

(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2014-512515
(P2014-512515A)

(43) 公表日 平成26年5月22日(2014.5.22)

| (51) Int.Cl. | F I | テーマコード (参考) |
|-------------------------|-----------------------|-------------|
| GO 1 N 33/574 (2006.01) | GO 1 N 33/574 Z N A A | 2 G O 4 5 |
| GO 1 N 33/53 (2006.01) | GO 1 N 33/53 M | 4 B O 2 4 |
| GO 1 N 33/50 (2006.01) | GO 1 N 33/50 Z | 4 B O 6 3 |
| GO 1 N 33/15 (2006.01) | GO 1 N 33/15 Z | 4 C O 8 4 |
| C 1 2 Q 1/68 (2006.01) | C 1 2 Q 1/68 A | |

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 57 頁) 最終頁に続く

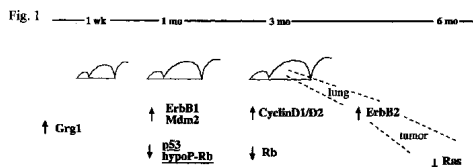
(21) 出願番号 特願2013-554760 (P2013-554760)
 (86) (22) 出願日 平成24年2月23日 (2012. 2. 23)
 (85) 翻訳文提出日 平成25年10月18日 (2013. 10. 18)
 (86) 国際出願番号 PCT/CA2012/000161
 (87) 国際公開番号 W02012/113061
 (87) 国際公開日 平成24年8月30日 (2012. 8. 30)
 (31) 優先権主張番号 61/445, 972
 (32) 優先日 平成23年2月23日 (2011. 2. 23)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 513212671
 コリーヌ・ローブ
 CORRI NNE LOBE
 カナダ、エム4エル・3ティ5、オンタリオ、トロント、ウェイバリー・ロード273番
 (71) 出願人 513212682
 マイアミ・マイルス・リサーチ・コーポレーション
 MIAMI MICE RESEARCH CORPORATION
 カナダ、エム5ジー・1エル7、オンタリオ、トロント、カレッジ・ストリート101番、スウィート120イー、ヘリテージ・ビルディング、マーズ・センター
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌診断および処置

(57) 【要約】

癌、例えば、肺癌に対する診断アッセイが記載されている。アッセイはまた、処置中の患者を追跡するため、および処置後の疾患再発の評価のために使用することができる。アッセイは、トランスジェニックマウスモデルにおいて同定される腫瘍形成に対するバイオマーカーを利用する。アッセイは、患者のバイオマーカー発現に基づく患者に対する治療的指標を同定するために使用される。バイオマーカーおよびそのフラグメントはまた、癌、例えば、肺または大腸癌を処置するために有用である。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

哺乳動物から生物学的サンプルを提供すること；

1 つ以上の高分子を含む一団を提供すること、ここで、それぞれの高分子は、非トランスジェニックマウスよりも、Gr g 1 を発現するトランスジェニックマウスにおいて定量的に異なるレベルで測定可能であるバイオマーカーであるか、またはバイオマーカーに特異的に結合する；

該バイオマーカーの発現のレベルを決定するために、哺乳動物の生物学的サンプルを一団と接触させること；

該哺乳動物サンプルにおいて発現される該バイオマーカーのレベルを、参照サンプルにおける該バイオマーカーのレベルと比較すること；

を含む、哺乳動物において肺癌を診断するための方法であって、該参照サンプルと比較して、該哺乳動物の生物学的サンプルにおける該バイオマーカーの発現の定量的に異なるレベルの存在が、癌を示す、方法。

【請求項 2】

該参照サンプルが、癌と診断されておらず、癌に対する増加した危険因子を有さない健常哺乳動物由来の生物学的サンプル；および、癌と診断されておらず、癌に対する増加した危険因子を有さない健常哺乳動物由来の生物学的サンプルにおいて測定されるレベルに対応する濃度レベルで提供される精製されたバイオマーカーからなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

該 1 つ以上の高分子が、抗体、核酸、タンパク質およびそれらのフラグメントからなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

該バイオマーカーが、タンパク質、mRNA および抗体からなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

該バイオマーカーが、Groucho 関連タンパク質、Mdm2、Ras、ErbB1、ErbB2 および CyclinD1 / D2 からなる群から選択されるタンパク質である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

該バイオマーカーが、Groucho 関連タンパク質、Mdm2、Ras、ErbB1、ErbB2 および CyclinD1 / D2 からなる群から選択されるタンパク質をコードする mRNA である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 7】

