄条件のストリンジェンシーを制御することによって、プローブに100%相補的な標的配列を特定することができる(相同プロービング)。代替的に、ストリンジェンシー条件は、より低い度合いの同一性が検出されるように、配列中の幾らかのミスマッチを許容するように調整することができる(非相同プロービング)。一般に、プローブは、約1000ヌクレオチド長未満または500ヌクレオチド長未満である。

#### 【0226】

本明細書で使用されるとき、実質的に同一のまたは相補的な配列は、それが高ストリンジェンシー条件下で比較されている核酸分子の補体と、特異的にハイブリッド形成するであろうポリヌクレオチドである。DNAハイブリダイゼーションを促進する適切なストリンジェンシー条件、例えば、約45での6X塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)、続いて50での2XSSCの洗浄は、当業者に既知であるか、またはCurrent Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6に見出すことができる。典型的には、ハイブリダイゼーションおよび検出のためのストリンジェントな条件は、塩濃度が、pH7.0~8.3で約1.5M Naイオン未満、典型的には約0.01~1.0M Naイオン濃度(または他の塩)であり、温度が、短いプローブ(例えば、10~50ヌクレオチド)については少なくとも約30、および長いプローブ(例えば、50ヌクレオチドを超える)については少なくとも約60である条件であろう。ストリンジェントな条件はまた、ホルムアミド等の不安定化剤の付加により達成されてもよい。例示的な低ストリンジェンシー条件は、30~35%ホルムアミド、1M NaCl、1%SDS(ドデシル硫酸ナトリウム)の緩衝溶液で37でのハイブリダイゼーション、および1X~2X SSC(20X SSC=3.0M NaCl/0.3Mクエン酸三ナトリウム)中の50~55での洗浄を含む。例示的な中程度のストリンジェンシー条件は、40~45%ホルムアミド、1.0M NaCl、1%SDS中の37でのハイブリダイゼーション、および0.5X~1X SSC中の55~60での洗浄を含む。例示的な高ストリンジェンシー条件は、50%ホルムアミド、1M NaCl、1%SDS中の37でのハイブリダイゼーション、および0.1X SSC中の60~65での洗浄を含む。任意に、洗浄緩衝剤は、約0.1%~約1%SDSを含んでもよい。ハイブリダイゼーションの持続期間は、一般に約24時間未満、通常は約4~約12時間である。洗浄時間の持続期間は、少なくとも、均衡に到達するために十分な時間の長さであろう。

#### 【0227】

ハイブリダイゼーション反応において、特異性は、典型的にはポストハイブリダイゼーション洗浄の関数であり、このうち必要不可欠な因子は、最終洗浄溶液のイオン強度および温度である。DNA-DNAハイブリッドについては、 $T_m$ は、Meinkoth and Wahl (1984) Anal Biochem. 138:267-284の、 $T_m = 81.5 + 16.6 (\log M) + 0.41 (GC\%) - 0.61 (\text{ホルム}\%) - 500/L$ の方程式から概算することができ、式中、Mは、一価陽イオンのモル濃度、GC%は、DNA内のグアノシンおよびシトシンヌクレオチドの百分率、ホルム%は、ハイブリダイゼーション溶液中のホルムアミドの百分率、Lは、塩基対のハイブリッドの長さである。 $T_m$ は、相補的な標的配列の50%が、完全にマッチしたプローブとハイブリッド形成する温度(規定のイオン強度およびpH下)である。 $T_m$ は、各1%のミスマッチにつき約1低減され、故に、 $T_m$ 、ハイブリダイゼーション、および/または洗浄条件は、所望の同一性を備える配列とハイブリッド形成するように調整することができる。例えば、90%以上の同一性を備える配列が求められる場合、 $T_m$ は10低減させられ得る。一般に、ストリンジェントな条件は、規定のイオン強度およびpHで、特異的配列およびその補体についての熱融点( $T_m$ )よりも、約5低くなるように選択される。しかしながら、非常にストリンジェントな条件は、熱融点( $T_m$ )よりも1、2、3、または

10

20

30

40

50

4 低いハイブリダイゼーションおよび/または洗浄を利用することができ、中程度にストリンジেন্টな条件は、熱融点 ( $T_m$ ) よりも 6、7、8、9、または 10 低いハイブリダイゼーションおよび/または洗浄を利用することができ、低ストリンジエンシー条件は、熱融点 ( $T_m$ ) よりも 11、12、13、14、15、または 20 低いハイブリダイゼーションおよび/または洗浄を利用することができる。方程式、ハイブリダイゼーションおよび洗浄組成物、ならびに所望の  $T_m$  を使用して、当業者であれば、ハイブリダイゼーションおよび/または洗浄溶液のストリンジエンシーの変形が本質的に説明されることを理解するであろう。所望の度合いのミスマッチが、45 未満 (水溶液) または 32 未満 (ホルムアミド溶液) の  $T_m$  をもたらず場合、より高い温度が使用され得るように、SSC 濃度を増加させることが最適である。核酸のハイブリダイゼーションの広範な手引きは、Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology Hybridization with Nucleic Acid Probes, Part I, Chapter 2* (Elsevier, New York)、および Ausubel et al., eds. (1995) *Current Protocols in Molecular Biology, Chapter 2* (Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York) に見出される。Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York) および Haymes et al. (1985) *In: Nucleic Acid Hybridization, a Practical Approach*, IRL Press, Washington, D.C. を参照されたい。

【0228】

核酸増幅技術の例証的な非限定的例としては、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)、逆転写 - ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR)、リガーゼ連鎖反応 (LCR) (Weiss (1991) *Science* 254:1292、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)、鎖置換増幅 (SDA) (Walker et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:392-396、米国特許第 5,270,184 号および第 5,455,166 号、それらの各々は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)、および核酸配列ベース増幅 (NASBA) が挙げられるが、これらに限定されない。一般的に PCR と称される、ポリメラーゼ連鎖反応 (米国特許第 4,683,195 号、第 4,683,202 号、第 4,800,159 号、および第 4,965,188 号、それらの各々は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる) は、標的核酸配列のコピー数を指数関数的に増加させるために多重サイクルの変性、プライマー対の反対鎖へのアニーリング、およびプライマー伸長を使用する。PCR の他の種々の組み合わせおよび順序については、例えば、米国特許第 4,683,195 号、第 4,683,202 号、および第 4,800,159 号、Mullis et al. (1987) *Meth. Enzymol.* 155:335、および Murakawa et al. (1988) *DNA* 7:287 を参照されたく、それらの各々は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0229】

