(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第4256169号
(P4256169)

(45)発行日　平成21年4月22日(2009.4.22)　(24)登録日　平成21年2月6日(2009.2.6)

(51)Int.Cl.		F I		
G01N 33/53	(2006.01)	G01N	33/53	ZNAD
C12Q 1/68	(2006.01)	G01N	33/53	M
G01N 33/574	(2006.01)	C12Q	1/68	A
C12N 15/09	(2006.01)	G01N	33/574	A
		C12N	15/00	A

請求項の数 46　(全 97 頁)

(21)出願番号	特願2002-588143(P2002-588143)
(86)(22)出願日	平成14年5月7日(2002.5.7)
(65)公表番号	特表2005-501225(P2005-501225A)
(43)公表日	平成17年1月13日(2005.1.13)
(86)国際出願番号	PCT/US2002/014487
(87)国際公開番号	WO2002/090931
(87)国際公開日	平成14年11月14日(2002.11.14)
審査請求日	平成17年4月27日(2005.4.27)
(31)優先権主張番号	60/289,223
(32)優先日	平成13年5月7日(2001.5.7)
(33)優先権主張国	米国(US)
(31)優先権主張番号	60/356,934
(32)優先日	平成14年2月12日(2002.2.12)
(33)優先権主張国	米国(US)

(73)特許権者　500114586
ザ　バーナム　インスティチュート
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９２０３７，　ラ　ホヤ，　ノース　トリー　パインズ　ロード　１０９０１
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100062409
弁理士　安村　高明
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ＴＵＣＡＮを用いて癌患者の予後を決定するための方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

結腸癌患者の生存について予後を決定するための試薬であって、該試薬は、

該結腸癌患者由来の結腸癌細胞含有サンプルにおけるＴＵＣＡＮのレベルを測定するための、ＴＵＣＡＮに対する選択的結合剤、ＴＵＣＡＮと特異的に反応する抗体、またはＴＵＣＡＮ遺伝子と相補的な核酸プローブ；

を含み、

参照のＴＵＣＡＮのレベルと比較して低い該サンプル中のＴＵＣＡＮレベルは、該結腸癌患者の増大した生存と相関する、

試薬。

【請求項２】

前記生存は、前記結腸癌患者が該癌の再発を有するかどうかにかかわらない生存である、請求項１に記載の試薬。

【請求項３】

前記生存が、疾患に罹患していない生存である、請求項１に記載の試薬。

【請求項４】

前記サンプルが、結腸腫瘍組織である、請求項１に記載の試薬。

【請求項５】

前記サンプルが、血液、血清、尿、精液、および便からなる群より選択される流体である、請求項１に記載の試薬。

【請求項６】
ＴＵＣＡＮポリペプチドのレベルが測定されることを特徴とする、請求項１に記載の試薬。
【請求項７】
ＴＵＣＡＮと特異的に反応する抗体を含む、請求項６に記載の試薬。
【請求項８】
ＴＵＣＡＮ核酸のレベルが測定されることを特徴とする、請求項１に記載の試薬。
【請求項９】
前記患者が、初期病期の結腸癌に罹患している、請求項１に記載の試薬。
【請求項１０】
前記ＴＵＣＡＮのレベルが、前記患者が再発についての危険性を有しているか否かを決定するために使用されることを特徴とする、請求項１に記載の試薬。
【請求項１１】
前記ＴＵＣＡＮのレベルが、前記患者に対する適切な処置過程を決定するために使用されることを特徴とする、請求項１に記載の試薬。
【請求項１２】
結腸癌患者の生存についての予後を決定する試薬であって、該試薬は、
該結腸癌患者由来の結腸癌細胞含有サンプルにおける、ＴＵＣＡＮおよび１つ以上のバイオマーカーのレベルを測定するための、
ＴＵＣＡＮに対する選択的結合剤および／もしくは該１つ以上のバイオマーカーに対する選択的結合剤；
ＴＵＣＡＮと特異的に反応する抗体および／もしくは該１つ以上のバイオマーカーと特異的に反応する抗体；または
ＴＵＣＡＮ遺伝子と相補的な核酸プローブおよび／もしくは該１つ以上のバイオマーカーの遺伝子と相補的な核酸プローブ；
を含み、該１つ以上のバイオマーカーが、以下：ｃＩＡＰ２、Ａｐａｆ１、Ｂｃｌ－２、およびＳｍａｃからなる群より選択され、
ＴＵＣＡＮおよび該１つ以上の選択されたバイオマーカーの参照のレベルと比較した該サンプルにおける、低レベルのＴＵＣＡＮおよび高レベルのＡｐａｆ１、Ｂｃｌ－２またはＳｍａｃのいずれか、あるいは低レベルのＴＵＣＡＮおよび低レベルのｃＩＡＰ２は、該結腸癌患者の増大した生存と相関する、
試薬。
【請求項１３】
前記生存は、前記結腸癌患者が該癌の再発を有するかどうかにかかわらない生存である、請求項１２に記載の試薬。
【請求項１４】
前記生存が、疾患に罹患していない生存である、請求項１２に記載の試薬。
【請求項１５】
ｃＩＡＰ２が、選択されたバイオマーカーである、請求項１２に記載の試薬。
【請求項１６】
Ａｐａｆ１が、選択されたバイオマーカーである、請求項１２に記載の試薬。
【請求項１７】
Ｂｃ１－２が、選択されたバイオマーカーである、請求項１２に記載の試薬。
【請求項１８】
Ｓｍａｃが、選択されたバイオマーカーである、請求項１２に記載の試薬。
【請求項１９】
前記サンプルが、結腸腫瘍組織である、請求項１２に記載の試薬。
【請求項２０】
前記サンプルが、血液、血清、精液、尿、および便からなる群より選択される流体である、請求項１２に記載の試薬。

【請求項２１】
ＴＵＣＡＮポリペプチドまたはバイオマーカーポリペプチドのレベルが測定されることを特徴とする、請求項１２に記載の試薬。
【請求項２２】
ＴＵＣＡＮポリペプチドと特異的に反応する抗体または前記バイオマーカーポリペプチドと特異的に反応する抗体を含む、請求項２１に記載の試薬。
【請求項２３】
ＴＵＣＡＮ核酸またはバイオマーカー核酸のレベルが測定されることを特徴とする、請求項１２に記載の試薬。
【請求項２４】
前記患者が、初期病期の結腸癌に罹患している、請求項１２に記載の試薬。
【請求項２５】
前記ＴＵＣＡＮおよび１つ以上のバイオマーカーのレベルが、前記患者が再発の危険を有するか否かを決定するために用いられることを特徴とする、請求項１２に記載の試薬。
【請求項２６】
前記ＴＵＣＡＮおよび１つ以上のバイオマーカーのレベルが、前記患者に対する適切な処置過程を決定するために用いられることを特徴とする、請求項１２に記載の試薬。
【請求項２７】
ｃＩＡＰ２、Ａｐａｆ１、Ｂｃｌ－２およびＳｍａｃからなる群より選択される２つ以上のバイオマーカーをさらに含む、請求項１２に記載の試薬。
【請求項２８】
結腸癌に罹患した患者に対する処置過程の効果をモニタリングするための試薬であって、該試薬は、
処置の前および後の結腸癌患者由来の結腸癌細胞含有サンプルにおけるＴＵＣＡＮのレベルを決定するための、ＴＵＣＡＮに対する選択的結合剤、ＴＵＣＡＮと特異的に反応する抗体、またはＴＵＣＡＮ遺伝子と相補的な核酸プローブ；
を含み、
該処置前のＴＵＣＡＮレベルと該処置後のＴＵＣＡＮレベルとの比較により、該処置の効果が示されることを特徴とする、
試薬。
【請求項２９】
前記サンプルが、結腸腫瘍組織である、請求項２８に記載の試薬。
【請求項３０】
前記サンプルが、血液、血清、尿、精液、および便からなる群より選択される流体である、請求項２８に記載の試薬。
【請求項３１】
ＴＵＣＡＮポリペプチドのレベルが測定されることを特徴とする、請求項２８に記載の試薬。
【請求項３２】
ＴＵＣＡＮと特異的に反応する抗体を含む、請求項３１に記載の試薬。
【請求項３３】
ＴＵＣＡＮ核酸のレベルが測定されることを特徴とする、請求項２８に記載の試薬。
【請求項３４】
前記患者が、初期病期の結腸癌に罹患している、請求項２８に記載の試薬。
【請求項３５】
結腸癌患者の生存について予後を決定するための試薬であって、該試薬は、
該結腸癌患者由来の結腸癌細胞含有サンプルにおけるＴＵＣＡＮのレベルを測定するための、ＴＵＣＡＮに対する選択的結合剤、ＴＵＣＡＮと特異的に反応する抗体、またはＴＵＣＡＮ遺伝子と相補的な核酸プローブ；
を含み、

低レベルのＴＵＣＡＮを有する第１のグループの患者が、高レベルのＴＵＣＡＮを有する第２のグループの患者と比較して、増大した生存可能性を有するとして分類され得ることを特徴とする、
試薬。
【請求項３６】
前記生存は、前記結腸癌患者が該癌の再発を有するかどうかにかかわらない生存である、請求項３５に記載の試薬。
【請求項３７】
前記生存が、疾患に罹患していない生存である、請求項３５に記載の試薬。
【請求項３８】
前記サンプルが、結腸腫瘍組織である、請求項３５に記載の試薬。
【請求項３９】
前記サンプルが、血液、血清、尿、精液、および便からなる群より選択される流体である、請求項３５に記載の試薬。
【請求項４０】
ＴＵＣＡＮポリペプチドのレベルが測定されることを特徴とする、請求項３５に記載の試薬。
【請求項４１】
ＴＵＣＡＮポリペプチドと特異的に反応する抗体を含む、請求項４０に記載の試薬。
【請求項４２】
ＴＵＣＡＮ核酸のレベルが測定されることを特徴とする、請求項３５に記載の試薬。
【請求項４３】
前記患者が、初期病期の結腸癌に罹患している、請求項３５に記載の試薬。
【請求項４４】
請求項３５に記載の試薬であって、該試薬は、
前記結腸癌患者由来の結腸癌細胞含有サンプル中のｃＩＡＰ２のレベルを決定するための、ｃＩＡＰ２に対する選択的結合剤、ｃＩＡＰ２と特異的に反応する抗体、またはｃＩＡＰ２遺伝子と相補的な核酸プローブ；
をさらに含み、
低レベルのＴＵＣＡＮおよび低レベルのｃＩＡＰ２を有する第１のグループの患者が、高レベルのＴＵＣＡＮおよび高レベルのｃＩＡＰ２を有する第２のグループの患者と比較して、増大した生存可能性を有するとして分類され得ることを特徴とする、
試薬。
【請求項４５】
請求項３５に記載の試薬であって、該試薬は、
前記結腸癌患者由来の結腸癌細胞含有サンプルにおける、Ａｐａｆ１、ＳｍａｃおよびＢｃｌ－２からなる群より選択されるバイオマーカーのレベルを決定するための、該バイオマーカーに対する選択的結合剤、該バイオマーカーと特異的に反応する抗体、または該バイオマーカーの遺伝子と相補的な核酸プローブ；
をさらに含み、
低レベルのＴＵＣＡＮおよび高レベルのＡｐａｆ１、ＳｍａｃまたはＢｃｌ－２のいずれかを有する第１のグループの患者が、高レベルのＴＵＣＡＮおよび低レベルのＡｐａｆ１、ＳｍａｃまたはＢｃｌ－２のいずれかを有する第２のグループの患者と比較して、増大した生存可能性を有するとして分類され得ることを特徴とする、
試薬。
【請求項４６】
請求項２８に記載の試薬であって、該試薬は、
処置前および処置後の前記結腸癌患者由来の結腸癌細胞含有サンプル中のｃＩＡＰ２、Ａｐａｆ１、ＳｍａｃおよびＢｃｌ－２からなる群より選択されるバイオマーカーのレベルを決定するための、該バイオマーカーに対する選択的結合剤、該バイオマーカーと特異

的に反応する抗体、または該バイオマーカーの遺伝子と相補的な核酸プローブ；
をさらに含み、
処置前の該選択されたバイオマーカーおよびＴＵＣＡＮのレベルが、該処置の効果を示すために、処置後の該選択されたバイオマーカーおよびＴＵＣＡＮのレベルと比較され得ることを特徴とする、
試薬。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、国立衛生研究所により授与された、助成金番号ＡＧ１５４０２、ＣＡ６９３８１、およびＮＳ３６８２１の下の政府の補助を用いてなされた。合衆国政府は、本発明において特定の権利を有する。
【背景技術】
【０００２】
（発明の背景）
本発明は、一般に、癌、より詳細には、癌の診断または予後のために用いられ得るバイオマーカーに関する。
【０００３】
癌は、毎年、診断される１００万人より多くの人、ならびに彼等の家族および友人に根深く影響する、主要な公衆衛生上の問題のままである。米国の人々が、成長し、そして年をとるにつれて、より多くの人々が、癌に罹患する。癌を早期に検出するためのスクリーニング試験の使用は、しばしば、より副作用の少ない、より効果的な処置を導く。早期に癌が見出された患者はまた、症状が現れるまで癌が見出されなかった患者よりも、これらの癌により死亡する確率が低いようである。
【０００４】
１つの型の癌のスクリーニング試験は、患者から得られた流体または組織中のバイオマーカー（例えば、腫瘍マーカー）の検出を含む。腫瘍マーカーは、癌細胞により産生される物質であって、代表的には正常な細胞により産生されない物質である。これらの物質は、一般的に、癌に罹患した患者の体液または組織において検出され得る。不幸なことに、いくつかの腫瘍マーカーはまた、癌に罹患していない人の体液または組織において有意な量で検出され得、このことは、特定のマーカーを、診断について信頼性の低いものにする。それにも関らず、腫瘍マーカーは、癌を診断するための重要なツールのままである。
【０００５】
腫瘍マーカーについての別の重要な使用は、進行した癌について処置されている患者をモニタリングするための使用である。この目的のために腫瘍マーカーを測定することは、治療が、癌を減少させているか否かを決定するために、胸部Ｘ腺、コンピューター断層撮影（ＣＴ）スキャン、骨のスキャン、または他の複雑な試験を繰り返すより侵襲性が低く、より時間がかからず、かつより費用がかからないものであり得る。
【０００６】
腫瘍マーカーについてのさらなる重要な使用は、癌患者の生存の予後を決定するための使用である。そのような予後方法は、外科的処置された患者にさらなる治療的選択が与えられ得るように、癌の再発を経験する可能性のある患者を特定するために用いられ得る。生存の予後のために有用なバイオマーカーはまた、検査または手術のときに測定可能な転移を示していない患者における転移の危険性を決定するために特に有効であり得る。癌患者における転移の可能性の知見は、処置の選択肢の選択における重要な因子であり得る。例えば、転移を経験する可能性がある癌患者は、特に攻撃的な様式を用いて有利に処置され得る。
【発明の開示】
【発明が解決しようとする課題】
【０００７】

従って、癌のための診断指標または予後指標として用いられ得るバイオマーカーを同定する必要性が存在する。本発明は、この必要性を満たし、そして関連する利点も提供する。

【課題を解決するための手段】

【０００８】

（発明の要旨）

本発明は、癌患者の生存についての予後を決定するための方法を提供する。１つの方法は、以下：（ａ）癌患者由来の新生物細胞含有サンプルのＴＵＣＡＮのレベルを測定する工程、および（ｂ）サンプル中のＴＵＣＡＮのレベルと、参照のＴＵＣＡＮのレベルとを比較する工程を包含し、ここで、サンプル中の低レベルのＴＵＣＡＮは、患者の増大した生存と相関する。

【０００９】

癌患者の生存についての予後を決定するための別の方法は、以下：（ａ）癌患者由来の新生物細胞含有サンプルにおける、ＴＵＣＡＮおよび１つ以上のバイオマーカーのレベルを測定する工程であって、１つ以上のバイオマーカーが、ｃＩＡＰ２、Ａｐａｆ１、Ｂｃｌ－２、およびＳｍａｃからなる群より選択される工程、ならびに（ｂ）サンプル中のＴＵＣＡＮおよび１つ以上の選択されたバイオマーカーのレベルと、ＴＵＣＡＮおよび１つ以上の選択されたバイオマーカーの参照のレベルとを比較する工程を包含し、ここでサンプル中の低レベルのＴＵＣＡＮおよび高レベルのＡｐａｆ１、Ｂｃｌ－２またはＳｍａｃのいずれか、あるいは低レベルのＴＵＣＡＮおよび低レベルのｃＩＡＰ２は、該患者の増大した生存に対応する。

【００１０】

癌患者の生存についての予後を決定するさらなる方法は、以下：（ａ）該癌患者由来の新生物細胞含有サンプルにおけるＴＵＣＡＮのレベルを測定する工程、および（ｂ）患者を、第１のグループの患者または第２のグループの患者のいずれかに属するとして分類する工程であって、低レベルのＴＵＣＡＮを有する第１のグループの患者が、高レベルのＴＵＣＡＮを有する第２のグループの患者よりも、増大した生存可能性を有するとして分類される、工程を包含する。

【００１１】

本発明はまた、癌を有する患者の処置経過の有効性をモニタリングするための方法を提供する。この方法は、（ａ）処置の前の癌患者由来の新生細胞含有サンプル中のＴＵＣＡＮレベルを決定する工程、および（ｂ）処置後の患者由来の新生細胞含有サンプル中のＴＵＣＡＮレベルを決定し、それにより、処置前のＴＵＣＡＮレベルと処置後のＴＵＣＡＮレベルとの比較によって処置の有効性を示す工程を包含する。

【００１２】

（発明の詳細な説明）

本発明は、タンパク質を含有するＣＡＲＤドメイン（ＰＣＴ公開　ＷＯ０１／１６１７０中でＣＡＲＤ－Ｘとして公知である）、ＴＵＣＡＮ（カスパーゼ９の腫瘍アップレギュレートＣＡＲＤ含有アンタゴニスト（Ｔｕｍｏｒ　Ｕｐ－ｒｅｇｕｌａｔｅｄ　ＣＡＲＤ－ｃｏｎｔａｉｎｉｎｇ　Ａｎｔａｇｏｎｉｓｔ　ｏｆ　Ｃａｓｐａｓｅ　Ｎｉｎｅ））の発現が、独立してかまたは他のバイオマーカーと組み合わせて、癌を有する患者についての臨床的な結果を効果的に予測するために使用され得るという知見に関する。

【００１３】

本発明の予後診断法は、患者が再発のおそれにある場合の測定のために有用である。癌再発は、種々の型の癌に関連する懸念である。例えば、結腸癌の外科的除去を受けた患者のうち、第ＩＩ病期の結腸癌を有する患者の２５％～４０％、および第ＩＩＩ病期の結腸癌を有する患者の約５０％が、癌の再発を経験する。癌の再発についての１つの説明は、比較的初期段階の疾患（例えば、第ＩＩ病期または第ＩＩＩ病期）を有する患者は、すでに手術によって除去されなかった、罹患した臓器の外側に広がった少量の癌を有しているということがある。これらの癌細胞は、微小転移巣と呼ばれ、現在利用可能である試験で

は一般的には検出し得ない。本発明の予後診断法は、癌再発しそうな外科的に処置された患者を同定するために使用され得、その結果、化学療法、照射、生物学的改変剤および他の適切な治療法のような手術前または手術後の補助を含む、さらなる治療オプションを提供し得る。この方法は、試験または手術のときに、測定可能な転位を示さない患者における転位の危険性を測定するために特に有効である。

【００１４】

本発明の予後診断法はまた、癌を有する患者のための適切な処置工程を決定するために有用である。処置工程とは、診断後または癌の処置後の患者のために行なわれる治療測定のことをいう。例えば、癌の再発、拡散、または患者生存についての可能性の決定は、治療に対してより保存的もしくはより根治的アプローチが行なわれるべきか否か、または処置様式が組み合わせられるべきか否かを決定するのを助け得る。例えば、癌再発が起こりそうな場合、化学療法、照射、免疫療法、生物学的改変剤療法、遺伝子治療、ワクチンなどによる手術前の処置もしくは手術後の処置、または患者が処置される時間幅を調節するのに有利であり得る。

【００１５】

本明細書中の実施例ＩＩおよびＶＩＩＩに開示されるように、高められたレベルのＴＵＣＡＮは、それぞれ、結腸腫瘍試料の４９％および６４％で見出された。単変量解析を使用して、より長期の疾患に罹患していない生存（ＤＦＳ）とＴＵＣＡＮの低い発現（ｐ＝０．０００４）との間の有意な相関を測定した。実施例ＩＶに示されるように、腫瘍が低レベルのＴＵＣＡＮを含んでいる患者の７８％（５０人中３９人）は、このタンパク質の高い発現を有する患者においては４４％（４８人中２１人）のみであるのに比べ、この研究によってカバーされる時間の間、生存しかつ疾患を有さないままであった。実施例ＶＩＩはまた、ＴＵＣＡＮ免疫染色が、生存していた患者と比べて、結腸癌で死亡した患者においてより有意に高いことを示す。

【００１６】

実施例ＩＶに示されるように、５年間のメジアンの追跡において、ＴＵＣＡＮの高い発現を有する患者の４９％は、結腸癌の再発を有するかまたは結腸癌によって死亡し、そして腫瘍がこのタンパク質を低レベルで発現する患者のグループにおいては、１９％のみが再発し
４％が疾患で亡くなった。多変量解析は、高いＴＵＣＡＮの存在が、結腸癌に由来する死の危険性を１７倍増加させたことを示した（ｐ＝０００００４）。従って、癌を有する患者由来のサンプル中の高レベルのＴＵＣＡＮは、腫瘍転位の増加された可能性および減少された生存に関連する。同様に、癌を有する患者由来のサンプル中の低レベルのＴＵＣＡＮは、腫瘍転位の減少された可能性および生存の増加された可能性に関連する。

【００１７】

低レベルのｃＩＡＰ２および低レベルのＴＵＣＡＮの組み合わせが、非常に都合よい結果を有する初期段階の結腸癌のサブグループを同定したことがまた、本明細書中で開示される。同齢集団の９２人の患者中の約３分の１の患者が、低レベルのｃＩＡＰ２および低レベルのＴＵＣＡＮの組み合わせを有していた（３３／９２（３６％））。これらの３３人の患者のうち、３２人（９７％）が生存し、かつ３０人（９１％）が本研究によって対象とされる時間において疾患を有さなかったが、これとは対照的に、他のカテゴリーでは、５６％が生存し、４４％が疾患を有さなかった。同様に、同齢集団の８１人の患者中の１７人が、高レベルのＡｐａｆ１発現および低レベルのＴＵＣＡＮ発現の組み合わせを有した。高レベルのＡｐａｆ１発現および低レベルのＴＵＣＡＮ発現を特徴とする全ての患者（１７人）は、この特徴によって特徴付けられなかった患者については６５％（８１人中５３人）のみが生存しかつ５３％（８１人中４３人）で再発しなかったこと比べ、この調査の終わりにおいても生存しかつ再発も有さなかった。従って、癌を有する患者由来のサンプル中の高レベルのｃＩＡＰ２または低レベルのＡｐａｆ１と組み合わせた高レベルのＴＵＣＡＮは、腫瘍転位の増加された可能性および生存の減少された可能性に関連する。それに対して、低レベルのｃＩＡＰ２または高レベルのＡｐａｆ１と組み合わせた低レ

ベルのＴＵＣＡＮは、腫瘍転位の減少された可能性および生存の増加された可能性に関連する。

【００１８】

これらの結果に基づいて、本発明は、新生物状態の診断、癌に罹患している患者の生存の予知、およびバイオマーカーとしてＴＵＣＡＮを使用する癌の段階の決定のための方法を提供する。ＴＵＣＡＮは、単独でかまたは癌に罹患している患者の生存を予知するための特異的バイオマーカーのような他の予知インディケーターと組み合わせて使用され得る。

【００１９】

本明細書中に開示されるように、Ａｐａｆ１、サルビビン（Ｓｕｒｖｉｖｉｎ）、ＸＩＡＰ、ｃＩＡＰ１、およびｃＩＡＰ２の高められたレベルが、それぞれ結腸腫瘍試料の３８％、５４％、７４％、６１％および３５％において見出された。単変量解析を使用して、より長い疾患に罹患していない生存（ＤＦＳ）と、ｃＩＡＰ２（ｐ＝０．０００２）、β－カテニン（ｐ＝０．０４）、変異ｐ５３タンパク質（ｐ＝０．０３）の低レベルの発現との間、またはより長い疾患に罹患していない生存（ＤＦＳ）Ａｐａｆ１（ｐ＝０．０００８）、Ｂｃｌ－２（ｐ＝０．００５）、およびＳＭＡＣ（ｐ＝０．０３）の高レベルの発現突然変異誘発との間の優位な相関を決定した（図４ａを参照のこと）。従って、腫瘍が低レベルのＴＵＣＡＮを含んでいる患者の７８％（５０人中３９人）は、このタンパク質の高レベルの発現を有する患者の４４％（４８人中２１人）と比べ、この研究によって対象とされる時間の間、生存したままでありかつ疾患を有さなかった。同様に、高いｃＩＡＰ２レベルを有する患者において３６％（３３人中１２人）のみ癌を有していなかったが、低レベルのｃＩＡＰ２発現者（ｅｘｐｒｅｓｓｏｒ）のうちの７４％（６１人中４５人）が、この調査の終わりに癌を有していなかった。５年間のメジアンの追跡において、高いｃＩＡＰ２レベルを有する患者の６０％が再発し、そして４６％が結腸癌によって死亡した。それに対して低レベルのｃＩＡＰ２グループにおいては、２０％が再発し、１８％が結腸癌に関連して死亡した。

【００２０】

本明細書中でさらに開示されるように、高レベルのＡｐａｆ１はより長い生存に関連し、低レベルのＡｐａｆ１発現を有する患者において６２人中２８人（４５％）しか疾患を有さなかったが、結腸癌患者の３８人中３３人（８７％）が疾患を有さないままであった。対照的に、低レベルのＡｐａｆ１を有する患者のうちの４３％が再発し、そして３５％が結腸癌によって死亡した。一方、１４％のみが、高レベルのＡｐａｆ１同齢集団において癌再発を有するかまたは死亡した。低レベルのＢｃｌ－２もまた、乏しい全体としての生存と関連した。高レベルのＢｃｌ－２グループにおいて死亡した患者においては２４％（７６人中１８人）が結腸癌によって死亡したのに対し、このタンパク質の低い発現を有する１８人の患者のうちの１１人（６１％）が結腸癌によって死亡した。同様に、腫瘍が低レベルのＡｐａｆ１染色を含む患者は、Ｂｃｌ－２を過剰発現した患者と比較してより悪い全生存を有した（図１Ｎ）。多変量解析は、高レベルのＡｐａｆ１およびＢｃｌ－２発現が、７５％（ｐ＝０．００４）および８２％（ｐ＝０．００００６）の差をつけた、結腸癌による死の減少に関連することを示した。従って、結腸癌を有する患者由来のサンプル中の、減少されたレベルのＡｐａｆ１またはＢｃｌ－２は、腫瘍転位の増加された発生率および減少された生存数に確実に関連する。

【００２１】

低レベルのｃＩＡＰ２および高レベルのＡｐａｆ１の組み合わせが、非常に都合よい結果を有する初期段階の結腸癌患者のサブグループを同定したという観測がまた、本明細書中で開示される。分析された腫瘍のうちの約４分の１（２５／９４（２７％））が、低レベルのｃＩＡＰ２および高レベルのＡｐａｆ１両方を含んだ。これらの２５人の患者のうち、２５人全てが、術後、調査の終わりにおいて（５年間のメジアン追跡）生存したままでありかつ疾患を有さなかった。従って、他の分類の患者についてそれぞれ５０％および６４％のみであったのに比べ、このグループの患者についての５年間のメジアンが疾患を

有さず全体として生存している比率は、１００％であった。従って、結腸癌を有する患者由来のサンプル中の増加されたレベルのｃＩＡＰ２および減少されたレベルのＡｐａｆ１は、腫瘍転位の増加された機会および減少された生存に関連する。

【００２２】

本明細書中で使用される場合、用語「レベル」は、ＴＵＣＡＮのようなバイオマーカー分子の量、集積量または比率をいう。レベルは、例えば、遺伝子によってコードされるメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）の量もしくは合成比、遺伝子によってコードされる所定のアミノ酸配列に対応するポリペプチドの量もしくは合成比、または細胞中で集積された分子の生物化学形態の量もしくは合成比によって表され得、例えば、ポリペプチド、核酸もしくは低分子の特定の合成後改変の量を含む。この用語は、サンプル中の分子の絶対量または分子の相対量をいうために使用され得るこれらの量としては、定常状態または非定常状態条件下で決定された量を含む。分子の発現レベルは、サンプル中のコントロール分子と比較して決定され得る。

【００２３】

ＴＵＣＡＮ　ｍＲＡＮまたはポリペプチドに関して使用される場合、レベルという用語は、配列番号１に示される核酸配列もしくは配列番号２に示されるＴＵＣＡＮポリペプチド、または実質的に同一であるヌクレオチド配列もしくはアミノ酸配列の合成の、程度、量または比率をいう。ＴＵＣＡＮの核酸配列およびアミノ酸配列もまた、ＰＣＴ公開ＷＯ０１／１６１７０に記載され、これは、本明細書中に参考として援用される。ｃＩＡＰ２　ｍＲＮＡまたはポリペプチド発現に関して使用される場合、レベルという用語は、配列番号５に示される核酸配列もしくは配列番号６に示されるＣＩＡＰ２ポリペプチド、または実質的に同一のヌクレオチドもしくはアミノ酸配列の合成の、程度、量、または比率のことをいう。β－カテニン　ｍＲＮＡまたはポリペプチドに関して使用される場合、レベルという用語は、配列番号７に示される核酸配列もしくは配列番号８に示されるβ－カテニンポリペプチド、または実質的に同一であるヌクレオチド配列もしくはアミノ酸配列の合成の、程度、量または比率をいう。Ａｐａｆ１　ｍＲＮＡまたはポリペプチドに関して使用される場合、レベルという用語は、配列番号９に示される核酸配列もしくは配列番号１０に示されるＡｐａｆ１ポリペプチド、または実質的に同一であるヌクレオチド配列もしくはアミノ酸配列の合成の、程度、量または比率をいう。Ｂｃｌ－２　ｍＲＮＡまたはポリペプチドに関して使用される場合、レベルという用語は、配列番号１１に示される核酸配列もしくは配列番号１２に示されるＢｃｌ－２ポリペプチド、または実質的に同一であるヌクレオチド配列もしくはアミノ酸配列の合成の、程度、量または比率をいう。Ｓｍａｃ　ｍＲＮＡまたはポリペプチドに関して使用される場合、レベルという用語は、配列番号１３に示される核酸配列もしくは配列番号１４に示されるＳｍａｃポリペプチド、または実質的に同一であるヌクレオチド配列もしくはアミノ酸配列の合成の、程度、量または比率をいう。これらおよび癌の他のバイオマーカー（ＸＩＡＰ、ｃＩＡＰ１、サルビビン、Ｂｃｌ－ＸＬ、Ｂａｘ、ＢＡＧ１、変異ｐ５３、ｐ５３およびＭＩＢ－１を含む）のレベルは、遺伝子発現レベルまたはポリペプチド発現レベルであり得る。

【００２４】

参照アミノ酸として実質的に同一のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列は、参照アミノ酸配列に対して、かなりの程度の配列同一性または類似性（例えば、少なくとも７０％、８０％、９０％、９５％、９８％、または１００％の配列同一性または類似性）を含む。このような変化、ギャップ、および挿入は、天然に存在する変異であり得るかまたはポリペプチドを含むサンプルのプロセシングから生じ得る。参照ヌクレオチド配列と実質的に同一であるヌクレオチド配列は、参照ヌクレオチド配列に対して、かなりの程度の配列同一性または類似性（例えば、少なくとも７０％、８０％、９０％、９５％、９８％、または１００％の配列同一性または類似性）を含む。このような差異は、遺伝子の変異および多型のような個体間の遺伝性差異に起因し得る。ヌクレオチドとアミノ酸配列との間の差異は、Ｓｍｉｔｈ－ＷａｔｅｒｍａｎアルゴリズムおよびＢＬＡＳＴホモロジー検索プログラム（Ａｌｔｓｃｕｌら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２１５：４０３－４１０（１９９０

））のような入手可能なアルゴリズムおよびプログラムを使用して決定し得る。

【００２５】

分子の遺伝子発現レベルは、バイオマーカー遺伝子の合成の、量、集積または比率を意味することが意図される。この遺伝子発現レベルは、例えば、遺伝子によってコードされるｈｎＲＮＡまたはｍＲＮＡの量または転写比によって表され得る。遺伝子発現レベルは、同様に、例えば、定常状態または非定常状態条件下で、測定された集積量もしくは相対量または合成比をいう。

【００２６】

ポリペプチド発現レベルは、バイオマーカーポリペプチドの合成の、量、集積または比率を意味することが意図される。このポリペプチド発現レベルは、例えば、ポリペプチド、ポリペプチドの前駆体形態またはポリペプチドの翻訳後修飾形態によってあらわされ得る。合成後修飾から生じたポリペプチドの種々の生物化学形態は、サンプル中に含まれる細胞中に存在し得る。このような修飾としては、翻訳後修飾、タンパク質分解、高分子複合体の形成が上げられる。ポリペプチドの翻訳後修飾としては、例えば、リン酸化、脂質化、プレニル化、硫酸化、ヒドロキシル化、アセチル化、炭水化物の添加、補欠分子族または補因子の添加、ジスルフィド結合の形成などが挙げられる。さらに、ポリペプチドのフラグメントは、ポリペプチド発現レベルの定義内に含まれることが理解される。フラグメントとしては、例えば、アミノ末端、カルボキシ末端、または全長ポリペプチドの内部欠失が挙げられ得る。このような修飾を伴うかまたは伴わない集積または合成比は、この用語の意味に含まれる。同様に、ポリペプチド発現レベルはまた、例えば、定常状態または非定常状態条件下で測定されたポリペプチドの絶対量または合成比をいう。

【００２７】

本明細書中で使用される場合、用語「参照レベル」は、患者の新生細胞含有サンプル中のバイオマーカーの発現の試験レベルを評価するために使用されるバイオマーカーのコントロールの発現レベルをいう。例えば、患者の新生細胞中のＴＵＣＡＮのレベルが、ＴＵＣＡＮの参照レベルよりも高い場合、この細胞は、ＴＵＣＡＮの高レベルの発現または過剰産生を有していると考えられる。逆に、患者の新生細胞中のＴＵＣＡＮレベルが参照レベルよりも低い場合、この細胞は、ＴＵＣＡＮの低レベルの発現または生産不足を有していると考えられる。

【００２８】

参照レベルを複数の方法によって決定し得る。ただし、得られた参照レベルは生物マーカーのレベルを正確に提供し、そのレベルよりも高くに第１のグループの患者が存在し、この第１のグループの患者は、参照レベル未満の生物マーカーレベルを有する第２のグループの患者の生存率とは異なる生存確率を有する。この参照レベルは、例えば、試験される新生物細胞の組織と同じ組織由来の非腫瘍性癌細胞における生物マーカーの発現レベルを測定することによって、決定され得る。参照レベルはまた、インビトロ培養細胞の生物マーカーのレベルでもあり得、これらは、腫瘍細胞を刺激するように操作され得るか、または参照レベルを正確に決定する発現レベルを生じる任意の他の様式で、操作され得る。

【００２９】

参照レベルはまた、同じ癌を患う患者集団において、生物マーカー（例えば、ＴＵＣＡＮ）のレベルの比較によっても決定され得る。このことは、例えば、患者の全体のコホートが図で示されるヒストグラム分析によって達成され得、ここで、第１軸は生物マーカーのレベルを示し、そして第２軸は、新生物細胞が所定のレベルで生物マーカーを発現しているコホートにおける患者数を示す。患者の２つ以上の別個の群は、同じレベルまたは類似のレベルの生物マーカーを有するコホートの集団の部分集合の同定によって決定され得る。次いで、参照レベルの決定が、これらの別個の群を最良に区別するレベルに基づいて、なされ得る。参照レベルはまた、２つ以上のマーカーのレベルを示し得る。２つ以上のマーカーは、例えば、各々の生物マーカーのレベルに対する値の比率によって示され得る。

【００３０】

参照レベルは、あらゆる患者に等しく適用可能な１つの数であり得るか、または参照レベルは患者の特定の部分集団に従って変動し得る。例えば、高齢の男性は、同じ癌に対して、若年の男性とは異なる参照レベルを有し得、そして女性は同じ癌に対して男性とは異なる参照レベルを有し得る。さらに、参照レベルは、各々の患者それぞれに対して決定される、いくつかのレベルであり得る。例えば、この参照レベルは、同一患者中の非腫瘍細胞における生物マーカーレベルに対する、患者の新生物細胞中の生物マーカーの特定の比率であり得る。従って、各患者に対する参照レベルは、１つ以上の生物マーカー（例えば、ＴＵＣＡＮ）の参照比率によって規定され得、ここで、参照比率は、本明細書中に記載される参照レベルを決定するための任意の方法によって、決定され得る。

【００３１】

本明細書中で使用される場合、用語「新生物細胞」とは、形質転換されて、その結果、正常な恒常性の増殖制御を有さずに増殖する、任意の細胞をいう。このような細胞は、増殖細胞の良性または悪性の病変を結果として生じ得る。このような病変は、生体の種々の組織および器官に局在され得る。以下の表１は、新生物細胞が誘導され得る例示的な型の癌の一覧表を提供する。

【００３２】

本明細書中で使用される場合、用語「癌」とは、異常な細胞の制御されない増殖によって特徴付けられる疾患のクラスを意味することが意図され、悪性腫瘍として特徴付けれるにせよ、良性腫瘍として特徴付けれるにせよ、軟組織性腫瘍として特徴付けれるにせよ、固形物性腫瘍として特徴付けれるにせよ、公知の全ての癌および新生物状態の全てを含む。特定の癌としては、消化性癌および胃腸癌（例えば、肛門癌、胆管癌、胃腸類癌腫、結腸癌、食道癌、胆嚢癌、肝臓癌、膵臓癌、直腸癌、虫垂癌、小腸癌、および胃癌）；乳癌；卵巣癌；肺癌；腎臓癌；ＣＮＳ癌；白血病ならびに黒色腫が挙げられる。例示によって、公知の癌の一覧表は以下の表１に提示される。

【００３３】

【表１－１】

表１：癌細胞の型

（血球系新生物）

リンパ球新生物

骨髄性新生物

組織球増殖

Ｂリンパ芽球前駆体白血病／リンパ腫（全て）

Ｔリンパ芽球前駆体白血病／リンパ腫（全て）

慢性リンパ球性白血病／小リンパ慢性リンパ腫（SLL）

リンパ芽球性リンパ腫

マントル細胞リンパ腫

濾胞状リンパ腫

辺縁層リンパ腫

毛様細胞白血病

プラスマ細胞腫／プラズマ細胞骨髄腫

びまん性巨大Ｂ細胞リンパ腫

バーキットリンパ腫

Ｔ細胞慢性リンパ球性白血病

巨大顆粒性リンパ球性白血病

菌状息肉腫およびセザリー症候群

末梢Ｔ細胞リンパ腫、未特定

血管免疫芽球性Ｔ細胞リンパ腫

血管中心（angiocentric）リンパ腫（NK/T細胞リンパ腫）

腸管Ｔ細胞リンパ腫

成人Ｔ細胞白血病／成人Ｔ細胞リンパ腫

未分化巨大細胞リンパ腫

ホジキン病(HD)

急性骨髄性白血病（AML）

脊髄形成異常症

慢性骨髄増殖性（myclofroliferative）障害

慢性骨髄性白血病（CML）

真性赤血球増加症

本態性血小板増加症

骨髄様化生を伴う骨髄線維症

血管腫

リンパ管腫

グロムス血管腫

カポシ肉腫

血管内皮腫（hemanioendothelioma）

血管肉腫

血管周囲細胞腫

（頭部および頸部）

基底細胞癌

扁平上皮癌

耳垢腺腫瘍

骨腫

非クロム親和性パラガングリオーマ

聴神経鞘腫

アデノイド嚢胞癌

粘液性類表皮癌

悪性混合腫瘍

腺癌

リンパ腫

線維肉腫

骨肉腫

軟骨肉腫

黒色腫

嗅覚神経芽細胞腫

孤立性プラスマ細胞腫（plasmocytoma）

内反乳頭腫

未分化の癌

【００３４】

【表１－２】

粘液性類表皮癌
小葉癌
悪性混合腫瘍
他の癌
アメノブラストーマ（amenoblastoma）
歯牙腫

（胸腺）
悪性胸腺腫Ｉ型（浸潤性胸腺腫）
悪性胸腺腫ＩＩ型（胸腺癌）
扁平上皮癌
上皮腫

（肺）
扁平上皮癌
腺癌
腺房状；乳頭状；固形状の気管支
気管支肺胞（bronchioalveolar）
小細胞癌
燕麦細胞癌
中間体細胞癌
未分化の巨大細胞癌
；肥大細胞；明細胞
悪性中皮腫
肉腫様（sarcomotioid）型
上皮型

（胃腸管）
扁平上皮癌
腺癌
カルチノイド
悪性黒色腫
腺癌
胃癌
胃リンパ腫
胃間質細胞腫瘍
リンパ腫
カポシ肉腫
内部間質細胞
カルチノイド（carcinid）
悪性中皮腫（mesethelioma）
非ムチン産生性腺癌

（肝臓および胆管）
肝細胞癌
胆管癌
胚芽細胞腫
血管肉腫
線維芽細胞腫
胆嚢癌
腺癌
乳頭状で、ほとんど分化していない扁平上皮癌

（膵臓）
腺癌
嚢胞性腺癌
インスリノーマ
ガストリノーマ
グルカゴノーマ

（腎臓）
腎臓細胞癌
腎芽細胞腫（ウィルムス腫瘍）

【００３５】

【表１－３】

（下部尿路）
尿路上皮（urothelial）癌
扁平上皮癌
混合癌
腺癌
小細胞癌
肉腫

（男性の生殖管）
扁平上皮癌
肉腫(sarcinoma)
精母細胞肉腫（speretocytic sarcinoma）
胎生期癌（embyonal carcinoma）
絨毛癌
奇形腫
ライディヒ細胞腫瘍
セルトーリ細胞腫瘍
リンパ腫
腺癌
未分化前立腺癌
腺管移行性癌