該バイオマーカーが、Groucho 関連タンパク質、Mdm2、Ras、ErbB1、ErbB2 および CyclinD1 / D2 からなる群から選択されるタンパク質に特異的に結合する自己抗体である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 8】

該バイオマーカーの少なくとも 1 つが Groucho 関連タンパク質を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

該一団が、1 つ以上の抗体またはそれらのフラグメントを含み、該抗体が、非トランスジェニックマウスよりも、Gr g 1 を発現するトランスジェニックマウスにおいて定量的に異なるレベルで測定可能であるバイオマーカータンパク質に特異的に結合する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

該一団が、1 つ以上の cDNA 分子またはそれらのフラグメントを含み、該 cDNA 分子が、バイオマーカー mRNA またはその相補的配列に特異的に結合し、該バイオマーカー mRNA またはその相補的配列が、非トランスジェニックマウスよりも、Gr g 1 を発

10

20

30

40

50

現するトランスジェニックマウスにおいて定量的に異なるレベルで測定可能である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 1】

該方法が、該哺乳動物の生物学的サンプルおよび該参照サンプルから mRNA を単離すること、および該 mRNA を定量的に増幅すること、および cDNA を生産することをさらに含む、請求項 1 0 に記載の方法。

【請求項 1 2】

該一団が、非トランスジェニックマウスよりも、Gr g 1 を発現するトランスジェニックマウスにおいて定量的に異なるレベルで測定可能であるバイオマーカーである 1 つ以上のタンパク質またはそれらのフラグメントを含む、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 1 3】

該哺乳動物の生物学的サンプルが液体サンプルである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 4】

該液体サンプルが、血液、血漿および血清からなる群から選択される、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】

該哺乳動物の生物学的サンプルおよび該参照サンプルが検出可能に標識されている、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 6】

候補患者から生物学的サンプルを提供すること；
患者の生物学的サンプルにおける T L E バイオマーカーの発現の存在を検出すること；
患者の生物学的サンプルにおける T L E バイオマーカーの発現のレベルを、参照サンプルにおける該 T L E バイオマーカーのレベルと比較すること；および
候補患者の生物学的サンプルにおける T L E バイオマーカー発現が、該参照サンプルにおける T L E バイオマーカーのレベルよりも高いとき、H D A C インヒビター化学療法に対する応答候補として候補患者を同定すること
の工程を含む、インヒビター化学療法に対して応答する候補患者を同定するための方法。

20

【請求項 1 7】

該参照サンプルが、癌と診断されておらず、癌に対する増加した危険因子を有さない健常哺乳動物由来の生物学的サンプル；癌と診断されておらず、癌に対する増加した危険因子を有さない健常哺乳動物由来の生物学的サンプルにおいて測定されるレベルに対応する濃度レベルで提供される精製されたバイオマーカー；既知の非応答患者由来の生物学的サンプル；および、既知の非応答患者由来の生物学的サンプルにおいて測定されるレベルに対応する濃度レベルで提供される精製されたバイオマーカーからなる群から選択される、請求項 1 6 に記載の方法。

30

【請求項 1 8】

癌患者が肺癌を有する、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 9】

該 T L E バイオマーカーの発現が、T L E タンパク質レベルまたは mRNA レベルを測定することにより決定される、請求項 1 6 に記載の方法。

40

【請求項 2 0】

該患者の生物学的サンプルが液体サンプルまたは組織サンプルである、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 2 1】

該液体サンプルが、血液、血漿および血清からなる群から選択される、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

該組織サンプルが肺組織である、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 3】

処置プロトコールを行う前に、患者から生物学的サンプルを提供すること；

50

該処置前の患者サンプルにおける T L E バイオマーカの発現の存在を検出すること、該処置前の患者サンプルにおける T L E バイオマーカの発現のレベルを、該処置中または該処置後の、該患者由来の生物学的サンプルにおける T L E バイオマーカの発現のレベルと、もしくは参照サンプルにおける該 T L E バイオマーカのレベルと比較することの工程を含む、癌患者処置プロトコルの有効性をモニタリングするための方法であって、該処置前の患者サンプルと比較して該処置後の患者サンプルにおける T L E バイオマーカの発現のレベルの変化、または、該参照サンプルにおける該 T L E バイオマーカのレベルと比較して該処置後の患者サンプルの T L E 発現のレベルの違いが、該処置の有効性を示す、方法。

