

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2006-500074

(P2006-500074A)

(43) 公表日 平成18年1月5日(2006.1.5)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
A O 1 K 67/027 (2006.01)	A O 1 K 67/027	4 B O 2 4
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	4 B O 6 3
A 6 1 K 35/76 (2006.01)	A 6 1 K 35/76	4 B O 6 5
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D	4 C O 8 4
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 138 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2005-509664 (P2005-509664)	(71) 出願人	505112060
(86) (22) 出願日	平成15年9月23日 (2003. 9. 23)		オリディス・ビオメド・フォルシュングス
(85) 翻訳文提出日	平成17年5月10日 (2005. 5. 10)		ーウント・エントヴィックルングス・ゲー
(86) 国際出願番号	PCT/EP2003/010564		エムペーハー
(87) 国際公開番号	W02004/029287		ORIDIS BIOMED FORSC
(87) 国際公開日	平成16年4月8日 (2004. 4. 8)		HUNGS- UND ENTWICKL
(31) 優先権主張番号	02021696.6		UNGS GMBH
(32) 優先日	平成14年9月27日 (2002. 9. 27)		オーストリア国、アー-8010 グラー
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		ツ、シュティフティングタルシュトラーセ
(31) 優先権主張番号	60/415, 913		3-5
(32) 優先日	平成14年10月3日 (2002. 10. 3)	(74) 代理人	100078662
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 津国 肇
		(74) 代理人	100075225
			弁理士 篠田 文雄
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 ポリペプチドおよびこれらをコード化する核酸ならびに肝臓障害および上皮癌の防止、診断、または処置のためのその使用

(57) 【要約】

本発明は、ポリペプチドおよびこれらをコード化する核酸ならびに肝臓障害および腫瘍性疾患、特に肝臓および他の上皮組織の癌、アデノーマなどの良性肝新生物ならびに限局性結節性過形成 (FNH) および肝硬変などの他の増殖性肝臓障害の診断、防止、および/または処置へのその使用に関する。本発明は、更に、これらの障害を診断および処置する方法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 2 記載の配列を含む単離されたポリペプチド、またはその機能的変異体。

【請求項 2】

請求項 1 記載のポリペプチドを含む、融合タンパク質。

【請求項 3】

請求項 1 記載のポリペプチドをコードする単離された核酸、またはその変異体。

【請求項 4】

核酸が、一本鎖または二本鎖 RNA である、請求項 3 記載の核酸。

【請求項 5】

核酸が、配列番号 1 1 記載の核酸を含む、請求項 3 記載の核酸。

【請求項 6】

請求項 3 記載の核酸、および配列番号 1 ~ 9 または配列番号 4 7 によるポリペプチドをコードする核酸からなる群より選択される核酸を含むベクター。

【請求項 7】

ベクターがノックアウト遺伝子構築物、プラスミド、シャトルベクター、ファージミド、コスミド、ウイルスベクター、および発現ベクターからなる群より選択される、請求項 6 記載のベクター。

【請求項 8】

請求項 3 記載の核酸を含む細胞。

【請求項 9】

請求項 6 記載のベクターを含む細胞。

【請求項 10】

細胞がトランスジェニック胎性非ヒト幹細胞である、請求項 9 記載の細胞。

【請求項 11】

請求項 3 記載の核酸を含む、トランスジェニック非ヒト哺乳動物。

【請求項 12】

抗体が請求項 1 記載のポリペプチドに対して、または請求項 3 記載の核酸に対して作成されている、抗体またはその抗体断片。

【請求項 13】

請求項 3 記載の核酸に対して相補性である配列を有する核酸または請求項 3 記載の核酸の非機能的突然変異体変種を含む核酸。

【請求項 14】

相補性配列を有する核酸がアンチセンス分子または RNA 干渉分子である、請求項 1 3 記載の核酸。

【請求項 15】

請求項 1 3 記載の核酸を含むベクター。

【請求項 16】

ベクターがプラスミド、シャトルベクター、ファージミド、コスミド、ウイルスベクター、および発現ベクターからなる群より選択される、請求項 1 5 記載のベクター。

【請求項 17】

請求項 1 3 記載の核酸を含む細胞。

【請求項 18】

請求項 1 5 記載のベクターを含む細胞。

【請求項 19】

請求項 1 記載のポリペプチド、配列番号 1 ~ 9 または配列番号 4 7 記載のポリペプチド、上記ポリペプチドの 1 つをコードする核酸、上記核酸の 1 つの変異体、および上記ポリペプチドの 1 つに対して作製された抗体または抗体断片からなる群より選択された少なくとも 1 つの化合物を、適切な添加剤または助剤と組合せてかまたは一緒に含む診断薬。

【請求項 20】

10

20

30

40

50

核酸が、プローブである、請求項 19 記載の診断薬。

【請求項 21】

プローブが、DNA プローブである、請求項 20 記載の診断薬。

【請求項 22】

請求項 1 記載のポリペプチド、配列番号 1 ~ 9 または配列番号 47 記載のポリペプチド、上記ポリペプチドの 1 つの機能的変異体、上記ポリペプチドの 1 つをコードする核酸、上記核酸の 1 つの変異体、上記核酸の 1 つの非機能的突然変異体変種である核酸、上記核酸の 1 つに対して相補性である配列を有する核酸、上記核酸の 1 つを含むベクター、上記核酸の 1 つを含む細胞、上記ベクターを含む細胞、上記ポリペプチドの 1 つに対して作製された抗体または抗体の断片、上記ポリペプチドの 1 つの機能的変異体に対して作成された抗体または抗体の断片、上記抗体の 1 つをコードする核酸を含むベクター、上記抗体の 1 つをコードする核酸を含むベクターを含む細胞、および上記抗体断片の 1 つをコードする核酸を含むベクターを含む細胞からなる群より選択された少なくとも 1 つの成分を、適切な添加剤または助剤と組合せてかまたは一緒に含む医薬組成物。

10

【請求項 23】

相補性配列を有する核酸が、アンチセンス分子または RNA 干渉分子である、請求項 22 記載の医薬組成物。

【請求項 24】

配列番号 1 ~ 9 または配列番号 47 記載のポリペプチド、上記ポリペプチドの 1 つの機能的変異体、上記ポリペプチドの 1 つをコードする核酸、上記核酸の 1 つの変異体、上記核酸の 1 つの非機能的突然変異体変種である核酸、上記核酸の 1 つに対して相補性である配列を有する核酸、上記ポリペプチドの 1 つに対して作成された抗体または抗体の断片、および上記ポリペプチドの 1 つの機能的変異体に対して作製された抗体または抗体の断片からなる群より選択された少なくとも 1 つの化合物が、患者のサンプル中で同定され、参照ライブラリーまたは参照サンプルの少なくとも 1 つの化合物と比較される、肝臓障害または上皮癌の診断の方法。

20

【請求項 25】

肝臓障害が、肝硬変、アルコール性肝臓疾患、慢性肝炎、ウィルソン病、血色素症、肝細胞癌、良性肝新生物、および限局性結節性過形成からなる群より選択される障害である、請求項 24 記載の方法。

30

【請求項 26】

上皮癌が、肺、胃、腎臓、大腸、前立腺、皮膚、および乳房からなる群より選択される器官の腺癌である、請求項 24 記載の方法。

【請求項 27】

肝臓障害または上皮癌を患う患者を処置する方法であって、配列番号 1 ~ 9 または配列番号 47 記載のポリペプチド、上記ポリペプチドの 1 つの機能的変異体、上記ポリペプチドの 1 つをコード化する核酸、上記核酸の 1 つの変異体、上記核酸の 1 つの非機能的突然変異体変種である核酸、上記核酸の 1 つに対して相補性である配列を有する核酸、上記核酸の 1 つを含むベクター、上記核酸の 1 つを含む細胞、上記ベクターを含む細胞、上記ポリペプチドの 1 つに対して作製された抗体または抗体の断片、上記ポリペプチドの 1 つの機能的変異体に対して作製された抗体または抗体の断片、抗体をコードする核酸を含むベクター、抗体をコードする核酸を含むベクターを含む細胞、および抗体断片をコードする核酸を含むベクターを含む細胞からなる群より選択される少なくとも 1 つの成分が、適切な添加剤または助剤と組合せてかまたは一緒に、処置の必要な患者に治療的有效量で投与される方法。

40

【請求項 28】

相補性配列を有する核酸が、アンチセンス分子または RNA 干渉分子である、請求項 27 記載の処置の方法。

【請求項 29】

RNA 干渉分子が、二本鎖 RNA または二本鎖 RNA を発現するベクターの形で投与さ

50

れる、請求項 28 記載の処置の方法。

【請求項 30】

RNA 干渉分子が、15 ~ 30 個のヌクレオチドからなる群より選択されるサイズ範囲を有する、請求項 29 記載の方法。

【請求項 31】

肝臓障害が、肝硬変、アルコール性肝臓疾患、慢性肝炎、ウィルソン病、血色素症、肝細胞癌、良性肝新生物、および限局性結節性過形成からなる群より選択される障害である、請求項 27 ~ 30 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 32】

上皮癌が、肺、胃、腎臓、大腸、前立腺、皮膚、および乳房からなる群より選択される器官の腺癌である、請求項 27 ~ 30 のいずれか一項記載の方法。

10

【請求項 33】

配列番号 1 ~ 9 または配列番号 47 の配列記載のポリペプチド、またはその機能的変異体に対する、肝臓障害または上皮癌を患う患者の免疫反応を刺激する方法であって、配列番号 1 ~ 9 または配列番号 47 の配列記載のポリペプチド、その機能的変異体、上記ポリペプチドの 1 つをコードする核酸、上記核酸の 1 つの変異体、上記核酸の 1 つを含むベクター、上記核酸の 1 つを含む細胞、および上記ベクターを含む細胞からなる群より選択される少なくとも 1 つの成分を、このような治療の必要な患者に治療的有効量で投与し、患者の免疫反応を刺激する方法。

【請求項 34】

20

患者から分離したサンプル中で異なって発現された配列番号 10 ~ 配列番号 19 記載の少なくとも 1 つの核酸、またはその変異体を、参照ライブラリーまたは参照サンプルに対して同定する方法であって、以下の工程：

(a) 患者から分離したサンプル中の、配列番号 10 ~ 配列番号 19 記載の少なくとも 1 つの核酸、またはその変異体の発現を検出する工程と；

(b) 工程 (a) で検出された上記核酸の発現を、参照ライブラリーまたは参照サンプル中の同じ上記核酸の発現と比較する工程と；

(c) 参照ライブラリーまたは参照サンプルと比較して、患者から分離したサンプル中の異なって発現された上記核酸を同定する工程と；

を含む方法。

30

【請求項 35】

肝臓障害または上皮癌を診断する方法であって、以下の工程：

(a) 患者から分離したサンプル中の、配列番号 10 ~ 配列番号 19 記載の少なくとも 1 つの核酸、またはその変異体の発現を検出する工程と；

(b) 工程 (a) で検出された上記核酸の発現を、参照ライブラリーまたは参照サンプル中の該核酸の発現と比較する工程と；

(c) 参照ライブラリーまたは参照サンプルと比較して、患者から分離したサンプル中の異なって発現された上記核酸を同定する工程と；

(d) 工程 (c) で同定した上記核酸を、病理参照サンプルまたは病理参照ライブラリー中の異なって発現された上記核酸と一致させる工程と；

40

を含み、

一致した核酸が、肝臓障害または上皮癌を患う患者を示す、

方法。

【請求項 36】

工程 (a) で、少なくとも 2 つの核酸が、同定される、請求項 35 記載の方法。

【請求項 37】

工程 (a) で、上記核酸の検出が、PCR ベース検出によるか、またはハイブリダイゼーションアッセイによる、請求項 35 記載の方法。

【請求項 38】

工程 (b) において、上記核酸の発現が、固相ベースのスクリーニング方法、ハイブリ

50

ダイゼーション、サブトラクティブハイブリダイゼーション、ディファレンシャルディスプレイ、およびRNase保護アッセイからなる群から選択される方法によって比較される、請求項35～37のいずれか一項記載の方法。

【請求項39】

患者から分離したサンプルが、肝臓組織、肝臓細胞、癌性形質転換を受けた別の器官からの組織、この器官からの細胞、血液、血清、血漿、腹水、乳房水、脳脊髄液、唾液、尿、精液、および糞からなる群より選択される、請求項35～38のいずれか一項記載の方法。

【請求項40】

参照サンプルが、同じ患者の非罹患サンプルおよび別の対象者からの非罹患サンプルから選択された供給源より分離される、請求項35～39のいずれか一項記載の方法。

10

【請求項41】

参照サンプルが、肝臓組織、肝臓細胞、血液、血清、血漿、腹水、乳房水、脳脊髄液、唾液、尿、精液、および糞からなる群より選択される、請求項35～40のいずれか一項記載の方法。

【請求項42】

参照ライブラリーが、工程(a)の上記核酸の肝臓障害特異的発現に関するクローンまたはデータを含む発現ライブラリーまたはデータベースである、請求項35～41のいずれか一項記載の方法。

【請求項43】

病理参照サンプルが、肝臓障害または上皮癌を患う別の患者からの罹患サンプルから選択された供給源から分離される、請求項35～42のいずれか一項記載の方法。

20

【請求項44】

病理参照ライブラリーが、参照サンプルまたは参照ライブラリーでの対照発現に対する、肝臓障害または上皮癌を患う別の患者から分離されたサンプル中の工程(a)における上記核酸のディファレンシャル発現に関するデータを含むデータベースである、請求項35～43のいずれか一項記載の方法。

【請求項45】

肝臓障害が、肝細胞癌、良性肝新生物、および肝硬変からなる群より選択される障害である、請求項35～44のいずれか一項記載の方法。

30

【請求項46】

上皮癌が、肺、胃、腎臓、大腸、前立腺、皮膚、および乳房からなる群より選択される器官の腺癌である、請求項35～44のいずれか一項記載の方法。

【請求項47】

参照ライブラリーまたは参照サンプルに対して、患者から分離されたサンプル中で異なって発現された配列番号1～配列番号9または配列番号47記載の少なくとも1つのポリペプチド、またはその機能的変異体を同定する方法であって、以下の工程：

(a) 患者から分離されたサンプル中の、配列番号1～配列番号9または配列番号47記載の少なくとも1つのポリペプチド、またはその機能的変異体の発現を検出する工程と；

40

(b) 工程(a)で検出された上記ポリペプチドの発現を、参照ライブラリーまたは参照サンプル中の上記ポリペプチドの発現と比較する工程と；

(c) 参照ライブラリーまたは参照サンプルと比較して、患者から分離したサンプル中の異なって発現された上記ポリペプチドを同定する工程と；
を含む方法。

【請求項48】

肝臓障害または上皮癌を診断する方法であって、以下の工程：

(a) 患者から分離されたサンプル中の、配列番号1～配列番号9または配列番号47記載の少なくとも1つのポリペプチド、またはその機能的変異体の発現を検出する工程と；

50

(b) 工程 (a) で検出された上記ポリペプチドの発現を、参照ライブラリーまたは参照サンプル中の上記ポリペプチドの発現と比較する工程と；

(c) 参照ライブラリーまたは参照サンプルと比較して、患者から分離したサンプル中で異なって発現された上記ポリペプチドを同定する工程と；

(d) 工程 (c) で同定した上記ポリペプチドを、病理参照サンプルまたは病理参照ライブラリー中の異なって発現された上記ポリペプチドと一致させる工程と；

を含み、

一致したポリペプチドが、肝臓障害または上皮癌を患う患者を示す、

方法。

【請求項 49】

少なくとも2つのポリペプチドが、同定される、請求項 48 記載の方法。

10

【請求項 50】

ポリペプチドが、ゲル電気泳動、クロマトグラフィー技法、免疫プロット分析、免疫組織化学、酵素ベース免疫アッセイ、表面プラズモン共鳴、HPLC、質量分析法、免疫組織化学、および酵素ベース免疫アッセイからなる群より選択される方法によって検出される、請求項 48 または 49 記載の方法。

【請求項 51】

ポリペプチドが、二次元ゲル電気泳動、クロマトグラフィー分離技法、免疫プロット分析、表面プラズモン共鳴、免疫組織化学、および酵素ベース免疫アッセイからなる群より選択される方法によって比較される、請求項 48 ~ 50 のいずれか一項記載の方法。

20

【請求項 52】

患者から分離したサンプルが、肝臓組織、肝臓細胞、癌性形質転換を受けた別の器官からの組織、この器官からの細胞、血液、血清、血漿、腹水、乳房水、脳脊髄液、唾液、尿、精液、および糞からなる群より選択される、請求項 48 ~ 51 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 53】

参照サンプルが、同じ患者の非罹患サンプルおよび別の対象者からの非罹患サンプルから選択された供給源より分離される、請求項 48 ~ 52 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 54】

参照サンプルが肝臓組織、肝臓細胞、血液、血清、血漿、腹水、乳房水、脳脊髄液、唾液、尿、精液、および糞からなる群より選択される、請求項 48 ~ 53 のいずれか一項記載の方法。

30

【請求項 55】

参照ライブラリーが、工程 (a) の上記核酸の肝臓障害特異的発現に関するクローンまたはデータを含む発現ライブラリーまたはデータベースである、請求項 48 ~ 54 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 56】

病理参照サンプルが、肝臓障害または上皮癌を患う別の患者からの罹患サンプルから選択された供給源から分離される、請求項 48 ~ 55 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 57】

病理参照ライブラリーが、参照サンプルまたは参照ライブラリーでの対照発現に対する、肝臓障害または上皮癌を患う別の患者から分離されたサンプル中の工程 (a) における上記ポリペプチドのディファレンシャル発現に関するデータを含むデータベースである、請求項 48 ~ 56 のいずれか一項記載の方法。

40

【請求項 58】

肝臓障害が、肝細胞癌、良性肝新生物、および肝硬変からなる群より選択される障害である、請求項 48 ~ 57 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 59】

上皮癌が、肺、胃、腎臓、大腸、前立腺、皮膚、および乳房からなる群より選択される器官の腺癌である、請求項 48 ~ 57 のいずれか一項記載の方法。

50

【請求項 6 0】

患者が肝臓障害または上皮癌を発症するのを防止する方法であって、配列番号 1 ~ 9 または配列番号 4 7 記載のポリペプチド、その機能的変異体、上記ポリペプチドの 1 つをコードする核酸、上記核酸の 1 つの変異体、上記核酸の 1 つに対して相補性である配列を有する核酸、上記核酸の 1 つの非機能的突然変異体である核酸、上記核酸の 1 つを含むベクターまたはその変異体、上記核酸の 1 つを含む細胞またはその変異体、および上記ベクターを含む細胞からなる群より選択される少なくとも 1 つの成分が、このような防止処置の必要な患者に治療的有効量で投与される方法。

【請求項 6 1】

薬理学的活性化合物を同定する方法であって、以下の工程：

10

(a) 配列番号 1 ~ 9 または配列番号 4 7 記載の少なくとも 1 つのポリペプチド、またはその機能的変異体を提供する工程と；

(b) 上記ポリペプチドに、薬理学的活性化合物であると思われる化合物を接触させる工程と；

(c) 工程 (a) の上記ポリペプチドと薬理学的に活性であると思われる上記化合物との相互作用をアッセイする工程と；

(d) 工程 (a) の上記ポリペプチドと直接または間接的に相互作用する、薬理学的に活性であると思われる上記化合物を同定する工程と；

を含む方法。

【請求項 6 2】

20

工程 (a) の上記ポリペプチドがカラムに付着されるか、上記ポリペプチドが、アレイに付着されるか、電気泳動ゲルに含有されるか、膜に付着されるか、または細胞によって発現される、請求項 6 1 記載の方法。

【請求項 6 3】

相互作用が、酵素または蛍光ベース細胞レポーター法によってアッセイされる、請求項 6 1 または 6 2 記載の方法。

【請求項 6 4】

相互作用が、表面プラズモン共鳴、HPLC、または質量分析法によってアッセイされる、請求項 6 1 または 6 2 記載の方法。

【請求項 6 5】

30

工程 (d) の直接または間接機能相互作用が、工程 (a) における上記ポリペプチドの発現の誘発、上記ポリペプチドの発現の抑制、上記ポリペプチドの機能の活性化、上記ポリペプチドの機能の抑制からなる群より選択される、請求項 6 1 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ポリペプチドおよびこれらをコード化する核酸ならびに肝臓障害および腫瘍性疾患、特に肝臓および他の上皮組織の癌、良性肝新生物、例えばアデノーマならびに他の増殖性肝臓障害、例えば限局性結節性過形成 (FNH) および肝硬変の診断、防止、および/または処置へのその使用に関する。本発明は、更に、これらの障害を診断および処置する方法に関する。

40

【背景技術】

【0002】

癌の発生は一般に、例えば増殖、アポトーシス (細胞死)、ストレスに対する反応および上皮/間質相互作用を含む、重要な細胞経路の活性を変化させる遺伝子変異を特徴とする。癌において調節解除された核酸の同定は、腫瘍性形質転換の機構への重要な新しい洞察を与えることが、ますます認識されている。マクロ再生結節などの前癌状態における調節解除核酸発現の同定ならびに肝臓癌における「大きな」および「小さな」細胞変化は、悪性形質転換の初期事象の知識を提供する。同様に、肝臓における FNH および肝硬変などの組織増殖および組織修復を特徴とする障害における調節解除遺伝子発現の同定は、

50

増殖および悪性形質転換に包含される核酸を識別できる。このような調節解除核酸およびコード化された遺伝子生成物は共に、癌の新しい診断マーカーとしての可能性を有する。その上、これらの調節解除核酸の生成物はそれ自体、ヒト患者におけるこれらの障害の防止および/または処置での治療介入の標的である。

【0003】

肝臓は、タンパク質、脂質、炭水化物、核酸、およびビタミンの代謝で重要な役割を果たす。効果的に診断、防止、または処置できない、肝細胞癌(HCC)などの肝臓に影響を及ぼす多数の障害がある。HCCの検査は、癌における調節解除遺伝子発現の同定に特によく適している。このことは、HCCの組織サンプルが外科的に切除した腫瘍から得ることが可能であり、腫瘍が間質組織がほとんどない、境界が明らかな固形構造であるから

10

【0004】

更に、先に記載したように、肝硬変、非腫瘍性症状と同様に良性および悪性腫瘍の比較分析の可能性がある。肝臓障害に関連する異なって発現された遺伝子を同定する技術の制限が克服できるならば、この比較手法は、成熟器官での(例えば肝硬変での)細胞増殖および組織修復の過程に特異的に関与する調節解除核酸の同定はもちろんのこと、過形成(FNHなど)ならびに良性および悪性新生物(例えばアデノーマおよびHCC)に関連する遺伝子発現変化の同定および識別を可能にする。HCCにおいて、新しくより優れた診断および治療能力への切迫した要求がある。肝臓癌の調節解除遺伝子が、胃腸管の他の癌と、そして確かに他の癌腫(上皮由来癌)と高度に関連性であるのは、これらの組織が共通の発生起源を共有するためである。

20

【0005】

世界的に肝細胞癌(HCC)は、最も一般的な悪性腫瘍に属し、約100万件死亡/年を計上している(Ishakら, 1999. Atlas of Tumor Pathology. Fascicle 31. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC)。

【0006】

HCCなどの腫瘍性肝臓障害および他の多くの腫瘍の最終診断は、生検標本の組織病理学的評価に依存する。この侵襲性外科的措置は、一般に、症候が現れるまで行われず、そのとき疾患は、ほとんどの場合で進行段階にあるため、それにより治療介入の選択肢が制限される。それゆえ診断薬および診断方法を改善するための要求がある。加えて早期診断が不可欠であるが、晩期発症または特異的臨床症候の欠如によってさえ阻止される。診断時に大半のHCC腫瘍は、外科的切除をもはや受け入れられない(被包性腫瘍または線維層状変種を除く)(Chen and Jeng, 1997, J.Gastroenterol. Hepatol.12: 329-34);その上、これらは細胞増殖抑制療法に対して高度に耐性である(Kawataら, 2001 Br.J.Cancer 84: 886-91)。全体的に、通例、診断後1年以内に死に至る。それゆえHCCの初期検知のマーカー、予後指標、および有効な防止および/または治療法が、この分野で非常に望ましい。

30

【0007】

対照的に、結腸直腸癌において良く研究された状況とは異なり、肝臓アデノーマは、HCCの前駆病巣を示さない。同様に肝硬変および肝炎ウイルス感染は、HCCの明らかな危険因子であるが、これらの状態はHCC発症に必須ではない。ある肝臓病巣は、マクロ再生結節性過形成などのHCC前段階を示すが、これはまだ確認されていない(Shortell and Schwartz, 1991, Surg Gynecol Obstet.173: 426-31; Anthony, P. in MacSweenら, 編 Pathology of the Liver.2001, Churchill Livingstone, Edinburgh)。これらの障害は、肝臓切除および肝臓生検の組織病理学的調査によって診断されるが、これらの状態のより早期の、または非侵襲性検知の有効な方法は存在していない。さらに、これらの新生物の診断および予後マーカーに対する、およびこれらの障害の非侵襲性検知に対する即時の要求がある。

40

【0008】

過去10年間に複数の技術が、細胞内の多数の転写物の発現レベルを常に監視すること

50

を可能にしてきた（例えばSchenら，1995，Science 270: 467-470; Lockhartら，1996，Nature Biotechnology 14: 1675-1680; Blanchardら，1996，Nature Biotechnology 14, 1649; 1996，米国特許第5,569,588号を参照）。転写物配列技術が、各種の障害状態においてアップレギュレートまたはダウンレギュレートされる遺伝子の同定に利用されてきた。複数の最近の研究は、HCCでの遺伝子発現の変化を検査するために、この技術を利用してきた。これらの研究は、対照に対して、HCC細胞系およびHCC組織中の肝臓特異性タンパク質をコード化する遺伝子の調節解除（すなわち過剰および過小発現）をさまざまに明らかにした。その上、研究は、細胞サイクル制御、ストレス反応、アポトーシス、脂質代謝、細胞-細胞相互作用、DNA修復、ならびにサイトカインおよび成長因子生成に必須の遺伝子を明らかにした（Graveelら，2001，Oncogene 20: 2704-12; Kawaiら，2001，Hepatology 33: 676-91; Lauら，2000，Oncol.Res.12: 59-69; Nagaiら，1998，Cancer 82: 454-61; Okabeら，2001，Cancer Res 61: 2129-37; Salvucciら，1999，Oncogene 18: 181-187; Shirotaら，2001，Hepatology 33: 832-40; Tackels-Horneら，2001，Cancer 92: 395-405; Wuら，2001，Oncogene 20: 2674-3682; Xuら，2001，Cancer Res.61: 3176-81）。しかしながら、これらの研究で報告された遺伝子発現パターンには、実験設計の相違により、および/またはHCC組織自体の不均一性により、ほとんど一致しない。その上、これらのHCCの病因は、重要な因子である。B型およびC型慢性肝炎ウイルス感染は、HCCの主な要因であるが、アルコールによる損傷および慢性肝臓障害もHCCを発生させることが認識されており、これら各種の病因による腫瘍の発症の原因となる機構は異なりやすい。総合すれば、現在までに、肝臓障害への介入を可能にする満足な診断薬および診断方法が開発されていない。

10

20

30

【0009】

同じことが肝臓障害、および上皮癌の治療に当てはまる。例えばHCCでは、切除および移植を除いて有効な治療選択肢がないが、これらの手法は、ドナー肝臓へのアクセスが制限され、患者への高度の危険と関連付けられた、HCCの早期段階においてのみ利用できる。加えてこれらの手法は、非常に費用がかかる。これらの癌は、大抵解毒での正常な肝機能および有害な化合物の移出により、化学療法にはごくわずかしか反応しない。化学塞栓、凍結療法、およびエタノール注射などの、複数の他の治療選択肢は、なお実験段階にあり、これらの有効性は確立されていない。外科的介入が最良の処置選択肢のままであるが、腫瘍の程度を精密に定義することはできない。したがってこの侵襲性措置は、処置の観点からすれば次善である。更に特異的な肝臓機能障害の早期診断の欠如は、大抵疾患の進行助長につながり、それは治療選択肢を更に混乱させ、これらの疾患による患者の死亡率を劇的に上昇させる（Jansen P.L., 1999, Neth.J.Med.55: 287-292）。それゆえ現在まで、肝臓障害および他の上皮癌に介入できるようにする満足のいく療法が開発されていない。更に最新技術においては、ディファレンシャル遺伝子発現によって明かされるような、HCC前駆病巣、良性肝新生物、およびアルコール性肝臓疾患および肝硬変などの代謝性肝臓疾患などの、肝臓障害の各種サブタイプの認識は、開示されていない。本発明で評価された障害の一部の主要な疾患の特徴の概要を表1に与える。

【0010】

【表 1】

表1:疾患の特徴

障害	細胞増殖	組織修復	クローン細胞増殖	新生組織形成	形質転換／悪性度
肝硬変	+	+			
FNH	+	+	+/-		
アデノーマ	+	+	+	+	
HCC	+	+	+	+	+

10

20

【0011】

本発明は、当分野に存在する制限を克服する、ポリペプチドおよびこれらをコード化する核酸ならびに肝臓障害、特に肝細胞癌（HCC）、および上皮癌、前癌肝臓病巣、アデノーマなどの良性新生物、ならびに限局性結節性過形成（FNH）および肝硬変などの、他の増殖性肝臓障害の診断、防止、および／または処置のためのその使用に関する。本発明は、このような核酸を含むベクターおよび細胞に、そして上記ポリペプチドおよび核酸に対して作成された抗体または抗体断片にも関する。

【0012】

本発明は、更に、これらの障害を診断および処置する方法に関する。重複するが明確な形態的および臨床的特徴を持つ複数の障害の評価は、同定および識別に関する新しい情報ならびに本発明による、これらの疾患の極めて新しい治療方法を提供する。

30

【0013】

本発明で採用された独自の手法は、非腫瘍性ヒト肝臓のプールと比較してHCCで特異的にアップレギュレートおよびダウンレギュレートされた遺伝子中で濃縮された疾患特異的cDNAライブラリーの作成のために、別個の、病理学者が確認した肝臓癌の病態を利用する。ライブラリーは、HCCでの調節解除遺伝子発現のゲノム規模の表現であり、したがってすべての潜在的なHCC調節解除遺伝子を含む。多くの更なる別個の、病理学者が確認した肝臓癌サンプル（HCC）および非悪性肝臓病巣からの標識された発現核酸を用いた、これらのライブラリークローンへの反復ハイブリダイゼーションは、HCC中で高度に調節解除された核酸を示した。驚くべき発見は、この手法が、これまでに同定されていない調節解除核酸及び以前にHCCと関連付けられなかった多くの調節解除核酸を提供し、その発現向上が他の新生物にも関連付けられることである。これらのHCC調節解除遺伝子およびタンパク質は、本発明の主題である。

40

【0014】

スクリーニングおよび検証方法は、入念および明確なパラメータ選択により、それ自体既に独創的である。本発明による異なって発現された遺伝子の同定は、ヒト肝臓の障害での遺伝子発現変化の発現に関して、組織病理学的に識別された肝臓障害組織に依存する。実験用の非罹患の参照肝臓サンプルも、診断により確認した。

【0015】

50

本発明の目的は、肝臓障害、肝臓癌、および/または上皮癌の診断方法によって解決され、ここで配列番号1～配列番号9および/または配列番号47の配列によるポリペプチド(表2)、その機能的変異体、先に記載したポリペプチドの1つをコード化する核酸、先に記載した核酸の1つの変異体、先に記載したポリペプチドの1つに対して作成された抗体または抗体の断片、またはその変異体からなる群より選択される少なくとも1つの化合物を、患者のサンプル中で同定して、参照ライブラリーの、または参照サンプルの少なくとも1つの化合物と比較する。

【0016】

本発明の目的は、肝臓障害または上皮癌を患う患者を治療する方法によっても解決され、ここで配列番号1～9および/または配列番号47によるポリペプチド、先に記載したポリペプチドの1つの機能的変異体、先に記載したポリペプチドの1つをコード化する核酸、またはその機能的変異体、先に記載した核酸の1つの変異体、先に記載した核酸の1つの非機能的突然変異体である核酸、先に記載した核酸の1つに対して相補性である配列を有する核酸、先に記載した核酸の1つを含むベクター、先に記載した核酸の1つを含む細胞、先に記載したベクターを含む細胞、先に記載したポリペプチドに対してまたはその機能変異体に対して作成された抗体または先に記載した抗体の1つの断片、先に記載した抗体の1つをコード化する核酸を含むベクター、先に記載した抗体断片をコード化する核酸を含むベクター、先に記載した抗体をコード化する核酸を含むベクターを含む細胞、および先に記載した抗体断片をコード化する核酸を含むベクターを含む細胞からなる群より選択される少なくとも1つの成分を、治療の必要のある患者に治療的有効量で投与する。

【0017】

本発明の別の態様において、本発明によるポリペプチド、その機能変異体、ポリペプチドをコード化する核酸、先に記載した核酸の1つの変異体、先に記載した核酸の1つの非機能的突然変異体である核酸、先に記載した核酸の1つに対して相補性である配列を有する核酸、先に記載した核酸の1つを含むベクター、先に記載した核酸の1つを含む細胞、先に記載したベクターを含む細胞、先に記載したポリペプチドの1つに対して作成された抗体、先に記載したポリペプチドの1つの機能変異体に対して作成された抗体、先に記載した抗体の1つの断片、先に記載した抗体の1つをコード化する核酸を含むベクター、先に記載した抗体断片の1つをコード化する核酸を含むベクター、先に記載した抗体をコード化する核酸を含むベクターを含む細胞、および先に記載した抗体断片の1つをコード化する核酸を含むベクターを含む細胞からなる群より選択される、少なくとも1つの化合物を含む医薬組成物を、治療の必要のある患者に治療的有効量で投与することが規定される。

【0018】

本発明によるポリペプチドのアクセッション番号およびそのcDNAを表2に示す。

【0019】

【表 2】

表2:核酸およびポリペプチドならびにそれぞれの配列番号および
GenBank データベースによるアクセッション番号

分子	ポリペプチド (配列番号)	アクセッション 番号	DNA (配列番号)	アクセッション 番号
OBcl1	1	NP_443111	10	AL833272
OBcl5	2	新規	11	新規
IK2	3	NP_079436	12	NM_025160
IK5	4	NP_006398	13	NM_006407
DAP3	5	NP_387506	14	NM_033657
LOC5	6	NP_060917	15	NM_018447
SEC14L2	7	NP_036561	16	NM_012429
SSP29	8	NP_006392	17	NM_006401
HS16	9	NP_057223	18	NM_016139
IK3	47	XM_131462	19	AL049338

10

20

【0020】

本発明によるこれらの核酸およびポリペプチドのサブセットは、RT-PCR分析によって、上皮起源の他の癌において、そして好ましくは該当する正常なヒト組織においてではなく、特異的に発現または調節解除されることが示されている。これらの核酸は、好ましくは、配列番号11～16および19を含む(表6および図3に与える)。肝臓癌の調節解除核酸は、これらの組織が共通の発生起源を共有しているため、好ましくは胃腸管の他の癌と高度に関連性がある。結果として、これらの核酸およびコード化されたポリペプチドは、好ましくは、診断の診断方法、医薬組成物、およびこれらの上皮癌の防止および/または処置の方法にも同様に利用できる。

30

【0021】

本発明によるポリペプチドおよび核酸は、参照サンプルと比較して、本発明による障害を患う患者から分離されたサンプルでは異なって発現されるという共通点を持つ。本発明によるポリペプチドおよび核酸の調節は、病理プロセスには必須であり、本発明による障害の診断、防止、および/または処置と直接および間接の関係にある。本発明によるポリペプチドおよび核酸は、現在までに既知の標的に属さないため、診断および療法への驚くべきおよび完全に新規な手法が本発明から生じる。

40

【0022】

一般に、組織中で異なって発現された遺伝子の分析は、細胞培養システムの分析よりも、人為的な偽陽性クローンの形でのエラーを起こしにくい。既存の細胞培養システムが、組織中の病理過程の複雑さを十分にシミュレートできないという事実に加えて、培養環境における細胞挙動の変動が、実際の病理状態に関して疑わしい核酸およびポリペプチドの発現パターンを生じさせる。これらの問題は、正常および罹患ヒト組織での遺伝子発現を利用する手法によってより明白になりにくい、複数の変数が再度、疾患に直接関連性であるディファレンシャル遺伝子発現の明らかな同定を混乱させる。例えば、異なって発現された核酸は、個人間の相違、代謝状態、および/または臨床処置パラダイムから生じる

50

ことがある。更に、cDNAマイクロアレイを使用する大規模な遺伝子発現の研究は、遺伝子発現における変動の細胞源を示していない。加えて、すべてまたは大半の遺伝子を含むディファレンシャル遺伝子発現の研究は、主要疾患関連の遺伝子発現の変化の識別を混乱させる、大量のデータを生成する。結果として、一般的にのみ定義された肝臓障害（例えば肝臓腫瘍）による組織からの遺伝子発現の大規模プロファイリングを含む手法は、疾患過程に關与する主要な遺伝子を明らかにし、診断および治療介入への最良の標的となるのは、これらの主要な遺伝子である。

【0023】

これらの問題により、スクリーニングの成功は、実験パラメータの選択に大きく依存している。使用した方法は、確立された方法に基づいて使用されるが、スクリーニングおよび検証方法は、入念および明確なパラメータ選択により、それ自体既に独創的である。本発明で利用した独自の手法は、非腫瘍性ヒト肝臓のプールと比較してHCCで特異的にアップレギュレートおよびダウンレギュレートされた核酸中で濃縮された疾患特異性cDNAライブラリーの作成のために、別個の、病理学者が確認した肝臓癌病態を利用する。実験用の非罹患の参照肝臓サンプルも、診断により確認して、個人間の変動から生じる偽陽性の検知を減少させるために3名のサンプルをプールした。参照肝臓プールおよび罹患肝臓（すなわちHCC）において同様のレベルで一般に発現された核酸は、サブストラクティブ・サブプレッシブ・ハイブリダイゼーション（SSH）cDNAライブラリーの作成によって除去された（Diatchenkoら，1996，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 93: 6025-6030）。これらのcDNAsは、HCCでアップレギュレートおよびダウンレギュレートの両方をされた核酸について高度に濃縮されるが、異なって発現された核酸に相当しない。数千個の各SSHクローンは、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって増幅し、カスタムcDNAマイクロアレイ内のガラススライドに付着させた。病理学者が確認した追加の肝臓障害によるRNAを、マイクロアレイ上のプールされた非罹患肝臓RNAを用いて競合ハイブリダイゼーション用の蛍光標識cDNAに変換する。ハイブリダイゼーション強度の生成率は、肝臓障害において特異的に調節解除された核酸を明らかにする。ディファレンシャル発現された遺伝子に関して高度に濃縮された候補cDNAのプールを提供することに加えて、SSHライブラリーは、ゲノム規模で、全部でないにしても大半の異なって発現された遺伝子を、標準cDNAライブラリーよりもはるかに少ないクローンと共に提示する。それによりこの特徴は、疾患で特異的に調節解除された核酸に集中する。本発明で作成されたSSHライブラリーは、正常な肝臓では本質的に発現されず、それにより従来のcDNAライブラリーまたはゲノム規模のcDNAマイクロアレイで提示されない核酸からのcDNAクローンを含む。

【0024】

正常な肝臓と比較した肝臓障害組織における本発明による配列の過剰発現は、配列特異的定量RT-PCR（Q-PCR）によって、RNAレベルの独立した分析により確認される（図2）。これらの検証実験において、本発明による配列の細胞RNAレベルに相当するPCR生成物は、特異的PCR生成物の蛍光検知により監視する。蛍光シグナルは、TaqMan手順の配列特性加水分解プローブオリゴヌクレオチド（プライマー）、またはSYBRグリーンなどの蛍光二本鎖DNA結合染料のどちらかによって提供される。本発明による配列に相当するPCR生成物のレベルは、グリセルアルデヒドデヒドロゲナーゼ（GAPDH）および-アクチンを含む「ハウスキーピング」遺伝子のレベルとの比較によって、実験可変性について正規化され、疾患中にまたは実験操作の後で比較的不変であると見なされる。これらのQ-PCR手順は、本発明による配列のレベルが、低分子干渉RNAオリゴヌクレオチドによって実験的に低下した場合などの実験状況において、遺伝子発現のレベルを測定するためにも使用される（図6、表10）。TaqMan Q-PCR分析に使用された参照遺伝子プライマーは、GAPDH-p1、配列番号56；GAPDH-p2、配列番号57；GAPDH-p3、配列番号58；bActin-p1、配列番号59；bActin-p2、配列番号60；およびbActin-p3、配列番号61である。SYBRグリーン分析に使用した参照遺伝子プライマーは、bActi

10

20

30

40

50

n - p 4、配列番号 6 2 ; および b A c t i n - p 5、配列番号 6 3 である。Q - P C R 実験における、これらのハウスキーピング遺伝子に対する R N A レベルの決定は、P f f a f l (Nucleic Acids Research(2001) May 1, 29(9): e45) の方法にしたがって実施した。これらの技法は、当業者に周知である。

【 0 0 2 5 】

更に本発明による H C C 調節解除遺伝子の発現は、静止細胞の血清刺激の 8 時間後および 1 2 時間後のヘパトーマ細胞 (H e p 3 B) の増殖に関連している (図 8) 。この発見は、本発明による発現の過剰発現が、肝臓癌などの増殖性肝臓障害にとって機能的に重要であるという示唆を裏付けている。

【 0 0 2 6 】

最先端と比較すると、これらのポリペプチドおよび核酸は、驚くべきことに、肝臓障害および / または上皮癌の改良された、より感受性の高い、より早期で、より高速の、および / または非侵襲性の診断を可能にする。本発明による核酸およびポリペプチドは、肝臓障害および上皮癌の診断、防止、および処置に利用できる。

【 0 0 2 7 】

本発明は、配列番号 2 による配列を含むポリペプチド、またはその機能変異体に関する。本発明は、ポリペプチドをコード化する核酸、またはその機能変異体、特に配列番号 1 1 による核酸およびその変異体に関する。

【 0 0 2 8 】

好ましい実施態様において、ポリペプチドは、配列番号 2 による配列からなる。別の好ましい実施態様において、核酸は、配列番号 1 1 による配列からなる。

【 0 0 2 9 】

最先端と比較すると、これらのポリペプチドおよび核酸は、驚くべきことに、肝臓障害および / または上皮癌の改良された、より感受性の高い、より早期で、より高速の、および / または非侵襲性の診断を可能にする。

【 0 0 3 0 】

本発明の別の態様において、本発明は、配列番号 1 ~ 9 および / または配列番号 4 7 による少なくとも 1 つのポリペプチド、ポリペプチドの機能変異体、先に記載したポリペプチドの 1 つをコード化する核酸、機能変異体をコード化する核酸、先に記載した核酸の 1 つの変異体、先に記載した核酸の 1 つの非機能的突然変異体である核酸、先に記載した核酸の 1 つに対して相補性である配列を有する核酸、先に記載した核酸の 1 つを含むベクター、先に記載した核酸の 1 つを含む細胞、先に記載したベクターを含む細胞、先に記載したポリペプチドの 1 つに対して作成された抗体、先に記載したポリペプチドの 1 つの機能変異体に対して作成された抗体、先に記載した抗体の 1 つの断片、先に記載した抗体の 1 つをコード化する核酸を含むベクター、先に記載した抗体断片の 1 つをコード化する核酸を含むベクター、先に記載した抗体の 1 つをコード化する核酸を含むベクターを含む細胞、および / または先に記載した抗体断片の 1 つをコード化する核酸を含むベクターを含む細胞、少なくとも 1 つの細胞の、本発明による障害の診断、防止、および / または処置への使用に関する。本発明の更なる実施態様は、以下で詳細に述べる。