（女性の生殖管）
扁平上皮癌
基底細胞癌
黒色腫
線維肉腫
上皮細胞間腫瘍(intaepithelial carcinoma)
胎児性腺癌
横紋筋腫（rhabdomysarcoma）
巨大細胞癌
神経内分泌細胞癌または燕麦細胞癌
腺癌
腺扁平上皮癌
未分化の癌
癌
腺棘細胞腫
肉腫
癌性肉腫
平滑筋腫
子宮内膜間質部肉腫
漿液性嚢胞腺腫
粘液性癌腫
類内膜腫瘍
腺肉腫
腹細胞腫瘍（celioblastoma）（ブレンナー腫）
明細胞癌
未分類癌
顆粒膜細胞腫
セルトリーライディヒ細胞腫瘍
未分化胚細胞腫
奇形腫

（乳房）
葉状腫瘍
肉腫
パジェット病
癌
インサイチュの癌
浸潤癌

（内分泌系）
腺腫
癌

【００３６】

【表１－４】

髄膜腫（meningnoma）
頭蓋咽頭腫（cramiopharlingioma）
乳頭状癌
濾胞状癌
髄様癌
未分化細胞（anoplastic）癌
腺腫
癌
褐色細胞腫
神経芽細胞腫（neuroblastome）
パラガングリオーマ
松果体
松果体芽細胞腫
松果体腫

（皮膚）
黒色腫
扁平上皮癌
基底細胞癌
メルケル細胞癌
乳房外（extramamary）パジェット病
乳頭パジェット病
カポシ肉腫
皮膚Ｔ細胞リンパ腫

（骨、関節および軟組織の腫瘍）
多発性骨髄腫
悪性リンパ腫
軟骨肉腫
間葉軟骨肉腫
骨肉腫
ユーイング腫瘍（ユーイング肉腫）
悪性巨細胞腫
アダマンチノーム
悪性線維
組織球腫
類腱線維腫
線維肉腫
脊索腫
血管内皮腫
血管周囲細胞腫（memangispericytoma）
脂肪肉腫
悪性線維
組織球腫
横紋筋肉腫（rhabdomysarcoms）
平滑筋肉腫
血管肉腫

（神経系）
神経鞘腫
神経線維腫
悪性末梢神経
鞘腫瘍（sheath tumor）
神経膠星状細胞腫
線維性神経膠星状細胞腫
グリア芽細胞腫多形態（multiforme）
脳幹グリオーム
重細胞性（pilocytic）神経膠星状細胞腫
多形態性の黄色星状膠細胞腫（xanthorstrocytoma）
乏突起神経膠腫
脳室上衣細胞腫
神経節細胞腫
大脳神経芽細胞腫

【００３７】

【表１－５】

中枢神経細胞腫

非胚形成性神経上皮腫瘍（dysembryoplastic neuroepithelial tumor）

髄芽細胞腫

悪性髄膜腫

原始脳胞リンパ腫

原始脳胞胚細胞腫瘍

（眼）

癌

扁平上皮癌

粘液性類表皮癌

黒色腫

網膜芽細胞腫

グリオーム

髄膜腫

（心臓）

粘液腫

線維腫

脂肪腫

乳頭状弾力線維腫（fibroelastoma）

横紋筋腫（rhasdoyoma）

血管肉腫

他の肉腫

（組織球増殖症）

ランゲルハンス細胞

組織球増殖症

。

【００３８】

本明細書中で使用される場合、用語「特異的に反応性な」とは、抗体に関して使用される場合、指示される標的ポリペプチドに対する、抗体の識別力ある結合をいう。このような識別性であるべき結合のため、抗体は実質的に他のポリペプチドと交差反応しない。特異的な反応性は、結合特異性、結合親和力（アフィニティー）および結合親和力（アビディティー）のような結合特性を含み得る。例えば、抗体は、約10^{-4}M以上、10^{-6}M以上、10^{-7}M以上、10^{-8}M以上、10^{-9}M以上、または10^{-10}M以上の

結合親和性（Ｋｄ）で、標的ポリペプチドを結合し得る。抗体の結合を検出または測定するためのいくつかの方法は、当該分野で公知であり、そして本明細書中において開示される。

【００３９】

本明細書中で使用される場合、用語「サンプル」とは、任意の生物学的流体、細胞、組織、器官またはそれらの一部を意味することが意図され、これは、新生物細胞（例えば、結腸、直腸、乳房、卵巣、前立腺、腎臓、肺、血液、脳、または新生物細胞を含むかもしくは含むことが推測される他の器官もしくは組織に由来の細胞）を包含するか、または潜在的に包含する。この用語は、個体中に存在するサンプル、および個体から獲得されるかまたは個体に由来するサンプルを包含する。例えば、サンプルは生検によって獲得された試料の組織学的切片であり得るか、または組織培養中に置かれるかもしくは組織培養に適合される細胞であり得る。サンプルはさらに、亜細胞画分もしくは亜細胞抽出物であり得るか、または粗製もしくは実質的に純粋な核酸分子もしくはタンパク質調製物であり得る。

【００４０】

本明細書中で使用される場合、用語「疾患に罹患していない生存」とは、腫瘍の再生および／または蔓延のないこと、および診断後の患者の運命（例えば、腫瘍の再発なしに生存している患者）をいう。語句「全体的な生存率」とは、その患者が腫瘍の再発を有するかどうかにかかわらず、診断後の患者の運命をいう。

【００４１】

本明細書中で使用される場合、用語「再発危険性」とは、癌の診断後の患者における、腫瘍の再発または蔓延の可能性をいい、ここで、この可能性は本発明のプロセスに従って決定される。

【００４２】

腫瘍再発は、癌の診断後、新生物細胞または癌性細胞のさらなる増殖をいう。特に、再発とは、癌性組織においてさらなる癌性細胞の増殖が生じる場合に生じ得る。腫瘍の蔓延とは、例えば腫瘍転移の間の、癌細胞の局所的な組織および器官、または離れた組織および器官への播種をいう。腫瘍の再発、特に転移は、癌に対する外科手術処置を受けた患者の中での死亡率の重要な原因である。従って、腫瘍の再発または蔓延は、疾患のない患者の生存率および患者の全体的な生存率と相関関係付けられる。

【００４３】

本発明は、癌患者に対して、生存率を予測するため、そして処置の効力をモニターするための生物マーカーとしてのＴＵＣＡＮの使用に関する。ＴＵＣＡＮは、アポトーシスを制御する役割を有する、ＣＡＲＤドメイン含有タンパク質である。アポトーシスは、本質的に全ての自己再生する組織において、細胞の形成と細胞の更新との間で恒常性が維持されることを確実とする、生理学的プロセスである。組織の恒常性の維持に加えて、アポトーシスはまた、種々の外部からの刺激（増殖因子除去、カルシウムレベルの変化、フリーラジカル、細胞傷害性リンホカイン、いくつかのウイスルによる感染、照射および大部分の化学療法剤が挙げられる）に応答して生じる。従って、アポトーシスは、例えば、代謝経路において生じる制御機構と同様な制御機構に供されるようである、誘導性の事象である。このことに関して、アポトーシスの非制御はまた、例えば、対応する正常細胞よりも長時間生存するいくつかの型の癌細胞において、そして成熟前にニューロンが死滅する神経変性疾患において、生じ得、そして観察される。ウイルス感染において、アポトーシスの誘導は、疾患のプロセスの病理生理学において顕著に現れ得る。何故なら、ウイルス感染の免疫ベースの根絶は、アポトーシスを生じる免疫細胞の攻撃による、ウイルス産生宿主細胞の排除に依存するからである。

【００４４】

アポトーシスの原理的なエフェクターは、カスパーゼ（Ｃａｓｐａｓｅ）（システインアスパルチルプロテアーゼ（Ｃｙｓｔｅｉｎｅ　Ａｓｐａｒｔｙｌ　Ｐｒｏｔｅａｓｅ）についての略語を示す）として既知の細胞内プロテアーゼのファミリーである。カスパー

ゼは、本質的に全ての動物細胞において不活性なチモーゲンとして見出される。アポトーシスの間、これらカスパーゼは、特定のアスパラギン酸残基でタンパク質分解性のプロセッシングによって活性化され、その結果、代表的に２つの大サブユニットおよび２つの少サブユニットを含むヘテロテトラマーからなる活性なプロテアーゼに組み立てられるサブユニットの生成を生じる（ＴｈｏｒｎｂｅｒｒｙおよびＬａｚｅｂｎｉｋ、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２８１：１３１２～１３１６（１９９８））。アポトーシス現象は、細胞内でのカスパーゼの活性化、その結果生じた特定の基質タンパク質のタンパク質分解性の切断によって、直接的または間接的に生じる。

【００４５】

ＴＵＣＡＮは、少なくとも２つのタンパク質ドメイン（これらのうち１つはＣＡＲＤ（カスパーゼ関連随補充ドメイン）である）を含む。ＣＡＲＤは、いくつかのカスパーゼのＮ末端プロドメインおよびＣＡＲＤ含有プロカスパーゼの活性を活性化するかまたは抑制するかのいずれかのアポトーシス調節タンパク質において見出されたタンパク質相互作用モチーフである。哺乳動物において、８つのＣＡＲＤ保有カスパーゼ（プロカスパーゼ１、プロカスパーゼ２、プロカスパーゼ４、プロカスパーゼ５、プロカスパーゼ９、プロカスパーゼ１１、プロカスパーゼ１２およびプロカスパーゼ１３が挙げられる）が同定された。現在のところ、複数の非カスパーゼＣＡＲＤ含有タンパク質（Ａｐａｆｌ、Ｎｏｄｌ（ＣＡＲＤ４）、ＮＡＣ（ＤＥＰＣＡＰ）、Ｒａｉｄｄ（ＣＲＡＤＤ）、Ｃａｒｄｉａｋ（Ｒｉｐ２，ＲＩＣＫ）、ＢｃｌｌＯ（ＣＩＰＥＲ）、ＡＲＣ（Ｎｏｐ３０）、Ａｓｃ、ＣＡＲＤ９、ＣＡＲＤ１０、ＣＡＲＤ１１、ＣＡＲＤ１４、ｃＩＡＰ１、ｃＩＡＰ２およびＣＬＡＮが挙げられる）が、発見され、そして機能的に特徴付けられた。多数のこれらのタンパク質のＣＡＲＤドメインは、プロテアーゼ活性を促進するかまたは阻害するかのいずれかの、特定のＣＡＲＤ保有カスパーゼのＣＡＲＤ含有プロドメインに結合され得る。

【００４６】

ＴＵＣＡＮのＣＡＲＤドメインは、それぞれのＣＡＲＤおよびプロカスパーゼ９に選択的に結合する（実施例ＩＸを参照のこと）。さらに、プロカスパーゼ９へのＴＵＣＡＮの結合は、Ａｐａｆｌと相互作用するためのプロカスパーゼ９の能力を妨害することが示された。プロカスパーゼ９とＡｐａｆｌとの間の相互作用を阻害することによって、ＴＵＣＡＮは、ミトコンドリア経路／チトクロムｃ経路におけるアポトーシスシグナル伝達を阻害する。この観察と一貫して、ＴＵＣＡＮの過剰発現が、カスパーゼ活性化のためのミトコンドリア経路を活性化することが公知である刺激（Ｂａｘ、ＤＮＡ損傷薬物およびスタウロスポリンが挙げられる）によって誘発されたアポトーシスを減少させるという知見である。対照的に、代替の経路（ＧｒａＢおよびＦａｓ（ＴＮＦファミリーデスレセプター）が挙げられる）を介して誘発されるアポトーシスは、ＴＵＣＡＮによって阻害されない。さらに、安定なトランスフェクションまたは一過性のトランスフェクションによる細胞内のＴＵＣＡＮの過剰発現は、Ａｐａｆｌ／カスパーゼ９依存性刺激（Ｂａｘ、ＶＰ１６およびスタウロスポリンが挙げられる）によって誘発されるが、Ａｐａｆｌ／カスパーゼ９非依存性刺激（ＦａｓおよびグランザイムＢ）によっては誘発されないアポトーシスおよびカスパーゼ活性化を阻害する。ＴＵＣＡＮのこれらの細胞機能性は、ミトコンドリアのシグナル伝達経路誘発アポトーシスを阻害するのに重要な役割を果たすことを示す。

【００４７】

ＴＵＣＡＮはまた、ＮＡＣタンパク質（Ａｐａｆｌアポトソーム（ａｐｏｐｔｏｓｏｍｅ）のＣＡＲＤ保有調節因子）のセグメントと類似するアミノ酸を共有するＮ末端ドメインを含む（Ｃｈｕら Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ ２７６：９２３９－９２４５（２００１）５およびＨｌａｉｎｇら Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ ２７６：９２３０－９２３８（２００１））。このＴＵＣＡＮのＮ末端ドメインは、いくつかの候補リン酸化部位（アミノ酸７２、２８６、３１３および４１６でのＰＫＣ（Ｓ／Ｔ－ｘ－Ｒ／Ｋ）部位、２８９、３７６、３９８、４１４および４１６でのカゼインキナーゼＩＩ（Ｓ／Ｔ－ｘ－Ｄ／Ｅ）部位および１８７ならびに２８９でのＭＡＰキナーゼ／ＣＤＫ（Ｓ／Ｔ－Ｐ）部位が挙げ

られる）を含む。ＳＤＳ－ＰＡＧＥ実験におけるそれらの異なる移動度によって同定されたＴＵＣＡＮの観察された複数の形態（例えば、図６Ｂを参照のこと）は、ＴＵＣＡＮの異なったリン酸化形態であり得る。ＴＵＣＡＮはまた、残基２４３～２４６での候補カスパーゼ切断部位（ＤＥＥＤ）を含む。

【００４８】

これらの分子および他の分子の特徴付けならびにＴＵＣＡＮの細胞機能性は、例えば、Ｐａｔｈａｎら　Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７６：３２２２０－３２２２９（２００１）（その全体が本明細書中に参考として援用される）に記載される。

【００４９】

本明細書中の実施例ＶＩＩに開示されるように、ＴＵＣＡＮの相対的に高いレベルは、いくつかのヒト癌細胞株において見出される。さらに、実施例ＩＩおよびＶＩＩＩに開示されるように、正常な結腸の粘膜と比較して、ＴＵＣＡＮの免疫染色は、悪性の形質転換に関連する、この抗アポトーシスタンパク質の異常な過剰発現を示す初期段階の結腸癌の約３分の２において病理学的に増強した。プロカスパーゼ９のノックアウトマウス由来の細胞の研究は、ｐ５３依存経路における腫瘍サプレッサーとしてのプロカスパーゼ９機能を示した（Ｓｏｅｎｇａｓら　Ｓｃｉｅｎｃｅ　２８４：１５６－１５９（１９９９））。プロカスパーゼ９の調節におけるＴＵＣＡＮの役割を考慮して、ＴＵＣＡＮの過剰発現は、プロカスパーゼ９の損失と機能的に同等であり得、ＴＵＣＡＮの増強したレベルが、腫瘍の病原性または進行を促進し得ることを示す。本明細書中の実施例ＩＶおよびＶＩＩＩに示されるように、結腸癌患者（患者の腫瘍は、高いレベルのＴＵＣＡＮを含む）は、記録保管用標本を使用する、遡及的な分析に起因して、これらの疾患がもとで死亡する傾向が実際に強い。

【００５０】

従って、本発明は、ＴＵＣＡＮを使用して癌患者に対する生存の予後を決定するための方法を提供する。この発明は、（ａ）癌患者由来の新生物細胞含有サンプル中のＴＵＣＡＮのレベルを測定する工程、および（ｂ）ＴＵＣＡＮの参照レベルとサンプル中のＴＵＣＡＮレベルとを比較する工程（ここで、サンプル中の低いレベルのＴＵＣＡＮが、患者の増大した生存率と相関する）を包含する。

【００５１】

ＴＵＣＡＮの決定された基本レベルまたは参照レベルを上回る、新生物細胞含有サンプル中のＴＵＣＡＮレベルは、腫瘍の再発または腫瘍の広がりにおける有意な因子であり得る。腫瘍細胞を用いて決定した参照レベルが上回る場合、ＴＵＣＡＮのレベルは、高いか、または過剰産生と特徴付けられる。高いＴＵＣＡＮかまたは過剰産生したＴＵＣＡＮは、腫瘍の再発または腫瘍の広がりの増大した危険性を示され得る。低いＴＵＣＡＮまたは減産したＴＵＣＡＮは、腫瘍の再発または腫瘍の広がりの減少した危険性を示され得る。

【００５２】

癌患者の生存率を予知するための本発明の方法は、患者からサンプルを得る工程、および１つ以上のバイオマーカー（例えば、ＴＵＣＡＮ）のレベルを測定する工程を包含する。バイオマーカー（例えば、ＴＵＣＡＮ）のレベルを使用して、疾患を有さないかまたは癌患者の全体の生存率に対する予後を本明細書中で提供される相関に基づいて決定する。腫瘍の再発または広がりの可能性は、腫瘍細胞中のＴＵＣＡＮのレベルと相関するので、このような予後は、可能である。例えば、実施例ＶＩおよびＶＩＩＩに示されるように、ＴＵＣＡＮ発現レベルが低い場合、癌の再発の可能性は低いことが見出された。患者由来の新生物細胞含有サンプル中のＴＵＣＡＮのレベルは、疾患状態の評価における単独の因子として使用され得るか、または他の予測的な方法に加えて使用され得る。

【００５３】

ＴＵＣＡＮを使用して、生存を予知し得るか、または様々な型の癌を罹患する患者に対する処置の過程の有効性をモニターし得る。実施例ＶＩＩに記載されるように、ＴＵＣＡＮは、複数の異なる癌細胞型（白血病、黒色腫ならびに胸部癌、卵巣癌、肺癌、ＣＮＡ癌、前立腺癌および腎臓癌が挙げられる）に存在する。上記されるようにまた、ＴＵＣＡＮ

の細胞機能性は、ミトコンドリアシグナル伝達経路誘発アポトーシスの抑制である。ミトコンドリアシグナル伝達経路誘発アポトーシスは、任意の細胞型において生じ得、そして任意の細胞型において、調節不全かまたは抑制の状態になり得るアポトーシス機構であり、正常なホメオスタシスの増殖制御を伴わずに、増殖するような細胞の形質転換を生じる。従って、ＴＵＣＡＮのレベルは、腫瘍の再発または任意の型の細胞を有する患者の生存率と相関され得る。本明細書中で提供されるガイダンスおよび他の周知の方法を使用して、当業者は、特定の腫瘍細胞型おけるＴＵＣＡＮのレベルが、患者の生存率と相関するか否かを決定し得る。決定されたＴＵＣＡＮの参照レベルと癌患者の生存率との間の相関を有して、当業者は、癌患者の生存率についての予後を決定するための方法、および本明細書中に記載される癌を有する患者を処置する過程の有効性をモニターするための方法を実行し得る。

【００５４】

本発明の方法において、サンプルは、例えば、生検手順を使用して得られた細胞または組織であり得るか、あるいは細胞を含む流体サンプル（例えば、血液、血清、精液、尿または便）であり得る。当業者は、癌の型、そして必要である場合、生検サンプルを得るための適切な方法に依存する、適切なサンプルを決定し得る。可能である場合、最少の侵襲性回収手順を使用して、患者からサンプルを得ることが所得され得る。例えば、患者からの流体サンプル（例えば、血液、唾液、血清、精液、尿または便）を得ることは、組織サンプルを回収することよりも侵襲性でない。

【００５５】

１つの実施形態において、ＴＵＣＡＮのレベルは、選択的結合剤（例えば、ＴＵＣＡＮポリペプチドと特異的に反応する抗体）を使用して、ＴＵＣＡＮの量を測定することによって決定され得る。他の選択的結合剤としては、ＴＵＣＡＮポリペプチドに結合するポリペプチド例えば、ＴＵＣＡＮ　ＣＡＲＤドメイン（アミノ酸３４５～４３１（配列番号３）を含むＴＵＣＡＮポリペプチド、およびカスパーゼ９ポリペプチド（このアミノ酸配列（配列番号４）は、Ｐｒｏｓｉｔｅデータベース中のＰ５５２１１として参照される）、またはＴＵＣＡＮポリペプチドに結合するその改変体が挙げられる。プロカスパーゼおよびそれ自体へのＴＵＣＡＮの選択的結合は、実施例ＩＸに記載される。

【００５６】

親和性結合アッセイの必須の全ての様式は、サンプル中のＴＵＣＡＮまたは別のバイオマーカーポリペプチド（例えば、ｃＩＡＰ２、Ａｐａｆ１、Ｓｍａｃ、β－カテニン、Ｂｃ１－２またはｐ５３）のレベルの決定における使用のために適用可能である。このような方法は、迅速であり、有効性であり、そして感受性である。さらに、親和性結合方法は単純であり、そして多様な臨床的な設定および多様な特定の必要性に適するような状態下で実行されるように改変され得る。公知であり、そして本発明の方法に使用され得る親和性結合アッセイとしては、可溶性相形式および固相形式の両方が挙げられる。可溶性相親和性結合アッセイ（ｓｏｌｕｂｌｅ　ｐｈａｓｅ　ａｆｆｉｎｉｔｙ　ｂｉｎｄｉｎｇ　ａｓｓａｙ）の特定の例は、バイオマーカーの選択的抗体または他の結合剤を使用する免疫沈降である。固相型式は、迅速であり、そして感受性または正確さを失うことなく同時に複数の異なるサンプルでより容易に実行され得るので、本発明の方法にとって有利である。さらに、固相親和性結合アッセイは、高スループットスクリーニングおよび自動化に適切である。

【００５７】

固相親和性結合アッセイの特定の例としては、免疫組織化学的結合アッセイ、免疫親和性結合アッセイ（例えば、ＥＬＩＳＡおよび放射免疫アッセイ（ＲＩＡ））が挙げられる。他の固相親和性結合アッセイは、当業者に公知であり、そして本発明の方法に適用可能である。親和性結合アッセイは、一般に、目的の分析物またはリガンドに対して選択的な抗体結合分子を用いる使用のためにフォーマットされるが、特に任意の結合剤は、選択的結合抗体と代替的に置換され得る。このような結合剤としては、例えば、高分子（例えば、ポリペプチド、ペプチド、核酸分子、脂質および糖）ならびに低分子化合物が挙げられ

る。特定の分析物またはリガンドに選択的に結合するこのような分子を同定するための方法は、当該分野で公知であり、そしてこれらとしては、例えば、表面提示ライブラリーおよびコンビナトリアルライブラリーが挙げられる。従って、親和性結合アッセイにおいて使用されるような抗体以外の分子について、必要とされる全ての分子は、バイオマーカーに対する選択的結合活性を示すような結合剤である。

【００５８】

親和性結合アッセイ（例えば、免疫親和性結合アッセイ）の種々の様式としては、例えば、免疫組織学化学的方法、固相ＥＬＩＳＡおよびＲＩＡならびにそれらの改変が挙げられる。このようなそれらの改変としては、例えば、捕獲アッセイおよびサンドイッチアッセイ、ならびに競合アッセイ形式との組み合わせのいずれかの様式の使用が挙げられる。使用のための免疫親和性結合アッセイのこれらの様式または形式の選択は、使用者の意図に依存する。このような方法は、一般的な実験室マニュアル（例えば、ＨａｒｌｏｗおよびＬａｎｅ，Ｕｓｉｎｇ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９９９））の記載に、見出され得る。

【００５９】

本発明の方法において有用な抗体としては、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体、ならびにこのような抗体の抗原結合フラグメントが挙げられる。ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を調製する方法は、当業者に周知であり、そして実施例ＩおよびＨａｒｌｏｗおよびＬａｎｅ，Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ（１９８８）に記載される。

【００６０】

本発明の方法に有用な抗体としてはまた、天然に存在する抗体ならびに天然に存在しない抗体（例えば、一本鎖抗体、キメラ抗体、二機能性抗体およびヒト化抗体、ならびにそれらの抗原結合フラグメントを含む）が挙げられる。このような天然に存在しない抗体は、固相ペプチド合成を使用して構築され得るか、組換え的に産生され得るか、または、例えば、Ｈｕｓｅら（Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４６：１２７５－１２８１（１９８９））によって記載されるような可変性の重鎖および可変性の軽鎖からなるコンビナトリアルなライブラリーをスクにーニングすることによって得られることができる。これらの方法、ならびに例えば、キメラ抗体、ヒト化抗体、ＣＤＲ移植抗体、一本鎖抗体および二機能性抗体を作製する他の方法は、当業者に周知である（ＷｉｎｔｅｒおよびＨａｒｒｉｓ，Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｔｏｄａｙ １４：２４３－２４６（１９９３）；Ｗａｒｄら、Ｎａｔｕｒｅ ３４１：５４４－５４６（１９８９）；ＨａｒｌｏｗおよびＬａｎｅ，前出，１９８８）；Ｈｉｌｙａｒｄら、Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ ａｐｐｒｏａｃｈ（ＩＲＬ Ｐｒｅｓｓ １９９２）；Ｂｏｒｒａｂｅｃｋ，Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，第２編（Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ １９９５））。

【００６１】

親和性結合を利用する形式は、種々の検出標識および分析されたサンプル中のバイオマーカーの量を定量化するための当該分野で公知のシステムとの組み合わせにおいて使用され得る。検出システムとしては、直接的手段および間接的手段の両方によって結合されたバイオマーカーの検出が挙げられる。直接的検出方法としては、バイオマーカー特異的反応性抗体または結合剤の標識化が挙げられる。間接的検出システムとしては、例えば、標識された二次抗体および結合剤の使用が挙げられる。

【００６２】

二次抗体、標識および検出システムは、当該分野で周知であり、そして商業的に得られ得るか、または当該分野で周知の技術によって得ることができる。バイオマーカー選択的結合剤とともに使用される検出可能な標識およびシステムは、バイオマーカーへの試薬の結合を損なうべきではない。さらに、複数の抗体および標識システムは、所望である場合

、結合アッセイの感受性を増強するような結合されたバイオマーカー特異的反応性抗体を検出するために使用され得る。

【００６３】

検出可能な標識は、分析方法によって定量され得るか測定され得る必須の任意の標識であり得る。このような標識としては、例えば、酵素、放射性同位元素、蛍光色素ならびに化学発光化合物および生物発光化合物が挙げられる。酵素標識の特定の例としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）、アルカリ性ホスファターゼ（ＡＰ）、β－ガラクトシダーゼ、ウレアーゼおよびルシフェラーゼが挙げられる。

【００６４】

西洋ワサビペルオキシダーゼの検出システムは、例えば、色素生産基質のテトラメチルベンジジン（ＴＭＢ）とともに使用され得、過酸化水素の存在において、４５０ｎｍでの吸光度を測定することによって検出可能である可溶性産物を得る。アルカリ性ホスファターゼ検出システムは、色素生産基質のｐ－ニトロフェニルリン酸とともに使用さえ得、例えば、４０５ｎｍでの吸光度を測定することによって検出可能である可溶性産物を得る。同様に、β－ガラクトシダーゼの検出システムは、色素生産基質のｏ－ニトロフェニル－β－Ｄ－ガラクトピラノシド（ＯＮＰＧ）とともに使用され得、４１０ｎｍでの吸光度を測定することによって検出可能である可溶性産物を得るか、またはウレアーゼの検出システムは、基質（例えば、尿素－ブロモクレゾールパープル（Ｓｉｇｍａ　Ｉｍｍｕｎｏｃｈｅｍｉｃａｌｓ，　Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ））とともに使用され得る。ルシフェリンは、ＡＴＰ依存性酸化の後に発光するルシフェラーゼに対する基質化合物である。

【００６５】

蛍光色素検出標識は、光または別のエネルギー供給原による励起の後、紫外線の光または可視波長の光の放出を介して検出可能に表される。ＤＡＰＩ、フルオレセイン、Ｈｏｅｃｈｓｔ　３３２５８、Ｒ－フィコシアニン、Ｂ－フィコエリトリン、Ｒ－フィコエリトリン、ローダミン、テキサスレッドおよびリーサミン（ｌｉｓｓａｍｉｎｅ）は、本発明の親和性結合形式において使用され得る蛍光色素検出標識の特定の例である。特に有用な蛍光色素は、フルオレセインまたはローダミンである。

【００６６】

化学発光および生物発光の検出レベルは、感受性（バイオマーカーの非放射活性検出）にとって都合がよく、そして様々な供給源（例えば、Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｌｉｆｅｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｉｎｃ．（Ａｒｌｉｎｇｔｏｎ　Ｈｅｉｇｈｔｓ，ＩＬ））から市販され得る。

【００６７】

あるいは、放射性同位元素は、本発明の方法において検出可能な標識として使用され得る。ヨウ素－１２５は、検出可能な標識として有用な放射性同位元素の特定の例である。

【００６８】

検出可能な標識からのシグナルは、以下を使用して分析され得る：例えば、色素生産基質からの色を検出するための分光光度計；特定波長の光の存在における蛍光発光を検出するための蛍光光度計；または放射線を検出するための放射線計数管（例えば、ヨウ素－１２５の検出のためのγ計数管）。酵素結合二次抗体の検出について、例えば、結合剤の量の定量的分析は、製造者の指示書に従って、分光光度計（例えば、ＥＭＡＸ　Ｍｉｃｒｏｐｌａｔｅ　Ｒｅａｄｅｒ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ，Ｍｅｎｌｏ　Ｐａｒｋ，ＣＡ）を使用してなされ得る。所望である場合、本発明のアッセイは、自動化され得るか、または機械的に実施され、そして複数のサンプルからのシグナルは、同時に検出され得る。

【００６９】

本発明の予後形式は、米国特許第４，３７６，１１０号および同第４，７７８，７５１号に記載されるように、前、後、または同時であり得る。本明細書に記載される種々のアッセイ形式のための分離工程（結合していない２次抗体の除去を含む）は、当該分野で公知の方法（ＨａｒｌｏｗおよびＬａｎｅ、前出）によって実行され得る。例えば、適切な

緩衝液を用いる洗浄は、濾過、吸入、減圧または磁気分離（ｍａｇｎｅｔｉｃ　ｓｅｐａｒａｔｉｏｎ）、および遠心分離に続き得る。

【００７０】

バイオマーカーについて選択的な結合剤はまた、バイオマーカーに標的化される（新生物細胞を表す）画像化方法において利用され得る。これらの画像化技術は、標準的な処置（例えば、結腸のような胃腸管系器官の外科的切除、および放射線治療が挙げられる）に続く、原発部位における残りの新生物細胞の同定において有用性を有する。さらに、新生物細胞を検出する画像化技術は、転移の第二部位の検出において有用性を有する。バイオマーカー特異的結合剤は、（例えば、^{111}インジウム）を用いて放射標識され得、そしてＫａｈｎら、Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｕｒｏｌｏｇｙ　１５２：１９５２－１９５５（１９９４）によって記載されるように、静脈内に注入され得る。バイオマーカーについて選択的な結合剤は、例えば、ＴＵＣＡＮまたは別のバイオマーカー（例えば、ｃＩＡＰ２、Ａｐａｆ１、Ｓｍａｃ、β－カテニン、Ｂｃｌ－２またはｐ５３）と特異的に反応するモノクローナル抗体であり得る。画像化は、例えば、Ｋａｈｎら（前出）によって記載されるような、放射免疫シンチグラフィーによって達成され得る。

【００７１】

ＴＵＣＡＮまたは別のバイオマーカー（例えば、ｃＩＡＰ２、Ａｐａｆ１、Ｓｍａｃ、β－カテニン、Ｂｃｌ－２またはｐ５３）のレベルはまた、核酸プローブのようなバイオマーカーのための選択的結合剤を用いて、バイオマーカーのｍＲＮＡまたはＤＮＡの量を測定することによって決定され得る。ｍＲＮＡレベルを検出するために使用される方法としては、バイオマーカーをコードするｍＲＮＡのハイブリダイゼーションまたは増幅の検出が挙げられる。この検出は、ｔｈｅ　Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ（Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ　＆　Ｓｏｎｓ，１９９９）；米国特許第５，８８２，８６４号などにおいて例示されるような、当業者に公知の方法のうちの１つを用いて、インビトロまたはインサイチュのいずれかでのｍＲＮＡの分析によって実行され得る。検出されるＴＵＣＡＮ　ｍＲＮＡまたは他のバイオマーカーのｍＲＮＡは、ＴＵＣＡＮ遺伝子もしくはそのフラグメント、あるいはｃＩＡＰ２遺伝子、Ｂｃｌ－２遺伝子、ｐ５３遺伝子、ｂ－カテニン遺伝子、ｓｕｒｖｉｖｉｎ遺伝子もしくはＡｐａｆ１遺伝子、またはそれらのフラグメントの任意のＲＮＡ転写物である。

【００７２】

相補的プローブを用いる特異的または選択的なハイブリダイゼーションによって核酸分子を検出するための、当該分野で周知の方法が多数存在する。簡単に言うと、ハイブリダイゼーションによる検出のために、検出可能なレベルを有する、ＴＵＣＡＮ遺伝子に相補的なＴＵＣＡＮ核酸プローブは、このプローブのＴＵＣＡＮ　ＲＮＡへのアニーリングを可能にする条件下で、癌を有する個体または癌を有することが疑われる個体から得られた新生物細胞含有サンプルに添加され得る。サンプル中のＴＵＣＡＮ　ＲＮＡを検出するための方法としては、例えば、ＲＴ－ＰＣＲの使用が挙げられ得る。条件は、溶液および固相のハイブリダイゼーション手順の両方について当該分野において周知である。さらに、ハイブリダイゼーション条件の最適化は、所望される場合、異なる温度、持続時間および異なる緩衝液条件におけるサンプルのアリコートのハイブリダイゼーションによって実行され得る。このような手順は慣用的であり、そして当業者に周知である。アニーリング後、このサンプルを洗浄し、そしてシグナルを測定し、そして適切なコントロール値または標準値と比較する。ハイブリダイゼーションシグナルの程度は、ＴＵＣＡＮのｍＲＮＡレベルに直接比例する。新生物細胞含有サンプルにおけるＴＵＣＡＮ　ｍＲＮＡのレベルは、ＴＵＣＡＮ　ｍＲＮＡに対する適切な参照レベルと比較される。他のバイオマーカー（例えば、ｃＩＡＰ２、Ａｐａｆ１、Ｓｍａｃ、β－カテニン、Ｂｃｌ－２またはｐ５３）ｍＲＮＡのレベルは、同様に決定され得、そして特定のバイオマーカーに対する適切な参照レベルと比較され得る。

【００７３】

方法の他の例としては、ＰＣＲおよび他の増幅方法（例えば、ＲＴ－ＰＣＲ、５’ＲＡ

ＣＥもしくは３’ＲＡＣＥ、ＲＮａｓｅ保護、ＲＮＡブロット、ドットブロットまたは他の膜ベースの技術、ディップスティック、ピン、ＥＬＩＳＡまたは固体支持体上に固定された二次元アレイ）が挙げられる。これらの方法は、定質的測定または定量的測定のいずれかを用いて実行され得、これらの全ては、当業者に周知である。

【００７４】

ＰＣＲまたはＲＴ－ＰＣＲは、単離されたＲＮＡまたは粗細胞溶解調製物を用いて使用され得る。出発材料の量を制限する場合、ＰＣＲは有益である。ＰＣＲ法のさらなる記載は、例えば、Ｄｉｅｆｆｅｎｂａｃｈ，Ｃ．Ｗ．およびＤｖｅｋｓｌｅｒ，Ｇ．Ｓ．、ＰＣＲ Ｐｒｉｍｅｒ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｐｒｅｓｓ，Ｐｌａｉｎｖｉｅｗ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９９５）に見出され得る。マイクロアレイのような多数サンプル形式は、単一アッセイにおいて、多数の異なるサンプルを分析することの利点を提供する。対照的に、固相ディップスティックベースの方法は、即時の結果のために、患者の流体サンプルを迅速に分析することが可能であるという利点を提供する。

【００７５】

バイオマーカー（例えば、ｃＩＡＰ２、ＴＵＣＡＮ、Ａｐａｆ１、β－カテニン、Ｂｃｌ－２またはＳｍａｃ）の発現レベルをハイブリダイゼーションによって測定するために有用な核酸プローブとしては、例えば、本明細書中に提供されるヌクレオチド配列を用いて調製されるプローブが挙げられる。全体のｃＤＮＡ配列およびそのフラグメント（ｃＩＡＰ２、ＴＵＣＡＮ、Ａｐａｆ１、β－カテニン、Ｂｃｌ－２またはＳｍａｃのヌクレオチド配列に対応するオリゴヌクレオチドが挙げられ、そしてこれらは、ｃＩＡＰ２ ＲＮＡ、ＴＵＣＡＮ ＲＮＡ、Ａｐａｆ１ ＲＮＡ、β－カテニン ＲＮＡ、Ｂｃｌ－２ ＲＮＡまたはＳｍａｃ ＲＮＡに特異的または選択的にハイブリダイズし得る）に対応する核酸分子は、ハイブリダイゼーション方法にとって有用である。

【００７６】

参照レベルは、患者の癌性細胞におけるバイオマーカーのレベルを評価するために使用されるバイオマーカー（例えば、ｃＩＡＰ２、ＴＵＣＡＮ、Ａｐａｆ１、Ｓｍａｃ、β－カテニンまたはＢｃｌ－２）のレベルである。特に、患者の癌性細胞におけるバイオマーカーのレベルが参照レベルよりも高い場合、これらの細胞は高レベルのバイオマーカーまたは過剰産生のバイオマーカーを有するとみなされる。逆に、患者の癌際細胞におけるバイオマーカーのレベルが参照レベルよりも低い場合、これらの細胞は、低レベルのバイオマーカーまたは過少産生のバイオマーカーを有するとみなされる。

【００７７】

高レベルのバイオマーカー遺伝子（例えば、ｃＩＡＰ２、ＴＵＣＡＮ、Ａｐａｆ１、Ｓｍａｃ、β－カテニン、Ｂｃｌ－２またはｐ５３）、あるいは過剰産生のバイオマーカー遺伝子は、決定した基礎レベルより高いのバイオマーカーのレベルと関連する。従って、癌細胞におけるバイオマーカー（例えば、ｃＩＡＰ２、ＴＵＣＡＮ、Ａｐａｆ１、Ｓｍａｃ、β－カテニン、Ｂｃｌ－２またはｐ５３）の参照レベルまたは基礎レベルは、「カットオフ」値として同定され、「カットオフ」値より上では、バイオマーカーの存在と、減少または増加した腫瘍の再発または広がりとの間に有意な相関が存在する。当業者は、いくつかの「カットオフ」値が明確でない（臨床的相関はカットオフの片側の値の範囲にわたって、なお有意である）ことを認識する；しかし、癌細胞の型に対するバイオマーカーレベルの至適なカットオフ値（例えば、変動するＨ－スコアなど）を選択することが可能である。至適なカットオフ値における改善が、参照値または基礎値を決定するために使用される統計学的方法の高度化、および参照値または基礎値を決定するために使用されるサンプルの数および供給源に依存して決定され得ることが理解される。

【００７８】

このような過剰産生は、代表的に、絶対的なバイオマーカーレベルに関して計算されないが、相対的測定を用いて決定される。これらの相対的測定値は、内部標準を用いた定量化の目的のために例示される；しかし、決定の他の標準または方法（例えば、外部標準、

バイオマーカーポリペプチド測定値、バイオマーカーｍＲＮＡ測定値、タンパク質の絶対値、ｍＲＮＡレベルまたはＤＮＡレベルなどとの比較）が、使用され得ることが理解される。

【００７９】

参照レベルはまた、癌を有する患者の集団（例えば、同一段階の癌を有する患者）におけるバイオマーカーレベルの比較によって決定され得る。これは、ヒストグラム分析（試験した患者の全体集団が図解される）によって達成され得、ここで、第一の軸はバイオマーカーのレベルを示し、そして第二の軸は、腫瘍細胞が所定レベルのバイオマーカーを含む集団における患者数を示す。患者の２つ以上の別個の群は、同一レベルまたは類似レベルのバイオマーカーを有する集団のサブセット集団の同定によって決定され得る。次いで、参照レベルの決定は、これらの別個の群を最も良好に区別するバイオマーカーレベルに基づいてなされ得る。

【００８０】

参照レベルが、参照バイオマーカーより高いのレベルを発現する癌患者に対して、参照バイオマーカーより低いのレベルを発現する癌患者における、腫瘍の再発または広がりの可能性を区別するという検証は、単一の可変分析または複数の可変分析を使用して実行され得る。これらの方法は、１つ以上の可変の結果と所定の結果との間の相関の可能性を決定する。特定の場合において、これらの方法は、バイオマーカーレベル（または別の変数と結合したバイオマーカーレベル）と、疾患を有さないか、または癌患者の全般的な生存との間の相関の可能性を決定する。これらの分析を実行するために、当業者に周知の複数の方法の任意の１つが、使用され得る。単一可変分析の例は、Ｋａｐｌａｎ－Ｍｅｉｒ法またはログランク試験（ｌｏｇ－ｒａｎｋ　ｔｅｓｔ）である。複数の可変分析の例は、Ｃｏｘ比例危険回帰モデル（例えば、実施例ＶＩを参照のこと）である。

【００８１】

参照レベルの集団ベースの決定（例えば、ヒストグラム分析による）は、異なるバイオマーカーレベルを有する患者の２つ以上の別個の群を決定するために、十分なサイズの患者集団を用いて実施され得る。代表的に、このような集団は、少なくとも２５人の患者、例えば、少なくとも５０人の患者、少なくとも７５人の患者および少なくとも１００人の患者を含む。同様に、決定される参照レベルの検証はまた、少なくとも２５人の患者、例えば、少なくとも５０人の患者、少なくとも７５人の患者および少なくとも１００人の患者を含み得る。