PCR プライマーおよび PCR クローニングを設計するための方法は、一般に当該技術分野で知られており、Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York) に開示される。また、Innis et al., eds. (1990) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Academic Press, New York)、Innis and Gelfand, eds. (1995) *PCR Strategie*

s (Academic Press, New York)、および Innis and Gelfand, eds. (1999) PCR Methods Manual (Academic Press, New York) も参照されたい。増幅の方法は更に、米国特許第 4,683,195 号、第 4,683,202 号、および Chen et al. (1994) PNAS 91:5695-5699 に記載される。これらの方法ならびに DNA 増幅の技術分野で既知の他の方法が、本発明の実施形態の実践において使用されてもよい。特異的 PCR プロトコルにおける幾つかのパラメータは、具体的な研究所の条件に合わせて調整される必要があり得、若干修正され得るが、なおも同様の結果の収集を可能にすることが理解される。これらの調整は、当業者にとって明らかであろう。サーマルサイクラーは、ポリヌクレオチドの特異的増幅のためにしばしば用いられる。PCR のための変性、アニーリング、および重合のサイクルは、典型的にはサーマルサイクラーとして知られる、自動装置を使用して行われてもよい。用いられ得るサーマルサイクラーは、米国特許第 5,612,473 号、第 5,602,756 号、第 5,538,871 号、および第 5,475,610 号に記載され、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

10

20

30

40

50

#### 【0230】

1つの例証的な検出方法は、増幅プロセスの定量評価をリアルタイムで提供する。増幅プロセスの「リアルタイム」での評価は、反応混合物中のアンプリコンの量を、増幅反応中に連続的または周期的のいずれかで決定すること、および決定された値を使用して、試料中に最初に存在する標的配列の量を算出することを伴う。リアルタイム増幅に基づいて試料中に存在する最初の標的配列の量を決定するための多様な方法は、当該技術分野で周知である。これらには、米国特許第 6,303,305 号および第 6,541,205 号に開示される方法が含まれ、それらの各々は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。試料中に最初に存在する標的配列の量を決定するための、しかしリアルタイム増幅に基づかない別の方法は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許第 5,710,029 号に開示される。

#### 【0231】

増幅産物は、種々の自己ハイブリッド形成プローブの使用を通じてリアルタイムで検出されてもよく、自己ハイブリッド形成プローブのうちほとんどは、ステム-ループ構造を有する。かかる自己ハイブリッド形成プローブは、標的配列へのハイブリダイゼーションを通じて、プローブが自己ハイブリッド形成状態または変化した状態にあるかどうかによって依存して、それらが異なって検出可能なシグナルを発するように標識される。非限定的な例として、「分子トーチ」は、連結領域（例えば、非ヌクレオチドリンカー）によって接続され、ハイブリダイゼーションアッセイ条件下で相互にハイブリッド形成する、自己相補性の特有の領域（「標的結合ドメイン」および「標的閉鎖ドメイン」と称される）を含む、自己ハイブリッド形成プローブの一種である。分子トーチおよび多様な種類の相互作用標識対は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許第 6,534,274 号に開示される。

#### 【0232】

自己相補性を有する検出プローブの別の例は、「分子ビーコン」である。分子ビーコンは、標的相補的配列、増幅反応中に存在する標的配列の不在下でプローブを閉鎖立体配座で保有する親和性対（または核酸アーム）、およびプローブが閉鎖立体配座にあるときに相互作用する標識対を有する核酸分子を含む。標的配列および標的相補的配列のハイブリダイゼーションは、親和性対の成員を分離し、それによってプローブを開放立体配座に切り替える。開放立体配座への切り替えは、例えば、フルオロフォアおよびクエンチャー（例えば、DABCYL および EDANS）であり得る、標識対の低減された相互作用に起因して検出可能である。分子ビーコンは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許第 5,925,517 号および第 6,150,097 号に開示される。

#### 【0233】

他の自己ハイブリッド形成プローブは、当業者に周知である。非限定的な例として、米

国特許第5,928,862号(参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)に開示されるもの等の、相互作用標識を有するプローブ結合対が、本発明における使用のために適合させられ得る。一塩基多型(SNP)を検出するために使用されるプローブ系もまた、本発明において利用され得る。更なる検出系は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許第20050042638号に開示されるように、「分子スイッチ」を含む。嵌入染料および/または蛍光色素を含むもの等の他のプローブもまた、本発明における増幅産物の検出に有用である。例えば、米国特許第5,814,447号を参照されたい(参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。

#### 【0234】

本開示のALK耐性突然変異体の特異的に検出するために使用され得る薬剤は、キット中に提供することができる。本明細書で使用されるとき、「キット」は、生物学的試料中のALK耐性突然変異体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの特定、検出、および/もしくは定量化(quantification)、またはALK耐性突然変異体ポリペプチドの検出および/もしくは定量化(quantitation)のための試薬の一式を指す。本明細書で使用される、「キット」および「システム」という用語は、具体的な実施形態では、1つ以上の他の種類の要素または構成要素(例えば、他の種類の生化学試薬、容器、商業用販売向きのパッケージング等のパッケージ、検出試薬が結合される基質、電子ハードウェア構成要素、使用説明書等)と組み合わせられた、少なくとも1つ以上の検出試薬を指すことが意図される。したがって、本発明は更に、パッケージ化されたプローブおよびプライマーセット(例えば、TaqManプローブ/プライマーセット)、核酸分子のアレイ/マイクロアレイ、および1つ以上のALK耐性突然変異体を検出するための1つ以上のプローブ、プライマー、または他の検出試薬を含有するビーズを含むが、これらに限定されない、ALK耐性突然変異体検出キットおよびシステムを提供する。キット/システムは任意に、種々の電子ハードウェア構成要素を含む可能性がある。例えば、種々の製造業者によって提供されるアレイ(例えば、DNAチップ)および微小流体システム(例えば、ラボオンチップシステム)は典型的に、ハードウェア構成要素を含む。他のキット/システム(例えば、プローブ/プライマーセット)は、電子ハードウェア構成要素を含まない場合があるが、例えば、1つ以上のALK耐性突然変異体検出試薬と共に、1つ以上の容器中にパッケージ化された他の生化学試薬を含み得る。

#### 【0235】

幾つかの実施形態では、ALK耐性突然変異体検出キットは典型的に、ALK耐性突然変異を含むポリヌクレオチドの増幅および/または検出等のアッセイまたは反応を行うために必要な、1つ以上の検出試薬および他の構成成分(例えば、緩衝剤、DNAポリメラーゼまたはリガーゼ等の酵素、デオキシヌクレオチド三リン酸等の鎖伸長ヌクレオチド、陽性対照配列、陰性対照配列等)を含有する。キットは、標的ポリヌクレオチド量を決定するための手段、および適切な基準と比較するための手段を更に含有することができ、またALK耐性突然変異を検出するためにキットを使用するための説明書を含むことができる。一実施形態では、本明細書に開示されるALK耐性突然変異のうちの一つ以上を検出するための1つ以上のアッセイを行うために必要な試薬を含有するキットが提供される。ALK耐性突然変異検出キット/システムは、ALK耐性突然変異にある、またはその近くの核酸分子とハイブリッド形成する、例えば、1つ以上のプローブ、またはプローブの対を含有してもよい。