【 0 0 3 1 】

肝臓障害および / または上皮癌の療法の最先端と比較した場合、これらの成分の使用は、驚くべきことに改良された、持続性の、および / または更に有効な、本発明による障害の診断、防止、および / または処置を提供する。

【 0 0 3 2 】

「ポリペプチド」という用語は、本発明によるポリペプチドの全長を指す。好ましい実施態様において、「ポリペプチド」という用語は、分離ポリペプチドおよび組換え方法によって、例えばサンプルからの分離および精製によって、ライブラリーをスクリーニングすることによって、および従来方法によるタンパク質合成によって、調製されるポリペプチドも含み、これらの方法はすべて、当業者に一般に既知である。ポリペプチド全体またはその一部は、好ましくは、例えば Merrifield 技法などの従来合成の助けによって合成

10

20

30

40

50

することができる。別の好ましい実施態様において、本発明によるポリペプチドの部分を利用して抗血清または特異性モノクローナル抗体を得ることが可能であり、これは、本発明によるポリペプチドの更なる機能変異体を同定する目的で、コード化されたタンパク質配列を発現させるために調製された適切な遺伝子ライブラリーをスクリーニングするために使用できる。

【0033】

「本発明によるポリペプチド」という用語は、配列番号1～配列番号9および/または配列番号47によるポリペプチドを指す(表2)。

【0034】

本発明の意味の範囲内のポリペプチドの「機能変異体」という用語は、配列番号1～配列番号9および/または配列番号47の1つによるアミノ酸配列を有するポリペプチドとの配列相同性、特に約70%、好ましくは約80%、特に約90%、とりわけ約95%、最も好ましくは98%の配列同一性を有するポリペプチドを指す。このような機能変異体は、例えば、ヒト以外の生物から、好ましくは非ヒト哺乳類、例えばマウス、ラット、サルおよびブタを起源とする、本発明によるポリペプチドに対して相同性のポリペプチドである。機能変異体の他の例は、異なる個人における、生物の異なる器官における、または異なる生育相における、遺伝子の異なる対立遺伝子によってコード化されるポリペプチドである。例えば機能変異体は、非肝臓組織、例えば胚性組織から、ただし指定された機能を持つ肝臓障害に關与する細胞中での発現の後に分離された核酸によってコード化されたポリペプチドも含む。機能変異体は、好ましくは、天然または合成変異、特にこれらの配列によってコード化されたペプチドの活性を定量的に変化させる変異も含む。更に、このような変異体は、好ましくは、コード化遺伝子のディファレンシャルスプライシングより生じる。

【0035】

「機能変異体」は、対応する本発明によるポリペプチドと本質的に同じ生物機能を有するポリペプチドを指す。このような生物機能は、機能アッセイにおいてアッセイすることができる。

【0036】

候補ポリペプチドが、本発明によるポリペプチドの機能変異体であるかどうかを試験するために、一般に当業者に既知の機能アッセイで候補ポリペプチドを分析することが可能であり、そのアッセイは、対応する本発明によるポリペプチドの生物機能をアッセイするのに適している。このような機能アッセイは、例えば、細胞培養システム；遺伝子が除去(ノックアウト)されるマウスまたは候補ポリペプチドをコード化する遺伝子に関して遺伝子組換えであるマウスの産生；酵素アッセイなどを含む。候補ポリペプチドが、対応する本発明によるポリペプチドと本質的に同じ生物機能を示すか、または直接阻害する場合、候補ポリペプチドは、先に記載した配列同一性%のレベルに関する要求を満足するという条件で、対応するポリペプチドの機能変異体である。

【0037】

更に「機能変異体」という用語は、候補の機能変異体ポリペプチドが配列同一性%のレベルに関する機能変異体の基準を満足しているという条件で、変異遺伝子から、またはディファレンシャルにスプライスされた遺伝子から発現されたポリペプチドを含めて、参照サンプルまたは参照ライブラリーに対して、肝臓障害または他の上皮癌を患う患者において好ましくは異なって発現されるポリペプチドを意味する。このような発現分析は、一般に当業者に既知の方法によって実施できる。

【0038】

ポリペプチドの「機能変異体」は、それらが対応する本発明によるポリペプチドと本質的に同じ生物機能を有するという条件で、少なくとも約7～約1000個のアミノ酸、好ましくは少なくとも10個のアミノ酸、更に好ましくは少なくとも20個の、最も好ましくは少なくとも50個の、例えば少なくとも100個の、例えば少なくとも200個の、例えば少なくとも300個の、例えば少なくとも400個の、例えば少なくとも500個

の、例えば少なくとも600個のアミノ酸の長さを持つ、本発明によるポリペプチドの部分でもよい。それらに対応する本発明によるポリペプチドと本質的に同じ生物機能を有するという条件で、約1~30個の、好ましくは約1~15個の、特に約1~5個のアミノ酸の範囲の、本発明によるポリペプチドの欠損も含まれる。例えば第一のアミノ酸のメチオニンは、ポリペプチドの機能を著しく変化させることなく、非存在でありうる。また変異体には、翻訳後修飾、例えば脂質アンカーまたはホスホリル基が存在しても、非存在でもよい。

【0039】

「配列同一性」は、2つの配列の同一性の程度(同一性%)を指し、ポリペプチドの場合では、例えば、Filterがオフに設定され、BLOSUMは62である、BLAST P 2.0.1によって、核酸の場合では、例えばBLASTN 2.0.14によって決定可能である(Altschulら, 1997, Nucleic Acids Res., 25: 3389-3402)。

10

【0040】

「配列相同性」は、例えば、Filterがオフに設定され、BLOSUMは62であるBLASTP 2.0.1によって決定される、2つのポリペプチド配列の(陽性%)の類似性を指す(Altschulら, 1997, Nucleic Acids Res., 25: 3389-3402)。

【0041】

「肝臓障害」という用語は、好ましくは肝臓の構造、生理機能、代謝性、および/または遺伝子活性に影響を及ぼす、好ましくは新しい肝臓細胞の産生に、および/または全体またはその一部としての肝臓の再生に、好ましくは過渡的に、一時的に、慢性的に、または永久的に病理的方法で影響を及ぼすあらゆる種類の障害を指し、それを含む。好ましくは遺伝性肝臓障害および腫瘍性肝臓障害も含まれる。肝臓障害は、更に、好ましくは、外傷、特にアルコール、薬物、または食中毒による中毒、放射線、感染、胆汁鬱滞、免疫反応によって、および遺伝性代謝性肝臓疾患によって引き起こされた肝臓障害を含むことが理解される。肝臓障害の好ましい例は、肝硬変、アルコール性肝臓疾患、慢性肝炎、ウィルソン病、およびヘモクロマトーシスを含む。好ましくは、自己免疫反応が本発明による少なくとも1つのポリペプチドに対して向けられた、自己免疫障害も更に含まれる。本発明の意味の範囲内で、「肝臓障害」という用語は、好ましくは、肝臓癌、例えば肝細胞癌(HCC)、アデノーマなどの良性肝新生物および/またはFNHも意味する。好ましくはHCCは、好ましくは細胞内タンパク質封入体の特徴とする肝臓癌、脂肪肝を特徴とするHCC、および線維層状HCCを含めて、先に記載した障害のサブタイプを更に含む。例えば好ましくは前癌病巣、例えば肝細胞の細胞サイズの増大(「大細胞」変化)を特徴とするもの、および肝細胞の細胞サイズの縮小(「小細胞」変化)はもちろんのこと、マクロ再生(過形成)結節をも特徴とするものなどのものも含まれる(Anthony, P. in MacSweenら, 編 Pathology of the Liver.2001, Churchill Livingstone, Edinburgh)。

20

30

【0042】

本発明の意味の範囲内で「上皮癌」という用語は、肝臓以外のいずれかの器官、好ましくは肺、胃、腎臓、結腸、前立腺、皮膚、および乳房の腺癌を含み、一般に当業者に既知であるような標準診断手順によって識別される悪性腫瘍を発生させる、組織の上皮細胞成分が形質転換されるこれらの器官の障害を指す。

40

【0043】

本発明の意味の範囲内で「本発明による障害」という用語は、先に定義したような上皮癌および肝臓障害を含む。

【0044】

ポリペプチドの場合、「ポリペプチドのディファレンシャル発現」という用語は、参照サンプルまたは参照ライブラリーでのポリペプチドの発現と比較した、患者からの分離サンプル中のポリペプチドの発現の相対的なレベルを指す。発現は、一般に当業者に既知である方法によって判定できる。このような方法の例は、ポリペプチドに特異性の抗体を用いたポリペプチドの免疫組織化学または免疫プロットまたはELISA検出を含む。ポリペプチドを標識する遺伝子操作によるポリペプチドの検出およびモデル系での発現のため

50

に導入遺伝子内のポリペプチドに標識することによってなどの、モデル系における検出も、好ましくは含まれる。

【0045】

「サンプル」という用語は、肝臓組織または肝臓細胞、好ましくは悪性形質転換を受けた別の器官からの組織またはこの器官からの細胞、血液、血清、血漿、腹水、乳房水、脳脊髄液、唾液、尿、精液または糞を含む生体物質を指す。

【0046】

サンプルは、患者または別の対象者から、侵襲性または非侵襲性方法を含む方法によって分離できる。侵襲性方法は、一般に、当業者に既知であり、例えば穿刺によるサンプルの分離、切開した体からのまたは内視鏡器具によるサンプルの外科的除去を含む。最小限の侵襲性および非侵襲性方法も当業者に既知であり、例えば血液、血清、血漿、腹水、乳房水、および脳脊髄液、唾液、尿、精液、ならびに糞などの体液を収集することを含む。好ましくは、非侵襲性方法は、口、耳、鼻、直腸、尿道などの本来存在する体の開口部、および開放創以外の開口を通じて、患者または対象者の体に貫入または体を切開する必要がない。

10

【0047】

「最小限に侵襲的な」手順という語は、好ましくは麻酔を必要とせず、診療所またはクリニックで日常的に実施可能であり、有痛性でないか、または名目的のみに有痛性である、患者サンプル物質を得るための、一般に特に当業者によって既知である方法を指す。最小限の侵襲性手順の最も一般的な例は、静脈穿刺である。

20

【0048】

「参照サンプル」という用語は、患者から分離された所与のサンプル中での本発明による核酸および/またはポリペプチドのディファレンシャル発現を評価するために、適切な対照として作用するサンプルを指す；そのように適切な参照サンプルの選択は一般に、当業者に既知である。参照サンプルの例は、同じ患者の、または別の対象者からの非罹患器官または組織または細胞から分離されたサンプルを含み、ここで非罹患器官または組織または細胞は、肝臓組織または肝臓細胞、血液、あるいは先に記載したサンプルからなる群より選択される。肝臓障害を持つ患者から分離されたサンプルでの発現との比較のために、参照サンプルは、異なる患者の非罹患器官または組織または細胞から分離されたサンプルを含むことが可能であり、ここで肝臓障害組織または細胞は、先に挙げたサンプル群より選択される。その上、参照は、患者の年齢および性別に好ましくは一致した健常ドナーからのサンプルを含むことができる。

30

【0049】

「参照ライブラリー」という用語は、発現された遺伝子を表すライブラリーを指し、そのライブラリーは、好ましくは非罹患肝臓組織または細胞から作成される。参照は、非罹患肝臓組織または細胞からの mRNA から由来することが可能であり、核酸の非罹患組織発現に関するデータを含むデータベースを含むことができる。肝臓に障害のある患者から分離されたサンプル中での、本発明による核酸またはポリペプチドの発現の比較のために、参照ライブラリーは、肝臓障害に罹患した肝臓組織または細胞から作成された発現ライブラリーおよび核酸の肝臓障害特異性発現に関するデータを含むデータベースを含むことができる。

40

【0050】

「患者」という用語は、本発明の意味の範囲内で、生死にかかわらず動物、好ましくは哺乳類、およびヒトを含む。患者は、肝臓障害および/または他の上皮癌のどちらかを患っており、肝臓障害および/または他の上皮癌の状況で分析、予防措置、療法、および/または診断を受ける。

【0051】

「対象者」という用語は、本発明の意味の範囲内で、肝臓障害および/または他の上皮癌を患っておらず、それゆえ患者における本発明による核酸および/またはポリペプチドのディファレンシャル発現の判定用に好ましい適切な対照となる、生死にかかわらず動物

50

、好ましくは哺乳類、およびヒトを含む。

【0052】

「有効な処置」という用語は、本発明の意味の範囲内で、好ましくは本発明による少なくとも1つの障害から患者を治療する、および/または障害に関連する少なくとも1つの症候、好ましくは3つの症候、更に好ましくは5つの症候、最も好ましくは障害に関連する10個の症候に関して、患者の病理状態を；好ましくは過渡的、短期（ほぼ数時間～数日）、長期（ほぼ数週間、数ヶ月、または数年）または永続的ペースで改善する処置を指し、ここで、全体的な効果が対照患者と比較して症候の著しい改善である限り、病理状態の改善は、好ましくは、程度が一定であるか、上昇するか、下降するか、連続的に変化または変動する。治療有効性および毒性、例えばED₅₀およびLD₅₀は、細胞培養物または実験動物において標準薬理学的手順によって決定できる。治療効果と毒性効果の間の用量比は、治療指数であり、比LD₅₀/ED₅₀によって表現できる。大きい治療指数を示す医薬組成物が好ましい。用量は、処置される個々の患者の年齢、体重、および状態はもちろんのこと、投与経路、投薬形ならびに投薬計画、および所望の結果にも合わせて調節する必要があり、正確な投薬量はもちろん、医師が決定すべきである。

10

【0053】

実際の投薬量は、処置する障害の性質および重症度に依存し、医師の裁量の範囲内であり、所望の治療効果を生じさせるために、本発明の特定の状況に対する投薬量の滴定によって変化させることができる。しかしながら現在、個々の用量あたり活性成分約0.1～500mg、好ましくは約1～100mg、最も好ましくは約1～10mgを含む医薬組成物が治療上の処置に適していると考えられる。

20

【0054】

活性成分は、1日あたり1回または数回の投薬で投与できる。ある例において、満足な結果は、静脈内(i.v.)および経口(p.o.)による0.1μg/kgという低い投薬量で得ることができる。好ましい範囲は、0.1μg/kg/日～約10mg/kg/日i.v.および1μg/kg/日～約100mg/kg/日p.o.である。

【0055】

別の態様において、本発明は、配列番号1～9および/または配列番号47によるポリペプチド、またはその機能変異体を含む、融合タンパク質に関する。

【0056】

「融合タンパク質」は、配列番号1～9および/または配列番号47による少なくとも1つのポリペプチド、その機能変異体または部分および一般に当業者に既知である、共有または、例えば水素結合などの非共有結合によって本発明によるポリペプチドに結合されたポリペプチド、ペプチド、および/またはペプチド類似物質から選択された少なくとも1つの成分Aを含むポリペプチドを指す。融合タンパク質の成分Aの好ましい例は、融合タンパク質のより容易な検出を促進するポリペプチド、ペプチドおよび/またはペプチド類似物質である；これらは、例えば「緑色蛍光タンパク質」、またはその変異体である。「his-tag」などの組換えタンパク質の精製を促進する融合タンパク質、またはタンパク質の免疫原性を上昇させる融合物も含まれる。

30

【0057】

本発明による融合タンパク質は、当業者に一般に既知である方法によって生成できる。本発明による融合タンパク質は、肝臓障害および/または上皮癌の診断、防止、および/または処置に使用できる。

40

【0058】

最先端と比較すると、これらの融合タンパク質は、驚くべきことに、肝臓障害および/または上皮癌の改良された、より感受性の高い、より早期の、より高速な、および/または非侵襲性の診断および/または改良された、持続性の、および/またはより有効な処置を可能にする。

【0059】

本発明による好ましい核酸は、配列番号10～配列番号19の1つによる配列、または

50

その変異体を有する。特に本発明は、分離された本発明による核酸に関する。

【0060】

最先端と比較すると、これらの核酸およびポリペプチドは、驚くべきことに、改良された、より感受性の高い、容易で、より高速な、および/または非侵襲性の診断および/または改良された、持続性の、および/またはより有効な、肝臓障害および/または上皮癌の処置を可能にする。

【0061】

「本発明による核酸」という用語は、配列番号10～配列番号19に相当する核酸および/またはその変異体を指す。

【0062】

「コード化核酸」という用語は、本発明による分離可能な生物活性ポリペプチドまたはその前駆物質をコード化するDNA配列に関する。ポリペプチドは、例えばレセプタ活性などの生物機能が本質的に維持される限り、配列の全長またはコード化配列のいずれかの部分の配列によってコード化することができる(機能変異体を参照)。

【0063】

先に記載した核酸の配列中に例えば遺伝子コードの変性による小さな変化が存在しうること、またはコード化ポリペプチドの活性に著しい影響を及ぼすことなく、未翻訳配列を核酸の5'および/または3'末端に付着させられることが既知である。したがって本発明は、先に記載した核酸のいわゆる天然発生型および人工的に産生された「変異体」も含む。

【0064】

好ましくは、本発明によって使用された核酸は、DNAまたはRNA、好ましくはDNA、特に二本鎖DNAである。特に本発明による核酸は、RNA分子、好ましくは一本鎖または二本鎖RNA分子でもよい。核酸の配列は、少なくとも1つのイントロンおよび/または1つのポリA配列を更に含むことができる。

【0065】

本発明による核酸は、当業者に一般に既知である方法によって生成可能であり、以下でも詳細に説明されている。

【0066】

「変異体」は、本発明の意味の範囲内で、ストリンジェントな条件下で参照配列を用いてハイブリダイズし、本発明による対応するポリペプチドと同様の活性を有する、DNA配列に対して相補性であるすべてのDNA配列を指す。本発明による核酸も、そのアンチセンス配列の形で使用できる。

【0067】

核酸の「変異体」は、好ましくは80%、特に90%、最も好ましくは95%の配列同一性を備えた他の種からの相同体でもよい。

【0068】

核酸の「変異体」は、その部分が本発明による対応するポリペプチドと同様の活性を持つ限り、少なくとも約8ヌクレオチド長、好ましくは少なくとも約16ヌクレオチド長、特に少なくとも約21ヌクレオチド長、更に好ましくは少なくとも約30ヌクレオチド長、なお更に好ましくは少なくとも約40ヌクレオチド長、最も好ましくは少なくとも約50ヌクレオチド長を持つ、本発明による核酸の部分でもよい。このような活性は、先に記載した機能アッセイを用いてアッセイすることができる。

【0069】

本発明の好ましい実施態様において、核酸は、本発明による核酸に対して相補性である配列を有する核酸、またはその変異体を含む。好ましくは核酸は、本発明による核酸の非機能的突然変異体、またはその変異体を含む。

【0070】

特に本発明は、相補性配列を有する核酸に関し、そこで核酸は、アンチセンス分子またはRNA干渉分子である。

10

20

30

40

50

【0071】

「核酸の非機能的突然変異体」という用語は、核酸の非機能的突然変異体によってコード化されたポリペプチドが、非変異ポリペプチドと比較して著しく低下または消滅した生物活性を示すように変異された、本発明による核酸に由来する核酸、またはその変異体を指す。核酸の非機能的突然変異体によってコード化されたポリペプチドのこのような活性は、機能変異体の評価について先に記載したような機能アッセイによって判定できる。本発明による核酸に由来するこのような非機能的突然変異体の作成およびスクリーニングは、当業者に一般に既知である。このような本発明による「核酸の非機能的突然変異体」は、患者において発現させることが可能であり、リボソームによるポリペプチド内への翻訳のための未変性 mRNA 分子との競合によって、標的とされた核酸の発現レベルを好ましくは消滅または低下させるであろう。

10

【0072】

「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」は、ハイブリダイゼーションが、 $2.5 \times SSC$ 緩衝液中で 60 にて起こり、低い塩濃度の緩衝液中での 37 での多数の洗浄工程後に安定を保つ条件を指す。

【0073】

「核酸のディファレンシャル発現」という用語は、参照サンプルまたは参照ライブラリー中の核酸の発現と比較した、患者からの分離サンプル中の核酸の発現の相対レベルを指す。参照サンプルおよび参照ライブラリーの定義は、先に詳細に述べている。発現は、当業者に一般に既知である方法によって判定することができる。このような方法の例は、RNA プロット（ノザン）分析、ヌクレアーゼ保護、インサイチューハイブリダイゼーション、逆転写酵素 PCR（RT-PCR；定量的動態 RT-PCR を含む）を含む。cDNA およびオリゴヌクレオチド・マイクロアレイもこのような方法に含まれる。

20

【0074】

好ましい実施態様において、本発明による核酸は、非冗長性およびヒト EST Gen Bank 配列データベースからの重複配列の同定によって組立てられる、OBc11 cDNA（配列番号 10）である。組立てられた配列配列番号に対応する RNA の HCC での発現は、実験的に確認される。SSH cDNA クローンとして同定された非罹患肝臓に対する HCC においてアップレギュレートされた初期配列は、Gen Bank 配列 AL050205 に一致する。その配列の 5' 末端は AF131755 と重複する；この配列は、XM113703、AK055521 および AY004310 によって、5' にて進行的に伸長される。後者の 3 つの配列は、OBc11.pr（配列番号 1）をコード化する読取枠を含む。この mRNA 構築物を支持して、すべての重複 cDNA 配列を同じ染色体に局在化させることができる。更に約 6 キロ塩基対の mRNA を、HCC の RNA プロット分析によって同定したが、正常肝臓 RNA は、このクローンからの SSH 配列をハイブリダイゼーションプローブとして使用しなかった（図 4）。このクローンに対応する配列の発現は、肝臓または HCC において、これまでに報告されていない。

30

【0075】

好ましい実施態様において、本発明によるポリペプチドは、HCC 中で、非罹患肝臓（OBc11、配列番号 10）に対して平均 2.9 倍でアップレギュレートされることが確認された mRNA から驚くべきことに同定される、OBc11.pr ポリペプチド（配列番号 1）である（表 3A / 3B を参照）。このポリペプチドをエンコードし、この mRNA と重複する cDNA 配列は、逆転写酵素 PCR 分析にによって同定され、これらの核酸は HCC 中で同様に増加される。このポリペプチド配列は、HCC での増加レベルについて以前は認識されなかった。OBc11.pr ポリペプチドの配列から、2 つの保存配列ドメインが、BLAST 配列解析ツールによって利用できる保存ドメイン予測 CDD アルゴリズム（Altschulら, 1997, Nucleic Acids Res., 25: 3389-3402）；ループス La ポリペプチド型 RNA 結合ドメイン（配列番号 1、アミノ酸 47 ~ 125）、および機能が未知の GTPase 酵素ドメイン（配列番号 1、アミノ酸 90 ~ 203）を用いて同定できる。OBc11.pr 配列は Gen Bank 配列データベースで、細胞骨髄増殖性白血

40

50

病レセプタ (c-Mpl) 結合ポリペプチドに指定されている。骨髄増殖性白血病ウイルスレセプタ (トロンボポエチンレセプタとしても既知) の潜在的なモジュレーターであるが、このポリペプチドの機能的役割は、どの系においても説明されていない。同様に、このポリペプチドの発現パターンは開示されていない。このポリペプチドをコード化する mRNA は、発現プロファイリングを受けた肝臓腫瘍 21 例のうち 11 例で (52%)、非罹患肝臓に対して 2 倍超に増加される。このポリペプチドをコード化する mRNA は同様に、プロファイルされた限局性結節性過形成 (FNH) 4 例のうち 4 例で (100%)、少なくとも 2 倍に増加する (表 3 A / 3 B)。この核酸および本発明による他の核酸で、発現に関するこの値は、2 倍以上に増加しなかったサンプルからの値を含めて、cDNA マイクロアレイ発現プロファイリング実験を受けた HCC サンプル 21 個すべてからの発現値比を含む。

10

【0076】

この mRNA の発現は、分析された他の癌腫においても、肝臓、腎臓、胃、肺、皮膚、およびその他を含む非罹患組織においても発現が検出されないため、肝臓障害に著しく特異性である (表 6 を参照)。Obcl1 mRNA の発現レベルの独立した RT-PCR 分析は、配列番号 22 および配列番号 23 を含む遺伝子特異性オリゴヌクレオチドを用いて決定される。したがって驚くべきことに Obcl1.pr ポリペプチド (配列番号 1) およびポリペプチド (配列番号 10) をコード化する核酸それぞれの発現と、本発明による障害との間に、強力の特異性の相関があることが見出されている。したがって、ポリペプチドおよびコード化核酸は、本発明による障害の診断に、例えば過形成性 (腫瘍性を含む) 肝臓疾患と肝硬変との診断識別に利用できる。

20

【0077】

更にこの HCC 調節解除遺伝子の発現は、ヘパトーマ細胞の増殖と相関しており、静止細胞の血清刺激の 8 時間および 12 時間後にそれぞれ、Hep3B 細胞系において Obcl1 mRNA の 3.4 倍および 6.3 倍の増加を示す (図 8 を参照)。

【0078】

これらの結果は、Obcl1.pr ポリペプチド (配列番号 1) およびポリペプチド (配列番号 10) をコード化する核酸が、本発明による障害の防止および療法で、特に過形成性 (腫瘍性を含む) 肝臓疾患の処置に利用できることを証明する。処置に関して、Obcl1.pr ポリペプチドまたはポリペプチドをコード化する核酸の発現が、例えば Obcl1.pr ポリペプチドをコード化する核酸と特異的に相互作用するアンチセンスオリゴヌクレオチドまたは RNA 干渉分子を投与することによって、低減および / または阻害されるような処置を実施することが好ましい。あるいは、Obcl1.pr ポリペプチドの活性が、例えば Obcl1.pr ポリペプチドの活性を遮断する、Obcl1.pr ポリペプチドに対して作成された抗体またはその抗体断片を、このような処置を必要とする患者に投与することによって低減および / または阻害されるような処置を実施することができる。最先端と比較すると、この Obcl1.pr ポリペプチドおよび / または Obcl1 核酸は、驚くべきことに、肝臓障害および / または上皮癌の改良された、より感受性の高い、より早期の、より高速な、および / または非侵襲性の診断および / または改良された持続性の、および / またはより有効な処置を可能にする。

30

40

【0079】

別の好ましい実施態様において、本発明による核酸は、Obcl5.pr ポリペプチド (配列番号 2) をコード化するコンパイル配列である、Obcl5 核酸 (配列番号 11) である。

【0080】

配列全体は、多数の GenBank 発現配列タグ (EST) データベース配列および GenBank ゲノムデータベース配列から確立され、各セグメントは、HCC における発現について確認する。例えば cDNA マイクロアレイ上のこの核酸の配列は、非罹患肝臓参照に対して平均 24.7 倍に増加される (表 3 A / 3 B)。

【0081】

50

このクローンに対応する部分配列の発現は、複数の組織および一部の腫瘍（胎児肝臓、結腸腺癌を含み、そして肝臓に局在化する腫瘍転移において）で報告されているが、本発明による配列全体は、これまでに発表されていない。したがってO B c 1 5の増加した発現は、肝臓障害に対して完全に特異性である。O B c 1 5核酸も、推定ポリペプチドのコンパイル配列も、本発明による障害の好ましくはH C Cのレベル上昇が認識されていない。

【0082】

本発明によるこの配列およびすべての配列の発現に関する情報は、パブリック・ドメイン・データベース（Pub MedおよびSOURCEなど）の検索から得られる。本発明による配列のほとんどについて、雑誌記事は発表されていない。したがって自動配列決定cDNAライブラリーからのcDNAクローンの相対的存在量は、本発明によるこの配列および他の配列の発現に関して、本明細書で引用された証拠を提供する。この情報は、UniGene、Swiss-Prot、GeneMap99、RHdb、dbEST、GeneCards、およびLocus-Linkデータベースから管理されるデータを含む、「SOURCE」（スタンフォード大学遺伝子学部が提供）などのデータベース経由でアクセスできる。

【0083】

別の好ましい実施態様において、本発明によるポリペプチドは、この調節解除mRNA配列からの最大読み取り枠となるO B c 1 5 . p rポリペプチド（配列番号2）である。このポリペプチド配列は、特徴付けられたポリペプチドに対する、または既知の構造モチーフに対する、認識された配列相同性を含有しない。このポリペプチドの発現のパターンは記載されていない。このポリペプチドを潜在的にコード化するRNAの発現は、非罹患肝臓に対して検査されたH C C症例100%で2倍以上に、プロファイルされた21例のうち17例（81%）で8倍以上に増加する。非罹患肝臓に対するコード化mRNAの発現増加も、肝臓アデノーマ、FNH、および肝硬変肝臓において明白であるが、転写物は肝硬変において、あまり劇的にアップレギュレートされない。このポリペプチドをコード化するmRNAは、非罹患のヒト肺、脳（皮質）、結腸、精巣組織で検出できるが、評価した他の大半の癌腫では検出されない（表6）。O b c 1 5 RNAの発現レベルの独立RT-PCR分析は、配列番号24および配列番号25を含む遺伝子特異性オリゴヌクレオチドプライマーを用いて判定される。O B c 1 5 cDNAの高い発現特異性は、図2に示す正常組織および他の種の癌における発現パターンと比較して、H C C、FNHにおける定量評価（Q-PCR）によって確認される。参照遺伝子としてのGAPDHおよび-アクチンの両方の並列検査を利用したTaqMan手順は、非腫瘍性肝臓と比較して、H C CおよびFNHにおけるO B c 1 5 RNA（配列番号11）の大規模な過剰発現を確認する（図2）。これらのハウスキーピング遺伝子に関連して、Q-PCRは、正常肝臓と比較してO B c 1 5 RNAレベルが、肝臓癌およびFNHにおいて上昇することと、O B c 1 5 RNAレベルが他の組織において、および他の癌において、正常肝臓においてよりもはるかに低いことを明らかにする。TaqMan分析では、O B c 1 5発現は、配列番号66；配列番号67；および配列番号68（「加水分解」プローブ）を含む遺伝子特異性オリゴヌクレオチドプライマーによって決定した。

【0084】

更にインサイチュハイブリダイゼーション分析は、O B c 1 5 RNAを用いて特異的にハイブリダイズするラジオアイソトープ標識O B c 1 5 RNAアンチセンスプローブを利用することにより、正常肝臓組織切片の限界シグナルに対して、H C CにおけるO B c 1 5 RNAの局在化を明確に示す（図5）。

【0085】

したがってポリペプチドおよび/またはコード化RNAの過剰発現は、肝臓障害の診断に有用である。これらの結果は、O B c 1 5 . p rポリペプチドならびにポリペプチド（配列番号11）をコード化する核酸およびその機能変異体が、本発明による障害の、特にH C C、肝臓アデノーマ、FNH、および肝硬変の診断、防止、および処置に利用できる

10

20

30

40

50

ことを明確に証明する。

【0086】

処置に関して、OBc15 . pr ポリペプチドおよび/またはその機能変異体の ; あるいはポリペプチドをコード化する核酸および/またはその機能変異体の発現が、例えばOBc15 . pr ポリペプチドを潜在的にコード化する、配列番号11で定義された核酸および/またはその機能変異体と特異的に相互作用するアンチセンスオリゴヌクレオチドまたは低分子干渉RNA分子を投与することによって、低減および/または阻害されるような処置を実施することが好ましい。

【0087】

あるいは、処置は、OBc15 . pr ポリペプチドおよび/またはその機能変異体の活性が、例えばOBc15 . pr ポリペプチドおよび/またはその機能変異体の活性を遮断する、OBc15 . pr ポリペプチドおよび/またはその機能変異体に対して作成された抗体、あるいはその抗体断片をこのような処置を必要とする患者に投与することによって、低減および/または阻害されるような処置を実施することができる。最先端と比較すると、OBc15 . pr ポリペプチドおよび/またはその機能変異体 ; および/またはOBc15 核酸は、驚くべきことに、肝臓障害および/または上皮癌の改良された、より感受性の高い、より早期の、より高速な、および/または非侵襲性の診断および/または改良された持続性の、および/またはより有効な処置を可能にする。

【0088】

詳細な配列分析は、OBc15 mRNA と他の真核非コード化RNA との配列類似性を明らかにした。加えて、このRNA からのタンパク質生成物を検出するための多様な方法による複数の試みは、このような生成物を明らかにしていない。したがって、このRNA は、ポリペプチドに翻訳されないが、機能(例えば調節)特性自体を有することができる。非コード化調節RNA の疾患関連性は、例えば真核生物ショウジョウバエにおける細胞増殖に関する非コード化RNA 「ban - tam」の役割によって(Brennecke J, Hipfner DR, Stark A, Russell RB, Cohen SM. Cell(2003)Apr4; 113(1): 25-36)、そして神経分化 t - 4 を阻害するために転写因子 HES - 1 と相互作用するマイクロRNA - 23 (Kawasaki, H. and Tiara, K. Nature(2003)423: 838-842) によって証明されるように、今や明白になってきている。

【0089】

低分子干渉RNA (siRNA) オリゴヌクレオチドを用いたヒト肝臓癌細胞の増殖におけるOBc15 RNA のレベルの低下(ノックダウン)は、肝臓障害、特に肝臓癌におけるOBc15 RNA の発現増加のための機能的に重大な役割を裏付けている。この実験において、腫瘍サプレッサ遺伝子網膜細胞芽腫タンパク質1 (RB1) をコード化するmRNA のレベルは、先に記載したようにTaqMan Q - PCR によって決定されたOBc15 RNA のレベルを減少させると同時に、数倍にアップレギュレートされる。RB1 mRNA レベルは、プライマーRB1 - p1 (配列番号64) およびRB1 - p2 (配列番号65) を用いて、SYBR グリーン定量PCR 分析によって決定する。したがってRB1 の負の調節によって、HCC におけるOBc15 RNA の発現増加は、腫瘍細胞増殖を促進する(図6)。

【0090】

なお別の好ましい実施態様において、本発明による核酸は、IK2 . pr ポリペプチド(配列番号3) をコード化する読み取り枠を含む、Gene Bank 配列NM025160 によって表されるIK2 核酸(配列番号12) である。IK2 . pr ポリペプチドは、本発明の別の実施態様である。このクローンに対応するEST 配列は、肝臓を含む複数の組織からのcDNA ライブラリーで、および腺癌で報告されているが、配列は、これまでにHCC に関与していない。このポリペプチドの発現は、どの細胞または組織でも述べられていない。ポリペプチド配列は、既知の機能を有していないが、配列は進化的によく保存される(予測ポリペプチドは、複数の哺乳類、ショウジョウバエ(Drosophila) および植物(シロイヌナズナ、Arabidopsis) に見出される)。CDD アルゴリズムは、本発

10

20

30

40

50

明によるこのポリペプチド配列における複数のWD40型ポリペプチド-ポリペプチド相互作用ドメインを予測する。HCC患者からの肝臓サンプルにおいて、このポリペプチドをコード化するRNAの発現は、驚くべきことに、非罹患肝臓に対して、プロファイルした21例のうち15例(71%)で平均値4.67倍に増加した。非罹患肝臓に対するコード化mRNAの発現増加も、肝硬変肝臓において明らかである(表3A/3B)。非罹患肝臓に対する、このペプチドをコード化するmRNAの最高のディファレンシャル発現レベルは、FNHで観察される;プロファイルされた4例のうち4例で8倍のアップレギュレーション。このポリペプチドをコード化するmRNAも、乳腺、肺および腎臓の癌腫を含む複数の他のヒト癌腫で、および検査した非罹患ヒト組織17個の2個(乳房および腎臓)で発現される。IK2 mRNAの発現レベルの、独立したRT-PCR分析は、配列番号26および配列番号27を含む遺伝子特異性オリゴヌクレオチドプライマーを用いて決定された。

10

【0091】

これらの結果は、このポリペプチドおよび/またはコード化mRNAの過剰発現が、本発明による障害の診断、防止、および処置に、特にHCC、FNH、肝硬変、および上皮由来新生物の診断に利用できることを証明する。処置に関して、IK2-prポリペプチドの、またはポリペプチドをコード化する核酸の発現が、IK2-prポリペプチドをコード化する核酸と特異的に相互作用するアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはRNA干渉分子を投与することによって、低減および/または阻害されるような処置を実施することが好ましい。あるいは、IK2-prポリペプチドの活性が、例えばIK2-prポリペプチドの活性を遮断する、IK2-prポリペプチドに対して作成された抗体またはその抗体断片をこのような処置を必要とする患者に投与することによって、低減および/または阻害されるような処置を実施することができる。最先端と比較すると、このIK2-prポリペプチドおよび/またはIK2核酸は、驚くべきことに、肝臓障害および/または上皮癌の改良された、より感受性の高い、より早期の、より高速な、および/または非侵襲性の診断および/または改良された持続性の、および/またはより有効な処置を可能にする。

20

【0092】

なお別の好ましい実施態様において、本発明による核酸は、HCC調節解除cDNAクローンの配列となる、IK5核酸(配列番号13)である。このクローンに対応する配列の発現は、複数の組織(肝臓を含む)および一部の腫瘍(下垂体および前立腺を含む)で報告されているが、配列がHCCでアップレギュレートされることは、これまでに発表されていない。好ましい実施態様において、本発明によるポリペプチドは、IK5cDNA(配列番号13)によってコード化されるIK5-prポリペプチド(配列番号4)である。ポリペプチド配列は、GenBankデータベース(アクセッション番号:NM006407)から、JWA、ビタミンA反応性ポリペプチドとして推定される。この推定ポリペプチドをコード化する遺伝子は、ビタミンAを用いた培養細胞のシミュレーションから説明されているが、ポリペプチドの存在は、いずれの細胞または組織においても説明されておらず、機能は不明である。JWAは、更に、GenBankデータベースで細胞骨格関連ポリペプチドとして述べられている。ポリペプチドは、EAC1グルタメートトランスポータと特異的に相互作用し、その活性を低減させるげっ歯類ポリペプチドとの相同性も共有する。この配列の保存ドメイン検索は、Gタンパク質情報伝達分子との相互作用を恐らく仲介する、プレニル化rabアクセプタ1ドメイン(PRA1)の考えられる存在を示す。このポリペプチドをコード化するmRNAの発現は、プロファイルした100%のHCC症例において非罹患肝臓に対して、平均9.14倍増加した。同様にコード化mRNAの発現増加も、アデノーマおよびFNHにおいて明らかである。コード化mRNA発現は、肝硬変肝臓においても、他の肝臓障害よりも低い程度でディファレンシャルに発現される。このポリペプチドをコード化するmRNAは、肺、腎臓、および結腸ヒト癌腫で発現されるが、検査した非罹患ヒト組織17例のうち1例のみである。IK5 mRNAの発現レベルの独立したRT-PCR分析は、配列番号28および配列番号29を

30

40

50

含む遺伝子特異性オリゴヌクレオチドプライマーを用いて決定される。このポリペプチドおよび/またはコード化mRNAの過剰発現は、肝臓癌を含む特異性上皮由来新生物を示すことができる。これらの結果は、IK5cDNA配列のディファレンシャルにアップレギュレートされた発現が、本発明による障害に対して高度に特異性であることを示す。

【0093】

更にこのHCC調節解除遺伝子の発現は、肝臓癌細胞の増殖と相関しており、静止細胞の血清刺激の8時間および12時間後それぞれで、Hep3B細胞系におけるIK5 mRNAの10.9倍および4.3倍の増加を示す(図8を参照)。

【0094】

したがって、IK5.prポリペプチドおよび/またはコード化核酸は、本発明による障害の診断、防止、および処置に、特にHCC、アデノーマ、FNH、肝硬変、および上皮由来新生物の診断に利用できる。処置に関して、IK5.prポリペプチドまたはポリペプチドをコード化する核酸の発現が、IK5.prポリペプチドをコード化する核酸と特異的に相互作用するアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはRNA干渉分子を投与することによって、低減および/または阻害されるような処置を実施することが好ましい。あるいは、IK5.prポリペプチドの活性が、例えばIK5.prポリペプチドの活性を遮断する、IK5.prポリペプチドに対して作成された抗体またはその抗体断片をこのような処置を必要とする患者に投与することによって低減および/または阻害されるような処置を実施することができる。最先端と比較すると、このIK5.prポリペプチドおよび/またはIK5核酸は、驚くべきことに、肝臓障害および/または上皮癌の改良された、より感受性の高い、より早期の、より高速な、および/または非侵襲性の診断および/または改良された持続性の、および/またはより有効な処置を可能にする。

【0095】

なお別の好ましい実施態様において、本発明による核酸は、DAP3.prポリペプチド(配列番号5)をコード化する、以前に開示された(アクセッション番号X83544)DAP3核酸(配列番号14)である。本発明は、更に、培養細胞中で過剰発現された場合にアポトーシス細胞死の促進に関与してきた、死関連ポリペプチド3(DAP3、配列番号5)に関する(Kissilら, 1995, J.Biol.Chem., 270: 27932-6)。

【0096】

ポリペプチドは、ミトコンドリア28Sリボソーム複合体に寄与する。そのため、このポリペプチドは、明らかに比較的低いレベルであるにかかわらず、すべてではないが多くの組織および細胞において遍在的に発現されやすい。内在性DAP3の特異的機能は述べられていない(Cadvar Kocら, 2001, FEBS Lett., 492: 166-170)。DAP3 mRNAのダウンレギュレーションは、肝臓における結腸腺癌転移で述べられているが(PECT/US01/30589)、DAP3核酸もDAP3ポリペプチドも本発明による障害、好ましくはHCCのレベル上昇に関して認識されていない。

【0097】

精製ゲノムDNAの定量RT-PCR(Q-PCR)増幅分析は、HCC10例のうち8例で約4~6コピーを持つ肝臓癌でのDAP3遺伝子増幅を示唆し、そして非腫瘍性肝臓サンプル13例(腫瘍近位および遠位肝硬変組織を含む)のうち13例で増幅を示唆しない。これらの分析は、DAP3ゲノムDNAの相対量を正確に定量するために、プライマーDAP3-p5(配列番号71)、DAP3-p6(配列番号72)および加水分解プローブDAP3-p-7(配列番号73)を用いて、TaqMan手順によって実施する。実際にDAP3遺伝子は、HCCにおいて増幅されることが頻繁に見出せる領域である、染色体1qに位置する(Buendia MA., Med Pediatr Oncol.(2002)Nov; 39(5): 530-5)。この発見は、遺伝子増幅として現れた正の選択力がHCCにおけるDAP3 RNAを過剰発現させ、HCCにおけるDAP3の機能的に重要な役割を支持することを示唆している。

【0098】

このポリペプチドをコード化するmRNAの発現は、プロファイルしたHCC21例の

うち18例(86%)で、非罹患肝臓に対して平均5.5倍増加する。コード化mRNAの発現増加は、HCCにおいてよりも低い程度であるが、他の肝臓障害においても明らかである。DAP3 mRNAの発現レベルの独立したRT-PCR分析は、配列番号30および配列番号31を含む遺伝子特異性オリゴヌクレオチドプライマーを用いて決定される。正常肝臓と比較してHCCで増加したDAP3 mRNAは、参照遺伝子として - アクチンを使用したSYBRグリーン技法を用いてQ-PCR分析によって更に確認される。検査したHCC5例それぞれから分離したRNAにおいて、DAP3 mRNA対 - アクチンmRNAのレベル比は、正常肝臓サンプル2例から分離したRNAでのこれらの比と比較して上昇した(平均HCC比 DAP3 mRNA対 - アクチンmRNA = 12.8 ; 平均正常肝臓比 DAP3 mRNA対 - アクチンmRNA = 1.03)。DAP3 mRNAレベルのQ-PCR分析は、配列番号69および配列番号70を含む遺伝子特異性オリゴヌクレオチドプライマーを用いたSYBRグリーン分析によって決定する。