【００８２】

参照レベルは、単一の数（各々の患者に等しく適用可能である）であり得るか、または参照レベルは、患者集団の特定のサブ集団に従って変動し得る。例えば、男性は、同一の癌について女性とは異なる参照レベルを有し得る。さらに、参照レベルは、各個別の患者に対して決定されるレベルであり得る。例えば、参照レベルは、同一の患者内の非腫瘍細胞におけるバイオマーカーレベルに対する患者の腫瘍細胞におけるバイオマーカーレベルの特定の比となり得る。従って、各患者についての参照レベルは、バイオマーカーレベルの参照比によって禁止され得、ここで、参照比は、上記の参照レベルを決定するための任意の方法によって決定され得る。

【００８３】

さらに、参照レベルは、患者の２つの群を分け得るが、複数の集団を分ける多くの参照値が存在し得ることは、本発明の範囲内である。例えば、２つの参照値は、高レベルのバイオマーカーを有する患者の第一群を、中間レベルのバイオマーカーを有する患者の第二群と低レベルのバイオマーカーを有する患者の第三群から分離し得る。異なる数の参照レベルは、曲線（例えば、連続する線）を禁止するのに十分であり得、これは、患者におけるバイオマーカーレベルの機能として、疾患を有さない可能性または患者における全般的な生存の可能性を記載する。このような曲線は、「連続した」バイオマーカーレベルを構成し、ここで、疾患を有さないかまたは患者における全般的な生存の可能性は、このような患者におけるバイオマーカーに比例する。２つ以上のバイオマーカーレベルはまた、こ

のような曲線によって示され得る。

【００８４】

参照レベルはまた、細胞の１つ以上の区画におけるバイオマーカータンパク質（例えば、ｃＩＡＰ２、ＴＵＣＡＮ、Ａｐａｆ１、Ｓｍａｃ、β－カテニン、Ｂｃｌ－２またはｐ５３）のレベルを示す。代表的に、参照レベルは、（ａ）細胞全体、（ｂ）核、または（ｃ）細胞質におけるバイオマーカータンパク質のレベルを示す。このレベルは、そのタンパク質の細胞区画化が、腫瘍の再発または特定の癌の広がりの危険性と相関する場合、有用である。同様に、参照レベルは、異なる区画におけるバイオマーカータンパク質のレベル比（例えば、細胞全体のバイオマーカータンパク質に対する核バイオマーカータンパク質の比、または細胞質のバイオマーカータンパク質に対する核の比）であり得る。

【００８５】

バイオマーカー（例えば、ｃＩＡＰ２、ＴＵＣＡＮ、Ａｐａｆ１またはＳｍａｃ）の参照レベルは、疾患を有さない可能性、または癌についての全般的な生存の可能性の統計学的に有意な指標であることが見出される、別の可変指標と組み合わせてさらに使用され得る。このような指標としては、既知の癌マーカー（例えば、結腸癌マーカーとしては、シアロシル－ＴｎＣＥＡ、ＣＡ１９－９、およびＬＡＳＡが挙げられる）の存在またはレベルが挙げられるか、あるいは臨床的指標または病理学的指標（例えば、年齢、腫瘍サイズ、腫瘍病歴、臨床段階、家族の病歴など）があり得る。例えば、癌の臨床段階はまた、疾患を有さないか、または全般的な生存の、統計学的に有意な指標であり、ここで、バイオマーカーの参照レベルは、癌の臨床段階に従って変動し得る。例えば、バイオマーカーのレベル（例えば、所定の患者について癌の臨床段階ＩＩに関連する低レベルのＴＵＣＡＮ）は、ともに、疾患を有さない可能性または全般的な生存の可能性の増大についての指標である。従って、バイオマーカーの参照レベルは、疾患を有さない可能性または癌についての全般的な生存の可能性の、別の統計学的に有意な指標関数として変動し得る。

【００８６】

癌細胞におけるバイオマーカー（例えば、ｃＩＡＰ２、Ａｐａｆ１、ＴＵＣＡＮ、Ｂｃｌ－２またはＳｍａｃ）のレベルは、互いに相関し得、そして他の分子と相関し得る。なぜなら、これらの分子は、癌細胞の過剰増殖状態に寄与する、一般的に調節不全の分子経路に関与するからである。従って、１つ以上のさらなるバイオマーカーとＴＵＣＡＮとの組み合わせは、癌患者の生存についての予後を決定するための本発明の方法において使用され得る。第２のバイオマーカーまたはさらなるバイオマーカーは、例えば、Ａｐａｆ１、ｃＩＡＰ１、ｃＩＡＰ２、ｓｕｒｖｉｖｉｎ、ＡＩＦ、Ｂｃｌ－２、Ｂｃｌ－ＸＬ、Ｂａｘ、Ｂｉｄ、ＢＡＧ１、ｐ５３、変異体ｐ５３、β－カテニン、ＭＩＢ－１または別の周知の腫瘍マーカー（例えば、以下に記載される例示的な市販の腫瘍マーカー）であり得る。さらに、ＴＵＣＡＮと、１つ以上のバイオマーカーとの組み合わせの使用は、増加した予後の有意性または予後決定における信頼を提供する。

【００８７】

従って、本発明は、癌患者の生存についての予後を決定するための方法を提供し、この方法は、２つ以上のバイオマーカーの使用を包含する。この方法は、（ａ）癌患者に由来する新生物細胞含有サンプルにおいて、ＴＵＣＡＮのレベル、ならびにｃＩＡＰ２、Ａｐａｆ１、Ｂｃｌ－２およびＳｍａｃからなる群より選択される１つ以上のバイオマーカーのレベルを測定する工程、ならびに（ｂ）上記サンプルにおけるＴＵＣＡＮおよび１つ以上の選択されたバイオマーカーのレベルと、ＴＵＣＡＮおよびバイオマーカーの参照レベルとを比較する工程によって実施される。ここで、上記サンプルにおける、低レベルのＴＵＣＡＮと高レベルの任意のＡｐａｆ１、Ｂｃｌ－２またはＳｍａｃ、あるいは低レベルのＴＵＣＡＮと低レベルのｃＩＡＰ２は、上記患者の増大した生存と相関する。

【００８８】

本発明の方法は、例えば、増大または減少した発現が改善された生存と相関する、ＴＵＣＡＮと、１つ以上のバイオマーカー（例えば、任意のｃＩＡＰ２、Ａｐａｆ１、Ｂｃｌ－２、Ｓｍａｃまたは癌に対する別の既知のバイオマーカーまたは標準的なバイオマーカ

ー）との組み合わせを選択することによって実施され得る。選択されたバイオマーカーは、複数の型の癌にとって有用な、一般的な診断マーカーまたは予後マーカー（例えば、ＣＡ１２５、ＣＥＡもしくはＬＤＨ）であり得るか、あるいは癌特異的診断マーカーまたは予後マーカー（例えば、結腸癌マーカー（例えば、シアロシル－ＴｎＣＥＡ、ＣＡ１９－９またはＬＡＳＡ）、乳癌マーカー（例えば、ＣＡ１５－２、Ｈｅｒ－２／ｎｅｕおよびＣＡ２７．２９）、卵巣癌マーカー（例えば、ＣＡ７２－４）、肺癌（例えば、神経特異的エノラーゼ（ＮＳＥ）および組織ポリペプチド抗原（ＴＰＡ））、前立腺癌（例えば、ＰＳＡ、前立腺特異的膜抗原および前立腺酸性ホスファターゼ）、黒色腫（例えば、Ｓ－１００およびＴＡ－９０）、ならびに他の型の癌に特異的な他のバイオマーカー）であり得る。当業者は、ＴＵＣＡＮと組み合わせて、検出のために有用な診断マーカーまたは予後マーカーを選択することが可能である。同様に、３つ以上、４つ以上もしくは５つ以上または多くのバイオマーカーが、癌患者の生存についての予後を決定するために一緒に使用され得る。

【００８９】

２つ以上のバイオマーカーの使用は、予後の結果に増大した信頼性を提供し得る。例えば、本明細書中に開示されるように、低いｃＩＡＰと低いＴＵＣＡＮとの組み合わせ、および高いＡｐａｆ１と低いＴＵＣＡＮとの組み合わせは、増大した、疾患に罹患していない生存と相関した（実施例Ｖを参照のこと）。特に、新生物細胞含有サンプルにおけるｃＩＡＰおよびＴＵＣＡＮのレベルについて試験した３３人の患者のうち、他のカテゴリーに属する患者については５６％が生存し、そして４４％が疾患を有さないのに対して、低いＩＡＰおよび低いＴＵＣＡＮを有する患者の９７％は生存し続けた（９１％は疾患を有さない）。さらに、新生物細胞含有サンプルにおけるＡｐａｆ１およびＴＵＣＡＮのレベルについて試験した１７人の患者のうち、他のカテゴリーに属する患者については６５％が生存し、そして５３％が疾患を有さないのに対して、高いＡｐａｆ１および低いＴＵＣＡＮを有する患者の１００％は生存し続け、そして疾患を有さなかった。当業者は、このような相関が、本明細書中に記載される方法を用いて、バイオマーカーの他の組み合わせを使用して観察され得ることを認識する。

【００９０】

本発明の予後方法において有用なバイオマーカーの組み合わせとしては、例えば、ｃＩＡＰ２およびＴＵＣＡＮ、Ａｐａｆ１およびＴＵＣＡＮ、ならびにバイオマーカー（例えば、ｃＩＡＰ２、Ａｐａｆ１、Ｂｃｌ－２およびＳｍａｃならびに他の分子（ＡＩＦ、Ｂｃｌ－２、Ｂｃｌ－ＸＬ、Ｂａｘ、Ｂｉｄ、ＢＡＧ１、ｐ５３、変異ｐ５３、β－カテニン、ＭＩＢ－１ならびに種々の他の一般的バイオマーカーおよび腫瘍特異的バイオマーカー（例えば、本明細書中に上記されるような市販の診断マーカー）を含む））とＴＵＣＡＮとの、多数の他の組み合わせが挙げられる。これらのバイオマーカーの上昇したレベルは、評価された全ての癌検体の部分において観察されたので（実施例ＩＩを参照のこと）、このような組み合わせは、癌細胞の転移状態の有用な指標であり得る。さらに、別の結腸癌マーカーであるＫｉ－６７と相関する種々のバイオマーカーのレベルの上昇、およびバイオマーカーの発現間（例えば、患者集団におけるｃＩＡＰ２とＴＵＣＡＮとの間（ｐ＝０．００３））の陽性の相関が観察された。

【００９１】

本発明はまた、癌に罹患する患者についての処置過程の有効性をモニタリングするための方法を提供する。この方法は、以下の工程：（ａ）癌患者由来の新生物細胞含有サンプル中のＴＵＣＡＮのレベルを決定する工程、および（ｂ）処置後の患者由来の新生物細胞含有サンプル中のＴＵＣＡＮのレベルを決定する工程、を包含し、これによって、処置前のＴＵＣＡＮレベルと処置後のバイオマーカーレベルとの比較が、処置の有効性を示す。

【００９２】

処置過程に関して使用される場合、「有効性」とは、この処置過程が腫瘍の再発または広がりの危険性を低減する能力をいい、従って、患者が疾患を有さない可能性または患者の全体的生存の可能性を増大させる能力をいう。この方法は、患者の腫瘍細胞におけるバ

イオマーカー（例えば、ｃＩＡＰ、ＴＵＣＡＮ、Ａｐａｆ１またはＳｍａｃ）のレベルが、患者の非腫瘍細胞におけるｃＩＡＰ、ＴＵＣＡＮ、Ａｐａｆ１およびＳｍａｃのレベルと比較して異常である場合、特に有用性を有する。処置の前および後の患者由来の新生物細胞含有サンプル中のバイオマーカーレベルの比較は、それによって、バイオマーカーレベルが非腫瘍細胞のレベルに戻っている（これは、より有効な処置過程を意味している）か否か、またはバイオマーカーレベルが異常なままであるかもしくは異常性を増している（これは、処置過程があまり有効でないことを示している）か否かを示すように働く。例えば、処置後の患者サンプル中のＡｐａｆ１、Ｂｃｌ－２またはＳｍａｃのレベルの増加は、Ａｐａｆ１またはＳｍａｃの高いレベルが、結腸癌の再発の低い発生率と相関するので、この処置が有効であることを示す。さらに、処置後の患者サンプルにおける低レベルのβ－カテニン、ｃＩＡＰ２またはＴＵＣＡＮは、低レベルのβ－カテニン、ｃＩＡＰ２またはＴＵＣＡＮが、結腸癌の再発の低い発生率と相関するので、この処置が有効であることを示す。

【００９３】

癌を有する患者は、高レベルの特定のバイオマーカーまたは低レベルのバイオマーカーが、この患者から得られた新生物細胞含有サンプルにおいて測定されるか否かにしたがって分類され得る。患者についての予後の決定は、この患者が割り当てられたグループが、この患者が割り当てられなかったグループに関して、より高いかまたはより低い、疾患に罹患していない生存の可能性または全体的生存の可能性と相関するか否かを決定することによって、なされ得る。

【００９４】

従って、本発明はまた、患者の分類を含む、癌患者の生存についての予後を決定する方法を提供する。この方法は、以下の工程：（ａ）癌患者由来の新生物細胞含有サンプル中のＴＵＣＡＮレベルを測定する工程、および（ｂ）第一または第二の患者グループのいずれかに属するとして患者を分類する工程、によって実施され、ここで、低レベルのＴＵＣＡＮを有する第一のグループの患者は、高レベルのＴＵＣＡＮを有する第二のグループの患者と比較して、生存の可能性が増大しているとして分類される。

【００９５】

高レベルのＴＵＣＡＮまたはＴＵＣＡＮの過剰発現は、腫瘍の再発または広がりの危険性が増大した患者と相関する。従って、高レベルのＴＵＣＡＮを有する第一のグループに属する患者は、低レベルのＴＵＣＡＮを有する第二のグループと比較して、腫瘍の再発または広がりの危険性が増大しているとして分類される。低レベルのＴＵＣＡＮを有する第一のグループに属する患者は、高レベルのＴＵＣＡＮを有する第二のグループと比較して、生存の可能性が増大しているとして分類される。

【００９６】

癌患者の生存についての予後を決定する方法は、１以上のさらなるバイオマーカーを使用して実施され得る。種々のバイオマーカー（公知の癌マーカーおよび本明細書中に開示される予後バイオマーカーを含む）は、癌患者の生存についての予後を決定するために、ＴＵＣＡＮと組み合わせて使用され得る。１実施形態において、この方法は、以下の工程：（ａ）癌患者由来の新生物細胞含有サンプル中のｃＩＡＰ２レベルを決定する工程、および（ｂ）第一または第二の患者グループのいずれかに属するとして患者を分類する工程、を包含し、ここで、低レベルのＴＵＣＡＮおよび低レベルのｃＩＡＰ２を有する第一のグループの患者は、高レベルのＴＵＣＡＮおよび高レベルのｃＩＡＰ２を有する第二のグループの患者と比較して、生存の可能性が増大しているとして分類される。

【００９７】

別の実施形態において、この方法は、以下の工程：（ａ）癌患者由来の新生物細胞含有サンプル中のＡｐａｆ１、ＳｍａｃおよびＢｃｌ－２からなる群より選択されるバイオマーカーのレベルを決定する工程、ならびに（ｂ）第一または第二の患者グループのいずれかに属するとして患者を分類する工程、を包含し、ここで、低レベルのＴＵＣＡＮおよび高レベルのＡｐａｆ１、ＳｍａｃまたはＢｃｌ－２のいずれかを有する第一のグループの

患者は、高レベルのＴＵＣＡＮおよび低レベルのＡｐａｆ１、ＳｍａｃまたはＢｃｌ－２のいずれかを有する第二のグループの患者と比較して、生存の可能性が増大しているとして分類される。

【００９８】

患者サンプル中の１以上のバイオマーカーのレベルを決定し、参照レベルと比較した後、次いで、患者は、疾患に罹患していない生存の特定の可能性または全体的生存の特定の可能性を有するグループへと分類される。次いで、患者についての疾患を有さない可能性または全体的生存の可能性は、そのグループ中の患者についての患者についての疾患を有さない可能性または全体的生存の可能性に基づいて評価される。

【００９９】

例えば、癌患者由来の新生物細胞含有サンプルは、参照レベルと比較して、高レベルのＡｐａｆ１、Ｂｃｌ－２またはＳｍａｃを有すると決定され得る。次いで、この患者は、高レベルのＡｐａｆ１、Ｂｃｌ－２またはＳｍａｃを有する患者のグループへと分類される。（癌細胞中で低レベルのＡｐａｆ１、Ｂｃｌ－２またはＳｍａｃを発現する患者のグループと比較して）癌細胞中で高レベルのＡｐａｆ１、Ｂｃｌ－２またはＳｍａｃを発現する患者のグループについての、疾患が存在しない可能性または全体的生存の可能性が増大していることが発見されているので、特定の癌患者は、疾患が存在しない生存の可能性または全体的生存の可能性が増大しているとみなされる。

【０１００】

逆に、癌患者由来の新生物細胞含有サンプルは、参照レベルと比較して、高レベルのｃＩＡＰ２、β－カテニンまたはＴＵＣＡＮを有すると決定され得る。次いで、この患者は、高レベルのｃＩＡＰ２、β－カテニンまたはＴＵＣＡＮを有する患者のグループへと分類される。（癌細胞中で低レベルのｃＩＡＰ２、β－カテニンまたはＴＵＣＡＮを発現する患者のグループと比較して）癌細胞中で高レベルのｃＩＡＰ２、β－カテニンまたはＴＵＣＡＮを発現する患者のグループについての、疾患が存在しない生存の可能性または全体的生存の可能性が減少していることが発見されているので、特定の癌患者は、疾患に罹患していない生存の可能性または全体的生存の可能性が減少しているとみなされる。

【０１０１】

本発明の方法は、癌の発達についての個体の感受性を決定するために適用可能である。この方法は、種々の癌（胃腸、肺、結腸、前立腺、乳房、卵巣、皮膚、血液および腎臓の癌を含む）に対して適用可能である。特に、結腸癌は、腺腫様結腸ポリープとして公知の前悪性前駆病変から発達する。複数の疫学的研究は、家族の一員が一旦腺腫様結腸ポリープを発症すると、その兄弟姉妹は、結腸腺腫および結腸癌の両方を発症する危険性が非常に上昇していることを実証した。当業者は、本発明の方法が、例えば、適切な生検サンプルを収集することによって、結腸新生物状態（例えば、腺腫様結腸ポリープ）を含む新生物状態について本明細書中に記載されるように実施され得る。

【０１０２】

癌患者の生存についての予後を決定するための本発明の方法は、腫瘍進行の任意の病期において患者に適用可能であり、そしてさらに、腫瘍進行の病期を決定するために使用され得る。腫瘍の病期とは、腫瘍の進行の程度をいう。腫瘍発達の種々の病期は、Ｍａｒｋｍａｎ「Ｂａｓｉｃ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｍｅｄｉｃｉｎｅ」、Ｓａｕｎｄｅｒｓ（Ｚｏｒａｂ，Ｒ．編）（１９９７）中に例示されるように、当業者に周知である。例えば、癌は、以下の３つの一般的な病期に病期分けされ得る：局在、局所的広がりおよび離れた広がり。癌はまた、ＴＮＭシステムを使用して病期分けされ得、このシステムは、罹患した組織および近傍の組織内への直接的広がりの程度、リンパ節近傍への広がりの程度、ならびに離れた器官への広がりの程度を考慮する。これらの特徴に基づいて、癌の広がりは、０～ＩＶまでのローマ数字を割り当てることによって要約され得る。当業者は、特定の型の癌に適切な病期分け系を選択し得る。

【０１０３】

特に、結腸癌は、Ｄｕｋｅｓ系、Ａｓｔｌｅｒ－Ｃｏｌｌｅｒ系およびＡＪＣＣ／ＴＮ

M系を使用して段階分けされ得、これらの系は、結腸または直腸の壁の層、結腸および直腸に隣接する器官、ならびに遠く離れた他の器官に関連する癌の広がりを記載する。Ｄｕｋｅｓ病期Ａは、ＡＪＣＣ／ＴＮＭ病期ＩおよびＡｓｔｌｅｒ－Ｃｏｌｌｅｒ病期Ａ、ＢＩと等価であり；Ｄｕｋｅ病期Ｂは、ＡＪＣＣ／ＴＮＭ病期ＩＩおよびＡｓｔｌｅｒ－Ｃｏｌｌｅｒ病期Ｂ２、Ｂ３と等価である。Ｄｕｋｅｓ病期Ｃは、ＡＪＣＣ／ＴＮＭ病期ＩＩＩおよびＡｓｔｌｅｒ－Ｃｏｌｌｅｒ病期Ｃ１、Ｃ２、Ｃ３と等価である。結腸直腸がんのＡＪＣＣ／ＴＮＭ病期は、以下のようである：病期０：この癌は、結腸または直腸の内層（粘膜）を越えて増殖していない。この病期は、またはインサイチュ癌腫または粘膜内癌腫としても公知である；病期Ｉ：この癌は、粘膜から粘膜下へと増殖しているか、または固有（ｐｒｏｐｒｉａ）筋層へも増殖しているかもしれないが、壁自体の外側に、リンパ節のような近傍組織へと広がってはいない；病期ＩＩ：この癌は、結腸または直腸の壁を越えて、最外層へと増殖しており、そして他の近傍組織を浸潤しているかもしれないが、近傍のリンパ節へと広がってはいない；病期ＩＩＩ：この癌は、任意の大きさであり得るが、３個以下の近傍リンパ節に広がっているか、または４個以上の節に広がっているが、身体の他の部分へは広がっていない；病期ＩＶ：この癌は、離れた器官（例えば、肝臓、肺、腹膜または卵巣）に広がっている。

【０１０４】

腫瘍発達の初期段階は、原発性腫瘍の器官に対して局所的なリンパ節以上には検出可能に広がっていない、腫瘍発達中の病期をいうことが理解されるべきである。代表的に、初期病期は、病期ＩおよびＩＩであるとみなされる。

【０１０５】

本発明の方法の予測的価値は、癌の初期病期の患者の場合に特に有効である。これは、本発明の方法が、検査の時点で測定可能な転移を実証しない患者における転移の危険性を決定する際に、有利に有効であるからである。当業者は、病期Ｉの癌に罹患している癌患者についての生存率の予後指標が、病期ＩＶの癌に罹患している癌患者についての生存率の予後指標とは異なり得ることを理解する。例えば、病期Ｉの癌患者についての予後は、癌の継続的増殖および／または転移の可能性に向けられ得、一方で、病期ＩＶの癌患者についての予後は、癌を処置するための治療方法の有効性の可能性に向けられ得る。

【０１０６】

癌進行の病期は、１以上のバイオマーカーのレベル（例えば、ＴＵＣＡＮ、Ａｐａｆ１またはＩＡＰ（例えば、ｃＩＡＰ２）またはＳｍａｃのレベル）と相関し得る。従って、癌患者由来のサンプルにおけるバイオマーカーのレベルの決定は、このサンプルを特定の病期の癌のバイオマーカー指標の参照レベルと比較することによって、得られたサンプル由来の腫瘍の病期を決定するために使用され得る。

【０１０７】

本発明の方法は、癌または新生物状態を有するかまたは有する疑いのある個体から単離または獲得された、種々の異なる型のサンプルを用いる使用のために適用可能である。例えば、本発明の１以上の予後形式における使用のために適用可能なサンプルとしては、組織サンプルおよび細胞サンプルが挙げられる。組織サンプルまたは細胞サンプルは、例えば、生検または手術によって患者から得られた流体サンプルから獲得され得る。例えば、転移していない固形腫瘍の場合、手術によって取り出された腫瘍由来の組織サンプルは、従来の技術によって試験するために、獲得および調製され得る。さらに、サンプルは、例えば、周知の生検手順を使用して、患者から取り出され得る。例えば、結腸癌の場合、非常に小さい隆起したポリープのサンプルを得るために、結腸鏡がスネアに嵌合されて、結腸の壁に対する損傷なしにポリープを取り出し得る（ポリープ切除術）；または小さい平らなポリープを得るために、生検鉗子が結腸鏡に装着されて、小さい組織サンプルを収集し得る。

【０１０８】

以下に記載するように、そして方法の形式に依存して、この組織は、全体で使用され得るか、または当該分野で公知の種々の方法に供されて、サンプルをより小さい細片、細胞

凝集物または個々の細胞へと分離し得る。さらに、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）のような増幅方法と組み合わせた場合に、単一細胞サンプルは、ハイブリダイゼーション検出方法を使用する本発明の予後アッセイにおける使用に十分である。同様に、バイオマーカーのポリペプチドレベルを測定する場合、酵素カップリングまたは光度測定増強を用いる信号の増幅は、いくつかまたは少数の細胞だけを用いて使用され得る。

【０１０９】

生検または手術から得られた全組織は、新生物細胞含有サンプルの１例である。腫瘍組織細胞サンプルは、以下に記載の形式のいずれかを使用してアッセイされ得る。例えば、腫瘍組織サンプルは、取り付けられ、そしてバイオマーカー核酸プローブとインサイチュでハイブリダイズされ得る。タンパク質検出方法およびインサイチュ活性アッセイを使用する類似の組織学的形式もまた、全組織腫瘍細胞サンプル中のバイオマーカーポリペプチドを検出するために使用され得る。タンパク質検出方法としては、例えば、本明細書中の実施例ＩＩに記載されるような、バイオマーカー特異的抗体を用いる染色が挙げられる。このような組織学的方法および当該分野で周知の他の方法は、新生物細胞含有サンプルの供給源として全組織を使用する本発明の予後方法における使用のために適用可能である。サンプルを調製および取り付けするための方法は、当該分野で周知である。

【０１１０】

新生物状態または癌を有するかまたは有することが疑われる個体由来の個々の細胞および細胞凝集物は、バイオマーカーのＲＮＡまたはポリペプチドの発現の増加または減少について分析され得る新生物細胞含有サンプルの別の例である。これらの細胞は、培養物中で増殖され得、そして上記のような手順を使用して分析され得る。バイオマーカー発現に関連する細胞表面マーカーを発現する全細胞サンプルは、蛍光活性化細胞分類または磁気活性化細胞分類（ＦＡＣＳまたはＭＡＣＳ）を、表面マーカーに選択的な標識された結合剤を用いて、または例えば、特定の細胞集団について選択的な結合剤を用いて使用し、次いで、この集団内のバイオマーカーのレベルを決定して、迅速に試験され得る。バイオマーカーのレベルは、例えば、バイオマーカーについての結合特異的反応剤を使用して、またはバイオマーカー特異的プローブへのハイブリダイゼーションによって、決定され得る。全細胞サンプル中のバイオマーカーのレベルを測定するための他の方法は、当該分野で公知であり、そして以下に記載される予後形式のいずれかにおいて同様に適用可能である。

【０１１１】

個体から獲得された組織腫瘍細胞サンプルまたは全細胞腫瘍細胞サンプルはまた、本明細書中に記載される形式のいずれかを使用して、細胞を溶解し、そしてこの溶解物、その分画された部分またはその精製成分中のバイオマーカーのレベルを測定することによって、バイオマーカーレベルの増加または減少について分析され得る。例えば、ハイブリダイゼーション形式が使用される場合、バイオマーカーＲＮＡは、ＰＣＲまたは当該分野で周知の他の増幅手順（例えば、バイオマーカー核酸分子のレベルを直接測定するための、ＲＴ－ＰＣＲ、５’ＲＡＣＥまたは３’ＲＡＣＥ）を使用して、溶解物から直接増幅され得る。ＲＮＡはまた、単離され得、そして例えば、溶液ハイブリダイゼーションによって直接的に探査され得るか、または固定化ＲＮＡへのハイブリダイゼーションによって間接的に探査され得る。同様に、ポリペプチド検出形式を使用してバイオマーカーのレベルを決定する場合、溶解物は直接アッセイされ得るか、またはバイオマーカーについて富化するために、さらに分画され得る。例えば、免疫化学的方法（例えば、イムノブロット分析（実施例ＩＩＩを参照のこと））が、新生物細胞含有サンプルを使用して実施され得る。全腫瘍細胞サンプルでの使用に適用可能な多数の他の方法は、当業者に周知であり、そして本発明の方法においてしかるべく使用され得る。

【０１１２】

腫瘍組織または細胞サンプルは、個体から直接的に獲得され得るか、あるいは、試験用に他の供給源から獲得され得る。同様に、細胞サンプルは、新たに単離されたときに試験され得るか、または正確さまたは感受性を実質的に失うことなく、短期間もしくは長期間

凍結保存された後に試験され得る。サンプルが、不確定な期間の後に試験される場合、そのサンプルは、獲得され得、次いで、凍結保存され得るか、または、例えば、短期間４℃で保存され得る。本発明の予後方法の利点は、サンプルの組織学的分析を必要としないことである。従って、サンプルは、最初に脱凝集され得るか、溶解され得るか、分画され得るか、または精製され得、そして活性成分が、後の診断のために保存される。

【０１１３】

本発明の予後方法は、腫瘍細胞サンプルではない種々の異なる型のサンプルを用いる用途に適用可能である。例えば、細胞外空間（循環液および他の体液を含む）に放出されるバイオマーカーポリペプチドまたはそのフラグメントが、バイオマーカーポリペプチドに関連する分泌型ポリペプチドまたはフラグメントを検出するための予後方法において使用され得る。このような場合、本発明の方法は、新生物状態または癌を有するかまたは有することが疑われる個体から収集された液体サンプルを用いて適用可能である。

【０１１４】

バイオマーカーレベルについて測定され得る液体サンプルとしては、例えば、血液、血清、リンパ液、尿、または糞便が挙げられる。他の体液は、当業者に公知であり、そして、同様に、本発明の予後方法においてサンプルとしての用途に適用可能である。液体サンプルを分析する１つの利点は、それらが、生検および手術に必要とされるような浸襲手順を伴わずに十分な量で容易に獲得可能であることである。液体サンプル（例えば、血液、血清、および尿）の分析は、一般的に、本明細書中に記載される、バイオマーカーポリペプチドレベルを測定する予後形式である。バイオマーカーに関連するポリエピトープは、溶液形態で循環しているので、この方法は、細胞溶解物、それらの分画部分、または精製成分から発現レベルを測定する方法と同様である。

【０１１５】

新生物状態および癌は、腫瘍性細胞含有サンプル、循環液、または個体から獲得され得る他の体液中のバイオマーカーレベルを測定することにより、診断、予測、または予後され得る。本明細書中に記載される場合、バイオマーカーのレベルは、当該分野で公知の種々の方法により測定され得る。

【０１１６】

当業者は、本明細書中に提供される教示および手引きが与えられれば、適切なアッセイ系を容易に決定し得、そしてＲＮＡまたはポリペプチドの測定に基づく方法を選択し得る。サンプルの型、利用可能性、および量のような考慮もまた、特定の予後形式の選択に影響を与える。例えば、サンプルが腫瘍細胞サンプルであり、少量しか利用可能でない場合、例えば、ＰＣＲ増幅によってバイオマーカーＲＮＡの量を測定するか、または例えば、ＦＡＣＳ分析によってバイオマーカーポリペプチドを測定する予後形式が、バイオマーカーのレベルを決定するのに適切な選択であり得る。あるいは、サンプルが血液サンプルであり、そしてユーザーが多くの異なるサンプルを同時に分析する（例えば、臨床環境にて）場合、バイオマーカーポリペプチドの量を測定する多サンプル形式（例えば、酵素連結イムノソルベントアッセイ（ＥＬＩＳＡ））が、バイオマーカーのレベルを決定するのに適切な選択であり得る。さらに、腫瘍性細胞または病理学的細胞から体液中に放出されるバイオマーカー核酸分子はまた、例えば、ＰＣＲまたはＲＴ－ＰＣＲによって分析され得る。当業者は、どの形式が特定の適用に受け入れられるか、および当該分野で公知のどの方法または改変が特定の型の形式と適合可能かを認知しているかまたは決定し得る。

【０１１７】

核酸プローブは、当該分野で周知の方法を用いて、組換え合成または化学合成され得る。さらに、ハイブリダイゼーションプローブは、種々の検出可能な標識（例えば、放射性同位元素、蛍光タグ、レポーター酵素、ビオチン、および他のリガンドを含む）で標識され得る。さらに、このような検出可能な標識は、分光光度測定検出のために、例えば、比色指標基質または測光指標基質と連結され得る。このようなプローブを標識および検出する方法は、当該分野で周知であり、そして例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋら、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ、第２版、Ｃｏｌｄ

Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｐｒｅｓｓ、Ｐｌａｉｎｖｉｅｗ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９８９）、およびＡｕｓｕｂｅｌら、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ（補遺４７）、Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９９９）に記載されているのが見出され得る。

【０１１８】

サンプル中のバイオマーカーを検出するのに有用な核酸プローブは、当業者に容易に決定される、種々のストリンジェンシー条件下でハイブリダイズされ得る。特定のアッセイに依存して、当業者は、ストリンジェンシー条件を、特定のサンプル型における特定のバイオマーカーの検出に最適化するよう容易に変更し得る。

【０１１９】

一般的には、ハイブリッドの安定性は、イオン濃度および温度の関数である。代表的には、ハイブリダイゼーション反応は、低ストリンジェンシーの条件下で実施され、その後、種々の（しかしより高い）ストリンジェンシーで洗浄される。中程度にストリンジェントなハイブリダイゼーションとは、核酸分子（例えば、プローブ）が相補的な核酸分子に結合することを許容する条件をいう。ハイブリダイズした核酸分子は、一般的に、少なくとも６０％の同一性、少なくとも７５％の同一性、少なくとも８５％の同一性、または少なくとも９０％の同一性を有する。中程度にストリンジェントな条件は、５０％ホルムアミド、５×Ｄｅｎｈａｒｔ溶液、５×ＳＳＰＥ、０．２％ ＳＤＳ中、４２℃でのハイブリダイゼーション、それに続く０．２×ＳＳＰＥ、０．２％ ＳＤＳ中、４２℃での洗浄と等価な条件である。高ストリンジェンシー条件は、例えば、５０％ホルムアミド、５×Ｄｅｎｈａｒｔ溶液、５×ＳＳＰＥ，０．２％ ＳＤＳ中、４２℃でのハイブリダイゼーション、それに続く、０．１×ＳＳＰＥおよび０．１％ＳＤＳ中、６５℃での洗浄により提供され得る。

【０１２０】

低ストリンジェンシーハイブリダイゼーションとは、１０％ホルムアミド、５×Ｄｅｎｈａｒｔ溶液、６×ＳＳＰＥ、０．２％ ＳＤＳ中、２２℃でのハイブリダイゼーション、それに続く１×ＳＳＰＥ、０．２％ ＳＤＳ中、３７℃での洗浄と等価な条件をいう。Ｄｅｎｈａｒｔ溶液は、１％Ｆｉｃｏｌｌ、１％ポリビニルピロリドン、および１％ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）を含む。２０×ＳＳＰＥ（塩化ナトリウム、リン酸ナトリウム、エチレンジアミド四酢酸（ＥＤＴＡ））は、３M塩化ナトリウム、０．２Mリン酸ナトリウム、および０．０２５M（ＥＤＴＡ）を含む。他の適切な中程度のストリンジェンシーおよび高ストリンジェンシーのハイブリダイゼーション緩衝液および条件は、当業者に周知であり、そして例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋら、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ、第2版、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｐｒｅｓｓ、Ｐｌａｉｎｖｉｅｗ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９８９）；およびＡｕｓｕｂｅｌら、前出、１９９９）に記載されている。ポリペプチドをコードする核酸分子は、中程度にストリンジェントな条件下または高ストリンジェンシー条件下で、ｃＩＡＰ２、ＴＵＣＡＮ、Ａｐａｆ１、Ｂｃｌ－２、Ｓｍａｃ、β－カテニン、または別のバイオマーカーの核酸配列の全配列、または実質的な部分（例えば、代表的に、少なくとも１５～３０ヌクレオチド）にハイブリダイズする。

【０１２１】

本発明は、多量または少量の特定のバイオマーカー（ｃＩＡＰ２、ＴＵＣＡＮ、Ａｐａｆ１、Ｂｃｌ－２、βカテニン、およびＳｍａｃを含む）が、癌を有する患者の生存度の指標となるという発見に関連する。これらのバイオマーカーの過剰発現または発現抑制は、制御されない増殖を誘導する癌細胞の遺伝子的機能不全に寄与し得る。従って、癌細胞におけるバイオマーカーのレベルの、正常細胞と一致するレベルへの調節は、癌細胞を、より正常な増殖状態に戻すために使用され得る。過剰発現されるバイオマーカー遺伝子（例えば、ｃＩＡＰ２、ＴＵＣＡＮ、およびｂ－カテニン）の場合、種々のストラテジーが、遺伝子発現を減少させるために使用され得る。例えば、ｃＩＡＰ２、ＴＵＣＡＮ、およびｂ－カテニンの転写もしくは翻訳の開始、またはｃＩＡＰ２、ＴＵＣＡＮ、およびｂ－

カテニンポリペプチドの活性量の減少が、これらのバイオマーカーのレベルを正常細胞で示されるレベルまで減少させるために使用され得る。発現抑制されるバイオマーカー遺伝子（Ａｐａｆ１、Ｂｃｌ－２、およびＳｍａｃ）の場合、種々のストラテジーが、遺伝子発現を増大するのに使用され得る。例えば、外因性核酸分子由来のＡｐａｆ１、Ｂｃｌ－２、もしくはＳｍａｃの導入、Ａｐａｆ１、Ｂｃｌ－２、もしくはＳｍａｃの転写または翻訳の促進、または活性なＡｐａｆ１、Ｂｃｌ－２、またはＳｍａｃポリペプチドの量の促進が、これらのバイオマーカーのレベルを正常な細胞で示されるレベルまで増大させるのに使用され得る。

【０１２２】

従って、本発明は、さらに、新生物状態（例えば、癌）の進行を、腫瘍性細胞増殖を減少させることにより処置または減少させる方法を提供する。１つの実施形態において、本方法は、Ａｐａｆ１、Ｂｃｌ－２、またはＳｍａｃをコードする核酸を、腫瘍性細胞に投与する工程および腫瘍性細胞増殖を減少させるのに有効な量でＡｐａｆ１、Ｂｃｌ－２、またはＳｍａｃポリペプチドを発現する工程を包含する。別の実施形態において、腫瘍性細胞増殖を減少する方法は、十分な条件下で、細胞中でＡｐａｆ１、Ｂｃｌ－２、またはＳｍａｃの量を増加する有効量の薬剤と、腫瘍性細胞とを接触させる工程を包含する。

【０１２３】

このような薬剤は、例えば、細胞中でのバイオマーカーポリペプチドの量を増大することにより（例えば、増加したｍＲＮＡ発現を刺激することにより）、直接的にかまたは間接的にバイオマーカーの量を増大し得る。Ａｐａｆ１、Ｂｃｌ－２、またはＳｍａｃのｍＲＮＡ発現は、例えば、Ａｐａｆ１、Ｂｃｌ－２、またはＳｍａｃの遺伝子の転写を誘導または抑制解除することにより、および遺伝子発現を調節する転写因子として作用する細胞タンパク質の発現を調節することにより、増大され得る。薬剤は、Ａｐａｆ１、Ｂｃｌ－２、またはＳｍａｃのｍＲＮＡまたはポリペプチドの安定性を増大することにより（例えば、細胞分解活性（例えば、プロテアーゼ活性）を減少させることにより）、Ａｐａｆ１、Ｂｃｌ－２、またはＳｍａｃの量を増大するよう作用し得る。Ａｐａｆ１、Ｂｃｌ－２、またはＳｍａｃの発現の調節を媒介する分子（例えば、レセプターおよび対応するシグナル伝達分子）はまた、細胞中でのＡｐａｆ１、Ｂｃｌ－２、またはＳｍａｃの量を増大する薬剤の標的であり得る。例えば、Ａｐａｆ１、Ｂｃｌ－２、またはＳｍａｃの発現を刺激するシグナル伝達経路は、例えば、Ａｐａｆ１、Ｂｃｌ－２、またはＳｍａｃの合成速度または遺伝子発現が活発である時間を増加させることにより、Ａｐａｆ１、Ｂｃｌ－２、またはＳｍａｃの発現レベルを増大するよう調節され得る。

【０１２４】

結果的に、細胞中でのバイオマーカーの量の減少は、上記と反対のバイオマーカーの転写、翻訳、またはタンパク質の安定性の変化を誘導することにより影響を受け得る。このように、さらなる実施形態において、腫瘍性細胞の増殖を減少する方法は、十分な条件下で、細胞中でｃＩＡＰ２、ｂ－カテニン、またはＴＵＣＡＮの量を減少する有効量の薬剤と、腫瘍性細胞とを接触する工程を包含する。

【０１２５】

細胞中でのバイオマーカー（例えば、ｃＩＡＰ２、ＴＵＣＡＮ、ｂ－カテニン、Ｂｃｌ－２、Ａｐａｆ１、またはＳｍａｃ）の量は、例えば、外因性核酸分子由来のバイオマーカーの発現を増加させることにより、バイオマーカーポリペプチドまたはその機能的アナログを細胞中に導入することにより、バイオマーカーポリペプチドのインヒビターを細胞中に導入することにより、そして細胞中のバイオマーカーのレベルを調節する遺伝子またはタンパク質産物の発現または活性を調節することにより、調節され得る。細胞中のバイオマーカーの量はまた、バイオマーカーｍＲＮＡの転写または翻訳をブロックするアンチセンス分子を用いて調節され得る。詳細には、細胞は、ｃＩＡＰ２、β－カテニン、またはＴＵＣＡＮ核酸分子に相補的な配列で形質転換され得る。このような方法は、当該分野で周知であり、そしてセンスもしくはアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはそれより長いフラグメントは、バイオマーカーをコードする配列のコード領域または制御領域に沿っ