#### 【0236】

具体的な実施形態では、キットは、第1のおよび第2のプライマーを含み、ここで第1のおよび第2のプライマーは、ALK阻害剤耐性突然変異を含むアンプリコンを増幅する。他の実施形態では、キットは、阻害剤耐性突然変異を有するALKをコードするポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリッド形成するポリヌクレオチド配列を含む、少なくとも1つのプローブを含む。

#### 【0237】

また、キットを使用して、ALK阻害剤耐性突然変異体ポリペプチドを検出することも



できる。これらの実施形態では、キットは、1つ以上の他の種類の要素または構成要素（例えば、他の種類の生化学試薬、容器、商業用販売の規模用パッケージ等のパッケージ、電子ハードウェア構成要素、洗浄試薬、抗体等の結合特異的結合剤の存在を検出することが可能なキットの試薬/化学物質）と組み合わせて、抗体等の、A L K 耐性突然変異体ポリペプチドに特異的に結合する薬剤を含む。

#### 【0238】

具体的な実施形態では、キットは、区画化されたキットを含み、試薬が別個の容器中に含有される任意のキットを含む。かかる容器には、小ガラス容器、プラスチック容器、またはプラスチック片もしくは紙片が含まれる。かかる容器は、試料および試薬が相互汚染されず、かつ各容器の薬剤または溶液が定量的様式で1つの区画から別の区画に添加されるように、試薬を1つの区画から別の区画に効率的に移すことを可能にする。かかる容器には、試験試料を受容することになる容器、アッセイに使用される抗体またはプローブを含有する容器、洗浄試薬（リン酸塩緩衝食塩水、トリス緩衝剤等）を含有する容器、および結合された抗体またはハイブリッド形成されたプローブを検出するために使用される試薬を含有する容器が含まれてもよい。上述のものを含むが、これらに限定されない、当該技術分野で既知の任意の検出試薬が、使用される得る。

10

#### 【0239】

A L K 耐性突然変異体を検出するための方法を使用して、対象において、異常な A L K 活性に関連する疾患を診断することができる。更に、本明細書に記載されるスクリーニングアッセイを使用して特定された A L K 耐性突然変異体を阻害する薬剤を使用して、かかる疾患を治療することができる。A L K 活性によって媒介される疾患には、一部には遊走、浸潤、増殖、および浸潤性の細胞増殖に関連する他の生物学的活性を特徴とする疾患が含まれるが、これらに限定されない。かかる疾患には、癌が含まれる。故に、対象において、少なくとも1つの A L K キナーゼ阻害剤に耐性であるかまたは耐性を発達させる可能性が高い癌の存在を診断するための方法が提供される。かかる方法は、特異的結合剤（例えば、抗体）により A L K 耐性突然変異体ポリペプチドを検出すること、または A L K 耐性突然変異を検出することが可能なポリヌクレオチドを使用して A L K 耐性突然変異を検出すること等、上述の方法のいずれかを使用して対象からの生物学的試料を、A L K 阻害剤耐性突然変異の存在についてアッセイすることを含むことができる。

20

#### 【0240】

「癌」という用語は、無秩序な細胞増殖を特徴とする、対象における病態を指し、ここで癌性の細胞は、局所浸潤および/または非隣接の部位への転移が可能である。本明細書で使用されるとき、「癌細胞」、「癌性の細胞」、または「腫瘍細胞」は、この無秩序な細胞増殖および浸潤性特性を特徴とする細胞を指す。

30

#### 【0241】

「癌」という用語は、限定なしに、心臓系の癌：肉腫（血管肉腫、線維肉腫、横紋筋肉腫、脂肪肉腫）、粘液腫、横紋筋腫、線維腫、脂肪腫、および奇形腫；肺の癌：気管支原性癌（扁平上皮細胞、未分化小細胞、未分化大細胞、腺癌）、肺胞（細気管支）癌、気管支腺腫、肉腫、リンパ腫、軟骨性過誤腫（chondromatous hamartoma）、中皮腫（mesothelioma）；胃腸系の癌：食道（扁平上皮癌、腺癌、平滑筋肉腫、リンパ腫）、胃（癌腫、リンパ腫、平滑筋肉腫）、膵臓（膵管腺癌、インスリノーマ、グルカゴノーマ、ガストリノーマ、カルチノイド腫瘍、ピポーマ）、小腸（腺癌、リンパ腫、カルチノイド腫瘍、カボジ肉腫、平滑筋腫、血管腫、脂肪腫、神経線維腫、線維腫）、大腸（腺癌、管状腺腫、絨毛腺腫、過誤腫、平滑筋腫）；尿生殖路腎臓の癌（腺癌、ウィルムス腫瘍[腎芽細胞腫]、リンパ腫、白血病）、膀胱および尿道（扁平上皮癌、移行上皮癌、腺癌）、前立腺（腺癌、肉腫）、精巣（セミノーマ、奇形腫、胚性癌腫、奇形癌腫、絨毛癌、肉腫、間質細胞癌腫、線維腫、線維腺腫、類腺腫瘍、脂肪腫）；肝臓の癌：肝癌（肝細胞癌）、胆管癌、肝芽腫、血管肉腫、肝細胞腺腫、血管腫；骨の癌：骨原性肉腫（骨肉腫）、線維肉腫、悪性線維性組織球腫、軟骨肉腫、ユーイング肉腫、悪性リンパ腫（細網細胞肉腫）、多発性骨髄腫、悪性巨細胞腫瘍 脊索腫、骨軟骨腫

40

50

(osteochronfroma) (骨軟骨性外骨症)、良性軟骨腫、軟骨芽細胞腫、軟骨粘液線維腫、類骨骨腫、および巨細胞腫瘍；神経系の癌：頭蓋（骨腫、血管腫、肉芽腫、黄色腫、変形性骨炎）、髄膜（髄膜腫、髄膜肉腫、神経膠腫症）、脳（星状細胞腫、髄芽細胞腫、神経膠腫、上衣腫、胚細胞腫〔松果体腫〕、多形膠芽腫、乏突起神経膠腫、シュワン細胞腫、網膜芽細胞腫、先天性腫瘍）、脊髄神経線維腫、髄膜腫、神経膠腫、肉腫）；婦人科の癌：子宮（子宮内膜癌）、子宮頸部（子宮頸癌、前腫瘍性子宮頸部異形成）、卵巣（卵巣癌〔漿液性嚢胞腺癌、粘液嚢胞腺癌、未分類癌腫〕、顆粒膜-莢膜細胞腫瘍、セルトリ・ライディッヒ細胞腫瘍、未分化胚細胞腫、悪性奇形腫）、外陰部（扁平上皮癌、上皮内癌、腺癌、線維肉腫、黒色腫）、膣（明細胞癌、扁平上皮癌、ブドウ状肉腫（胚性横紋筋肉腫）、卵管（癌腫）；血液系癌：血液（骨髄性白血病〔急性および慢性〕、急性リンパ芽球性白血病、慢性リンパ球性白血病、骨髄増殖性疾患、多発性骨髄腫、骨髄異形成症候群）、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫〔悪性リンパ腫〕、未分化大細胞リンパ腫（ALCL）；皮膚癌：悪性黒色腫、基底細胞癌、扁平上皮癌、カボジ肉腫、黒子異形成母斑、脂肪腫、血管腫、皮膚線維腫、ケロイド、乾癬；ならびに副腎の癌：神経芽細胞腫を含む、全ての形態の癌腫、黒色腫、肉腫、リンパ腫、および白血病を含むが、これらに限定されない全ての種類の癌を包含する。