【請求項 2 4】

該処置後の患者サンプルにおける T L E の減少したレベルが有効な処置を示す、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】

該参照サンプルが、癌と診断されておらず、癌に対する増加した危険因子を有さない健常哺乳動物由来の生物学的サンプル；および、癌と診断されておらず、癌に対する増加した危険因子を有さない健常哺乳動物由来の生物学的サンプルにおいて測定されるレベルに対応する濃度レベルで提供される精製されたバイオマーカからなる群から選択される、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 6】

該処置が、治療有効量の H D A C インヒビターを投与することを含む、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 7】

癌患者が肺癌を有する、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 8】

該 T L E バイオマーカの発現が、T L E タンパク質レベルまたは m R N A レベルを測定することにより決定される、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 9】

該生物学的サンプルが液体サンプルまたは組織サンプルである、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 3 0】

該液体サンプルが、血液、血漿および血清からなる群から選択される、請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 1】

該組織サンプルが肺組織である、請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 2】

患者から処置後の生物学的サンプルを提供すること；

該患者サンプルにおける T L E バイオマーカの発現の存在を検出すること；

該処置後の患者サンプルにおける T L E バイオマーカの発現のレベルを、参照サンプルにおける T L E バイオマーカの発現のレベルと比較すること

の工程を含む、癌患者処置プロトコルの有効性をモニタリングするための方法であって、該参照サンプルにおける該 T L E 発現のレベルと比較して該処置後の患者サンプルの T L E 発現のレベルの違いが、該処置の有効性を示す、方法

【請求項 3 3】

該処置後の患者サンプルにおける T L E の減少したレベルが、有効な処置を示す、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 4】

該参照サンプルが、治療に対して応答しない処置後の癌患者から得られる、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 5】

癌患者が肺癌を有する、請求項 3 2 に記載の方法。

10

20

30

40

50

- 【請求項 36】
 該 T L E バイオマーカの発現が、T L E タンパク質レベルまたは m R N A レベルを測定することにより決定される、請求項 32 に記載の方法。
- 【請求項 37】
 該生物学的サンプルが液体サンプルまたは組織サンプルである、請求項 32 に記載の方法。
- 【請求項 38】
 該液体サンプルが、血液、血漿および血清からなる群から選択される、請求項 37 に記載の方法。
- 【請求項 39】 10
 該組織サンプルが肺組織である、請求項 37 に記載の方法。
- 【請求項 40】
 患者から生物学的サンプルを提供すること；
 参照サンプルにおける T L E バイオマーカのレベルと比較して、該患者の生物学的サンプルにおける T L E バイオマーカのより高いレベルの存在を検出すること；および
 治療有効量の G r o u c h o 関連タンパク質のフラグメントの投与で該癌を処置するための候補として、癌患者を同定すること
 の工程を含む、癌患者処置候補を同定するための方法。
- 【請求項 41】 20
 該参照サンプルが、癌と診断されておらず、癌に対する増加した危険因子を有さない健常哺乳動物由来の生物学的サンプル；癌と診断されておらず、癌に対する増加した危険因子を有さない健常哺乳動物由来の生物学的サンプルにおいて測定されるレベルに対応する濃度レベルで提供される精製されたバイオマーカ；既知の非応答患者由来の生物学的サンプル；および、既知の非応答患者由来の生物学的サンプルにおいて測定されるレベルに対応する濃度レベルで提供される精製されたバイオマーカからなる群から選択される、請求項 40 に記載の方法。
- 【請求項 42】
 該癌患者が肺癌を有する、請求項 40 に記載の方法。
- 【請求項 43】 30
 該フラグメントが Q ドメインを含む、請求項 40 に記載の方法。
- 【請求項 44】
 患者から生物学的サンプルを提供すること；
 該患者の生物学的サンプルにおける不活性化 A P C またはベータ - カテニン突然変異の存在を検出すること；および、
 該癌患者への治療有効量の G r o u c h o 関連タンパク質または G r o u c h o 関連タンパク質のフラグメントの投与で該癌を処置するための候補として、該不活性化 A P C またはベータ - カテニン突然変異を有する癌患者を同定すること
 の工程を含む、癌患者処置候補を同定するための方法。
- 【請求項 45】 40
 癌患者が大腸癌を有する、請求項 44 に記載の方法。
- 【請求項 46】
 該フラグメントが少なくとも W D 40 ドメインを含む、請求項 44 に記載の方法。
- 【請求項 47】
 治療有効量の G r o u c h o 関連タンパク質または G r o u c h o 関連タンパク質のフラグメントを該哺乳動物に投与すること
 の工程を含む、哺乳動物における癌を処置するための方法。
- 【請求項 48】
 該癌が肺癌である、請求項 47 に記載の方法。
- 【請求項 49】 50
 該フラグメントが Q ドメインを含む、請求項 47 に記載の方法。