て種々の位置から設計され得る。従って、アンチセンス分子は、バイオマーカー活性を調節するため、または遺伝子機能の調節を達成するために使用され得る。

【０１２６】

酵素的ＲＮＡ分子であるリボザイムはまた、バイオマーカーｍＲＮＡ（例えば、ｃＩＡＰ２、β－カテニン、またはＴＵＣＡＮ）の特異的切断を触媒するために使用され得る。リボザイム作用の機構は、相補的標的であるバイオマーカーＲＮＡに対するリボザイム分子の配列特異的ハイブリダイゼーション、それに続くヌクレオチド内部分解切断を含む。任意の潜在的なＲＮＡ標的内の特異的なリボザイム切断部位は、以下の配列を含むリボザイム切断部位についてバイオマーカーＲＮＡをスキャンすることにより同定される：ＧＵＡ、ＧＵＵ、およびＧＵＣ。一旦同定されると、この切断部位を含む標的遺伝子の領域に対応する１５リボヌクレオチドと２０リボヌクレオチドとの間の短いＲＮＡ配列は、そのオリゴヌクレオチドを手術不能にし得る二次構造の特徴について評価され得る。候補標的の適合性はまた、リボヌクレアーゼ保護アッセイを用いて、相補的オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションに対するアクセシビリティを試験することによって評価され得る。本発明のアンチセンス分子およびリボザイムは、核酸分子の合成について当該分野で公知の任意の方法により調製され得る。

【０１２７】

ＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）はまた、バイオマーカーｍＲＮＡ（例えば、ｃＩＡＰ２、β－カテニン、またはＴＵＣＡＮ）の量を調節するために使用され得る。ＲＮＡｉは、翻訳後ＲＮＡ分解による配列特異的遺伝子サイレンシングのプロセスである。このプロセスは、配列中のサイレンシングを受ける遺伝子と相同な二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）により開始される。ＲＮＡｉに適切な二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）は、１９ＲＮＡ塩基対を形成し、各々の３’末端に２ヌクレオチドのオーバーハングを残す、標的化される遺伝子に対応する約２１連続ヌクレオチドのセンス鎖およびアンチセンス鎖を含む（Ｅｌｂａｓｈｉｒら、Ｎａｔｕｒｅ　４１１：４９４－４９８（２００１）；Ｂａｓｓ、Ｎａｔｕｒｅ　４１１：４２８－４２９（２００１）；Ｚａｍｏｒｅ、Ｎａｔ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．８：７４６－７５０（２００１））。約２５～３０ヌクレオチドのｄｓＲＮＡもまた、ＲＮＡｉとしての使用に成功している（Ｋａｒａｂｉｎｏｓら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．９８：７８６３－７８６８（２００１））。ｄｓＲＮＡは、インビトロで合成され得、そして当該分野で公知の手段により細胞中に導入され得る。

【０１２８】

細胞（癌細胞を含む）中への核酸分子の導入のための種々の方法が、当該分野で公知である。このような方法としては、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、リポフェクション、リン酸カルシウム媒介トランスフェクション、ＤＥＡＥ－デキストラン媒介トランスフェクション、ポリブレン媒介トランスフェクションまたはポリリジン媒介トランスフェクション、および抗体、グラミシジンＳ、人工ウイルスエンベロープまたは他の細胞内キャリア（例えば、ＴＡＴ）への結合が挙げられる。例えば、細胞は、Ｃｉｂｅｌｌｉら、Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．１６：６４２－６４６（１９９８）またはＬａｍｂおよびＧｅａｒｈａｒｔ、Ｃｕｒ．Ｏｐｉｎ．Ｇｅｎ．Ｄｅｖ．５：３４２－３４８（１９９５）に記載されるようにマイクロインジェクションにより；またはＣｈｏｉ（米国特許第６，０６９，０１０号）またはＬａｍｂおよびＧｅａｒｈａｒｔ、Ｃｕｒ．Ｏｐｉｎ．Ｇｅｎ．Ｄｅｖ　５．３４２－３４８（１９９５）に記載されるようにリポフェクションにより；Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ、Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ　ａｎｄ　Ｓｏｎｓ、ｐｐ９．１６．４～．９．１６．１１（２０００）またはＣｉｂｅｌｌｉら、Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．１６：６４２－６４６（１９９８）に記載されるようにエレクトロポレーションにより；あるいは、酵母スフェロプラストとの融合により（ＬａｍｂおよびＧｅａｒｈａｒｔ、Ｃｕｒ．Ｏｐｉｎ．Ｇｅｎ．Ｄｅｖ．５：３４２－３４８（１９９５））、形質転換され得る。

【０１２９】

バイオマーカーポリペプチド（例えば、Ａｐａｆ１、Ｂｃｌ－２、またはＳｍａｃ）、

または癌細胞の増殖を減少させるのに有用な他の分子をコードする核酸は、当該分野で周知の適切なベクターを用いて、インビボまたはインビトロのいずれかで、哺乳動物細胞に送達され得る。バイオマーカーポリペプチドをコードする核酸を哺乳動物細胞に送達するのに適切なベクターとしては、ウイルスベクターおよび非ウイルスベクター（例えば、プラスミドベクター）が挙げられる。このようなベクターは、治療量のバイオマーカーポリペプチド（例えば、Ａｐａｆ１、Ｂｃｌ－２、またはＳｍａｃ）を提供するため、ならびにアンチセンス核酸分子およびリボザイムを送達するために有用である。

【０１３０】

ウイルスベースの系は、種々の細胞に比較的高レベルの異種核酸を導入し得るという利点を提供する。バイオマーカーポリペプチド（例えば、Ｂｃｌ－２、Ｓｍａｃ、またはＡｐａｆ１）をコードする核酸を哺乳動物細胞に導入するのに適切なウイルスベクターは、当該分野で周知である。これらのウイルスベクターとしては、例えば、単純疱疹ウイルスベクター（Ｇｅｌｌｅｒら、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２４１：１６６７－１６６９（１９８８））；ワクシニアウイルスベクター（Ｐｉｃｃｉｎｉら、Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ、１５３：５４５－５６３（１９８７））；サイトメガロウイルスベクター（Ｍｏｃａｒｓｋｉら、Ｖｉｒａｌ　Ｖｅｃｔｏｒｓ、Ｙ．ＧｌｕｚｍａｎおよびＳ．Ｈ．Ｈｕｇｈｅｓ編、Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ、Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ、Ｎ．Ｙ．、１９８８、ｐｐ．７８－８４））；モロニーマウス白血病ウイルス（Ｄａｎｏｓら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、８５：６４６０－６４６４（１９８８）；Ｂｌａｅｓｅら、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２７０：４７５－４７９（１９９５）；Ｏｎｏｄｅｒａら、Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．、７２：１７６９－１７７４（１９９８））；アデノウイルスベクター（Ｂｅｒｋｎｅｒ、Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ、６：６１６－６２６（１９８８）；Ｃｏｔｔｅｎら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、８９：６０９４－６０９８（１９９２）；Ｇｒａｈａｍら、Ｍｅｔｈ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、７：１０９－１２７（１９９１）；Ｌｉら、Ｈｕｍａｎ　Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒａｐｙ、４：４０３－４０９（１９９３）；Ｚａｂｎｅｒら、Ｎａｔｕｒｅ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ、６：７５－８３（１９９４））；アデノ随伴ウイルスベクター（Ｇｏｌｄｍａｎら、Ｈｕｍａｎ　Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒａｐｙ、１０：２２６１－２２６８（１９９７）；Ｇｒｅｅｌｉｓｈら、Ｎａｔｕｒｅ　Ｍｅｄ．、５：４３９－４４３（１９９９）；Ｗａｎｇら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、９６：３９０６－３９１０（１９９９）；Ｓｎｙｄｅｒら、Ｎａｔｕｒｅ　Ｍｅｄ．、５：６４－７０（１９９９）；Ｈｅｒｚｏｇら、Ｎａｔｕｒｅ　Ｍｅｄ．、５：５６－６３（１９９９））；レトロウイルスベクター（Ｄｏｎａｈｕｅら、Ｎａｔｕｒｅ　Ｍｅｄ．、４：１８１－１８６（１９９８）；Ｓｈａｃｋｌｅｆｏｒｄら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、８５：９６５５－９６５９（１９８８）；米国特許第４，４０５，７１２号、同第４，６５０，７６４号、および同第５，２５２，４７９号、ならびにＷＩＰＯ公開ＷＯ９２／０７５７３、ＷＯ９０／０６９９７、ＷＯ８９／０５３４５、ＷＯ９２／０５２６６、およびＷＯ９２／１４８２９；ならびにレンチウイルスベクター（Ｋａｆｒｉら、Ｎａｔｕｒｅ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ、１７：３１４－３１７（１９９７））が挙げられる。永久的発現および一過的発現の両方が、本発明の方法において有用であり得ることが理解される。

【０１３１】

Ａｐａｆｌポリペプチド、Ｂｃｌ－２ポリペプチドまたはＳｍａｃポリペプチドをコードする組換え核酸は、例えば、ベクター標的性遺伝子発現または組織限定的遺伝子発現によって、特定の組織または器官系に指向され得る。従って、Ａｐａｆｌポリペプチド、Ｂｃｌ－２ポリペプチドまたはＳｍａｃポリペプチドをコードする核酸の治療投与のために有用なベクターは、ポリペプチドの組織特異的発現を提供する調節エレメントを含み得る。例えば、Ａｐａｆｌポリペプチド、Ｂｃｌ－２ポリペプチドまたはＳｍａｃポリペプチドをコードする核酸配列は、細胞特異的プロモーターに作動可能に連結され得る。

【０１３２】

任意の種々の誘導可能なプロモーターまたはエンハンサーもまた、本発明の核酸またはベクター中に含まれ得、これらは、Ａｐａｆｌポリペプチド、Ｂｃｌ－２ポリペプチドまたはＳｍａｃポリペプチド、あるいは細胞増殖を調節するために有用な別の分子（例えば、アンチセンス核酸分子またはリボザイム）の発現を、追加刺激または追加分子によって制御することを可能にする。このような誘導可能な系としては、例えば、以下が挙げられる：テトラサイクリン誘導系（ＧｏｓｓｅｎおよびＢｉｚａｒｄ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８９：５５４７－５５５１（１９９２）；Ｇｏｓｓｅｎら、Ｓｃｉｅｎｃｅ，２６８：１７６６－１７６９（１９９５）；Ｃｌｏｎｔｅｃｈ，Ｐａｌｏ　Ａｌｔｏ，ＣＡ）；重金属によって誘導されるメタロチオネンプロモーター；エクジソンまたは関連ステロイド（例えば、ムリステロン（ｍｕｒｉｓｔｅｒｏｎｅ））に応答性の昆虫ステロイドホルモン（Ｎｏら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，９３：３３４６－３３５ｌ（１９９６）；Ｙａｏら、Ｎａｔｕｒｅ，３６６：４７６－４７９（１９９３）；Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）；グルココルチコイドおよびエストロゲンのようなステロイドによって誘導されるマウス乳癌ウイルス（ＭＭＴＶ）（Ｌｅｅら、Ｎａｔｕｒｅ，２９４：２２８－２３２（１９８１）；ならびに、温度変化によって誘導可能な熱ショックプロモーター。

【０１３３】

治療投与のために特に有用な誘導可能な系は、個体に投与される所定の薬物レベルに応答して、治療用生成物レベルを送達し、かつその薬物の非存在下において治療用生成物の発現をほとんど有さないかまたは全く有さないように、調節され得る誘導可能なプロモーターを利用する。１つのこのような系は、改変したアデノウイルスベクター中で、ミフェプリストンのような抗黄体ホルモンによって誘導可能であるＧａ１４融合体を利用する（Ｂｕｒｉｅｎら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，９６：３５５－３６０（１９９９）。ＧＥＮＥ　ＳＷＩＴＣＨの誘導可能な発現系（米国特許第５，９３５，９３４号および同第５，８７４，５３４号）は、このような系の一例である。他の誘導可能な系は、アデノ随伴ウイルスベクターにおいて、ＦＫＢＰ１２およびＦＲＡＰのラパマイシン結合ドメインを含有する転写性アクチベータの再構築を誘導するために、薬物ラパマイシンを使用し（Ｙｅら、Ｓｃｉｅｎｃｅ，２８３：８８－９１（１９９９））、転写を制御するためにテトラサイクリンを使用し（Ｂａｒｏｎ　Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．２５：２７２３－２７２９，（１９９７））、そして、遺伝子発現を調節するために合成二量体（ｄｉｍｅｒｉｚｅｒ）を使用する（Ｐｏｌｌｏｃｋら、Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｅｎｚｙｍｏｌ．３０６：２６３－２８１（１９９９））。このような調節可能で誘導可能な系が、有利である。なぜなら、治療用生成物の発現レベルが、個体に投与される薬物の量によって制御され得るか、または所望の場合、この治療生成物の発現が、薬物の投与を停止することによって終結され得るからである。

【０１３４】

本発明の種々の実施形態の活性化に実質的に影響しない改変もまた、本明細書中に適用される本発明の定義内に包含されることが、理解される。従って、以下の実施例は、本発明の例示と解釈されるが、本発明を限定しない。

【実施例】

【０１３５】

（実施例Ｉ）

（ＩＡＰおよびＡｐａｆｌの免疫検出のための抗体の作製）

この実施例は、ＩＡＰおよびＡｐａｆｌを検出するために有用な抗体の調製および特徴付けを示す。

【０１３６】

サルビビン、ＸＩＡＰ、Ａｐａｆｌ、ＡＩＦおよびＳｍａｃの免疫検出のために、抗血清を、組換えタンパク質および合成ペプチドに対して惹起した。癌を分析するためにこれらの抗体を使用する前に、これらの抗体の意図したタンパク質標的に対する特異性を、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ／免疫ブロット分析によって確認した。データの例を、図３に与える。図

３Ａは、インビトロで翻訳された、サルビビン、ＸＩＡＰ、ｃＩＡＰ１、ｃＩＡＰ２、ＮＡＩＰ、ＢＲＵＣＥを示し、バキュロイウイルスＣｐ－ＩＡＰタンパク質を、ポリクローナルＸＩＡＰ抗血清（ＡＲ－２７Ａ）を使用して、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ／免疫ブロット分析に供した。ＸＩＡＰ抗血清とのインキュベーションは、インビトロで翻訳されたタンパク質のうちＸＩＡＰのみを検出した。界面活性剤溶解物を、種々の正常なヒト組織から調製し、全タンパク質含有量（５０μｇ）について正規化し、そしてサルビビン（Ｂ）、Ａｐａｆｌ（Ｃ）、ＳＭＡＣ（Ｄ）またはＡＩＦ（Ｅ）に特異的な抗血清を使用して、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ／免疫ブロットアッセイに供した；分子量マーカーを、キロダルトン（Ｆ）で示した。さらに、結腸癌（Ｔ）検体および正常な結腸粘膜（Ｎ）検体の５つの対応する対からの溶解物を、全タンパク質含有量（１レーンあたり１００ｍｇ）について分析し、そしてｃ－ＩＡＰ１、ｃ－ＩＡＰ２、ＸＩＡＰ、サルビビン、Ａｐａｆ－１、およびＴＵＣＡＮ（Ｇ）に特異的な抗血清を使用して、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ／免疫ブロット分析に供した。抗体検出を、ＥＣＬ方法によって実施した。免疫ブロットデータを、Ｐｒｏ－Ｉｍａｇｅソフトウエアシステムを使用するスキャニングデンシトメトリーによって、定量した。

【０１３７】

抗ＸＩＡＰ抗血清は、予測された約５７ｋＤａのＸＩＡＰタンパク質と特異的に反応したが、他のＩＡＰファミリーメンバー（サルビビン、ｃＩＡＰ１、ｃＩＡＰ２、ＮＡＩＰ、ＢＲＵＣＥ、およびバキュロウイルスＣｐ－ＩＡＰを含む）（これら全てを、ｃＤＮＡからのインビトロ転写および翻訳によって作製した）とは反応しなかった（図３Ａ）。同様に、抗サルビビン抗血清の単一特異性（ｍｏｎｏｓｐｅｃｉｆｉｃｉｔｙ）を、組換えＩＡＰファミリーメンバーのタンパク質、ならびにサルビビンタンパク質を発現する腫瘍細胞株に対して、サルビビン　ｍＲＮＡおよびタンパク質を欠いた正常細胞由来の溶解物のＳＤＳ－ＰＡＧＥ／免疫ブロット分析によって実証した（図３Ｂ）。抗Ｓｍａｃ抗血清は、ＧＳＴ－Ｓｍａｃ組換えタンパク質に対して特異的な反応性を示した（図３Ｃ）。この抗体は、ＲＳ１１細胞およびＪｕｒｋａｔ細胞、ならびに数種のヒト組織（例えば、表皮、脳および精巣）において、多量のＳｍａｃタンパク質を検出した。正常結腸においてわずかに検出可能なＳｍａｃレベルは、結腸癌溶解物における相対的に多量のこのタンパク質とは、対照的であった。

【０１３８】

サルビビン、Ａｐａｆｌ、ＸＩＡＰおよびＳｍａｃに対するポリクローナル抗血清を、組換えタンパク質免疫原を用いてウサギ内で作製した。サルビビン（全長タンパク質）およびＡｐａｆｌ（２６４～２８２残基）を、宿主株として大腸菌ＢＬ２１（ＤＥ３）を使用して、ｐＧＥＸベクター由来のＧＳＴ融合タンパク質として生成した。このタンパク質精製方法は、以前に記載されている。さらなる抗Ａｐａｆ－１血清を、免疫原として合成ペプチドを使用して、ウサギ内で作製した。マレイミド活性化キャリアタンパク質であるＫＬＨおよびＯＶＡ（Ｐｉｅｒｃｅ，Ｉｎｃ．）への結合体化を可能にするように付加されたＮ末端システインを有する、ヒト（ｈｕ）Ａｐａｆ－１の２６４～２８２残基に対応するペプチド（ＮＨ２－ＣＧＰＫＹＶＶＰＶＥＳＳＬＧＫＥＫＧＬＥ－アミド（配列番号１５））を、合成した。このペプチド結合体を使用して、ポリクローナル抗血清（ＡＲ－２３）をウサギ内で作製した。アフィニティー精製したＨｉｓ６タグ化ＸＩＡＰ　ＢＩＲ２組換えタンパク質を、公式の方法を使用して生成し、そしてこれを免疫原として使用して、ＸＩＡＰ特異的抗血清（ＡＲ－２７Ａ）を作製した。抗ＡＩＦ血清を、ヒトＡＩＦの１５１～１７０残基に対応する合成ペプチドを使用して、ウサギ内で作製した。ニュージーランド白色雌性ウサギに、０．２５ｍｌのＫＬＨペプチド（１ｍｇ／ｍｌ）、０．２５ｍｌのＯＶＡペプチド（１ｍｇ／ｍｌ）、または組換えタンパク質（１回の免疫付与あたり、０．１～０．２５μｇのタンパク質）および０．５ｍｌのフロイント完全アジュバント（１０ヶ所の注射部位にわたって分割された用量）の混合物を皮下注射し、次いで、１週間の間隔を空けて３回ブーストし、続いて１ヶ月の間隔を空けて、フロイント不完全アジュバント中、ＫＬＨペプチド、ＯＶＡペプチド、または組換えタンパク質の免疫原を各々０．２５ｍｇ用いて、さらに３～２０回ブーストし、各ブーストの１～３週間後に血液

を収集して、免疫血清を得た。Ｂｃｌ－２、Ｂｃｌ－ＸＬ、Ｂａｘ、およびＴＵＣＡＮの特異的抗血清の作製は、記載されている。抗ｃ－ＩＡＰ１抗体および抗ｃ－ＩＡＰ２抗体を、Ｓａｎｔａ Ｃｒｕｚ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｉｎｃ．，ＣＡ ａｎｄ Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｉｎｃ．から得、β－カテニン抗血清をＢＤ Ｔｒａｎｓｄｕｃｔｉｏｎ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓから得、そしてｐ５３クローンＤＯ－７抗血清、ＭＩＢ－１抗血清、およびＢＡＧ１クローンＫＳ－６Ｃ８抗血清を、ＤＡＫＯから得た。

【０１３９】

（実施例ＩＩ）

（正常な結腸粘膜および結腸癌におけるＩＡＰおよび他の生物マーカーの免疫組織化学分析）

この実施例は、１０２人の個体から得た組織サンプルを表す組織マイクロアレイにおける、ＩＡＰおよび他の生物マーカーの免疫組織化学分析を示す。

【０１４０】

組織マイクロアレイを、第ＩＩ期疾患（ＤｕｋｅｓのＢ段階）を示す、相対的に同種のコホートの１０２人の患者由来の初代腫瘍検体を使用して、単一の施設に構築した。患者を、治療目的で、外科的切除によって処置した。結腸癌検体を、Ｄｅｐａｒｔｍｅｎｔ ｏｆ Ｐａｔｈｏｌｏｇｙ，Ｙｏｎｓｅｉ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ，Ｃｏｌｌｅｇｅ ｏｆ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，Ｓｅｏｕｌ，Ｋｏｒｅａから得た。サンプルを、ＤｕｋｅｓのＢ段階［Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｊｏｉｎｔ Ｃｏｍｍｉｔｔｅｅ ｏｎ Ｃａｎｃｅｒ ａｎｄ Ｕｎｉｏｎ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌｅ Ｃｏｎｔｒｅ ｌｅ Ｃａｎｃｅｒ（ＡＪＣＣ／ＵＩＣＣ）基準によって規定されるような、第ＩＩ期疾患]を有する、１９８６年と１９９６年との間に生存した患者由来の５つの初代の腫瘍から採取した。ＤｕｋｅｓのＢ２段階（Ｔ３Ｎ０Ｍ０）を有する患者が、コホートの９１％を構成したのに対して、９％は、ＤｕｋｅｓのＢ３段階（Ｔ４Ｎ０Ｍ０）である癌に罹患した。全ての患者を、結腸に関連した断片の外科的切除によって処置した。手術後のアジュバント化学療法を、全ての場合において初めから行ったわけではなかった。しかし、化学療法を、数人の患者について、再発後に投与した。臨床データは、６０ヶ月までの追跡のメジアンを表す。

【０１４１】

結腸癌マイクロアレイを構築するために、１mm直径の組織の２～５個のシリンダーを、８％ホルマリン固定化した腫瘍を含有するアーカイバル（ａｒｃｈｉｖａｌ）パラフィンブロックの代表的な領域から採取し、そして新たなレシピエントパラフィンブロック中に、特注の精密機器（Ｂｅｅｃｈｅｒ Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ，Ｓｉｌｖｅｒ Ｓｐｒｉｎｇ，ＭＤ）を用いて整列させた。連続的な切片（４μｍ）を、３－アミノプロピルトリエトキシシラン（ＡＰＥＳ）でコーティングしたスライド（Ｓｉｇｍａ）に適用した。

【０１４２】

ＩＡＰファミリーメンバーであるサルビビン、ＸＩＡＰ、ｃＩＡＰ１、およびｃＩＡＰ２（Ｆｉｇｕｒｅ １Ａ）、ならびに他のマーカー（例えば、Ａｐａｆｌ、Ｓｍａｃ、ＡＩＦ、Ｂｃｌ－２、Ｂｃｌ－ＸＬ、Ｂａｘ、ＢＡＧ１、β－カテニン、ＭＩＢ－１、およびｐ５３）に特異的な抗血清を使用して、マイクロアレイを免疫染色した。脱ろうした組織切片を、自動免疫染色器（Ｄａｋｏ Ｕｎｉｖｅｒｓａｌ Ｓｔａｉｎｉｎｇ Ｓｙｓｔｅｍ）を使用するＥｎｖｉｓｉｏｎ－Ｐｌｕｓ－Ｈｏｒｓｅ Ｒａｄｉｓｈ Ｐｅｒｏｘｉｄａｓｅ（ＨＲＰ）システム（ＤＡＫＯ）を用いる、詳細に記載したジアミノベンジジン（ＤＡＢ）ベースの検出方法を使用して、免疫染色した。サルビビン、ＸＩＡＰ、Ａｐａｆｌ、ＴＵＣＡＮ、ＡＩＦ、Ｓｍａｃ、Ｂａｘ、およびＢｉｄに特異的な抗血清を、１：３０００～１：１００００（ｖ／ｖ）で適用し、Ｂｃｌ－２およびＢｃｌ－ＸＬに特異的な抗血清を、１：２０００（ｖ／ｖ）で適用した。ｃ－ＩＡＰ１抗体、ｃ－ＩＡＰ２抗体およびβ－カテニン抗体の希釈は、１：６００（ｖ／ｖ）であり、ＢＡＧ１抗体およびＭＩＢ－１抗体の希釈は、１：１００であり、そしてｐ５３抗体の希釈は、１：５０であった。試験した全ての組織について、免疫染色手順を、免疫前血清を並列して使用して行い、結果の特異性を検証した。抗体特異性の初期確認はまた、５～１０μｇ／ｍｌの合

成ペプチド免疫原または組換えタンパク質免疫原のいずれかを用いて血清を予め吸収する実験を含んだ。腫瘍免疫染色のスコア付けは、染色強度スコア（０／１／２／３）を掛けた免疫陽性細胞の割合（０～１００）に基づき、０～３００のスコアを得た。全ての免疫染色の結果を、免疫陽性細胞のおよその割合（０～１００％）および０～３スケールに対する免疫強度に従って定量し、次いで、免疫スコアを、免疫陽性度％および免疫強度の結果（０～３００）から算出した。

【０１４３】

組織切片を、上記のように、種々の抗血清を使用して、免疫染色し、続いて、ジアミノベンジジン比色基質（褐色）を用いるＨＲＰａｓｅベースの方法を使用して、検出した。核を、ヘマトキシリン（青色）を用いて対比染色した。代表的なデータを、図１に示す。図１Ａは、ｃＩＡＰ２について染色した結腸癌のマイクロアレイスライドを示す（×５倍の拡大率）。正常な結腸上皮免疫染色の例を、ｃＩＡＰ１（Ｂ；×１００）、サルビビン（Ｄ；×１５０）、Ｓｍａｃ（Ｅ；×１５０）、ＡＩＦ（Ｇ；×１５０）、およびＴｕｃａｎ（Ｋ；×２０）について示す。浸潤癌の領域における免疫染色の結果を、Ｓｍａｃ（Ｆ；×４００）、ＡＩＦ（Ｈ；×２５０）、Ａｐａｆｌ（Ｉ、Ｊ；×２００）、ＴＵＣＡＮ（Ｌ　×２０；Ｍ　×４００）、およびＢｃｌ－２（Ｎ；×１５０）について示す。悪性結腸上皮、およびその隣接の正常結腸上皮の例を、ｃＩＡＰ２（Ｃ；×４０）、ｐ５３（Ｏ；×１５０）およびＭＩＢ－１（Ｐ；×４００）について示す。

【０１４４】

アレイ上の１０２人の腫瘍検体のうちのいくつか（約６５％）が、特定のスライドに依存して、隣接性の正常な結腸粘膜（５９～７０）を含み、これにより、正常上皮　対　悪性上皮についての免疫染色結果を並べて比較することが可能になる。さらに、結腸癌を有するとは診断されていない個体由来の正常結腸の４検体を、別々に染色した。ｃＩＡＰ１タンパク質およびｃＩＡＰ２タンパク質に対する免疫反応性を、試験した正常な結腸粘膜検体の、それぞれ、６２／６２（１００％）および３４／６５（５２％）において検出した。非悪性上皮におけるｃＩＡＰ１染色の強度は、陰窩の基底から管腔表面まで徐々に増加した（図１Ｂ）。対照的に、ｃＩＡＰ２の低い免疫反応性が、陰窩－絨毛軸に沿って、より均一に分布したが、しばしば絨毛の上方領域における免疫強度のわずかな増加が、明らかであった。ＸＩＡＰはまた、非悪性結腸上皮において発現され（６３／６３［１００％］）そして、これは、ｃＩＡＰ１と類似の勾配で分布し、ＸＩＡＰ免疫反応性は、絨毛の上方部分において、最も高かった。低強度のサルビビン免疫染色が、正常な結腸上皮を含有する検体の６０／６２（９７％）において存在した。サルビビン免疫反応性は、優勢には、陰窩上皮細胞の核であり、そして免疫強度を徐々により増加させ、そして優勢には、陰窩－絨毛軸に沿って管腔表面に向かう、細胞質であった（図１Ｄ）。正常な結腸粘膜におけるＡｐａｆ１の免疫組織化学分析は、検体の５８／６０（９７％）における免疫反応性の存在を明らかにした。Ａｐａｆｌの免疫反応性は、正常な結腸上皮細胞における核周囲および細胞質位置において、優勢に存在し、その強度は、細胞が陰窩基底から絨毛の上方に移動するにつれて、わずかに増加した。Ａｐａｆｌと一緒に、Ｓｍａｃタンパク質の細胞内濃度は、正常な結腸粘膜検体の５８／６２（９４％）において、管腔表面に向かって増加した（図１Ｅ）。相対的に高度な主に顆粒状のＡＩＦ細胞質発現は、１００％の検体（６０／６０）において、結腸陰窩に沿って均一に分布した（図１Ｇ）。これらの免疫染色結果の特異性を、免疫前血清または同等の免疫原で予め吸収させた免疫抗血清のいずれかを使用して行うコントロール染色によって確認した。

【０１４５】

マイクロアレイによる腫瘍組織の免疫組織学化学分析は、これらのアポトーシス調節タンパク質の発現における、癌特異的な変更のいくつかの例を明らかにした。図１は、腫瘍検体についての免疫染色結果のいくつかの例を示す。全ての調査したタンパク質に関して、免疫染色の平均強度は、正常な結腸上皮と比較して、浸潤癌において有意により高かった（図１Ｃ、Ｅ～Ｆ、Ｋ～Ｍ、Ｏ、Ｐ）（ただし、Ｂｃｌ－２、Ｂａｘ、およびＡＩＦ（図１Ｇ、Ｈ）を除く）。さらに、免疫染色の結果は、試験した検体の間で広範に変化した

が、癌の検体の一部の免疫スコアは、正常な検体と比較した場合、免疫反応性において明らかな上昇を示す群内でクラスター形成した。例えば、全ての結腸検体は、２００未満のｃＩＡＰ１免疫スコアを有したが、９４個の浸潤癌検体のうち３５個（３７％）は、２００の免疫スコアを有し（ｐ＜０．０００１）、従って、これらのことは、結腸癌の亜群が、この抗アポトーシスタンパク質のレベルの病理学的上昇を生じさせることを示唆する。同様に、ｃＩＡＰ２免疫スコアは、正常な結腸上皮について、１００未満であり、浸潤癌とは対照的に、９４個のうちの２５個（２７％）が、１００より高い免疫スコアを有した（ｐ＜０．０００１）。同様に、全ての正常な結腸上皮サンプルが、ＸＩＡＰについて、１９０未満の免疫スコアを有したが、一方、浸潤癌の９７個のうちの３４個（３５％）が、１９０より高いＸＩＡＰ免疫スコアを有した（ｐ＜０．０００１）。非悪性上皮についてのサルビビン免疫スコアは、１９０未満であり、浸潤癌と比較して、１９０より高いスコアが、１００人の検体のうちの３３人（３３％）について、見出された（ｐ＜０．０００１）。Ａｐａｆｌについて、免疫スコアの２つのクラスターが、正常上皮と悪性上皮の両方について現れた。大部分の正常な結腸検体（５０／６０；８３％）は、１００未満の免疫スコアを有した。腫瘍において、同様に低い免疫スコア（１００未満）を有する検体の群が、観察されたが（６４／１０２；６３％）（図１Ｊ）、免疫スコアが１００を超えて（１４０～２８０の範囲）クラスター形成する、癌のさらなる群（３８／１０２；３７％）を、同定した（図１Ｉ）。これらの結果は、試験した全ての生物マーカーについて、発現の腫瘍関連アップレギュレーションの証拠が、評価された癌検体の一部において観察されたことを示す。

【０１４６】

ｃＩＡＰ２、サルビビン、およびβ－カテニンの上昇したレベルは、高いＫｉ－６７標識指標（それぞれｐ＝０．００６、ｐ＝０．００５、およびｐ＝＜０．０００１）と相関する。統計学的分析は、サルビビンのレベルとＸＩＡＰおよびｃＩＡＰ１（ｐ＝０．０１）またはｃＩＡＰ２（ｐ＝０．００８）のレベルとの間に有意な相関があることを明らかにした。サルビビンの上昇したレベルは、Ｂｃｌ－２の高発現と関連していた。ｃＩＡＰ２およびＴＵＣＡＮ（ｐ＝０．００３）の発現の間のポジティブな相関は、観察されたポジティブな影響と一致し、低レベルのこれらのタンパク質の組み合わせは、本発明者らの結腸癌患者のコホートにおいて生存性を有する。しかし、ＴＵＣＡＮとＢｃｌ－２またはＡＩＦとの間の逆相関は、統計学的な有意性に達しなかった。ｃＩＡＰ２とＡｐａｆｌまたはＢｃｌ－２との間に有意な関連は見出されなかった。本発明者らのコホートにおいて良好な予後マーカーであることが示唆されるＢｃｌ－２は、いくつかのプロアポトーシスタンパク質（例えば、Ａｐａｆｌ（ｐ＜０．０００１）、ＡＩＦ（ｐ＝０．００２）およびＳｍａｃ（ｐ＝０．００８））と有意に相関するだけでなく、乳癌（＃７８７４）の初期段階での長期間の生存を予想することが発見されている抗アポトーシスＢＡＧ１タンパク質とも相関する。その８０％がｐ５３点ミスセンス変異に関連するｐ５３の増加した核濃度は、Ｂｃｌ－ＸＬ（ｐ＜０．０００１）の発現の増加と相関した。

【０１４７】

（実施例ＩＩＩ）

（結腸癌におけるＩＡＰｓおよびＡｐａｆｌの免疫ブロット分析）

この実施例は、５つの凍結した結腸癌標本におけるＩＡＰｓ、Ａｐａｆ１および他のアポトーシスレギュレーターの免疫ブロット分析を示す。

【０１４８】

免疫組織化学的データを確認するために、５つの凍結した結腸癌標本が、ＩＡＰｓ、Ａｐａｆｌ、および他のタンパク質について特異的な抗体を用いて免疫ブロット分析について、十分な量の隣接する正常な（Ｎ）組織および腫瘍（Ｔ）組織の両方を有することを同定した。これらの組織標本の界面活性剤溶解物を調製し、そしてＳＤＳ－ＰＡＧＥ／免疫ブロット分析の前に総タンパク質含量について標準化した（図３Ｅ）。デンシトメトリー（Ｄｅｎｓｉｔｏｍｅｔｒｙ）分析をまた実行して、バンド強度を定量し、そしてローディングコントロールブロットからの結果を使用して、全てのデータを標準化した（図３Ｆ

）。

【０１４９】

支質に対する癌細胞の割合が高い（＞７０％）を有する結腸癌標本（ｎ＝１０）を、免疫ブロット分析について選択した。このタンパク質溶解物を、さらなる顕微解剖または分別せずに調製した。同じ患者由来の腫瘍溶解物、および正常な粘膜のサンプルを、完全なプロテアーゼインヒビターカクテル（ＳＩＧＭＡ）、Ｐａｎ－カスパーゼインヒビター、ｚ－Ａｓｐ－２．６－ジクロロベンゾイルオキシ－メチルケトンおよびＺＶＡＤ－ｆｍｋを含む改変したＲＩＰＡ緩衝液（５０ｍＭ トリス［ｐＨ ７．４］、１５０ｍＭ ＮａＣｌ、０．２５％ Ｎａ－デオキシコレート、１％ ＮＰ４０、１ｍＭ ＥＤＴＡ、１ｍＭ Ｎａ３ＶＯ４、１ｍＭ ＮａＦ、１ｍＭ ＰＭＳＦ）を用いて調製し、総タンパク質含量（１００μｇ）に対して標準化し、そしてＳＤＳ－ＰＡＧＥ（１２％および１５％ゲル）により解析した。タンパク質定量を、Ｂｉｏ－Ｒａｄ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ａｓｓａｙ Ｋｉｔ（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）を用いて実行した。タンパク質を、ＰＶＤＦ膜（Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｐｈａｒｍａｃｉａ）にトランスファー（１５０ ｍＡ、４℃、一晩）した。室温で２時間、５％スキムミルクを含むＴＢＳＴ（５０ｍＭ トリス［ｐＨ ７．６］、１５０ ｍＭ ＮａＣｌ、０．０５％ Ｔｗｅｅｎ ２０）中でブロッキングした後、ブロットを、４℃で１：１，０００～１：１０，０００（ｖ／ｖ）の希釈を用いて、特定のＩＡＰファミリーメンバー（ＡｐａｆｌおよびＴＵＣＡＮ）に特異的な抗血清と伴に一晩インキュベートした。ＨＲＰａｓｅ－結合体化２次ヤジ抗ウサギ（Ｂｉｏ－ＲａｄまたはＳａｎｔａ Ｃｒｕｚのいずれかの）抗体と伴に室温で１時間インキュベートした後、免疫検出を、Ｘ線フィルム（Ｋｏｄａｋ／ＸＡＲ）への曝露と伴に、増強した化学蛍光（ＥＣＬ）方法（Ａｍｅｒｓｈａｍ）によって達成した。デンシトメトリーを実行して、Ｉｍａｇｅ－ｐｒｏ Ｐｌｕｓソフトウェアを用いてバンドの強度を定量した。

【０１５０】

より高いレベルのｃＩＡＰ２、ＸＩＡＰ、サルビビンおよびＡｐａｆｌを、上昇した全ての標本において検出し、ケースが一致した正常組織と比較した。ｃＩＡＰ１タンパク質、および抗アポトーシスタンパク質ＴＵＣＡＮのレベルは、正常な標本と比較していくつかの腫瘍標本において上昇していたが、他では上昇していなかった。二次ＥＣＬ抗体（Ｂｉｏｒａｄ）を用いたプレブロッキング手順の間に得られた非特異的バンドを、ローディングコントロールとして供給した。

【０１５１】

免疫ブロッティングの結果は、実施例ＩＩ（図１Ｅ、Ｆ）に記載される免疫組織化学的観察を確認した。より高いレベルのｃＩＡＰ２、ＸＩＡＰ、サルビビンおよびＡｐａｆｌを、ケースが一致した正常な組織と比較して上昇したレベルを全ての標本について検出した。ｃＩＡＰ１およびＴＵＣＡＮのレベルは、正常な標本と比較していくつかの腫瘍標本で上昇していたが、他のものでは上昇していなかった。

【０１５２】

（実施例ＩＶ）

（臨床学的結果とタンパク質発現との相関）

患者の生存とバイオマーカーとの関連を分析するために、図３に示される正常な結腸上皮および結腸癌について得られた免疫供給源の比較を使用して、データの二分化について理論的なカットオフ（ｃｕｔ－ｏｆｆ）を設定した。

【０１５３】

臨床学的データは、５年までのメジアンで、再発および全体的な生存に関する組織マイクロアレイに関する全ての患者標本について利用可能であった。患者を以下のように分類した：（ｉ）疾患を有さずに生存（Ａ）；（ｉｉ）再発性の疾患を有して生存（Ｒ）；または（ｉｉｉ）死（Ｄ）。表２に示されるように、Ａ、Ｒ、およびＤグループの患者を比較した場合に、ｃＩＡＰ１、ＸＩＡＰまたはサルビビンについての免疫スコアにおいて有意な差異は観察されなかった。ｃＩＡＰ２免疫染色は、疾患で死亡（Ｄ）したか、または手術後再発（Ｒ）したかのいずれかの結腸癌患者に置いて有意に高かった（ｐ＜０．００

０１）。対照的に、Ａｐａｆｌについての免疫スコアは、疾患を有さずに生存している患者と比較して、再発（Ｒ）または死（Ｄ）した患者のグループにおいて有意に低かった（表２）（ｐ＜０．０００１）。不対のｔ検定方法を、Ａ、Ｒ、およびＤグループの患者におけるＸＩＡＰ、サルビビン、ｃＩＡＰ１、ｃＩＡＰ２、およびＡｐａｆｌ免疫スコアの比較のために使用した。Ｐ値は、組み合わせた群ＲおよびＤと群Ａとの比較をいう。

【０１５４】

（表２：結腸癌患者についての免疫染色結果の要約）

【０１５５】

【表２】

患者の状態	XIAP	サルビビン	cIAP1	cIAP2	Apaf1
	平均 ±SE メジアン	平均 ±SE メジアン	平均 ±SE メジアン	平均 ±SE メジアン	平均 ±SE メジアン
A	168±9 160	152±10 160	166±9 190	81±9 70	132±8 140
R	176±22 170	125±25 95	169±23 180	162±22 160	46±20 50
D	177±13 180	135±13 120	174±13 180	146±13 130	77±12 70
p-値 A 対 R+D	0.5	0.2	0.7	<.0001	<.0001

別の方法によって患者の生存に対するバイオマーカーの関係を分析するために、これらのタンパク質についての免疫染色データを、高い発現群　対　低い発現群に二分化した。この目的のために、図２に示される結腸上皮および結腸癌について得られた免疫スコアの比較を使用して、データの二分化についての理論的なカットオフを設定した。正常な結腸上皮および悪性の結腸上皮についての免疫スコアを、図２にグラフの形態で描写した。正常な結腸上皮との比較に基づいて、二分化免疫染色データについてのカットオフを選択した。９５％の正常な標本についての免疫スコアの範囲は、ｃＩＡＰｌ、ｃＩＡＰ２、ＸＩＡＰ、サルビビン、Ｂｃｌ－ＸＬおよびＢＡＧ１について低い免疫スコアを有する腫瘍の群を規定した。タンパク質の複峰性二分化は、Ｂａｘ、ＡｐａｆｌおよびＴＵＣＡＮについてのカットオフの同定を補助した。　Ｂｃｌ－２、Ｂｉｄ、ＡＩＦ、Ｓｍａｃおよびβ－カテニンについてのカットオフとしての中央免疫スコアの適用は、低発現体（ｅｘｐｒｅｓｓｏｒ）および高発現体への腫瘍のサブカテゴライズ（ｓｕｂｃａｔｅｇｏｒｉｓａｔｉｏｎ）における正確性を増大させた。ｐ５３およびＭＩＢ－１についてのヒストグラムは、免疫パーセンテージを示し、これは＞０％のケースを高ｐ５３発現体として分類し、そして＝２０％を高レベルのＭＩＢを発現する発現体として分類した。