10

## 【0242】

ある実施形態では、癌は、大細胞型B細胞リンパ腫、悪性組織球症、炎症性筋線維芽細胞性腫瘍肉腫、食道扁平上皮癌、乳癌、結腸直腸癌、非小細胞肺癌、神経芽細胞腫、膀胱癌、腎臓癌、および膠芽腫である。

20

## 【0243】

「対象」とは、イヌ、ネコ、畜牛、ウマ、ブタ、ヒツジ等であるが、これらに限定されない哺乳動物、例えば、霊長類、ヒト、農業用動物、および家畜が意図される。幾つかの実施形態では、診断または治療されている対象は、ヒトである。

## 【0244】

本方法を使用して、本明細書に開示される検出方法を使用した、ALK阻害剤耐性突然変異を有するALK発癌性融合タンパク質、またはそれをコードするポリヌクレオチドの検出を通じて、癌を有することが以前に知られていない対象において、癌を診断することができる。

## 【0245】

また、本方法を使用して、本明細書に開示される検出方法を使用した、ALK阻害剤耐性突然変異体ポリペプチドまたはそれをコードするポリヌクレオチドの検出を通じて、異常なALK活性に関連する癌を有することが以前に知られた対象において、少なくとも1つのALKキナーゼ阻害剤に耐性であるかまたは耐性を発達させる可能性が高い癌を診断することもできる。これらの実施形態では、ALK阻害剤耐性突然変異体は、ゲノム増幅またはタンパク質過剰発現が、異常なALK活性および癌発達をもたらす可能性があるため、必ずしもALK発癌性融合タンパク質の一部である必要はない。したがって、「異常なALK活性」は、癌性の状態の発達および/または維持に寄与するために十分である、増加されたALK活性（それはゲノム増幅、タンパク質過剰発現もしくは過剰活性化、または構成的に活性なALK発癌性融合タンパク質の存在に起因し得る）を指す。したがって、異常なALK活性に関連する癌は、異常なALK活性が癌の発達および/または増殖に寄与する癌である。

30

40

## 【0246】

本明細書に開示される方法を通じて特定されるALK耐性突然変異体阻害剤は、ALK耐性突然変異を有する癌の治療に使用され得る。更に、ALK耐性突然変異体の発現を低減する薬剤（例えば、サイレンシング因子）を使用して、ALK耐性突然変異を有する癌を治療することができる。

## 【0247】

本明細書で使用されるとき、「治療」は、有益なまたは所望の臨床結果を得るためのアプローチである。本発明において、有益なまたは所望の臨床結果には、症状の緩和、視覚

50

の部分的なまたは完全な回復（例えば、中心視、視力）、障害の程度の縮減、障害（例えば、錐体光受容体の変性）の安定化（すなわち、悪化していない）状態、障害の進行の遅延または緩徐化、障害の寛解または和らげ、および網膜障害の予防、その阻害、またはそれを発症する危険性の低減が含まれるが、これらに限定されない。「治療」は、治療的処置および予防的（*prophylactic*）または予防的（*preventative*）措置の両方を指す。治療を必要とするものには、すでに障害を有するもの（更なる変性を予防するため）、ならびに障害が予防されるべきものが含まれる。障害を「和らげること」とは、治療なしでの状況と比較して、障害の程度および/もしくは望ましくない臨床徴候を低下させる、かつ/または進行の時間経過を緩徐化または延長することを意味する。

10

## 【0248】

幾つかの実施形態では、ALK耐性突然変異体阻害剤は、薬学的に許容される担体と共に投与され、それは本明細書で薬学的組成物と称される。本明細書で使用されるとき、「薬学的に許容される担体」という用語は、薬学的投与と適合する溶媒、分散媒体、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤等を含む。補足的な活性化化合物もまた、組成物中に組み込むことができる。

## 【0249】

本発明の薬学的組成物は、その意図される投与経路と適合するように製剤化される。投与経路の例としては、非経口、例えば、静脈内、皮内、皮下、経口（例えば、吸入）、経皮（局所）、経粘膜、および直腸投与が挙げられる。加えて、治療上有効量の薬学的組成物を、治療を必要とする領域に（例えば、 $T_R$ 細胞機能を阻害することが所望される身体の領域に）局所的に投与することが望ましい場合がある。これは、例えば、外科手術中の局部（*local*）または局所（*regional*）注入または灌流、局所適用、注射、カテーテル、坐薬、または移植組織（例えば、シリコンゴム（*silastic*）膜または繊維等の膜を含む、多孔質、非多孔質、またはゼラチン質物質から形成される移植組織）等によって達成することができる。一実施形態では、投与は、治療されるべきである癌の部位（または以前の部位）での直接注射による可能性がある。別の実施形態では、治療上有効量の薬学的組成物は、リポソーム等の小胞中で送達される（例えば、*Langer (1990) Science 249: 1527-33*、および *Treat et al., in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez Berestein and Fidler (eds.), Liss, N.Y., pp. 353-65, 1989*を参照されたい）。

20

30

## 【0250】

なおも別の実施形態では、治療上有効量の薬学的組成物を、制御放出系で送達することができる。一例では、ポンプが使用され得る（例えば、*Langer (1990) Science 249: 1527-33*、*Sefton (1987) Crit. Rev. Biomed. Eng. 14: 201-40*、*Buchwald et al. (1980) Surgery 88: 507-16*、*Saudek et al. (1989) N. Engl. J. Med. 321: 574-79*を参照されたい）。別の例では、ポリマー物質が使用され得る（例えば、*Levy et al. (1985) Science 228: 190-92*、*During et al. (1989) Ann. Neurol. 25: 351-56*、*Howard et al. (1989) J. Neurosurg. 71: 105-12*を参照されたい）。*Langer (1990) Science 249: 1527-33*によって考察されるもの等の他の制御放出系もまた使用することができる。

40

## 【0251】

非経口、皮内、または皮下適用のために使用される溶液または懸濁液は、次の構成成分を含み得る：注射用の水、食塩水溶液、固定油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコール、または他の合成溶媒等の滅菌希釈剤；ベンジルアルコールまたは