10

【0099】

DAP3タンパク質の発現は、分析した他の癌腫においても、肝臓、腎臓、胃、肺、皮膚、およびその他を含む非罹患組織においても、発現は非常に低いか、検出されないため、HCCでは非常に特異的にアップレギュレートされる。HCCでのDAP3の他の機能的関与は、正常肝臓と比較した、そして他の正常および罹患組織と比較した、HCCでのDAP3タンパク質発現レベルの特異的上昇によって更に裏付けられる(表6および図7を参照)。低分子干渉RNA分子(sRNA; 配列番号54および配列番号55)を用いた肝臓癌細胞におけるDAP3 mRNAの実験的低減は、肝臓癌細胞の劇的な形態的および明らかな生化学的变化を生じるため、細胞は増大し、そして処置細胞からの標準方法によるRNAおよびタンパク質抽出は不可能である。これらの発見は、更に、HCCでのDAP3増加の機能的重要性を裏付ける。

20

【0100】

これらの結果は、DAP3 cDNA配列の、およびDAP3 pr. ポリペプチドの強力にアップレギュレートされた発現が、本発明による障害、特にHCCで非常に特異的であることを示す。したがってDAP3ポリペプチドおよび/またはコード化核酸は、本発明による障害の診断、防止、および処置に、特にHCCの診断に利用できる。処置に関して、DAP3ポリペプチドまたはポリペプチドをコード化する核酸の発現が、例えばDAP3ポリペプチドコード化する核酸と特異的に相互作用するアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはRNA干渉分子を投与することによって、低減および/または阻害されるような処置を実施することが好ましい。あるいは、DAP3ポリペプチドの活性が、DAP3ポリペプチドの活性を遮断する、DAP3ポリペプチドに対して作成された抗体またはその抗体断片をこのような処置を必要とする患者に投与することによって、低減および/または阻害されるような処置を実施することができる。最先端と比較すると、このDAP3ポリペプチドおよびDAP3核酸は、驚くべきことに、肝臓障害および/または上皮癌の改良された、より感受性の高い、より早期の、より高速な、および/または非侵襲性の診断および/または改良された持続性の、および/またはより有効な処置を可能にする。

30

【0101】

別の好ましい実施態様において、本発明は、HCCアップレギュレートLOC5. pr 仮説的ポリペプチド(配列番号6)およびポリペプチドをコード化する核酸LOC5(配列番号15)に関する。このmRNAに対応するcDNAは、肝臓を含む複数のヒト組織からのcDNAライブラリーで同定されているが(上述したSOURCEデータベースからの情報)、配列が本発明による障害、特にHCCでアップレギュレートされることは、これまでに報告されていない。このmRNAの発現は、プロファイルしたHCC症例の71%で非罹患肝臓に対して5倍増加する(表3B)。同様の分析が、このcDNAマイクロアレイ発現プロファイリング手順を受けたFNHおよび大多数の肝硬変肝臓における、このmRNAの発現増加を明らかにする。mRNAは、他のヒト胃腸管癌腫で発現されるが、検査した非罹患ヒト組織17例では脳および骨髄においてのみである。LOC5 mRNAの発現レベルの独立したRT-PCR分析は、配列番号32および配列番号33を含

40

50

む遺伝子特異性オリゴヌクレオチドプライマーによって決定される。LOC5.p r (配列番号6)は、予測された30kDaポリペプチド(GenBankデータベースで、アクセッション番号NP_060917.1)である。このポリペプチドの存在は、どの細胞または組織でも述べられていない。この予測されたポリペプチドにはどの機能も説明されておらず、CDDドメインアルゴリズムを用いた検索から、保存ドメインは明らかになっていない。これらの結果は、LOC5 cDNA配列の強力にアップレギュレートされた発現が、本発明による障害、特にHCC、FNH、および多数の肝硬変肝臓で非常に特異的であることを示す。更に、このHCC調節解除遺伝子の発現は、肝臓癌細胞の増殖と関連しており、静止細胞の血清刺激の8時間および12時間後それぞれで、Hep3B細胞系におけるLOC5 mRNAの3.7倍および8.8倍の増加を示す(図8を参照)。

10

【0102】

したがってLOC5.p rポリペプチドおよび/またはその機能変異体および/またはコード化核酸および/またはその変異体は、本発明による障害の診断、防止、および処置に、特にHCC、FNH、および多数の肝硬変肝臓の診断に利用できる。処置に関して、LOC5.p rポリペプチドまたはポリペプチドをコード化する核酸の発現が、LOC5.p rポリペプチドをコード化する核酸と特異的に相互作用するアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはRNA干渉分子を投与することによって、低減および/または阻害されるような処置を実施することが好ましい。あるいは、LOC5.p rポリペプチドの活性が、例えばIK5.p rポリペプチドの活性を遮断する、LOC5.p rポリペプチドに対して作成された抗体またはその抗体断片をこのような処置を必要とする患者に投与することによって、低減および/または阻害されるような処置を実施することができる。最先端と比較すると、このLOC5.p rポリペプチドおよび/またはLOC5核酸は、驚くべきことに、肝臓障害および/または上皮癌の改良された、より感受性の高い、より早期の、より高速な、および/または非侵襲性の診断および/または改良された持続性の、および/またはより有効な処置を可能にする。

20

【0103】

更に好ましい実施態様において、本発明は、本発明によるSEC14L2.p rポリペプチド(配列番号7)をコード化するSEC14L2核酸cDNA(配列番号16)に関する。SEC14L2 mRNAの発現は、多くの組織で述べられているが、このメッセージまたはコード化ポリペプチドの増加は、本発明による障害、特に肝臓障害または癌においては、これまでに報告されていない。SEC14L2.p r(配列番号7)は、酵母secポリペプチド14のヒト相同体である。酵母分泌経路に関与するが、ポリペプチドまたはその相同体の明確な機能は、どの種でも述べられていない。このヒト配列は、トコフェロールに結合することも示唆されており、このポリペプチドがスクアレン転移、コレステロール生合成または、更に一般に細胞内輸送に関与することが予測されてきた(Zimmerら, 2000, J.Biol.Chem.275: 25672-25680)。このポリペプチド配列の発現は、ヒト細胞または組織では報告されていない。ポリペプチド配列は、考えられるGポリペプチド結合およびホスホチジルイノシトール転移ドメインおよびコンセンサスCRALTRIOドメインを含む。後者は、シス-レチナルCRALモチーフを介してビタミン結合に関与してきた。このポリペプチドをコード化するmRNAは、HCCサンプルの71%において、プロファイルしたFNH疾患サンプルすべてにおいて、非罹患肝臓に対して5.14倍以上の平均に増加するが、肝硬変サンプルのわずか半分のアデノーマでは増加しない(表3A/3B)。このポリペプチドをコード化するmRNAの発現は、腎臓および結腸癌腫および正常な膵臓において検出されたが、検査した他の正常組織では検出されなかった(表6)。SEC14L2 mRNAの発現レベルの独立したRT-PCR分析は、配列番号34および配列番号35を含む遺伝子特異性オリゴヌクレオチドプライマーによって決定する。更にこのHCC調節解除遺伝子の発現は、肝臓癌細胞の増殖に関連しており、静止細胞の血清刺激の8時間および12時間後それぞれで、Hep3B細胞系におけるSEC14L2 mRNAの10.6倍および1.9倍の増加を示す(図8を参照)。

30

40

【0104】

50

これらの結果は、SEC14L2 cDNA配列の強力にアップレギュレートされた発現が、本発明による障害、特にHCCおよびFNHで非常に特異的であることを示す。したがって、SEC14L2 . prポリペプチドおよび/またはコード化核酸は、本発明による障害の診断、防止、および処置、特にHCC、FNHおよび好ましくは肝硬変の診断にも利用できる。処置に関して、SEC14L2 . prポリペプチドまたはポリペプチドをコード化する核酸の発現が、SEC14L2 . prポリペプチドをコード化する核酸と特異的に相互作用するアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはRNA干渉分子を投与することによって、低減および/または阻害されるような処置を実施することが好ましい。あるいは、SEC14L2 . prポリペプチドの活性が、例えばSEC14L2 . prポリペプチドの活性を遮断する、SEC14L2 . prポリペプチドに対して作成された抗体またはその抗体断片をこのような処置を必要とする患者に投与することによって、低減および/または阻害されるような処置を実施することができる。最先端と比較すると、このSEC14L2 . prポリペプチドおよび/またはSEC14L2核酸は、驚くべきことに、肝臓障害および/または上皮癌の改良された、より感受性の高い、より早期の、より高速な、および/または非侵襲性の診断および/または改良された持続性の、および/またはより有効な処置を可能にする。

10

【0105】

更に好ましい実施態様において、本発明は、多くの組織および腫瘍で述べられている、SSP29 . prまたはAPRILポリペプチドをコード化する核酸(配列番号17)に関する。この推定腫瘍壊死ファミリメンバをコード化する遺伝子において、本発明による障害、特にHCCにおいて上昇したレベルで発現されることは、これまでに報告されていない。更に本発明は、本発明による核酸(配列番号17)によってコード化された銀染色29 kDaポリペプチド(SSP29 . pr; 配列番号8)に関する。ポリペプチドは、TNFサイトカインファミリに属すると考えられる、ロイシンリッチ分泌ポリペプチドとして同定されている。それはAPRIL(ロイシンが豊富な酸性ポリペプチド)としても既知であり、抗原仲介細胞反応に関与するロイシン・リッチ・リピート(LRR)をN末端付近に含有する(Zhuら, 1997, Biochem.Mol.Biol.Int.42: 927-935; Mencingerら, 1998, Biochim.Biophys.Acta 1395: 176-80)。SSP29 . prポリペプチドの発現は、ヒト細胞または組織においては報告されていない。このポリペプチドをコード化するmRNAは、プロファイルされたHCC21例のうち17例で、非罹患肝臓に対して平均3.77倍に増加する。驚くべきことに、このポリペプチドをコード化するmRNAのレベルは、非罹患肝臓のプールよりも、銅毒性によって引き起こされた肝硬変において30倍高い(表3A/3B)。mRNAレベルは、プロファイルされた他の肝臓障害において、非罹患肝臓に対してわずかに上昇し、このmRNAはそうでなければ、ここで発現プロファイリングを受けた正常および罹患組織においてまれにのみ検出される。SSP29 mRNAの発現レベルの独立したRT-PCR分析は、配列番号36および配列番号37を含む遺伝子特異性オリゴヌクレオチドプライマーによって決定される。更にこのHCC調節解除遺伝子の発現は、肝臓癌細胞の増殖に相関しており、静止細胞の血清刺激の8時間および12時間後それぞれで、Hep3B細胞系におけるSSP29 mRNAの2.4倍および4.3倍の増加を示す(図8を参照)。これらの結果は、SSP29 cDNA配列の強力にアップレギュレートされた発現が、本発明による障害、特にHCC、およびある種の肝硬変疾患で非常に特異的であることを示す。

20

30

40

【0106】

したがってSSP29 . prポリペプチドおよび/またはコード化核酸は、本発明による障害の診断、防止、および処置、特にHCCおよび肝硬変の診断に利用できる。処置に関して、SSP29 . prポリペプチドまたはポリペプチドをコード化する核酸の発現が、SSP29 . prポリペプチドをコード化する核酸と特異的に相互作用するアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはRNA干渉分子を投与することによって、低減および/または阻害されるような処置を実施することが好ましい。あるいは、SSP29 . prポリペプチドの活性が、例えばSSP29 . prポリペプチドの活性を遮断する、SSP29 .

50

p r ポリペプチドに対して作成された抗体またはその抗体断片をこのような処置を必要とする患者に投与することによって、低減および/または阻害されるような処置を実施することができる。最先端と比較すると、このSSP29 . p r ポリペプチドおよび/またはSSP29核酸は、驚くべきことに、肝臓障害および/または上皮癌の改良された、より感受性の高い、より早期の、より高速な、および/または非侵襲性の診断および/または改良された持続性の、および/またはより有効な処置を可能にする

【0107】

なお別の好ましい実施態様において、本発明は、HS16核酸(配列番号18)に関する。HS16 mRNAに対応するcDNAクローンは、結腸の腺癌を含む複数の組織で同定されているが、このmRNAも、コード化ポリペプチド(HS16 . p r、配列番号9)も、これまでに本発明による障害、特に肝臓障害またはHCCに關与していない。本発明は、更に、HS16をコード化するポリペプチドであって、16 . 7 kDaの推定ポリペプチド(配列番号9 ; GenBankデータベースでアクセッション番号NP_057223)に関する。ポリペプチドの存在は、いずれの細胞または組織においても説明されておらず、その機能は述べられていないし、機能ドメインもCDDアルゴリズムによって同定されない。このポリペプチドをコード化するmRNAは、すべて非罹患肝臓に対して、検査したHCC8例で少なくとも2 . 8倍以上に、そして検査した追加のHCCサンプル4例ではほぼ2倍に増加する(表3A / 3B)。HS16 mRNAの発現レベルの独立したPT-PCR分析は、配列番号38および配列番号39を含む遺伝子特異性オリゴヌクレオチドプライマーを用いて決定される。これらの結果は、HS16 cDNA配列の強力にアップレギュレートされた発現が、本発明による障害、特にHCCに対して高度に特異性であることを示す。

【0108】

したがってHS16 . p r ポリペプチドおよび/またはコード化核酸は、本発明による障害の診断、防止、および処置に、特にHCCの診断に利用できる。処置に関して、HS16 . p r ポリペプチドまたはポリペプチドをコード化する核酸の発現が、例えば、HS16 . p r ポリペプチドをコード化する核酸と特異的に相互作用するアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはRNA干渉分子を投与することによって、低減および/または阻害されるような処置を実施することが好ましい。あるいは、HS16 . p r ポリペプチドの活性が、例えばHS16 . p r ポリペプチドの活性を遮断する、HS16 . p r ポリペプチドに対して作成された抗体またはその抗体断片をこのような処置を必要とする患者に投与することによって、低減および/または阻害されるような処置を実施することができる。最先端と比較すると、このHS16 . p r ポリペプチドおよび/またはHS16核酸は、驚くべきことに、肝臓障害および/または上皮癌の改良された、より感受性の高い、より早期の、より高速な、および/または非侵襲性の診断および/または改良された持続性の、および/またはより有効な処置を可能にする。

【0109】

好ましい実施態様において、本発明による核酸は、非冗長性GenBank配列データベースからの重複配列の同定によって組立てられた、IK3 cDNA(配列番号19)である。cDNAマイクロアレイ分析を用いて同定された、非罹患肝臓に対してHCCでアップレギュレートされた初期配列は、GenBankデータベースの胎児脳cDNA(AL049338)に一致する。その配列は、XM_131462(配列番号47) ; タンパク質チロシンホスファターゼレセプターD型(PTPRD)をコード化するマウスcDNAと重複する。このマウスPTPRDは、ヒトPTPRD転写単位と非常に相同であり、この肝臓癌調節解除RNAと相同がある領域は、このヒトPTPRD転写ユニット配列内に見出されない。したがって、このHCC調節配列が、ヒトPTPRDをコード化することは、まだ述べられていない。あるいは、提供されたデータベース配列は、読み取り枠の欠失を説明するエラーを含むことがある。更に別の代案は、コード化されたポリペプチドがこの配列内の小型読み取り枠の1つから生じることである。また、このRNAは、ポリペプチドに翻訳されないが、機能(例えば調節)特性自体を持つことができる。

【0110】

驚くべきことに、この mRNA からの配列は、正常なヒトの肝臓よりも、HCC ではるかに高いレベルで表現される。さもなければ、この RNA は、正常な脳、骨格筋、前立腺、および肝臓において低レベルでのみ発現される。この mRNA は、プロファイルされた HCC サンプル 21 例中 12 例 (57%) で、非罹患肝臓に対して、平均 3.81 倍以上に増加する。IK3 はまた、検査した FNH 4 例のうち 3 例で、アデノーマで、および検査した肝硬変サンプル 6 例のうち 5 例で、非罹患肝臓に対して 2 倍以上に増加する (表 3A / 3B)。IK3 mRNA の発現レベルの独立した RT-PCR 分析は、配列番号 40 および配列番号 41 を含む遺伝子特異性オリゴヌクレオチドプライマーによって決定される。これらの結果は、IK3 cDNA 配列の強力にアップレギュレートされた発現が、本発明による障害、特に HCC、FNH、アデノーマ、および肝硬変で非常に特異的であることを示す。

10

【0111】

したがって、IK3 ポリペプチドおよび / またはその機能変異体、および / またはコード化核酸、および / またはその変異体は、本発明による障害の診断、防止、および処置、特に HCC、FNH、アデノーマ、および肝硬変の診断に利用できる。処置に関して、IK3 によってコード化されるポリペプチドまたは IK3 核酸の発現が、例えば IK3 核酸と特異的に相互作用するアンチセンスオリゴヌクレオチドまたは RNA 干渉分子を投与することによって、低減および / または阻害されるような処置を実施することが好ましい。あるいは、IK3 ポリペプチドの活性が、例えば IK3 ポリペプチドの活性を遮断する、IK3 ポリペプチドに対して作成された抗体またはその抗体断片をこのような処置を必要とする患者に投与することによって、低減および / または阻害されるような処置を実施することができる。最先端と比較すると、この IK3 核酸は、驚くべきことに、肝臓障害および / または上皮癌の改良された、より感受性の高い、より早期の、より高速な、および / または非侵襲性の診断および / または改良された持続性の、および / またはより有効な処置を可能にする。

20

【0112】

HCC を含むヒト肝臓障害からの組織において評価された、本発明による配列の非罹患肝臓参照サンプルの cDNA 発現レベルを、独立した 2 セットの実験を表示する表 3A / 3B に示す。表 3B の値は、発現レベルの \log_2 比を示すのに対して、表 3A は、特注 cDNA マイクロアレイへの競合ハイブリダイゼーションから得た、罹患サンプルと非罹患サンプルの間の非形質転換データである。HCC = 肝細胞癌サンプル; HCC (IHB) = HCC サンプルを含むイントラヒアリン体; FNH = 限局性結節性過形成サンプル; Cirrh = 肝硬変サンプル。グループ (HCC、FNH および Cirrh) ごとに各配列 (配列番号 10 ~ 19) の平均; 中央値 (値の 50 番目のパーセンタイル) および値の標準偏差が与えられる。

30

【0113】

【表 3】

表3A: cDNAマイクロアレイ発現レベル比(比形質転換値)

疾患サンプル ↓	OBcl1 配列番号 10	OBcl5 配列番号 11	IK2 配列番号 12	IK5 配列番号 13	DAP3 (A) 配列番号 14	DAP3 (B) 配列番号 14	LOC5 配列番号 15	SEC14L2 配列番号 16	SSP29 配列番号 17	HS16 配列番号 18	IK3 配列番号 19
HCC11	4.0	27.7	2.4	8.8	2.2	4.7	1.0	15.6	2.0	1.1	1.5
HCC12	1.5	38.2	1.1	11.5	3.1	6.5	4.3	14.0	3.8	1.9	2.1
HCC13	1.4	44.6	7.8	6.7	7.3	9.3	7.1	3.3	2.1	1.8	2.8
HCC15	2.6	30.5	1.4	3.7	23.9	3.3	5.8	3.9	8.6	1.9	1.7
HCC1	2.4	40.5	7.6	9.6	1.8	2.4	7.0	9.4	5.6	1.6	12.8
HCC27	11.6	11.8	4.2	2.5	6.2	2.5	8.2	4.6	5.0	9.2	7.1
HCC29	10.9	22.9	13.5	3.9	6.7	7.6	5.4	1.9	7.0	4.7	3.4
HCC2	2.2	41.4	8.3	5.4	2.5	9.3	8.9	2.3	1.9	1.8	12.5
HCC30n	1.9	23.8	0.9	21.0	2.5	3.4	3.6	5.5	10.4	1.7	0.8
HCC31	1.3	9.7	0.6	13.8	2.9	3.4	3.0	0.9	3.3	3.6	0.9
HCC32	2.8	7.8	4.4	6.0	3.4	3.1	3.5	4.4	3.0	4.7	3.2
HCC33	0.9	7.1	2.0	4.1	1.9	3.4	8.3	7.2	1.9	0.9	3.4
HCC34	2.9	48.3	9.4	21.7	3.8	8.5	12.9	16.3	1.1	1.4	7.6
HCC35	4.0	3.1	4.2	7.2	5.4	2.8	4.3	3.3	5.0	4.9	3.0
HCC36	1.8	36.3	5.0	8.4	5.3	4.6	6.1	3.3	2.4	1.4	1.3
HCC4	1.7	21.4	8.3	15.4	10.6	19.0	2.0	0.9	2.5	3.3	1.8
HCC6	0.7	15.6	0.5	1.9	1.4	2.3	1.4	1.6	2.6	4.3	1.6
HCC9	1.2	52.7	3.6	15.6	2.7	2.3	1.1	4.4	3.8	1.4	0.9
HCC (IHB)	0.6	20.4	8.4	14.0	19.2	10.0	9.8	1.2	2.5	5.1	4.8
HCC22	3.2	10.5	2.2	5.0	2.4	1.7	0.8	2.4	2.7	1.2	5.1
HCC28	0.6	5.3	2.3	5.6	1.3	1.4	0.7	1.4	1.8	1.1	1.9
HCC 平均	2.9	24.7	4.7	5.1	5.6	5.3	5.0	5.1	3.8	2.8	3.8
HCC 中央値	1.9	22.9	4.2	7.2	3.1	3.4	4.3	3.3	2.7	1.8	2.8
HCC 標準偏差	3.0	15.4	3.6	5.8	5.9	4.2	3.4	4.8	2.4	2.1	3.5

10

20

30

40

疾患サンプル ↓	OBe1 配列番号 10	OBe15 配列番号 11	IK2 配列番号 12	IK5 配列番号 13	DAP3 (A) 配列番号 14	DAP3 (B) 配列番号 14	LOC5 配列番号 15	SEC14L2 配列番号 16	SSP29 配列番号 17	HS16 配列番号 18	IK3 配列番号 19
FNH1	2.5	7.0	8.0	10.1	4.6	1.9	10.2	7.1	2.3	4.9	0.9
FNH2	4.7	7.1	10.9	16.2	2.2	4.4	7.1	4.2	2.2	2.1	16.6
FNH3	3.0	4.2	9.5	11.5	1.5	2.6	9.6	6.0	1.0	2.1	9.9
FNH9	3.4	15.1	7.7	9.9	1.7	3.2	2.4	3.8	0.9	1.3	7.5
FNH 平均	3.4	8.3	9.1	11.9	2.5	3.0	7.3	5.3	1.6	2.6	8.7
FNH 中央値	3.2	7.1	8.8	10.8	2.0	2.9	8.4	5.1	1.6	2.1	8.7
FNH 標準偏差	0.9	4.7	1.5	2.9	1.4	1.1	3.5	1.5	0.8	1.6	6.5

10

20

Cirrh34b	7.6	17.7	6.0	6.0	13.7	3.2	9.3	2.3	19.6	8.6	4.2
Cirrh5	0.5	2.7	12.9	2.7	1.2	3.0	10.3	4.0	16.0	2.0	3.9
Cirrh1	1.0	1.8	2.2	2.8	7.5	3.0	1.9	2.3	9.3	12.2	10.1
Cirrh2	0.4	2.6	2.9	2.9	13.9	0.9	2.4	3.3	1.8	1.3	2.7
Cirrh3	0.4	4.0	15.2	22.1	1.3	2.8	1.4	0.8	2.4	3.6	1.7
Cirrh4	0.8	10.8	24.7	9.0	2.4	3.9	2.7	1.7	1.0	3.8	4.6
Cirrh 平均	1.8	6.6	10.7	7.6	6.7	2.8	4.7	2.4	8.3	5.3	4.5
Cirrh 中央値	0.7	3.4	9.5	4.5	5.0	3.0	2.6	2.3	5.9	3.7	4.1
Cirrh. 標準偏差	2.9	6.4	8.7	7.5	6.0	1.0	4.0	1.1	8.0	4.3	2.9

30

アデノーマ	1.9	10.0	1.7	6.9	1.6	3.6	1.8	1.1	2.2	1.5	3.7
-------	-----	------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

40

銅毒	2.3	18.7	3.5	7.2	7.0	8.4	13.0	7.3	35.5	22.4	9.5
----	-----	------	-----	-----	-----	-----	------	-----	------	------	-----

非罹患肝臓	0.7	0.6	n,d,	2.6	1.4	1.5	1.7	1.6	1.1	2.0	1.2
-------	-----	-----	------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

【表 4】

表3B cDNAマイクロアレイ核酸発現レベル比(log2値)

疾患サンプル ↓	OBe1 配列番号 10	OBe15 配列番号 11	IK2 配列番号 12	IK5 配列番号 13	DAP3 配列番号 14	LOC5 配列番号 15	SEC14L2 配列番号 16	SSP29 配列番号 17	HS16 配列番号 18	IK3 配列番号 19
HCC11	1.99	4.79	1.24	3.13	1.12	0.05	3.96	1.02	0.14	0.57
HCC12	0.55	5.26	0.19	3.52	1.64	2.10	3.80	1.93	0.90	1.08
HCC13	0.46	5.48	2.97	2.74	2.87	2.82	1.73	1.05	0.81	1.50
HCC15	1.36	4.93	0.50	1.89	4.58	2.53	1.95	3.11	0.91	0.76
HCC1	1.24	5.34	2.92	3.26	0.83	2.82	3.23	2.47	0.64	3.68
HCC27	3.53	3.56	2.06	1.34	2.64	3.04	2.21	2.32	3.20	2.82
HCC29	3.45	4.52	3.75	1.96	2.75	2.43	0.91	2.81	2.22	1.75
HCC2	1.15	5.37	3.05	2.43	1.29	3.16	1.21	0.94	0.88	3.65
HCC30n	0.96	4.57	-0.19	4.40	1.31	1.84	2.46	3.38	0.77	-0.38
HCC31	0.42	3.27	-0.63	3.79	1.55	1.57	-0.12	1.74	1.85	-0.15
HCC32	1.48	2.96	2.15	2.59	1.77	1.81	2.13	1.59	2.22	1.68
HCC33	-0.17	2.83	0.97	2.05	0.96	3.06	2.85	0.94	-0.07	1.76
HCC34	1.54	5.59	3.23	4.44	1.93	3.69	4.03	0.16	0.44	2.92
HCC35	1.99	1.63	2.08	2.85	2.42	2.09	1.74	2.31	2.29	1.61
HCC36	0.86	5.18	2.32	3.08	2.40	2.61	1.74	1.28	0.52	0.35
HCC4	0.77	4.42	3.05	3.94	3.41	0.97	-0.13	1.35	1.73	0.87
HCC6	-0.60	3.96	-0.87	0.94	0.45	0.44	0.68	1.36	2.09	0.70
HCC9	0.29	5.72	1.84	3.97	1.44	0.17	2.15	1.92	0.47	-0.13
IHB-HCC	-0.85	4.35	3.06	3.81	4.27	3.29	0.32	1.34	2.35	2.26
HCC22	1.66	3.39	1.16	2.31	1.28	-0.31	1.26	1.45	0.32	2.35
HCC28	-0.75	2.41	1.22	2.49	0.42	-0.62	0.45	0.86	0.12	0.90
HCC 平均	1.02	4.26	1.72	2.90	1.97	1.88	1.84	1.68	1.18	1.45
HCC 中央値	0.96	4.52	2.06	2.85	1.64	2.10	1.74	1.45	0.88	1.50
HCC 標準偏差	1.17	1.16	1.35	0.97	1.14	1.29	1.26	0.81	0.93	1.18

10

20

30

40

疾患サンプル ↓	OBc11 配列番号 10	OBc15 配列番号 11	IK2 配列番号 12	IK5 配列番号 13	DAP3 配列番号 14	LOC5 配列番号 15	SEC14L2 配列番号 16	SSP29 配列番号 17	HS16 配列番号 18	IK3 配列番号 19
FNH1	1.34	2.81	3.01	3.33	2.19	3.34	2.83	1.21	2.29	-0.18
FNH2	2.24	2.84	3.45	4.01	1.14	2.83	2.08	1.11	1.08	4.05
FNH3	1.58	2.07	3.25	3.53	0.59	3.27	2.58	0.06	1.06	3.30
FNH9	1.76	3.91	2.95	3.31	0.75	1.28	1.93	-0.12	0.35	2.91
FNH 平均	1.56	2.99	2.68	3.39	1.07	2.32	1.91	0.67	1.07	2.40
FNH 中央値	1.58	2.84	3.01	3.33	0.75	2.83	2.08	1.11	1.06	2.91
FNH 標準偏差	0.50	0.68	1.10	0.44	0.66	1.16	1.05	0.65	0.75	1.64

10

20

Cirrh34b	2.92	4.14	2.58	2.59	3.78	3.22	1.17	4.29	3.11	2.08
Cirrh5	-0.97	1.42	3.69	1.42	0.24	3.36	2.01	4.00	1.01	1.97
Cirrh1	0.02	0.86	1.16	1.48	2.91	0.92	1.19	3.22	3.61	3.34
Cirrh2	-1.43	1.37	1.55	1.55	3.80	1.29	1.70	0.81	0.40	1.44
Cirrh3	-1.28	1.99	3.93	4.47	0.40	0.53	-0.40	1.28	1.85	0.74
Cirrh4	-0.37	3.43	4.62	3.17	1.27	1.44	0.75	-0.05	1.92	2.20
Cirrh 平均	-0.18	2.20	2.92	2.45	2.07	1.79	1.07	2.26	1.98	1.96
Cirrh 中央値	-0.67	1.70	3.13	2.07	2.09	1.37	1.18	2.25	1.89	2.02
Cirrh 標準偏差	1.62	1.30	1.39	1.22	1.63	1.20	0.84	1.82	1.22	0.86

30

アデノーマ	0.89	3.32	0.75	2.78	0.70	0.87	0.15	1.11	0.56	1.89
-------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------

40

銅毒	1.21	4.23	1.82	2.85	2.82	3.70	2.87	5.15	4.48	3.25
----	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------

非罹患肝臓	-0.53	-0.84	n.d.	1.39	0.50	0.80	0.69	0.19	0.97	0.23
-------	-------	-------	------	------	------	------	------	------	------	------

【 0 1 1 5 】

cDNA マイクロアレイ 核酸発現値の概要を表 4 に示す。Mann-Whitney の U 検定を利用して、RNA 発現レベルを統計的に評価する：この検定は、対フラグ = 'false' を用いた Wilcoxon 順位和両側検定と等しい (Hollander & Wolfe, 1973, Nonparametric statist

50

ical inference. New York: John Wiley & Sons, 27-33, 68~75頁; Bauer, D.F., 1972, J. Amer. Statistical Assoc. 67: 687-690)。発現値は通例、正規分布に適合しないため、値の平均は誤解されやすい。しかしながら中央値の解析は、大半の場合、特に大きなデータセットにおいて、実験値と参照値の間の有意差を証明する。実験中間 = 実験（罹患）組織の中央値；実験四分位間 = 四分位間範囲の実験値（中央値の+/-25番目のパーセンタイル）；対照中間 = 対照（非罹患）組織サンプルの中央値；対照四分位間 = 四分位間範囲の対照値（中央値の+/-25番目のパーセンタイル）；p値 = 実験値および対照値が有意に異なるという確率の統計的評価から得られた値。

【0116】

【表5】

10

表4:cDNAマイクロアレイ核酸(配列番号:10~19)発現値の概要

HCC					
	実験中間	実験四分位間	対照中間	対照四分位間	p値
OBcl1	6482	4915	3235	1050	0.0001
OBCI5	995.5	1549.1	832.2	195	0.0156
IK2	582.7	348.9	874.3	344.1	0.0397
IK5	600.1	330.4	760.9	261.5	0.0056
DAP3	1202	1271.7	927	391.3	0.0499
LOC5	673.7	256.2	965	255.4	0.0255
SEC14L2	457.39	351.17	869.7	306.1	0.0003
SSP29	949.9	475.1	976.2	327.9	0.6792
HS16	1269	483	1083	494.4	0.2293
IK3	651.7	305.2	842.2	297.3	0.0080
FNH					
	実験中間	実験四分位間	対照中間	対照四分位間	p値
OBcl1	8279.2	3205	3550.1	684	0.0286
OBCI5	806.4	1563.4	737.6	106.5	0.4857
IK2	1165.1	222	887.2	137	0.6857
IK5	1358.9	383	882.1	196.6	0.4857
DAP3	1555.6	569	1046.2	136	0.3429
LOC5	971.3	459.3	890.7	131	0.6857
SEC14L2	807.3	262.9	806	176.6	0.6857
SSP29	1484.4	462	1139.9	101	0.2000
HS16	1556.2	644	1156.5	113	0.4857
IK3	1298.9	131	800.7	360.4	0.3429

20

30

40

50

肝硬変					
	実験中間	実験 四分位間	対照中間	対照 四分位間	p値
OBcl1	2518	1923	4108	869	0.2403
OBC15	318.4	187	1318	321	0.0087
IK2	408.3	235	1195	194	0.0022
IK5	244	251.7	1238	995	0.0022
DAP3	576.1	568.1	1417	446	0.0022
LOC5	355.6	360	1377	293	0.0022
SEC14L2	192.3	112.8	1287	243	0.0022
SSP29	361.3	140.4	1547	501	0.0087
HS16	246.7	250.5	1392	300	0.0022
IK3	378.6	446.6	1217	423	0.0043

10

20

【 0 1 1 7 】

非腫瘍性肝臓疾患および肝臓癌における核酸発現値の比較を、表 5 A に示す。本発明による各核酸について、FNH、肝硬変およびHCCサンプルの間の比較のために、中間実験発現値の差に対してP値が与えられる。各核酸および比較について、0.05以下のP値は、疾患群間の発現値の有意差を示す。有意性は、Wilcoxon順位和検定を用いて評価した。発現の統計的有意差は、疾患群間で明らかである。例えばIK2の発現値は、3つの比較すべてで著しく異なる(0.05未満のP値)。FNHサンプル群は小さく、値の大きな分布を示す。このことは、この群との比較での、より小さい有意差を説明する。

【 0 1 1 8 】

30

【表6】

表5A:HCC対Cirrh(肝硬変);HCC対FNH;Cirrh対FNHにおける核酸
(配列番号:10~19)の発現特異性

	HCC 対 Cirrh.	HCC 対 FNH	Cirrh. 対 FNH
OBcl1	0.0013	0.2718	0.0095
OBcl5	0.0010	0.7672	0.0667
IK2	0.0042	0.0081	0.0095
IK5	0.0078	0.0031	0.0095
DAP3	0.0078	0.4885	0.0667
LOC5	0.0042	0.1109	0.0095
SEC14L2	0.0004	0.0817	0.0095
SSP29	0.0052	0.0336	0.0095
HS16	0.0168	0.4085	0.0095
IK3	0.1273	0.0014	0.0095

10

20

【0119】

表5BのMann-Whitney Uは、値が昇順で整列されるときに、第一群(HCC)の値が第二群(それぞれFNHおよびCirrh)の値を超える回数を示す。Wilcoxon Wは、Mann-Whitney Wilcoxon順位和検定での、2つの群の大きい方の順位和である。漸近有意性(Asymp. Sig.)(2-tailed)は、両側検定のP値を与える。この統計解析は、表7に与えられ、図2に示された定量RT-PCR(Q-PCR)データの統計によって検証された、OBcl5(HCC対FNH、HCC対Cirrh)の発現パターンの全体的な傾向を決定するために利用する。

30

【0120】

【表7】

表5B:HCC対FNHおよびHCC対CirrhのOBcl5の発現特異性

HCC 対 FNH

	Mann-Whitney U	Wilcoxon W	漸近有意性 (2-tailed)
OBC15	18.0	33.0	0.025

40

HCC 対 Cirrh

	Mann-Whitney U	Wilcoxon W	漸近有意性 (2-tailed)
OBC15	15.0	36.0	0.005

【0121】

逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)は、リストに挙げた各組織の各調節

50

解除核酸に対して特異性であるプライマーを用いて実施し、配列が各組織から作成されたRNA中で表現されるかどうか判定する。利用したすべての組織は、RNA（およびcDNA）作成への利用前に、診断によって確認する。表6において、「+」記号は、遺伝子が組織内で発現されることを示し、「-」は、この遺伝子がこのRNAサンプルからのcDNA中に検出されないことを示す；そして空欄は、その遺伝子と組織との組合せに対して解析を行っていないことを示す。患者の年齢および性別を与える。追加のサンプル情報は、腫瘍ステージング値（T = 腫瘍サイズ）はもちろんのこと、腫瘍グレーディングスコア（G = 腫瘍細胞分化）も含む；大きい数字は、より大きく、あまり分化しなかった腫瘍をそれぞれ示す。組織cDNAの正の対照は、グリセルアルデヒドホスフェートデヒドロゲナーゼmRNA（GAPDH）からの増幅である。

【0122】

表6:ヒト非罹患者および罹患者組織での核酸発現のRT-PCR

サンプル	患者の性別	患者の年齢	診断	T	G	GAPDH	OBcl1	OBcl5	IK2	IK5	DAP3	LOC5	SEC14L2	SSP29	HS16	IK3
肝臓	m	45	非罹患者組織			+				+	-					
肝臓	m	27	非罹患者組織			+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
肝臓			非罹患者組織			+				+	-					
HCC1	m	66	小柱状/管状HCC	3	1	+	-	+	+							+
HCC2	m	81	小柱状/管状HCC	3	2	+	-	+	+	+						
HCC3	m	63	小柱状/管状HCC	3	2	+	-	+	-	-						-
HCC4	m	72	小柱状/管状HCC	3	2	+	-	+/-								-
アデノーマ	f	22	良性肝臓新生物			+	-	+	+	+						+/-
HCC (HCVから)	m	63	小柱状/管状HCC	2		+	-	+								
HCC cDNA ライブラリプール							+	+	+	-		+	+	-	+	-
結腸	m	52	非罹患者組織			+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
結腸腫瘍	m	69	管状腺癌	4	2	+	-	-	-	-	+/-	-	-	+	-	-
結腸腫瘍	m	64	管状腺癌	3	2	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
結腸腫瘍	m	52	管状腺癌	3	2	+	-	-								

【表 8】

サンプル	患者の性別	患者の年齢	診断	T	G	GAPDH	OBcl1	OBcl5	IK2	IK5	DAP3	LOC5	SEC14L2	SSP29	HS16	IK3
胃	f	57	非罹患組織			+	-	+			+/-					
胃	m	70	非罹患組織				-	-	-	-		-	-			-
胃腫瘍	f	61	腺癌	2		+	-	+			+					
胃腫瘍	f	78	腺癌	3	3	+	+/-	-			-					
胃腫瘍	f	70	管状腺癌	X	3	+	-	-			-					
胃腫瘍	m	69	腺癌	3	3	+	-	-								
脾臓	m	55	非罹患組織			+	-	-	-	+	+/-					-
脾臓腫瘍	m	69	腺癌	3	3	+	-	+			-					-
脾臓腫瘍	m	69	腺癌	3	3	+	-	-								
皮膚	f	60	非罹患組織			+	-	-			-					
皮膚腫瘍	m	50	扁平上皮癌		2	+	-	-								
皮膚腫瘍	f	92	扁平上皮癌	2	3	+	-	-			-					
皮膚腫瘍	m	73	扁平上皮癌	2	1	+	-	-			+					
睾丸	m	48	非罹患組織			+	-	+			-					-
睾丸腫瘍	m	35	精上皮腫および卵黄嚢腫瘍	3		+	-	-			+					-
睾丸腫瘍	m	43	精上皮腫	2		+	-	-			-					
睾丸腫瘍	m	31	精上皮腫	1		+	-	-			-					

10

20

30

40

サンプル	患者の性別	年齢の年数	診断	T	G	GAPDH	OBcl1	OBcl5	IK2	IK5	DAP3	LOC5	SEC14L2	SSP29	HS16	IK3
甲状腺腫瘍	f	60	乳頭癌	3 a		+	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-	-
甲状腺腫瘍	f	57	乳頭癌	4 a		+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
甲状腺腫瘍	f	17	乳頭癌	2 b		+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
腎臓	f	33	非罹患組織			+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
腎臓腫瘍	f	33	明細胞癌	1	1	+	-	-			+					
腎臓腫瘍	f	62	明細胞癌	1	1	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
腎臓腫瘍	m	54	明細胞癌	1	2	+	-	-	+	+	+/-	-	+	-	-	+
肺	f	64	非罹患組織			+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
肺	f	57	非罹患組織			+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
肺腫瘍	m	58	扁平上皮癌	2	3	+	-	-	+	+	+/-	-	-	-	-	+
肺腫瘍	m	54	扁平上皮癌	2	2- 3	+	-	+	+/-	-	-	-	-	-	-	+
肺腫瘍	f	57	扁平上皮癌	2	2- 3	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
乳腺	f	38	非罹患組織			+	-	-	+/-	-	+/-	-	+	-	-	-
乳腺腫瘍	f	55	浸潤性乳管癌 (IDC)	2	2	+	-	-	+	-		-	-	-	-	-

10

20

30

40

サンプル	患者の性別	患者の年齢	診断	T	G	GAPDH	OBcl1	OBcl5	IK2	IK5	DAP3	LOC5	SEC14L2	SSP29	HS16	IK3
乳腺腫瘍	f	66	粘液癌	2	1	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
脾臓	f	58	非罹患組織			+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
筋肉	m	65	非罹患組織			+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
脳(皮質)	m	27	非罹患組織			+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
脳髄	m	27	非罹患組織			+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
心臓			非罹患組織								+					+
骨髄			非罹患組織							+		+				+
胎盤cDNA			非罹患組織			+						+				+
ライブラリ			非罹患組織													

10

20

30

40

【 0 1 2 3 】

本発明の別の好ましい実施態様において、本発明による核酸は、アンチセンスオリゴヌクレオチド (Zheng and Kemeny, 1995, Clin.Exp.Immunol.100: 380-2; Nellen and Lichtenstein, 1993, Trends Biochem.Sci.18: 419-23; Stein, 1992, Leukemia 6: 967-74)

50

および/またはリボザイム (Amarguoui, ら 1998, Cell.Mol.Life Sci.54: 1175-202; Vaishら, 1998, Nucleic Acids Res.26: 5237-42; Persidis, 1997, Nat.Biotechnol.15: 921-2; Couture and Stinchcomb, 1996, Trends Genet.12: 510-5) および/または低分子干渉二本鎖 RNA (Elbashirら, 2001, Nature 411: 494-98; Brummelkampら, 2002, Science 296: 550-553) の作成に使用できる。本発明の更に好ましい実施態様において、RNA干渉分子 (オリゴヌクレオチド) を使用して、本発明による核酸の安定性を低下させること、および/または、本発明による核酸の翻訳を抑制することが可能である。それゆえ例えば、細胞内の対応する遺伝子の発現は、インピボとインピトロの両方で減少させることができる。したがってオリゴヌクレオチドは、治療薬として適切でありうる。この方法は、例えば肝臓細胞に、特にアンチセンスオリゴヌクレオチドがリボソームと複合体化する場合にも適している。プローブまたは「アンチセンス」オリゴヌクレオチドとしての使用では、一本鎖 DNA または RNA が好ましい。低分子干渉 RNA (siRNA) 二本鎖オリゴヌクレオチドも、治療薬として適切でありうる。このアプローチによって、治療上標的にされる配列に対して相補性である配列を含む、短い配列または 15 ~ 22 個のヌクレオチドの配列は、罹患組織に触れさせると、治療標的 RNA 配列の発現レベルを劇的に低下または「ノックダウン」する役割を果たす。別の疾患での siRNA 治療アプローチが近年報告され、肝臓障害、肝臓癌および他の上皮癌にも利用できる (Filleur S, Courtin A, Ait-Si_Ali S, Guglielmi J, Merle C, Harel-Bellan A, Clezardin P, Cabon F.Cancer Res. 2003年7月15日; 63(14): 39-22)。