【０１５６】

この方法に基づいて、高レベルのＡｐａｆｌ、ＴＵＣＡＮ、サルビビン、ＸＩＡＰ、ｃＩＡＰｌ、およびｃＩＡＰ２を、それぞれ３８％、４９％、５４％、７４％、６１％および３５％の腫瘍標本において見出した。一変量分析において、有意な相関を、このコホートにおいて、より長い疾患に罹患していない生存（ＤＦＳ）と低発現のｃＩＡＰ２（ｐ＝０．０００２）、ＴＵＣＡＮ（ｐ＝０．０００４）、β－カテニン（ｐ＝０．０４）、変

異ｐ５３タンパク質（ｐ＝０．０３）、または高レベルのＡｐａｆｌ（ｐ＝０．０００８）、Ｂｃｌ－２（ｐ＝０．００５）、およびＳＭＡＣ（ｐ＝０．０３）との間で観察した（図４ａ）。従って、その腫瘍が低レベルのＴＵＣＡＮを含む患者の７８％（３９／５０）は生存し続け、そして高発現のこのタンパク質を有する患者の４４％（２１／４８）のみと比較して、この研究によって網羅される時間の間疾患を有さない。同様に、７４％（４５／６１）の低ｃＩＡＰ２発現体は、３６％（１２／３３）のみの高ｃＩＡＰ２レベルを有する発現体と比較して最後の手術時に結腸癌のない人生が約束されている。対照的に、高レベルのＡｐａｆｌは、結腸癌患者のこのコホートにおけるより長い生存と関連しており、患者の３３／３８（８７％）は、低いＡｐａｆ１発現を伴なう結腸癌患者の２８／６２（４５％）のみと比較して、疾患がないままである。

【０１５７】

全体的な生存性の最も有意な改善を、その結腸癌標本が低レベルのＴＵＣＡＮ（ｐ＜．０００１）を含む患者のグループにおいて観察した（図４ｂ）。患者の５４％（２６／４８）の患者が高レベルのＴＵＣＡＮタンパク質を示すことに対して、低いＴＵＣＡＮを発現する５０人の患者の間で、４％（２／５０）のみが死亡した。有意な相関をまた、より長い全体的な生存と低ｃＩＡＰ２（ｐ＝０．０１）または低変異ｐ５３タンパク質（ｐ＝０．０３）との間で観察した。低いＢｃｌ－２レベルは、全体的な乏しい生存と関連していた。このタンパク質の低い発現を有する１８人の患者のうち、高Ｂｃｌ－２群（１８／７６）で死亡した２４％の患者と比較して、１１人（６１％）が結腸癌で死亡した。同様に、その腫瘍が低いＡｐａｆｌ染色を含む患者は、Ｂｃｌ－２を過剰発現する患者と比較してより劣悪な全体的な生存を有していた（図１Ｎ）。

【０１５８】

Ｂｃｌ－２の上昇したレベルは、全体的な生存（ｐ＝０．０００８）および疾患を有さずに生存（ｐ＝０．００５）の両方について優位な利点を与えた。その腫瘍が高Ｂｃｌ－２を明らかにする７６人の患者のうち、低Ｂｃｌ－２レベルを有する３９％および３３％の患者と比較して、５８人（７６％）が生存し、そして５０人（６６％）が再発しなかった。その抗アポトーシス機能に依存せずに、Ｂｃｌ－２は、細胞周期への移行を遅延し得、そしてその周期からの細胞の退去を促進し得る。従って、臨床学的結果におけるＢｃｌ－２のポジティブな効果は、その細胞周期阻害の役割に関連し得る。

【０１５９】

図４は、疾患を伴なわない生存（Ａ）および結腸癌患者についての全体的な生存（Ｂ）とのバイオマーカーの免疫染色データの相関を示す。全てのバイオマーカーデータおよび結果測定を、ＳＴＡＴＩＳＴＩＣＡソフトウェアシステム（ＳｔａｔＳｏｆｔ）を用いてデータベースに入力した。ｌｏｇランクテストを、患者の生存についての免疫スコアデータの相関について使用した。Ｋａｐｌａｎ－Ｍｅｉｅｒ曲線は、患者のこのコホートについての生存と研究されたバイオマーカーとの相関を例示する。

【０１６０】

要約すると、５年までのメジアンで、高いｃＩＡＰ２レベルを有する患者の６０％が再発し、そして４６％が結腸癌で死亡した。その一方で、低ｃＩＡＰ２群において、２０％が再発し、そして１８％が結腸癌に関連して死亡した。同じ時間で、ＴＵＣＡＮの高い発現を伴なう患者の４９％は、再発するか、または結腸癌で死亡し、そしてその腫瘍が低レベルのこのタンパク質を発現した患者のグループにおいて１９％のみが再発し、そして４％が疾患で死亡した。対照的に、低いＡｐａｆｌを有する患者の４３％が再発し、そして３５％が結腸癌で死亡した。その一方で１４％のみが癌を再発するか、または高いＡｐａｆｌコホートで死亡した。従って、これらの発見は、高レベルの抗アポトーシスタンパク質ｃＩＡＰ２および低レベルのプロアポトーシスタンパク質Ａｐａｆｌが、結腸癌の初期段階を有する患者において逆の結果と関連することを示す。有意な差異は、ｃＩＡＰ２、Ａｐａｆｌ、またはＴＵＣＡＮについての高発現群　対　低発現群における患者の年齢、または性別において見られなかった。

【０１６１】

（実施例Ｖ）
（ｃＩＡＰ２およびＡｐａｆｌ発現データの組み合わせ分析）
この実施例は、ｃＩＡＰ２およびＡｐａｆｌの発現データの組み合わせた分析を示す。
【０１６２】
特定のタンパク質は、有意な予後価値を有していたので、組み合わせた２つのバイオマーカーが、異なる生存特性を有する患者のサブグループを同定し得るか否かを決定した。２つの好ましい変数（低ｃＩＡＰ２および高Ａｐａｆｌ）を有する患者を、このコホートにおいて全ての他の患者と比較した。
【０１６３】
図５は、バイオマーカーと結腸癌患者についての疾患を有さずに生存（Ａ、Ｂ）および全体的な生存（Ｃ、Ｄ）とのその組み合わせの相関を示す。Ｋａｐｌａｎ－Ｍｅｉｅｒ曲線を使用して、パネルＡおよびＢは、疾患に罹患していない生存におけるポジティブな影響を有するバイオマーカー［低ｃＩＡＰ２および高Ａｐａｆｌ（Ａ）；低ｃＩＡＰ２および低ＴＵＣＡＮ（Ｂ）］の組み合わせを例示する。生存に不利な効果を有するマーカーの２つの組み合わせは、パネルＣ（低Ａｐａｆｌおよび高ＴＵＣＡＮ）、およびパネルＤ（低Ｂｃｌ－２および高ｃＩＡＰ２）に示される。
【０１６４】
ｃＩＡＰ２およびＡｐａｆｌについて都合よく分析された９４人の患者のサンプルのうち、２５人（２７％）は、低ｃＩＡＰ２および高Ａｐａｆｌ免疫スコアの両方を有していた。５２％の疾患を有していない患者、または６４％の他の生存患者（ＯＳについてｐ＝０．００００７；ＤＦＳについてｐ＜０．０００１）と比較して、低ｃＩＡＰ２および高Ａｐａｆｌの組み合わせを有するこれらの患者の全て（１００％）は生存し、そして診断の５年後でも疾患を有していなかった（図５Ａ；ＤＦＳ）。同じ時点で、低ｃＩＡＰ２と低ＴＵＣＡＮの組み合わせを有する患者９７％が生存し、そして５９％の生存患者および５０％の疾患を有していない他の患者と比較して（ｐ＝０．００００１）、９４％が疾患を有していなかった（図５Ｂ；ＤＦＳ）。従って、ｃＩＡＰ２とＡｐａｆｌとの組み合わせ、またはｃＩＡＰ２とＴＵＣＡＮ免疫染色データの組み合わせは、別個の生存特性を有する結腸癌患者のサブグループを同定する。しかし、２つの不利なバイオマーカー（低Ａｐａｆｌおよび高ＴＵＣＡＮ）を有する患者を、他の患者と比較した場合に、この組み合わせのタンパク質を有する患者の３４％および９０％の他の患者が、診断の５年後に生存していた（ｐ＜０．０００１）（図４Ｃ）。この不一致は、手術の最後でもなお大きく、それぞれ０％および９０％が生存し続けていた。組み合わせデータを、別の対の不利なバイオマーカー（ｃＩＡＰ２高およびＢｃｌ－２低）について試験した場合に、手術の５年後にこの群で生存している患者はいなかったが、他の患者では７５％生存していた（ｐ＝００４）（図４Ｄ）。これらの結果は、ＬＥＲＳデータ分析の結果と一致していた。
【０１６５】
（実施例ＶＩ）
（多変数分析は、結腸癌の初期段階における生存の独立した予後指標としてｃＩＡＰ２、Ａｐａｆｌ、ＴＵＣＡＮおよびＢｃｌ－２を同定する）
この実施例は、多変数分析が、ｃＩＡＰ２、Ａｐａｆｌ、ＴＵＣＡＮおよびＢｃｌ－２は、結腸癌の初期段階における生存の独立した予後指標であることを確認することを示す。
【０１６６】
多変数Ｃｏｘ比例ハザードモデルを、バイオマーカーの上昇したレベルが、疾患に罹患していない生存（ＤＦＳ）および全体的な生存（ＯＳ）に関連するか否かを評価するために適合させた。この変数は、この研究に関する少数の患者に起因してＴ３Ｎ０Ｍ０およびＴ４Ｎ０Ｍ０のサブグループに階層化されなかった。さらに、このデータ採掘システムＬＥＲＳ（ラフなセット（Ｒｏｕｇｈ　Ｓｅｔ）に基づいた実施例からの学習）を使用して、免疫組織化学的染色データの多変数分析を実行した。
【０１６７】

この計画において、アルゴリズムＬＥＭ２をこのデータについて最も適用性があると決定し、従って多変数分析について使用した。高ｃＩＡＰ２および高ＴＵＣＡＮの存在は、それぞれ２．７倍（ｐ＝０．０１）および１７倍（ｐ＝０００００４）の患者のこのコホートにおける結腸癌からの死の危険性を増加させた。高ＡｐａｆｌおよびＢｃｌ－２発現は、結腸癌による死の相対的な危険性の７５％（ｐ＝０．００４）および８２％（ｐ＝０．００００６）の減少と関連していた。

【０１６８】

疾患に罹患していない生存とタンパク質レベルとの関係が多変数分析によって評価される場合に、ｃＩＡＰ２およびＴＵＣＡＮは、それぞれ６倍および３．４倍の再発の危険性を増大させる高レベルのこれらのタンパク質と予後の有意性（ｐ＝０．０００００５、ｐ＝０．０００５）を維持した。ＡｐａｆｌおよびＢｃｌ－２はまた、その有意な予後の役割を保持し（ｐ＝０．００６、ｐ＝０．０００４）、約７５％まで結腸癌の再発の危険率を減少させた。さらに、高レベルのＳｍａｃは、６３％まで再発の危険性を減少させた。このコホートにおける患者の全ての生存についてＳｍａｃの役割は確認されなかった。まとめると、これらの発見は、ｃＩＡＰ２、Ａｐａｆｌ、ＴＵＣＡＮ、Ｂｃｌ－２およびこれらの組み合わせについての免疫染色が、結腸癌の初期段階を有する患者について予後有意性を有し得ることを示す。表３Ａ～Ｂは、バイオマーカーの上昇したレベルが、疾患に罹患していない生存または全ての生存と関連するか否かを評価するための後方段階的Ｃｏｘ比例ハザード逆行分析（ｂａｃｋｗａｒｄ ｓｔｅｐｗｉｓｅ Ｃｏｘ ｐｒｏｐｏｒｔｉｏｎａｌ ｈａｚａｒｄｓ ｒｅｇｒｅｓｓｉｏｎ ａｎａｌｙｓｉｓ）を用いた段階ＩＩの結腸癌患者におけるＤＦＳ（Ａ）およびＯＳ（Ｂ）の多変数分析を示す。

【０１６９】

（表３：第ＩＩ病期の結腸癌腫患者のＤＦＳ（Ａ）およびＯＳ（Ｂ）の多変量解析）

【０１７０】

【表３】

A. DFS

生体マーカー	係数	HR (95% CI)	p
cIAP2	1.79	5.96 (2.78 - 12.8)	0.000005
Apaf1	-1.27	0.28 (0.11 - 0.68)	0.006
TUCAN	1.23	3.43 (1.6 - 6.55)	0.0005
Bcl-2	-1.37	0.25 (0.13 - 0.60)	0.007
Smac	-1.00	0.37 (0.19 - 0.81)	0.007

B. OS

生体マーカー	係数	HR (95% CI)	p
cIAP2	0.98	2.66 (1.04 - 5.42)	0.01
Apaf1	-1.36	0.26 (0.10 - 0.65)	0.004
TUCAN	2.84	17.19 (5.12 - 57.48)	0.000004
Bcl-2	-1.69	0.18 (0.08 - 0.43)	0.00006

（実施例ＶＩＩ）

（複数の癌細胞株におけるＴＵＣＡＮの発現）

この実施例は、ＴＵＣＡＮが幾つかの腫瘍細胞株において発現されていることを示している。

【０１７１】

癌におけるＴＵＣＡＮの発現を決定するために、６０のヒト腫瘍細胞株のＮＣＩパネル（Ｗｅｉｎｓｔｅｉｎら、Ｓｃｉｅｎｃｅ　１７：３４３～３４９（１９９７））を、ＴＵＣＡＮに特異的な抗血清を使用して免疫ブロッティングによって分析した（図６Ａ）。このパネルに含まれる細胞株を以下の表４に示す。

【０１７２】

（表４　６０のヒト腫瘍細胞株のＮＣＩパネル）

【０１７３】

【表４－１】

細胞株名	細胞型
CCRF-CEM	白血病
HL-60(TB)	白血病
K-562	白血病
MOLT-4	白血病
RPMI-8226	白血病
SR	白血病
A549/ATCC	非小細胞肺
EKVX	非小細胞肺
HOP-62	非小細胞肺
HOP-92	非小細胞肺
NCI-H226	非小細胞肺
NCI-H23	非小細胞肺
NCI-H322M	非小細胞肺
NCI-H460	非小細胞肺
NCI-H522	非小細胞肺
COLO 205	結腸
HCC-2998	結腸
HCT-116	結腸
HCT-15	結腸
HT29	結腸

【０１７４】

【表４－２】

(表4つづき)

細胞株名	細胞型
KM12	結腸
SW-620	結腸
SF-268	CNS
SF-295	CNS
SF-539	CNS
SNB-19	CNS
SNB-75	CNS
U251	CNS
LOX IMVI	黒色腫
MALME-3M	黒色腫
M14	黒色腫
SK-MEL-2	黒色腫
SK-MEL-28	黒色腫
SK-MEL-5	黒色腫
UACC-257	黒色腫
UACC-62	黒色腫
IGR-OV1	卵巣
OVCAR-3	卵巣
OVCAR-4	卵巣
OVCAR-5	卵巣
OVCAR-8	卵巣
SK-OV-3	卵巣
786-0	腎臓
A498	腎臓
ACHN	腎臓
CAKI-1	腎臓
RXF 393	腎臓
SN12C	腎臓
TK-10	腎臓
UO-31	腎臓
PC-3	前立腺
DU-145	前立腺
MCF7	胸部

【０１７５】

【表４－３】

表4(つづき)

細胞株名	細胞型
NCI/ADR-RES	胸部
MDA-MB-231/ATCC	胸部
HS 578T	胸部
MDA-MB-435	胸部
MDA-N	胸部
BT-549	胸部
T-47D	胸部

溶解物を、分析前にタンパク質の総含有量について規格化した。ＴＵＣＡＮタンパク質の相対レベルは、試験した腫瘍株の中で広範に変化し、その幾つかの細胞株（例えば、ＭＣＦ７乳癌細胞、ＯＶＣＡＲ５卵巣癌細胞およびＮＣＩ－Ｈ３２２M肺癌細胞）は、特に

大量のこのタンパク質を含んでいた。ＴＵＣＡＮタンパク質はまた、ＨＬ－６０白血病細胞、ＳＮＢ－１９　ＣＮＳ癌細胞、ＭＤＡ－ＭＢ－２３１乳癌細胞、ＩＧＲＯＶ１卵巣癌細胞、ＮＣＩ－Ｈ２２６非小細胞肺癌細胞、ＮＣＩ－Ｈ２３非小細胞肺癌細胞、Ｍ１４黒色腫細胞、Ｄｕ－１４５前立腺癌細胞、ＵＯ－３１腎臓癌細胞、およびＫ５６２白血病細胞において存在した。これらの腫瘍細胞株の幾つかにおいて、ＴＵＣＡＮは、ブロードなバンドとしてかまたは明確なダブレット（二重線）としてＳＤＳ－ＰＡＧＥに中を移動し、このことは、複数形態のＴＵＣＡＮタンパク質が癌細胞に存在し得る（図６Ａ）こと示した。

【０１７６】

これらの癌細胞株のうちの幾つかにおける内因性ＴＵＣＡＮタンパク質のレベルを、トランスフェクトしたＨＥＫ２９３Ｔ細胞およびＪｕｒｋａｔ細胞と比較した。一過的にトランスフェクトしたＨＥＫ２９３Ｔ細胞において産生されるプラスミドに由来するＴＵＣＡＮのレベルは、ＭＣＦ７乳癌細胞において見出されるＴＵＣＡＮの内因性レベルに匹敵した（図６Ｂ）。安定にトランスフェクトしたＪｕｒｋａｔ細胞において産生されたプラスミド由来のＴＵＣＡＮのレベルは、ＯＶＡＣＡＲ５卵巣癌細胞株およびＮＣＩ－Ｈ３２２Ｍ肺癌細胞株で測定された内因性のＴＵＣＡＮに量的に匹敵した。

【０１７７】

要約すると、ＴＵＣＡＮは種々の腫瘍細胞株（ヒト胸部腫瘍、卵巣腫瘍、肺腫瘍、ＣＮＳ腫瘍、白血病、腎臓腫瘍、前立腺腫瘍、皮膚および結腸腫瘍から得られる細胞を含む）において発現される。

【０１７８】

（実施例ＶＩＩＩ）

（結腸癌におけるＴＵＣＡＮ発現レベルの上昇と患者の生存率の減少は相関する）

この実施例は、ＴＵＣＡＮ発現が結腸癌において増大していることを示し、かつＴＵＣＡＮの増大は、結腸癌患者の生存率の減少と相関する。

【０１７９】

抗ＴＵＣＡＮ抗体を使用して、ＴＵＣＡＮタンパク質の発現を、一貫した臨床的段階（Ｄｕｋｅ　Ｂ；第ＩＩ病期）および処置（アジュバント化学療法を使用しない外科手術）における患者に由来する１０２のパラフィン包埋結腸癌標本の収集物を免疫組織化学的方法によって分析した。全ての１０２の腫瘍検体が単一のスライドガラス上で分析でき、これによって技術上の人為的影響に起因する免疫強度の差異を最小化するように、組織顕微鏡を操作した（図７）。

【０１８０】

免疫組織化学分析のための正常ヒト組織を、Ｂｏｕｉｎ溶液（Ｓｉｇｍａ）中で固定してパラフィンで包埋した生検標本および検死標本から得た。結腸癌腫標本を、延世大学医学部病理学専攻（韓国；ソウル）から入手した。組織サンプルとしては、Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｊｏｉｎｔ Ｃｏｍｍｉｔｔｅｅ ｏｎ Ｃａｎｃｅｒ ａｎｄ Ｕｎｉｏｎ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌｅ Ｃｏｎｔｒｅ ｌｅ Ｃａｎｃｅｒ（ＡＪＣＣ／ＵＩＣＣ）基準に規定されるような、第ＩＩ病期（Ｄｕｋｅ　Ｂ病期）を有して１９８６～１９９６年に生存した患者に由来する１０２の原発性腫瘍を含む。全ての患者を、結腸の浸潤切片の外科的切除によって処置する。術後アジュバント化学療法を全ての症例において初期に実施しなかった。しかし、化学療法剤を再発後に一部の患者に投与した。臨床データは、６０ヶ月間までのメジアン追跡を示している。

【０１８１】

結腸癌マイクロアレイを構築するために、直径１ｍｍの組織の２～５のシリンダーを、８％ホルマリン固定した腫瘍を含む永久パラフィン塊の代表的な領域から採取し、そして、カスタムビルド精密機器（Ｂｅｅｃｈｅｒ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ，Ｓｉｌｖｅｒ Ｓｐｒｉｎｇ，ＭＤ）を使用して新規のレシピエントパラフィン塊へと配置した。連続した切片（４μｍ）を、Ｒｅｎｔｒｏｐら、Ｈｉｓｔｏｃｈｅｍ Ｊ．１８：２７１～２７６（１９８６）に記載されるように、３－アミノプロピルトリエトキシシラン（ＡＰＥＳ

）被覆スライド（Ｓｉｇｍａ）に適用した。

【０１８２】

免疫組織化学のために、脱ろう組織切片を、ジアミノベンジジン（ＤＡＢ）に基づく検出方法を用いて免疫染色したが、ここで、自動免疫染色機（Ｄａｋｏ　Ｕｎｉｖｅｒａｌ　Ｓｔａｉｎｉｎｇ　Ｓｙｓｔｅｍ）を用いてＥｎｖｉｓｉｏｎ－Ｐｌｕｓ－Ｈｏｒｓｅ　Ｒａｄｉｓｈ　Ｐｅｒｏｘｉｄａｓｅ（ＨＲＰ）ｓｙｓｔｅｍ（ＤＡＫＯ）を使用した（Ｋｒａｊｅｗｓｋｉら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９６：５７５２～５７５７（１９９９））。抗ＴＵＣＡＮ抗体は、１：５０００（ｖ／ｖ）で適用した。５μｇ／ｍｌの合成ペプチド（ＢＵＲ２１５）免疫原または組換えＧＳＴ－ＣＡＲＤ／ＴＵＣＡＮタンパク質（ＢＵＲ２０６）免疫原のいずれかによって予備吸収した抗血清とのインキュベーションを用いてこの結果の特異性の確証を得るために使用した。腫瘍染色のスコア付けは、免疫陽性細胞（０～１００）のパーセンテージと染色強度スコア（０／１／２／３）との積に基づいていており、この積は０～３００のスコアとなる。

【０１８３】

データを、ＪＭＰ統計ソフトウェアパッケージ（ＳＡＳ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ）を使用して解析した。片側ｔ検定法およびピヤソンχ^2検定法を、患者の生存とＴＵＣＡＮ免疫染色データとの相関について使用した。

【０１８４】

分析された１０２腫瘍検体のうち、６６は、同一の切片の中に隣接した正常な結腸上皮を含み、正常細胞に対する腫瘍におけるＴＵＣＡＮ免疫染色の強度の比較を可能にする。ＴＵＣＡＮ免疫強度は、６６のこれらの標本のうち４２（６４％）の正常結腸上皮細胞と比較して浸潤癌細胞においてより強力であったが、これは、大まかに３分の２の結腸癌がＴＵＣＡＮタンパク質のアップレギュレートされたレベルを有する。ＴＵＣＡＮ免疫反応性は、これらの細胞の細胞質に亘って放射状に存在していた（図７）。ＴＵＣＡＮ免疫原とともに予め吸収された予備免疫血清または抗ＴＵＣＡＮ抗血清のいずれかを使用して実施した対照染色によって、これらの結果が抗ＴＵＣＡＮにとって特異的であることを確認した。

【０１８５】

腫瘍免疫染色の結果は、免疫強度（０～３のスケールでランク付けした）、免疫陽性百分率（０～１００％）および免疫スコア（これは、免疫強度と免疫百分率との積である）に関してスコア付けし、そして、これらのデータは患者の生存情報と相関していた。ＴＵＣＡＮ免疫染色は、疾患を有さずに生存している患者（ｎ＝６１）または再発した疾患を有して生存している患者（ｎ＝１０）と比較して、これらの癌によって死亡した患者（ｎ＝３１）の中で有意に高かった。ＴＵＣＡＮ免疫染色の結果の要約は、以下の表５において示す。

【０１８６】

（表５　ＴＵＣＡＮ免疫染色の結果の概要）

【０１８７】

【表５】

患者の状態	n	免疫陽性(%)	免疫強度	免疫スコア
		Mean Median ± SE	Mean Median ± SE	Mean Median ± SE
疾患なしで生存	61	58 ± 3 60	1.4 ± 0.1 1	92 ± 9 80
疾患あり生存	10	54 ± 7 55	1.3 ± 0.2 1	73 ± 21 65
疾患により脂肪	31	90 ± 4 95	2.5 ± 0.1 3	224 ± 12 240
p値	102	p < .0001	p < .0001	p < .0001

要約すると、ＴＵＣＡＮ発現は、初期結腸癌の実質的な割合において異常に上昇した。さらに、上昇したＴＵＣＡＮ発現は低減した患者の生存と相関している。

【０１８８】

（実施例ＩＸ）

（ＴＵＣＡＮは、プロカスパーゼ－９およびそれ自体に対して選択的に結合する）

この実施例は、ＴＵＣＡＮがプロカスパーゼ－９およびそれ自体に選択的に結合することを示す。ＣＡＲＤＳは、これらの互いに結合する能力について知られているので、ＴＵＣＡＮをＣＡＲＤ含有タンパク質であるプロカスパーゼ１、プロカスパーゼ２、プロカスパーゼ９、Ａｐａｆ１、Ｎｏｄ１（ＣＡＲＤ４）、ＣＥＤ４、ＮＡＣ（ＤＥＦＣＡＰ）、Ｃａｒｄｉａｋ（ＲＩＰ２）、Ｒａｉｄｄ（ＣＲＡＤＤ）、Ｂｃｌ１０（ＣＩＰＥＲ；ｈｕＥ１０）、ｃＩＡＰ１、ｃＩＡＰ２、ＣＬＡＮ、ＣＡＲＤ、ＣＡＲＤ９、およびそれ自体との相互作用について試験した。これらの中で、ＴＵＣＡＮは、プロカスパーゼ－９およびＴＵＣＡＮ自体とのみ会合した。

【０１８９】

図８は、代表的結果がＦｌａｇエピトープタグまたはＭｙｃエピトープタグのいずれかを含むＴＵＣＡＮを使用して実施する同時免疫沈降実験から得られることを示している。ＴＵＣＡＮポリペプチドを、エピトープタグ化プロカスパーゼ－９または他のタンパク質と一緒に、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞中で一過性トランスフェクションによって発現した。触媒システインがアラニンで置換されている（Ｃｙｓ２８７／Ａｌａ）プロカスパーゼ－９の不活性変異体を、アポトーシスの導入を回避するためにこれらの実験のために使用した（Ｃａｒｄｏｎｅら，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２８２：１３１８～１３２１（１９９８））。細胞溶解物は、トランスフェクトした細胞から調製され、そして、免疫沈降を抗Ｆｌａｇ抗体または抗Ｍｙｃ抗体を使用して実施して、その後、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ／免疫ブロッティング分析を行った。代表的な結果は、図８Ａにおいて提供した。この図８は、ＴＵＣＡＮが、プロカスパーゼと同時免疫沈降するが、ＣＡＲＤ含有タンパク質Ａｐａｆ１とは同時免疫沈降しないことを示す。ＴＵＣＡＮはまた、ＣＡＲＤ含有タンパク質、プロカスパーゼ－１、プロカスパーゼ－２、Ｎｏｄ１、ＣＥＤ４、ＮＡＣ、Ｃａｒｄｉａｋ、Ｒａｉｄｄ、Ｂｃｌ１０、ＣＬＡＮ、ＣＡＲＤ９、ｃＩＡＰ1およびｃＩＡＰ２と同時免疫沈降しなかった。さらに、同時免疫沈降実験は、ＤＥＤ含有カスパーゼ、プロカスパーゼ－８、プロカスパーゼ－１０との相互作用しなかったのでＴＵＣＡＮは、カスパーゼと非特異的に会合しなかった（図８Ａ）。

【０１９０】

プロカスパーゼ－９との相互作用についてＴＵＣＡＮの内のＣＡＲＤドメインの役割を決定するために、ＴＵＣＡＮのフラグメントを発現した。このＴＵＣＡＮフラグメントは

、本質的にＣＡＲＤ（残基３４５～４３１）のみを含むかまたはＣＡＲＤを欠く（残基１～３３７）（ΔＣＡＲＤ）。プロカスパーゼ－９は、全長ＴＵＣＡＮおよびＣＡＲＤのみのフラグメントと同時免疫沈降するが、ＴＵＣＡＮのΔＣＡＲＤフラグメントとは同時免疫沈降しない（図８Ｂ）。従って、ＴＵＣＡＮのＣＡＲＤドメインは、プロカスパーゼ－９との会合のために必要かつ十分である。ＴＵＣＡＮの自己会合はまた、ＨＡおよびＭｙｃタグ化タンパク質を使用し、全長タンパク質、ＣＡＲＤのみのタンパク質、およびΔＣＡＲＤタンパク質と対照する、同時免疫沈降実験によって確認される。全長ＴＵＣＡＮは、全長ＴＵＣＡＮおよびＣＡＲＤのみのフラグメントと相互作用するが、ΔＣＡＲＤフラグメントとは相互作用しない（図８Ｃ）。従って、ＴＵＣＡＮのＣＡＲＤドメインは、自己会合のために必要かつ十分である。

【０１９１】

本出願に亘って、種々の刊行物は括弧内で参照されている。これらの刊行物の開示の全体が、本出願が関連する技術の状態をより完全に記載するために本明細書中で本出願における参考として援用される。

【０１９２】

本発明は、開示された実施形態を参照して記載されるが、当業者は、詳説された具体的な実施形態は本発明の単なる例示であると容易に解釈する。種々の改変が本発明の精神を逸脱することなく実施され得ることが理解されるべきである。

【図面の簡単な説明】

【０１９３】

【図１】図１は、正常組織および悪性結腸組織中のＩＡＰファミリータンパク質、Ａｐａｆ１およびＴＵＣＡＮの免疫組織化学検出の例を示す。

【図２－１】図２Ａ～２Ｄは、正常組織および悪性結腸組織についての免疫スコアの比較を示す。

【図２－２】図２Ｅ～２Ｈは、正常組織および悪性結腸組織についての免疫スコアの比較を示す。

【図２－３】図２Ｉ～２Ｌは、正常組織および悪性結腸組織についての免疫スコアの比較を示す。

【図２－４】図２Ｍ～２Ｐは、正常組織および悪性結腸組織についての免疫スコアの比較を示す。

【図３－１】図３Ａ～３Ｄは、イムノブロットによる結腸癌中のＩＡＰ、Ａｐｆ１およびＴＵＣＡＮタンパク質の抗体の特異性および発現を示す。

【図３－２】図３Ｅは、イムノブロットによる結腸癌中のＩＡＰ、Ａｐｆ１およびＴＵＣＡＮタンパク質の抗体の特異性および発現を示す。

【図３－３】図３Ｆは、イムノブロットによる結腸癌中のＩＡＰ、Ａｐｆ１およびＴＵＣＡＮタンパク質の抗体の特異性および発現を示す。

【図４－１】図４Ａ～４Ｈは、結腸癌患者に対する「疾患に罹患していない生存」（図４Ａ）および「全体的な生存」（図４Ｂ）のバイオマーカー免疫染色データの相関を示す。

【図４－２】図４Ｉ～４Ｐは、結腸癌患者に対する「疾患に罹患していない生存」（図４Ａ）および「全体的な生存」（図４Ｂ）のバイオマーカー免疫染色データの相関を示す。

【図４－３】図４Ｑ～４Ｘは、結腸癌患者に対する「疾患に罹患していない生存」（図４Ａ）および「全体的な生存」（図４Ｂ）のバイオマーカー免疫染色データの相関を示す。

【図４－４】図４Ｙ～４Ｚおよび図４Ａ－１～図４Ｆ－１は、結腸癌患者に対する「疾患に罹患していない生存」（図４Ａ）および「全体的な生存」（図４Ｂ）のバイオマーカー免疫染色データの相関を示す。

【図５－１】図５Ａおよび５Ｂは、結腸癌患者に対する「疾患に罹患していない生存」（図５Ａ）および「全体的な生存」（図５Ｂ）のバイオマーカー免疫染色データの相関を示す。

【図５－２】図５Ｃおよび５Ｄは、結腸癌患者に対する「疾患に罹患していない生存」（図５Ａ）および「全体的な生存」（図５Ｂ）のバイオマーカー免疫染色データの相関を示

す。
【図６】図６は、いくつかの腫瘍細胞株中のＴＵＣＡＮの発現を示す。
【図７】図７は、結腸直腸中のＴＵＣＡＮ発現の免疫組織化学分析を示す。
【図８－１】図８Ａは、ＴＵＣＡＮが、プロカスパーゼ－９およびＴＵＣＡＮ自身に対して選択的に結合することを示す。
【図８－２】図８Ｂおよび８Ｃは、ＴＵＣＡＮが、プロカスパーゼ－９およびＴＵＣＡＮ自身に対して選択的に結合することを示す。
【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> The Burnham Institute

<120> Methods For Determining the Prognosis
For Cancer Patients Using Tucan

<130> FP-LJ 5246

<150> US 60/289,233
<151> 2001-05-07

<150> US 60/356,934
<151> 2002-02-12

<160> 15

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
<211> 1487
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(1293)

<400> 1

```
atg atg aga cag agg cag agc cat tat tgt tcc gtg ctg ttc ctg agt   48
Met Met Arg Gln Arg Gln Ser His Tyr Cys Ser Val Leu Phe Leu Ser
 1               5                  10                  15

gtc aac tat ctg ggg ggg aca ttc cca gga gac att tgc tca gaa gag   96
Val Asn Tyr Leu Gly Gly Thr Phe Pro Gly Asp Ile Cys Ser Glu Glu
            20                  25                  30

aat caa ata gtt tcc tct tat gct tct aaa gtc tgt ttt gag atc gaa   144
Asn Gln Ile Val Ser Ser Tyr Ala Ser Lys Val Cys Phe Glu Ile Glu
        35                  40                  45

gaa gat tat aaa aat cgt cag ttt ctg ggg cct gaa gga aat gtg gat   192
Glu Asp Tyr Lys Asn Arg Gln Phe Leu Gly Pro Glu Gly Asn Val Asp
    50                  55                  60

gtt gag ttg att gat aag agc aca aac aga tac agc gtt tgg ttc ccc   240
Val Glu Leu Ile Asp Lys Ser Thr Asn Arg Tyr Ser Val Trp Phe Pro
65                  70                  75                  80

act gct ggc tgg tat ctg tgg tca gcc aca ggc ctc ggc ttc ctg gta   288
Thr Ala Gly Trp Tyr Leu Trp Ser Ala Thr Gly Leu Gly Phe Leu Val
```

```
                85                  90                  95

agg gat gag gtc aca gtg acg att gcg ttt ggt tcc tgg agt cag cac   336
Arg Asp Glu Val Thr Val Thr Ile Ala Phe Gly Ser Trp Ser Gln His
            100                 105                 110

ctg gcc ctg gac ctg cag cac cat gaa cag tgg ctg gtg ggc ggc ccc   384
Leu Ala Leu Asp Leu Gln His His Glu Gln Trp Leu Val Gly Gly Pro
        115                 120                 125

ttg ttt gat gtc act gca gag cca gag gag gct gtc gcc gaa atc cac   432
Leu Phe Asp Val Thr Ala Glu Pro Glu Glu Ala Val Ala Glu Ile His
    130                 135                 140

ctc ccc cac ttc atc tcc ctc caa ggt gag gtg gac gtc tcc tgg ttt   480
Leu Pro His Phe Ile Ser Leu Gln Gly Glu Val Asp Val Ser Trp Phe
145                 150                 155                 160

ctc gtt gcc cat ttt aag aat gaa ggg atg gtc ctg gag cat cca gcc   528
Leu Val Ala His Phe Lys Asn Glu Gly Met Val Leu Glu His Pro Ala
                165                 170                 175

cgg gtg gag cct ttc tat gct gtc ctg gaa agc ccc agc ttc tct ctg   576
Arg Val Glu Pro Phe Tyr Ala Val Leu Glu Ser Pro Ser Phe Ser Leu
            180                 185                 190

atg ggc atc ctg ctg cgg atc gcc agt ggg act cgc ctc tcc atc ccc   624
Met Gly Ile Leu Leu Arg Ile Ala Ser Gly Thr Arg Leu Ser Ile Pro
        195                 200                 205

atc act tcc aac aca ttg atc tat tat cac ccc cac ccc gaa gat att   672
Ile Thr Ser Asn Thr Leu Ile Tyr Tyr His Pro His Pro Glu Asp Ile
    210                 215                 220

aag ttc cac ttg tac ctt gtc ccc agc gac gcc ttg cta aca aag gcg   720
Lys Phe His Leu Tyr Leu Val Pro Ser Asp Ala Leu Leu Thr Lys Ala
225                 230                 235                 240

ata gat gat gag gaa gat cgc ttc cat ggt gtg cgc ctg cag act tcg   768
Ile Asp Asp Glu Glu Asp Arg Phe His Gly Val Arg Leu Gln Thr Ser
                245                 250                 255

ccc cca atg gaa ccc ctg aac ttt ggt tcc agt tat att gtg tct aat   816
Pro Pro Met Glu Pro Leu Asn Phe Gly Ser Ser Tyr Ile Val Ser Asn
            260                 265                 270

tct gct aac ctg aaa gta atg ccc aag gag ttg aaa ttg tcc tac agg   864
Ser Ala Asn Leu Lys Val Met Pro Lys Glu Leu Lys Leu Ser Tyr Arg
        275                 280                 285

agc cct gga gaa att cag cac ttc tca aaa ttc tat gct ggg cag atg   912
Ser Pro Gly Glu Ile Gln His Phe Ser Lys Phe Tyr Ala Gly Gln Met
    290                 295                 300
```

```
aag gaa ccc att caa ctt gag att act gaa aaa aga cat ggg act ttg   960
Lys Glu Pro Ile Gln Leu Glu Ile Thr Glu Lys Arg His Gly Thr Leu
305                 310                 315                 320

gtg tgg gat act gag gtg aag cca gtg gat ctc cag ctt gta gct gca   1008
Val Trp Asp Thr Glu Val Lys Pro Val Asp Leu Gln Leu Val Ala Ala
                325                 330                 335

tca gcc cct cct cct ttc tca ggt gca gcc ttt gtg aag gag aac cac   1056
Ser Ala Pro Pro Pro Phe Ser Gly Ala Ala Phe Val Lys Glu Asn His
            340                 345                 350

cgg caa ctc caa gcc agg atg ggg gac ctg aaa ggg gtg ctc gat gat   1104
Arg Gln Leu Gln Ala Arg Met Gly Asp Leu Lys Gly Val Leu Asp Asp
        355                 360                 365

ctc cag gac aat gag gtt ctt act gag aat gag aag gag ctg gtg gag   1152
Leu Gln Asp Asn Glu Val Leu Thr Glu Asn Glu Lys Glu Leu Val Glu
    370                 375                 380

cag gaa aag aca cgg cag agc aag aat gag gcc ttg ctg agc atg gtg   1200
Gln Glu Lys Thr Arg Gln Ser Lys Asn Glu Ala Leu Leu Ser Met Val
385                 390                 395                 400

gag aag aaa ggg gac ctg gcc ctg gac gtg ctc ttc aga agc att agt   1248
Glu Lys Lys Gly Asp Leu Ala Leu Asp Val Leu Phe Arg Ser Ile Ser
                405                 410                 415

gaa agg gac cct tac ctc gtg tcc tat ctt aga cag cag aat ttg       1293
Glu Arg Asp Pro Tyr Leu Val Ser Tyr Leu Arg Gln Gln Asn Leu
            420                 425                 430

taaaatgagt cagttaggta gtctggaaga gagaatccag cgttctcatt ggaaatggat 1353
aaacagaaat gtgatcattg atttcagtgt tcaagacaga agaagactgg gtaacatcta 1413
tcacacaggc tttcaggaca gacttgtaac ctggcatgta cctattgact gtatcctcat 1473
gcattttcct caag                                                   1487

<210> 2
<211> 431
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2
Met Met Arg Gln Arg Gln Ser His Tyr Cys Ser Val Leu Phe Leu Ser
 1               5                  10                  15
Val Asn Tyr Leu Gly Gly Thr Phe Pro Gly Asp Ile Cys Ser Glu Glu
            20                  25                  30
Asn Gln Ile Val Ser Ser Tyr Ala Ser Lys Val Cys Phe Glu Ile Glu
        35                  40                  45
Glu Asp Tyr Lys Asn Arg Gln Phe Leu Gly Pro Glu Gly Asn Val Asp
    50                  55                  60
Val Glu Leu Ile Asp Lys Ser Thr Asn Arg Tyr Ser Val Trp Phe Pro
```

```
65                  70                  75                  80
Thr Ala Gly Trp Tyr Leu Trp Ser Ala Thr Gly Leu Gly Phe Leu Val
                85                  90                  95
Arg Asp Glu Val Thr Val Thr Ile Ala Phe Gly Ser Trp Ser Gln His
            100                 105                 110
Leu Ala Leu Asp Leu Gln His His Glu Gln Trp Leu Val Gly Gly Pro
        115                 120                 125
Leu Phe Asp Val Thr Ala Glu Pro Glu Glu Ala Val Ala Glu Ile His
    130                 135                 140
Leu Pro His Phe Ile Ser Leu Gln Gly Glu Val Asp Val Ser Trp Phe
145                 150                 155                 160
Leu Val Ala His Phe Lys Asn Glu Gly Met Val Leu Glu His Pro Ala
                165                 170                 175
Arg Val Glu Pro Phe Tyr Ala Val Leu Glu Ser Pro Ser Phe Ser Leu
            180                 185                 190
Met Gly Ile Leu Leu Arg Ile Ala Ser Gly Thr Arg Leu Ser Ile Pro
        195                 200                 205
Ile Thr Ser Asn Thr Leu Ile Tyr Tyr His Pro His Pro Glu Asp Ile
    210                 215                 220
Lys Phe His Leu Tyr Leu Val Pro Ser Asp Ala Leu Leu Thr Lys Ala
225                 230                 235                 240
Ile Asp Asp Glu Glu Asp Arg Phe His Gly Val Arg Leu Gln Thr Ser
                245                 250                 255
Pro Pro Met Glu Pro Leu Asn Phe Gly Ser Ser Tyr Ile Val Ser Asn
            260                 265                 270
Ser Ala Asn Leu Lys Val Met Pro Lys Glu Leu Lys Leu Ser Tyr Arg
        275                 280                 285
Ser Pro Gly Glu Ile Gln His Phe Ser Lys Phe Tyr Ala Gly Gln Met
    290                 295                 300
Lys Glu Pro Ile Gln Leu Glu Ile Thr Glu Lys Arg His Gly Thr Leu
305                 310                 315                 320
Val Trp Asp Thr Glu Val Lys Pro Val Asp Leu Gln Leu Val Ala Ala
                325                 330                 335
Ser Ala Pro Pro Pro Phe Ser Gly Ala Ala Phe Val Lys Glu Asn His
            340                 345                 350
Arg Gln Leu Gln Ala Arg Met Gly Asp Leu Lys Gly Val Leu Asp Asp
        355                 360                 365
Leu Gln Asp Asn Glu Val Leu Thr Glu Asn Glu Lys Glu Leu Val Glu
    370                 375                 380
Gln Glu Lys Thr Arg Gln Ser Lys Asn Glu Ala Leu Leu Ser Met Val
385                 390                 395                 400
Glu Lys Lys Gly Asp Leu Ala Leu Asp Val Leu Phe Arg Ser Ile Ser
                405                 410                 415
Glu Arg Asp Pro Tyr Leu Val Ser Tyr Leu Arg Gln Gln Asn Leu
            420                 425                 430
```