50

メチルパラベン等の抗菌剤；アスコルビン酸または重亜硫酸ナトリウム等の酸化防止剤；エチレンジアミン四酢酸等のキレート薬剤；酢酸塩、クエン酸塩、またはリン酸塩等の緩衝剤、および塩化ナトリウムまたはデキストロース等の張性の調整のための薬剤。pHは、塩酸または水酸化ナトリウム等の、酸または塩基で調整することができる。非経口調製物は、アンプル、使い捨て注射器、またはガラスもしくはプラスチック製の複数回投与バイアル中に封入することができる。

#### 【0252】

注入用の使用に好適な薬学的組成物には、滅菌水溶液（水溶性の場合）または分散剤、および滅菌注射液または分散剤の即時調製のための滅菌粉末が含まれる。静脈内投与のための好適な担体には、生理食塩水、静菌水、Cremophor（登録商標）EL（BAS F、Parshippany, NJ）、またはリン酸塩緩衝食塩水（PBS）が含まれる。10  
 全ての場合において、組成物は、滅菌されていなければならない、容易にシリンジで注射できる程度に流動的であるべきである。それは製造および保管の条件下で安定でなければならない、細菌および真菌等の微生物の汚染作用から守られなければならない。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコール等）を含む溶媒または分散媒、およびそれらの好適な混合物であり得る。適切な流動性は、例えば、レシチン等のコーティングの使用によって、分散物の場合には必要とされる粒径の維持によって、および界面活性剤の使用によって維持20  
 することができる。微生物の作用の防止は、種々の抗菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサル等によって達成することができる。多くの場合、等張剤、例えば、糖、マンニトール、ソルビトール等のポリアルコール、塩化ナトリウムを組成物中に含むことが好ましいであろう。注射用組成物の持続的吸収は、組成物中に、吸収を遅延させる薬剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを含むことによってもたすことができる。

#### 【0253】

滅菌注射液は、必要な量の活性化化合物を、必要に応じて、上に列挙された成分の1つまたはその組み合わせとともに適切な溶媒中に組み入れ、続いて濾過滅菌することによって調製することができる。一般に、分散剤は、活性化化合物を、塩基性分散媒体および上で列挙されたものからの必要とされる他の成分を含有する滅菌ビヒクル中に組み込むことによ30  
 って調製される。滅菌注射液の調製のための滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、真空乾燥および凍結乾燥であり、それにより、活性成分の粉末に加えて、すでに滅菌濾過したその溶液からの任意の追加的な所望の成分を得る。

#### 【0254】

経口組成物は、一般に、不活性希釈剤または可食性担体を含む。それらは、ゼラチンカプセル中に封入すること、または錠剤に圧縮することができる。経口治療的投与において、活性化化合物は、賦形剤と共に組み込むことができ、錠剤、トローチ、またはカプセルの形態で使用することができる。経口組成物はまた、マウスウォッシュとして使用するた40  
 めに流動担体を使用して調製することができ、ここで流動担体中の化合物は、経口で適用され、ゆすがれ、吐き出されるかまたは飲み込まれる。薬学的に適合する結合剤、および/またはアジュバント物質を、組成物の一部として含めることができる。錠剤、丸薬、カプセル、トローチ等は、次の成分のいずれか、または同様の性質の化合物を含有することができる：微結晶性セルロース、ゴムトラガカント、もしくはゼラチン等の結合剤；デンプンもしくは乳糖等の賦形剤、アルギン酸、プリモゲル（Primogel）、もしくはコーンスターチ等の崩壊剤；ステアリン酸マグネシウムもしくはステロテス（Sterotes）等の滑沢剤；コロイド状二酸化ケイ素等の流動促進剤；蔗糖もしくはサッカリン等の甘味剤；またはペパーミント、サリチル酸メチル、もしくはオレンジ香料等の香料剤。吸入による投与については、化合物は、好適な噴霧剤、例えば、二酸化炭素等のガスを含50  
 有する圧力容器またはディスペンサー、または噴霧器からのエアロゾルスプレーの形態で送達される。

#### 【0255】

全身投与は、経粘膜手段または経皮手段によることもできる。経粘膜または経皮投与のために、障壁を透過するのに適した浸透剤が製剤中に使用される。かかる浸透剤は、当該技術分野において一般に知られており、例えば、経粘膜投与のためには、洗剤、胆汁塩、およびフシジン酸誘導体を含む。経粘膜投与は、鼻内スプレーまたは坐薬の使用を通じて達成することができる。経皮投与については、活性化合物は、当該技術分野で一般知られるように、軟膏、膏薬、ゲル、またはクリーム中に製剤化される。化合物はまた、直腸送達のために、（例えば、ココアバターおよび他のグリセリド等の従来の坐薬基剤を有する）坐薬、または保持浣腸の形態で調製することもできる。

#### 【0256】

一実施形態では、活性化合物は、化合物を、埋め込みおよびマイクロカプセル封入送達系を含む、制御放出製剤等の、身体からの急速な排出から保護する担体と共に調製される。エチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸等の生分解性、生体適合性ポリマーを使用することができる。かかる製剤の調製のための方法は、当業者に明らかであろう。物質はまた、Alza CorporationおよびNova Pharmaceuticals, Incから商業的に得ることもできる。リポソーム懸濁液（特異的受容体に対するモノクローナル抗体で感染細胞を標的としたリポソームを含む）もまた、薬学的に許容される担体として使用することができる。これらは、例えば、米国特許第4,522,811号に記載されるように、当業者に知られる方法に従って調製することができる。

#### 【0257】

ポリヌクレオチドは、ネイキッドDNAまたはRNAとして、欠損もしくは弱毒化レトロウイルスまたは他のウイルスベクターを使用した感染によって直接注射することができ、あるいは脂質もしくは細胞表面受容体またはトランスフェクション剤でコーティングし、リポソーム、微粒子、またはマイクロカプセル中にカプセル封入すること、あるいは核に進入することが知られるペプチドと連結してそれらを投与することによって、受容体媒介型エンドサイトーシスに供されるリガンドと連結してそれを投与することによって（例えば、Wu and Wu (1987) J. Biol. Chem. 262:4429-4432を参照されたい）（受容体を特異的に発現する細胞型を標的とするために使用することができる）等が可能である。別の実施形態では、リガンドがエンドソームを攪乱するための融合性ウイルスペプチドを含む、ポリヌクレオチド-リガンド複合体を形成することができ、ポリヌクレオチドがリソソーム分解を回避することを可能にする。なおも別の実施形態では、ポリヌクレオチドは、特異的受容体を標的とすることによって、細胞特異的取り込みおよび発現に対して、体内で標的化することができる。代替的に、ポリヌクレオチドは、相同組み換えによって、細胞内に導入され、発現のために宿主細胞DNA内に組み込まれ得る（Koller and Smithies (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935、Zijistra et al. (1989) Nature 342:435-438）。