【請求項 5 0】

該癌が大腸癌である、請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 5 1】

該フラグメントが少なくとも W D 4 0 ドメインを含む、請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 5 2】

治療有効量のベータ - カテニンを癌に投与すること
の工程を含む、哺乳動物における癌を処置するための方法。

【請求項 5 3】

該癌が肺癌である、請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 4】

ゲノムが、A p c 遺伝子が少なくともコドン 1 6 3 8 で切断されている A P C タンパク質をコードする遺伝子のヘテロ接合のヌル対立遺伝子、および G r o u c h o 関連遺伝子の半接合の導入遺伝子の対立遺伝子を含み、腫瘍の形成を示す、トランスジェニックマウス。

10

【請求項 5 5】

ゲノムが、A p c 遺伝子が少なくともコドン 1 6 3 8 で切断されている A P C タンパク質をコードする遺伝子のヘテロ接合のヌル対立遺伝子、および G r o u c h o 関連遺伝子の半接合の導入遺伝子の対立遺伝子を含み、腫瘍の形成を示すトランスジェニックマウスを作製すること；

作製されたトランスジェニックマウスを候補化合物で処置すること；

腫瘍細胞の数、腫瘍の体積または腫瘍細胞生存能力を測定することにより、候補化合物で処置されたトランスジェニックマウスにおける腫瘍のレベルを決定すること；および腫瘍細胞の数または腫瘍の体積が、候補化合物での処置前のトランスジェニックマウスにおける腫瘍細胞の数または腫瘍の体積と比較して減少されているとき、または、腫瘍細胞のアポトーシスが、候補化合物での処置後に誘導されているとき、抗腫瘍活性を有する化合物として候補化合物を同定すること

の工程を含む、抗腫瘍活性に対して化合物をスクリーニングする方法。

20

【請求項 5 6】

非トランスジェニックマウスよりも、G r g 1 を発現するトランスジェニックマウスにおいて定量的に異なるレベルである 1 つ以上のバイオマーカーを含む、診断キット。

30

【請求項 5 7】

該 1 つ以上のバイオマーカーが、G r o u c h o 関連タンパク質、M d m 2、R a s、E r b B 1、E r b B 2 および C y c l i n D 1 / D 2 からなる群から選択される、請求項 5 6 に記載のキット。