<210> 3
<211> 87
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

```
Ala Ala Phe Val Lys Glu Asn His Arg Gln Leu Gln Ala Arg Met Gly
 1               5                  10                  15
Asp Leu Lys Gly Val Leu Asp Asp Leu Gln Asp Asn Glu Val Leu Thr
            20                  25                  30
Glu Asn Glu Lys Glu Leu Val Glu Gln Glu Lys Thr Arg Gln Ser Lys
        35                  40                  45
Asn Glu Ala Leu Leu Ser Met Val Glu Lys Lys Gly Asp Leu Ala Leu
    50                  55                  60
Asp Val Leu Phe Arg Ser Ile Ser Glu Arg Asp Pro Tyr Leu Val Ser
65                  70                  75                  80
Tyr Leu Arg Gln Gln Asn Leu
                85
```

<210> 4
<211> 416
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

```
Met Asp Glu Ala Asp Arg Arg Leu Leu Arg Arg Cys Arg Leu Arg Leu
 1               5                  10                  15
Val Glu Glu Leu Gln Val Asp Gln Leu Trp Asp Ala Leu Leu Ser Ser
            20                  25                  30
Glu Leu Phe Arg Pro His Met Ile Glu Asp Ile Gln Arg Ala Gly Ser
        35                  40                  45
Gly Ser Arg Arg Asp Gln Ala Arg Gln Leu Ile Ile Asp Leu Glu Thr
    50                  55                  60
Arg Gly Ser Gln Ala Leu Pro Leu Phe Ile Ser Cys Leu Glu Asp Thr
65                  70                  75                  80
Gly Gln Asp Met Leu Ala Ser Phe Leu Arg Thr Asn Arg Gln Ala Ala
                85                  90                  95
Lys Leu Ser Lys Pro Thr Leu Glu Asn Leu Thr Pro Val Val Leu Arg
            100                 105                 110
Pro Glu Ile Arg Lys Pro Glu Val Leu Arg Pro Glu Thr Pro Arg Pro
        115                 120                 125
Val Asp Ile Gly Ser Gly Gly Phe Gly Asp Val Gly Ala Leu Glu Ser
    130                 135                 140
Leu Arg Gly Asn Ala Asp Leu Ala Tyr Ile Leu Ser Met Glu Pro Cys
145                 150                 155                 160
Gly His Cys Leu Ile Ile Asn Asn Val Asn Phe Cys Arg Glu Ser Gly
                165                 170                 175
Leu Arg Thr Arg Thr Gly Ser Asn Ile Asp Cys Glu Lys Leu Arg Arg
            180                 185                 190
Arg Phe Ser Ser Pro His Phe Met Val Glu Val Lys Gly Asp Leu Thr
        195                 200                 205
Ala Lys Lys Met Val Leu Ala Leu Leu Glu Leu Ala Gln Gln Asp His
    210                 215                 220
Gly Ala Leu Asp Cys Cys Val Val Val Ile Leu Ser His Gly Cys Gln
225                 230                 235                 240
Ala Ser His Leu Gln Phe Pro Gly Ala Val Tyr Gly Thr Asp Gly Cys
                245                 250                 255
Pro Val Ser Val Glu Lys Ile Val Asn Ile Phe Asn Gly Thr Ser Cys
```

```
            260                 265                 270
Pro Ser Leu Gly Gly Lys Pro Lys Leu Phe Phe Ile Gln Ala Cys Gly
        275                 280                 285
Gly Glu Gln Lys Asp His Gly Phe Glu Val Ala Ser Thr Ser Pro Glu
    290                 295                 300
Asp Glu Ser Pro Gly Ser Asn Pro Glu Pro Asp Ala Thr Pro Phe Gln
305                 310                 315                 320
Glu Gly Leu Arg Thr Phe Asp Gln Leu Asp Ala Ile Ser Ser Leu Pro
                325                 330                 335
Thr Pro Ser Asp Ile Phe Val Ser Tyr Ser Thr Phe Pro Gly Phe Val
            340                 345                 350
Ser Trp Arg Asp Pro Lys Ser Gly Ser Trp Tyr Val Glu Thr Leu Asp
        355                 360                 365
Asp Ile Phe Glu Gln Trp Ala His Ser Glu Asp Leu Gln Ser Leu Leu
    370                 375                 380
Leu Arg Val Ala Asn Ala Val Ser Val Lys Gly Ile Tyr Lys Gln Met
385                 390                 395                 400
Pro Gly Cys Phe Asn Phe Leu Arg Lys Lys Leu Phe Phe Lys Thr Ser
                405                 410                 415
```

<210> 5
<211> 3164
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (724)...(2538)

<400> 5

```
gaattcaaaa tgtcttcagt tgtaaatctt accattattt tacgtacctc taagaaataa 60
aagtgcttct aattaaaata tgatgtcatt aattatgaaa tacttcttga taacagaagt 120
ttaaaatagc catcttagaa tcagtgaaat atggtaatgt attattttcc tcctttgagt 180
taggtcttgt gctttttttt cctggccact aaatttcaca atttccaaaa agcaaaataa 240
acatattctg aatatttttg ctgtgaaaca cttgacagca gagctttcca ccatgaaaag 300
aagcttcatg agtcacacat tacatctttg ggttgattga atgccactga aacattctag 360
tagcctggag aagttgacct acctgtggag atgcctgcca ttaaatggca tcctgatggc 420
ttaatacaca tcactcttct gtgaagggtt ttaattttca acacagctta ctctgtagca 480
tcatgtttac attgtatgta taaagattat acaaaggtgc aattgtgtat ttcttcctta 540
aaatgtatca gtataggatt tagaatctcc atgttgaaac tctaaatgca tagaaataaa 600
aataataaaa aatttttcat tttggctttt cagcctagta ttaaaactga taaaagcaaa 660
gccatgcaca aaactacctc cctagagaaa ggctagtccc ttttcttccc cattcatttc 720
att atg aac ata gta gaa aac agc ata ttc tta tca aat ttg atg aaa   768
    Met Asn Ile Val Glu Asn Ser Ile Phe Leu Ser Asn Leu Met Lys
     1               5                  10                  15

agc gcc aac acg ttt gaa ctg aaa tac gac ttg tca tgt gaa ctg tac   816
Ser Ala Asn Thr Phe Glu Leu Lys Tyr Asp Leu Ser Cys Glu Leu Tyr
                20                  25                  30

cga atg tct acg tat tcc act ttt cct gct ggg gtc cct gtc tca gaa   864
Arg Met Ser Thr Tyr Ser Thr Phe Pro Ala Gly Val Pro Val Ser Glu
```

```
            35                  40                  45

agg agt ctt gct cgc gct ggt ttc tat tac act ggt gtg aat gac aag   912
Arg Ser Leu Ala Arg Ala Gly Phe Tyr Tyr Thr Gly Val Asn Asp Lys
         50                  55                  60

gtc aaa tgc ttc tgt tgt ggc ctg atg ctg gat aac tgg aaa aga gga   960
Val Lys Cys Phe Cys Cys Gly Leu Met Leu Asp Asn Trp Lys Arg Gly
     65                  70                  75

gac agt cct act gaa aag cat aaa aag ttg tat cct agc tgc aga ttc  1008
Asp Ser Pro Thr Glu Lys His Lys Lys Leu Tyr Pro Ser Cys Arg Phe
 80                  85                  90                  95

gtt cag agt cta aat tcc gtt aac aac ttg gaa gct acc tct cag cct  1056
Val Gln Ser Leu Asn Ser Val Asn Asn Leu Glu Ala Thr Ser Gln Pro
                100                 105                 110

act ttt cct tct tca gta aca aat tcc aca cac tca tta ctt ccg ggt  1104
Thr Phe Pro Ser Ser Val Thr Asn Ser Thr His Ser Leu Leu Pro Gly
            115                 120                 125

aca gaa aac agt gga tat ttc cgt ggc tct tat tca aac tct cca tca  1152
Thr Glu Asn Ser Gly Tyr Phe Arg Gly Ser Tyr Ser Asn Ser Pro Ser
        130                 135                 140

aat cct gta aac tcc aga gca aat caa gat ttt tct gcc ttg atg aga  1200
Asn Pro Val Asn Ser Arg Ala Asn Gln Asp Phe Ser Ala Leu Met Arg
    145                 150                 155

agt tcc tac cac tgt gca atg aat aac gaa aat gcc aga tta ctt act  1248
Ser Ser Tyr His Cys Ala Met Asn Asn Glu Asn Ala Arg Leu Leu Thr
160                 165                 170                 175

ttt cag aca tgg cca ttg act ttt ctg tcg cca aca gat ctg gca aaa  1296
Phe Gln Thr Trp Pro Leu Thr Phe Leu Ser Pro Thr Asp Leu Ala Lys
                180                 185                 190

gca ggc ttt tac tac ata gga cct gga gac aga gtg gct tgc ttt gcc  1344
Ala Gly Phe Tyr Tyr Ile Gly Pro Gly Asp Arg Val Ala Cys Phe Ala
            195                 200                 205

tgt ggt gga aaa ttg agc aat tgg gaa ccg aag gat aat gct atg tca  1392
Cys Gly Gly Lys Leu Ser Asn Trp Glu Pro Lys Asp Asn Ala Met Ser
        210                 215                 220

gaa cac ctg aga cat ttt ccc aaa tgc cca ttt ata gaa aat cag ctt  1440
Glu His Leu Arg His Phe Pro Lys Cys Pro Phe Ile Glu Asn Gln Leu
    225                 230                 235

caa gac act tca aga tac aca gtt tct aat ctg agc atg cag aca cat  1488
Gln Asp Thr Ser Arg Tyr Thr Val Ser Asn Leu Ser Met Gln Thr His
240                 245                 250                 255
```

```
gca gcc cgc ttt aaa aca ttc ttt aac tgg ccc tct agt gtt cta gtt   1536
Ala Ala Arg Phe Lys Thr Phe Phe Asn Trp Pro Ser Ser Val Leu Val
               260                 265                 270

aat cct gag cag ctt gca agt gcg ggt ttt tat tat gtg ggt aac agt   1584
Asn Pro Glu Gln Leu Ala Ser Ala Gly Phe Tyr Tyr Val Gly Asn Ser
           275                 280                 285

gat gat gtc aaa tgc ttt tgc tgt gat ggt gga ctc agg tgt tgg gaa   1632
Asp Asp Val Lys Cys Phe Cys Cys Asp Gly Gly Leu Arg Cys Trp Glu
       290                 295                 300

tct gga gat gat cca tgg gtt caa cat gcc aag tgg ttt cca agg tgt   1680
Ser Gly Asp Asp Pro Trp Val Gln His Ala Lys Trp Phe Pro Arg Cys
   305                 310                 315

gag tac ttg ata aga att aaa gga cag gag ttc atc cgt caa gtt caa   1728
Glu Tyr Leu Ile Arg Ile Lys Gly Gln Glu Phe Ile Arg Gln Val Gln
320                 325                 330                 335

gcc agt tac cct cat cta ctt gaa cag ctg cta tcc aca tca gac agc   1776
Ala Ser Tyr Pro His Leu Leu Glu Gln Leu Leu Ser Thr Ser Asp Ser
               340                 345                 350

cca gga gat gaa aat gca gag tca tca att atc cat ttt gaa cct gga   1824
Pro Gly Asp Glu Asn Ala Glu Ser Ser Ile Ile His Phe Glu Pro Gly
           355                 360                 365

gaa gac cat tca gaa gat gca atc atg atg aat act cct gtg att aat   1872
Glu Asp His Ser Glu Asp Ala Ile Met Met Asn Thr Pro Val Ile Asn
       370                 375                 380

gct gcc gtg gaa atg ggc ttt agt aga agc ctg gta aaa cag aca gtt   1920
Ala Ala Val Glu Met Gly Phe Ser Arg Ser Leu Val Lys Gln Thr Val
   385                 390                 395

cag aga aaa atc cta gca act gga gag aat tat aga cta gtc aat gat   1968
Gln Arg Lys Ile Leu Ala Thr Gly Glu Asn Tyr Arg Leu Val Asn Asp
400                 405                 410                 415

ctt gtg tta gac tta ctc aat gca gaa gat gaa ata agg gaa gag gag   2016
Leu Val Leu Asp Leu Leu Asn Ala Glu Asp Glu Ile Arg Glu Glu Glu
               420                 425                 430

aga gaa aga gca act gag gaa aaa gaa tca aat gat tta tta tta atc   2064
Arg Glu Arg Ala Thr Glu Glu Lys Glu Ser Asn Asp Leu Leu Leu Ile
           435                 440                 445

cgg aag aat aga atg gca ctt ttt caa cat ttg act tgt gta att cca   2112
Arg Lys Asn Arg Met Ala Leu Phe Gln His Leu Thr Cys Val Ile Pro
       450                 455                 460
```

```
atc ctg gat agt cta cta act gcc gga att att aat gaa caa gaa cat   2160
Ile Leu Asp Ser Leu Leu Thr Ala Gly Ile Ile Asn Glu Gln Glu His
    465                 470                 475

gat gtt att aaa cag aag aca cag acg tct tta caa gca aga gaa ctg   2208
Asp Val Ile Lys Gln Lys Thr Gln Thr Ser Leu Gln Ala Arg Glu Leu
480                 485                 490                 495

att gat acg att tta gta aaa gga aat att gca gcc act gta ttc aga   2256
Ile Asp Thr Ile Leu Val Lys Gly Asn Ile Ala Ala Thr Val Phe Arg
                500                 505                 510

aac tct ctg caa gaa gct gaa gct gtg tta tat gag cat tta ttt gtg   2304
Asn Ser Leu Gln Glu Ala Glu Ala Val Leu Tyr Glu His Leu Phe Val
            515                 520                 525

caa cag gac ata aaa tat att ccc aca gaa gat gtt tca gat cta cca   2352
Gln Gln Asp Ile Lys Tyr Ile Pro Thr Glu Asp Val Ser Asp Leu Pro
        530                 535                 540

gtg gaa gaa caa ttg cgg aga cta caa gaa gaa aga aca tgt aaa gtg   2400
Val Glu Glu Gln Leu Arg Arg Leu Gln Glu Glu Arg Thr Cys Lys Val
    545                 550                 555

tgt atg gac aaa gaa gtg tcc ata gtg ttt att cct tgt ggt cat cta   2448
Cys Met Asp Lys Glu Val Ser Ile Val Phe Ile Pro Cys Gly His Leu
560                 565                 570                 575

gta gta tgc aaa gat tgt gct cct tct tta aga aag tgt cct att tgt   2496
Val Val Cys Lys Asp Cys Ala Pro Ser Leu Arg Lys Cys Pro Ile Cys
                580                 585                 590

agg agt aca atc aag ggt aca gtt cgt aca ttt ctt tca tga           2538
Arg Ser Thr Ile Lys Gly Thr Val Arg Thr Phe Leu Ser  *
            595                 600

agaagaacca aaacatcatc taaactttag aattaattta ttaaatgtat tataacttta 2598
actttcatcc taatttggtt tccttaaaat ttttatttat ttacaactca acaaacattg 2658
ttttgtgtaa catatttaat atatgtatct aaaccatatg aacatatatt ttttagaaac 2718
taagagaatg ataggctttt gttcttatga acgaaaaaga ggtagcacta caaacacaat 2778
attcaatcaa aatttcagca ttattgaaat tgtaagtgaa gtaaaactta agatatttga 2838
gttaaccttt aagaatttta aatattttgg cattgtacta ataccgggaa catgaagcca 2898
ggtgtggtgg tatgtgcctg tagtcccagg ctgaggcaag agaattactt gagcccagga 2958
gtttgaatcc atcctgggca gcatactgag accctgcctt taaaaacaaa cagaacaaaa 3018
acaaaacacc agggacacat ttctctgtct tttttgatca gtgtcctata catcgaaggt 3078
gtgcatatat gttgaatgac attttaggga catggtgttt ttataaagaa ttctgtgaga 3138
aaaaatttaa taaaaccccc caaatt                                     3164

<210> 6
<211> 604
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

<400> 6

```
Met Asn Ile Val Glu Asn Ser Ile Phe Leu Ser Asn Leu Met Lys Ser
 1               5                  10                  15
Ala Asn Thr Phe Glu Leu Lys Tyr Asp Leu Ser Cys Glu Leu Tyr Arg
            20                  25                  30
Met Ser Thr Tyr Ser Thr Phe Pro Ala Gly Val Pro Val Ser Glu Arg
        35                  40                  45
Ser Leu Ala Arg Ala Gly Phe Tyr Tyr Thr Gly Val Asn Asp Lys Val
    50                  55                  60
Lys Cys Phe Cys Cys Gly Leu Met Leu Asp Asn Trp Lys Arg Gly Asp
65                  70                  75                  80
Ser Pro Thr Glu Lys His Lys Lys Leu Tyr Pro Ser Cys Arg Phe Val
                85                  90                  95
Gln Ser Leu Asn Ser Val Asn Asn Leu Glu Ala Thr Ser Gln Pro Thr
            100                 105                 110
Phe Pro Ser Ser Val Thr Asn Ser Thr His Ser Leu Leu Pro Gly Thr
        115                 120                 125
Glu Asn Ser Gly Tyr Phe Arg Gly Ser Tyr Ser Asn Ser Pro Ser Asn
    130                 135                 140
Pro Val Asn Ser Arg Ala Asn Gln Asp Phe Ser Ala Leu Met Arg Ser
145                 150                 155                 160
Ser Tyr His Cys Ala Met Asn Asn Glu Asn Ala Arg Leu Leu Thr Phe
                165                 170                 175
Gln Thr Trp Pro Leu Thr Phe Leu Ser Pro Thr Asp Leu Ala Lys Ala
            180                 185                 190
Gly Phe Tyr Tyr Ile Gly Pro Gly Asp Arg Val Ala Cys Phe Ala Cys
        195                 200                 205
Gly Gly Lys Leu Ser Asn Trp Glu Pro Lys Asp Asn Ala Met Ser Glu
    210                 215                 220
His Leu Arg His Phe Pro Lys Cys Pro Phe Ile Glu Asn Gln Leu Gln
225                 230                 235                 240
Asp Thr Ser Arg Tyr Thr Val Ser Asn Leu Ser Met Gln Thr His Ala
                245                 250                 255
Ala Arg Phe Lys Thr Phe Phe Asn Trp Pro Ser Ser Val Leu Val Asn
            260                 265                 270
Pro Glu Gln Leu Ala Ser Ala Gly Phe Tyr Tyr Val Gly Asn Ser Asp
        275                 280                 285
Asp Val Lys Cys Phe Cys Cys Asp Gly Gly Leu Arg Cys Trp Glu Ser
    290                 295                 300
Gly Asp Asp Pro Trp Val Gln His Ala Lys Trp Phe Pro Arg Cys Glu
305                 310                 315                 320
Tyr Leu Ile Arg Ile Lys Gly Gln Glu Phe Ile Arg Gln Val Gln Ala
                325                 330                 335
Ser Tyr Pro His Leu Leu Glu Gln Leu Leu Ser Thr Ser Asp Ser Pro
            340                 345                 350
Gly Asp Glu Asn Ala Glu Ser Ser Ile Ile His Phe Glu Pro Gly Glu
        355                 360                 365
Asp His Ser Glu Asp Ala Ile Met Met Asn Thr Pro Val Ile Asn Ala
    370                 375                 380
Ala Val Glu Met Gly Phe Ser Arg Ser Leu Val Lys Gln Thr Val Gln
385                 390                 395                 400
Arg Lys Ile Leu Ala Thr Gly Glu Asn Tyr Arg Leu Val Asn Asp Leu
                405                 410                 415
```

```
Val Leu Asp Leu Leu Asn Ala Glu Asp Glu Ile Arg Glu Glu Glu Arg
            420                 425                 430
Glu Arg Ala Thr Glu Glu Lys Glu Ser Asn Asp Leu Leu Leu Ile Arg
        435                 440                 445
Lys Asn Arg Met Ala Leu Phe Gln His Leu Thr Cys Val Ile Pro Ile
    450                 455                 460
Leu Asp Ser Leu Leu Thr Ala Gly Ile Ile Asn Glu Gln Glu His Asp
465                 470                 475                 480
Val Ile Lys Gln Lys Thr Gln Thr Ser Leu Gln Ala Arg Glu Leu Ile
                485                 490                 495
Asp Thr Ile Leu Val Lys Gly Asn Ile Ala Ala Thr Val Phe Arg Asn
            500                 505                 510
Ser Leu Gln Glu Ala Glu Ala Val Leu Tyr Glu His Leu Phe Val Gln
        515                 520                 525
Gln Asp Ile Lys Tyr Ile Pro Thr Glu Asp Val Ser Asp Leu Pro Val
    530                 535                 540
Glu Glu Gln Leu Arg Arg Leu Gln Glu Glu Arg Thr Cys Lys Val Cys
545                 550                 555                 560
Met Asp Lys Glu Val Ser Ile Val Phe Ile Pro Cys Gly His Leu Val
                565                 570                 575
Val Cys Lys Asp Cys Ala Pro Ser Leu Arg Lys Cys Pro Ile Cys Arg
            580                 585                 590
Ser Thr Ile Lys Gly Thr Val Arg Thr Phe Leu Ser
        595                 600
```

<210> 7
<211> 2585
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (201)...(2546)

<400> 7

```
ggggcagcag cgttggcccg gccccgggag cggagagcga ggggaggcgg agacggagga 60
aggtctgagg agcagcttca gtccccgccg agccgccacc gcaggtcgag gacggtcgga 120
ctcccgcggc gggaggagcc tgttcccctg agggtatttg aagtatacca tacaactgtt 180
ttgaaaatcc agcgtggaca atg gct act caa gct gat ttg atg gag ttg gac 233
                      Met Ala Thr Gln Ala Asp Leu Met Glu Leu Asp
                       1               5                  10

atg gcc atg gaa cca gac aga aaa gcg gct gtt agt cac tgg cag caa   281
Met Ala Met Glu Pro Asp Arg Lys Ala Ala Val Ser His Trp Gln Gln
             15                  20                  25

cag tct tac ctg gac tct gga atc cat tct ggt gcc act acc aca gct   329
Gln Ser Tyr Leu Asp Ser Gly Ile His Ser Gly Ala Thr Thr Thr Ala
         30                  35                  40

cct tct ctg agt ggt aaa ggc aat cct gag gaa gag gat gtg gat acc   377
Pro Ser Leu Ser Gly Lys Gly Asn Pro Glu Glu Glu Asp Val Asp Thr
```

```
     45                  50                  55

tcc caa gtc ctg tat gag tgg gaa cag gga ttt tct cag tcc ttc act   425
Ser Gln Val Leu Tyr Glu Trp Glu Gln Gly Phe Ser Gln Ser Phe Thr
 60                  65                  70                  75

caa gaa caa gta gct gat att gat gga cag tat gca atg act cga gct   473
Gln Glu Gln Val Ala Asp Ile Asp Gly Gln Tyr Ala Met Thr Arg Ala
                 80                  85                  90

cag agg gta cga gct gct atg ttc cct gag aca tta gat gag ggc atg   521
Gln Arg Val Arg Ala Ala Met Phe Pro Glu Thr Leu Asp Glu Gly Met
             95                 100                 105

cag atc cca tct aca cag ttt gat gct gct cat ccc act aat gtc cag   569
Gln Ile Pro Ser Thr Gln Phe Asp Ala Ala His Pro Thr Asn Val Gln
        110                 115                 120

cgt ttg gct gaa cca tca cag atg ctg aaa cat gca gtt gta aac ttg   617
Arg Leu Ala Glu Pro Ser Gln Met Leu Lys His Ala Val Val Asn Leu
    125                 130                 135

att aac tat caa gat gat gca gaa ctt gcc aca cgt gca atc cct gaa   665
Ile Asn Tyr Gln Asp Asp Ala Glu Leu Ala Thr Arg Ala Ile Pro Glu
140                 145                 150                 155

ctg aca aaa ctg cta aat gac gag gac cag gtg gtg gtt aat aag gct   713
Leu Thr Lys Leu Leu Asn Asp Glu Asp Gln Val Val Val Asn Lys Ala
                160                 165                 170

gca gtt atg gtc cat cag ctt tct aaa aag gaa gct tcc aga cac gct   761
Ala Val Met Val His Gln Leu Ser Lys Lys Glu Ala Ser Arg His Ala
            175                 180                 185

atc atg cgt tct cct cag atg gtg tct gct att gta cgt acc atg cag   809
Ile Met Arg Ser Pro Gln Met Val Ser Ala Ile Val Arg Thr Met Gln
        190                 195                 200

aat aca aat gat gta gaa aca gct cgt tgt acc gct ggg acc ttg cat   857
Asn Thr Asn Asp Val Glu Thr Ala Arg Cys Thr Ala Gly Thr Leu His
    205                 210                 215

aac ctt tcc cat cat cgt gag ggc tta ctg gcc atc ttt aag tct gga   905
Asn Leu Ser His His Arg Glu Gly Leu Leu Ala Ile Phe Lys Ser Gly
220                 225                 230                 235

ggc att cct gcc ctg gtg aaa atg ctt ggt tca cca gtg gat tct gtg   953
Gly Ile Pro Ala Leu Val Lys Met Leu Gly Ser Pro Val Asp Ser Val
                240                 245                 250

ttg ttt tat gcc att aca act ctc cac aac ctt tta tta cat caa gaa  1001
Leu Phe Tyr Ala Ile Thr Thr Leu His Asn Leu Leu Leu His Gln Glu
            255                 260                 265
```

```
gga gct aaa atg gca gtg cgt tta gct ggt ggg ctg cag aaa atg gtt   1049
Gly Ala Lys Met Ala Val Arg Leu Ala Gly Gly Leu Gln Lys Met Val
        270                 275                 280

gcc ttg ctc aac aaa aca aat gtt aaa ttc ttg gct att acg aca gac   1097
Ala Leu Leu Asn Lys Thr Asn Val Lys Phe Leu Ala Ile Thr Thr Asp
    285                 290                 295

tgc ctt caa att tta gct tat ggc aac caa gaa agc aag ctc atc ata   1145
Cys Leu Gln Ile Leu Ala Tyr Gly Asn Gln Glu Ser Lys Leu Ile Ile
300                 305                 310                 315

ctg gct agt ggt gga ccc caa gct tta gta aat ata atg agg acc tat   1193
Leu Ala Ser Gly Gly Pro Gln Ala Leu Val Asn Ile Met Arg Thr Tyr
                320                 325                 330

act tac gaa aaa cta ctg tgg acc aca agc aga gtg ctg aag gtg cta   1241
Thr Tyr Glu Lys Leu Leu Trp Thr Thr Ser Arg Val Leu Lys Val Leu
            335                 340                 345

tct gtc tgc tct agt aat aag ccg gct att gta gaa gct ggt gga atg   1289
Ser Val Cys Ser Ser Asn Lys Pro Ala Ile Val Glu Ala Gly Gly Met
        350                 355                 360

caa gct tta gga ctt cac ctg aca gat cca agt caa cgt ctt gtt cag   1337
Gln Ala Leu Gly Leu His Leu Thr Asp Pro Ser Gln Arg Leu Val Gln
    365                 370                 375

aac tgt ctt tgg act ctc agg aat ctt tca gat gct gca act aaa cag   1385
Asn Cys Leu Trp Thr Leu Arg Asn Leu Ser Asp Ala Ala Thr Lys Gln
380                 385                 390                 395

gaa ggg atg gaa ggt ctc ctt ggg act ctt gtt cag ctt ctg ggt tca   1433
Glu Gly Met Glu Gly Leu Leu Gly Thr Leu Val Gln Leu Leu Gly Ser
                400                 405                 410

gat gat ata aat gtg gtc acc tgt gca gct gga att ctt tct aac ctc   1481
Asp Asp Ile Asn Val Val Thr Cys Ala Ala Gly Ile Leu Ser Asn Leu
            415                 420                 425

act tgc aat aat tat aag aac aag atg atg gtc tgc caa gtg ggt ggt   1529
Thr Cys Asn Asn Tyr Lys Asn Lys Met Met Val Cys Gln Val Gly Gly
        430                 435                 440

ata gag gct ctt gtg cgt act gtc ctt cgg gct ggt gac agg gaa gac   1577
Ile Glu Ala Leu Val Arg Thr Val Leu Arg Ala Gly Asp Arg Glu Asp
    445                 450                 455

atc act gag cct gcc atc tgt gct ctt cgt cat ctg acc agc cga cac   1625
Ile Thr Glu Pro Ala Ile Cys Ala Leu Arg His Leu Thr Ser Arg His
460                 465                 470                 475
```

```
caa gaa gca gag atg gcc cag aat gca gtt cgc ctt cac tat gga cta   1673
Gln Glu Ala Glu Met Ala Gln Asn Ala Val Arg Leu His Tyr Gly Leu
                480                 485                 490

cca gtt gtg gtt aag ctc tta cac cca cca tcc cac tgg cct ctg ata   1721
Pro Val Val Val Lys Leu Leu His Pro Pro Ser His Trp Pro Leu Ile
            495                 500                 505

aag gct act gtt gga ttg att cga aat ctt gcc ctt tgt ccc gca aat   1769
Lys Ala Thr Val Gly Leu Ile Arg Asn Leu Ala Leu Cys Pro Ala Asn
        510                 515                 520

cat gca cct ttg cgt gag cag ggt gcc att cca cga cta gtt cag ttg   1817
His Ala Pro Leu Arg Glu Gln Gly Ala Ile Pro Arg Leu Val Gln Leu
    525                 530                 535

ctt gtt cgt gca cat cag gat acc cag cgc cgt acg tcc atg ggt ggg   1865
Leu Val Arg Ala His Gln Asp Thr Gln Arg Arg Thr Ser Met Gly Gly
540                 545                 550                 555

aca cag cag caa ttt gtg gag ggg gtc cgc atg gaa gaa ata gtt gaa   1913
Thr Gln Gln Gln Phe Val Glu Gly Val Arg Met Glu Glu Ile Val Glu
                560                 565                 570

ggt tgt acc gga gcc ctt cac atc cta gct cgg gat gtt cac aac cga   1961
Gly Cys Thr Gly Ala Leu His Ile Leu Ala Arg Asp Val His Asn Arg
            575                 580                 585

att gtt atc aga gga cta aat acc att cca ttg ttt gtg cag ctg ctt   2009
Ile Val Ile Arg Gly Leu Asn Thr Ile Pro Leu Phe Val Gln Leu Leu
        590                 595                 600

tat tct ccc att gaa aac atc caa aga gta gct gca ggg gtc ctc tgt   2057
Tyr Ser Pro Ile Glu Asn Ile Gln Arg Val Ala Ala Gly Val Leu Cys
    605                 610                 615

gaa ctt gct cag gac aag gaa gct gca gaa gct att gaa gct gag gga   2105
Glu Leu Ala Gln Asp Lys Glu Ala Ala Glu Ala Ile Glu Ala Glu Gly
620                 625                 630                 635

gcc aca gct cct ctg aca gag tta ctt cac tct agg aat gaa ggt gtg   2153
Ala Thr Ala Pro Leu Thr Glu Leu Leu His Ser Arg Asn Glu Gly Val
                640                 645                 650

gcg aca tat gca gct gct gtt ttg ttc cga atg tct gag gac aag cca   2201
Ala Thr Tyr Ala Ala Ala Val Leu Phe Arg Met Ser Glu Asp Lys Pro
            655                 660                 665

caa gat tac aag aaa cgg ctt tca gtt gag ctg acc agc tct ctc ttc   2249
Gln Asp Tyr Lys Lys Arg Leu Ser Val Glu Leu Thr Ser Ser Leu Phe
        670                 675                 680

aga aca gag cca atg gct tgg aat gag act gct gat ctt gga ctt gat   2297
```

```
Arg Thr Glu Pro Met Ala Trp Asn Glu Thr Ala Asp Leu Gly Leu Asp
    685                 690                 695

att ggt gcc cag gga gaa ccc ctt gga tat cgc cag gat gat cct agc   2345
Ile Gly Ala Gln Gly Glu Pro Leu Gly Tyr Arg Gln Asp Asp Pro Ser
700                 705                 710                 715

tat cgt tct ttt cac tct ggt gga tat ggc cag gat gcc ttg ggt atg   2393
Tyr Arg Ser Phe His Ser Gly Gly Tyr Gly Gln Asp Ala Leu Gly Met
                720                 725                 730

gac ccc atg atg gaa cat gag atg ggt ggc cac cac cct ggt gct gac   2441
Asp Pro Met Met Glu His Glu Met Gly Gly His His Pro Gly Ala Asp
            735                 740                 745

tat cca gtt gat ggg ctg cca gat ctg ggg cat gcc cag gac ctc atg   2489
Tyr Pro Val Asp Gly Leu Pro Asp Leu Gly His Ala Gln Asp Leu Met
        750                 755                 760

gat ggg ctg cct cca ggt gac agc aat cag ctg gcc tgg ttt gat act   2537
Asp Gly Leu Pro Pro Gly Asp Ser Asn Gln Leu Ala Trp Phe Asp Thr
    765                 770                 775

gac ctg taa atcatccttt aggagtaaca atacaaatgg attttgccc            2585
Asp Leu  *
780
```

<210> 8
<211> 781
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

```
Met Ala Thr Gln Ala Asp Leu Met Glu Leu Asp Met Ala Met Glu Pro
 1               5                  10                  15
Asp Arg Lys Ala Ala Val Ser His Trp Gln Gln Gln Ser Tyr Leu Asp
            20                  25                  30
Ser Gly Ile His Ser Gly Ala Thr Thr Thr Ala Pro Ser Leu Ser Gly
        35                  40                  45
Lys Gly Asn Pro Glu Glu Glu Asp Val Asp Thr Ser Gln Val Leu Tyr
    50                  55                  60
Glu Trp Glu Gln Gly Phe Ser Gln Ser Phe Thr Gln Glu Gln Val Ala
65                  70                  75                  80
Asp Ile Asp Gly Gln Tyr Ala Met Thr Arg Ala Gln Arg Val Arg Ala
                85                  90                  95
Ala Met Phe Pro Glu Thr Leu Asp Glu Gly Met Gln Ile Pro Ser Thr
            100                 105                 110
Gln Phe Asp Ala Ala His Pro Thr Asn Val Gln Arg Leu Ala Glu Pro
        115                 120                 125
Ser Gln Met Leu Lys His Ala Val Val Asn Leu Ile Asn Tyr Gln Asp
    130                 135                 140
Asp Ala Glu Leu Ala Thr Arg Ala Ile Pro Glu Leu Thr Lys Leu Leu
```

```
145                 150                 155                 160
Asn Asp Glu Asp Gln Val Val Val Asn Lys Ala Ala Val Met Val His
                165                 170                 175
Gln Leu Ser Lys Lys Glu Ala Ser Arg His Ala Ile Met Arg Ser Pro
            180                 185                 190
Gln Met Val Ser Ala Ile Val Arg Thr Met Gln Asn Thr Asn Asp Val
        195                 200                 205
Glu Thr Ala Arg Cys Thr Ala Gly Thr Leu His Asn Leu Ser His His
    210                 215                 220
Arg Glu Gly Leu Leu Ala Ile Phe Lys Ser Gly Gly Ile Pro Ala Leu
225                 230                 235                 240
Val Lys Met Leu Gly Ser Pro Val Asp Ser Val Leu Phe Tyr Ala Ile
                245                 250                 255
Thr Thr Leu His Asn Leu Leu Leu His Gln Glu Gly Ala Lys Met Ala
            260                 265                 270
Val Arg Leu Ala Gly Gly Leu Gln Lys Met Val Ala Leu Leu Asn Lys
        275                 280                 285
Thr Asn Val Lys Phe Leu Ala Ile Thr Thr Asp Cys Leu Gln Ile Leu
    290                 295                 300
Ala Tyr Gly Asn Gln Glu Ser Lys Leu Ile Ile Leu Ala Ser Gly Gly
305                 310                 315                 320
Pro Gln Ala Leu Val Asn Ile Met Arg Thr Tyr Thr Tyr Glu Lys Leu
                325                 330                 335
Leu Trp Thr Thr Ser Arg Val Leu Lys Val Leu Ser Val Cys Ser Ser
            340                 345                 350
Asn Lys Pro Ala Ile Val Glu Ala Gly Gly Met Gln Ala Leu Gly Leu
        355                 360                 365
His Leu Thr Asp Pro Ser Gln Arg Leu Val Gln Asn Cys Leu Trp Thr
    370                 375                 380
Leu Arg Asn Leu Ser Asp Ala Ala Thr Lys Gln Glu Gly Met Glu Gly
385                 390                 395                 400
Leu Leu Gly Thr Leu Val Gln Leu Leu Gly Ser Asp Asp Ile Asn Val
                405                 410                 415
Val Thr Cys Ala Ala Gly Ile Leu Ser Asn Leu Thr Cys Asn Asn Tyr
            420                 425                 430
Lys Asn Lys Met Met Val Cys Gln Val Gly Gly Ile Glu Ala Leu Val
        435                 440                 445
Arg Thr Val Leu Arg Ala Gly Asp Arg Glu Asp Ile Thr Glu Pro Ala
    450                 455                 460
Ile Cys Ala Leu Arg His Leu Thr Ser Arg His Gln Glu Ala Glu Met
465                 470                 475                 480
Ala Gln Asn Ala Val Arg Leu His Tyr Gly Leu Pro Val Val Val Lys
                485                 490                 495
Leu Leu His Pro Pro Ser His Trp Pro Leu Ile Lys Ala Thr Val Gly
            500                 505                 510
Leu Ile Arg Asn Leu Ala Leu Cys Pro Ala Asn His Ala Pro Leu Arg
        515                 520                 525
Glu Gln Gly Ala Ile Pro Arg Leu Val Gln Leu Leu Val Arg Ala His
    530                 535                 540
Gln Asp Thr Gln Arg Arg Thr Ser Met Gly Gly Thr Gln Gln Gln Phe
545                 550                 555                 560
Val Glu Gly Val Arg Met Glu Glu Ile Val Glu Gly Cys Thr Gly Ala
                565                 570                 575
```

```
Leu His Ile Leu Ala Arg Asp Val His Asn Arg Ile Val Ile Arg Gly
            580                 585                 590
Leu Asn Thr Ile Pro Leu Phe Val Gln Leu Leu Tyr Ser Pro Ile Glu
        595                 600                 605
Asn Ile Gln Arg Val Ala Ala Gly Val Leu Cys Glu Leu Ala Gln Asp
    610                 615                 620
Lys Glu Ala Ala Glu Ala Ile Glu Ala Glu Gly Ala Thr Ala Pro Leu
625                 630                 635                 640
Thr Glu Leu Leu His Ser Arg Asn Glu Gly Val Ala Thr Tyr Ala Ala
                645                 650                 655
Ala Val Leu Phe Arg Met Ser Glu Asp Lys Pro Gln Asp Tyr Lys Lys
            660                 665                 670
Arg Leu Ser Val Glu Leu Thr Ser Ser Leu Phe Arg Thr Glu Pro Met
        675                 680                 685
Ala Trp Asn Glu Thr Ala Asp Leu Gly Leu Asp Ile Gly Ala Gln Gly
    690                 695                 700
Glu Pro Leu Gly Tyr Arg Gln Asp Asp Pro Ser Tyr Arg Ser Phe His
705                 710                 715                 720
Ser Gly Gly Tyr Gly Gln Asp Ala Leu Gly Met Asp Pro Met Met Glu
                725                 730                 735
His Glu Met Gly Gly His His Pro Gly Ala Asp Tyr Pro Val Asp Gly
            740                 745                 750
Leu Pro Asp Leu Gly His Ala Gln Asp Leu Met Asp Gly Leu Pro Pro
        755                 760                 765
Gly Asp Ser Asn Gln Leu Ala Trp Phe Asp Thr Asp Leu
    770                 775                 780
```

<210> 9
<211> 7042
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (578)...(4162)

<400> 9

```
aagaagaggt agcgagtgga cgtgactgct ctatcccggg caaaagggat agaaccagag 60
gtggggagtc tgggcagtcg gcgacccgcg aagacttgag gtgccgcagc ggcatccgga 120
gtagcgccgg gctcctccg gggtgcagcc gccgtcgggg gaagggcgcc acaggccggg 180
aagacctcct ccctttgtgt ccagtagtgg ggtccaccgg agggcggccc gtgggccggg 240
cctcaccgcg gcgctccggg actgtggggt caggctgcgt tgggtggacg cccacctcgc 300
caaccttcgg aggtccctgg gggtcttcgt gcgccccggg gctgcagaga tccaggggag 360
gcgcctgtga ggcccggacc tgccccgggg cgaagggtat gtggcgagac agagccctgc 420
acccctaatt cccggtggaa aactcctgtt gccgtttccc tccaccggcc tggagtctcc 480
cagtcttgtc ccggcagtgc cgccctcccc actaagacct aggcgcaaag gcttggctca 540
tggttgacag ctcagagaga gaaagatctg agggaag atg gat gca aaa gct cga  595
                                        Met Asp Ala Lys Ala Arg
                                         1               5

aat tgt ttg ctt caa cat aga gaa gct ctg gaa aag gac atc aag aca   643
Asn Cys Leu Leu Gln His Arg Glu Ala Leu Glu Lys Asp Ile Lys Thr
```