#### 【0258】

投与の容易性および投薬量の均一性のために、経口または非経口組成物を単位剤形で製剤化することがとりわけ有利である。本明細書で使用される単位剤形とは、対象を、必要とされる薬学的担体を伴い、所望の治療効果をもたらすように算出された、既定の量の活性化合物を含有する、各単位により治療するために、単位の投薬（unitary doses）として適した、物理的に個別的な単位を指す。本発明の単位剤形の仕様は、活性化合物の固有の特徴および達成されるべき特定の治療効果、ならびに個人の治療のためにかかる活性化合物を調合する技術分野の本質的な限界によって決定付けられ、またそれに直接依存する。

#### 【0259】

薬学的組成物は、投与のための説明書と共に、容器、パック、またはディスペンサーに含めることができる。

#### 【0260】

10

20

30

40

50

投与が治療目的のためであるとき、投与は、予防的 ( p r o p h y l a c t i c ) (すなわち、予防的 ( p r e v e n t a t i v e ) ) または治療的目的のいずれのためであってもよい。予防的に提供されるとき、物質は、あらゆる症状の前に提供される。物質の予防的投与は、あらゆるその後の症状を阻止または減弱する機能を果たす。治療的に提供されるとき、物質は、症状の発現時 ( またはその直後 ) に提供される。物質の治療的投与は、任意の実際の症状を減弱する機能を果たす。

【 0 2 6 1 】

本明細書に記載される治療 ( t r e a t m e n t ) 様式が、単独で、または外科的療法、放射線療法、化学療法 ( 例えば、当該技術分野で周知の任意の化学療法剤を用いて )、もしくは免疫療法を含むが、これらに限定されない、他の治療 ( t h e r a p e u t i c ) 様式と組み合わせて ( すなわち、アジュバント療法として ) 使用されてもよいことは、当業者によって理解されるであろう。

10

【 0 2 6 2 】

当業者であれば、疾患もしくは障害の重症度、過去の治療、対象の全般的な健康および / もしくは年齢、ならびに存在する他の疾患を含むが、これらに限定されない、対象を効果的に治療するために必要とされる、いくつかの種類の要因が投薬量に影響を及ぼし得ることを理解するであろう。更に、治療上有効量の A L K 耐性突然変異体阻害剤による対象の治療は、単一の治療を含むことができるか、または、好ましくは、一連の治療を含むことができる。治療に使用される A L K 耐性突然変異体阻害剤の有効な投薬量が、特定の治療の経過にわたって増加または減少されてもよいこともまた理解されるであろう。投薬量の変化が生じ得、本明細書に記載される診断アッセイの結果から明らかとなり得る。

20

【 0 2 6 3 】

かかる活性化合物の適切な用量は、専門の医師、獣医、または研究者の知識内にある幾つかの要因に依存することが理解される。活性化合物の用量 ( 複数可 ) は、例えば、処置されている対象または試料の素性、サイズ、および病態に依存して、更に、該当する場合、組成物が投与されるべき経路、ならびに活性化合物が A L K 耐性突然変異体に対して有する、開業医が所望する効果に依存して、異なるであろう。例示的な用量は、対象または試料重量のキログラム当たりの、ミリグラムまたはマイクログラム量の小分子 ( 例えば、キログラム当たり約 1 マイクログラム ~ キログラム当たり約 5 0 0 ミリグラム、キログラム当たり約 1 0 0 マイクログラム ~ キログラム当たり約 5 ミリグラム、またはキログラム当たり約 1 マイクログラム ~ キログラム当たり約 5 0 マイクログラム ) を含む。活性剤の適切な用量は、調節されるべき発現または活性に関する活性剤の効力に依存することが更に理解される。かかる適切な用量は、本明細書に記載されるアッセイを使用して決定されてもよい。これらの小分子のうちの一つ以上が、A L K 耐性突然変異体の発現レベルまたは活性を低減するために動物 ( 例えば、ヒト ) に投与されるべきであるとき、医師、獣医、または研究者は、例えば、最初に比較的低用量を処方し、その後、適切な反応が得られるまで用量を増加させてもよい。加えて、任意の特定の動物対象に対する特異的な用量レベルは、用いられる特異的な化合物の活性、対象の年齢、体重、全般的な健康、性別、および食生活、投与時間、投与経路、排泄率、任意の薬物の組み合わせ、ならびに調節されるべき発現または活性の度合いを含む、多様な要因に依存することが理解される。

30

40

【 0 2 6 4 】

A L K 耐性突然変異体阻害剤の治療上有効量は、動物研究によって決定することができる。動物アッセイが使用されるとき、投薬量は、動物アッセイにおいて有効であることが示された濃度と同様の標的組織中濃度を提供するために投与される。治療の方法は、A L K 耐性突然変異体阻害剤の治療上有効量の単回投与または治療上有効量の複数回投与を含んでもよいことが認識される。

【 0 2 6 5 】

細胞増殖を阻害する所望の効果を効果的に達成する任意の送達系または治療レジメンを、使用することができる。故に、例えば、A L K 耐性突然変異体阻害剤または A L K 耐性突然変異体特異的結合剤を含む、有効な量の本発明の薬学的組成物を含む製剤を、A L K

50

耐性突然変異体の活性に関連する幾つかの臨床適応症の治療、予防、および診断の目的のために使用することができる。

【0266】

「a」または「an」主体という用語は、その主体の1つ以上を指すことに留意されたく、例えば、「ポリペプチド」は、1つ以上のポリペプチドを表すことが理解される。したがって、「a」（または「an」）、「1つ以上」、および「少なくとも1つ」という用語は、本明細書で交換可能に使用することができる。

【0267】

本明細書および実施形態全体を通じて、「を含む (comprise)」、「を含む (comprises)」、および「を含むこと (comprising)」という単語は、文脈上、別様であることが必要である場合を除いて、非排他的な意味で使用される。

10

【0268】

本明細書で使用されるとき、「約」という用語は、値を指すとき、幾つかの実施形態では±50%、幾つかの実施形態では±20%、幾つかの実施形態では±10%、幾つかの実施形態では±5%、幾つかの実施形態では±1%、幾つかの実施形態では±0.5%、および幾つかの実施形態では±0.1%である、指定される量からの変動を包含することが意図され、したがって変動は、本開示の方法を行うため、または本開示の組成物を用いるために適切である。

【0269】

更に、量、濃度、または他の値もしくはパラメータが、範囲、好ましい範囲、または好ましい上限値と好ましい下限値との一覧のいずれかとして与えられるとき、これは、範囲が別個に開示されているかどうかに関わらず、上限範囲または好ましい値と任意の下限範囲または好ましい値との任意の対から形成される、全ての範囲を具体的に開示しているとして理解されるべきである。数値の範囲が本明細書に列挙される場合、別段の定めのない限り、その範囲は、その終点ならびにその範囲内の全ての整数および分数を含むことが意図される。本開示の主題の範囲が、範囲を規定するときに列挙される具体的な値に限定されることは意図されない。

20

【0270】

別途規定されない限り、本明細書で使用される全ての学術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の専門家によって一般的に理解されるものと同じ意味を有する。本発明の実践または試験において本明細書と同様の任意の方法および物質を使用することができるが、好ましい方法および物質が本明細書に記載される。