10

【0124】

20

好ましい実施態様において、本発明による核酸は、組換え法によって、ライブラリーのスクリーニングまたは患者または対象者から得たサンプルからの分離によって作成されてきた。本発明の別の好ましい実施態様において、本発明による核酸は、合成により作成されてきた。それゆえ本発明による核酸は、例えば配列番号 10 ~ 配列番号 19 で記述された DNA 配列を化学的に用いて、および/または、例えばホスホトリエステル法による遺伝子コードへの参照により、配列番号 1 ~ 配列番号 9 および/または配列番号 47 で記述されたタンパク質配列を用いて合成することができる (例えば Uhlmann and Peyman, 1990, Chemical Reviews 90: 543-584 を参照)。

【0125】

別の好ましい実施態様において、本発明は、本発明による核酸または核酸の非機能的突然変異体である核酸、あるいは核酸の 1 つに対して相補性である配列を有する核酸に関し、それは分解に対して安定化させるために核酸への化学基の付加によって修飾されるため、細胞内で長期間に渡って核酸の高濃度が維持される (Beigelmanら, 1995, Nucleic acids Res.23: 3989-94; Dudycz, 1995, 国際公開公報第 95 / 11910 号; Macadamら, 1998, 国際公開公報第 98 / 37240 号; Reeseら, 1997, 国際公開公報第 97 / 29116 号)。通例、このような安定化は、1 つ以上のインターヌクレオチドリリングの導入によって、または 1 つ以上の非リンインターヌクレオチドの導入によって得ることができる。

30

【0126】

好ましい適切な修飾インターヌクレオチドは、Uhlmann および Peymann に要約されている (1990 Chem.Rev.90, 544; Beigelmanら, 1995 Nucleic Acids Res.23: 3989-94; Dudycz, 1995, 国際公開公報第 95 / 11910 号; Macadamら, 1998, 国際公開公報第 98 / 37240 号; Reeseら, 1997, 国際公開公報第 97 / 29116 号も参照)。

40

【0127】

更なる実施態様において、本発明は、本発明による核酸および/またはその変異体、あるいは核酸の非機能的突然変異体である核酸、あるいは先に記載した核酸の 1 つに対して相補性である配列を有する核酸を含むベクターに関する。好ましくはベクターは、ノックアウト遺伝子構築物、プラスミド、シャトルベクター、ファージミド、コスミド、ウイルスベクター、発現ベクター、および/または遺伝子療法で利用できるベクターである。このような構築物の調製は、当業者に一般に既知である。

50

【0128】

本発明の意味の範囲内の「発現ベクター」は、好ましくは、少なくとも1つのプロモーターまたはエンハンサー、少なくとも1つの翻訳開始シグナルを含むすなわち少なくとも1つの調節要素、本発明による核酸または核酸の非機能的突然変異体である核酸または先に記載した核酸の1つに対して相補性である配列を有する核酸の少なくとも1つ、1つの翻訳終了シグナル、転写終了シグナル、および真核生物での発現のためのポリアデニル化シグナルを含む。

【0129】

関係する遺伝子の発現では、一般に二本鎖DNAが好ましく、ポリペプチドをコード化するDNA領域が特に好ましい。真核生物の場合、この領域は、Kozak配列に位置する第一の開始コドン(ATG)で始まり(Kozak, 1987, Nucleic Acids Res.15: 8125-48)、ATGと同じ読み取り枠内に位置する次の停止コドン(TAG、TGA、またはTAA)までである。原核生物の場合、この領域はShine-Dalgarno配列後の第一のAUG(またはGUG)で開始し、ATGと同じ読み取り枠内に位置する次の停止コドン(TAA、TAG、またはTGA)で終了する。

10

【0130】

HCCで異なって発現された遺伝子は、肝臓または肝臓癌遺伝子特異性調節配列を含有することができる。組織または疾患特異性遺伝子に見出されるこれらの非転写配列は含まれた治療および/または腫瘍細胞傷害性遺伝子の組織または疾患特異性発現を引き起こすために使用できる。これらの調節配列は、本発明による核酸または核酸の非機能的突然変異体である核酸または先に記載した核酸の1つに対して相補性である配列を有する核酸の肝臓癌特異性発現に使用できる。このような調節配列のスクリーニングおよび作成は、当業者に一般に既知である。

20

【0131】

適切な発現ベクターは、原核または真核発現ベクターでありうる。原核発現ベクターの例は、E.coliでの発現のための、例えばベクターspGEMまたはpUC誘導体であり、真核発現ベクターの例は、Saccharomyces cerevisiaeでの発現のための、例えば昆虫細胞での発現のためのベクターp426Met25またはp426GAL1(Mumbergら(1994)Nucl.Acids Res., 22, 5767-5768)、例えば欧州特許登録特許第0127839号または欧州特許登録特許第0549721号で開示されているようなバキュロウイルスベクター、および哺乳類細胞での発現のための、例えばベクターRc/CMVおよびRc/RSVまたはSV40ベクターであり、すべて一般に入手可能である。形質移入後のRNA干渉の生成のための特異性ベクター、例えばpSUPERベクター(Brummelkampら, 2002, Science 296: 550-553)も含まれる。

30

【0132】

一般に、発現ベクターは、各細胞に適したプロモーター、例えばE.coliでの発現のためのtrpプロモーター(例えば欧州特許登録特許第0154133号)、酵母での発現のためのMET25、GAL1またはADH2プロモーター(Russelら(1983), J. Biol.Chem.258, 2674-2682; Mumberg, 同上)、昆虫細胞での発現のためのバキュロウイルスポリヘドリンプロモーター(例えば欧州特許登録特許第0127839号を参照)なども含有する。哺乳類細胞での発現では、例えば適切なプロモーターは、真核細胞内で、構成的で調節可能な組織特異的の、細胞サイクル特異的の、または代謝特異的の発現を可能にするプロモーターである。本発明による調節要素は、好ましくは、プロモーター、アクチベーター配列、エンハンサー、サイレンサーおよび/またはリプレッサー配列である。

40

【0133】

真核生物での考えられる構成的発現を可能にする適切な調節要素の例は、好ましくは、RNAポリメラーゼIIIまたはウイルスプロモーターによって認識されるプロモーター、CMVエンハンサー、CMVプロモーター、SV40プロモーター、または、例えばMMTV(マウス乳癌ウイルス; Leeら(1981)Nature 214, 228-232)からのLTRプロモーター

50

ターおよび、例えばアデノおよびアデノ様ウイルスHBV、HCV、HSV、HPV、EBV、HTLVまたはHIVから由来する、更なるウイルスプロモーターおよびアクチベーター配列である。

【0134】

真核生物における考えられる調節発現を可能にする調節要素の例は、対応するリプレッサーと組合せたテトラサイクリンオペレーターである (Gossenら, 1994, Curr.Opin.Biotechnol.5: 516-20)。

【0135】

翻訳開始シグナル、翻訳終了シグナル、転写終了シグナル、およびポリアデニル化シグナルは当業者に一般に既知であり、研究メーカーから容易に入手することができる。

10

【0136】

好ましくは、肝臓障害および/または上皮癌に関連する遺伝子の発現は、組織特異性プロモーターの制御下、例えばアルブミン、アルファフェトタンパク質、アポリポタンパク質AI、アルファ-1アンチトリプシン、および相補性C5およびC8A遺伝子などの肝臓特異的プロモーターの制御下で起こる (Schremら, 2002, Pharmacol.Rev.54 129-58; Pontoglioら, 2001, J.Expt.Med.194: 1683-1689)。本明細書に記載するようにHCCにおいて高度に調節解除された遺伝子に関連する調節配列も、これらの障害において特異的な遺伝子発現のための好ましい方法を提供する。

【0137】

真核生物における考えられる組織特異的発現を可能にする調節要素の例は、ある細胞種でのみ発現されるタンパク質をコード化するこれらの遺伝子のプロモーターまたはエンハンサーからの、プロモーターまたはアクチベーター配列である。

20

【0138】

真核生物における考えられる代謝性特異的発現を可能にする調節要素の例は、低酸素状態によって、酸化ストレスによって、グルコース欠乏によって、ホスフェート濃度によって、または熱ショックによって調節できるプロモーターである。

【0139】

真核生物における細胞サイクル特異的発現を可能にする調節要素の例は、以下の遺伝子: cdc25A、cdc25B、cdc25C、サイクリンA、サイクリンE、cdc2、E2F-1~E2F-5、B-mybまたはDHF Rのプロモーターである (Zwicker J.and Muller R., 1997, Trends Genet.13: 3-6)。細胞サイクル調節プロモーターの使用は、ポリペプチドの発現または本発明による核酸が増殖性細胞に制限される場合で特に好ましい。

30

【0140】

先に記載したような核酸、または核酸の非機能的突然変異体の導入およびそれゆえ形質移入、形質転換または感染による、真核または原核細胞でのポリペプチドの発現を可能にするために、核酸は、プラスミドとして、ウイルスまたは非ウイルスベクターとして存在できる。ここでの適切なウイルスベクターは特に: バキュロウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルス、およびヘルペスウイルスである。ここでの適切な非ウイルスベクターは特に: ビロソーム、リポソーム、カチオン性脂質、またはポリリジン結合DNAまたは裸のDNAである。

40

【0141】

本発明による使用に適したプラスミド、シャトルベクター、ファージミド、およびコスミドも当業者に既知であり、研究メーカーから一般に入手できる。

【0142】

遺伝子療法で利用できるベクターの例は、ベクター、例えばアデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター、またはRNAウイルスのレプリコンに基づくベクターである (Lindemannら, 1997, Mol.Med.3: 466-76; Springerら, 1998, Mol.Cell.2: 549-58, Khromykh, 2000, Curr.Opin.Mol Ther.2: 555-569)。裸のDNAは局所利用時に、または血液供給を通じて例えば肝臓細胞内に浸透可能であるため、真核発現ベクターは、単離され

50

た形態での遺伝子療法用途に適切である。

【0143】

最先端と比較すると、この融合構築物は、驚くべきことに、肝臓障害および/または上皮癌の改良された、より感受性の高い、より早期の、より高速な、および/または非侵襲性の診断および/または改良された持続性の、および/またはより有効な処置を可能にする。

【0144】

別の態様において、本発明は、更に、本発明による核酸および/またはその変異体を含む細胞に関する。好ましくは細胞は、本発明によるベクターによって形質転換される。細胞は、好ましくは、核酸であって、本発明による核酸の非機能的突然変異体、またはその変異体のどちらかである核酸を含有する。特に細胞は、核酸であって、本発明による核酸の非機能的突然変異体、またはその変異体である核酸を含むベクターを含有する。好ましくは、細胞は、本発明による核酸に対して相補性である配列を有する核酸をコード化する核酸、またはその変異体を含むベクターを含有する。その上、細胞は、好ましくは、本発明による抗体または抗体の断片をコード化する核酸を含むベクターを含有する。本発明による細胞は、例えば、先に記載した核酸の少なくとも1つを含む肝臓細胞、または先に記載したベクターの1つを使用して形質転換された細胞でもよい。細胞は、原核または真核細胞、異種または自己細胞のどちらでもよい。原核細胞の例は、*E. coli*であり、真核細胞の例は、一次肝細胞、*He p G 2*および*He p 3 B*細胞などの肝細胞系、酵母細胞、例えば*Saccharomyces cerevisiae*または昆虫細胞を含む。

10

20

【0145】

最先端と比較すると、本発明による細胞は、驚くべきことに、肝臓障害および/または上皮癌の改良された、より感受性の高い、より早期の、より高速な、および/または非侵襲性の診断および/または改良された持続性の、および/またはより有効な処置を可能にする。

【0146】

本発明の好ましい実施態様において、細胞は、先に記載した少なくとも1つの本発明による核酸、少なくとも1つのベクター、少なくとも1つのノックアウト遺伝子構築物および/または少なくとも1つの発現ベクターを含む、トランスジェニック胎性非ヒト幹細胞である。

30

【0147】

細胞および/または幹細胞の形質転換の過程は、当業者に周知であり、例えば電気穿孔または微量注入を含む。

【0148】

別の態様において、本発明は、本発明による核酸および/またはその変異体、核酸の非機能的突然変異体である核酸、先に記載した核酸の1つに対して相補性である配列を有する核酸、ベクターの形の、ノックダウンまたはノックアウト遺伝子構築物の形の、および発現ベクターの形の先に記載した核酸の1つからなる群より選択される化合物を含む、トランスジェニック非ヒト哺乳類の提供に関する。

40

【0149】

トランスジェニック動物は、一般に、核酸および/またはポリペプチドの組織特異的な発現増加を示し、例えば*HCC*などの肝臓障害および/または上皮癌の分析に、そしてこのような障害の治療方法の開発および評価に使用できる。トランスジェニック動物は、更に、本発明によるポリペプチドの生成に利用できる。動物によって生成されたポリペプチドは、例えば、動物の体液中で濃縮できる。本発明によるポリペプチドは、例えば、牛乳などの体液から分離できる。

【0150】

最先端と比較すると、このトランスジェニック非ヒト哺乳類は、驚くべきことに、肝臓障害および/または他の上皮癌の改良された、より感受性の高い、より早期の、より高速な、および/または非侵襲性の分析および/または診断を可能にする。

50

【0151】

トランスジェニック動物の、特にトランスジェニックマウスの作成工程は同様に、ドイツ特許196 25 049号および米国特許第4,736,866号；米国特許第5,625,122号；米国特許第5,698,765号；米国特許第5,583,278号および米国特許第5,750,825号から当業者に既知であり、例えば本発明による発現ベクターの胚または精母細胞への直接注入によって、または発現ベクターの受精卵の前核への注入によって、または発現ベクターの胚幹細胞への形質移入によって、または適切なレシピエント細胞への核移植によって生成できるトランスジェニック動物を含む(Polites and Pinkert, DNA Microinjection and Transgenic animal Production, 15~68頁 in Pinkert, 1994, Transgenic animal technology: a laboratory handbook, Academic Press, London, UK; Houdebine, 1997, Harwood Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands; Doetschman, Gene Transfer in Embryonic Stem Cells, 115~146頁 in Pinkert, 1994, 同上; Wood, Retrovirus-Mediated Gene Transfer, 147~176頁 in Pinkert, 1994, 同上; Monastersky, Gene Transfer Technology; Alternative Techniques and Applications, 177~220頁 in Pinkert, 1994, 同上)。

【0152】

先に記載した核酸をいわゆる「ターゲティングベクター」または「ノックアウト遺伝子構築物」に組み込む場合(Pinkert, 1994, 同上)、胚幹細胞の形質移入および相同性組換えの後に、例えば一般にヘテロ接合性マウスとして、核酸の発現減少を示すノックアウトマウスを生成することが可能であり、これに対してホモ接合性マウスは、核酸の発現をもはや示さない。そのように生成された動物は、例えばHCCなどの肝臓障害および/または上皮癌の分析にも使用できる。

【0153】

ノックアウト遺伝子構築物は、例えば米国特許第5,625,122号；米国特許第5,698,765号；米国特許第5,583,278号および米国特許第5,750,825号から当業者に既知である。

【0154】

更なる態様において、本発明は、提供される抗体またはその断片に関し、ここで抗体または抗体断片は、本発明によるポリペプチド、またはその機能変異体に対して、あるいはポリペプチドをコード化する核酸またはその変異体に対して作成される。

【0155】

最先端と比較すると、これらの抗体またはその断片は、驚くべきことに、肝臓障害および/または上皮癌の改良された、より感受性の高い、より早期の、より高速な、および/または非侵襲性の診断および/または改良された、持続性の、および/またはより有効な処置を可能にする。

【0156】

「抗体」または「抗体断片」という用語は、本発明により、遺伝子操作に作成および場合により修飾された抗体またはその抗原結合部分、例えばキメラ抗体、ヒト化抗体、多機能性抗体、二重またはオリゴ特異性抗体、一本鎖抗体、F(ab)またはF(ab)₂断片なども意味するとして理解される(例えば欧州登録特許第0368684号、米国特許第4,816,567号、米国特許第4,816,397号、国際公開公報第88/01649号、国際公開公報93/06213号、国際公開公報98/24884号を参照)。本発明による抗体は、例えば、肝臓障害、例えばHCCおよび/または上皮癌などの本発明による障害の診断、防止、および/または処置に使用できる。

【0157】

本発明は、更に、例えば本発明による障害の診断および/または防止および/または処置のために、本発明による核酸またはその変異体によってコード化されるポリペプチドまたはその機能変異体に対して特異性の抗体または抗体断片、好ましくはポリクローナルまたはモノクローナル抗体を作成する方法に関する。工程は、当業者に一般に既知である方法にしたがって、哺乳類、例えばウサギを、本発明による核酸またはその変異体を用いて

、あるいは本発明による少なくとも6アミノ酸長を有する、好ましくは8アミノ酸長を有する、特に少なくとも12アミノ酸長を有する、ポリペプチドまたはその部分またはその機能変異体によって、適切な場合にはフロイントアジュバントおよび/または水酸化アルミニウムゲルの存在下で免疫化することによって実施される(例えばHarlow and Lane, 1998, Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, New York, USA, Chapter 5, 53~135頁を参照)。次に、免疫反応の結果として動物内で形成されたポリクローナル抗体は、一般に既知の方法にしたがって、例えばカラムクロマトグラフィーによって、血液から容易に分離および精製することができる。モノクローナル抗体は、例えばWinter & Milsteinの既知の方法にしたがって作成できる(Winter and Milstein, 1991, Nature 349: 293-299)。

10

【0158】

本発明は、更に、先に記載したポリペプチドに対して作成されており、先に記載したポリペプチドと特異的に反応する抗体または抗体断片に関し、ここで先に記載したポリペプチドの部分は、それ自体免疫原性であるか、あるいは、例えばウシ血清アルブミンまたはキーホールリンペットヘモシアニンなどの適切な担体に結合させてその免疫原性を上昇させることにより、免疫原性にするかのどちらかである。この抗体はポリクローナルまたはモノクローナルのどちらかである；好ましくはそれはモノクローナル抗体である。

【0159】

なお更に本発明は、例えばKnappikら(2000, J.Molec.Biol.296: 57-86)に、またはChaddおよびChamow(2001 Curr.Opin.Biotechnol.12: 188-94)に記載されているような、組換え抗体発現ライブラリーからの本発明によるポリペプチドに対して特異性である抗体または抗体断片の産生および/または生成に関する。

20

【0160】

本発明の別の実施態様において、アレイが提供され、アレイは、本発明によるポリペプチド、その機能変異体、ポリペプチドをコード化する核酸、核酸の非機能的突然変異体およびポリペプチドに対して作成される抗体または抗体断片からなる群より選択される、少なくとも2つの化合物を含有する。あるいは、アレイは、少なくとも1つの本発明による成分を、腫瘍性または代謝性肝臓障害あるいは上皮癌に関与する先に記載した成分と組合せて含有することもできる。

【0161】

本発明の意味の範囲内で、「アレイ」という用語は、少なくとも2つの化合物が一次元、二次元または三次元配置で付着または結合される、固相またはゲル状担体を指す。このようなアレイは、当業者に一般に既知であり、顕微鏡ガラススライド、特にポリカチオン、ニトロセルロースまたはビオチンコーティングスライドなどのコーティングガラススライド、カバースリップ、および例えばニトロセルロースまたはナイロンを主成分とする膜などの膜の上に産生される。

30

【0162】

先に記載したアレイは、本発明による結合ポリペプチドまたはその機能変異体またはポリペプチドをコード化する核酸、またはその変異体、本発明による融合タンパク質あるいは本発明によるポリペプチドまたはその機能変異体に対して作成された抗体または抗体断片あるいは本発明によるポリペプチドまたはその機能変異体を発現する細胞あるいは少なくとも1つの本発明による核酸、またはその変異体を発現する少なくとも2つの細胞を含む。これらをコード化する核酸、またはその変異体は、アレイの一部でもよい。そのようアレイは、肝臓障害、好ましくはHCC、および/または上皮癌の分析および/または診断に利用できる。

40

【0163】

本発明は、更に、本発明によるアレイを作成する方法に関し、本発明による少なくとも2つの化合物が担体材料に結合される。

【0164】

例えば固相化学および感光保護基に基づいてこのようなアレイを作成する方法は、一般

50

に既知である（米国特許第5,744,305号）。このようなアレイは、物質または物質ライブラリーと接触させて、相互作用、例えば結合または高次構造の変化について試験することもできる。

【0165】

本発明は、更に、肝臓障害、好ましくはHCCなどの本発明による障害の分析および/または診断のための、支持材料に固定されたアレイを作成するための工程に関し、そこでは少なくとも2つの核酸、少なくとも2つのポリペプチドあるいは少なくとも2つの抗体または抗体断片、および/または少なくとも2つの細胞、あるいは先に記載した成分の少なくとも1つが、先に記載したように、腫瘍性および代謝性肝臓障害または上皮癌に関連する他の成分と組合せて調製に使用される。このような工程により作成されたアレイは、

10

【0166】

別の態様において、本発明は、本発明によるポリペプチド、またはその機能変異体、ポリペプチドをコード化する核酸、好ましくは配列番号10~19による核酸、あるいは先に記載した核酸の1つの変異体、および本発明による抗体または抗体断片からなる群より選択された少なくとも1つの化合物を、適切な添加剤または助剤と組合せてまたは共に含有する診断薬に関する。

【0167】

最先端と比較すると、この診断は、驚くべきことに、肝臓障害および/または他の上皮癌の改良された、より感受性の高い、より早期の、より高速な、および/または非侵襲性の診断を可能にする。

20

【0168】

本発明の意味の範囲内で「適切な添加剤」または「助剤」は、当業者に一般に既知であり、例えば生理的食塩水、脱塩水、ゼラチン、またはグリセロールベースタンパク質安定化試薬を含む。あるいは、本発明による核酸またはポリペプチドは、安定化のために凍結乾燥できる。

【0169】

別の例において、本発明による核酸配列に基づく診断キットを作成することができる。このようなキットは、循環系に内在する説明した障害の結果として改変されて、それにより検査患者の血清から検出可能である細胞を、特異的に検出するように設計できる。診断キットの追加の例は、酵素結合免疫測定法（ELISA）、放射性免疫測定法（RIA）、および特異的に反応する免疫細胞の検出を含む、本発明によるポリペプチドに対する免疫反応または特異的抗体の検出を含む。

30

【0170】

好ましい実施態様において、本発明による診断薬は、プローブ、優先的にはDNAプローブを含有する。

【0171】

例えば本発明にしたがって、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）に基づく診断薬を調製することが可能である。規定条件下で、好ましくは本発明による核酸に対して特異的なプライマーをDNAプローブとして使用して、本発明の核酸配列に対して特異的なPCRは、診断または治療目的のために得られた患者より分離されたサンプル中の本発明による特異的核酸の存在、および特に量の両方を監視するために利用される。これは、適切なプローブを利用した、例えば肝臓障害特異的または肝臓特異的遺伝子バンクからの例えば適切な遺伝子またはcDNAライブラリーからの分離によって、説明した核酸を得る更なる可能性を切り開く（例えばJ.Sambrookら、1989、Molecular Cloning.A Laboratory Manual 2nd edn., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY 8章 8.1~8.81頁、9章 9.47~9.58頁および10章 10.1~10.67頁を参照）。

40

【0172】

適切なプローブは、例えば、ヌクレオチド約50~1000個の長さを有する、好ましくはヌクレオチド約10~約100個の長さ、好ましくはヌクレオチド約100~約20

50

0個の長さを有する、特にヌクレオチド約200~500の長さを有するDNAまたはRNA断片であり、その配列は、配列番号1~配列番号9および/または配列番号47によるポリペプチド、およびその機能変異体、および好ましくは配列番号10~配列番号19によるポリペプチドをコード化する核酸、およびその変異体に由来しうる。

【0173】

あるいは、好ましくは、由来核酸配列を用いて、ポリメラーゼ連鎖反応のプライマーとして適切であるオリゴヌクレオチドを合成することが可能である。

【0174】

これを使用して、先に記載した核酸またはこの一部をcDNA、例えばHCC特異的cDNAから増幅および単離することができる。適切なプライマーは、例えば、ヌクレオチド約10~100個の長さを有する、好ましくはヌクレオチド約15~50個の長さを有する、特にヌクレオチド17~30個の長さを有するDNA断片であり、その配列は、配列番号10~配列番号19による核酸からの、配列番号1~配列番号9および/または配列番号47によるポリペプチドから由来しうる。このようなプライマーの設計および合成は、当業者に一般に既知である。プライマーは、更に、制限部位、例えばベクター内への組み込みに適した増幅配列、あるいは、例えば当業者に一般に既知である蛍光マーカなどのマーカ分子が結合した、他のアダプターまたはオーバーハング配列を更に含有することができる。

10

【0175】

本発明の別の態様において、本発明による障害の診断の方法が提供され、そこでは配列番号1~配列番号9および/または配列番号47の配列によるポリペプチド、その機能変異体、ポリペプチドをコード化する核酸、先に記載した核酸の1つの変異体、およびポリペプチドに対して作成された抗体またはその抗体断片からなる群より選択された少なくとも1つの化合物が、患者のサンプル中で同定され、参照ライブラリーまたは参照サンプルの少なくとも1つの化合物と比較される。

20

【0176】

方法の好ましい実施態様において、肝臓の障害は、肝硬変、アルコール性肝臓疾患、慢性肝炎、ウィルソン病、ヘモクロマトーシス、肝細胞癌、良性肝新生物、および限局性結節性過形成からなる群より選択される。

【0177】

方法の好ましい実施態様において、上皮癌は、肝臓以外のいずれかの器官の、好ましくは肺、胃、腎臓、結腸、前立腺、皮膚、および乳房からなる群より選択される器官の腺癌である。

30

【0178】

最先端と比較すると、この診断は、驚くべきことに、改良された、より感受性の高い、より早期の、より高速な、および/または非侵襲性の、肝臓障害および/または他の上皮癌の診断を可能にする。

【0179】

好ましくはサンプルは、先に記載した非侵襲性の方法によって患者から分離される。

【0180】

例えば、特異的調節解除遺伝子タンパク質のELISAアッセイによる血清検出は、調節解除遺伝子生成物に対する抗体の1つまたは群のどちらかの1つの応用であり、そこから診断スコアが、罹患患者からの罹患組織または血清で発現される遺伝子の組合せ、および発現レベルに基づいて導き出される。

40

【0181】

本発明による好ましい診断は、説明したポリペプチドまたは先に更に詳細に記載したその免疫原性部分を含有する。好ましくは、例えばニトロセルロースまたはナイロンの固相に結合されたポリペプチドまたはその部分は、例えば調査する体液、例えば血液、血清、血漿、腹水、乳房水、脳脊髄液、唾液、尿、精液にインビトロで接触させて、それゆえ例えば患者の血液中に存在する例えば自己免疫抗体と反応させることができる。そこで抗体

50

- ペプチド複合体は、例えば、標識抗ヒトIgG抗体を用いて検出することができる。標識化は、例えば、呈色または化学発光反応を触媒するペルオキシダーゼなどの酵素を包含する。それゆえ存在する自己免疫抗体の存在および量は、色によって容易および迅速に検出できる。

【0182】

加えて診断は、患者から分離したサンプル中に存在する内在性抗体またはその断片を検知するを目的としており、その抗体またはその断片は、本発明によるポリペプチドに対して作成されている。このような自己免疫抗体の検出は、当業者に一般に既知である方法によって、例えば本発明によるポリペプチドまたはその機能変異体またはその部分をプローブとして用いた、免疫親和性アッセイによって実施できる。好ましくはこのような自己免疫抗体の存在は、本発明による障害を患う患者を示す。

10

【0183】

本発明の主題である更なる診断は、本発明による抗体そのものを含有する。これらの抗体を用いて、例えば関与する本発明によるポリペプチドが増加した量で存在するかどうかに関して組織サンプルを容易および迅速に調査して、それにより肝臓障害、例えばHCCを含む考えられる疾患の指標を得ることができる。この場合、本発明による抗体は、好ましくは直接標識されるか、更に一般的には、例えばこれらは既に先に記載したように酵素または蛍光分子によってなど、特異的に二次抗体によって間接的に検出される。特異的抗体-ペプチド複合体はそれにより、例えば酵素呈色反応によって、容易および迅速に検出することができる。

20

【0184】

本発明のなお別の態様において、参照ライブラリーまたは参照サンプルに対して、患者から分離したサンプル中でディファレンシャルに発現された、配列番号10～配列番号19による少なくとも1つの核酸、またはその変異体を同定するための方法であって、以下の工程：

(a) 患者から分離したサンプル中で、配列番号10～配列番号19による少なくとも1つの核酸、またはその変異体の発現を検出する工程と；

(b) 工程(a)で検出された上記核酸の発現を、参照ライブラリーまたは参照サンプル中の同じ核酸の発現と比較する工程と；

(c) 参照ライブラリーまたは参照サンプルと比較して、患者から分離したサンプル中で異なって発現された上記核酸を同定する工程と；

30

を含む方法が提供される。

【0185】

最先端と比較すると、方法は、驚くべきことに、本発明による障害を診断するために有用な基準を提供する、改良された、より感受性の高い、容易で、より高速な、および/または非侵襲性の、異なって発現された本発明による核酸の同定を可能にする。

【0186】

好ましくは少なくとも2つの、少なくとも3つの、少なくとも4つの、少なくとも5つの、少なくとも6つの、または少なくとも7つの核酸が同定される。

【0187】

方法の別の好ましい実施態様において、上記核酸は、PCRベースの検出によって、またはハイブリダイゼーションアッセイによって検出される。

40

【0188】

方法の別の好ましい実施態様において、上記核酸の発現は、固相ベースのスクリーニング方法、ハイブリダイゼーション、サブトラクティブ・ハイブリダイゼーション、ディファレンシャルディスプレイ、およびRNase保護アッセイからなる群から選択される方法によって比較される。

【0189】

方法の更に好ましい実施態様において、患者から分離したサンプルは、肝臓組織、肝臓細胞、癌性形質転換を受けた別の器官からの組織、この器官からの細胞、血液、血清、血

50

漿、腹水、乳房水、脳脊髄液、唾液、尿、精液、および糞からなる群より選択される。

【0190】

好ましくは参照サンプルは、同じ患者の非罹患サンプルまたは別の対象者からの非罹患サンプルから選択された供給源より分離される。適切な参照サンプルの選択は、当業者に一般に既知である。特に、参照サンプルは、肝臓組織、肝臓細胞、血液、血清、血漿、腹水、乳房水、脳脊髄液、唾液、尿、精液、および糞からなる群より選択できる。

【0191】

方法の別の好ましい実施態様において、参照ライブラリーは、好ましくは肝臓組織、肝臓細胞、血液、血清、血漿、腹水、乳房水、脳脊髄液、唾液、尿、精液、および糞からなる群より選択されるサンプル中の、本発明による少なくとも1つの核酸の非罹患発現に関するクローンまたはデータを含む発現ライブラリーまたはデータベースである。

10

【0192】

本発明の別の態様において、肝臓障害および/または別の上皮癌を診断する方法であって、以下の工程：

(a) 患者から分離したサンプル中で、配列番号10～配列番号19および/または配列番号47による少なくとも1つの核酸、またはその変異体の発現を検出するステップと；

(b) 工程(a)で検出された上記核酸の発現を、参照ライブラリーまたは参照サンプル内での同じ核酸の発現と比較する工程と；

(c) 参照ライブラリーまたは参照サンプルと比較して、患者から分離したサンプル中で異なって発現された上記核酸を同定する工程と；

20

(d) 工程(c)で同定した上記核酸を、病理参照サンプルまたは病理参照ライブラリー中で異なって発現された上記核酸と一致させる工程と；

を含み、

一致した核酸が、肝臓障害および/または他の上皮癌を患う患者を示す、方法が提供される。

【0193】

最先端と比較すると、診断のこの方法は、驚くべきことに、改良された、より感受性の高い、容易で、より高速な、および/または非侵襲性の、肝臓障害および/または他の上皮癌の診断を可能にする。

30

【0194】

好ましくは少なくとも2つの、少なくとも3つの、少なくとも4つの、少なくとも5つの、少なくとも6つの、または少なくとも7つの核酸が同定される。

【0195】

方法の別の好ましい実施態様において、上記核酸は、PCRベースの検出によって、またはハイブリダイゼーションアッセイによって検出される。

【0196】

方法の別の好ましい実施態様において、上記核酸の発現は、固相ベースのスクリーニング方法、ハイブリダイゼーション、サブトラクティブ・ハイブリダイゼーション、ディフアレンシャルディスプレイ、およびRNase保護アッセイからなる群から選択される方法によって比較される。

40

【0197】

方法の更に好ましい実施態様において、患者から分離したサンプルは、肝臓組織、肝臓細胞、癌性形質転換を受けた別の器官からの組織、この器官からの細胞、血液、血清、血漿、腹水、乳房水、脳脊髄液、唾液、尿、精液、および糞からなる群より選択される。

【0198】

好ましくは参照サンプルは、同じ患者の非罹患サンプルまたは別の対象者からの非罹患サンプルから選択された供給源より分離される。適切な参照サンプルの選択は、当業者に一般に既知である。特に、参照サンプルは、肝臓組織、肝臓細胞、血液、血清、血漿、腹水、乳房水、脳脊髄液、唾液、尿、精液、および糞からなる群より選択できる。

50

【0199】

診断の方法の別の好ましい実施態様において、参照ライブラリーは、好ましくは肝臓組織、肝臓細胞、血液、血清、血漿、腹水、乳房水、脳脊髄液、唾液、尿、精液および糞からなる群より選択されるサンプル中の、本発明による少なくとも1つの核酸の非罹患発現に関するクローンまたはデータを含む発現ライブラリーまたはデータベースである。

【0200】

診断の方法の別の好ましい実施態様において、病理参照サンプルは、別の患者からの罹患サンプルから分離される。後者の患者は、診断される本発明による障害を患っていると診断されている。適切な病理参照サンプルの選択は、当業者に一般に既知である。特に病理参照サンプルは、肝臓組織、肝臓細胞、血液、血清、血漿、腹水、乳房水、脳脊髄液、唾液、尿、精液、および糞からなる群より選択できる。

10

【0201】

診断の本発明の別の好ましい実施態様において、病理参照ライブラリーは、診断中の患者を除いて、参照サンプルまたは参照ライブラリーでの対照発現に対する、本発明の方法で診断される本発明による障害を患う、少なくとも1人の患者から分離されたサンプル中の、本発明による少なくとも1つの核酸のディファレンシャル発現に関するデータを含むデータベースである。病理参照ライブラリーは、好ましくは、診断中の患者を除いて、参照サンプルまたは参照ライブラリーでの対照発現に対して本発明の方法で診断される本発明による障害を患う、少なくとも1人の患者から分離されたサンプル中で異なって発現される、本発明による核酸を含むディファレンシャル発現ライブラリーにも関する。適切な病理参照ライブラリーの選択は、当業者に一般に既知である。

20

【0202】

好ましくは肝臓障害は、肝硬変、アルコール性肝臓疾患、慢性肝炎、ウィルソン病、ヘモクロマトーシス、肝細胞癌、良性肝新生物、および限局性結節性過形成からなる群より選択される障害である。特に上皮癌は、肝臓以外のいずれかの器官の、好ましくは肺、胃、腎臓、結腸、前立腺、皮膚、および乳房からなる群より選択される器官の腺癌である。

【0203】

本発明の意味の範囲内で「核酸を検出する」という用語は、好ましくはサンプル中に存在する他の成分のバックグラウンドから本発明による核酸を発見、描出、分離する、またはその識別を可能にする方法を指す。このような方法は、当業者に一般に既知であり、インサイチュハイブリダイゼーション、PCR増幅、ゲル電気泳動、ノーザンブロット、固相アレイ（遺伝子チップ）ベースの方法、ヌクレアーゼ保護方法を含む（Alberts, ら（2002）The Molecular Biology of the Cell, 4th ed. Garland, New York, USAで説明および引用）。

30

【0204】

本発明の意味の範囲内で、「工程（a）で検出された上記核酸の発現を、参照ライブラリーまたは参照サンプル中の同じ核酸の発現と比較する」という用語は、定量的または定性的レベルでの、ディファレンシャルディスプレイ、サブトラクティブ・ハイブリダイゼーション、RNAse保護アッセイ、または特にDNAチップハイブリダイゼーションなどの実験手順による、上記核酸の2つの群の発現の比較を指す。その上、先に定義したように、工程（a）で検出された上記核酸の実験データの、参照ライブラリー中の同じ核酸の発現との比較も本明細書に含まれている。

40

【0205】

「参照ライブラリーまたは参照サンプルと比較して、患者から分離したサンプル中で異なって発現された上記核酸を同定する」という用語は、本発明の意味の範囲内で、以下の基準を満足する、参照ライブラリーまたは参照サンプルと比較して異なって発現された上記核酸を選択することを意味すると理解される：検出された上記核酸のディファレンシャル発現のレベルが、参照ライブラリーまたは参照サンプルと比較して、約2倍以上、好ましくは約5倍以上、更に好ましくは約10倍以上アップレギュレートされる。

【0206】

50

「工程(c)で同定した上記核酸を、病理参照サンプルまたは病理参照ライブラリー中で異なって発現された上記核酸と一致させる」という用語は、本発明の意味の範囲内で、工程(c)で同定した上記核酸を、病理参照サンプルまたは病理参照ライブラリー中で異なって発現された上記核酸と比較することを意味すると理解される。そこで病理参照サンプルまたは病理参照ライブラリー中で異なって発現された、工程(c)で同定した上記核酸は一致され、すなわち上記同一対は、同定および割当される。病理参照サンプルまたは病理参照ライブラリー中での上記核酸のディファレンシャル発現は、本発明による障害を示すため、サンプル中のディファレンシャル発現とのこのような一致は、患者がその障害を患っていることを示す。

【0207】

サンプルは、好ましくは、非侵襲性の、または静脈穿刺を含む、先に記載したような好ましくは最小限の侵襲性方法によって患者から分離される。

【0208】

本発明による診断の方法は、参照サンプルに対する、または参照ライブラリーに対する、肝臓障害および/または上皮癌を患う動物および/またはヒト患者から分離したサンプル中で検出された本発明による核酸の本質的に一致した発現パターンに基づいて、肝臓障害および/または上皮癌の初期検出、および/または障害の非侵襲性診断を可能にする。方法は、追加の利点を有し、肝臓障害の異なるサブタイプ、例えばHCCのサブタイプなどを特徴付けるために、追加のおよび新規な診断パラメータも提供する。

【0209】

本発明による核酸の「実質的に一致した発現パターン」という用語は、比較された患者または対象者が同じまたは比較可能な病理状態または健康状態にそれぞれあるという条件で、患者間または対象者間で本質的に再現性である発現のパターンを指す。

【0210】

本発明のなお別の態様において、参照ライブラリーまたは参照サンプルに対して、患者から分離されたサンプル中で異なって発現された配列番号1～配列番号9および/または配列番号47による少なくとも1つのポリペプチド、またはその機能変異体を同定する方法であって、以下の工程：

(a)患者から分離されたサンプル中で、配列番号1～配列番号9および/または配列番号47による少なくとも1つのポリペプチド、またはその機能変異体の発現を検出する工程と；

(b)工程(a)で検出された上記ポリペプチドの発現を、参照ライブラリーまたは参照サンプル中の上記ポリペプチドの発現と比較する工程と；

(c)参照ライブラリーまたは参照サンプルと比較して、患者から分離したサンプル中で異なって発現された上記ポリペプチドを同定する工程と；
を含む方法が提供される。

【0211】

最先端と比較すると、この方法は、驚くべきことに、本発明による障害を診断するために有用な基準を提供する、改良された、より感受性の高い、容易で、より高速な、および/または非侵襲性の、異なって発現された本発明によるポリペプチドの同定を可能にする。

【0212】

好ましくは2つの、少なくとも3つの、少なくとも4つの、少なくとも5つの、少なくとも6つの、または少なくとも7つのポリペプチドが同定される。

【0213】

サンプルは、好ましくは、非侵襲性の、または静脈穿刺を含む、先に記載したような好ましくは最小限の侵襲性方法によって患者から分離される。

【0214】

方法の別の実施態様において、サンプルは、先に更に定義したようなサンプルである。好ましくは参照サンプルは、先に定義したような参照サンプルである。

10

20

30

40

50

【0215】

方法の別の好ましい実施態様において、参照ライブラリーは、好ましくは肝臓組織、肝臓細胞、血液、血清、血漿、腹水、乳房水、脳脊髄液、唾液、尿、精液、および糞からなる群より選択されるサンプル中の、本発明による少なくとも1つのポリペプチドの非罹患発現に関するクローンまたはデータを含む発現ライブラリーまたはデータベースである。このようなデータベースは、本発明によるcDNAマイクロアレイ発現分析の結果として作成され、当業者に既知である。本発明により使用できる更なる参照ライブラリーは、上述されている。

【0216】

本発明の別の態様において、肝臓障害および/または上皮癌を診断する方法であって、以下の工程：

(a) 患者から分離されたサンプル中で、配列番号1～配列番号9および/または配列番号47による少なくとも1つのポリペプチド、および/またはその機能変異体の発現を検出する工程と；

(b) 工程(a)で検出された上記ポリペプチドの発現を、参照ライブラリーまたは参照サンプル中の上記ポリペプチドの発現と比較する工程と；

(c) 参照ライブラリーまたは参照サンプルと比較して、患者から分離したサンプル中で異なって発現された上記ポリペプチドを同定する工程と；

(d) 工程(c)で同定した上記ポリペプチドを、病理参照サンプルまたは病理参照ライブラリー中で異なって発現された上記ポリペプチドと一致させる工程と；

を含み、一致したポリペプチドが、肝臓障害および/または他の上皮癌を患う患者を示す、方法が提供される。

【0217】

最先端と比較すると、診断のこの方法は、驚くべきことに、改良された、より感受性の高い、容易で、より高速な、および/または非侵襲性の、肝臓障害および/または他の上皮癌の診断を可能にする。

【0218】

好ましくは少なくとも2つの、少なくとも3つの、少なくとも4つの、少なくとも5つの、少なくとも6つの、または少なくとも7つのポリペプチドが同定される。

【0219】

本発明の意味の範囲内で「ポリペプチドを検出する」という用語は、好ましくはサンプル中に存在する他の成分のバックグラウンドから本発明によるポリペプチドを発見、描出、分離する、および/またはその識別を可能にする方法を指す。このような方法は、当業者に一般に既知であり、先に記載したように、ゲル電気泳動、クロマトグラフィー技法、免疫プロット分析、免疫組織化学、酵素ベース免疫アッセイ、質量分析法、高圧液体クロマトグラフィー、表面プラズモン共鳴、および/または抗体およびタンパク質アレイを含む(Ausubel, F.A.ら, 編, 1990, Current Protocols in Molecular Biology. Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, USA, 10章; Myszka and Rich 2000, Pharm.Sci.Technol.Today 3: 310-317)。好ましくは、タンパク質およびポリペプチドは、例えば物理剪断または超音波手段を用いた細胞の破碎によって、サンプルから調製される。タンパク質を還元剤処置および加熱によって変性および安定化して、タンパク質は電気泳動ポリアクリルアミドゲルでサイズ分画する。

【0220】

本発明の意味の範囲内で、「工程(a)で検出された上記ポリペプチドの発現を、参照ライブラリーまたは参照サンプル中の同じポリペプチドの発現と比較する」という用語は、定量的または定性的レベルでの、二次元ゲル電気泳動、クロマトグラフィー分離技法、免疫プロット分析、表面プラズモン共鳴、免疫組織化学、および酵素ベース免疫アッセイなどの実験手順による、ポリペプチドの2つの群の発現の比較を指す。二次元ゲル電気泳動では、すべてのペプチドは、最初に第一次元目の電気泳動の等電点によって、次に当業

者に周知の方法にしたがってサイズによって分解される。その上、先に定義したように、工程 1 で検出した少なくとも 1 つのポリペプチドに関する実験データと、参照ライブラリー中のポリペプチドの発現との比較も、本明細書に含まれている。