```
            10                  15                  20

tcc tac atc atg gat cac atg att agt gat gga ttt tta aca ata tca   691
Ser Tyr Ile Met Asp His Met Ile Ser Asp Gly Phe Leu Thr Ile Ser
        25                  30                  35

gaa gag gaa aaa gta aga aat gag ccc act caa cag caa aga gca gct   739
Glu Glu Glu Lys Val Arg Asn Glu Pro Thr Gln Gln Gln Arg Ala Ala
    40                  45                  50

atg ctg att aaa atg ata ctt aaa aaa gat aat gat tcc tac gta tca   787
Met Leu Ile Lys Met Ile Leu Lys Lys Asp Asn Asp Ser Tyr Val Ser
55                  60                  65                  70

ttc tac aat gct cta cta cat gaa gga tat aaa gat ctt gct gcc ctt   835
Phe Tyr Asn Ala Leu Leu His Glu Gly Tyr Lys Asp Leu Ala Ala Leu
                75                  80                  85

ctc cat gat ggc att cct gtt gtc tct tct tcc agt gta agg aca gtc   883
Leu His Asp Gly Ile Pro Val Val Ser Ser Ser Ser Val Arg Thr Val
            90                  95                  100

ctg tgt gaa ggt gga gta cca cag agg cca gtt gtt ttt gtc aca agg   931
Leu Cys Glu Gly Gly Val Pro Gln Arg Pro Val Val Phe Val Thr Arg
        105                 110                 115

aag aag ctg gtg aat gca att cag cag aag ctc tcc aaa ttg aaa ggt   979
Lys Lys Leu Val Asn Ala Ile Gln Gln Lys Leu Ser Lys Leu Lys Gly
    120                 125                 130

gaa cca gga tgg gtc acc ata cat gga atg gca ggc tgt ggg aag tct  1027
Glu Pro Gly Trp Val Thr Ile His Gly Met Ala Gly Cys Gly Lys Ser
135                 140                 145                 150

gta tta gct gca gaa gct gtt aga gat cat tcc ctt tta gaa ggt tgt  1075
Val Leu Ala Ala Glu Ala Val Arg Asp His Ser Leu Leu Glu Gly Cys
                155                 160                 165

ttc cca ggg gga gtg cat tgg gtt tca gtt ggg aaa caa gac aaa tct  1123
Phe Pro Gly Gly Val His Trp Val Ser Val Gly Lys Gln Asp Lys Ser
            170                 175                 180

ggg ctt ctg atg aaa ctg cag aat ctt tgc aca cgg ttg gat cag gat  1171
Gly Leu Leu Met Lys Leu Gln Asn Leu Cys Thr Arg Leu Asp Gln Asp
        185                 190                 195

gag agt ttt tcc cag agg ctt cca ctt aat att gaa gag gct aaa gac  1219
Glu Ser Phe Ser Gln Arg Leu Pro Leu Asn Ile Glu Glu Ala Lys Asp
    200                 205                 210

cgt ctc cgc att ctg atg ctt cgc aaa cac cca agg tct ctc ttg atc  1267
Arg Leu Arg Ile Leu Met Leu Arg Lys His Pro Arg Ser Leu Leu Ile
215                 220                 225                 230
```

```
ttg gat gat gtt tgg gac tct tgg gtg ttg aaa gct ttt gac agt cag   1315
Leu Asp Asp Val Trp Asp Ser Trp Val Leu Lys Ala Phe Asp Ser Gln
               235                 240                 245

tgt cag att ctt ctt aca acc aga gac aag agt gtt aca gat tca gta   1363
Cys Gln Ile Leu Leu Thr Thr Arg Asp Lys Ser Val Thr Asp Ser Val
           250                 255                 260

atg ggt cct aaa tat gta gtc cct gtg gag agt tcc tta gga aag gaa   1411
Met Gly Pro Lys Tyr Val Val Pro Val Glu Ser Ser Leu Gly Lys Glu
       265                 270                 275

aaa gga ctt gaa att tta tcc ctt ttt gtt aat atg aag aag gca gat   1459
Lys Gly Leu Glu Ile Leu Ser Leu Phe Val Asn Met Lys Lys Ala Asp
   280                 285                 290

ttg cca gaa caa gct cat agt att ata aaa gaa tgt aaa ggc tct ccc   1507
Leu Pro Glu Gln Ala His Ser Ile Ile Lys Glu Cys Lys Gly Ser Pro
295                 300                 305                 310

ctt gta gta tct tta att ggt gca ctt tta cgt gat ttt ccc aat cgc   1555
Leu Val Val Ser Leu Ile Gly Ala Leu Leu Arg Asp Phe Pro Asn Arg
               315                 320                 325

tgg gag tac tac ctc aaa cag ctt cag aat aag cag ttt aag aga ata   1603
Trp Glu Tyr Tyr Leu Lys Gln Leu Gln Asn Lys Gln Phe Lys Arg Ile
           330                 335                 340

agg aaa tct tcg tct tat gat tat gag gct cta gat gaa gcc atg tct   1651
Arg Lys Ser Ser Ser Tyr Asp Tyr Glu Ala Leu Asp Glu Ala Met Ser
       345                 350                 355

ata agt gtt gaa atg ctc aga gaa gac atc aaa gat tat tac aca gat   1699
Ile Ser Val Glu Met Leu Arg Glu Asp Ile Lys Asp Tyr Tyr Thr Asp
   360                 365                 370

ctt tcc atc ctt cag aag gac gtt aag gtg cct aca aag gtg tta tgt   1747
Leu Ser Ile Leu Gln Lys Asp Val Lys Val Pro Thr Lys Val Leu Cys
375                 380                 385                 390

att ctc tgg gac atg gaa act gaa gaa gtt gaa gac ata ctg cag gag   1795
Ile Leu Trp Asp Met Glu Thr Glu Glu Val Glu Asp Ile Leu Gln Glu
               395                 400                 405

ttt gta aat aag tct ctt tta ttc tgt gat cgg aat gga aag tcg ttt   1843
Phe Val Asn Lys Ser Leu Leu Phe Cys Asp Arg Asn Gly Lys Ser Phe
           410                 415                 420

cgt tat tat tta cat gat ctt caa gta gat ttt ctt aca gag aag aat   1891
Arg Tyr Tyr Leu His Asp Leu Gln Val Asp Phe Leu Thr Glu Lys Asn
       425                 430                 435
```

```
tgc agc cag ctt cag gat cta cat aag aag ata atc act cag ttt cag   1939
Cys Ser Gln Leu Gln Asp Leu His Lys Lys Ile Ile Thr Gln Phe Gln
    440                 445                 450

aga tat cac cag ccg cat act ctt tca cca gat cag gaa gac tgt atg   1987
Arg Tyr His Gln Pro His Thr Leu Ser Pro Asp Gln Glu Asp Cys Met
455                 460                 465                 470

tat tgg tac aac ttt ctg gcc tat cac atg gcc agt gcc aag atg cac   2035
Tyr Trp Tyr Asn Phe Leu Ala Tyr His Met Ala Ser Ala Lys Met His
                475                 480                 485

aag gaa ctt tgt gct tta atg ttt tcc ctg gat tgg att aaa gca aaa   2083
Lys Glu Leu Cys Ala Leu Met Phe Ser Leu Asp Trp Ile Lys Ala Lys
            490                 495                 500

aca gaa ctt gta ggc cct gct cat ctg att cat gaa ttt gtg gaa tac   2131
Thr Glu Leu Val Gly Pro Ala His Leu Ile His Glu Phe Val Glu Tyr
        505                 510                 515

aga cat ata cta gat gaa aag gat tgt gca gtc agt gag aat ttt cag   2179
Arg His Ile Leu Asp Glu Lys Asp Cys Ala Val Ser Glu Asn Phe Gln
    520                 525                 530

gag ttt tta tct tta aat gga cac ctt ctt gga cga cag cca ttt cct   2227
Glu Phe Leu Ser Leu Asn Gly His Leu Leu Gly Arg Gln Pro Phe Pro
535                 540                 545                 550

aat att gta caa ctg ggt ctc tgt gag ccg gaa act tca gaa gtt tat   2275
Asn Ile Val Gln Leu Gly Leu Cys Glu Pro Glu Thr Ser Glu Val Tyr
                555                 560                 565

cag caa gct aag ctg cag gcc aag cag gag gtc gat aat gga atg ctt   2323
Gln Gln Ala Lys Leu Gln Ala Lys Gln Glu Val Asp Asn Gly Met Leu
            570                 575                 580

tac ctg gaa tgg ata aac aaa aaa aac atc acg aat ctt tcc cgc tta   2371
Tyr Leu Glu Trp Ile Asn Lys Lys Asn Ile Thr Asn Leu Ser Arg Leu
        585                 590                 595

gtt gtc cgc ccc cac aca gat gct gtt tac cat gcc tgc ttt tct gag   2419
Val Val Arg Pro His Thr Asp Ala Val Tyr His Ala Cys Phe Ser Glu
    600                 605                 610

gat ggt cag aga ata gct tct tgt gga gct gat aaa acc tta cag gtg   2467
Asp Gly Gln Arg Ile Ala Ser Cys Gly Ala Asp Lys Thr Leu Gln Val
615                 620                 625                 630

ttc aaa gct gaa aca gga gag aaa ctt cta gaa atc aag gct cat gag   2515
Phe Lys Ala Glu Thr Gly Glu Lys Leu Leu Glu Ile Lys Ala His Glu
                635                 640                 645

gat gaa gtg ctt tgt tgt gca ttc tct aca gat gac aga ttt ata gca   2563
```

```
Asp Glu Val Leu Cys Cys Ala Phe Ser Thr Asp Asp Arg Phe Ile Ala
            650                 655                 660

acc tgc tca gtg gat aaa aaa gtg aag att tgg aat tct atg act ggg   2611
Thr Cys Ser Val Asp Lys Lys Val Lys Ile Trp Asn Ser Met Thr Gly
        665                 670                 675

gaa cta gta cac acc tat gat gag cac tca gag caa gtc aat tgc tgc   2659
Glu Leu Val His Thr Tyr Asp Glu His Ser Glu Gln Val Asn Cys Cys
    680                 685                 690

cat ttc acc aac agt agt cat cat ctt ctc tta gcc act ggg tca agt   2707
His Phe Thr Asn Ser Ser His His Leu Leu Leu Ala Thr Gly Ser Ser
695                 700                 705                 710

gac tgc ttc ctc aaa ctt tgg gat ttg aat caa aaa gaa tgt cga aat   2755
Asp Cys Phe Leu Lys Leu Trp Asp Leu Asn Gln Lys Glu Cys Arg Asn
                715                 720                 725

acc atg ttt ggt cat aca aat tca gtc aat cac tgc aga ttt tca cca   2803
Thr Met Phe Gly His Thr Asn Ser Val Asn His Cys Arg Phe Ser Pro
            730                 735                 740

gat gat aag ctt ttg gct agt tgt tca gct gat gga acc tta aag ctt   2851
Asp Asp Lys Leu Leu Ala Ser Cys Ser Ala Asp Gly Thr Leu Lys Leu
        745                 750                 755

tgg gat gcg aca tca gca aat gag agg aaa agc att aat gtg aaa cag   2899
Trp Asp Ala Thr Ser Ala Asn Glu Arg Lys Ser Ile Asn Val Lys Gln
    760                 765                 770

ttc ttc cta aat ttg gag gac cct caa gag gat atg gaa gtg ata gtg   2947
Phe Phe Leu Asn Leu Glu Asp Pro Gln Glu Asp Met Glu Val Ile Val
775                 780                 785                 790

aag tgt tgt tcg tgg tct gct gat ggt gca agg ata atg gtg gca gca   2995
Lys Cys Cys Ser Trp Ser Ala Asp Gly Ala Arg Ile Met Val Ala Ala
                795                 800                 805

aaa aat aaa atc ttt ttg tgg aat aca gac tca cgt tca aag gtg gct   3043
Lys Asn Lys Ile Phe Leu Trp Asn Thr Asp Ser Arg Ser Lys Val Ala
            810                 815                 820

gat tgc aga gga cat tta agt tgg gtt cat ggt gtg atg ttt tct cct   3091
Asp Cys Arg Gly His Leu Ser Trp Val His Gly Val Met Phe Ser Pro
        825                 830                 835

gat gga tca tca ttt ttg aca tct tct gat gac cag aca atc agg ctc   3139
Asp Gly Ser Ser Phe Leu Thr Ser Ser Asp Asp Gln Thr Ile Arg Leu
    840                 845                 850

tgg gag aca aag aaa gta tgt aag aac tct gct gta atg tta aag caa   3187
Trp Glu Thr Lys Lys Val Cys Lys Asn Ser Ala Val Met Leu Lys Gln
```

```
855                 860                 865                 870

gaa gta gat gtt gtg ttt caa gaa aat gaa gtg atg gtc ctt gca gtt   3235
Glu Val Asp Val Val Phe Gln Glu Asn Glu Val Met Val Leu Ala Val
                875                 880                 885

gac cat ata aga cgt ctg caa ctc att aat gga aga aca ggt cag att   3283
Asp His Ile Arg Arg Leu Gln Leu Ile Asn Gly Arg Thr Gly Gln Ile
            890                 895                 900

gat tat ctg act gaa gct caa gtt agc tgc tgt tgc tta agt cca cat   3331
Asp Tyr Leu Thr Glu Ala Gln Val Ser Cys Cys Cys Leu Ser Pro His
        905                 910                 915

ctt cag tac att gca ttt gga gat gaa aat gga gcc att gag att tta   3379
Leu Gln Tyr Ile Ala Phe Gly Asp Glu Asn Gly Ala Ile Glu Ile Leu
    920                 925                 930

gaa ctt gta aac aat aga atc ttc cag tcc agg ttt cag cac aag aaa   3427
Glu Leu Val Asn Asn Arg Ile Phe Gln Ser Arg Phe Gln His Lys Lys
935                 940                 945                 950

act gta tgg cac atc cag ttc aca gcc gat gag aag act ctt att tca   3475
Thr Val Trp His Ile Gln Phe Thr Ala Asp Glu Lys Thr Leu Ile Ser
                955                 960                 965

agt tct gat gat gct gaa att cag gta tgg aat tgg caa ttg gac aaa   3523
Ser Ser Asp Asp Ala Glu Ile Gln Val Trp Asn Trp Gln Leu Asp Lys
            970                 975                 980

tgt atc ttt cta cga ggc cat cag gaa aca gtg aaa gac ttt aga ctc   3571
Cys Ile Phe Leu Arg Gly His Gln Glu Thr Val Lys Asp Phe Arg Leu
         985                 990                 995

ttg aaa aat tca aga ctg ctt tct tgg tca ttt gat gga aca gtg aag   3619
Leu Lys Asn Ser Arg Leu Leu Ser Trp Ser Phe Asp Gly Thr Val Lys
    1000                1005                1010

gta tgg aat att att act gga aat aaa gaa aaa gac ttt gtc tgt cac   3667
Val Trp Asn Ile Ile Thr Gly Asn Lys Glu Lys Asp Phe Val Cys His
1015                1020                1025                1030

cag ggt aca gta ctt tct tgt gac att tct cac gat gct acc aag ttt   3715
Gln Gly Thr Val Leu Ser Cys Asp Ile Ser His Asp Ala Thr Lys Phe
                1035                1040                1045

tca tct acc tct gct gac aag act gca aag atc tgg agt ttt gat ctc   3763
Ser Ser Thr Ser Ala Asp Lys Thr Ala Lys Ile Trp Ser Phe Asp Leu
            1050                1055                1060

ctt ttg cca ctt cat gaa ttg agg ggc cac aac ggc tgt gtg cgc tgc   3811
Leu Leu Pro Leu His Glu Leu Arg Gly His Asn Gly Cys Val Arg Cys
        1065                1070                1075
```

```
tct gcc ttc tct gtg gac agt acc ctg ctg gca acg gga gat gac aat   3859
Ser Ala Phe Ser Val Asp Ser Thr Leu Leu Ala Thr Gly Asp Asp Asn
    1080                1085                1090

gga gaa atc agg ata tgg aat gtc tca aac ggt gag ctt ctt cat ttg   3907
Gly Glu Ile Arg Ile Trp Asn Val Ser Asn Gly Glu Leu Leu His Leu
1095                1100                1105                1110

tgt gct ccg ctt tca gaa gaa gga gct gct acc cat gga ggc tgg gtg   3955
Cys Ala Pro Leu Ser Glu Glu Gly Ala Ala Thr His Gly Gly Trp Val
                1115                1120                1125

act gac ctt tgc ttt tct cca gat ggc aaa atg ctt atc tct gct gga   4003
Thr Asp Leu Cys Phe Ser Pro Asp Gly Lys Met Leu Ile Ser Ala Gly
            1130                1135                1140

gga tat att aag tgg tgg aac gtt gtc act ggg gaa tcc tca cag acc   4051
Gly Tyr Ile Lys Trp Trp Asn Val Val Thr Gly Glu Ser Ser Gln Thr
        1145                1150                1155

ttc tac aca aat gga acc aat ctt aag aaa ata cac gtg tcc cct gac   4099
Phe Tyr Thr Asn Gly Thr Asn Leu Lys Lys Ile His Val Ser Pro Asp
    1160                1165                1170

ttc aaa aca tat gtg act gtg gat aat ctt ggt att tta tat att tta   4147
Phe Lys Thr Tyr Val Thr Val Asp Asn Leu Gly Ile Leu Tyr Ile Leu
1175                1180                1185                1190

cag act tta gaa taa aatagttaag cattaatgta gttgaacttt ttaaattttt   4202
Gln Thr Leu Glu  *

gaattggaaa aaaattctaa tgaaaccctg atatcaactt tttataaagc tcttaattgt 4262
tgtgcagtat tgcattcatt acaaaagtgt ttgtggttgg atgaataata ttaatgtagc 4322
tttttcccaa atgaacatac ctttaatctt gtttttcatg atcatcatta acagtttgtc 4382
cttaggatgc aaatgaaaat gtgaatacat accttgttgt actgttggta aaattctgtc 4442
ttgatgcatt caaaatggtt gacataatta atgagaagaa tttggaagaa attggtattt 4502
taatactgtc tgtatttatt actgttatgc aggctgtgcc tcagggtagc agtggcctgc 4562
tttttgaacc acacttaccc caaggggttt ttgtttctcct aaatacaatc ttagaggttt 4622
tttgcactct ttaaatttgc tttaaaaata ttgtgtctgt gtgcatagtc tgcagcattt 4682
cctttaattg actcaataag tgagtcttgg atttagcagg ccccccccacc ttttttttt 4742
gtttttggag acagagtctt gctttgttgc caggctggag tgcagtggcg cgatctcggc 4802
tcaccacaat cgctgcctcc tgggttcaag caattctcct gcctcagcct cccgagtagc 4862
tgggactaca ggtgtgcgca catgccaggc taatttttgt atttttagta gagacggggt 4922
ttcaccatgt tggccgggat ggtctcgatc tcttgacctc atgatctacc cgccttggcc 4982
tcccaaagtg ctgagattac aggcgtgagc caccgtgcct ggccaggccc cttctctttt 5042
aatggagaca gggtcttgca ctatcaccca ggctggagtg cagtggcata atcatacctc 5102
attgcagcct cagactcctg ggttcaagca atcctcctgc ctcagcctcc caagtagctg 5162
agactgcagg cacgagccac cacacccagc taatttttaa gttttcttgt agagacaggg 5222
tctcactatg ttgtctaggc tggtcttgaa ctcttggcct caagtaatcc tcctgcctca 5282
gcctcccaaa gtgttgggat tgcagatatg agccactggc ctggccttca gcagttcttt 5342
ttgtgaagta aaacttgtat gttggaaaga gtagatttta ttggtctacc cttttctcac 5402
```

```
tgtagctgct ggcagccctg tgccatatct ggactctagt tgtcagtatc tgagttggac 5462
actattcctg ctccctcttg tttcttacat atcagacttc ttacttgaat gaaacctgat 5522
ctttcctaat cctcactttt ttctttttta aaaagcagtt tctccactgc taaatgttag 5582
tcattgaggt ggggccaatt ttaatcataa gccttaataa gatttttcta agaaatgtga 5642
aatagaacaa ttttcatcta attccattta cttttagatg aatggcattg tgaatgccat 5702
tcttttaatg aatttcaaga gaattctctg gttttctgtg taattccaga tgagtcactg 5762
taactctaga agattaacct tccagccaac ctatttttct ttcccttgtc tctctcatcc 5822
tcttttcctt ccttctttcc tttctcttct tttatctcca aggttaatca ggaaaaatag 5882
cttttgacag gggaaaaaac tcaataacta gctatttttg acctcctgat caggaacttt 5942
agttgaagcg taaatctaaa gaaacatttt ctctgaaata tattattaag ggcaatggag 6002
ataaattaat agtagatgtg gttcccagaa aatataatca aaattcaaag attttttttg 6062
tttctgtaac tggaactaaa tcaaatgatt actagtgtta atagtagata acttgttttt 6122
attgttggtg catattagta taactgtggg gtaggtcggg gagagggtaa gggaatagat 6182
cactcagatg tattttagat aagctattta gcctttgatg gaatcataaa tacagtgaat 6242
acaatccttt gcattgttaa ggaggttttt tgtttttaaa tggtgggtca aggagctagt 6302
ttacaggctt actgtgattt aagcaaatgt gaaaagtgaa accttaattt tatcaaaaga 6362
aatttctgta aatggtatgt ctccttagaa tacccaaatc ataattttat ttgtacacac 6422
tgttaggggc tcatctcatg taggcagagt ataaagtatt acctttggga attaaaagcc 6482
actgactgtt ataaagtata acaacacaca tcaggtttta aaaagccttg aatggccctt 6542
gtcttaaaaa gaaattagga gccaggtgcg gtggcacgtg cctgtagtcc cagctccttg 6602
ggaggctgag acaggaggat tccttgagcc ctggagtttg agtccagcct gggtgacata 6662
gcaagaccct gtcttaaaag aaaaatggga agaaagacaa ggtaacatga agaaagaaga 6722
gatacctagt atgatggagc tgcaaatttc atggcagttc atgcagtcgg tcaagaggag 6782
gattttgttt tgtagtttgc agatgagcat ttctaaagca tttttcccttg ctgtattttt 6842
ttgtattata aattacattg gacttcatat atataatttt ttttttacatt atatgtctct 6902
tgtatgtttt gaaactcttg tatttatgat atagcttata tgatttttttt gccttggtat 6962
acattttaaa atatgaattt aaaaaatttt tgtaaaaata aaattcacaa aattgttttg 7022
aaaaacaaaa aaaaaaaaaa                                           7042
```

<210> 10
<211> 1194
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10

```
Met Asp Ala Lys Ala Arg Asn Cys Leu Leu Gln His Arg Glu Ala Leu
 1               5                  10                  15
Glu Lys Asp Ile Lys Thr Ser Tyr Ile Met Asp His Met Ile Ser Asp
            20                  25                  30
Gly Phe Leu Thr Ile Ser Glu Glu Glu Lys Val Arg Asn Glu Pro Thr
        35                  40                  45
Gln Gln Gln Arg Ala Ala Met Leu Ile Lys Met Ile Leu Lys Lys Asp
    50                  55                  60
Asn Asp Ser Tyr Val Ser Phe Tyr Asn Ala Leu Leu His Glu Gly Tyr
65                  70                  75                  80
Lys Asp Leu Ala Ala Leu Leu His Asp Gly Ile Pro Val Val Ser Ser
                85                  90                  95
Ser Ser Val Arg Thr Val Leu Cys Glu Gly Gly Val Pro Gln Arg Pro
            100                 105                 110
Val Val Phe Val Thr Arg Lys Lys Leu Val Asn Ala Ile Gln Gln Lys
        115                 120                 125
Leu Ser Lys Leu Lys Gly Glu Pro Gly Trp Val Thr Ile His Gly Met
    130                 135                 140
```

```
Ala Gly Cys Gly Lys Ser Val Leu Ala Ala Glu Ala Val Arg Asp His
145                 150                 155                 160
Ser Leu Leu Glu Gly Cys Phe Pro Gly Gly Val His Trp Val Ser Val
                165                 170                 175
Gly Lys Gln Asp Lys Ser Gly Leu Leu Met Lys Leu Gln Asn Leu Cys
            180                 185                 190
Thr Arg Leu Asp Gln Asp Glu Ser Phe Ser Gln Arg Leu Pro Leu Asn
        195                 200                 205
Ile Glu Glu Ala Lys Asp Arg Leu Arg Ile Leu Met Leu Arg Lys His
    210                 215                 220
Pro Arg Ser Leu Leu Ile Leu Asp Asp Val Trp Asp Ser Trp Val Leu
225                 230                 235                 240
Lys Ala Phe Asp Ser Gln Cys Gln Ile Leu Leu Thr Thr Arg Asp Lys
                245                 250                 255
Ser Val Thr Asp Ser Val Met Gly Pro Lys Tyr Val Val Pro Val Glu
            260                 265                 270
Ser Ser Leu Gly Lys Glu Lys Gly Leu Glu Ile Leu Ser Leu Phe Val
        275                 280                 285
Asn Met Lys Lys Ala Asp Leu Pro Glu Gln Ala His Ser Ile Ile Lys
    290                 295                 300
Glu Cys Lys Gly Ser Pro Leu Val Val Ser Leu Ile Gly Ala Leu Leu
305                 310                 315                 320
Arg Asp Phe Pro Asn Arg Trp Glu Tyr Tyr Leu Lys Gln Leu Gln Asn
                325                 330                 335
Lys Gln Phe Lys Arg Ile Arg Lys Ser Ser Ser Tyr Asp Tyr Glu Ala
            340                 345                 350
Leu Asp Glu Ala Met Ser Ile Ser Val Glu Met Leu Arg Glu Asp Ile
        355                 360                 365
Lys Asp Tyr Tyr Thr Asp Leu Ser Ile Leu Gln Lys Asp Val Lys Val
    370                 375                 380
Pro Thr Lys Val Leu Cys Ile Leu Trp Asp Met Glu Thr Glu Glu Val
385                 390                 395                 400
Glu Asp Ile Leu Gln Glu Phe Val Asn Lys Ser Leu Leu Phe Cys Asp
                405                 410                 415
Arg Asn Gly Lys Ser Phe Arg Tyr Tyr Leu His Asp Leu Gln Val Asp
            420                 425                 430
Phe Leu Thr Glu Lys Asn Cys Ser Gln Leu Gln Asp Leu His Lys Lys
        435                 440                 445
Ile Ile Thr Gln Phe Gln Arg Tyr His Gln Pro His Thr Leu Ser Pro
    450                 455                 460
Asp Gln Glu Asp Cys Met Tyr Trp Tyr Asn Phe Leu Ala Tyr His Met
465                 470                 475                 480
Ala Ser Ala Lys Met His Lys Glu Leu Cys Ala Leu Met Phe Ser Leu
                485                 490                 495
Asp Trp Ile Lys Ala Lys Thr Glu Leu Val Gly Pro Ala His Leu Ile
            500                 505                 510
His Glu Phe Val Glu Tyr Arg His Ile Leu Asp Glu Lys Asp Cys Ala
        515                 520                 525
Val Ser Glu Asn Phe Gln Glu Phe Leu Ser Leu Asn Gly His Leu Leu
    530                 535                 540
Gly Arg Gln Pro Phe Pro Asn Ile Val Gln Leu Gly Leu Cys Glu Pro
545                 550                 555                 560
Glu Thr Ser Glu Val Tyr Gln Gln Ala Lys Leu Gln Ala Lys Gln Glu
```

```
                565                 570                 575
Val Asp Asn Gly Met Leu Tyr Leu Glu Trp Ile Asn Lys Lys Asn Ile
            580                 585                 590
Thr Asn Leu Ser Arg Leu Val Val Arg Pro His Thr Asp Ala Val Tyr
        595                 600                 605
His Ala Cys Phe Ser Glu Asp Gly Gln Arg Ile Ala Ser Cys Gly Ala
    610                 615                 620
Asp Lys Thr Leu Gln Val Phe Lys Ala Glu Thr Gly Glu Lys Leu Leu
625                 630                 635                 640
Glu Ile Lys Ala His Glu Asp Glu Val Leu Cys Cys Ala Phe Ser Thr
                645                 650                 655
Asp Asp Arg Phe Ile Ala Thr Cys Ser Val Asp Lys Lys Val Lys Ile
            660                 665                 670
Trp Asn Ser Met Thr Gly Glu Leu Val His Thr Tyr Asp Glu His Ser
        675                 680                 685
Glu Gln Val Asn Cys Cys His Phe Thr Asn Ser Ser His His Leu Leu
    690                 695                 700
Leu Ala Thr Gly Ser Ser Asp Cys Phe Leu Lys Leu Trp Asp Leu Asn
705                 710                 715                 720
Gln Lys Glu Cys Arg Asn Thr Met Phe Gly His Thr Asn Ser Val Asn
                725                 730                 735
His Cys Arg Phe Ser Pro Asp Asp Lys Leu Leu Ala Ser Cys Ser Ala
            740                 745                 750
Asp Gly Thr Leu Lys Leu Trp Asp Ala Thr Ser Ala Asn Glu Arg Lys
        755                 760                 765
Ser Ile Asn Val Lys Gln Phe Phe Leu Asn Leu Glu Asp Pro Gln Glu
    770                 775                 780
Asp Met Glu Val Ile Val Lys Cys Cys Ser Trp Ser Ala Asp Gly Ala
785                 790                 795                 800
Arg Ile Met Val Ala Ala Lys Asn Lys Ile Phe Leu Trp Asn Thr Asp
                805                 810                 815
Ser Arg Ser Lys Val Ala Asp Cys Arg Gly His Leu Ser Trp Val His
            820                 825                 830
Gly Val Met Phe Ser Pro Asp Gly Ser Ser Phe Leu Thr Ser Ser Asp
        835                 840                 845
Asp Gln Thr Ile Arg Leu Trp Glu Thr Lys Lys Val Cys Lys Asn Ser
    850                 855                 860
Ala Val Met Leu Lys Gln Glu Val Asp Val Val Phe Gln Glu Asn Glu
865                 870                 875                 880
Val Met Val Leu Ala Val Asp His Ile Arg Arg Leu Gln Leu Ile Asn
                885                 890                 895
Gly Arg Thr Gly Gln Ile Asp Tyr Leu Thr Glu Ala Gln Val Ser Cys
            900                 905                 910
Cys Cys Leu Ser Pro His Leu Gln Tyr Ile Ala Phe Gly Asp Glu Asn
        915                 920                 925
Gly Ala Ile Glu Ile Leu Glu Leu Val Asn Asn Arg Ile Phe Gln Ser
    930                 935                 940
Arg Phe Gln His Lys Lys Thr Val Trp His Ile Gln Phe Thr Ala Asp
945                 950                 955                 960
Glu Lys Thr Leu Ile Ser Ser Ser Asp Asp Ala Glu Ile Gln Val Trp
                965                 970                 975
Asn Trp Gln Leu Asp Lys Cys Ile Phe Leu Arg Gly His Gln Glu Thr
            980                 985                 990
```

```
Val Lys Asp Phe Arg Leu Leu Lys Asn Ser Arg Leu Leu Ser Trp Ser
        995                 1000                1005
Phe Asp Gly Thr Val Lys Val Trp Asn Ile Ile Thr Gly Asn Lys Glu
    1010                1015                1020
Lys Asp Phe Val Cys His Gln Gly Thr Val Leu Ser Cys Asp Ile Ser
1025                1030                1035                1040
His Asp Ala Thr Lys Phe Ser Ser Thr Ser Ala Asp Lys Thr Ala Lys
                1045                1050                1055
Ile Trp Ser Phe Asp Leu Leu Leu Pro Leu His Glu Leu Arg Gly His
            1060                1065                1070
Asn Gly Cys Val Arg Cys Ser Ala Phe Ser Val Asp Ser Thr Leu Leu
        1075                1080                1085
Ala Thr Gly Asp Asp Asn Gly Glu Ile Arg Ile Trp Asn Val Ser Asn
    1090                1095                1100
Gly Glu Leu Leu His Leu Cys Ala Pro Leu Ser Glu Glu Gly Ala Ala
1105                1110                1115                1120
Thr His Gly Gly Trp Val Thr Asp Leu Cys Phe Ser Pro Asp Gly Lys
                1125                1130                1135
Met Leu Ile Ser Ala Gly Gly Tyr Ile Lys Trp Trp Asn Val Val Thr
            1140                1145                1150
Gly Glu Ser Ser Gln Thr Phe Tyr Thr Asn Gly Thr Asn Leu Lys Lys
        1155                1160                1165
Ile His Val Ser Pro Asp Phe Lys Thr Tyr Val Thr Val Asp Asn Leu
    1170                1175                1180
Gly Ile Leu Tyr Ile Leu Gln Thr Leu Glu
1185                1190
```

<210> 11
<211> 5086
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1459)...(2178)

<400> 11

```
gcgcccgccc ctccgcgccg cctgcccgcc cgcccgccgc gctcccgccc gccgctctcc 60
gtggccccgc cgcgctgccg ccgccgccgc tgccagcgaa ggtgccgggg ctccgggccc 120
tccctgccgg cggccgtcag cgctcggagc gaactgcgcg acgggaggtc cgggaggcga 180
ccgtagtcgc gccgccgcgc aggaccagga ggaggagaaa gggtgcgcag cccggaggcg 240
gggtgcgccg gtggggtgca gcggaagagg gggtccaggg gggagaactt cgtagcagtc 300
atcctttta ggaaaagagg gaaaaaataa aaccctcccc caccacctcc ttctccccac 360
ccctcgccgc accacacaca gcgcgggctt ctagcgctcg gcaccggcgg gccaggcgcg 420
tcctgccttc atttatccag cagcttttcg gaaaatgcat ttgctgttcg gagtttaatc 480
agaagacgat tcctgcctcc gtccccggct ccttcatcgt cccatctccc ctgtctctct 540
cctggggagg cgtgaagcgg tcccgtggat agagattcat gcctgtgtcc gcgcgtgtgt 600
gcgcgcgtat aaattgccga gaaggggaaa acatcacagg acttctgcga ataccggact 660
gaaaattgta attcatctgc cgccgccgct gccaaaaaaa aactcgagct cttgagatct 720
ccggttggga ttcctgcgga ttgacatttc tgtgaagcag aagtctggga atcgatctgg 780
aaatcctcct aatttttact ccctctcccc ccgactcctg attcattggg aagtttcaaa 840
tcagctataa ctggagagtg ctgaagattg atgggatcgt tgccttatgc atttgttttg 900
```

```
gttttacaaa aaggaaactt gacagaggat catgctgtac ttaaaaaata caagtaagtc 960
tcgcacagga aattggttta atgtaacttt caatggaaac ctttgagatt ttttacttaa 1020
agtgcattcg agtaaattta atttccaggc agcttaatac attgttttta gccgtgttac 1080
ttgtagtgtg tatgccctgc tttcactcag tgtgtacagg gaaacgcacc tgatttttta 1140
cttattagtt tgtttttttct ttaacctttc agcatcacag aggaagtaga ctgatattaa 1200
caatacttac taataataac gtgcctcatg aaataaagat ccgaaaggaa ttggaataaa 1260
aatttcctgc gtctcatgcc aagagggaaa caccagaatc aagtgttccg cgtgattgaa 1320
gacacccctt cgtccaagaa tgcaaagcac atccaataaa atagctggat tataactcct 1380
cttctttctc tgggggccgt ggggtgggag ctggggcgag aggtgccgtt ggcccccgtt 1440
gcttttcctc tgggaagg atg gcg cac gct ggg aga acg ggg tac gac aac   1491
                    Met Ala His Ala Gly Arg Thr Gly Tyr Asp Asn
                     1               5                  10

cgg gag ata gtg atg aag tac atc cat tat aag ctg tcg cag agg ggc   1539
Arg Glu Ile Val Met Lys Tyr Ile His Tyr Lys Leu Ser Gln Arg Gly
             15                  20                  25

tac gag tgg gat gcg gga gat gtg ggc gcc gcg ccc ccg ggg gcc gcc   1587
Tyr Glu Trp Asp Ala Gly Asp Val Gly Ala Ala Pro Pro Gly Ala Ala
         30                  35                  40

ccc gca ccg ggc atc ttc tcc tcc cag ccc ggg cac acg ccc cat cca   1635
Pro Ala Pro Gly Ile Phe Ser Ser Gln Pro Gly His Thr Pro His Pro
     45                  50                  55

gcc gca tcc cgc gac ccg gtc gcc agg acc tcg ccg ctg cag acc ccg   1683
Ala Ala Ser Arg Asp Pro Val Ala Arg Thr Ser Pro Leu Gln Thr Pro
 60                  65                  70                  75

gct gcc ccc ggc gcc gcc gcg ggg cct gcg ctc agc ccg gtg cca cct   1731
Ala Ala Pro Gly Ala Ala Ala Gly Pro Ala Leu Ser Pro Val Pro Pro
                 80                  85                  90

gtg gtc cac ctg gcc ctc cgc caa gcc ggc gac gac ttc tcc cgc cgc   1779
Val Val His Leu Ala Leu Arg Gln Ala Gly Asp Asp Phe Ser Arg Arg
             95                 100                 105

tac cgc ggc gac ttc gcc gag atg tcc agc cag ctg cac ctg acg ccc   1827
Tyr Arg Gly Asp Phe Ala Glu Met Ser Ser Gln Leu His Leu Thr Pro
        110                 115                 120

ttc acc gcg cgg gga cgc ttt gcc acg gtg gtg gag gag ctc ttc agg   1875
Phe Thr Ala Arg Gly Arg Phe Ala Thr Val Val Glu Glu Leu Phe Arg
    125                 130                 135

gac ggg gtg aac tgg ggg agg att gtg gcc ttc ttt gag ttc ggt ggg   1923
Asp Gly Val Asn Trp Gly Arg Ile Val Ala Phe Phe Glu Phe Gly Gly
140                 145                 150                 155

gtc atg tgt gtg gag agc gtc aac cgg gag atg tcg ccc ctg gtg gac   1971
Val Met Cys Val Glu Ser Val Asn Arg Glu Met Ser Pro Leu Val Asp
                160                 165                 170
```

```
aac atc gcc ctg tgg atg act gag tac ctg aac cgg cac ctg cac acc   2019
Asn Ile Ala Leu Trp Met Thr Glu Tyr Leu Asn Arg His Leu His Thr
            175                 180                 185

tgg atc cag gat aac gga ggc tgg gat gcc ttt gtg gaa ctg tac ggc   2067
Trp Ile Gln Asp Asn Gly Gly Trp Asp Ala Phe Val Glu Leu Tyr Gly
        190                 195                 200

ccc agc atg cgg cct ctg ttt gat ttc tcc tgg ctg tct ctg aag act   2115
Pro Ser Met Arg Pro Leu Phe Asp Phe Ser Trp Leu Ser Leu Lys Thr
    205                 210                 215

ctg ctc agt ttg gcc ctg gtg gga gct tgc atc acc ctg ggt gcc tat   2163
Leu Leu Ser Leu Ala Leu Val Gly Ala Cys Ile Thr Leu Gly Ala Tyr
220                 225                 230                 235

ctg agc cac aag tga agtcaacatg cctgccccaa acaaatatgc aaaaggttca   2218
Leu Ser His Lys  *

ctaaagcagt agaaataata tgcattgtca gtgatgtacc atgaaacaaa gctgcaggct 2278
gtttaagaaa aaataacaca catataaaca tcacacacac agacagacac acacacacac 2338
aacaattaac agtcttcagg caaaacgtcg aatcagctat ttactgccaa agggaaatat 2398
catttatttt ttacattatt aagaaaaaag atttatttat ttaagacagt cccatcaaaa 2458
ctccgtcttt ggaaatccga ccactaattg ccaaacaccg cttcgtgtgg ctccacctgg 2518
atgttctgtg cctgtaaaca tagattcgct ttccatgttg ttggccggat caccatctga 2578
agagcagacg gatggaaaaa ggacctgatc attggggaag ctggctttct ggctgctgga 2638
ggctggggag aaggtgttca ttcacttgca tttctttgcc ctgggggcgt gatattaaca 2698
gagggagggt tcccgtgggg ggaagtccat gcctccctgg cctgaagaag agactctttg 2758
catatgactc acatgatgca tacctggtgg gaggaaaaga gttgggaact tcagatggac 2818
ctagtaccca ctgagatttc cacgccgaag gacagcgatg ggaaaaatgc ccttaaatca 2878
taggaaagta ttttttaag ctaccaattg tgccgagaaa agcattttag caatttatac 2938
aatatcatcc agtaccttaa accctgattg tgtatattca tatattttgg atacgcaccc 2998
cccaactccc aatactggct ctgtctgagt aagaaacaga atcctctgga acttgaggaa 3058
gtgaacattt cggtgacttc cgatcaggaa ggctagagtt acccagagca tcaggccgcc 3118
acaagtgcct gcttttagga gaccgaagtc cgcagaacct acctgtgtcc cagcttggag 3178
gcctggtcct ggaactgagc cgggccctca ctggcctcct ccagggatga tcaacagggt 3238
agtgtggtct ccgaatgtct ggaagctgat ggatggagct cagaattcca ctgtcaagaa 3298
agagcagtag aggggtgtgg ctgggcctgt caccctgggg ccctccaggt aggcccgttt 3358
tcacgtggag cataggagcc acgacccttc ttaagacatg tatcactgta gagggaagga 3418
acagaggccc tgggccttcc tatcagaagg acatggtgaa ggctgggaac gtgaggagag 3478
gcaatggcca cggcccattt tggctgtagc acatggcacg ttggctgtgt ggccttggcc 3538
acctgtgagt ttaaagcaag gctttaaatg actttggaga gggtcacaaa tcctaaaaga 3598
agcattgaag tgaggtgtca tggattaatt gacccctgtc tatggaatta catgtaaaac 3658
attatcttgt cactgtagtt tggttttatt tgaaaacctg acaaaaaaaa agttccaggt 3718
gtggaatatg ggggttatct gtacatcctg gggcattaaa aaaaaatcaa tggtggggaa 3778
ctataaagaa gtaacaaaag aagtgacatc ttcagcaaat aaactaggaa attttttttt 3838
cttccagttt agaatcagcc ttgaaacatt gatggaataa ctctgtggca ttattgcatt 3898
atataccatt tatctgtatt aactttggaa tgtactctgt tcaatgttta atgctgtggt 3958
tgatatttcg aaagctgctt taaaaaaata catgcatctc agcgtttttt tgtttttaat 4018
tgtatttagt tatggcctat acactatttg tgagcaaagg tgatcgtttt ctgtttgaga 4078
tttttatctc ttgattcttc aaaagcattc tgagaaggtg agataagccc tgagtctcag 4138
ctacctaaga aaaacctgga tgtcactggc cactgaggag ctttgtttca accaagtcat 4198
```