30

【0271】

次の実施例は、限定としてではなく、例証として提供される。

【実施例】

【0272】

実施例1. 小分子キナーゼ阻害剤に対する耐性を付与するALKの点突然変異の特定および特徴付け

マウス細胞株BaF3を、pcDNA3neo-NPM-ALK発現構築物で安定にトランスフェクトした(NPM-ALKのヌクレオチド配列およびアミノ酸配列は、それぞれ、配列番号3および4に記載される)。NPM-ALK/BaF3細胞クローンを、阻害剤耐性スクリーニングに使用するために、限界希釈によって単離した。阻害剤耐性コロニーについてのスクリーニングを、阻害剤への間欠的曝露または連続的曝露のいずれかを含む小規模な修正により、以前に記述されたように行った(von Bubnoff et al. (2005) Blood 105:1652-1659、von Bubnoff et al. (2006) Blood 108:1328-1333、Kancha et al. (2009) Clin Cancer Res 15:460-467、von Bubnoff et al. (2009) Cancer Res 69:3032-3041、von Bubnoff et al. (2005) Cell Cycle 4:400-406)。簡潔に述べると、NPM-ALK/BaF3細胞を、9

40

50

6 ウェルプレート中、ウェル当たり  $1 \times 10^5$  細胞の密度で、種々の濃度の二重 A L K / M E T 阻害剤 P F - 0 2 3 4 1 0 6 6 ( P f i z e r ) または A L K 阻害剤化合物 N V P - T A E 6 8 4 ( N o v a r t i s ) の存在下で培養した ( C h r i s t e n s e n e t a l . ( 2 0 0 7 ) M o l C a n c e r T h e r 6 : 3 3 1 4 - 3 3 2 2 , M c D e r m o t t e t a l . ( 2 0 0 8 ) C a n c e r R e s 6 8 : 3 3 8 9 - 3 3 9 5 , G a l k i n e t a l . ( 2 0 0 7 ) P r o c N a t l A c a d S c i U S A 1 0 4 : 2 7 0 - 2 7 5 ) 。可視の細胞コロニーを選択し、増大させ、A L K キナーゼドメインにおける阻害剤耐性突然変異を特定するために配列分析を行った。  
【 0 2 7 3 】

表 2 は、特定した突然変異の各々を列挙する。A L K キナーゼドメインの 1 3 の異なるアミノ酸位置で、総計 1 8 の突然変異の交換を特定した。突然変異の各々を、B a F 3 細胞中で、野生型 ( W T ) N P M - A L K ( 配列番号 4 ) の部位特異的突然変異誘発によって再構築し、W T N P M - A L K を発現する B a F 3 細胞と比較して、P F - 0 2 3 4 1 0 6 6 への耐性を付与することが示された。N V P - T A E 6 8 4 を使用した選択によって特定した突然変異の全てもまた、P F - 0 2 3 4 1 0 6 6 への耐性を付与したことに留意されたい ( データは図示されず ) 。

【 0 2 7 4 】

表 2 . N P M - A L K 融合タンパク質中に存在するとき、阻害剤化合物 P F - 0 2 3 4 1 0 6 6 または N V P - T A E 6 8 4 への耐性を付与する、A L K キナーゼドメインにおける突然変異

【表 2 - 1】

| 突然変異の番号 | アミノ酸突然変異* | ヌクレオチド突然変異 | 阻害剤化合物[濃度、nM]     | 選択方法 | コロニーの数 |
|---------|-----------|------------|-------------------|------|--------|
| 1       | G1123S    | GGC → AGC  | PF-2341066 [850]  | 連続的  | 14     |
|         | G1123S    | GGC → AGC  | PF-2341066 [950]  | 連続的  | 2      |
|         | G1123S    | GGC → AGC  | PF-2341066 [1050] | 連続的  | 1      |
|         | G1123S    | GGC → AGC  | NVP-TAE684 [88]   | 連続的  | 5      |
| 2       | G1123A    | GGC → GCC  | NVP-TAE684 [88]   | 連続的  | 5      |
| 3       | E1129V    | GAG → GTG  | PF-2341066 [910]  | 連続的  | 1      |
| 4       | E1132K    | GAA → AAA  | PF-2341066 [910]  | 連続的  | 1      |
| 5       | T1151M    | ACG → ATG  | PF-2341066 [850]  | 連続的  | 3      |
| 6       | C1156Y    | TGC → TAC  | PF-2341066 [910]  | 連続的  | 3      |
| 7       | F1174C    | TTC → TGC  | PF-2341066 [750]  | 連続的  | 2      |
|         | F1174C    | TTC → TGC  | NVP-TAE684 [88]   | 連続的  | 2      |
| 8       | F1174I    | TTC → ATC  | PF-2341066 [750]  | 連続的  | 1      |
|         | F1174I    | TTC → ATC  | NVP-TAE684 [88]   | 連続的  | 2      |
| 9       | F1174V    | TTC → GTC  | PF-2341066 [850]  | 連続的  | 1      |



【表 2 - 2】

|    |                   |                               |                   |     |    |
|----|-------------------|-------------------------------|-------------------|-----|----|
| 10 | F1174L            | TTC → CTC                     | PF-2341066 [850]  | 連続的 | 1  |
| 11 | L1196M            | CTG → ATG                     | PF-2341066 [910]  | 連続的 | 2  |
| 12 | G1202R            | GGA → AGA                     | PF-2341066 [750]  | 連続的 | 1  |
|    | G1202R            | GGA → AGA                     | PF-2341066 [850]  | 連続的 | 43 |
|    | G1202R            | GGA → AGA                     | PF-2341066 [950]  | 連続的 | 2  |
|    | G1202R            | GGA → AGA                     | NVP-TAE684 [88]   | 連続的 | 2  |
| 13 | D1203N            | GAC → AAC                     | PF-2341066 [525]  | 間欠的 | 1  |
|    | D1203N            | GAC → AAC                     | PF-2341066 [750]  | 連続的 | 28 |
|    | D1203N            | GAC → AAC                     | PF-2341066 [850]  | 連続的 | 40 |
|    | D1203N            | GAC → AAC                     | PF-2341066 [950]  | 連続的 | 2  |
| 14 | E1210K            | GAG → AAG                     | NVP-TAE684 [88]   | 連続的 | 1  |
| 15 | G1269A            | GGA → GCA                     | PF-2341066 [850]  | 連続的 | 1  |
|    | G1269A            | GGA → GCA                     | PF-2341066 [910]  | 連続的 | 1  |
|    | G1269A            | GGA → GCA                     | PF-2341066 [1100] | 連続的 | 6  |
| 16 | E1406K            | GAA → AAA                     | PF-2341066 [850]  | 連続的 | 1  |
| 17 | E1408K            | GAA → AAA                     | PF-2341066 [750]  | 連続的 | 1  |
|    | E1408K            | GAA → AAA                     | PF-2341066 [910]  | 連続的 | 1  |
| 18 | E1406K/<br>E1408K | GAA →<br>AAA/<br>GAA →<br>AAA | PF-2341066 [850]  | 連続的 | 1  |