【0221】

「参照ライブラリーまたは参照サンプルと比較して、患者から分離したサンプル中で異なって発現された上記ポリペプチドを同定する」という用語は、本発明の意味の範囲内で、以下の基準を満足する、参照ライブラリーまたは参照サンプルと比較して異なって発現された上記ポリペプチドを選択することを意味すると理解される：検出されたポリペプチドのディファレンシャル発現のレベルが、参照ライブラリーまたは参照サンプルと比較して、約 2 倍以上、好ましくは約 5 倍以上、更に好ましくは約 10 倍以上アップレギュレート

10

【0222】

「工程 (c) で同定した上記ポリペプチドを、病理参照サンプルまたは病理参照ライブラリー中で異なって発現された上記ポリペプチドと一致させる」という用語は、本発明の意味の範囲内で、工程 (c) で同定した上記ポリペプチドを、病理参照サンプルまたは病理参照ライブラリー中で異なって発現された上記ポリペプチドと比較することを意味すると理解される。そこで病理参照サンプルまたは病理参照ライブラリー中で異なって発現された、工程 (c) で同定した上記ポリペプチドは一致され、すなわち上記同一対は、同定および割当される。病理参照サンプルまたは病理参照ライブラリー中での上記ポリペプチドのディファレンシャル発現は、本発明による障害を示すため、サンプル中のディファレ

20

【0223】

サンプルは、好ましくは、非侵襲性の、または静脈穿刺を含む、先に記載したような好ましくは最小限の侵襲性方法によって患者から分離される。

【0224】

方法の別の実施態様において、サンプルは、先に更に定義したようなサンプルである。好ましくは参照サンプルは、先に定義したような参照サンプルである。

【0225】

診断の方法の別の好ましい実施態様において、参照ライブラリーは、好ましくは肝臓組織、肝臓細胞、血液、血清、血漿、腹水、乳房水、脳脊髄液、唾液、尿、精液、および糞

30

【0226】

本発明によるデータベースの例および本発明によって使用できる更なる実験参照ライブラリーは、上述されている。

【0227】

診断の方法の別の好ましい実施態様において、病理参照サンプルは、先に定義したような病理参照サンプルである。

【0228】

診断の方法の別の好ましい実施態様において、病理参照ライブラリーは、診断中の患者を除いて、参照サンプルまたは参照ライブラリーでの対照発現に対して本発明の方法で診断される本発明による障害を患う、少なくとも 1 人の患者から分離されたサンプル中の、本発明による少なくとも 1 つの上記ポリペプチドのディファレンシャル発現に関するデータを含むデータベースである。病理参照ライブラリーは、診断中の患者を除いて、参照サンプルまたは参照ライブラリーでの対照発現に対して本発明の方法で診断される本発明による障害を患う、少なくとも 1 人の患者から分離されたサンプル中で異なって発現される、本発明によるポリペプチドを含むディファレンシャル発現ライブラリーにも関する。適切な病理参照ライブラリーの選択は、当業者に一般に既知である。

40

【0229】

50

好ましくは肝臓障害は、肝硬変、アルコール性肝臓疾患、慢性肝炎、ウィルソン病、ヘモクロマトーシス、肝細胞癌、良性肝新生物、および限局性結節性過形成からなる群より選択される障害である。特に上皮癌は、肝臓以外のいずれかの器官の、好ましくは肺、胃、腎臓、結腸、前立腺、皮膚、および乳房からなる群より選択される器官の腺癌である。

【0230】

本発明による診断の方法は、参照サンプルに対する、または参照ライブラリーに対する、肝臓障害および/または上皮癌を患う動物および/またはヒト患者から分離したサンプル中で検出された本発明によるポリペプチドの本質的に一致した発現パターンに基づいて、肝臓障害および/または上皮癌の初期検出、および/または障害の非侵襲性診断を可能にする。方法は、追加の利点を有し、肝臓障害の異なるサブタイプ、例えばHCCのサブタイプなどを特徴付けるために、追加のおよび新規な診断パラメータも提供する。

10

【0231】

本発明によるポリペプチドの「本質的に一致した発現パターン」という用語は、比較された患者または対象者が同じまたは比較可能な病理状態または健康状態にそれぞれあるという条件で、患者間または対象者間で本質的に再現性である発現のパターンを指す。

【0232】

本発明の別の態様において、本発明によるポリペプチド、その機能変異体、先に記載したポリペプチドの1つをコード化する核酸、先に記載した核酸の1つの変異体、先に記載した核酸の1つの非機能的突然変異体である核酸、先に記載した核酸の1つに対して相補性である配列を有する核酸、先に記載した核酸の1つを含むベクター、先に記載した核酸の1つを含む細胞、先に記載したベクターを含む細胞、先に記載したポリペプチドの1つに対して作成された抗体または抗体の断片、先に記載した抗体をコード化する核酸を含むベクター、先に記載した抗体をコード化する核酸を含むベクターを含む細胞、および先に記載した抗体断片をコード化する核酸を含むベクターを含む細胞からなる群より選択される少なくとも1つの化合物を、適切な添加剤または助剤と組合せてまたは共に含む医薬組成物が提供される。好ましい実施態様において、医薬組成物は、本発明による少なくとも1つの細胞を、適切な添加剤または助剤と組合せてまたは共に含有する

20

【0233】

肝臓障害および/または他の上皮癌の療法の最先端と比較すると、本発明による医薬組成物は、驚くべきことに、改良された、持続性の、および/またはより有効な処置を提供する。

30

【0234】

医薬組成物は、本発明が意味するところで、肝臓障害および/または上皮癌を防止および/または処置するために使用できる薬剤を含む。医薬組成物は、例えば、細胞系、好ましくは真核系における特異的抗体遺伝子断片の発現により生成された安定化組換え抗体を含む。組換え抗体治療薬は、例えば罹患肝臓領域への、または静脈または動脈血管系への、または肝門脈系への注入によって送達される。注入は、治療有効性を達成するために、定期的な間隔で反復することができる。本発明による治療薬は、有効性を向上させるために、他の化学薬品、抗体、または他のいずれかの治療処理と組合せて利用することもできる。

40

【0235】

本発明は、本発明による障害、例えばHCCの処置および/または防止のための医薬組成物を製造する工程にも関し、そこで、本発明によるポリペプチド、その機能変異体、先に記載したポリペプチドの1つをコード化する核酸、先に記載した核酸の1つの変異体、先に記載した核酸の1つの非機能的突然変異体である核酸、先に記載した核酸の1つに対して相補性である配列を有する核酸、先に記載した核酸の1つを含むベクター、先に記載した核酸の1つを含む細胞、先に記載したベクターを含む細胞、先に記載したポリペプチドの1つに対して作成された抗体または抗体の断片、先に記載した抗体の1つをコード化する核酸を含むベクター、先に記載した抗体の1つをコード化する核酸を含むベクターを含む細胞、および先に記載した抗体断片の1つをコード化する核酸を含むベクターを含む

50

細胞からなる群より選択される少なくとも1つの化合物が、適切な添加剤と共に組合されるか、混合される。

【0236】

本発明は、更に、肝臓障害および/または上皮癌、例えばHCCの処置および/または防止のためにこの工程によって製造された医薬組成物に関し、その医薬組成物は、本発明によるポリペプチド、その機能変異体、先に記載したポリペプチドの1つをコード化する核酸、先に記載した核酸の1つの変異体、先に記載した核酸の1つの非機能的突然変異体である核酸、先に記載した核酸の1つに対して相補性である配列を有する核酸、先に記載した核酸の1つを含むベクター、先に記載した核酸の1つを含む細胞、先に記載した核酸の1つを含む細胞、先に記載したベクターを含む細胞、先に記載したポリペプチドの1つ 10
に対して作成された抗体または抗体の断片、先に記載した抗体の1つをコード化する核酸を含むベクター、先に記載した抗体の1つをコード化する核酸を含むベクターを含む細胞、および先に記載した抗体断片の1つをコード化する核酸を含むベクターを含む細胞からなる群より選択される少なくとも1つの化合物を、適当ならば適切な添加剤および助剤と共に含有する。本発明は、更に、肝臓障害、例えばHCCおよび/または上皮癌の防止および/または処置のための本医薬組成物の使用に関する。

【0237】

好ましくは医薬組成物は、肝硬変、アルコール性肝臓疾患、慢性肝炎、ウィルソン病、ヘモクロマトーシス、肝細胞癌、良性肝新生物、および限局性結節性過形成からなる群より選択される肝臓障害の処置に利用される。特に医薬組成物は、肝臓以外のいずれかの器 20
官の、好ましくは肺、胃、腎臓、結腸、前立腺、皮膚、および乳房からなる群より選択される器官の腺癌である上皮癌の処置に利用される。

【0238】

療法は、当業者に一般に既知である従来方法で、例えば本発明による医薬組成物の経口投与によって、または静脈注射を介しても実施できる。それゆえ、例えば生理的食塩水、脱塩水、安定剤、プロテイナーゼインヒビターなどの適切な添加剤または助剤を含む医薬組成物を投与することが可能である。

【0239】

本発明による少なくとも1つのポリペプチド、その機能変異体またはポリペプチドをコード化する核酸、またはその変異体を発現する細胞の使用に基づいた療法は、自己または 30
異種細胞を使用して実施できる。好ましい細胞は、肝臓細胞、例えば肝臓細胞、肝臓生成幹または前駆細胞の初代培養物、あるいは血液細胞を含む。細胞は、適切な担体材料を用いて、組織、好ましくは血液に添加または肝臓に注入することができる。このような療法は、好ましくは、本発明によるポリペプチドの発現および/または放出時に、ポリペプチドが、処置を必要とする患者において免疫反応を刺激するという概念に基づく。

【0240】

好ましくは、治療アプローチは、本発明による少なくとも1つのポリペプチドの機能および/または発現および/または本発明による少なくとも1つの核酸の機能および/または発現を抑制することに向けられている。発現および/または機能のこのような抑制は、 40
好ましくは、標的化された核酸/ポリペプチドの発現および/または機能を著しく低下させる。発現および/または機能の抑制は、好ましくは、標的化核酸/ポリペプチドの発現および/または機能を除去する。標的化核酸/ポリペプチド発現および/または機能のこのような低下または除去は、当業者に一般に既知であるポリペプチド/核酸の発現および/または機能を判定する従来のアッセイを使用して決定できる。特に機能を判定するこのようなアッセイは、医薬組成物の投与前および投与後の、標的化核酸/ポリペプチドの生物活性を比較する方法を含む。好ましくは発現を判定するこのようなアッセイは、医薬組成物の投与前および投与後の、標的化核酸/ポリペプチドの発現のレベルを比較する方法を含む。

【0241】

このような療法は、好ましくは、本発明による核酸の1つに対して相補性である配列を 50

有する核酸、すなわち転写された本発明による核酸の翻訳を低下または停止させ、それにより標的化核酸／ポリペプチドの機能および／または発現を抑制するアンチセンス分子またはRNA干渉分子の使用によって実施される。好ましくは相補性配列を有するこのような核酸は、このような核酸を含むベクターまたは細胞の形で利用できる。療法はポリペプチドレベルで、本発明によるポリペプチドに対して作成された抗体または抗体断片の使用によって特に実施できる。抗体または抗体断片は、患者に直接投与されるか、または、好ましくは、抗体をコード化する核酸が、好ましくは細胞に含有されるベクターに含有されている。次に細胞またはベクターは、このような治療が必要な患者に投与できる。

【0242】

肝臓障害および／または他の上皮癌の療法の最先端と比較すると、本発明による処置の方法は、驚くべきことに、改良された、持続性の、および／または更に有効な処置を提供する。

10

【0243】

本発明は、更に、肝臓障害を患う患者を治療する方法に関し、ここでは本発明によるポリペプチド、その機能変異体、先に記載したポリペプチドの1つをコード化する核酸、先に記載した核酸の1つの変異体、先に記載した核酸の1つの非機能的突然変異体である核酸、先に記載した核酸の1つに対して相補性である配列を有する核酸、先に記載した核酸の1つを含むベクター、先に記載した核酸の1つを含む細胞、ベクターを含む細胞、ポリペプチドに対して作成された抗体、抗体の断片、抗体をコード化する核酸を含むベクター、抗体をコード化する核酸を含むベクターを含む細胞、および抗体断片をコード化する核酸を含むベクターを含む細胞からなる群より選択される少なくとも1つの成分が、場合により適切な添加剤および／または助剤と組合せてまたは共に、治療が必要な患者に治療の有効量で投与される。

20

【0244】

好ましくは、治療の方法は、肝硬変、アルコール性肝臓疾患、慢性肝炎、ウィルソン病、ヘモクロマトーシス、肝細胞癌、良性肝新生物、および限局性結節性過形成からなる群より選択される肝臓障害を対象とする。特に治療の方法は、肝臓以外のいずれかの器官の、好ましくは肺、胃、腎臓、結腸、前立腺、皮膚、および乳房からなる群より選択される器官の腺癌である上皮癌を対象とする。

【0245】

このような化合物または細胞を投与する方法は、先に詳細に説明されている。

30

【0246】

「治療的有效量」という用語は、先に定義したような「有効な治療」を生じる化合物の量の患者への投与を指す。化合物の治療的有效量の判定は、当業者に一般に既知である。

【0247】

治療のこのような方法は、先に記載したように肝臓障害および／または上皮癌の有効な治療を可能にする。

【0248】

本発明の別の態様において、本発明によるポリペプチド、またはその機能変異体に対する、肝臓障害および／または上皮癌を患う患者の免疫反応を刺激する方法が提供され、ここでは本発明によるポリペプチド、その機能変異体、先に記載したポリペプチドの1つをコード化する核酸、先に記載した核酸の1つの変異体、先に記載した核酸の1つを含むベクター、先に記載した核酸の1つを含む細胞、および先に記載したベクターを含む細胞からなる群より選択される少なくとも1つの成分がこのような治療が必要な患者に、患者の免疫反応を刺激するのに有効な量で投与される。

40

【0249】

障害および／または他の上皮癌の療法の最先端と比較すると、本発明による免疫反応を刺激する方法は、驚くべきことに、改良された、持続性の、および／または更に有効な免疫化を提供する。

【0250】

50

本発明の別の態様において、患者が、肝臓障害および/または上皮癌を発現するのを防止する方法が提供され、ここでは本発明によるポリペプチド、その機能変異体、先に記載したポリペプチドの1つをコード化する核酸、先に記載した核酸の1つの変異体、先に記載した核酸の1つに対して相補性である配列を有する核酸、先に記載した核酸の1つの非機能的突然変異体である核酸、先に記載した核酸の1つを含むベクター、先に記載した核酸の1つを含む細胞、および先に記載したベクターを含む細胞からなる群より選択される少なくとも1つの成分が、このような防止処置が必要な患者に治療的有効量で投与される。

【0251】

肝臓障害および/または他の上皮癌の療法の最先端と比較すると、本発明による防止の方法は、驚くべきことに、改良された、持続性の、および/または更に有効な予防措置を提供する。

10

【0252】

好ましくは免疫反応を防止する方法および/または刺激する方法は、肝硬変、アルコール性肝臓疾患、慢性肝炎、ウィルソン病、ヘモクロマトーシス、肝細胞癌、良性肝新生物、および限局性結節性過形成からなる群より選択される肝臓障害を対象とする。特に好ましくは、免疫反応を防止する方法および/または刺激する方法は、肝臓以外のいずれかの器官の、好ましくは肺、胃、腎臓、結腸、前立腺、皮膚、および乳房からなる群より選択される器官の腺癌である上皮癌を対象とする。

【0253】

更なる態様において、本発明は、少なくとも1つの薬理的活性化合物を同定する方法であって、以下の工程：

20

(a) 配列番号1~9および/または配列番号47による少なくとも1つのポリペプチド、またはその機能変異体を提供する工程と；

(b) 上記ポリペプチドに、薬理的活性化合物であることが疑われる化合物を接触させる工程と；

(c) 工程(a)の上記ポリペプチドと薬理的活性であることが疑われる上記化合物との相互作用をアッセイする工程と；

(d) 工程(a)の上記ポリペプチドと直接または間接的に相互作用する、薬理的活性であることが疑われる上記化合物を同定する工程と；

30

を含む方法に関する。

【0254】

好ましくは、上記ポリペプチドは、カラムに付着された上記ポリペプチド、アレイに付着された上記ポリペプチド、電気泳動ゲルに含有された上記ポリペプチド、膜に付着された上記ポリペプチド、および細胞によって発現された上記ポリペプチドからなる群より選択される形で提供される。

【0255】

薬理的活性が疑われる化合物と工程(a)の上記ポリペプチドの組換え融合タンパク質との相互作用が検出される、酵素および蛍光ベース細胞レポーターアッセイの群より選択される方法によって、相互作用をアッセイすることが好ましい。相互作用は、好ましくは、表面プラズモン共鳴、HPLC、および質量分析法によってもアッセイできる。好ましくは直接または間接相互作用は、上記ポリペプチドの発現の誘発、上記ポリペプチドの発現の抑制、上記ポリペプチドの機能の活性化、上記ポリペプチドの機能の抑制からなる群より選択される。

40

【0256】

「薬理的活性物質」という用語は、本発明が意味するところで、適切な条件下で配列番号1~9および/または配列番号47によるポリペプチド、またはその機能変異体(配列番号10~19によってコード化)と、適当な場合は適切な添加剤および/または助剤と共に相互作用することが可能である、これらの分子、化合物および/または組成物および物質混合物すべてを意味すると理解される。考えられる薬理的活性物質は、簡単な化

50

学（有機または無機）分子または化合物であるが、ペプチド、タンパク質またはその複合体を含むこともできる。薬理的活性物質の例は、その薬理的活性について分析されている化合物のライブラリーから由来する有機分子である。その相互作用によって、薬理的活性物質は、インピボまたはインピトロでポリペプチドの発現および/または機能に影響を及ぼすか、または代わりに先に記載したポリペプチドに単に結合するか、またはそれらとの共有的または非共有的な方法の他の相互作用の一部になることができる。

【0257】

本発明によって使用できる適切な試験システムは、二重ハイブリッドシステムとの相互作用を同定することに基づいている（Fields and Stenglanz, 1994, Trends in Genetics, 10, 286-292; Colas and Brent, 1998 TIBTECH, 16, 355-363）。この試験システムにおいて、細胞は、少なくとも1つの本発明によるポリペプチドおよびGal4またはLexAなどの転写因子のDNA結合ドメインからなる融合タンパク質を発現する発現ベクターによって形質転換される。形質転換された細胞は、レポーター遺伝子も含有し、そのプロモーターは、対応するDNA結合ドメインへの結合部位を含有する。既知または未知のポリペプチドおよび例えばGal4または単純ヘルペスウイルスVP16からの活性化ドメインからなる第二の融合タンパク質を発現する、更なる発現ベクターを形質転換することによって、第二の融合タンパク質が調査した本発明によるポリペプチドと相互作用するならば、レポーター遺伝子の発現を大幅に増加させることができる。発現のこの増加は、第二の融合タンパク質を作成する目的で、例えば肝臓組織、または罹患肝臓組織からcDNAライブラリーを作成することによって、新しい相互作用パートナーを同定するために使用できる。好ましい実施態様において、相互作用パートナーは、配列番号1~9および/または配列番号47（配列番号10~19によってコード化）によるポリペプチドまたはその機能変異体のインヒビターである。この試験システムは、本発明によるポリペプチドと相互作用パートナーとの間の相互作用を抑制する物質をスクリーニングするためにも使用できる。このような物質は、本発明によるポリペプチドの融合タンパク質および相互作用パートナーを発現させる細胞において、レポーター遺伝子の発現を減少させる（Vidal and Endoh, 1999, Trends in Biotechnology, 17: 374-81）。このようにして、肝臓障害および/または上皮癌の療法および/または防止に利用できる、新規な活性化化合物を迅速に同定することが可能である。

【0258】

タンパク質の発現に影響を及ぼす薬理的活性物質を同定するアッセイは、当業者に周知である（例えばSivarajら, 2001, 米国特許第6,183,956を参照）。それゆえ配列番号2によるポリペプチドまたはその機能変異体を発現する細胞は、遺伝子発現をインピトロで分析するための試験システムとして培養可能であり、肝臓細胞が優先される。遺伝子発現は、当業者に一般に既知の方法を用いて、例えばmRNAまたはタンパク質のレベルで分析される。この文脈では、1つ以上の推定上の薬理的活性物質を細胞培養物に添加した後存在する配列番号1~9および/または配列番号47（配列番号10~19によってコード化）によるポリペプチドまたはmRNAの量を測定し、対照培養物中の対応する量と比較する。これは、例えば、細胞の溶解物中に存在するポリペプチドを検出するために使用できる、配列番号1~9および/または配列番号47（配列番号10~19によってコード化）によるポリペプチド、またはその機能変異体に対して特異的に作成された抗体を用いて実施される。発現されたポリペプチドの量は、例えばELISAまたはウェスタンブロットを使用して、当業者に一般に既知である方法によって定量できる。この文脈で、分析を高スループット方法として実施し、非常に多数の物質を、配列番号1~9および/または配列番号47（配列番号10~19によってコード化）によるポリペプチドの発現のモジュレーターとしての適合性について分析することができる（Sivarajら, 2001, 米国特許第6,183,956号）。この文脈で、分析される物質は、しばしば非常に異質である、数千個の物質を含有可能な物質ライブラリー（例えばドイツ特許第19816414号、ドイツ特許第19619373号）から得ることができる。

【0259】

10

20

30

40

50

本発明はここで、図および実施例を用いて以下で更に説明し、本発明を本明細書に制限することなく、本発明の実施態様および特徴を示す。

【実施例 1】

【0260】

HCC サブトラクト cDNA ライブラリーの作成

RNA は、病理学者が確認した HCC 腫瘍サンプル 3 個および病理学者が確認した非罹患ヒト肝臓サンプル 3 個から、標準方法にしたがって TRIzol 試薬 (Invitrogen) を用いて分離した (Chomczynski & Sacchi, 1987, Anal. Biochem. 162: 156-159)。cDNA ライブラリーの作成に使用する組織は、商業研究を含めて、この物質の研究目的への利用に関して明確なインフォームドコンセントを与えた患者からのものである。mRNA は、Clontech Laboratories による「PCR 選択 cDNA サブトラクションキット」で与えられた説明書に記載されているように、逆転写酵素および DNA ポリメラーゼを用いて二本鎖 cDNA に変換した。HCC において特異的に増加および減少した cDNA を濃縮するために、参照肝臓プールおよび HCC で共通して同様のレベルで発現した cDNA を、このキットで与えられた説明書にしたがって、そして Diatchenko ら (1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 6025-6030) に記載されているように、サブストラクティブ・サブプレッシブ・ハイブリダイゼーション (SSH) によって除去した。SSH 工程は、生じた cDNA 分子が HCC でアップレギュレートおよびダウンレギュレートの両方をされた核酸配列を示すが、異なって発現された核酸配列を示さないように、両方の方向で実施した (HCC cDNA から非罹患肝臓 cDNA をサブトラクトし、非罹患肝臓 cDNA から HCC cDNA をサブトラクトする)。加えて、HCC 組織において珍しい mRNA 転写物をよりよく示すために、正規化されたがサブトラクトされていない HCC cDNA ライブラリーを作成した。これらの cDNA は別個に pCRII ベクター (Invitrogen) 内に、このプラスミド内への連結と、それに続く E. coli XL-1-Blue 電気穿孔コンピテント細胞 (Stratagene) 内への電気泳動形質転換によってクローニングした。クローニングは、ベクターおよびコンピテント細胞の供給者が説明するように実施した。クローニング済みの異なって発現された cDNA を選択 (アンピシリン) 培地にプレートイングし、個々のクローンを分離した。各 SSH ライブラリーからはクローン 960 個を分離し、正規化 HCC ライブラリーからはクローン 576 個を分離し、培養物は 96 ウェルマイクロタイタープレートで確立した。これらの cDNA クローンは共に、ヒト HCC 組織に特異的な mRNA 発現の独自の表現を与える。

【実施例 2】

【0261】

HCC cDNA マイクロアレイの作成およびハイブリダイゼーション

先に記載の SSH cDNA ライブラリークローンの培養物 1 ml を増幅し、cDNA インサートを、DNA インサートに隣接するベクター配列に特異的なプライマーを用いて、PCR によって増幅した。M13 フォワード (5' - G T A A A A C G A C G G C C A G - 3' ; 配列番号 20) および M13 リバースプライマー (5' - C A G G A A A C A G C T A T G A C - 3' ; 配列番号 21) をクローンインサートの PCR 増幅に利用した。細菌培養物 50 マイクロリットルを 95 °C で 10 分間に渡って熱変性させて、細片を遠心分離によって除去し、上澄 2 μl を標準 PCR [1 X Ampli taq PCR 緩衝液、2.5 mM MgCl₂、37.5 nM 各プライマー、0.5 mM dATP、dCTP、dGTP および dTTP のそれぞれおよび 1.5 単位 Ampli taq DNA ポリメラーゼ (Applied Biosystems)] に含めた。反応条件は、95 °C にて 5 分間で、続いて 94 °C にて 30 秒間、60 °C にて 30 秒間、72 °C にて 60 秒間を 35 サイクル; 次に続いて 72 °C にて 7 分間であり、そして次に 4 °C に冷却した。cDNA インサートの増幅は、0.4 μg/ml 臭化エチジウムを含む 1% アガロースゲルでの PCR 5% の電気泳動および 1 X Tris アセテート EDTA (TAE; 40 mM Tris - アセテート、1 mM EDTA、pH 7.5) 緩衝液中での泳動によって確認した。SSH クローン増幅インサート配列はそれぞれ、Genetic Microsystems 417cDNA アレイヤーロボットを使用して、シ

アリル化顕微鏡スライドガラス (GAPSS Corning) に付着させ、カスタム HCC cDNA マイクロアレイを作成した。cDNA インサートをスライドにスポットするプロトコルは、cDNA 緩衝液の精製および調整なしで PCR マイクロタイタープレートから直接スポットすることを除いて、Hedge らが発表したプロトコル (2000, Biotechniques 29: 548-560) に従った。SSH cDNA クローンインサートに加えて、多数の対照 DNA をハイブリダイゼーション反応の対照としてマイクロアレイにスポットした。更に、癌に関与することが以前報告された遺伝子に対応する公式に入手できる cDNA クローン約 2000 個を German Genome Research Center (RZPD) から購入し、膨張、増幅させて、先に記載したようにこれらのマイクロアレイにスポットした。ハイブリダイゼーションプローブの作成では、更なるヒ病態が確認された肝臓障害からの、および同じ量のプールされた罹患肝臓 RNA からの RNA 20 マイクログラムを、標準方法 (Hedge ら, 2000, Biotechniques 29: 548-560) により、逆転写酵素を用いて、cy5 - 蛍光標識および cy3 - 蛍光標識 cDNA (cy5 - CTP および cy3 - CTP, Pharmacia) にそれぞれ変換した。このプロトコルを使用して、これらの標識 cDNA を HCC マイクロアレイに競合ハイブリダイズした。5X SSC (0.75M クエン酸ナトリウム、75mM クエン酸ナトリウム、pH 7.0); 0.1% SDS (ドデシル硫酸ナトリウム) および 1% BSA (ウシ血清アルブミン) 中での 42 における 45 分間のプレハイブリダイゼーションの後、50%ホルムアミド、5X SSC、および 0.1% SDS を含む緩衝液中で 42 にてハイブリダイゼーションを一晩実施した。ハイブリダイズしたスライドは、ストリンジентな条件 (1X SSC、0.1% SDS 中で、42 にて 2 分間をそれぞれ 2 回; 0.1X SSC、0.1% SDS 中で、室温にて 4 分間をそれぞれ 2 回; 0.05X SSC 中で室温にて 2 分間をそれぞれ 2 回) で洗浄し、乾燥させ、製造者の勧告にしたがって Genetic Microsystems 418 cDNA マイクロアレイスキャナおよび付属の Image 4.1 画像分析ソフトウェアを用いて分析した。

10

20

【実施例 3】

【0262】

本発明による核酸およびポリペプチドのディファレンシャル発現の独立した検証 RNA は、先に詳細に述べたようにヒト患者サンプルから分離した。この分析の HCC サンプルは、HCC SSH ライブラリーの作成に、または cDNA マイクロアレイチップハイブリダイゼーションに利用したのと同じ患者からのものではない (上の実施例、表 3 A / 3 B、4 および図 1)。非罹患肝臓組織での、本発明による核酸の発現を評価するために、HCC サンプルに加えて、独立した非罹患肝臓サンプルから RNA を作成した。更に、他の正常ヒト組織および他のヒト癌での本発明による核酸の発現を評価するために、追加の非罹患および癌組織から RNA を作成した。RNA 1 μg を、Superscript 逆転写酵素 (Invitrogen) を用いて、dATP、dCTP、dGTP、および dTTP (それぞれ 0.4 mM)、7.5 nM ランダム 6 - ヌクレオチドプライマー (ヘキサマー)、10 mM ジチオスレイトール、および RNase インヒビター 1 単位の中で当業界で既知の標準手順を用いて、一本鎖 cDNA に変換した (Sambrook ら, Molecular Cloning, 2nd ed., 1989, Cold Spring Harbor Press, NY, USA, 5.52~5.55 頁)。そして本発明による核酸の存在または非存在は、PCR 実験において、本発明による各核酸に特異的なプライマー対を用いた cDNA からのこれらの配列の増幅により判定した。この分析に使用したプライマーを以下の表 9 に与える。

30

40

【0263】

【表 9】

表9:RT-PCRプライマーとその配列番号

クローン	配列番号	プライマー1(配列番号)	プライマー2(配列番号)
OBcl1	10	5'-CAGGTGAATTTCAAAGG AGGATTTACTCAC-3' (22)	5'-GTGAGTAAATCCTCCTT TGAAATTCACCTG-3' (23)
OBcl5	11	5'-GCAAGCCAGGAAGAGT CGTCACG-3' (24)	5'-TGCCAGGAACTTCTTG CTTGATGC-3' (25)
IK2	12	5'-AGTAACCAGTTGAGATG AAGCACGTC-3' (26)	5'-CAGAAGAGCAACAAGA ATGGTATCCTGC-3' (27)
IK5	13	5'-AACTTGAGTTCTATTTAC CTTGAC-3' (28)	5'-TTGCTTGGGTCATCTAA AGAC-3' (29)
DAP3	14	5'-ACTCACGTGCAAGGATG ATG-3' (30)	5'-AGCTCTCGGACTCTCAA CTG-3'(31)
LOC5	15	5'-CTTCTCCTATGACTGATC CTACTATG-3' (32)	5'-CAGGATGCAGAACTCAC CCTG-3' (33)
SEC1 4L2	16	5'-GCAGATTTCCCGTGGCT CCTC-3' (34)	5'-GTTGGGCAGCACCTCTG TCATC-3' (35)
SSP29	17	5'-CTGTGACATTCCGCCTTC CTTC-3' (36)	5'-CCACGCTACTGCAAGAA TCTTAC-3' (37)
HS16	18	5'-AGAAGTTCAACCTGGAG AGATGG-3' (38)	5'-CAAGGAAGCTAGGAATG ACAGGAG-3' (39)
IK3	19	5'-GCAAAGCCAAATTCATG TTACTCT-3' (40)	5'-CAGATACGAACAGTGAA TGGAATACG-3' (41)

10

20

30

【0264】

これらのプライマーは、本発明による障害の診断にも利用できるが、当業者は、所与の本発明による核酸に特異的な他のプライマーを設計してもよい。PCRは、cDNA 0.5%、1X Amplitaq PCR緩衝液、2.5mM MgCl₂、37.5nM各プライマー、0.5mM dATP、dCTP、dGTP、およびdTTPのそれぞれおよび1.5単位 Amplitaq DNAポリメラーゼ (Applied Biosystems) を含んでいた。PCR条件は、各プライマー対について必要に応じて最適化して、通例：94で3分間、続いて94で15秒間、60で30秒間、72で60秒間を30サイクルで、次に4に冷却した。cDNAインサートの増幅は、0.5μg/ml臭化エチジウムを含む1%アガロースゲルでのPCR5~10%の電気泳動および1X TrisアセテートEDTA (TAE) 緩衝液中での泳動によって確認した。cDNA合成前のサンプルのRNAse処置を含むRT-PCRの標準対照および逆転写酵素の省略は、これらの反応の特異性を決まて証明した。反応は、正しい分子サイズの別個のバンドがゲルに認められたかどうかに基づいて、発現 (+) または発現の非存在 (-) について評価した。これらの条件下での非常に微弱な、または不明瞭なバンドは、(+/-) で評価した。HCCおよび非罹患肝臓でのこれらの検証研究の概要を表6に与える。独立したHCCおよび非罹患肝臓サンプルのこれらの分析を示すデータを図3に与える。

40

【0265】

定量RT-PCR (Q-PCR) は、非罹患肝臓に対する、肝臓癌および他の肝臓障害での本発明による配列の過剰発現も検証した。これらの研究では、実施例5で詳細に説明

50

し、図2および6に示した、TaqMan加水分解プライマー方法およびSYBRグリーンインタカレート染料方法を利用した。

【0266】

本発明による核酸のディファレンシャル発現の追加の独立した検証を図4に示す。この場合、2つのHCCサンプルから、および非罹患肝臓からのRNA 15 µgに、2.2 Mホルムアルデヒドおよび1X MOPS緩衝液(10 mM 4-モルホリンプロパンスルホン酸、1 mM EDTA、5 mM 酢酸ナトリウム、pH 7.0)を含む1%アガロースゲルでの変性電気泳動分離を受けさせ、1X MOPS緩衝液中で泳動させた。サイズ分画変性RNAを、すべて当業者に周知の手順にしたがって、RNA(ノーザン)プロット技法を用いてナイロン膜(Gene Screen、New England Nuclear)に移して、UV光を用いて膜に架橋した(Sambrookら、Molecular Cloning, 2nd ed., 1989, Cold Spring Harbor Press, NY, Press, NY, USA, 7.39~7.52頁)。OBc11およびOBc15(配列番号10および11)のSSHクローンからのcDNAクローンインサートは、前の実施例に記載したようにPCR増幅によって分離した。これらの配列に対応する一本鎖放射性標識RNAプローブは、このテンプレートから、SP6およびT7 RNAポリメラーゼを用いて、1X標識緩衝液(0.5 mM ATP、CTP、GTP、10 mM ジチオスレイトール、および適切なRNAポリメラーゼ20単位)中、32P-UTPの存在下で、37にて35分間に渡って合成した。生じたアンチセンスプローブは、対応するmRNA配列に対して相補性であり、それゆえノザンプロットでmRNA配列に特異的にハイブリダイズすることが予想される。反対にセンスプローブ配列は、mRNAのそれと一致し、それによりmRNAにハイブリダイズしない。同一のノザンプロットは、250 mM 第一リン酸ナトリウム、250 mM 第二リン酸ナトリウム、7% SDS、1 mM EDTAおよび1% BSAの15 ml中で、68にて少なくとも30分間プレハイブリダイズした。ハイブリダイゼーションでは、プレハイブリダイゼーション緩衝液を除去して、先に記載したセンスおよび各アンチセンスRNAプローブを含む同じ緩衝液10 mlと、68にて一晚交換した。RNAプロットをストリンジェント条件(それぞれ室温にて15分間、2X SSC、0.1% SDSで2回;それぞれ68にて10分間、1X SSC、0.1% SDSで2回)下で洗浄し、乾燥させて、X線フィルムに暴露させてオートラジオグラフを作成した。図4に示すように、各アンチセンスプローブは別個のHCC RNAに特異的にハイブリダイズするが、非罹患肝臓RNAにはごく弱くハイブリダイズするか、全くハイブリダイズしない。これらの結果の特異性は、OBc11およびOBc15の両方の対応するセンスプローブからの特異的シグナルの非存在によって示される。加えて、異なる分子量のRNAは、OBc11アンチセンスプローブによって明らかである。この結果は大抵、恐らく別のスプライシングによって作成された別個のmRNA種を示す。これらの種は、この配列に対応する複数の異なるサイズのcDNAクローンが、GenBank配列データベースで報告されるという発見に基づいて予想される。

【0267】

更にインサイチュ-ハイブリダイゼーションは、NNL組織サンプルと比較したときに、HCCにおける強力なOBc15 RNA発現を明らかにする。S³⁵-標識プローブは、Fickertら(Am J Pathol.2002 Feb; 160(2): 491-9.)のプロトコルによって、RNAプロットに対して上述されたように合成する。インビトロ転写のテンプレートは、OBc15 3' cDNAを含むプラスミドから増幅する。インビトロ転写テンプレートを作成するために利用したプライマー(MWG Biotech, Munich, Germany)は、両方のエクソン(ヌクレオチド95~484からの配列番号11)を含むOBc15 RNAの365塩基に及ぶT7アンチセンスプローブのための、OBc15-p6フォワードプライマー(5'-aatctgcaagccaggaaagagt-3'、配列番号48)およびM13for(5'-gtaaaacgacggccag-3'、配列番号20);および両方のエクソン(ヌクレオチド436~1からの配列番号11)を含むOBc15配列の436塩基に及ぶSP6センスプローブのための、M13rev(5'-caggaaacagctatgac-3'、配列番号21)およびOBc15-p7リバープライマー

10

20

30

40

50

(5' - t c t a g t t t c a g t t t t g a t g a t a t t t t g - 3'、配列番号 49)である。これらのテンプレートPCRを増幅するために、10 pM フォワードプライマー、10 pM リバースプライマー、1 pM dNTP (Invitrogen)、PCR緩衝液II、5 mM MgCl₂ (Applied Biosystems、カリフォルニア州フォスターシティ)、テンプレートプラスミドDNA 217 ng、AmpliTaqポリメラーゼ 2.5単位 (Applied Biosystems、カリフォルニア州フォスターシティ)を含むPCRを、Applied Biosystems Gene Amp PCRシステム270を用いて、通例：94にて3分間、94にて30秒間、50にて30秒間、72にて50秒間で実施し、最後の工程を25回反復し、続いて72にて3分間、次に最終伸長を加えた。PCR生成物中のDNAの量は、Smart Spec 3000 (BIO-RAD、カリフォルニア州ハーキュリーズ)を用いて分光分析によって決定した。インビトロ転写アッセイは、各テンプレート200 ngを用いて、転写緩衝液 (Boehringer Mannheim、ドイツ)、100 mM ジチオスレイトール (DTT)、それぞれ1 mMのrNTP、RNaseインヒビター (Eppendorf、ドイツ、ハンブルク)、 γ -S³⁵-UTP (Amersham Bioscience)、RNAポリメラーゼSP6/T7 (Boehringer Mannheim)の中で、37にて2時間実施した。非組込みヌクレオチドの除去後 (RNaseフリーMicroSpin S-200HRカラム、Amersham Bioscience、英国バッキンガムシャー)、テンプレートDNAは、RNaseフリーDNase 2単位を用いて37にて10分間消化した。平均プローブサイズを得るために、加水分解緩衝液 (400 mM NaHCO₃、600 mM Na₂CO₃、100 mM DTT)を使用して、150 bp加水分解を60にて42分間実施し、0.1 M酢酸ナトリウム、10 mM DTTおよび1%氷酢酸中で中和した。転写プローブは、LiCl/イソプロパノールによって沈殿させ、25 mM DTTを含む50%ホルムアミド中で再懸濁させた。HCCおよび非腫瘍性正常肝臓切片のパラフィン埋め込み組織学的検証サンプルをMicroHM 355S microtome (Microm、ドイツ、ウォルドーフ)によって2.5マイクロメートルに切断し、スライド当たり2個の切片をSuperfrostスライド (Menzel-Glaser、ドイツ、ブラウンシュワイク)に載せた。すべての切片を一晩乾燥させた。乾燥切片を60にて1時間加熱し、キシレン中で30分間脱パラフィンした。100%、90%、70%および50%の勾配エタノール中で再水和を行い、続いてTris緩衝液塩水 (TBS緩衝液)中で3分間の洗浄を4回を行い、次に切片を4%パラホルムアルデヒドを含むリン酸緩衝塩水 (PBS緩衝液)中で固定した。数回のPBS洗浄の後、切片を0.2 M HCl中で10分間変性させ、TBS中で再度、3分間ずつ4回洗浄した。タンパク質消化は、CaCl₂ 2 mMを含むTBS中の、RNaseフリープロテイナーゼK (F.Hoffman La Roche Ltd.スイス、バーゼル)中で、37にて20分間実施した。反応は、4のTBS中での5分間のスライドのインキュベーションにより停止させた。続いて切片を再度、室温にてTBS緩衝液中で4分間、3回洗浄し、無水酢酸を含む0.1 M Tris緩衝液、pH 8で10分間インキュベートした。切片を50%、70%、90%、100%の勾配エタノール、最後にクロロホルムで脱水し、2時間空気乾燥させた。ハイブリダイゼーションでは、標識プローブ (切片当たり1 × 10⁶ cpm; LKB Wallac、1211 RACKBETA液体シンチレーションカウンタによって決定したプローブ放射能を、12.5 mM ホスフェート緩衝液、pH 6.8、12.5 mM Tris、0.4 M NaCl、3 mM EDTA、1.25 × Denhardt's溶液、50%ホルムアミド、12.5%硫酸デキストラン、0.1 M DTT、100 nM S-rATP (Boehringer Mannheim)、酵母tRNA 60 ng、およびポリ(A) (Boehringer Mannheim) 20 ngを含む、50 μl/切片のハイブリダイゼーション緩衝液で希釈した。切片は、2 × 標準クエン酸緩衝液 (SSC)、pH 7、および50%ホルムアミドを含む湿潤チャンバ内で、52にて一晩ハイブリダイズした。次に、切片をホルムアミド緩衝液 (10 mM リン酸緩衝液、pH 6.8、10 mM Tris-HCl、pH 7.7、0.3 M NaCl、5 mM EDTA、0.1 × Denhardt's溶液、0.07% β-メルカプトエタノール、および50%ホルムアミド)で2回、それぞれ1時間および2時間洗浄した。その後、切片を10 mM Tris-HCl pH 7.4、

0.5 M NaCl、2.5 mM EDTA および 0.07% -メルカプトエタノール中で15分間、2回洗浄した。RNAse処理は、20 µg/ml RNAse A (Boehringer Mannheim) を含む同じ緩衝液中で、38 °Cにて30分間実施し、ホルムアミド洗浄緩衝液を用いた更なる洗浄を37 °Cにて一晩続けた。切片は続いて、2 x SSC および 0.07% -メルカプトエタノール中で45 °Cにて30分間洗浄し、0.1 x SSC および 0.07% -メルカプトエタノール中で45 °Cにて更に30分間洗浄した。その後、切片を50%、70%、90%、100%の勾配エタノール中で脱水し、空気乾燥させた。最後に、スライドをIlford K2フォトエマルジョン (Ilford Ltd. Mobberly、英国チェシャー) でコーティングした。露出10、14および17日後、Kodak D 19 現像機 (Eastman Kodak、ニューヨーク州ロチェスター) を用いて現像を実施した。切片をヘマトキシリンによって対比染色し、水性封入剤に封入した (Aquatex-EM Science、ニュージャージー州ギブズタウン)。暗点を現像すると、エマルジョンからの銀粒子は、OBc15 RNA への特異的ハイブリダイゼーションを示す (図5)。相補性センスプローブは、アンチセンスプローブへの化学的類似性にもかかわらず、インサイチューでOBc15 RNA にハイブリダイズできない。したがってセンスプローブは、バックグラウンドシグナルのみが検出される負の対照 (図5、パネルA およびC) として作用する。OBc15 RNA はNNLではわずかに検出され (図5に示す、パネルB)、HCCでは、多数の銀粒子スポットによって証明されるように、インサイチューで明確に示されている (図5、パネルD)。