```
gtgcatttcc acgtcaacag aattgtttat tgtgacagtt atatctgttg tccctttgac 4258
cttgtttctt gaaggtttcc tcgtccctgg gcaattccgc atttaattca tggtattcag 4318
gattacatgc atgtttggtt aaacccatga gattcattca gttaaaaatc cagatggcga 4378
atgaccagca gattcaaatc tatggtggtt tgacctttag agagttgctt tacgtggcct 4438
gtttcaacac agacccaccc agagccctcc tgccctcctt ccgcgggggc tttctcatgg 4498
ctgtccttca gggtcttcct gaaatgcagt ggtcgttacg ctccaccaag aaagcaggaa 4558
acctgtggta tgaagccaga cctccccggc gggcctcagg gaacagaatg atcagacctt 4618
tgaatgattc taatttttaa gcaaaatatt attttatgaa aggtttacat tgtcaaagtg 4678
atgaatatgg aatatccaat cctgtgctgc tatcctgcca aaatcatttt aatggagtca 4738
gtttgcagta tgctccacgt ggtaagatcc tccaagctgc tttagaagta acaatgaaga 4798
acgtggacgt ttttaatata aagcctgttt tgtcttttgt tgttgttcaa acgggattca 4858
cagagtattt gaaaaatgta tatatattaa gaggtcacgg gggctaattg ctagctggct 4918
gccttttgct gtggggtttt gttacctggt tttaataaca gtaaatgtgc ccagcctctt 4978
ggccccagaa ctgtacagta ttgtggctgc acttgctcta agagtagttg atgttgcatt 5038
ttccttattg ttaaaaacat gttagaagca atgaatgtat ataaaagc              5086
```

<210> 12
<211> 239
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12

```
Met Ala His Ala Gly Arg Thr Gly Tyr Asp Asn Arg Glu Ile Val Met
 1               5                  10                  15
Lys Tyr Ile His Tyr Lys Leu Ser Gln Arg Gly Tyr Glu Trp Asp Ala
            20                  25                  30
Gly Asp Val Gly Ala Ala Pro Pro Gly Ala Ala Pro Ala Pro Gly Ile
        35                  40                  45
Phe Ser Ser Gln Pro Gly His Thr Pro His Pro Ala Ala Ser Arg Asp
    50                  55                  60
Pro Val Ala Arg Thr Ser Pro Leu Gln Thr Pro Ala Ala Pro Gly Ala
65                  70                  75                  80
Ala Ala Gly Pro Ala Leu Ser Pro Val Pro Pro Val Val His Leu Ala
                85                  90                  95
Leu Arg Gln Ala Gly Asp Asp Phe Ser Arg Arg Tyr Arg Gly Asp Phe
            100                 105                 110
Ala Glu Met Ser Ser Gln Leu His Leu Thr Pro Phe Thr Ala Arg Gly
        115                 120                 125
Arg Phe Ala Thr Val Val Glu Glu Leu Phe Arg Asp Gly Val Asn Trp
    130                 135                 140
Gly Arg Ile Val Ala Phe Phe Glu Phe Gly Gly Val Met Cys Val Glu
145                 150                 155                 160
Ser Val Asn Arg Glu Met Ser Pro Leu Val Asp Asn Ile Ala Leu Trp
                165                 170                 175
Met Thr Glu Tyr Leu Asn Arg His Leu His Thr Trp Ile Gln Asp Asn
            180                 185                 190
Gly Gly Trp Asp Ala Phe Val Glu Leu Tyr Gly Pro Ser Met Arg Pro
        195                 200                 205
Leu Phe Asp Phe Ser Trp Leu Ser Leu Lys Thr Leu Leu Ser Leu Ala
    210                 215                 220
Leu Val Gly Ala Cys Ile Thr Leu Gly Ala Tyr Leu Ser His Lys
225                 230                 235
```

<210> 13
<211> 1358
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (20)...(739)

<400> 13

```
ggcgtccgcg cgctgcaca atg gcg gct ctg aag agt tgg ctg tcg cgc agc  52
                      Met Ala Ala Leu Lys Ser Trp Leu Ser Arg Ser
                       1               5                  10

gta act tca ttc ttc agg tac aga cag tgt ttg tgt gtt cct gtt gtg  100
Val Thr Ser Phe Phe Arg Tyr Arg Gln Cys Leu Cys Val Pro Val Val
             15                  20                  25

gct aac ttt aag aag cgg tgt ttc tca gaa ttg ata aga cca tgg cac  148
Ala Asn Phe Lys Lys Arg Cys Phe Ser Glu Leu Ile Arg Pro Trp His
         30                  35                  40

aaa act gtg acg att ggc ttt gga gta acc ctg tgt gcg gtt cct att  196
Lys Thr Val Thr Ile Gly Phe Gly Val Thr Leu Cys Ala Val Pro Ile
     45                  50                  55

gca cag aaa tca gag cct cat tcc ctt agt agt gaa gca ttg atg agg  244
Ala Gln Lys Ser Glu Pro His Ser Leu Ser Ser Glu Ala Leu Met Arg
 60                  65                  70                  75

aga gca gtg tct ttg gta aca gat agc acc tct acc ttt ctc tct cag  292
Arg Ala Val Ser Leu Val Thr Asp Ser Thr Ser Thr Phe Leu Ser Gln
                 80                  85                  90

acc aca tat gcg ttg att gaa gct att act gaa tat act aag gct gtt  340
Thr Thr Tyr Ala Leu Ile Glu Ala Ile Thr Glu Tyr Thr Lys Ala Val
             95                 100                 105

tat acc tta act tct ctt tac cga caa tat aca agt tta ctt ggg aaa  388
Tyr Thr Leu Thr Ser Leu Tyr Arg Gln Tyr Thr Ser Leu Leu Gly Lys
        110                 115                 120

atg aat tca gag gag gaa gat gaa gtg tgg cag gtg atc ata gga gcc  436
Met Asn Ser Glu Glu Glu Asp Glu Val Trp Gln Val Ile Ile Gly Ala
    125                 130                 135

aga gct gag atg act tca aaa cac caa gag tac ttg aag ctg gaa acc  484
Arg Ala Glu Met Thr Ser Lys His Gln Glu Tyr Leu Lys Leu Glu Thr
140                 145                 150                 155

act tgg atg act gca gtt ggt ctt tca gag atg gca gca gaa gct gca  532
Thr Trp Met Thr Ala Val Gly Leu Ser Glu Met Ala Ala Glu Ala Ala
```

```
                160                 165                 170

tat caa act ggc gca gat cag gcc tct ata acc gcc agg aat cac att   580
Tyr Gln Thr Gly Ala Asp Gln Ala Ser Ile Thr Ala Arg Asn His Ile
            175                 180                 185

cag ctg gtg aaa ctg cag gtg gaa gag gtg cac cag ctc tcc cgg aaa   628
Gln Leu Val Lys Leu Gln Val Glu Glu Val His Gln Leu Ser Arg Lys
        190                 195                 200

gca gaa acc aag ctg gca gaa gca cag ata gaa gag ctc cgt cag aaa   676
Ala Glu Thr Lys Leu Ala Glu Ala Gln Ile Glu Glu Leu Arg Gln Lys
    205                 210                 215

aca cag gag gaa ggg gag gag cgg gct gag tcg gag cag gag gcc tac   724
Thr Gln Glu Glu Gly Glu Glu Arg Ala Glu Ser Glu Gln Glu Ala Tyr
220                 225                 230                 235

ctg cgt gag gat tga gggcctgagc acactgccct gtctccccac tcagtgggga   779
Leu Arg Glu Asp  *


aagcaggggc agatgccacc ctgcccaggg ttggcatgac tgtctgtgca ccgagaagag 839
gcggcaggtc ctgccctggc caatcaggcg agacgccttt gtgagctgtg agtgcctcct 899
gtggtctcag gcttgcgctg gacctggttc ttagcccttg ggcactgcac cctgtttaac 959
atttcacccc actctgtaca gctgctctta cccatttttt ttacctcaca cccaaagcat 1019
tttgcctacc tgggtcagag agaggagtcc tttttgtcat gcccttaagt tcagcaactg 1079
tttaacctgt tttcagtctt atttacgtcg tcaaaaatga tttagtactt gttcccctctg 1139
ttgggatgcc agttgtggca gggggagggg aacctgtcca gtttgtacga tttctttgta 1199
tgtatttctg atgtgttctc tgatctgccc ccactgtcct gtgaggacag ctgaggccaa 1259
ggagtgaaaa acctattact actaagagaa ggggtgcaga gtgtttacct ggtgctctca 1319
acaggactta acatcaacag gacttaacac agaaaaaaa                        1358
```

<210> 14
<211> 239
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```
<400> 14
Met Ala Ala Leu Lys Ser Trp Leu Ser Arg Ser Val Thr Ser Phe Phe
 1               5                  10                  15
Arg Tyr Arg Gln Cys Leu Cys Val Pro Val Val Ala Asn Phe Lys Lys
            20                  25                  30
Arg Cys Phe Ser Glu Leu Ile Arg Pro Trp His Lys Thr Val Thr Ile
        35                  40                  45
Gly Phe Gly Val Thr Leu Cys Ala Val Pro Ile Ala Gln Lys Ser Glu
    50                  55                  60
Pro His Ser Leu Ser Ser Glu Ala Leu Met Arg Arg Ala Val Ser Leu
65                  70                  75                  80
Val Thr Asp Ser Thr Ser Thr Phe Leu Ser Gln Thr Thr Tyr Ala Leu
                85                  90                  95
Ile Glu Ala Ile Thr Glu Tyr Thr Lys Ala Val Tyr Thr Leu Thr Ser
            100                 105                 110
```

```
Leu Tyr Arg Gln Tyr Thr Ser Leu Leu Gly Lys Met Asn Ser Glu Glu
        115                 120                 125
Glu Asp Glu Val Trp Gln Val Ile Ile Gly Ala Arg Ala Glu Met Thr
    130                 135                 140
Ser Lys His Gln Glu Tyr Leu Lys Leu Glu Thr Thr Trp Met Thr Ala
145                 150                 155                 160
Val Gly Leu Ser Glu Met Ala Ala Glu Ala Ala Tyr Gln Thr Gly Ala
                165                 170                 175
Asp Gln Ala Ser Ile Thr Ala Arg Asn His Ile Gln Leu Val Lys Leu
            180                 185                 190
Gln Val Glu Glu Val His Gln Leu Ser Arg Lys Ala Glu Thr Lys Leu
        195                 200                 205
Ala Glu Ala Gln Ile Glu Glu Leu Arg Gln Lys Thr Gln Glu Glu Gly
    210                 215                 220
Glu Glu Arg Ala Glu Ser Glu Gln Glu Ala Tyr Leu Arg Glu Asp
225                 230                 235
```


<210> 15
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 15
Cys Gly Pro Lys Tyr Val Val Pro Val Glu Ser Ser Leu Gly Lys Glu
 1   5   10   15
Lys Gly Leu Glu
            20

【図１Ａ】

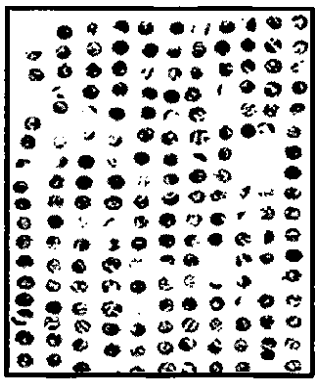


FIG. 1A

【図１Ｂ】

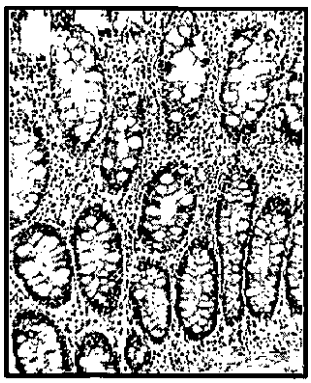


FIG. 1B

【図１Ｃ】

FIG. 1C

【図１Ｄ】

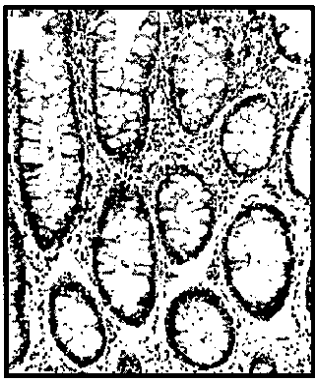


FIG. 1D

【図１Ｅ】

FIG. 1E

【図１Ｆ】

FIG. 1F

【図１Ｇ】

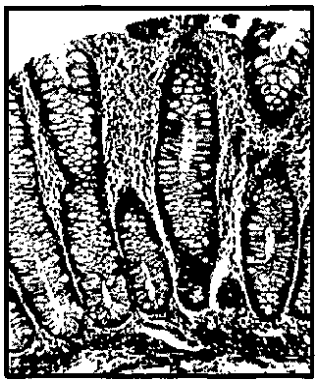


FIG. 1G

【図１Ｈ】

FIG. 1H

【図１Ｉ】

FIG. 1I

【図１Ｊ】

FIG. 1J

【図１Ｋ】

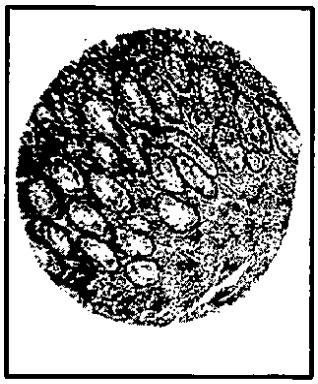


FIG. 1K

【図１Ｌ】

FIG. 1L

【図１Ｍ】

FIG. 1M

【図１Ｎ】

FIG. 1N

【図１Ｏ】

FIG. 10

【図１Ｐ】

FIG. 1P

【図２－１】

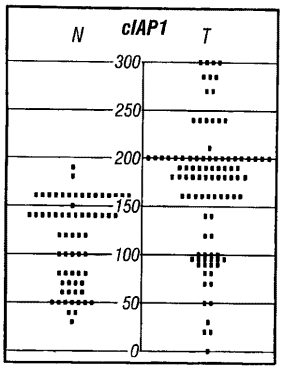


FIG. 2A

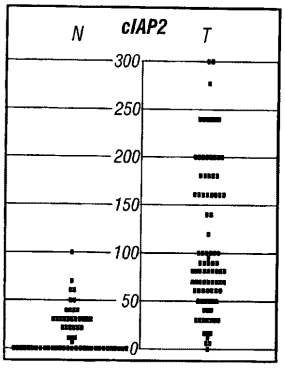


FIG. 2B

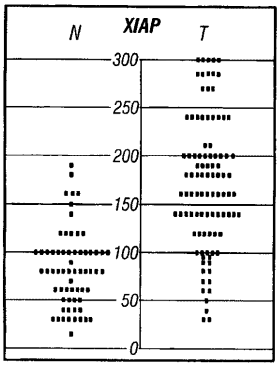


FIG. 2C

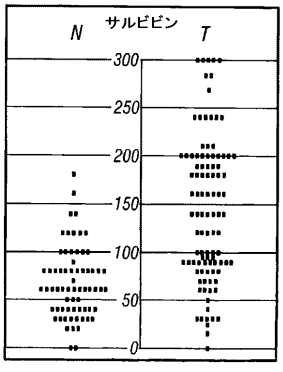


FIG. 2D

【図２Ｅ】

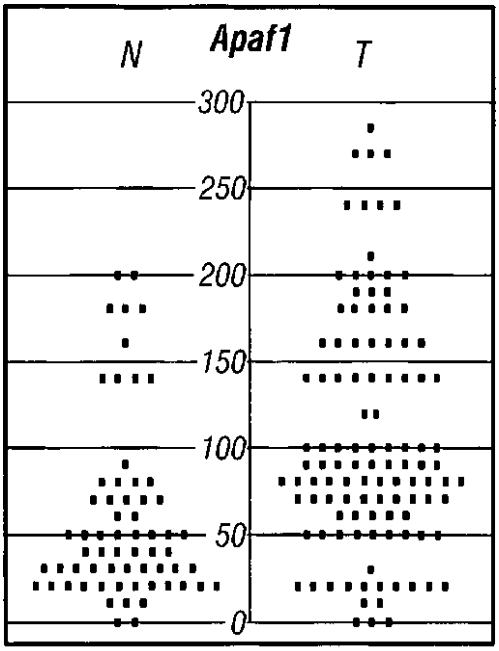


FIG. 2E

【図２Ｆ】

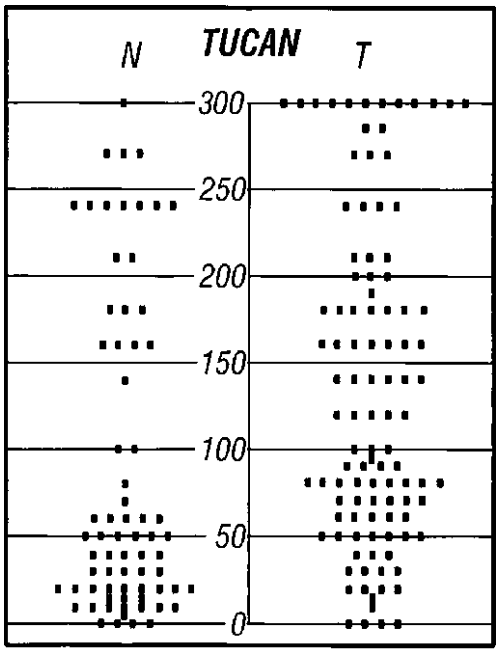


FIG. 2F

【図２Ｇ】

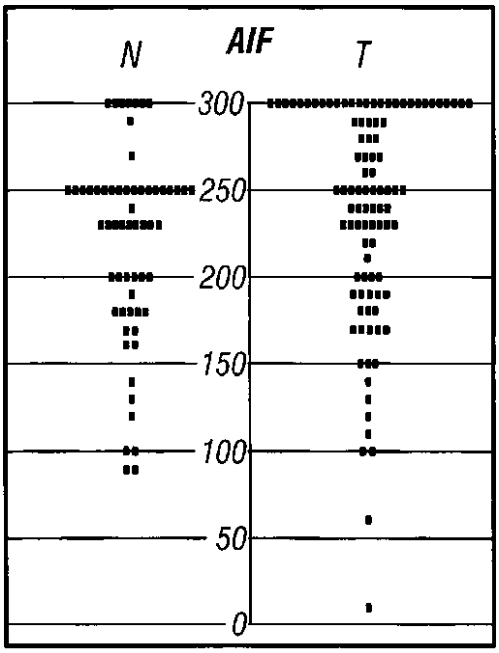


FIG. 2G

【図２Ｈ】

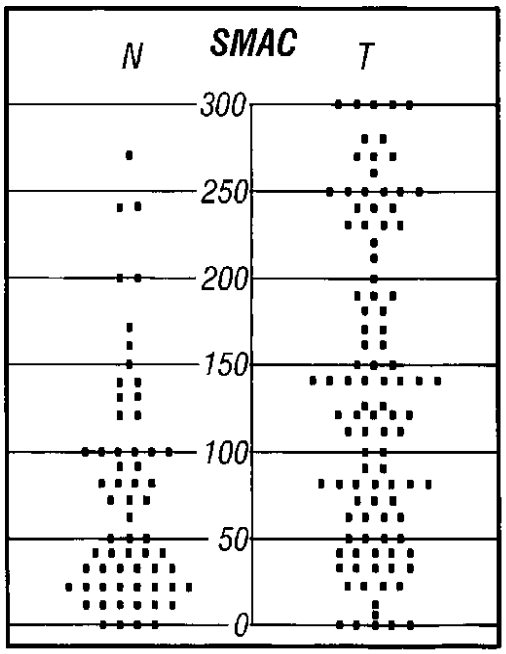


FIG. 2H

【図２Ｉ】

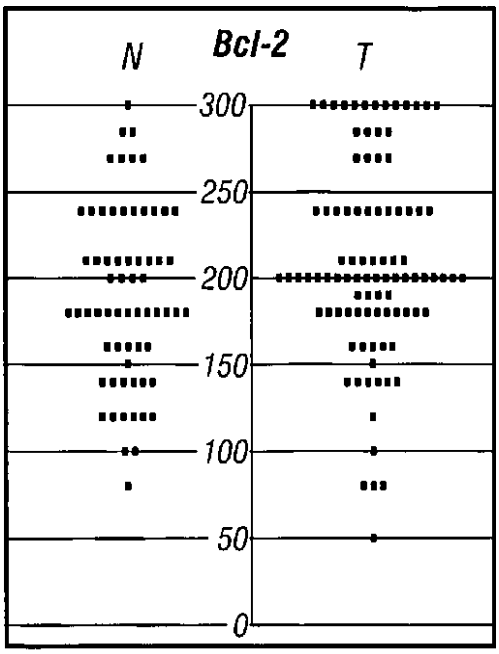


FIG. 2I

【図２Ｊ】

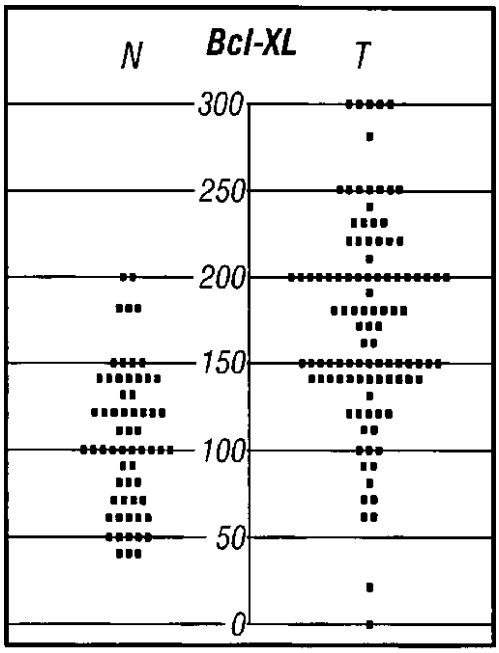


FIG. 2J

【図２Ｋ】

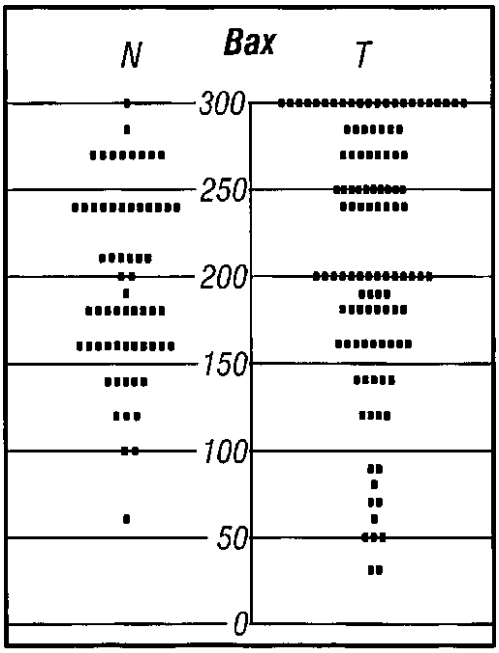


FIG. 2K

【図２Ｌ】

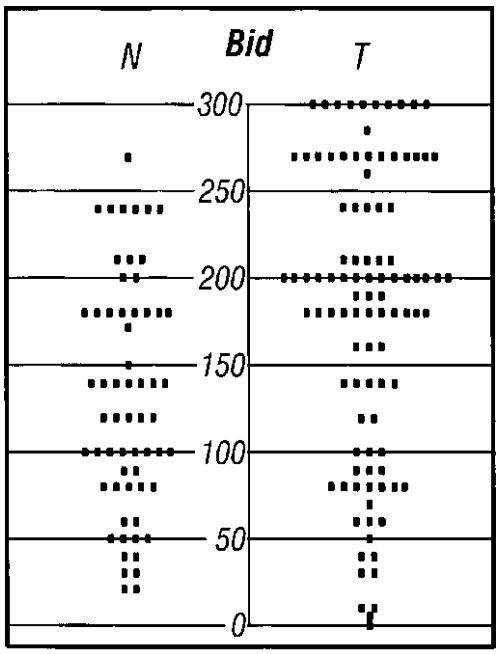


FIG. 2L

【図２－４】

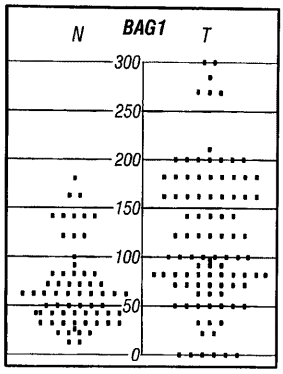


FIG. 2M

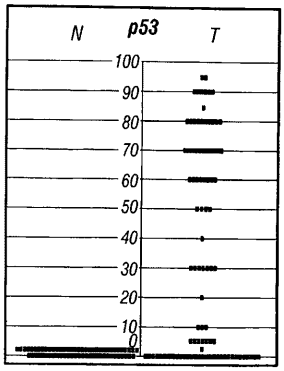


FIG. 2N

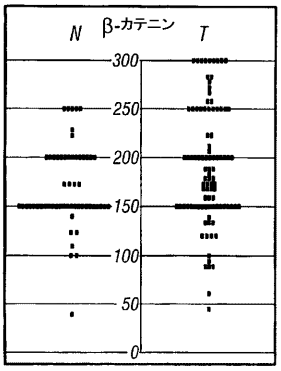


FIG. 2O

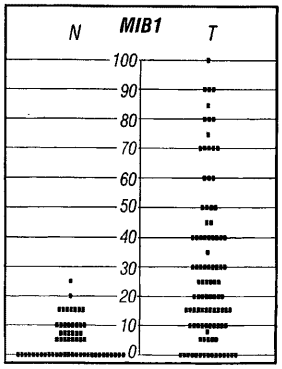


FIG. 2P

【図３－１】

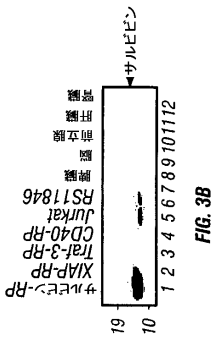


FIG. 3B

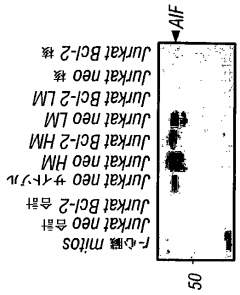


FIG. 3D

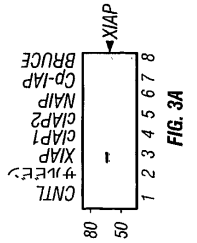


FIG. 3A

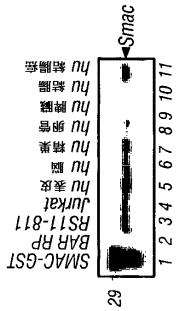


FIG. 3C

【図３－２】

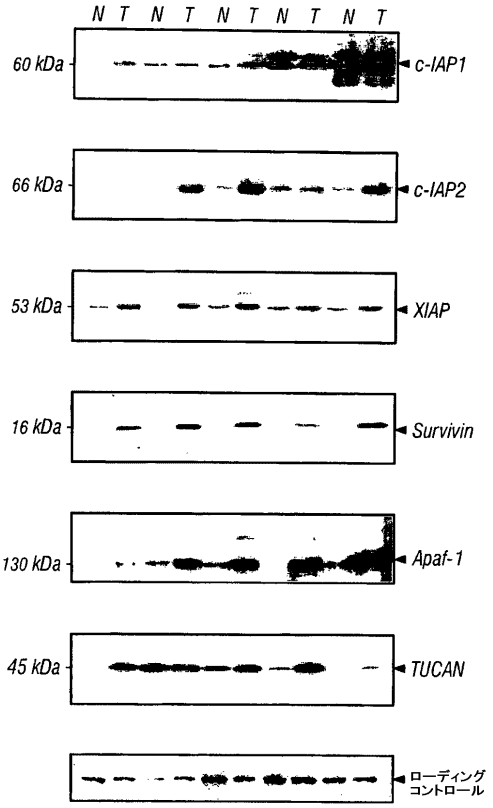
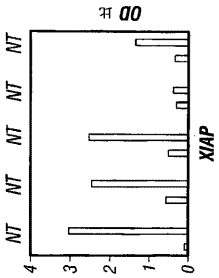
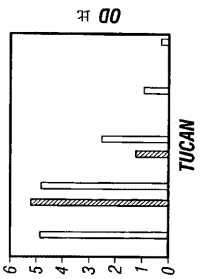
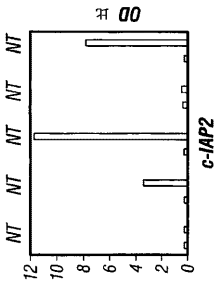


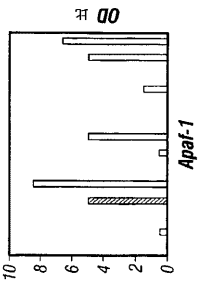
FIG. 3E

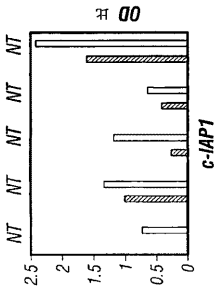
【図３－３】











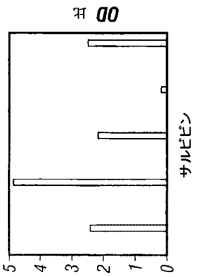


FIG. 3F

【図４－１】

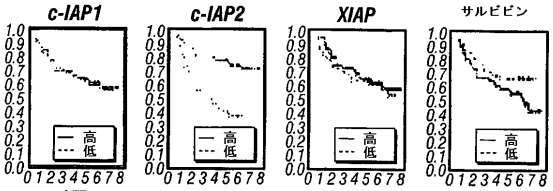


FIG. 4A FIG. 4B FIG. 4C FIG. 4D

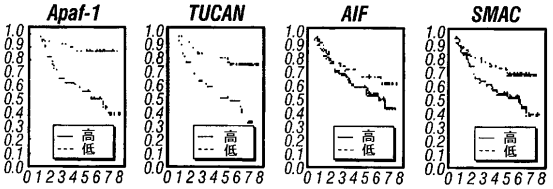


FIG. 4E FIG. 4F FIG. 4G FIG. 4H

【図４－２】

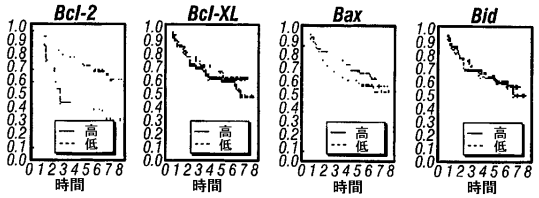


FIG. 4I FIG. 4J FIG. 4K FIG. 4L

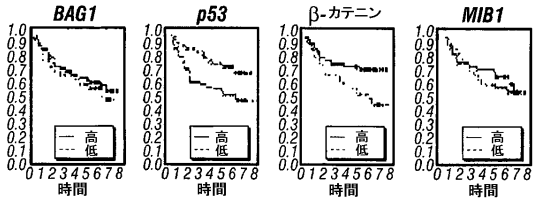


FIG. 4M FIG. 4N FIG. 4O FIG. 4P

【図４－３】

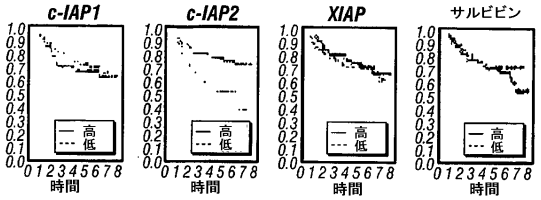


FIG. 4Q FIG. 4R FIG. 4S FIG. 4T

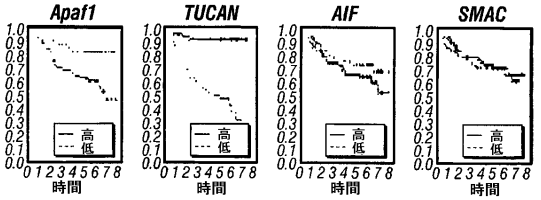


FIG. 4U FIG. 4V FIG. 4W FIG. 4X

【図４－４】

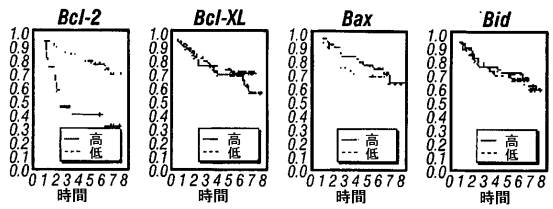


FIG. 4Y FIG. 4Z FIG. 4A-1 FIG. 4B-1

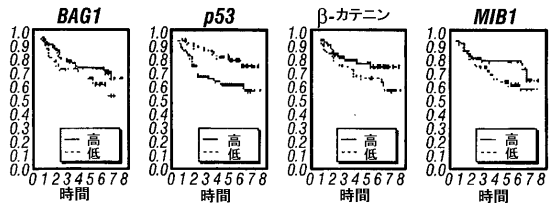


FIG. 4C-1 FIG. 4D-1 FIG. 4E-1 FIG. 4F-1

【図５－１】

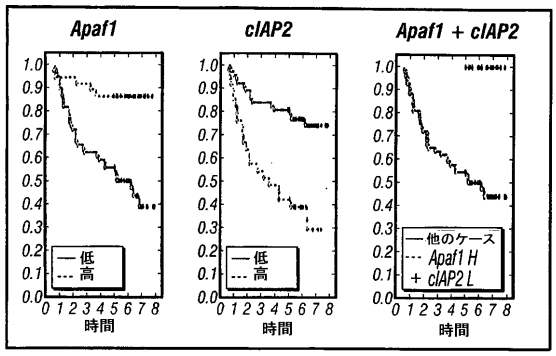


FIG. 5A

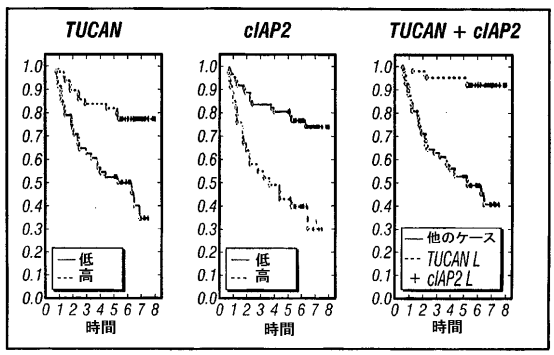


FIG. 5B

【図５－２】

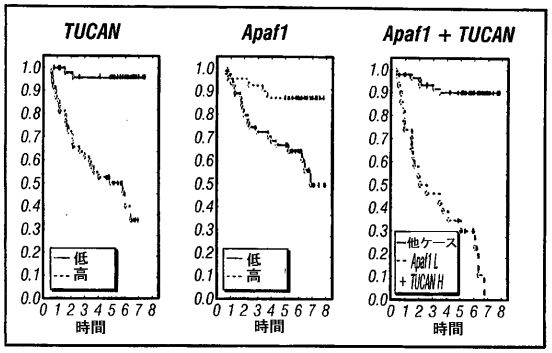


FIG. 5C

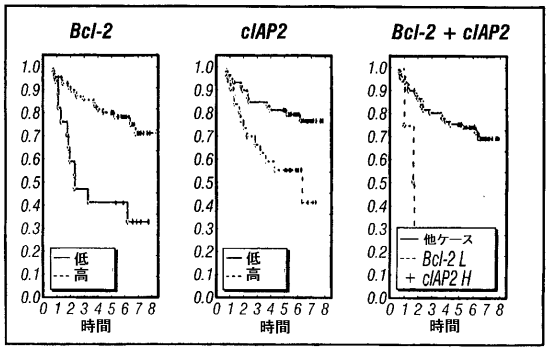


FIG. 5D

【図６Ａ】

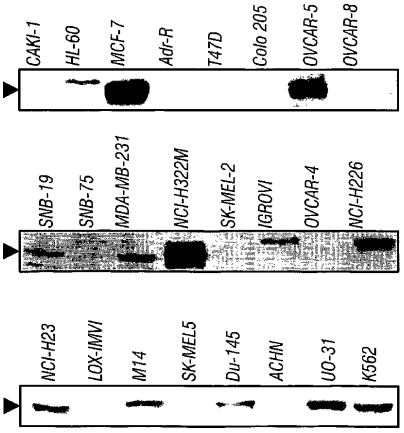


FIG. 6A

【図６Ｂ】

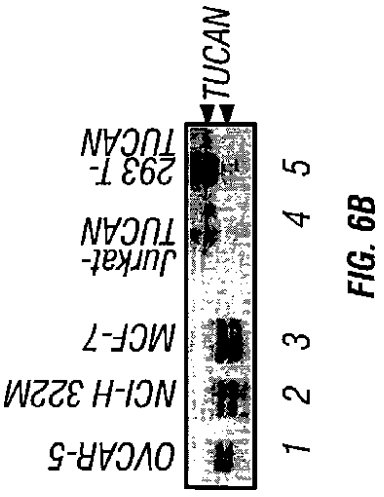


FIG. 6B

【図７Ａ】

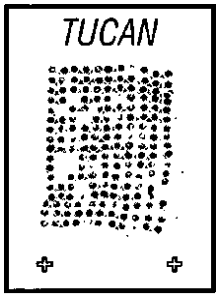


FIG. 7A

【図７Ｂ】

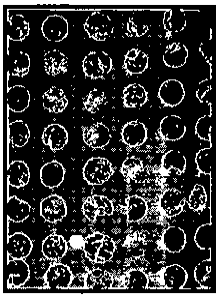


FIG. 7B

【図７Ｃ】

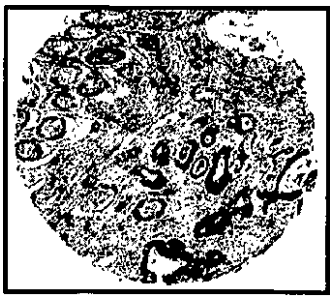


FIG. 7C

【図７Ｄ】

FIG. 7D

【図７Ｅ】

FIG. 7E

【図７Ｆ】

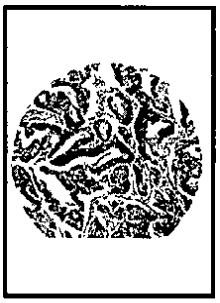


FIG. 7F

【図７Ｇ】

FIG. 7G

【図８－１】

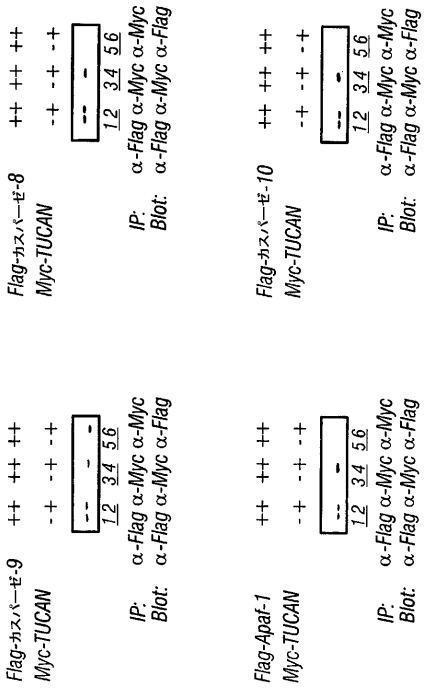


FIG. 8A

【図８－２】

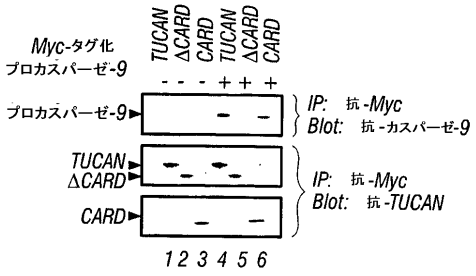


FIG. 8B

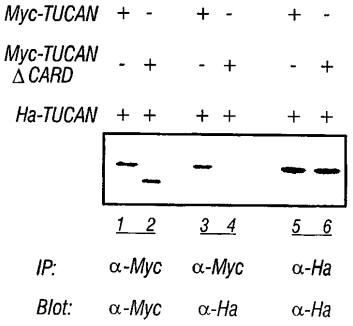


FIG. 8C

フロントページの続き

(72)発明者　リード，　ジョン　シー．
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９２０６７－０１３，　ランチョ　サンタ　フェ，　ピー．オー．ボックス　１３７，　エル　カミノ　レアル　１７０４４

審査官　海野　佳子

(56)参考文献　国際公開第００／０５０４５３（WO，Ａ１）
国際公開第９９／０４０１０２（WO，Ａ１）
特開２０００－２８７６８９（ＪＰ，Ａ）
国際公開第０１／０４９７１９（WO，Ａ１）
国際公開第０１／０３０８１３（WO，Ａ１）
特表平１１－５１１０１３（ＪＰ，Ａ）
国際公開第０１／０１６１７０（WO，Ａ１）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
G01N 33/48-98
JMEDPlus(JDreamII)
JST7580(JDreamII)
JSTPlus(JDream2)
CAplus(STN)