10

20

30

\*アミノ酸残基の位置は、完全長ALKタンパク質に対してであり、その配列は、配列番号2に記載される。

## 【0275】

PF-02341066についての細胞傷害性IC<sub>50</sub>決定を、72時間XTTアッセイによって、特定された突然変異の各々を含有するNPM-ALK/BaF3細胞上で、これらの突然変異が阻害剤耐性を付与することを明解に確認するために、以前に記載された(Lagiseti et al. (2009) J. Med. Chem. 52: 6979-6990)ように行った。特定されたALK KD突然変異のうち3つによって付与された、細胞死に対する耐性のレベルを示す代表的な結果を図1に例証する。PF-02341066についてのIC<sub>50</sub>値を表3に示す。3つの突然変異の各々は、正常な親BaF3よりも高いPF-02341066のIC<sub>50</sub>に関連し、これらの突然変異を含有する腫瘍細胞を効率的に死滅させるために必要とされるPF-02341066の濃度が、正常な組織に対して毒性である可能性が高いであろうことを示す。

40

## 【0276】

表3. 親BaF3細胞(なし)、または特定された阻害剤耐性突然変異を有する、天然(野生型)NPM-ALKもしくはNPM-ALKを発現するBaF3細胞中のPF-02341066のIC<sub>50</sub>値

【表 3】

| <u>NPM-ALK</u> | <u>IC<sub>50</sub> (nm)</u> |
|----------------|-----------------------------|
| なし             | 1460                        |
| 野生型            | 460                         |
| L1196M         | 1960                        |
| G1202R         | 2060                        |
| D1203N         | 1490                        |

## 【0277】

10

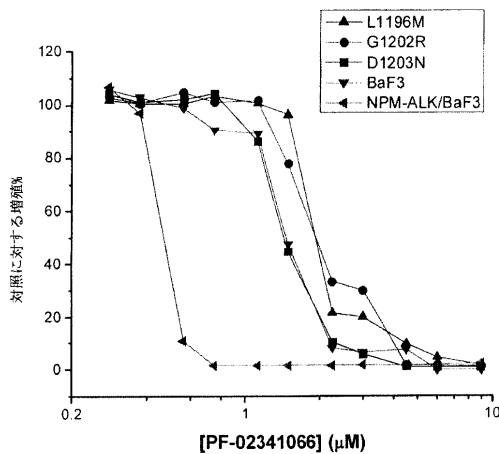
本明細書で言及される全ての刊行物および特許出願は、本発明が属する技術分野の専門家の水準を示す。全ての刊行物および特許出願は、各々の個々の刊行物および特許出願が、参照により具体的におよび個々に組み込まれて示されるかのように、同じ程度まで参照により本明細書に組み込まれる。

## 【0278】

本明細書に記載される本発明の多くの修正および他の実施形態が、前述の説明および関連する図表に提示される教示の利益を有する、これらの発明が属する技術分野の専門家に想定されよう。したがって、本発明が、開示される具体的な実施形態に限定されるべきでないこと、ならびに修正および他の実施形態が、実施形態および添付の特許請求の範囲の上述の一覧の範囲内に含まれるように意図されることを理解されたい。本明細書で具体的な用語が用いられているが、それらは包括的かつ記述的な意味合いで使用されるにすぎず、限定を目的としたものではない。

20

【図 1】



【配列表】

2017018141000001.app

## フロントページの続き

| (51)Int.Cl. |                   | F I     |         | テーマコード(参考) |
|-------------|-------------------|---------|---------|------------|
| C 1 2 N     | 9/12 (2006.01)    | C 1 2 N | 9/12    | 4 C 0 8 6  |
| C 0 7 K     | 19/00 (2006.01)   | C 0 7 K | 19/00   | 4 H 0 4 5  |
| C 0 7 K     | 16/40 (2006.01)   | C 0 7 K | 16/40   |            |
| C 1 2 Q     | 1/68 (2006.01)    | C 1 2 Q | 1/68    | A          |
| C 0 7 K     | 14/47 (2006.01)   | C 0 7 K | 14/47   |            |
| G 0 1 N     | 33/574 (2006.01)  | G 0 1 N | 33/574  | A          |
| G 0 1 N     | 33/573 (2006.01)  | G 0 1 N | 33/573  | A          |
| G 0 1 N     | 33/15 (2006.01)   | G 0 1 N | 33/15   | Z          |
| G 0 1 N     | 33/50 (2006.01)   | G 0 1 N | 33/50   | Z          |
| A 6 1 K     | 45/00 (2006.01)   | A 6 1 K | 45/00   |            |
| A 6 1 P     | 35/00 (2006.01)   | A 6 1 P | 35/00   |            |
| A 6 1 P     | 43/00 (2006.01)   | A 6 1 P | 43/00   | 1 1 1      |
| A 6 1 K     | 31/4545 (2006.01) | A 6 1 K | 31/4545 |            |
| A 6 1 K     | 31/553 (2006.01)  | A 6 1 K | 31/553  |            |
| A 6 1 K     | 48/00 (2006.01)   | A 6 1 K | 48/00   |            |
| A 6 1 K     | 31/7088 (2006.01) | A 6 1 K | 31/7088 |            |

(74)代理人 100119013

弁理士 山崎 一夫

(74)代理人 100123777

弁理士 市川 さつき

(74)代理人 100136249

弁理士 星野 貴光

(72)発明者 モーリス スティーブン ダブリュ

アメリカ合衆国 テネシー州 3 8 1 3 9 ジャーマンタウン ウィンディー オークス ドライブ 2 5 3 2

(72)発明者 ジャン チン

アメリカ合衆国 テネシー州 3 8 1 3 4 メンフィス ベント ツリー アヴェニュー 6 7 4 8

(72)発明者 クイ シャオリ

アメリカ合衆国 テネシー州 3 8 1 2 0 メンフィス ベアーズ ポウ サークル 5 3 0 4

(72)発明者 シュエ リクァン

アメリカ合衆国 テネシー州 3 8 0 1 6 コルドヴァ ガーデン ウィロー レーン 8 3 0 2

F ターム(参考) 2G045 AA24 FB01

4B050 CC03 CC05 LL01 LL03

4B063 QA01 QA18 QQ42 QR08 QR42 QR55 QR62 QS25 QS36 QX02

4B065 AA01X AA57X AA90X AA93Y AB01 BA02 CA24 CA25 CA27 CA44  
CA46

4C084 AA13 AA17 NA05 NA14 ZB26 ZC202

4C086 AA01 AA02 BC36 CB22 EA16 GA07 GA08 MA01 MA04 NA05

NA14 ZB26 ZC20

4H045 AA11 AA20 AA30 BA41 CA40 DA89 EA28 EA51 FA72 FA74