10

【0268】

20

更にタンパク質発現分析は、例えばDAP3タンパク質、すなわちHCC中で特異的にアップレギュレートされたDAP3 mRNAの機能生成物も、HCCでは高度に過剰発現されることを示す。各種組織でのDAP3タンパク質発現を検出するために、凍結組織 (液体窒素中に保管) に由来するタンパク質抽出物を使用して、標準ウェスタンブロット分析を実施した、図7を参照。冷凍マイクロトーム (cryocut, Leica CM3050) を使用して、切片50 µm (HCC、正常肝臓および各種器官サンプル) を得て、検査中の組織の同一性および均一性は、各切断工程の間および後に、以前に採取したH&E染色によって検証した。組織切片を2 µg/ml ロイペプチン、2 µg/ml ペプスタチン、2 µg/ml アプロチニン、1 mM フェニルメチルスルホニルフロリド (PMSF)、および2 mM ジチオスレイトールを添加した氷冷RIPA緩衝液 (50 mM Tris-HCl、pH 7.4、250 mM NaCl、0.1% SDS、1% デオキシコール酸塩、1% NP-40) 中に再懸濁させ、氷上での超音波処理 (5秒の2バースト) による均質化を続けた。氷上での20分間のインキュベーションの後、溶解物を13000 rpmで4 °Cにて15分間、微量遠心機内で2回の遠心分離工程によって清澄にし、上澄を収集した。タンパク質濃度は、ウシ血清アルブミンを標準として用いて、Bradfordアッセイ (Biorad) によって決定した。等量のタンパク質 (通例10~30 µg) を12% SDS-PAGEゲルで分離して、Semi-dryブロッティング (TE70, Amersham) により、ポリビニリデンジフロリド (PVDF) 膜 (Hybond-P, Amersham) に電気泳動によって移した。膜は遮断溶液 [TBS-T (0.1% Tween-20を含む25 mM Tris-HCl、pH 7.4、137 mM NaCl、3 mM KCl) 中の5% ミルク] 中で室温にて1時間遮断し、一次抗体溶液 (TBS-T / 1% ミルク中で調製) によって、4 °Cにて一晩攪拌しながらインキュベートした。以下の抗体に対して特異性である抗体を使用した: DAP3 (1:1000; BD Transduction Laboratories)、および -アクチン (1:5000, Sigma)。一次抗体溶液の除去およびTBS-T中での複数回の洗浄の後、膜は、HRP (ホースラディッシュペルオキシダーゼ) 結合二次抗体 (ウサギ抗マウス、1:1000; Dako) を用いて、室温にて1時間インキュベートした。TBS-T中での複数回の洗浄の後、化学発光 (ECL, Amersham) およびX線フィルムへの暴露によって検出を実施した (図7)。バンドの強度は、ChemImager 5500ソフトウェア (Alpha Innotech) を用いて濃度測定によって分析し、各シグナルは、対応する -アクチンシグナルの強度に正規化した (表8)。

30

40

50

【0269】

これらのデータは、HCCにおける本発明による核酸およびポリペプチドの調節解除発現の独立した検証を与える。本発明による核酸およびポリペプチドの発現は、非罹患肝臓において存在するか、非常に低いレベルでのみ観測され、それによりcDNAマイクロアレイへのハイブリダイゼーションによって確認されたこれらの核酸のディファレンシャル発現を検証する。結果は、本発明による核酸およびポリペプチドを用いて、本発明による障害を診断、防止、および/または処置できるという、驚くべき証拠を与える。

【実施例4】

【0270】

肝臓癌(ヘパトーマ)細胞系の増殖において増加される、本発明による配列
 ヒト肝臓癌細胞系(Hep G2、Hep 3B)は、5%CO₂を含む湿潤インキュベータ
 内で37℃にて、0%ウシ胎仔血清(FBS)を添加したDMEM中で培養した。細胞を
 約20%コンフルエントまで分裂させ、続いて血清の非存在下で3日間培養することによ
 って静止させた。飢餓期間の後、培地に10%FBSを添加することによって細胞を刺激
 して増殖させた。RNAの作成およびFACS(蛍光活性化細胞分類)分析による細胞サイ
 クルにおける細胞の位置の決定のために、細胞増殖の誘発の前および後(0、8および
 12時間)に、サンプルを採取した。したがって、ヨウ化プロピジウム(PI)染色によ
 って細胞サイクル分布を判定するために、細胞をトリプシン処理によって採取し、リン酸
 緩衝生理食塩水(PBS)で2回洗浄し、最後にPBS 500μl中で再懸濁させた
 。続いて、予備冷却メタノール5mlを添加した。-20℃での10分間のインキュベーシ
 ョンの後、細胞懸濁物をPBS中での3回の洗浄後にFACS分析に直接使用して、ヨウ
 化プロピジウム(PI)染色緩衝液(DNA-Prep Stain, Part No. 6604452; Beckman Coul
 ter) 500μl中で再懸濁させ、37℃にて15分間インキュベートした。最後に、1
 M NaCl 70μlを添加し、EPICS XL-MCLフローサイトメータ(Beckm
 an Coulter)での分析前に、サンプルは光を遮断して氷上で保管した。非同期細胞集団か
 ら調製した細胞を参照として使用した。

10

20

30

【0271】

分離RNAを使用して、静止対増殖肝臓癌細胞における遺伝子の発現をcDNAマイク
 ロアレイ分析によって監視した。実施例2に記載したような蛍光染料による標識の後、R
 NAを、細胞サイクル依存方法で発現されることが既知である対照遺伝子も含有する、特
 別に関与されたHCC特異的cDNAマイクロアレイチップ上でハイブリダイズした。最
 後に、Image 4.1およびGeneSightソフトウェアパッケージを使用してデータを解析した。血清の添加前に分離した0時間サンプルで得られたシグナルを参
 照として使用した。cDNA実験読み取り値からの血清刺激対静止発現値のlog₂変換
 比を図8に与える。

【0272】

これらのデータは、本発明による配列がヒト肝臓腫瘍細胞増殖と相関していることを示
 す。最先端と比較すると、これらの核酸およびポリペプチドはしたがって驚くべきことに
 、肝臓障害および/または上皮癌の改良された、より感受性の高い、より早期の、より高
 速な、および/または非侵襲性の診断を可能にする。

40

【実施例5】

【0273】

肝臓障害、特に肝臓癌における、本発明による配列の発現増加に関する機能的に重要な
 役割

詳細な配列分析は、OBcl5 RNAと真核非コード化RNAとの間の配列類似性を
 明らかにした。加えて、このRNAからタンパク質生成物を検出するための多様な方法を
 用いた複数の試みは、このような生成物を明らかにしていない。したがってこのRNAは
 、ポリペプチド内に翻訳されないが、それ自体機能(例えば調節)特性を有する。TransM
 essenger Transfection Reagent Handbook(Qiagen, 10/2002)によるプロトコルを使用す
 ると、低分子干渉RNA(sRNA)オリゴヌクレオチドを用いたヒト肝臓癌細胞の増

50

殖におけるOBcl5 RNAのレベルの低下(OBcl5 RNAのsiRNA仲介ノックダウン)が行われる。二本鎖低分子干渉RNA(siRNA)オリゴヌクレオチドプローブ(表10)は、OBcl5に対応するRNAレベルのインサイチュー欠乏に対して設計され(配列番号11)、Qiagenが提供している。

【0274】

【表10】

表10:二本鎖低分子干渉RNA(siRNA)オリゴヌクレオチドプローブ

名称	配列	配列番号*
OBcl5 siRNA fw	5' r(UCUGCAAGCCAGGAAGAGU)d(TT) 3'	50
OBcl5 siRNA rev	5' r(ACUCUCCUGGCUUGCAGA)d(TT) 3'	51
OBcl5 siRNA fw1	5' r(CCUCCAGAACUGUGAUCCA)d(TT) 3'	52
OBcl5 siRNA rev1	5' r(UGGAUCACAGUUCUGGAGG)d(TT) 3'	53
DAP3 siRNA fw	5' r(CUACAAAUGAGCGCUUCCU)d(TT) 3'	54
DAP3 siRNA rev	5' r(AGGAAGCGCUCAUUUGUAG)d(TT) 3'	55

10

20

[*これらのsiRNAリボオリゴヌクレオチドに関する付随情報において、これらのリストでリボヌクレオチド/デオキシリボヌクレオチドキメラ分子を明示することはできないため、配列番号と共に示した配列は、各配列末端に2個の3'デオキシリボヌクレオチド(dTT)「テール」を含まない。]

【0275】

HepG2細胞(ウェル当たり 3×10^4 細胞の密度)を播種して、37にて24時間インキュベートし、Oligofectamine試薬(Invitrogen)1.5 μ lおよび20 μ M二本鎖siRNAオリゴヌクレオチドストック溶液2.5 μ lを用いて製造者の説明(Invitrogenプロトコル)にしたがって形質移入した。インキュベーション24時間後、全RNAを分離し、実施例2に記載したようなcDNAに逆転写した。したがってPCR生成物は、蛍光標識プライマーまたはTaqmanプローブ加水分解系およびSYBRグリーンなどの蛍光二本鎖DNAインタカレート分子を含む、各種の蛍光ベースインジケータの包含によって監視した。実験は、製造者の説明(GeneAmp(登録商標); 5700 Sequence detection System, User Manual; PE Biosystems)にしたがって実施した。したがって、TaqMan方法に基づくリアルタイム定量RT-PCR分析を、5700 Sequence Detection System(Applera)を用いて以下のように実施した: 全RNA 500ngを実施例3に記載したように実施し、最終体積30 μ l中に各プライマー5~8pmol/ μ lを含む、このcDNAテンプレートの1:4希釈をQ-PCRに使用した(RNA 6.25ngに相当)。Q-PCRの温度は、40サイクルを用いて製造者の説明にしたがって使用した。3通りの反応を実施した。

30

40

【0276】

SYBRグリーン方法に基づくリアルタイムQ-PCR分析は、7000 Sequence Detection System(Applera)を用いて実施した。PCRは、先に記載したようにRNA 6.25ngに相当するcDNAを使用して、SYBR-Green Universal PCR Master Mix(Applera)によって実施し、最終体積30 μ l中の各プライマー(RBおよび - アクチン、反応サンプル中各プライマー10pmol)の量を、製造者の説明にしたがって経験的に決定した。SYBR-RT-PCRの温度は、取扱説明書にしたがって使用した。これらの反応も、40回サイクルさせ、3通りの反応を実施した。標的RNAレベル(この場合、OBcl5 RNA)のノックダウンのパーセンテージは、先に記載したように、TaqManベ

50

ース（使用したGAPDHプライマー＝GAPDH-p1、配列番号56；GAPDH-P2、配列番号57；GAPDH-p3、配列番号58）（使用した-アクチンプライマー＝bActin-p1、配列番号59；bActin-p2、配列番号60；bActin-p3、配列番号61）またはSYBRグリーン分析（SYBRグリーン分析の参照として、使用した-アクチンプライマー＝bActin-p4、配列番号62；bActin-p5、配列番号63）のどちらかにおいて、参照としてのGAPDHまたは-アクチンmRNAレベルの並行Q-PCR決定を使用して、Q-PCRによって決定した。RNAレベルの変化は、Pfaffl(Nucleic Acids Research(2001) May 1, 29(9): e45)に記載された方法にしたがって決定した。

【0277】

OBcl5 RNAのレベルがヘパトマ細胞においてノックダウンされるこのような実験において、腫瘍サプレッサ遺伝子網膜芽細胞腫タンパク質1(RB1)をコード化するmRNAのレベルが、OBcl5 RNAのレベルの低下時に、用量依存方式で数倍にアップレギュレートされることが判定された(図6)(使用したRB1 Q-PCRプライマー＝RB1-p1、配列番号64；RB1-p2、配列番号65)。明らかな結論は、HCCでのOBcl5 RNAの発現増加がRB1の負の調節を与え、したがって腫瘍細胞増殖を促進することである。それゆえsiRNAオリゴヌクレオチドを用いた、増殖するヒト肝臓癌細胞におけるOBcl5 RNAのレベルの低下(ノックダウン)は、肝臓障害、特に肝臓癌におけるOBcl5 RNAの発現増加のために機能的に重要な役割を裏付けている。

【0278】

siRNAオリゴヌクレオチドが、肝臓癌細胞においてDAP3 mRNA(配列番号14)をノックダウンするよう設計された、更なるこのような実験は、驚くべき形態的效果を与えた(DAP3 siRNAノックダウン研究に使用したオリゴ配列は、表10に与えた)。他のsiRNAオリゴを利用したことを除いて完全に同じように処置した細胞(スクランブル配列siRNAオリゴ対照など)ではなく、DAP3 siRNAオリゴ処置細胞において、細胞体積の増大などを含む、細胞形態の実質的な変化が見られた。これらの処置細胞は、培養基質に対して付着性を維持していたが、RNAおよびタンパク質は、これらの実施例に記載した標準方法を使用してこのような処置細胞から抽出できないことが更に認められた。同時に完全に同じように処置した肝臓癌細胞における、同様のsiRNAオリゴ処置を用いたこのような効果の欠如は、これらの観察が肝臓癌細胞でのDAP3 mRNAレベルのノックダウンに特異的であることを示している。したがってDAP3 mRNAの過剰発現は、肝臓癌細胞の生存性に不可欠である。これらの観察は、更に、肝臓腫瘍細胞におけるDAP3に関する機能上重要な役割を裏付けている。

【0279】

これらの結果は、更に、本発明による核酸および/またはポリペプチドを使用して、本発明による障害を診断、防止、および/または処置できるという驚くべき証拠を提供する。

【実施例6】

【0280】

HCC特異的プローブを使用する診断方法

好ましくはポリメラーゼ連鎖反応(PCR)に基づく、本発明による障害の診断方法を確立することができる。本発明の核酸配列の標準PCR検出は、例えば患者の血流で循環するHCC腫瘍細胞を十分に同定することができる。しかしながら細針生検などからの、腫瘍生検物質における本発明の核酸配列の発現の検出も、この診断手順のための好ましい指標である。本発明の核酸配列、OBcl5(配列番号11)は、例えば、大半の非罹患組織では検出されず、例えばHCCにおいて比較的特異的に発現される。肝臓疾患のディファレンシャル診断へのこのようなアプローチの潜在的な識別力を示す、肝硬変およびHCCにおけるこの核酸の発現増加も証明されている(図1、2、5および表5A/B)。

【0281】

10

20

30

40

50

PCR診断は、好ましくは、患者の物質から分離されたRNAを約1 pg、好ましくは少なくとも100 ng、更に好ましくは少なくとも1 μg必要とする。好ましい利用において、RNAは、最小限の侵襲性静脈穿刺手順によって得た循環血からの、好ましくは白血球画分から標準手順にしたがって分離される。この好ましい場合では、手順は、血液循環系におけるHCC腫瘍細胞の存在を検出する。RNAは、肝臓生検物質から同様に分離できる。

【0282】

例えばOBc15の特異的検出では、PCR診断は、患者サンプルから産生されたRNAからのcDNA合成のための特異的アンチセンスプライマー（プライマーOBc15-p1；5'-GCCACAGGTGAAACACTTAATTTG-3'；配列番号42；配列番号11のヌクレオチド350-327から）を含む、OBc15核酸配列に特異的な複数のプライマーを含む。同様に、例えばOBc15-p2（5'-AGGAAGAGTCTGTCACGAGAAACC-3'；配列番号43；配列番号11のヌクレオチド107~128から）およびOBc15-p3（5'-ATAATGCTGTGCTTAGTTTATTGCC-3'；配列番号44；配列番号11のヌクレオチド313~289から）などの特異的PCRプライマー。感受性、特異性、および品質管理は、OBc15核酸インサートに対して特異的であり、およびプライマーOBc15-p2および-p3の内側（入れ子）である、追加のプライマーセット（例えば：OBc15-p4；5'-GATCGTGGACATTTCAACCTC-3'；配列番号45；配列番号11のヌクレオチド147~167から、およびOBc15-p5；5'-TCTTGCTTGTATGCTTTGGTC-3'；配列番号46；配列番号11のヌクレオチド280~261から）の提供によって改良される。OBc15 mRNAレベルの定量評価も、TaqMan Q-PCRを使用して、例えば：

OBc15-8、配列番号66（5'-ATCTGCAAGCCAGGAAGAGTTC-3'）；OBc15-p9、配列番号67（5'-CTTGCTTGTATGCTTTGGTCTGT-3'）；およびOBc15-p10、配列番号68、（5'-CCAGACCATGCAAGAACTCTGATCGTGGAC-3'）によって、図2に示すようにこのような検出方法で実施できる。

【0283】

cDNAは、ゲノムDNAによる潜在的な汚染を除去するための、RNaseフリーDNase-1（Roche）によるRNAの消化の後に、患者RNAサンプルから作成した。この汚染の可能性は、ゲノムDNAテンプレートから生じる（およびそれによりOBc15に対応するmRNAの発現を反映しない）PCR生成物が、RNA特異的PCR生成物より大であるため、OBc15遺伝子の異なるエクソンの配列からのPCR増幅用プライマーを含めることによって更に制御される。cDNA合成は、例えば、50 mM Tris-HCl、6 mM MgCl₂、40 mM KCl、および10 mM ジチオスレイトール、pH 8.5などの適切な緩衝液中にて、OBc15特異的OBc15-p1（約1 μMにて）によって、逆転写酵素[約2単位/反応でのMaloneyマウス白血病ウイルス逆転写酵素（Roche）など]を用いて初回刺激することができる。cDNA合成反応においては、それぞれ約1 mMのdATP、dCTP、dGTP、およびdTTP、約1~10単位/反応の胎盤RNaseインヒビタ（Roche）などのRNaseインヒビタも必要である。cDNA合成は、好ましくは42にて30~60分間実施し、続いて95にて10分間加熱してRNAテンプレートを変性させた。得られたcDNAは、血液（または肝臓生検サンプル）中でOBc15を検出するために、PCRのテンプレートとして利用できる。10X Taq DNAポリメラーゼ緩衝液（500 mM Tris-Cl pH 8.3、2.5 mM MgCl₂、0.1% Triton X-100）；最終濃度がそれぞれ0.2 mMのdATP、dCTP、dGTP、およびdTTPの混合物；Taq DNAポリメラーゼ（2.5 U/反応）、およびOBc15-p2、OBc15-p3、OBc15-p4、およびOBc15-p5などのOBc15特異的プライマー（0.1~1 μM最終濃度）を含む、OBc15のPCR検出に必要な追加試薬も、好ましくは提供される

。例えばOBc15配列インサートを備えたDNAなどの、PCR増幅の正の対照も好ましくは含まれる(1~10ng/反応)。PCRは、例えば、95にて30秒間、60にて30秒間、72にて60秒間の22~40サイクルに渡って実施できる。先に示したように、好ましい追加の感受性および特異性は、元のPCRプライマーセットを用いて増幅した配列内に位置する追加のOBc15プライマーセットの利用によって、この診断手順で達成される。この場合、第一のPCR反応で利用された条件に似た条件下での続いたPCRは、好ましくはプライマーOBc15-p4およびOBc15-p5を除いて、テンプレートDNAとして第一のPCR 1~10μlを含む反応物中で入れ子配列を増幅するために利用された。あるいは、反応は、好ましくは、第一のプライマーセット(OBc15-p2およびOBc15-p3)を用いて10~15サイクル実施され、その後、次にこの反応物の1~10μlをテンプレートとして、プライマーsOBc15-p4およびOBc15-p5(および含まれるすべての必要なPCR成分)と共に新たなPCR反応物中に含ませた。OBc15特異的PCR生成物の検出は、好ましくは、当業界で既知であり、前の実施例に記載したアガロースゲル電気泳動を利用した。診断には、このようなPCRベースの診断試験のための対照として、好ましくは比較可能な体液または組織抽出物が含まれるべきである。これは、非罹患者からの血清または血漿および/または適切な動物モデルからの血清、血漿または組織抽出物を含みうる。プライマーOBc15-p4およびOBc15-p5との反応の生成物などの、本発明による核酸のPCRによって決定された発現が、対照に対して、患者から分離されたサンプル中でアップレギュレートされた場合、そして特にアップレギュレートされた発現が本質的に、図1に示したような障害特異的(平均)発現比に一致する場合、このような一致は、障害を患う患者を示す。

【0284】

この手法の変形も評価できる。cDNA合成およびPCR増幅は、熱安定性DNAポリメラーゼを、RocheによるTitan one-tubeまたはCarboxydothemus DNAポリメラーゼone-set RT-PCRシステムによって提供されるような逆転写酵素活性と共に利用して、単一の反応容器内で連続的にまたは同時に実施できる。あるいはPCR生成物は、蛍光標識プライマーまたはTaqmanプロブ加水分解系を含むPCR生成物の各種の蛍光ベースインジケータの包含によって、先に記載したようにSYBRグリーンなどの蛍光二本鎖DNAインターカレート分子を用いて監視することができる。PCR生成物の蓄積は、本発明による核酸の発現の感受性定量評価を達成するために連続的に監視できるため、蛍光ベース手法は利点を与える。このことは、本発明による障害の血液または組織で上昇したが、非罹患者および組織においてもより低いレベル存在する核酸で特に有利であるため、核酸の発現のレベルに関する定量情報が得られる。更にこの実施例と同様に、核酸発現レベルの正確な定量は、例えば肝硬変とHCCとの間のディファレンシャル診断に寄与する。このデータと、疾患および疾患不在を示す提供された標準との比較は、このような診断手順に関する重要な利点を提供する。

【0285】

この診断方法の追加の変形は、本発明による複数の核酸および/または本発明による核酸の、障害に関与する他の核酸との同時検出を含む。更なる本発明による核酸のハイブリダイゼーションベースの診断検知も考えられる。この場合、好ましくはRNAプロット、RNAse保護または患者細胞または組織生検サンプルへのインサイチュハイブリダイゼーションを利用するmRNA検出も有効である。

【0286】

同様の方法およびその変形によって、本発明による核酸は、および/または本発明による核酸は他の核酸と共に、本発明による障害の診断に利用できる。

【実施例7】

【0287】

本発明によるポリペプチドの抗体検出による診断方法

本発明による障害の好ましい診断方法は、本発明によるポリペプチドに対して作成され

た抗体に基づく。例えば診断手順は、好ましくは、酵素結合免疫測定法 (ELISA) アッセイによる、特異的にアップレギュレートされた遺伝子タンパク質の血清検出を利用する。簡単な形式では、診断アッセイは、好ましくは、OBc15.p r (配列番号2) またはDAP3 (配列番号5) などの本発明によるポリペプチドに対して特異的な分離および精製された抗体によって完全にコーティングされた、マイクロタイタープレートまたはマイクロタイターウェルのストリップを含む。例えば抗体は、一般に例えばウサギで産生されるなどのアフィニティ精製ポリクローナル抗体、または当業界で確立された手順にしたがって一般にマウスで産生されるなどの精製モノクローナル抗体でもよい (Cooper, H. M. & Paterson, Y., (2000), In Current Protocols in Molecular Biology (Ansel, F.A. ら, 編) 11.12.1~11.12.9頁, Greene Publ. & Wiley Intersci., NY); (Fuller S.A. ら, 10 (1992), In Current Protocols in Molecular Biology (Ansel, F.A. ら, 編) 11.4.1~11.9.3頁, Greene Publ. & Wiley Intersci., NY)。好ましくは抗体は、Knappik ら (2000, J. Molec. Biol. 296: 57-86) または Chadd および Chamow (2001 Curr. Opin. Biotechnol. 12: 188-94) に記載されているように、ファージ・ディスプレイ・ライブラリー・パニングおよび精製から得た組換え抗体またはその断片でもよい。抗体コーティングは、好ましくは、リン酸緩衝液食塩水 (PBS) などの標準コーティング溶液中の、1~100 $\mu\text{g/ml}$ の抗OBc15.p r 抗体または抗DAP3.p r 抗体の希釈物によって実現される。抗体は、好ましくは、マイクロタイターウェル (Nunc Maxisorp immunoplate など) の吸収性表面に37 にて60分間、あるいは室温または4 にて一晚結合させた。コーティングしたウェルにサンプルを結合させる前に、ウェルは、好ましくは、リン酸緩衝液食塩水中の5 20 %ウシ血清アルブミンまたは同じ緩衝液中で再懸濁させた5%脱脂粉乳などの濃縮タンパク質溶液中での、室温にて15~60分間のインキュベーションによって、非特異的結合を完全に遮断した。次に、好ましくは患者サンプル物質をマイクロタイターウェルに塗布して、遮断溶液中に希釈させて、検出の特異性を上昇させた。サンプルは、例えば、当業界で周知の方法にしたがって調製した、組織生検または外科的切除物からの血漿または血清またはタンパク質抽出物である (Smith, J.A. (2001) In, Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, F.A. ら, 編) 10.0.1~10.0.23頁, Greene Publ. & Wiley Intersci., NY)。特に患者サンプルは、室温または4 にて抗体コーティングウェルに30-120分間 (またはそれ以上) 接触させた。非特異的相互作用タンパク質は、好ましくは、例えば0.02~0.1% Tween 20を含む0.1M Tris-緩衝液食塩水などの標準洗淨緩衝液による徹底的な洗淨により除去した。洗淨は、好ましくは3~10分間に渡って実施し、3~5回繰り返した。患者サンプル中のDAP3.p r ポリペプチドの検出は、例えば、先に記載したように産生された第二の独立した抗DAP3.p r 抗体との続いての結合反応によって実施し、標準2部位「サンドイッチ」型ELISAにおいて、DAP3.p r ポリペプチド上の特徴的なエピトープを識別した。第二の抗OBc15.p r 抗体またはDAP3.p r 抗体の結合は、例えば、室温にて30~60分間、抗体内でウェルを (例えば遮断溶液中1~100 $\mu\text{g/ml}$ の濃度にて) インキュベーションして、続いて前の工程と同様に徹底的に洗淨することによって実施した。第二の抗体は、好ましくはアルカリホスファターゼなどの適切な基質の存在下で、色素生産性または蛍光生産性反応生成物を生成できる酵素に直接結合できる。あるいは、例えば、そのように酵素に結合され 40 た抗種および抗アイソタイプ特異的第三抗体を利用して、標準分光分析プレートリーダー機器で検出可能である反応生成物を産生させる。反応生成物の現像では、(先のように) 洗淨した抗体-抗原-酵素複合体を好ましくはRocheからのAttoPhosなどの色素生産性基質に室温にて約10分間露出させて、反応を50mM Tris-HCl pH 5.5などの低pH緩衝液によって停止させるか、または代わりに直接アッセイすることができる。特異的に結合したOBc15.p r ポリペプチドまたはDAP3.p r ポリペプチドの量は、例えば、分光光度計の適切な波長 (この場合は420nm) での励起後の、各ウェルにおける酵素反応生成物の量の測定によって決定する。測定は、好ましくは、放射波長 (この場合は560nm) においてプレートリーダーで行う。好ましくは診断には、例 50 えば精製組換えOBc15.p r ポリペプチドまたはDAP3.p r ポリペプチドなどの

、O B c 1 5 タンパク質標準またはD A P 3 タンパク質標準が含まれる。このタンパク質標準の希釈シリーズは、当業界で周知であるように、反応の対照として、そしてポリペプチド発現レベルの比較のタンパク質標準曲線を導くために、好ましくはE L I S A に同時に含まれる。特定の肝臓障害を示す、対応する濃度範囲は、好ましくは、診断で与えられるべきである。加えて、比較できる体液または組織抽出物も好ましくは、このようなE L I S A 試験で対照として含まれるべきである。これは、好ましくは、非罹患者からの血清または血漿および/または適切な動物モデルからの血清、血漿、または組織抽出物を含む。このようなE L I S A 検出診断は、当業界で一般的である(例えばHauschildら, 2001, Cancer Res.158: 169-77を参照)。E L I S A によって決定したサンプル: 対照タンパク質レベルは、好ましくは、対照サンプルに対して、本発明による障害を患う患者の、病理学者が確認した組織で決定した、E L I S A 決定障害特異的タンパク質発現比值である。サンプル: 対照のタンパク質レベルが障害特異的タンパク質発現比值と本質的に一致する場合、このような一致は、好ましくは障害を患う患者を示す。好ましくはこのような診断は、1つを超える本発明によるポリペプチドに対して実施される。

10

【0288】

更に診断は、本発明によるポリペプチドに対して作成された内在性抗体、あるいは患者から分離されたサンプル中に存在するその機能変異体またはその断片を検出することに向けられており、抗体またはその断片は、本発明によるポリペプチドに対して作成されている。このような自己免疫抗体の検出は、当業者に一般に既知である方法によって、例えば先に詳細に記載したE L I S A などの免疫親和性アッセイによって、本発明によるポリペ

20

【0289】

加えてまたはあるいは、少なくとも1つの本発明によるポリペプチドの免疫組織化学検出をベースとする関連診断キットを作成できる。このようなキットでは、例えば精製した抗体または本発明によるポリペプチドに特異的な抗体を、好ましくは患者の細胞または組織切片への抗体の結合を検出するために必要な試薬と共に含むことができる。これらの試薬は、例えば、好ましくは、例えば色素生産性基質の触媒作用が可能な触媒に結合された、またはフルオロフォア(例えばTexas Redなど)に結合された - 本発明によるポリペプチドまたはその機能変異体に対して作成された - 特異的抗種およびサブタイプ特異的二次

抗体を含む。好ましくは酵素基質も洗浄およびインキュベーション緩衝液と同様に含まれる。このようなキットの追加の任意の成分は、正の対照組織、例えば肝臓の切片、あるいは正の組織対照としてポリペプチドを特異的に発現する細胞の充填ペレットからの組織または切片でもよい。与えられた説明は、本発明によるポリペプチドの検出のための抗原回復の好ましいおよび/または代替の方法あるいは、例えばホルマリン固定およびパラフィン包埋組織物質よりも、凍結組織物質を利用すべきであるという指示を含む。この場合、氷冷アセトンへの10分間の浸漬などの、凍結組織サンプル切片の固定のための勧告が好ましくは含まれる。更なる説明は、好ましくは、遺伝子生成物の検出で使用する抗体の濃度についての勧告はもちろんのこと、提供された免疫試薬への組織の暴露のための勧告および提案されたインキュベーション時間および温度も与える。3%正常ヒツジ血清を含むリン酸緩衝液食塩水を含む0.01%~0.1% t w e e n - 20などの、抗体インキュベーション用の好ましい反応緩衝液も含むことができる。更に、リン酸緩衝液食塩水を含む0.1% t w e e n - 20を用いた、各5分間の洗浄4回などの、特異的抗体中でのインキュベーション前後の組織切の洗浄のための明細な条件が好ましくは含まれる。このような免疫組織化学検出プロトコルは、当業者に既知である。一般に、キットは、好ましくは、正および負の組織例からの特異的免疫組織化学染色結果の画像のパネルおよび特に、診断される障害を患う患者を示す結果を表示した表を、ユーザーガイドとして含む。このようなキットの利用は、好ましくは、本発明による先に記載した肝臓障害、肝臓癌、または上皮癌の診断を除外、支持または確認する。

30

40

【0290】

50

核酸ベース診断手法について先に規定したように、本発明によるポリペプチドの検出および/または定量に基づく診断は、このようなポリペプチドを1つ以上含む。その上、このようなポリペプチドの、本発明による障害に關与する他のペプチドとの同時検出は、このような診断で利用できる。

【0291】

本発明の組成物および工程に各種の修正が行えることは、当業者に明らかになるであろう。それゆえ本発明は、このような修正および変更が添付請求項およびその相当物の範囲内であるという条件で、それらを対象とすることが意図されている。本明細書で引用したすべての刊行物は、参照によりその全体が組み入れられている。

【図面の簡単な説明】

【0292】

【図1】HCCのRNA発現レベル HCC対非罹患肝臓cDNAマイクロアレイ実験での発現値の要約ボックスプロットを与える。ボックスプロットは、log₂発現値比と、各ボックスの水平線によって示される中央値とのグラフ表示である。各ボックスの範囲は、四分位間を示す；ウィスカーは、四分位間の1.5倍を示す。この範囲に含まれない比は、小さい丸で示す。本発明による各核酸では、HCCで発現増加が明らかである。発現値は、患者と対照サンプルの間の発現の差が最も重大であるOBc15（配列番号11）を除いて、同様の比で一貫して増加している。

【図2】正常組織および他の種類の癌と比較した場合の、HCCでのOBc15の発現特異性 OBc15特異的PCR生成物の量は、プライマーのOBc15-p8、配列番号66；OBc15-p9、配列番号67；およびOBc15-p10、配列番号68を使用して、Taqman蛍光標識遺伝子特異的プローブの包含および加水分解によって監視する。定量RT-PCR（Q-PCR）によるHCC=A、FNH=BでのOBc15（配列番号11）の発現の定量評価は、正常組織（C=非腫瘍性（正常）肝臓；D=肺正常；F=結腸正常；H=睾丸正常；J=筋肉正常；K=皮膚正常；L=心臓正常；M=腎臓正常）および他の癌（E=肺癌；G=結腸癌；I=睾丸癌）の発現パターンと比較する。Mann-Whitney-U検定（異常に分布したデータに利用された非パラメータ検定）は、Wilcoxon検定としてオプションpaired="false"を用いて実施され、2つの群の大きいほうの順位和を与え（HCC）（=Wilcoxon値、W）、そして表7に示すようなすべての組織サンプル（HCC=肝細胞癌；FNH=限局性結節性過形成；NNL=非腫瘍性（正常）肝臓；肺N=肺正常；Col N=結腸正常；Tst.N=睾丸正常；Ms.N=筋肉正常；皮膚N=皮膚正常；Hrt.N=心臓正常；Kdny.N=腎臓正常）および他の癌（肺C=肺癌；Col.C=結腸癌；Tst.C=睾丸癌）でのOBc15分布の有意差（P値）を示す。

【0293】

10

20

30

【表 1 1】

表7:各種の組織サンプル中のOBcl5の分布

データ	W	P値
HCC 対 FNH	71	0.0005468
HCC 対 NNL	54	0.001504
HCC 対 肺 N	54	0.001504
HCC 対 肺 C	36	0.01053
HCC 対 Col. N	54	0.001504
HCC 対 Col. C	54	0.001504
HCC 対 Tst. N	72	0.0002734
HCC 対 Tst. C	54	0.001504
HCC 対 Ms. N	72	0.0002734
HCC 対 皮膚 N	54	0.001504
HCC 対 Hrt. N	54	0.001504
HCC 対 Kdny. N	54	0.001504

10

20

【 0 2 9 4 】

【図 3】独立 HCC サンプルおよび対照での核酸（配列番号 10 ~ 19）の発現を示す RT-PCR データ 「ハウスキーピング」遺伝子グリセルアルデヒドホスフェートデヒドロゲナーゼ（GAPDH）の増幅は、cDNA 品質を制御するために、各 cDNA テンプレートとの並列反応に含まれていた。30 ~ 40 回の PCR サイクルを受けた RT-PCR 反応生成物の 5 ~ 10 % をアガロースに装填し、臭化エチジウムで染色した DNA ゲルをここに描出した。HCC ライブラリープールからの精製 DNA は、本発明による各核酸の正の対照（C）として含まれる。この分析ではそれぞれの本発明による核酸について、2 つの独立した HCC サンプル（H）が 1 つの非罹患肝臓サンプル（N）とともに含まれていた。M = 分子量マーカー（100 bp ラダー）。

30

【図 4】RNA プロットによるディファレンシャル遺伝子発現の検証 3 つの非罹患肝臓（L）および 2 つの HCC 組織（H）のプールからの RNA サンプルの独立した評価は、図に示すように、RNA プロットオートラジオグラムのこの画像において、OBcl1（配列番号 10）および OBcl5（配列番号 11）の発現増加を検証する。各配列に特異的なアンチセンス鎖プローブ（A、上；特異的シグナル）および負の対照としての対応するセンス鎖プローブ（B、下）からの結果は、アンチセンスプローブによるハイブリダイゼーションの特異性を示す。

40

【図 5】HCC 対 NNL の OBcl5 RNA 局在化 インサイチュールハイブリダイゼーション分析は、肝細胞癌（HCC）および非腫瘍性肝臓（NNL）サンプルにおいて OBcl5 RNA を検出する。放射性同位体標識アンチセンスプローブ（as）は、組織切片の OBcl5 RNA と特異的にハイブリダイズし、オートラジオグラフィエマルジョンによる切片の展開によって検出される。暗点は、OBcl5 RNA に対する特異的ハイブリダイゼーションを示すエマルジョンからの展開された銀粒子である。相補性センスプローブは、アンチセンスプローブへの化学的類似性にもかかわらず、インサイチュールで OBcl5 RNA にハイブリダイズできない。したがってセンスプローブは、バックグラウンドシグナルのみが検出されるパネル A および C で負の対照として作用する。OB

50

c l 5 RNA はパネル B に示した N N L でわずかに検出され、パネル D の多数の銀粒子スポットによって明示されるように、インサイチューで H C C にて明確に示される。各パネルは、倍率 2 0 0 倍 (2 0 0 X) で示される。

【図 6】 O B c l 5 RNA 発現の s i RNA 仲介ノックダウン Hep G 2 細胞は、 O B c l 5 RNA 配列に対して特異的である s i RNA オリゴヌクレオチドによって、またはスクランブル配列であるが同一組成の、負の対照としてのオリゴヌクレオチドによって形質移入した (表 1 0) 。これらの特異的オリゴヌクレオチドは、 O B c l 5 RNA と相互作用して、それを不安定化し、それによって肝臓癌細胞中のこの RNA のレベルを低下させ、 O B c l 5 RNA レベルのノックダウンとして既知の工程である。負の対照によってスクランブルされたオリゴヌクレオチドは、次の実験読み出しのための対照参照 RNA を提供するために、並行形質移入で使用する。 Q - P C R を利用して、 3 つの独立した実験 (A 、 B および C) から、スクランブルされたオリゴヌクレオチド形質移入 (対照) 細胞と比較して、特異的オリゴヌクレオチド形質移入細胞 (実験) における、 O B c l 5 RNA および網膜細胞芽腫タンパク質 1 (R B 1) m R N A の発現のレベルを判定した。 Y 軸は、 O B c l 5 m R N A 残存活性 (白色、左列) の \log_2 パーセント値を表す ; これに対して R B 1 m R N A \log_2 比の値は、 O B c l 5 s i RNA 形質移入対対照オリゴ形質移入 Hep G 2 細胞での R B 1 m R N A のレベルの倍増を示す (黒色、右列) 。特異的 s i RNA オリゴヌクレオチドによって仲介された O B c l 5 RNA の減少は、明らかである。対照細胞では上昇しないが、実験における R B 1 m R N A のレベル上昇は、 O B c l 5 発現がこの腫瘍サプレッサ m R N A のレベルを負に調節することを示唆する。

【図 7】 組織での D A P 3 タンパク質発現 タンパク質抽出物は、ヒト組織におけるこれらのタンパク質の発現レベルを判定するために、 D A P 3 および β - アクチンタンパク質に特異的な抗体を用いた免疫プロット分析を受ける。ホースラディッシュペルオキシダーゼ (H R P) 結合二次抗体を用いたインキュベーションおよび化学発光 H R P 基質による免疫複合体の検出の後、バンドの強度を濃度測定によって分析し、各シグナルを β - アクチンシグナルの強度に正規化する。各レーンに示した組織を、これらの組織での D A P 3 タンパク質レベルの定量分析も含む表 8 に定義する。これらの分析は、 D A P 3 タンパク質、すなわち H C C で特異的にアップレギュレートされた D A P 3 m R N A の機能生成物も、 H C C で高度に過剰発現されることを示す。

【 0 2 9 5 】

10

20

30

【表 1 2】

表8:図7で検査した組織およびヒト組織抽出物におけるDAP3タンパク質発現レベルの濃度測定による定量

番号	組織	DAP-3	β -アクチン	DAP-3正規化
1	脳	1.5	7.4	1.4
2	小脳	1.6	7.5	1.4
3	心臓	1.2	0.0	1.2
4	結腸	3.3	7.4	3.0
5	肺	0.0	6.7	0.0
6	胃	4.2	6.2	4.6
7	膵臓	16.3	6.2	17.8
8	腎臓	0.0	0.0	0.0
9	前立腺	0.9	4.2	1.5
10	子宮	1.4	9.2	1.0
11	HCC2	20.7	6.3	22.2
12	HCC3	31.1	8.0	26.3
13	HCC4	15.6	6.9	15.3
14	肝臓	1.9	3.5	3.7
15	骨格筋	0.1	0.0	0.1
16	睾丸	0.5	6.0	0.6
17	脾臓	0.0	5.1	0.0
18	乳線	0.4	8.1	0.3

10

20

30

【0296】

【図8】ヘパトーマ細胞の増殖に相関するHCC調節解除遺伝子の発現 静止細胞の血清刺激の8時間(黒列)および12時間(白列)後の、肝臓癌細胞(Hep3B)における本発明による標的遺伝子配列の増殖依存性発現。cDNAマイクロアレイ実験読み取りからの血清刺激対静止発現値の \log_2 変換比が提供される。静止肝臓癌細胞と比較した、増殖でのこれらの配列の発現レベルの実質的上昇は、これらの配列が肝臓癌細胞増殖にとって機能的に重要であることを示唆している。

40

【配列表】

1223FPC.ST25.txt
SEQUENCE LISTING

<110> ORIDIS BIOMED Forschungs- und Entwicklungs GmbH
Guehly, Christian
Buck, Charles R.
Zatloukal, Kurt

<120> Polypeptides and nucleic acids encoding these and their use
for the prevention, diagnosis or treatment of liver disorders and
epithelial cancer

<130> Oridis Biomed

10

<140> 1223FPC
<141> 2003-09-22

<160> 73

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 654
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Tyr Ser Ser Ser Cys Glu Thr Thr Arg Asn Thr Thr Gly Ile Glu
1 5 10 15

20

Glu Ser Thr Asp Gly Met Ile Leu Gly Pro Glu Asp Leu Ser Tyr Gln
20 25 30

Ile Tyr Asp Val Ser Gly Glu Ser Asn Ser Ala Val Ser Thr Glu Asp
35 40 45

Leu Lys Glu Cys Leu Lys Lys Gln Leu Glu Phe Cys Phe Ser Arg Glu
50 55 60

30

Asn Leu Ser Lys Asp Leu Tyr Leu Ile Ser Gln Met Asp Ser Asp Gln
65 70 75 80

Phe Ile Pro Ile Trp Thr Val Ala Asn Met Glu Glu Ile Lys Lys Leu
85 90 95

Thr Thr Asp Pro Asp Leu Ile Leu Glu Val Leu Arg Ser Ser Pro Met
100 105 110

Val Gln Val Asp Glu Lys Gly Glu Lys Val Arg Pro Ser His Lys Arg

40

1223FPC.ST25.txt
120

115

125

Cys Ile Val Ile Leu Arg Glu Ile Pro Glu Thr Thr Pro Ile Glu Glu
130 135 140

Val Lys Gly Leu Phe Lys Ser Glu Asn Cys Pro Lys Val Ile Ser Cys
145 150 155 160

Glu Phe Ala His Asn Ser Asn Trp Tyr Ile Thr Phe Gln Ser Asp Thr
165 170 175

10

Asp Ala Gln Gln Ala Phe Lys Tyr Leu Arg Glu Glu Val Lys Thr Phe
180 185 190

Gln Gly Lys Pro Ile Met Ala Arg Ile Lys Ala Ile Asn Thr Phe Phe
195 200 205

Ala Lys Asn Gly Tyr Arg Leu Met Asp Ser Ser Ile Tyr Ser His Pro
210 215 220

Ile Gln Thr Gln Ala Gln Tyr Ala Ser Pro Val Phe Met Gln Pro Val
225 230 235 240

20

Tyr Asn Pro His Gln Gln Tyr Ser Val Tyr Ser Ile Val Pro Gln Ser
245 250 255

Trp Ser Pro Asn Pro Thr Pro Tyr Phe Glu Thr Pro Leu Ala Pro Phe
260 265 270

Pro Asn Gly Ser Phe Val Asn Gly Phe Asn Ser Pro Gly Ser Tyr Lys
275 280 285

30

Thr Asn Ala Ala Ala Met Asn Met Gly Arg Pro Phe Gln Lys Asn Arg
290 295 300

Val Lys Pro Gln Phe Arg Ser Ser Gly Gly Ser Glu His Ser Thr Glu
305 310 315 320

Gly Ser Val Ser Leu Gly Asp Gly Gln Leu Asn Arg Tyr Ser Ser Arg
325 330 335

Asn Phe Pro Ala Glu Arg His Asn Pro Thr Val Thr Gly His Gln Glu

40

1223FPC.ST25.txt
345

340

350

Gln Thr Tyr Leu Gln Lys Glu Thr Ser Thr Leu Gln Val Glu Gln Asn
355 360 365

Gly Asp Tyr Gly Arg Gly Arg Arg Thr Leu Phe Arg Gly Arg Arg Arg
370 375 380

Arg Glu Asp Asp Arg Ile Ser Arg Pro His Pro Ser Thr Ala Glu Ser
385 390 395 400

10

Lys Ala Pro Thr Pro Lys Phe Asp Leu Leu Ala Ser Asn Phe Pro Pro
405 410 415

Leu Pro Gly Ser Ser Ser Arg Met Pro Gly Glu Leu Val Leu Glu Asn
420 425 430

Arg Met Ser Asp Val Val Lys Gly Val Tyr Lys Glu Lys Asp Asn Glu
435 440 445

Glu Leu Thr Ile Ser Cys Pro Val Pro Ala Asp Glu Gln Thr Glu Cys
450 455 460

20

Thr Ser Ala Gln Gln Leu Asn Met Ser Thr Ser Ser Pro Cys Ala Ala
465 470 475 480

Glu Leu Thr Ala Leu Ser Thr Thr Gln Gln Glu Lys Asp Leu Ile Glu
485 490 495

Asp Ser Ser Val Gln Lys Asp Gly Leu Asn Gln Thr Thr Ile Pro Val
500 505 510

30

Ser Pro Pro Ser Thr Thr Lys Pro Ser Arg Ala Ser Thr Ala Ser Pro
515 520 525

Cys Asn Asn Asn Ile Asn Ala Ala Thr Ala Val Ala Leu Gln Glu Pro
530 535 540

Arg Lys Leu Ser Tyr Ala Glu Val Cys Gln Lys Pro Pro Lys Glu Pro
545 550 555 560

Ser Ser Val Leu Val Gln Pro Leu Arg Glu Leu Arg Ser Asn Val Val

40

1223FPC.ST25.txt
570

565

575

Ser Pro Thr Lys Asn Glu Asp Asn Gly Ala Pro Glu Asn Ser Val Glu
580 585 590

Lys Pro His Glu Lys Pro Glu Ala Arg Ala Ser Lys Asp Tyr Ser Gly
595 600 605

Phe Arg Gly Asn Ile Ile Pro Arg Gly Ala Ala Gly Lys Ile Arg Glu
610 615 620

10

Gln Arg Arg Gln Phe Ser His Arg Ala Ile Pro Gln Gly Val Thr Arg
625 630 635 640

Arg Asn Gly Lys Glu Gln Tyr Val Pro Pro Arg Ser Pro Lys
645 650

<210> 2
<211> 72
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20

<400> 2

Met Gly Val Glu Leu Met Met Glu Leu Glu Pro Leu Gln Gly Asn Glu
1 5 10 15

Glu Thr Arg Ala Leu Phe Met Pro Arg Glu Asp Thr Ala Arg Pro Gln
20 25 30

Ser Ala Ser Gln Glu Glu Ser Ser Arg Glu Pro Asp His Ala Gly Thr
35 40 45

Leu Ile Val Asp Ile Ser Thr Ser Arg Thr Val Ile Gln Asn Ala Tyr
50 55 60

30

Val Ser Leu Glu Glu Thr Leu Lys
65 70

<210> 3
<211> 367
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

40

1223FPC.ST25.txt

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

10

20

30

1223FPC.ST25.txt

Asp Arg Asn Ile Val Gln Glu Asp His Pro Ile Met Ser Phe Thr Ile
 225 230 235 240

Ser Lys Asn Gly Arg Leu Ala Leu Leu Asn Val Ala Thr Gln Gly Val
 245 250 255

His Leu Trp Asp Leu Gln Asp Arg Val Leu Val Arg Lys Tyr Gln Gly
 260 265 270

Val Thr Gln Gly Phe Tyr Thr Ile His Ser Cys Phe Gly Gly His Asn
 275 280 285

Glu Asp Phe Ile Ala Ser Gly Ser Glu Asp His Lys Val Tyr Ile Trp
 290 295 300

His Lys Arg Ser Glu Leu Pro Ile Ala Glu Leu Thr Gly His Thr Arg
 305 310 315 320

Thr Val Asn Cys Val Ser Trp Asn Pro Gln Ile Pro Ser Met Met Ala
 325 330 335

Ser Ala Ser Asp Asp Gly Thr Val Arg Ile Trp Gly Pro Ala Pro Phe
 340 345 350

Ile Asp His Gln Asn Ile Glu Glu Glu Cys Ser Ser Met Asp Ser
 355 360 365

<210> 4
 <211> 188
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4

Met Asp Val Asn Ile Ala Pro Leu Arg Ala Trp Asp Asp Phe Phe Pro
 1 5 10 15

Gly Ser Asp Arg Phe Ala Arg Pro Asp Phe Arg Asp Ile Ser Lys Trp
 20 25 30

Asn Asn Arg Val Val Ser Asn Leu Leu Tyr Tyr Gln Thr Asn Tyr Leu
 35 40 45

10

20

30

1223FPC.ST25.txt
 Val Val Ala Ala Met Met Ile Ser Ile Val Gly Phe Leu Ser Pro Phe
 50 55 60

Asn Met Ile Leu Gly Gly Ile Val Val Val Leu Val Phe Thr Gly Phe
 65 70 75 80

Val Trp Ala Ala His Asn Lys Asp Val Leu Arg Arg Met Lys Lys Arg
 85 90 95

Tyr Pro Thr Thr Phe Val Met Val Val Met Leu Ala Ser Tyr Phe Leu
 100 105 110

10

Ile Ser Met Phe Gly Gly Val Met Val Phe Val Phe Gly Ile Thr Phe
 115 120 125

Pro Leu Leu Leu Met Phe Ile His Ala Ser Leu Arg Leu Arg Asn Leu
 130 135 140

Lys Asn Lys Leu Glu Asn Lys Met Glu Gly Ile Gly Leu Lys Arg Thr
 145 150 155 160

20

Pro Met Gly Ile Val Leu Asp Ala Leu Glu Gln Gln Glu Glu Gly Ile
 165 170 175

Asn Arg Leu Thr Asp Tyr Ile Ser Lys Val Lys Glu
 180 185

<210> 5
 <211> 398
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 5

30

Met Met Leu Lys Gly Ile Thr Arg Leu Ile Ser Arg Ile His Lys Leu
 1 5 10 15

Asp Pro Gly Arg Phe Leu His Met Gly Thr Gln Ala Arg Gln Ser Ile
 20 25 30

Ala Ala His Leu Asp Asn Gln Val Pro Val Glu Ser Pro Arg Ala Ile
 35 40 45

Ser Arg Thr Asn Glu Asn Asp Pro Ala Lys His Gly Asp Gln His Glu

40

1223FPC.ST25.txt

50

55

60

Gly Gln His Tyr Asn Ile Ser Pro Gln Asp Leu Glu Thr Val Phe Pro
65 70 75 80

His Gly Leu Pro Pro Arg Phe Val Met Gln Val Lys Thr Phe Ser Glu
85 90 95

Ala Cys Leu Met Val Arg Lys Pro Ala Leu Glu Leu Leu His Tyr Leu
100 105 110

10

Lys Asn Thr Ser Phe Ala Tyr Pro Ala Ile Arg Tyr Leu Leu Tyr Gly
115 120 125

Glu Lys Gly Thr Gly Lys Thr Leu Ser Leu Cys His Val Ile His Phe
130 135 140

Cys Ala Lys Gln Asp Trp Leu Ile Leu His Ile Pro Asp Ala His Leu
145 150 155 160

Trp Val Lys Asn Cys Arg Asp Leu Leu Gln Ser Ser Tyr Asn Lys Gln
165 170 175

20

Arg Phe Asp Gln Pro Leu Glu Ala Ser Thr Trp Leu Lys Asn Phe Lys
180 185 190

Thr Thr Asn Glu Arg Phe Leu Asn Gln Ile Lys Val Gln Glu Lys Tyr
195 200 205

Val Trp Asn Lys Arg Glu Ser Thr Glu Lys Gly Ser Pro Leu Gly Glu
210 215 220

30

Val Val Glu Gln Gly Ile Thr Arg Val Arg Asn Ala Thr Asp Ala Val
225 230 235 240

Gly Ile Val Leu Lys Glu Leu Lys Arg Gln Ser Ser Leu Gly Met Phe
245 250 255

His Leu Leu Val Ala Val Asp Gly Ile Asn Ala Leu Trp Gly Arg Thr
260 265 270

Thr Leu Lys Arg Glu Asp Lys Ser Pro Ile Ala Pro Glu Glu Leu Ala

40

275 1223FPC.ST25.txt 285
280

Leu Val His Asn Leu Arg Lys Met Met Lys Asn Asp Trp His Gly Gly
290 295 300

Ala Ile Val Ser Ala Leu Ser Gln Thr Gly Ser Leu Phe Lys Pro Arg
305 310 315 320

Lys Ala Tyr Leu Pro Gln Glu Leu Leu Gly Lys Glu Gly Phe Asp Ala
325 330 335 10

Leu Asp Pro Phe Ile Pro Ile Leu Val Ser Asn Tyr Asn Pro Lys Glu
340 345 350

Phe Glu Ser Cys Ile Gln Tyr Tyr Leu Glu Asn Asn Trp Leu Gln His
355 360 365

Glu Lys Ala Pro Thr Glu Glu Gly Lys Lys Glu Leu Leu Phe Leu Ser
370 375 380

Asn Ala Asn Pro Ser Leu Leu Glu Arg His Cys Ala Tyr Leu
385 390 395 20

<210> 6
<211> 261
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Ala Gly Pro Glu Leu Leu Leu Asp Ser Asn Ile Arg Leu Trp Val
1 5 10 15

Val Leu Pro Ile Val Ile Ile Thr Phe Phe Val Gly Met Ile Arg His
20 25 30 30

Tyr Val Ser Ile Leu Leu Gln Ser Asp Lys Lys Leu Thr Gln Glu Gln
35 40 45

Val Ser Asp Ser Gln Val Leu Ile Arg Ser Arg Val Leu Arg Glu Asn
50 55 60

Gly Lys Tyr Ile Pro Lys Gln Ser Phe Leu Thr Arg Lys Tyr Tyr Phe
65 70 75 80

10

20

30

40

1223FPC.ST25.txt

Asn Asn Pro Glu Asp Gly Phe Phe Lys Lys Thr Lys Arg Lys Val Val
85 90 95

Pro Pro Ser Pro Met Thr Asp Pro Thr Met Leu Thr Asp Met Met Lys
100 105 110

Gly Asn Val Thr Asn Val Leu Pro Met Ile Leu Ile Gly Gly Trp Ile
115 120 125

10

Asn Met Thr Phe Ser Gly Phe Val Thr Thr Lys Val Pro Phe Pro Leu
130 135 140

Thr Leu Arg Phe Lys Pro Met Leu Gln Gln Gly Ile Glu Leu Leu Thr
145 150 155 160

Leu Asp Ala Ser Trp Val Ser Ser Ala Ser Trp Tyr Phe Leu Asn Val
165 170 175

Phe Gly Leu Arg Ser Ile Tyr Ser Leu Ile Leu Gly Gln Asp Asn Ala
180 185 190

20

Ala Asp Gln Ser Arg Met Met Gln Glu Gln Met Thr Gly Ala Ala Met
195 200 205

Ala Met Pro Ala Asp Thr Asn Lys Ala Phe Lys Thr Glu Trp Glu Ala
210 215 220

Leu Glu Leu Thr Asp His Gln Trp Ala Leu Asp Asp Val Glu Glu Glu
225 230 235 240

Leu Met Ala Lys Asp Leu His Phe Glu Gly Met Phe Lys Lys Glu Leu
245 250 255

30

Gln Thr Ser Ile Phe
260

<210> 7
<211> 403
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 7

40

1223FPC.ST25.txt

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

10

20

30

1223FPC.ST25.txt

Lys Glu Val Leu Leu Lys His Ile Ser Pro Asp Gln Val Pro Val Glu
 225 230 235 240

Tyr Gly Gly Thr Met Thr Asp Pro Asp Gly Asn Pro Lys Cys Lys Ser
 245 250 255

Lys Ile Asn Tyr Gly Gly Asp Ile Pro Arg Lys Tyr Tyr Val Arg Asp
 260 265 270

Gln Val Lys Gln Gln Tyr Glu His Ser Val Gln Ile Ser Arg Gly Ser
 275 280 285

Ser His Gln Val Glu Tyr Glu Ile Leu Phe Pro Gly Cys Val Leu Arg
 290 295 300

Trp Gln Phe Met Ser Asp Gly Ala Asp Val Gly Phe Gly Ile Phe Leu
 305 310 315 320

Lys Thr Lys Met Gly Glu Arg Gln Arg Ala Gly Glu Met Thr Glu Val
 325 330 335

Leu Pro Asn Gln Arg Tyr Asn Ser His Leu Val Pro Glu Asp Gly Thr
 340 345 350

Leu Thr Cys Ser Asp Pro Gly Ile Tyr Val Leu Arg Phe Asp Asn Thr
 355 360 365

Tyr Ser Phe Ile His Ala Lys Lys Val Asn Phe Thr Val Glu Val Leu
 370 375 380

Leu Pro Asp Lys Ala Ser Glu Glu Lys Met Lys Gln Leu Gly Ala Gly
 385 390 395 400

Thr Pro Lys

<210> 8
 <211> 251
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 8

10

20

30

40

1223FPC.ST25.txt

Met Asp Met Lys Arg Arg Ile His Leu Glu Leu Arg Asn Arg Thr Pro
1 5 10 15

Ala Ala Val Arg Glu Leu Val Leu Asp Asn Cys Lys Ser Asn Asp Gly
20 25 30

Lys Ile Glu Gly Leu Thr Ala Glu Phe Val Asn Leu Glu Phe Leu Ser
35 40 45

Leu Ile Asn Val Gly Leu Ile Ser Val Ser Asn Leu Pro Lys Leu Pro
50 55 60

10

Lys Leu Lys Lys Leu Glu Leu Ser Glu Asn Arg Ile Phe Gly Gly Leu
65 70 75 80

Asp Met Leu Ala Glu Lys Leu Pro Asn Leu Thr His Leu Asn Leu Ser
85 90 95

Gly Asn Lys Leu Lys Asp Ile Ser Thr Leu Glu Pro Leu Lys Lys Leu
100 105 110

20

Glu Cys Leu Lys Ser Leu Asp Leu Phe Asn Cys Glu Val Thr Asn Leu
115 120 125

Asn Asp Tyr Arg Glu Ser Val Phe Lys Leu Leu Pro Gln Leu Thr Tyr
130 135 140

Leu Asp Gly Tyr Asp Arg Glu Asp Gln Glu Ala Pro Asp Ser Asp Ala
145 150 155 160

Glu Val Asp Gly Val Asp Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu Gly Glu Asp
165 170 175

30

Glu Glu Asp Glu Asp Asp Glu Asp Gly Glu Glu Glu Glu Phe Asp Glu
180 185 190

Glu Asp Asp Glu Asp Glu Asp Val Glu Gly Asp Glu Asp Asp Asp Glu
195 200 205

Val Ser Glu Glu Glu Glu Glu Phe Gly Leu Asp Glu Glu Asp Glu Asp
210 215 220

1223FPC.ST25.txt

Glu Asp Glu Asp Glu Glu Glu Glu Glu Gly Gly Lys Gly Glu Lys Arg
225 230 235 240

Lys Arg Glu Thr Asp Asp Glu Gly Glu Asp Asp
245 250

<210> 9
<211> 151
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9

10

Met Pro Arg Gly Ser Arg Ser Arg Thr Ser Arg Met Ala Pro Pro Ala
1 5 10 15

Ser Arg Ala Pro Gln Met Arg Ala Ala Pro Arg Pro Ala Pro Val Ala
20 25 30

Gln Pro Pro Ala Ala Ala Pro Pro Ser Ala Val Gly Ser Ser Ala Ala
35 40 45

Ala Pro Arg Gln Pro Gly Leu Met Ala Gln Met Ala Thr Thr Ala Ala
50 55 60

20

Gly Val Ala Val Gly Ser Ala Val Gly His Thr Leu Gly His Ala Ile
65 70 75 80

Thr Gly Gly Phe Ser Gly Gly Ser Asn Ala Glu Pro Ala Arg Pro Asp
85 90 95

Ile Thr Tyr Gln Glu Pro Gln Gly Thr Gln Pro Ala Gln Gln Gln
100 105 110

30

Pro Cys Leu Tyr Glu Ile Lys Gln Phe Leu Glu Cys Ala Gln Asn Gln
115 120 125

Gly Asp Ile Lys Leu Cys Glu Gly Phe Asn Glu Val Leu Lys Gln Cys
130 135 140

Arg Leu Ala Asn Gly Leu Ala
145 150

<210> 10

40

1223FPC.ST25.txt

<211> 6497

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 10

ccgggtggag gggcaaggcg agtgtgtgtc cttatcctag caattggggc gcgggcctgt
60

gagccagttg gagttgcggc ggcgggaacg attgggctga gcagaggacg acatgttgct
120

tttcgtggag catttatggg gttaagtggc atgggatttc tgtttctgat agtaaatagc
180

aggtagcatc taaaggaact ggtttaaatc ctaatgccaa agtatggcaa gaaattgctc
240

ctggaatac tgatgccacc ccagtaactc atggaactga aagctcttgg catgaaatag
300

cagctacatc aggtgctcat cctgagggta atgcagagct ctcagaagat atatgtaaag
360

aatatgaagt aatgtattct tcattttgtg aaaccacaag aaatactaca ggcaattgaag
420

aatcaactga tgggatgatt ttaggaccag aagatctgag ttaccaaata tatgatgttt
480

ccggagaaag caattcagca gtttctacag aagacctaaa agaatgtctg aagaacaat
540

tagaattctg tttttcacga gaaaatttgt caaaggatct ttacttgata tctcaaatgg
600

atagtgatca gttcatccca atttggacag ttgccaacat ggaagaaata aaaaagttga
660

ctacagacc tgatctaatt cttgaagtgt taagatcttc tcccatggta caagttgatg
720

agaagggtga gaaagtgaga ccaagtcata agcgttgtat tgtaattctt agagagattc
780

ctgaaacaac accaatagag gaagtgaaag gtttgttcaa aagtgaaaac tgccccaag
840

tgataagctg tgagtttgca cacaatagca actggtatat cactttccag tcagacacag
900

atgcacaaca ggcttttaaa tacttaagag aagaagttaa aacatttcag ggcaagccaa
960

ttatggcaag gataaaagcc atcaatacat tttttgctaa gaatggttat cgattaatgg
1020

10

20

30

1223FPC.ST25.txt

attctagtat ctatagtcac cccattcaaa ctcaagcaca gtatgcctcc ccagtcctta
1080

tgcagcctgt atataatcct caccaacagt actcggctca tagtattgtg cctcagtcctt
1140

ggctctcaaa tcctacacct tactttgaaa caccactggc tccctttccc aatggtagtt
1200

ttgtgaatgg ctttaattcg ccaggatcct ataaaacaaa tgctgctgct atgaatatgg
1260

gtcgaccatt ccaaaaaaat cgtgtgaagc ctcagtttag gtcatctggt ggttcagaac
1320

10

actcaacaga gggctctgta tccttggggg atggacagtt gaacagatat agttcaagaa
1380

actttccagc tgaacggcat aacccacag taactgggca tcaggagcaa acttaccttc
1440

agaaggagac ttccactttg caggtggaac agaatgggga ctatggtagg ggcaggagaa
1500

ctctcttcag aggtcgaaga cgacgagaag atgacaggat ctcaagacct catccttcaa
1560

cagctgaatc aaaggctcca acaccaaagt ttgacttatt agcctcaaat tttccacctt
1620

20

tacctggaag ttcatacaaga atgccaggtg aactcgtttt ggagaatagg atgtctgatg
1680

ttgttaaagg tgtctacaaa gaaaaggata atgaagagtt gacaattagt tgcccagtcg
1740

ctgcagatga gcagacagaa tgcacttctg cccagcaact caatatgagt accagttctc
1800

catgtgctgc tgagcttact gcattaagca caactcagca agaaaaggat ctaatagaag
1860

attcctctgt tcagaaggat ggtctcaatc agacaactat accagtttct cctccaagta
1920

30

ctacaaagcc atcgagggca agtactgctt caccatgtaa taataacata aatgcagcta
1980

cagctgtggc tctacaggaa ccccgaaagt taagttatgc tgaagtgtgc cagaagcccc
2040

ctaaagagcc atcttcagtt cttgtgcagc cactacggga acttcgctcc aatgtggtgt
2100

ctcccaccaa aatgaagac aatggagctc ctgagaactc cgttgagaaa ccacatgaga
2160

40

1223FPC.ST25.txt

agccagaagc aagggctagt aaggattatt ctggcttccg aggcaatata atccccaggg
2220

gagcagcagg aaaaatcagg gaacagagac gccagtttag ccatagggct atacctcagg
2280

gagtgactcg acgtaatggc aaagagcaat atgtgccacc cagatcacca aagtaaaaaa
2340

caacaaaact attcaaaaac ttcactctct tcccattaaa cttgaactgt ggctatattg
2400

aactgttttg gaggggaggg ggtagccagg aaggaaacaa gagaaagtac gtccatttca
2460

ttatggattt tggagttgtg agtgatagga tcccaaaatt catctctaatt gtggttttta
2520

aatgctggag gattccaatc aatataaata tatatatata tatacacaca catatataaa
2580

aagtataatt tttctatttt tgtttttggg ttttaatttg agagatttgc tgccaggaat
2640

caattttgag ggttcagatt tagcttggaa gaaaaaaaaag aaacatacat ccttcagtat
2700

aggagatgag ggaatgagag aaaatatttt ttgaagaagc atttctgtaa aattagaat
2760

tacttttttt aatctattta aagtttggct tgaagaatgc catctctgac tatatggcct
2820

tgtattgcaa agcagatcag tggctggggg gcctgtttgt ggtgtgagtg tgtacaagag
2880

cgattgaagc caaatctggt gtcattgtag taaatgattt gaaaactgaa tgtaataact
2940

gagtagattt ttttttctag tttgaaattt agtctgtctt tttgacctta ctaatatttc
3000

atthaacaag ttgtaaaaact ctgattgtac ttagagatgt gactaccaat cagtttgata
3060

ctcaaggaaa gggggttatt caagaaattg aaaatttcat cttggacctc agtgcacgg
3120

tcaaattgat ttcagagggt taaacttccc tgtgattccc cctgaatacc cccaaaatga
3180

gaaacaaaat ttttttctt actccatttg ttactctctg ttctttgact gccaccacc
3240

agaaaagcaa aataaccaac tacctactca attgtgtggt tgtaattgct ttgagcagtc

10

20

30

40

1223FPC.ST25.txt

3300
tagtcaaatc atataaattg ttctaaattt cagaattgaa cattgaagta ttaactcttc
3360
tgttcacaca tttagaattt tagctcccaa gatggtaggg cagactgacc gtacagtaat
3420
ttatttgcg ttagtgtaa agattaagca tagtaactga ctcttaagtg ttaaataatg
3480
tagaagtaaa aaaatTTTTT ttaaaggctt aatttgggag gggggactta tttctgttta
3540 10
cagtgtatta ccttccttcc ctctcttct cccccacac ccaacaaaat acagtttggg
3600
attcactgaa acagtaccag caagtcatga gatttttttag taaagatgag aaagatggtt
3660
gaagaaaatt agtgcataat ttctcagtga ataaagttgt agctctcata tactaaatag
3720
acaagtttac atgctgttat ttagaaaatg actaaaatat taaaaaccgt gttgtgtaa
3780
tctgttttaa gtcataccat gttcagagtt ctatgtaagg tgggttttat ttttctttta
3840 20
agggatagtt tgtaatagta agaactgtcc catatgtag taaattacat atgtacaaat
3900
tgaaactgta aattgtgaac actggaaagc accattgtga catagagtaa acatcttagt
3960
aatatattaa agtgaatgta aatgggtggtt aaaattacat tactgtgaaa ttcacttccc
4020
aactctaagt taagctttgg agatacatgt tagtggttaa ctgttaagag ctttgaaaac
4080
actgcacata tctgtacaag ccagaattac ttttctttg acttattatt agcttggcag
4140 30
ttgcttttga tttgattggt ttatgacatg gtatactact atatttactc agtttgaaac
4200
tattcatttc tacacactat ttttaaaaat tgcctactag gtgaaacata acaataaaac
4260
tacctgtgct gaaatttggg ggaagtttag gtcctttaa aaaacatatt aatcattgac
4320
tacatctatg ataaaagtgc ttattttggt ttactaagat aatgcagttg gtggaaatga
4380

1223FPC.ST25.txt

taaacgtttt aagtgttaac atcctttgaa tgcgttggat ttcagagaat aacattttg
4440

taaaaatcac ttgtaagga ttataaactt aattactgca cttaaaatga aacattactt
4500

tttttaaca atgtgtcaca aatgtaggtc tgtattactt gtatgcttgt gtgacttact
4560

gttagtccag ctctaaaaat ttaaaggttg taattgaaat acaagaaaag agccttcttt
4620

tagaagaaag caagtatatt tttgctttta cttcaaatgt tttttaaagt agaaatttaa
4680

10

ttttagata taacctttta aaattttctc attaagacaa tgtttttaat ttaatttgcc
4740

tcattacatc taatagttcc catttgatgg catgtatagg gaagagtggag agagtgtgtg
4800

tgtgtgtatg tgtgtgtaat atttatata attcacagta tgtatttagc atttattta
4860

ttacagcaga tttaaagttt gtatctaaat aatgcctatg agttgtgtga agctcttggc
4920

ttttttcca acgttacttt gtaactaatg aggggtggatg ttcattgtag tttatttatt
4980

20

tggttcttta gatggaggaa tttaaaaaat caaatttttc tcttcacctt tatgacttga
5040

catttcttg atctgttggg ggctaaaagt aggtataaat gatattgaat gttgggtata
5100

gtgatactct gccatagttc ttactgcatg aagagaacaa gagtcacaca agttcaccac
5160

tttgcacttc atagagaagg tacatagaga cattgcaaaa cctgtctcca tttgetatcc
5220

tgataattaa ggttttcata atacctaggg cctgtctctg agtaatttta attttgcaa
5280

30

atacactgac atttaaaata gtgatccatc taaatttttt tcagctgggt tttgaggaat
5340

ataagagctt tcaatgataa aggtttgttg tagttgtctt atgtgctgaa tttgcagatg
5400

atcagatgct gtgcagaatt ctgatttatt tttgtttcct aaaattaaga tagcttgaat
5460

attatttcac attccttttt ctttttttaa taaacaggtt tgctttggaa aggcttaatg
5520

40

1223FPC.ST25.txt

atggaatggt agcatcttca ctagggtaaa gaagaacaaa agaatgttg ctggaacgta
5580

aaatagtatt taaaagttaa tgaacacttc tctagttttc ttagttatgg ccttaataat
5640

tagtctcttg gcttaaagt ccactggttt tactttgaca cagttgaaca aactgggggt
5700

taagtctctg gtatttaggc tggcaatata tatattaacc atattttaa agtaccaatt
5760

ttgtttttac agaaaagata aaactcaaaa gagaacagtg tattccttct gaggggcttt
5820

tataaattat taactataat atatgatgga tttttccta atttttata tttccttaca
5880

attttggtgg ccattaattt aacttttaggc ttttgggcat atgctagtct gagcttccga
5940

aaagatacat atatgtttcc cttttcatta gctgaatgag gatattttaa gaagttgaaa
6000

gagaatttat tttcaagttg tgagtaaate ctcctttgaa attcacctga ttattagata
6060

acttaaagtt tattttttaa agctgacaac tttttatgaa tcttcgagtt gacagttcct
6120

aaaagcgtaa ctcagatatt aatgggctgt gtattaaatg gttttatttt cagttttgca
6180

gcacagaaca ctggtgaaat atccatatca acttgatttt ttaacctaa ttcaggtgtc
6240

ctttgcatct cttaaagtgt ggggggtgggg gtcagagcca gttatccggc ttctgttttg
6300

tcgattgctt agatttggtc ctgttgtcaa aactgttacc cccaaaattg gtgtgacaca
6360

tgctcatgca taaaatgta aatgagtac atccttgat ttgtatttgt tttcaacatc
6420

gccaaggtgc tatgggaaat taacaaaatt agaaaaaaaa taaaattatt aaaaagcaaa
6480

aaaaaaaaaa aaaaaaa
6497

<210> 11
<211> 484
<212> DNA

10

20

30

40

1223FPC.ST25.txt

<213> Homo sapiens

<400> 11

atgggggtgg aactcatgat ggaattggag cctttacaag ggaatgaaga gacaagagct
60ctctttatgc cacgtgagga tacagcaagg cccaatctg caagccagga agagtcgtca
120cgagaaccag accatgcagg aactctgatac gtggacattt caacctccag aactgtgatac
180caaaatgcat atgtatcttt ggaagaaact ctgaagtaaa ggccggaata ttctttgttt
240aaaacattaa aaacaaaaca gaccaaagca tcaagcaaga agtttcctgg caataaacta
300agcacagcat ttttttttaa ggaacacaaa ttaagtgttc aacctgtggc aaatttgtac
360tttctccctg aattatgttg ttatcaaaga aaaaaattgg gaagcatggc aaaatatcat
420caaaactgaa actagaatta aactaaatta aaataaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
480aaaa
484

<210> 12

<211> 1904

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 12

ctacgtgcaa aagcagaatg ggaaggctaa gggacagctt cccgatctaa actattggat
60aaacttcaga cctatttacc accatcagtg atgcttcccc cacggcgttt acagactctc
120ctgcggcagg cgggtggaact acaaagggat cgggtcctat atcacaatac caaacttgat
180aataatctag attctgtgtc tctgcttata gaccatgttt gtagtaggag gcagttccca
240tggtatacgc agcagatact tacggagcat tgtaatgaag tgtggttctg taaattctct
300aatgatggca ctaaactagc aacaggatca aaagatacaa cagttatcat atggcaagtt
360gatccggata cacacctgct aaaactgctt aaaacattag aaggacatgc ttatggcggtt
400

10

20

30

40

1223FPC.ST25.txt

420
 tcttatattg catggagtcc agatgacaac tatcttggtg cttgtggccc agatgactgc
 480
 tctgagcttt ggctttggaa tgtacaaaca ggagaactaa ggacaaaaat gagccagtct
 540
 catgaagaca gtttgacaag tgtggcttgg aatccagatg ggaagcgctt tgtgactgga
 600
 ggtcagcgtg ggcagttcta tcagtgtgac ttagatggta atctccttga ctctgggaa
 660 10
 ggggtaagag tgcaatgcct ttggtgcttg agtgatggaa agactgttct ggcatcagat
 720
 acacaccagc gaattcgggg ctataacttc gaggacctta cagataggaa catagtacaa
 780
 gaagatcatc ctattatgtc ttttactatt tcaaaaaatg gccgattagc tttgttaaat
 840
 gtagcaactc agggagtcca tttatgggac ttgcaagaca gagttttagt aagaaagtat
 900
 caaggtgtta cacaagggtt ttatacaatt cattcatggt ttggaggcca taatgaagac
 960 20
 ttcacgcta gtggcagtga agatcacaaag gtttacatct ggcacaaacg tagtgaactg
 1020
 ccaattgagg agctgacagg gcacacacgt acagtaaact gtgtgagctg gaaccacag
 1080
 attccatcca tgatggccag cgcctcagat gatggcactg ttagaatatg gggaccagca
 1140
 ccttttatag accaccagaa tattgaagag gaatgcagta gcatggatag ttgatggtga
 1200
 atttggagca gacgacctct gtttaactta aaattagtcg tattttaatg gcttgggatt
 1260 30
 tgggtgcaaac aaacatgatt gatagctgga cagacatgct cgtcatgaaa aaagaaccat
 1320
 ttctgaagcc cgattggggc caaacattta caccttgctt catagtaacc agttgagatg
 1380
 aagcacgtcg ttagaacggt gttggacacc atgttgaatt attccccat cggttgtgaa
 1440
 gaactgtgct acattcaggc ttaccattg aactcagtat atatattttt ttccttctg
 1500

1223FPC.ST25.txt
 tcttttgtct ggcaggatac cattcttggt gctcttctgt gtaatgaagt ttaaatgctt
 1560
 gtttggaaaa ctttatntaa cagtttagaa ggcttgatag aaagagtgca ttagtctgaa
 1620
 gagtatacat tggataggaa agaatttctt tcttttgttt ctccaaatct ttccgcctta
 1680
 tttagcttga gatctttgca gcttggttca tggattctag ccttgcccgt tgcgcagtat
 1740
 atactgatcc agatgataaa ccagtgaact atgtcaaaag cactctcaat attacatttg
 1800
 acaaaaagtt ttgtactttt cacatagctt gttgccccgt aaaagggta acagcacaat
 1860
 tttttaaaaa taaattaaga agtatttaaa aaaaaaaaaa aaaa
 1904

10

<210> 13
 <211> 2088
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

20

<400> 13
 cgctgtcaac tctccaactc agctcagctg atcggttgcc gccgcccgcg ccgccagatt
 60
 ctggaggcga agaacgcaaa gctgagaaca tggacgttaa tatcgcccca ctccgcgcct
 120
 gggacgattt ctccccgggt tccgatcgct ttgcccgcc ggacttcagg gacatttcca
 180
 aatggaacaa ccgcgtagtg agcaacctgc tctattacca gaccaactac ctggtggtgg
 240
 ctgccatgat gatttccatt gtggggtttc tgagtccctt caacatgatc ctgggaggaa
 300
 tcgtggtggt gctggtgttc acagggtttg tgtgggcagc ccacaataaa gacgtccttc
 360
 gccgatgaa gaagcgctac cccacgacgt tcgttatggt ggtcatgttg gcgagctatt
 420
 tccttatctc catgtttggg ggagtcattg tctttgtggt tggcattact tttcctttgc
 480
 tgttgatggt tatccatgca tcgttgagac ttcggaacct caagaacaaa ctggagaata
 540
 aatggaagg aataggtttg aagaggacac cgatgggcat tgccttggat gccctagaac

30

40

1223FPC.ST25.txt

600
 agcaggaaga aggcaccaac agactcactg actatatcag caaagtgaag gaataaacat
 660
 aacttacctg agctagggtt gcagcagaaa ttgagttgca gcttgccctt gtccagacct
 720
 atgttctgct tgcgtttttg aaacaggagg tgcacgtacc acccaattat ctatggcagc
 780
 atgcatgtat aggccgaact attatcagct ctgatgtttc agagagaaga cctcagaaac
 840 10
 cgaagaaaa ccaccacct cctattgtgt ctgaagtttc acgtgtgttt atgaaatcta
 900
 atgggaaatg gatcacacga tttctttaag ggaattaaaa aaaataaaag aattacggct
 960
 tttacagcaa caatacgatt atcttatagg aaaaaaaaa atcattgtaa agtatcaaga
 1020
 caatacgagt aaatgaaaag gctgttaaag tagatgacat catgtgttag cctgttccta
 1080
 aatccctaga attgtaatgt gtgggatata aattagtttt tattattctc ttaaaaaatca
 1140 20
 aagatgatct ctatcacttt gccacctggt tgatgtgcag tggaaactgg ttaagccagt
 1200
 tgttcact tcccttacia atataaagat agctgttttag gatattttgt tacatttttg
 1260
 taaatttttg aaatgctagt aatgtgtttt caccagcaag tatttgttgc aaacttaatg
 1320
 tcattttcct taagatggtt acagctatgt aacctgtatt attctggacg gacttattaa
 1380
 aatacaaca gacaaaaaat aaaacaaaac ttgagttcta tttaccttgc acattttttg
 1440 30
 ttgttacagt gaaaaaatg gtccaagaaa atgtttgcca tttttgcatt gtttcgtttt
 1500
 taactggaac atttagaaag aaggaaatga atgtgcattt tattaattcc ttaggggcac
 1560
 aaggaggaca ataatagctg atcttttgaa atttgaaaaa cgtctttaga tgaccaagca
 1620
 aaaagacttt aaaaaatggt aatgaaaatg gaatgcagct actgcagcta ataaaaaatt
 1680

1223FPC.ST25.txt

ttagatagca attgttacaa ccatatgcct ttatagctag acattagaat tatgatagca
1740

tgagtttata cattctatta ttttctcc ctttctcatg tttttataaa taggtaataa
1800

aaaatgtttt gcctgccaat tgaatgattt cgtagctgaa gtagaaacat ttaggtttct
1860

gtagcattaa attgtgaaga caactggagt ggtacttact gaagaaactc tctgtatgtc
1920

ctagaataag aagcaatgat gtgctgcttc tgatTTTTTt tgcattttta attctcagcc
1980

aacctacagc catgatcttt agcacagtga taccaccatg acttcacaga catggcttag
2040

aatctgtacc cttaccaca tatgaagaat aaaattgatt aaaggtta
2088

<210> 14

<211> 1650

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 14

gcctTTTTTg cagtctcagg acgggcgctt tggagccggc cccaggcagc gtgtgtcgg
60

cgctagtctt ggagaactag tcctcgactc acggtgaggg aatggaccga cacgggtatt
120

gtaccgctga gggaaaggag cgggactccg gacctccagg agtgcaagga tgatgctgaa
180

aggaataaca aggcttatct ctaggatcca taagttggac cctgggcggt tttacacat
240

ggggaccag gctcgccaaa gcattgctgc tcacctagat aaccaggttc cagttgagag
300

tccgagagct atttcccgca ccaatgagaa tgacctggcc aagcatgggg atcagcacga
360

gggtcagcac tacaacatct cccccagga tttggagact gtatttcccc atggccttc
420

tcctcgcttt gtgatgcagg tgaagacatt cagtgaagct tgctgatgg taaggaaacc
480

agccctagaa cttctgcatt acctgaaaa caccagtttt gcttatccag ctatacgata
540

tcttctgtat ggagagaagg gaacaggaaa aaccctaagt ctttgccatg ttattcattt

10

20

30

40

1223FPC.ST25.txt

600
ctgtgcaaaa caggactggc tgatactaca tattccagat gctcatcttt gggtgaaaaa
660
ttgtcgggat cttctgcagt ccagctacaa caaacagcgc tttgatcaac ctttagaggc
720
ttcaacctgg ctgaagaatt tcaaaactac aaatgagcgc ttcctgaacc agataaaagt
780
tcaagagaag tatgtctgga ataagagaga aagcactgag aaagggagtc ctctgggaga
840 10
agtggttgaa cagggcataa cacgggtgag gaacgccaca gatgcagttg gaattgtgct
900
gaaagagcta aagaggcaaa gttctttggg tatgtttcac ctctagtgg ccgtggatgg
960
aatcaatgct ctttggggaa gaaccactct gaaaagagaa gataaaagcc cgattgcccc
1020
cgaggaatta gcacttgttc acaacttgag gaaaatgatg aaaaatgatt ggcatggagg
1080
cgccatttg tgcgctttga gccagactgg gtctctcttt aagccccgga aagcctatct
1140 20
gccccaggag ttgctgggaa aggaaggatt tgatgccctg gatcccttta ttcccatcct
1200
ggtttccaac tataaccaa aggaatttga aagttgtatt cagtattatt tggaaaacaa
1260
ttggcttcaa catgagaaag ctctacaga agaagggaaa aaagagctgc tgttcctaag
1320
taacgcgaac ccctcgtgc tggagcggca ctgtgcctac ctctaagcca agatcacagc
1380
atgtgaggaa gacagtggac atctgcttta tgctggacct agtaagatga ggaagtcggg
1440 30
cagtacacag gaagaggagc cagggccttg tacctatggg attggacagg actgcagttg
1500
gctctggacc tgcattaaaa tgggtttcac tgtgaatgcg tgacaataag atattccctt
1560
gttcctaaaa ctttataatca gtttattgga tgtggttttt cacatttaag ataattatgg
1620
ctcttttcct aaaaaataaa atatctttct
1650

1223FPC.ST25.txt

<210> 15
 <211> 1109
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 15
 actggaagac caggcagccc agctgaaggc agtaagctcg gctcacagtc gcaggagagt
 60
 tctgggttac acgggcaaag gggcttgaga aggccccggag gcgaagccga agagaagcaa
 120
 ctgtgccccg gagaagagaa gctcgcccat tccagactgg gaaccagctt tcagtgaaga
 180
 tggcagggcc agaactggtg ctcgactcca acatccgcct ctgggtggtc ctacccatcg
 240
 ttatcatcac tttcttcgta ggcgatgatcc gccactacgt gtccatcctg ctgcagagcg
 300
 acaagaagct caccagagaa caagtatctg acagtcaagt cctaattcga agcagagtcc
 360
 tcagggaaaa tggaaaatac attcccaaac agtctttctt gacacgaaaa tattatttca
 420
 acaaccagaa ggatggattt ttcaaaaaaa ctaaaccggaa ggtagtgccca ctttctccta
 480
 tgactgatcc tactatggtg acagacatga tgaaagggaa tgtaacaaat gtccctcccta
 540
 tgattcttat tgggtgatgg atcaacatga cattctcagg ctttgtcaca accaagggtcc
 600
 catttcact gaccctccgt ttaagccta tgttacagca aggaatcgag ctactcatat
 660
 tagatgcatc ctgggtgagt tctgcatcct ggtacttctt caatgtatctt gggcttcgga
 720
 gcatttactc tctgattctg ggccaagata atgccgctga ccaatcacga atgatgcagg
 780
 agcagatgac gggagcagcc atggccatgc cgcagacac aaacaaagct ttcaagacag
 840
 agtgggaagc tttggagctg acggatcacc agtgggcact agatgatgtc gaagaagagc
 900
 tcattggcaa agacctccac ttcgaaggca tgttcaaaaa ggaattacag acctctattt
 960
 tttgaagacc gagcagggat tagctgtgtc aggaacttgg agttgcactt aaccttgtaa

10

20

30

40

1223FPC.ST25.txt

1020

ctttgtttgg agctggcacc tcttgaata aaaaggagga tgcacgagct ggcaggcatg
1080

caaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaa
1109

<210> 16

<211> 2818

<212> DNA

<213> Homo sapiens

10

<400> 16

ccctactccg cctctcggga tcctttaaga ggcggggctt ggctgccagc tccgcggccc
60

gggcaaaagg ctgggacttt actccgggtg gcggcgagga cgagtctgtg ctccatcagc
120

tgccgcaccc gccgcctccc gccccaaac cccatccccg cggttgagcc acgatgagcg
180

gcagagtcgg cgatctgagc cccaggcaga aggaggcatt ggccaagttt cgggagaatg
240

tccaggatgt gctgccggcc ctgccgaatc cagatgacta ttttctctg cgttggctcc
300

20

gagccagaag cttcgacctg cagaagtcgg aggccatgct ccggaagcat gtggagtcc
360

gaaagcaaaa ggacattgac aacatcatta gctggcagcc tccagaggtg atccaacagt
420

atctgtcagg gggatgtgtg ggctatgacc tggatggctg cccagtctgg tacgacataa
480

ttggacctct ggatgccaaag ggtctgctgt tctcagcctc caaacaggac ctgctgagga
540

ccaagatgcg ggagtgtgag ctgcttctgc aagagtgtgc ccaccagacc acaaagttgg
600

30

ggaggaaggt ggagaccatc accataattt atgactgcga ggggcttggc ctcaagcatc
660

tctggaagcc tgctgtggag gcctatggag agtttctctg catgtttgag gaaaattatc
720

ccgaaacact gaagcgtctt tttgttgta aagcccccaa actgtttctt gtggcctata
780

acctcatcaa acccttctg agtgaggaca ctcgtaagaa gatcatggtc ctgggagcaa
840

40

1223FPC.ST25.txt

attggaagga ggttttactg aaacatatca gccctgacca ggtgcctgtg gagtatgggg
900

gcacatgac tgaccctgat ggaaacccca agtgcaaatc caagatcaac tacgggggtg
960

acatccccag gaagtattat gtgcgagacc aggtgaaaca gcagtatgaa cacagcgtgc
1020

agatttcccg tggctcctcc caccaagtgg agtatgagat cctcttccct ggctgtgtcc
1080

tcaggtggca gtttatgtca gatggagcgg atgttggttt tgggatttte ctgaagacca
1140

agatgggaga gaggcagcgg gcaggggaga tgacagaggt gctgccaac cagaggtaca
1200

actcccacct ggtccctgaa gatgggaccc tcacctgcag tgatcctggc atctatgtcc
1260

tgcggtttga caacacctac agcttcattc atgccaagaa ggtcaatttc actgtggagg
1320

tcctgcttcc agacaaagcc tcagaagaga agatgaaaca gctgggggca ggcaccccga
1380

aataacacct tctcctatag caggcctggc cccctcagtg tctccctgtc aatttctacc
1440

ccttgtagca gtcattttcg cacaacctg aagcccaaag aaactgggct ggaggacaga
1500

cctcaggagc tttcatttca gttaggcaga ggaagagcga ctgcagtggg tctccgtgtc
1560

tatcaaatac ctaaggagtc cccaggagct ggctggccat cgtgatagga tctgtctgtc
1620

ctgtaaactg tgccaacttc acctgtccag ggacagcga gctgggggtg gcggggggca
1680

tgtaccacag ggtggcagca gggaaaaaaaa ttagaaaagg gtgaaagatt gggacttaac
1740

acttcaggga agtcagctgc cggggagaaa cttgctccta aatgaacaca taagtttaga
1800

tcgcaatgag gagtagcagg gtagctggtt gctagagtta cgggtgggat cagaaactct
1860

tccaacatt ttagcactga ggctggggta gcttttggct tttcccaggt ctcaggaggt
1920

ggcctgagtc agcacacatc ttcccactcg gtagacaggc tggcctctcc ctcaacttga
40

10

20

30

40

1223FPC.ST25.txt

1980

gactttggca actcctgggc cacacggcct gcctctttga ttactaatga ttgtcagtga
2040

ctcagagctt cctgggactt cgggtaccca cccgctgttc tccatgcaaa caaagcgcca
2100

gggaaatgac ccacagggat cgcagctgca gggagggcca gggaggttg ggggtggagt
2160

gaatgctaaa agcagatcgt ccagtgccct tttcagtgt accggcctct caccaagcag
2220

10

tcctccatgt gagcaacccc gagacaaaaa tgctaagtgg gatcaagaga gcagcactcg
2280

gagaggggtg ttgccagtct gagtgtcccg cgggtcccgc caaccgcctt cctgactgac
2340

ctgagcaagg tcttactaag cagtccatc tctgtgggag gcatgcaacg cgtgcagggg
2400

gttcagggtg cggtcggcgt agccaggcct ggaggcccc caggcaggag gccgccccaa
2460

ggcggggccg gcgtctcgca gactaggggc tgggggcggc cacagacggc ctcgaaacca
2520

20

cagcccttac cccaatccca cgagccccgc caacgaacca caggtgctgg gctttagaga
2580

acatgggaag gcggccccag acctggcggg aacgcctttc cctcagagcc aggccccggc
2640

cccgtctggg aagctcatct tgcgaagctg agggagctca gggcaaaggc caggctagcg
2700

cggaccggaa ggggccgagg ctgcacgggc ctctgccaga acgctcagga catccccggc
2760

tgggtttaca acgctgttag gaaaattaac caatgaataa agcaacgttc agtgcgca
2818

30

<210> 17

<211> 1475

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 17

gtcgacgagg ccgcgctccg ctcccgtgag taacttggct ccgggggctc cgctcgctg
60

cccgcacgcc gcccgcacc caggaccgag ccgcccgcct ccgccgctag caaaccttc
120

40

1223FPC.ST25.txt

cgacggccct cgctgcgcaa gccgggacgc ctctcccccc tccgcccccg ccgcggaag
180

ttaagtttga agagggggga agaggggaac atggacatga agaggaggat ccacctggag
240

ctgaggaacc ggacccccggc agctgttcga gaacttgtct tggacaattg caaatcaaat
300

gatggaaaaa ttgagggctt aacagctgaa tttgtgaact tagagtccct cagtttaata
360

aatgtaggct tgatctcagt ttcaaatctc cccaagctgc ctaaattgaa aaagcttgaa
420

ctcagtghaa atagaatctt tggaggtctg gacatgttag ctgaaaaact tccaaatctc
480

acacatctaa acttaagtgg aaataaactg aaagatatca gcaccttggg acctttghaa
540

aagttagaat gtctghaaaag cctggacctc ttttaactgtg aggttaccaa cctgaatgac
600

taccgagaga gtgtcttcaa gctcctgccc cagcttacct acttggatgg ctatgaccga
660

gaggaccagg aagcacctga ctcagatgcc gaggtggatg gtgtggatga agaggaggag
720

gacgaagaag gagaagatga ggaagacgag gacgatgagg atggtgaaga agaggagttt
780

gatgaagaag atgatgaaga tgaagatgta gaaggggatg aggacgacga tgaagtcagt
840

gaggaggaag aagaatttgg acttgatgaa gaagatgaag atgaggatga ggatgaagag
900

gaggaagaag gtgggaaagg tgaaaagagg aagagagaaa cagatgatga aggagaagat
960

gattaagacc ccagatgacc tgcagaaaca gaactgttca gtattggttg gactgctcat
1020

ggattttgta gctgtttaaa aaaaaaaaaa aggtagctgt gatacaaacc ccaggacacc
1080

cacccaccca aagagccaaa gaatagtcc tgtgacattc cgccttcctt ccatgtagtc
1140

cctcttggtg atctaccacc aagcttgggg acttcacccc aacaaaattg taagcgttgt
1200

taggtttttg tgtaagattc ttgctgtagc gtggatagct gtgattggtg agtcaaccgt
1260

10

20

30

40

1223FPC.ST25.txt

1260

ctgtggctac cagttacact gagattgtaa cagcattttt actttctgta caacaaaaaa
1320

gctttgtaaa taaaatctta acattttggg tctgtttttt catgctttgc tttttaatta
1380

ttattattat tttttttaca ttaggacatt ttatgtgaca actgccaaaa aagtattttt
1440

aagaatttaa gcgaaataaa cagttactct ttggc
1475

10

<210> 18

<211> 841

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 18

gcaaccactg cagctgggcc aagtcgctta gctcttcggt ggttgtcaca cgccggagg
60

cctagccgtc gcgtacctag gatgccgctt ggaagccgaa gccgcacctc ccgatggcc
120

cctccggcca gccgggcccc tcagatgaga gctgcacca ggccagcacc agtcgctcag
180

20

ccaccagcag cggcaccccc atctgcagtt ggctcttctg ctgctgcgcc ccggcagcca
240

ggtctgatgg cccagatggc aaccactgca gctggcgtgg ctgtgggctc tgctgtgggg
300

cacacattgg gtcacgcat tactgggggc ttcagtggag gaagtaatgc tgagcctgcg
360

aggcctgaca tcacttacca ggagcctcag ggaaccagc cggcacagca gcagcagcct
420

tgcctctatg agatcaaaca gtttctggag tgtgccaga accagggatga catcaagctc
480

30

tgtgagggtt tcaatgaggt gctgaaacag tgccgacttg caaacggatt ggcctaatga
540

agaagttaa cctggagaga tggaaaatca gctctcataa ctaagttaat ttagtataaa
600

aatagaattg atagtggagg tataaagtgt aaccatcagt taaacctctc ctgtcattcc
660

tagcttcctt gcttcagaat tgaaatggaa gtgggggtgt ccctactctg tagaatctgg
720

40

1223FPC.ST25.txt

gactgggcaa atgtttgtgt ggcctcctta aactagctgt tatgttatga ttttattcct
780

tgtgagttaa ttagaataaa gtcattttct tacaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
840

a
841

<210> 19
<211> 1486
<212> DNA
<213> Homo sapiens

10

<400> 19
gggctcgtca gatataataa ttttacctt cagttttgat tggtgagaaa gtaccattc
60

tcttcaaata atcaaagata attattattt tgttttgttt ttggaatcaa cagggaggcg
120

caaagtataa agttgctgct aacatatata catatacatc catattttat aaggggtgct
180

atgtatatat agacagtgtg tccacacaaa aaatagatac agttatcagt cagtcagttc
240

20

ttccatgatt tagttttttt aaacgtagaa aagctattgt aaacgtctct ttccatttat
300

tcttaatttt ttgacatatt ggtatttctt taaagggaaa tgaggaatgc acatcagtga
360

ttgattgtca aacctcacc cctgatttcc tacctaactt acccccacct aaccaatcaa
420

tcacatccac aaattgtttt gtttgtttgt tagtcaggct tccaacagag ttcaatattt
480

ctaacactct agtgcaataa aaattattat taaatagcta agaggtgtgc atgtgggaaa
540

30

ggtcagtgca tatcccttta ggaggggaga atgttgtaat atatcagcta tcgagttggt
600

taaaaaaagt gtattcaatc gtatattgtc tatagtatgt gctatgaaat ttgcatttat
660

gatatgtaac aggggcaaag ccaaattcat gttactctgt tcagtcagaa acattttgtg
720

gcatacagca ttcttgggaa gtgctgtact ttgtttcggt ttggttttag ttttgcattt
780

1223FPC.ST25.txt

agagtgcctt ataattgatg cctattttaa tagcatttct ttttagcttt tggttcgtat
840

ttccattcac tgttcgtatc tgttactttc tattaaagca ttatctgttt accacatgta
900

caaaaactct ttgaataata tgcattccta gttttcagcc aagacgggga tgttagtgat
960

tgtaccagcc caaagcactt ggataatcag ggcccttctt ccttttataa tcaatcatca
1020

acatcagaaa aagctacttg ttttatttat attcccttcc aaatccgctc tggaacatgc
1080

agtaactgca ccaaacttat tttagtaaca aatatcattg gcaactttgg aatatatttg
1140

atattccatt aggatttttc taaaagggga aataaactat atatatatat gtatcttacc
1200

cccaattctt ccaacagaat ttctatagga agccatggat gatggcataa gtttgccaca
1260

tattacatga ttttaataa tcctcaaaat acccaaggaa ctcttaaaga gttttggtat
1320

gagtatacta ctttggttta attttagctt catggatggt ctgcatggaa ggatttttgt
1380

tttccacatt ttccattgc tagcagagtg aaatccaaga gaccaaacat ttgcaagcat
1440

tgtatttgag cacttttcta aaaaacaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa
1486

- <210> 20
- <211> 16
- <212> DNA
- <213> Bacteriophage M13mp18

<400> 20
gtaaaacgac ggccag
16

- <210> 21
- <211> 17
- <212> DNA
- <213> Bacteriophage M13mp18

<400> 21
caggaaacag ctatgac
17

10

20

30

40

1223FPC.ST25.txt

<210> 22
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 22
 caggtgaatt tcaaaggagg atttactcac
 30

<210> 23
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

10

<400> 23
 gtgagtaaat cctccttga aattcacctg
 30

<210> 24
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 24
 gcaagccagg aagagtcgac acg
 23

20

<210> 25
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 25
 tgccaggaaa cttcttgctt gatgc
 25

<210> 26
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

30

<400> 26
 agtaaccagt tgagatgaag cacgtc
 26

<210> 27
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

1223FPC.ST25.txt

<400> 27
 cagaagagca acaagaatgg taccctgc
 28

<210> 28
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 28
 aacttgagtt ctatttacct tgcac
 25

10

<210> 29
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 29
 ttgcttgggt catctaaaga c
 21

<210> 30
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

20

<400> 30
 actcacgtgc aaggatgatg
 20

<210> 31
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 31
 agctctcgga ctctcaactg
 20

30

<210> 32
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 32
 cttctcctat gactgatcct actatg
 26

<210> 33

40

1223FPC.ST25.txt

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 33
 caggatgcag aactcacct g
 21

<210> 34
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

10

<400> 34
 gcagatttcc cgtggctcct c
 21

<210> 35
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 35
 gttgggcagc acctctgtca tc
 22

20

<210> 36
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 36
 ctgtgacatt cgccttcct tc
 22

<210> 37
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

30

<400> 37
 ccacgctact gcaagaatct tac
 23

<210> 38
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 38
 agaagttcaa cctggagaga tgg

40

1223FPC.ST25.txt

23

<210> 39
<211> 24
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 39
caaggaagct aggaatgaca ggag
24

10

<210> 40
<211> 24
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 40
gcaaagccaa attcatgtta ctct
24

<210> 41
<211> 27
<212> DNA
<213> Homo sapiens

20

<400> 41
cagatacгаа cagtgaatgg aaatag
27

<210> 42
<211> 24
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 42
gccacagggtt gaacacttaa ttg
24

30

<210> 43
<211> 22
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 43
aggaagagtc gtcacgagaa cc
22

<210> 44
<211> 25
<212> DNA

40

1223FPC.ST25.txt

<213> Homo sapiens

<400> 44
ataatgctgt gcttagttta ttgcc
25

<210> 45
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 45
gatcgtggac atttcaacct c
21

10

<210> 46
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 46
tcttgcttga tgctttggtc
20

<210> 47
<211> 1254
<212> PRT
<213> Mus musculus

20

<400> 47

Met Pro Gly Gly Ser Val Asn Ile Thr Cys Val Ala Val Gly Ser Pro
1 5 10 15

Met Pro Tyr Val Lys Trp Met Leu Gly Ala Glu Asp Leu Thr Pro Glu
20 25 30

Asp Asp Met Pro Ile Gly Arg Asn Val Leu Glu Leu Asn Asp Val Arg
35 40 45

30

Gln Ser Ala Asn Tyr Thr Cys Val Ala Met Ser Thr Leu Gly Val Ile
50 55 60

Glu Ala Ile Ala Gln Ile Thr Val Lys Ala Leu Pro Lys Pro Pro Gly
65 70 75 80

Thr Pro Val Val Thr Glu Ser Thr Ala Thr Ser Ile Thr Leu Thr Trp
85 90 95

40

1223FPC.ST25.txt

Asp Ser Gly Asn Pro Glu Pro Val Ser Tyr Tyr Ile Ile Gln His Lys
 100 105 110
 Pro Lys Asn Ser Glu Glu Pro Tyr Lys Glu Ile Asp Gly Ile Ala Thr
 115 120 125
 Thr Arg Tyr Ser Val Ala Gly Leu Ser Pro Tyr Ser Asp Tyr Glu Phe
 130 135 140
 Arg Val Val Ala Val Asn Asn Ile Gly Arg Gly Pro Ala Ser Glu Pro
 145 150 155 160
 Val Leu Thr Gln Thr Ser Glu Gln Ala Pro Ser Ser Ala Pro Arg Asp
 165 170 175
 Val Gln Ala Arg Met Leu Ser Ser Thr Thr Ile Leu Val Gln Trp Lys
 180 185 190
 Glu Pro Glu Glu Pro Asn Gly Gln Ile Gln Gly Tyr Arg Val Tyr Tyr
 195 200 205
 Thr Met Asp Pro Thr Gln His Val Asn Asn Trp Met Lys His Asn Val
 210 215 220
 Ala Asp Ser Gln Ile Thr Thr Ile Gly Asn Leu Val Pro Gln Lys Thr
 225 230 235 240
 Tyr Ser Val Lys Val Leu Ala Phe Thr Ser Ile Gly Asp Gly Pro Leu
 245 250 255
 Ser Ser Asp Ile Gln Val Ile Thr Gln Thr Gly Val Pro Gly Gln Pro
 260 265 270
 Leu Asn Phe Lys Ala Glu Pro Glu Ser Glu Thr Ser Ile Leu Leu Ser
 275 280 285
 Trp Thr Pro Pro Arg Ser Asp Thr Ile Ala Ser Tyr Glu Leu Val Tyr
 290 295 300
 Arg Asp Gly Asp Gln Gly Glu Glu Gln Arg Ile Thr Ile Glu Pro Gly
 305 310 315 320

10

20

30

40

1223FPC.ST25.txt

Thr Ser Tyr Arg Leu₃₂₅ Gln Gly Leu Lys Pro₃₃₀ Asn Ser Leu Tyr Tyr Phe
 Arg Leu Ser Ala₃₄₀ Arg Ser Pro Gln Gly₃₄₅ Leu Gly Ala Ser Thr Ala Glu
 Ile Ser Ala₃₅₅ Arg Thr Met Gln Ser₃₆₀ Met Phe Ala Lys Asn₃₆₅ Phe His Val
 Lys Ala Val₃₇₀ Met Lys Thr Ser₃₇₅ Val Leu Leu Ser Trp₃₈₀ Glu Ile Pro Glu
 Asn Tyr Asn Ser Ala Met₃₉₀ Pro Phe Lys Ile Leu Tyr Asp Asp Gly Lys₄₀₀
 Met Val Glu Glu Val₄₀₅ Asp Gly Arg Ala Thr₄₁₀ Gln Lys Leu Ile Val Asn
 Leu Lys Pro Glu₄₂₀ Lys Ser Tyr Ser Phe Val₄₂₅ Leu Thr Asn Arg Gly Asn
 Ser Ala Gly₄₃₅ Gly Leu Gln His Arg Val₄₄₀ Thr Ala Lys Thr₄₄₅ Ala Pro Asp
 Val Leu Arg Thr Lys Pro Ala₄₅₅ Phe Ile Gly Lys Thr₄₆₀ Asn Leu Asp Gly
 Met Ile Thr Val Gln Leu₄₇₀ Pro Asp Val Pro Ala₄₇₅ Asn Glu Asn Ile Lys₄₈₀
 Gly Tyr Tyr Ile Ile₄₈₅ Ile Val Pro Leu Lys₄₉₀ Lys Ser Arg Gly Lys Phe
 Ile Lys Pro Trp₅₀₀ Glu Ser Pro Asp Glu₅₀₅ Met Glu Leu Asp Glu Leu Leu
 Lys Glu Ile Ser Arg Lys Arg Arg₅₂₀ Ser Ile Arg Tyr Gly₅₂₅ Arg Glu Val
 Glu Leu Lys Pro Tyr Ile Ala₅₃₅ Ala His Phe Asp Val₅₄₀ Leu Pro Thr Glu

10

20

30

40

1223FPC.ST25.txt

Phe Thr Leu Gly Asp Asp Lys His Tyr Gly Gly Phe Thr Asn Lys Gln
 545 550 555 560
 Leu Gln Ser Gly Gln Glu Tyr Val Phe Phe Val Leu Ala Val Met Asp
 565 570 575
 His Ala Glu Ser Lys Met Tyr Ala Thr Ser Pro Tyr Ser Asp Pro Val
 580 585 590
 Val Ser Met Asp Leu Asp Pro Gln Pro Ile Thr Asp Glu Glu Glu Gly
 595 600 605
 Leu Ile Trp Val Val Gly Pro Val Leu Ala Val Val Phe Ile Ile Cys
 610 615 620
 Ile Val Ile Ala Ile Leu Leu Tyr Lys Arg Lys Arg Ala Glu Ser Glu
 625 630 635 640
 Ser Arg Lys Ser Ser Leu Pro Asn Ser Lys Glu Val Pro Ser His His
 645 650 655
 Pro Thr Asp Pro Val Glu Leu Arg Arg Leu Asn Phe Gln Thr Pro Gly
 660 665 670
 Met Ala Ser His Pro Pro Ile Pro Ile Leu Glu Leu Ala Asp His Ile
 675 680 685
 Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Asn Leu Lys Phe Ser Gln Glu Tyr Glu
 690 695 700
 Ser Ile Asp Pro Gly Gln Gln Phe Thr Trp Glu His Ser Asn Leu Glu
 705 710 715 720
 Val Asn Lys Pro Lys Asn Arg Tyr Ala Asn Val Ile Ala Tyr Asp His
 725 730 735
 Ser Arg Val Leu Leu Ser Ala Ile Glu Gly Ile Pro Gly Ser Asp Tyr
 740 745 750
 Val Asn Ala Asn Tyr Ile Asp Gly Tyr Arg Lys Gln Asn Ala Tyr Ile
 755 760 765

10

20

30

40

1223FPC.ST25.txt

Ala Thr Gln Gly Ser Leu Pro Glu Thr Phe Gly Asp Phe Trp Arg Met
770 775 780

Ile Trp Glu Gln Arg Ser Ala Thr Val Val Met Met Thr Lys Leu Glu
785 790 795 800

Glu Arg Ser Arg Val Lys Cys Asp Gln Tyr Trp Pro Ser Arg Gly Thr
805 810 815

10

Glu Thr His Gly Leu Val Gln Val Thr Leu Leu Asp Thr Val Glu Leu
820 825 830

Ala Thr Tyr Cys Val Arg Thr Phe Ala Leu Tyr Lys Asn Gly Ser Ser
835 840 845

Glu Lys Arg Glu Val Arg Gln Phe Gln Phe Thr Ala Trp Pro Asp His
850 855 860

Gly Val Pro Glu His Pro Thr Pro Phe Leu Ala Phe Leu Arg Arg Val
865 870 875 880

20

Lys Thr Cys Asn Pro Pro Asp Ala Gly Pro Met Val Val His Cys Ser
885 890 895

Ala Gly Val Gly Arg Thr Gly Cys Phe Ile Val Ile Asp Ala Met Leu
900 905 910

Glu Arg Ile Lys His Glu Lys Thr Val Asp Ile Tyr Gly His Val Thr
915 920 925

Leu Met Arg Ala Gln Arg Asn Tyr Met Val Gln Thr Glu Asp Gln Tyr
930 935 940

30

Ile Phe Ile His Asp Ala Leu Leu Glu Ala Val Thr Cys Gly Asn Thr
945 950 955 960

Glu Val Pro Ala Arg Asn Leu Tyr Ala Tyr Ile Gln Lys Leu Thr Gln
965 970 975

Ile Glu Thr Gly Glu Asn Val Thr Gly Met Glu Leu Glu Phe Lys Arg
980 985 990

40

1223FPC.ST25.txt

Leu Ala Ser Ser Lys Ala His Thr Ser Arg Phe Ile Ser Ala Asn Leu
 995 1000 1005

Pro Cys Asn Lys Phe Lys Asn Arg Leu Val Asn Ile Met Pro Tyr
 1010 1015 1020

Glu Ser Thr Arg Val Cys Leu Gln Pro Ile Arg Gly Val Glu Gly
 1025 1030 1035

10

Ser Asp Tyr Ile Asn Ala Ser Phe Leu Asp Gly Tyr Arg Gln Gln
 1040 1045 1050

Lys Ala Tyr Ile Ala Thr Gln Gly Pro Leu Ala Glu Thr Thr Glu
 1055 1060 1065

Asp Phe Trp Arg Met Leu Trp Glu His Asn Ser Thr Ile Val Val
 1070 1075 1080

Met Leu Thr Lys Leu Arg Glu Met Gly Arg Glu Lys Cys His Gln
 1085 1090 1095

20

Tyr Trp Pro Ala Glu Arg Ser Ala Arg Tyr Gln Tyr Phe Val Val
 1100 1105 1110

Asp Pro Met Ala Glu Tyr Asn Met Pro Gln Tyr Ile Leu Arg Glu
 1115 1120 1125

Phe Lys Val Thr Asp Ala Arg Asp Gly Gln Ser Arg Thr Val Arg
 1130 1135 1140

Gln Phe Gln Phe Thr Asp Trp Pro Glu Gln Gly Val Pro Lys Ser
 1145 1150 1155

30

Gly Glu Gly Phe Ile Asp Phe Ile Gly Gln Val His Lys Thr Lys
 1160 1165 1170

Glu Gln Phe Gly Gln Asp Gly Pro Ile Ser Val His Cys Ser Ala
 1175 1180 1185

Gly Val Gly Arg Thr Gly Val Phe Ile Thr Leu Ser Ile Val Leu
 1190 1195 1200

40

1223FPC.ST25.txt

Glu Arg Met Arg Tyr Glu Gly Val Val Asp Ile Phe Gln Thr Val
1205 1210 1215

Lys Met Leu Arg Thr Gln Arg Pro Ala Met Val Gln Thr Glu Asp
1220 1225 1230

Gln Tyr Gln Phe Cys Tyr Arg Ala Ala Leu Glu Tyr Leu Gly Ser
1235 1240 1245

10

Phe Asp His Tyr Ala Thr
1250

<210> 48
<211> 21
<212> DNA
<213> homo sapiens

<400> 48
aatctgcaag ccaggaagag t
21

20

<210> 49
<211> 27
<212> DNA
<213> homo sapiens

<400> 49
tctagtttca gttttgatga tattttg
27

<210> 50
<211> 19
<212> RNA
<213> homo sapiens

<400> 50
ucugcaagcc aggaagagu
19

30

<210> 51
<211> 19
<212> RNA
<213> homo sapiens

<400> 51
acucuuccug gcuugcaga
19

40

1223FPC.ST25.txt

<210> 52
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> homo sapiens

<400> 52
 ccuccagaac ugugaacca
 19

<210> 53
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> homo sapiens

<400> 53
 uggaucacag uucuggagg
 19

<210> 54
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<400> 54
 cuacaaauga gcgcuuccu
 19

<210> 55
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<400> 55
 aggaagcgcu cauuuguag
 19

<210> 56
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 56
 ccacatcgct cagacacat
 20

<210> 57
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

10

20

30

40

1223FPC.ST25.txt

<400> 57
accaggcgcc caatagc
17

<210> 58
<211> 28
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 58
caaatccggtt gactccgacc ttcacctt
28

10

<210> 59
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 59
aaggccaacc gcgagaagat
20

<210> 60
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

20

<400> 60
gtcaccggag tccatcacga
20

<210> 61
<211> 32
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 61
ccatgtacgt tgctatccag gctgtgctat cc
32

30

<210> 62
<211> 25
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 62
caactgggac gacatggaga aaatc
25

1223FPC.ST25.txt

<210> 63
<211> 22
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 63
catggctggg gtgttgaagg tc
22

<210> 64
<211> 23
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 64
actctcacct cccatgttgc tca
23

<210> 65
<211> 23
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 65
gctatccgtg cactcctgtt ctg
23

<210> 66
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 66
atctgcaagc caggaagagt c
21

<210> 67
<211> 22
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 67
cttgcttgat gctttgttct gt
22

<210> 68
<211> 30
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 68

10

20

30

40

1223FPC.ST25.txt
 ccagaccatg caggaactct gatcgtggac
 30

<210> 69
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 69
 atgccctgga tccctttatt c
 21

10

<210> 70
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 70
 tcatcccgac ttctcatct tac
 23

<210> 71
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

20

<400> 71
 aactccctta ttacactatc catt
 24

<210> 72
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 72
 gtggttatgag gaaaagatta ggga
 24

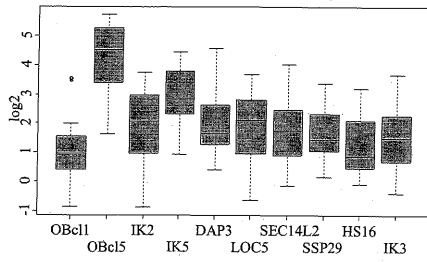
30

<210> 73
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 73
 tgcagccagg agaagcaaga gaacagaaat
 30

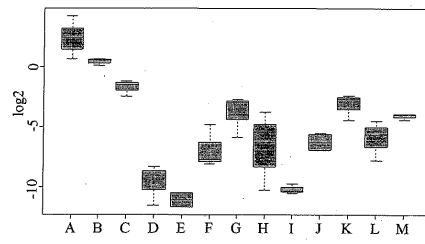
【 図 1 】

Figure 1.



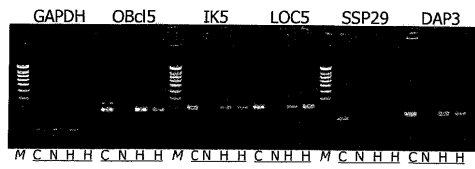
【 図 2 】

Figure 2.



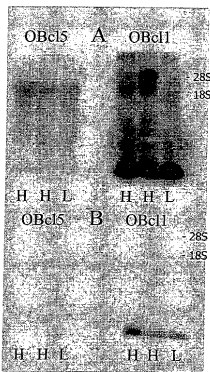
【 図 3 】

Figure 3.



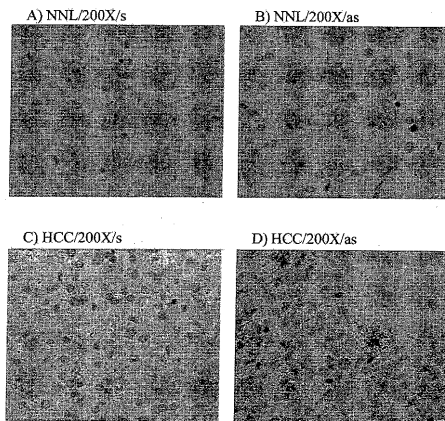
【 図 4 】

Figure 4.



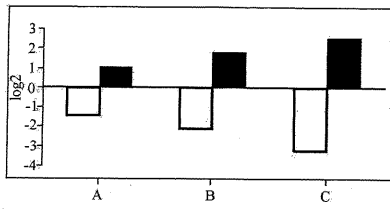
【 図 5 】

Figure 5.



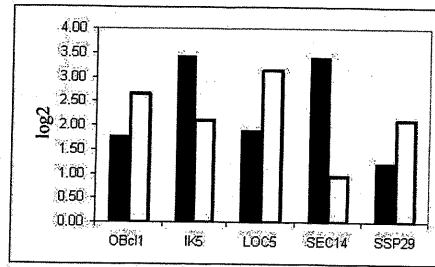
【 図 6 】

Figure 6.



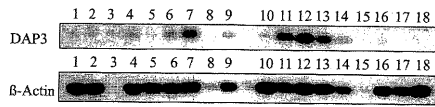
【 図 8 】

Figure 8.



【 図 7 】

Figure 7.



【 手続補正書 】

【 提出日 】 平成17年5月13日 (2005.5.13)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 配列表

【 補正方法 】 追加

【 補正の内容 】

【 配列表 】

2006500074000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 03/10564

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER					
IPC 7	C07K14/47	C07K19/00	C12N15/12	C12N15/62	C12N15/63
	C12N5/00	A01K67/027	C07K16/18	G01N33/68	G01N33/53
	C12Q1/68	A61K38/17	A61K39/00	A61K48/00	A61P35/00
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC					
B. FIELDS SEARCHED					
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)					
IPC 7	C07K	C12N	A01K	G01N	C12Q A61K
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched					
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)					
EPO-internal, Sequence Search, BIOSIS, WPI Data					
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT					
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages				Relevant to claim No.
X	<p>WD 01/75067 A (HYSEQ INC ;LIU CHENGHUA (US); TANG Y TOM (US); DRMANAC RODOJE T (U) 11 October 2001 (2001-10-11) the entire document, particularly SEQ ID NOS:77 and 30445, pages 1-6,24-37,45,53,55-62,74-84,87-94 and the claims & DATABASE EBI [Online] Human diagnostic protein #77 13 February 2002 (2002-02-13), DRMANAC RT ET AL.: "New isolated polynucleotide and encoded polypeptides, useful in diagnostics,forensics, gene mapping, identifications of mutations responsible for genetic disorders or other traits and to assess biodiversity" Database accession no. ABG00086 abstract</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>				1-65
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.					
* Special categories of cited documents:					
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed			"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search			Date of mailing of the international search report		
2 February 2004			09 JUL 2004		
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5318 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016			Authorized officer Schmidt, Harald		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/EP 03/10564

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	& DATABASE EBI [Online] DNA encoding novel human diagnostic protein #77 13 February 2002 (2002-02-13), DRMANAC RT ET AL.: "New isolated polynucleotide and encoded polypeptides, useful in diagnostics, forensics, gene mapping, identifications of mutations responsible for genetic disorders or other traits and to assess biodiversity" Database accession no. AAS64273 abstract	
A	----- US 6 410 724 B1 (DEJEAN ANNE ET AL) 25 June 2002 (2002-06-25) the whole document	
A	----- XU X-R ET AL: "Insight into hepatocellular carcinogenesis at transcriptome level by comparing gene expression profiles of hepatocellular carcinoma with those of corresponding noncancerous liver" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, vol. 98, no. 26, 18 December 2001 (2001-12-18), pages 15089-15094, XP002231180 ISSN: 0027-8424 the whole document	
A	----- WO 02/059611 A (TULARIK INC) 1 August 2002 (2002-08-01) the whole document -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP 03/10564**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2. Claims Nos.: 1-65 (all partially)
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-5, 8, 11-18 completely and 6, 7, 9, 10, 19-65 partially

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ EP 03/10564

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claims 24 to 26 are directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Although claims 27 to 33 and 60 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 1-65 (all partially)

The scope of claims 1 to 65, in as far as the expressions "functional variant", "variant", "non-functional mutant variant" or "fragment" are concerned, is so unclear within the meaning of Article 6 PCT that a meaningful International Search is impossible with regard to these expressions.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

International Application No. PCT/ EP 03/10564

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-5,8,11-18 (completely) and 6,7,9,10,19-65 (partially)

polypeptide and fusion proteins comprising a sequence according to SEQ ID NO:2, nucleic acids encoding said polypeptide, their vectors, cells, transgenic non-human mammals, antibodies, diagnostics, compositions and their methods

1.1. claims: 1,2 (completely) and 19,22-27,31-33,47-60 (all partially)

polypeptide and fusion proteins comprising a sequence according to SEQ ID NO:2 and its methods for diagnosis, prevention and treatment

1.2. claims: 61-65 (partially)

method of identifying a pharmacologically active compound wherein a polypeptide according to SEQ ID NO:2 is provided

1.3. claims: 3-5 (completely) and 6-11,13-46,60 (partially)

nucleic acid encoding a polypeptide comprising SEQ ID NO:2, vectors, cells and transgenic non-human mammal, and its use in the diagnosis, prevention and treatment of a liver disorder or an epithelial cancer

1.4. claims: 12 (completely) and 19,22-27,31,32 (partially)

antibodies against a polypeptide comprising SEQ ID NO:2 and their use in a method for prevention, treatment and diagnosis

2. claims: 6,7,9,10,19-65 (all partially)

vectors comprising a nucleic acid encoding a polypeptide according to SEQ ID NO:1, their cells, transgenic non-human mammals, diagnostics, compositions and methods comprising polypeptides according to SEQ ID NO:1, their antibodies, nucleic acids, vectors and cells

3. claims: 6,7,9,10,19-65 (all partially)

vectors comprising a nucleic acid encoding a polypeptide according to SEQ ID NO:3, their cells, transgenic non-human mammals, diagnostics, compositions and methods comprising polypeptides according to SEQ ID NO:3, their antibodies, nucleic acids, vectors and cells

International Application No. PCT/ EP 03/10564

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

4. claims: 6,7,9,10,19-65 (all partially)

vectors comprising a nucleic acid encoding a polypeptide according to SEQ ID NO:4, their cells, transgenic non-human mammals, diagnostics, compositions and methods comprising polypeptides according to SEQ ID NO:4, their antibodies, nucleic acids, vectors and cells

5. claims: 6,7,9,10,19-65 (all partially)

vectors comprising a nucleic acid encoding a polypeptide according to SEQ ID NO:5, their cells, transgenic non-human mammals, diagnostics, compositions and methods comprising polypeptides according to SEQ ID NO:5, their antibodies, nucleic acids, vectors and cells

6. claims: 6,7,9,10,19-65 (all partially)

vectors comprising a nucleic acid encoding a polypeptide according to SEQ ID NO:6, their cells, transgenic non-human mammals, diagnostics, compositions and methods comprising polypeptides according to SEQ ID NO:6, their antibodies, nucleic acids, vectors and cells

7. claims: 6,7,9,10,19-65 (all partially)

vectors comprising a nucleic acid encoding a polypeptide according to SEQ ID NO:7, their cells, transgenic non-human mammals, diagnostics, compositions and methods comprising polypeptides according to SEQ ID NO:7, their antibodies, nucleic acids, vectors and cells

8. claims: 6,7,9,10,19-65 (all partially)

vectors comprising a nucleic acid encoding a polypeptide according to SEQ ID NO:8, their cells, transgenic non-human mammals, diagnostics, compositions and methods comprising polypeptides according to SEQ ID NO:8, their antibodies, nucleic acids, vectors and cells

9. claims: 6,7,9,10,19-65 (all partially)

vectors comprising a nucleic acid encoding a polypeptide according to SEQ ID NO:9, their cells, transgenic non-human mammals, diagnostics, compositions and methods comprising polypeptides according to SEQ ID NO:9, their antibodies, nucleic acids, vectors and cells

International Application No. PCT/ EP 03/10564

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

10. claims: 6,7,9,10,19-65 (all partially)

vectors comprising a nucleic acid encoding a polypeptide according to SEQ ID NO:47, their cells, transgenic non-human mammals, diagnostics, compositions and methods comprising polypeptides according to SEQ ID NO:47, their antibodies, nucleic acids, vectors and cells

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/EP 03/10564

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date				
WO 0175067	A	11-10-2001	AU 3486501 A	14-08-2001			
			AU 3995501 A	12-09-2001			
			AU 4925101 A	15-10-2001			
			AU 4972801 A	15-10-2001			
			AU 5119401 A	15-10-2001			
			AU 5521401 A	15-10-2001			
			CA 2399681 A1	09-08-2001			
			CA 2404501 A1	11-10-2001			
			CA 2404555 A1	11-10-2001			
			EP 1254266 A1	06-11-2002			
			EP 1268762 A1	02-01-2003			
			EP 1268510 A2	02-01-2003			
			JP 2004502403 T	29-01-2004			
			JP 2004500120 T	08-01-2004			
			WO 0157266 A1	09-08-2001			
			WO 0164839 A2	07-09-2001			
			WO 0175067 A2	11-10-2001			
			WO 0175064 A2	11-10-2001			
			WO 0174836 A1	11-10-2001			
			WO 0175093 A1	11-10-2001			
			US 2004048249 A1	11-03-2004			
			US 2003092112 A1	15-05-2003			
			US 2003087370 A1	08-05-2003			
			US 2003096279 A1	22-05-2003			
			US 6436703 B1	20-08-2002			
			US 2002061567 A1	23-05-2002			
			US 2003180722 A1	25-09-2003			
			US 2002146757 A1	10-10-2002			
			US 6410724	B1	25-06-2002	US 2002042073 A1	11-04-2002
						AU 6416198 A	30-10-1998
						CA 2286282 A1	15-10-1998
						EP 0973941 A1	26-01-2000
						JP 2001518788 T	16-10-2001
WO 9845478 A2	15-10-1998						
US 6265161 B1	24-07-2001						
US 2004076950 A1	22-04-2004						
WO 02059611	A	01-08-2002	WO 02059611 A2	01-08-2002			
			US 2002150934 A1	17-10-2002			

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N 4 C 0 8 5
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 6
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	4 C 0 8 7
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 H 0 4 5
C 0 7 K 14/82 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	
C 0 7 K 16/32 (2006.01)	C 0 7 K 14/82	
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 16/32	
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 Q 1/25 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/25	
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	M
	C 1 2 N 5/00	A
	A 6 1 K 37/02	

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 ゲリー, クリスティアン
オーストリア国、アー - 8 0 6 3 エグゲスドルフ・ベー・グラーツ、ブルグスタール 2 8 1

(72) 発明者 バック, チャールズ
アメリカ合衆国、インディアナ 4 7 9 0 6、ウェスト・ラファイエット、ノッティングハム・ブレイス 2 5 1 2

(72) 発明者 ツアトロウカル, クルト
オーストリア国、アー - 8 0 4 7 グラーツ、シュテルンヴィルトヴェーク 2 2 ツェー

F ターム(参考) 2G045 AA40 DA36 FB01 FB03
4B024 AA01 AA12 CA04 CA09 DA01 DA02 DA05 DA11 EA02 EA03
EA04 EA06 GA11 HA12
4B063 QA01 QA19 QQ08 QQ79 QR32 QR40 QR48 QR55 QR62 QR77
QS25 QS34 QS38
4B065 AA01X AA57X AA87X AA93Y AB01 BA02 CA24 CA44 CA46
4C084 AA02 AA03 AA07 AA13 BA01 BA08 BA20 BA22 BA23 CA53
NA14 ZA752 ZB092 ZB262
4C085 AA13 AA14
4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA75 ZB09 ZB26
4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 NA14 ZA75 ZB09 ZB26
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA41 DA75 EA20 EA50 EA51
FA74

专利名称(译)	编码它们的多肽和核酸及其用于预防，诊断或治疗肝脏疾病和上皮癌用途		
公开(公告)号	JP2006500074A	公开(公告)日	2006-01-05
申请号	JP2005509664	申请日	2003-09-23
[标]申请(专利权)人(译)	ORIDIS生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	Oridisu-Biomedo文件夹中顺集团 - UND进入维克Rungu扫描有限公司		
[标]发明人	ゲリークリスティアン バックチャールズ ツアトロウカルクト		
发明人	ゲリー,クリスティアン バック,チャールズ ツアトロウカル,クト		
IPC分类号	C12N15/09 A01K67/027 A61K31/7088 A61K35/76 A61K39/395 A61K48/00 A61P1/16 A61P35/00 A61P37/04 C07K14/82 C07K16/32 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12Q1/25 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 C12N5/10 A61K38/00 A01K67/00 A61K38/17 A61K39/00 C07H21/04 C07K14/47 C07K16/18 C07K16/30 C12N5/00 C12N15/12 C12N15/62 G01N33/68		
CPC分类号	A01K2217/05 A01K2217/075 A01K2227/105 A01K2267/0331 A61K38/00 A61K39/00 A61K48/00 A61P1/16 C07K14/47 C07K2319/00 C12N2799/021 C12Q1/6886 C12Q2600/112 C12Q2600/136 C12Q2600/178		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A01K67/027 A61K31/7088 A61K35/76 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K48/00 A61P1/16 A61P35/00 A61P37/04 C07K14/82 C07K16/32 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12Q1/25 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M C12N5/00.A A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/DA36 2G045/FB01 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA11 4B024/EA02 4B024/EA03 4B024/EA04 4B024/EA06 4B024/GA11 4B024/HA12 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR40 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR77 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS38 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA87X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA20 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/CA53 4C084/NA14 4C084/ZA752 4C084/ZB092 4C084/ZB262 4C085/AA13 4C085/AA14 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA75 4C086/ZB09 4C086/ZB26 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BC83 4C087/CA12 4C087/NA14 4C087/ZA75 4C087/ZB09 4C087/ZB26 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA41 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/EA51 4H045/FA74		
代理人(译)	津国 肇 筱田文雄		
优先权	2002021696 2002-09-27 EP 60/415913 2002-10-03 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及编码它们的多肽和核酸，以及肝脏和肿瘤疾病，特别是肝脏和其他上皮组织的癌症，良性肝肿瘤如腺瘤和局部结节性增生 (FNH) 和肝硬化。用于诊断，预防和/或治疗其他增殖性肝病，例如：本发明还涉及诊断和治疗这些疾病的方法。

障害

	細胞増殖	組織修復	クローン細胞増殖	新生組織形成	形質転換/悪性度
肝硬変	+	+			
FNH	+	+	+/-		
アデノーマ	+	+	+	+	
HCC	+	+	+	+	+