【請求項 5 8】

少なくとも 1 つのバイオマーカーが G r o u c h o 関連タンパク質を含む、請求項 5 6 に記載のキット。

【請求項 5 9】

該 1 つ以上のバイオマーカーが、固体支持体に結合されているバイオマーカーの一団として提供される、請求項 5 6 に記載のキット。

40

【請求項 6 0】

G r g 1 を発現するトランスジェニックマウス由来の生物学的サンプルおよび G r g 1 を発現しないマウス由来の生物学的サンプルを提供すること；

該 G r g 1 を発現するトランスジェニックマウスおよび該 G r g 1 を発現しないマウスにおけるバイオマーカーの発現を測定すること；および、

該サンプルにおいて異なるレベルで発現されるバイオマーカーを同定すること

を含む、非小細胞性肺癌に対するマーカーを同定するための方法。

【請求項 6 1】

該バイオマーカーが、タンパク質および m R N A からなる群から選択される、請求項 6 0 に記載の方法。

50

- 【請求項 6 2】
該生物学的サンプルが液体サンプルまたは組織サンプルである、請求項 6 0 に記載の方法。
- 【請求項 6 3】
該液体サンプルが、血液、血清および血漿からなる群から選択される、請求項 6 2 に記載の方法。
- 【請求項 6 4】
該組織サンプルが肺組織である、請求項 6 2 に記載の方法。
- 【請求項 6 5】
測定工程前に、該生物学的サンプルを結合パートナーと接触させることをさらに含む、請求項 6 0 に記載の方法。 10
- 【請求項 6 6】
該結合パートナーが、抗体、核酸、リガンド、アプタマーおよびそれらのフラグメントからなる群から選択される、請求項 6 5 に記載の方法。
- 【請求項 6 7】
該同定する工程が、結合パートナーへの結合を検出することを含む、請求項 6 5 に記載の方法。
- 【請求項 6 8】
該生物学的サンプルが検出可能に標識されている、請求項 6 0 に記載の方法。
- 【請求項 6 9】
該検出する工程が、該マーカー - 結合パートナー複合体を第 2 の結合パートナーと接触させることを含む、請求項 6 5 に記載の方法。 20
- 【請求項 7 0】
該第 2 の結合パートナーが検出可能に標識されている、請求項 6 9 に記載の方法。
- 【請求項 7 1】
該方法が、液体クロマトグラフィー分析およびタンデム質量分析を含む、請求項 6 0 に記載の方法。
- 【請求項 7 2】
バイオマーカー発現のレベルが、Gr g 1 を発現しないマウスにおけるバイオマーカー発現のレベルと比較したとき、Gr g 1 を発現するトランスジェニックマウスにおいて増加されている、請求項 6 0 に記載の方法。 30
- 【請求項 7 3】
バイオマーカー発現のレベルが、Gr g 1 を発現しないマウスにおけるバイオマーカー発現のレベルと比較したとき、Gr g 1 を発現するトランスジェニックマウスにおいて減少されている、請求項 6 0 に記載の方法。
- 【請求項 7 4】
該方法が、mRNA レベルを比較する工程前に、該サンプルを DNA と接触させることをさらに含む、請求項 6 0 に記載の方法。
- 【請求項 7 5】
該方法が、該サンプルから mRNA を単離すること、および該 mRNA を定量的に増幅すること、および cDNA を生産することをさらに含む、請求項 6 0 に記載の方法。 40
- 【発明の詳細な説明】
- 【技術分野】
- 【0001】
関連出願の相互参照
本出願は、出典明示によりその全体が本明細書に包含させる 2011 年 2 月 23 日に出版された米国 61 / 445 , 972 の利益を主張する。
- 【0002】
技術分野
本発明は、生物学的マーカーを使用する癌の診断および癌の処置のための方法に関する 50

。

【背景技術】

【0003】

背景

肺癌は、数十年にわたって最も一般的な癌であり、世界中で最も多くの癌による死を引き起こしている。2008年は、世界中でおよそ161万人の新規症例（全12.7%）があり、138万人の死（全18.2%）が肺癌により引き起こされた。これは、乳房、前立腺および結腸直腸癌を合わせた死亡率を超える。肺癌は、喫煙者、喫煙経験者および非喫煙者に影響を及ぼし、後者のグループは症例の約15%を構成する。この疾患の腫瘍進行性および侵襲性生物学的挙動の根拠は、依然としてほとんど分かっていない。まとめると、問題は、利用できる動物モデルの不足であり、そのことが疾患の生物学的および分子

10

【0004】

他の癌と同様に、肺癌は早期に検出されると、生存率は非常に高い。該疾患が早期の局所段階に検出され、外科的に除去することができる場合、5年生存率が85%に達することができる。しかしながら、一旦癌が他の臓器、とりわけ遠位部位に広がると、患者の5年生存率がわずか2%となる。残念ながら、肺癌は進行した段階に達するまで、通常、無症候性である。したがって、肺癌のほんの5%が早期の局所段階に見出される。したがって、最も早期の最も治療可能な段階における肺癌の検出を導く、無症候性個体のスクリーニングに役立つツールに対して切迫した必要性が存在する。

20

【0005】

早期肺癌を検出するための可能性のあるスクリーニングツールは、胸部X線およびコンピュータトモグラフィ（CT）スキャンである。しかしながら、高コストおよび高い偽陽性率が、これらの放射線ツールを日常的な広範な使用に実用的でないものとする。例えば、米国の国立癌研究所の最近の試験は、胸部X線での肺癌に対するスクリーニングは、早期肺癌を検出することができるが、多数の偽陽性試験結果を生じ、不必要な追跡調査を引き起こすと結論づけた、Okenら *Journal of the National Cancer Institute*, 97(24)1832-1839, 2005。偽陽性の同様の問題は、CTスキャンを含む継続中の試験で見られる。CTスクリーニングの特異性は、不確定な放射線所見の数に基づいて約65%で計算される。普及しているCTスキャンにおいて見られる多数の不確定な肺結節は、侵襲的手段によるさらなる研究を必要とし、CTスキャンにより同定される肺結節の多くは、良性であり、このことは、1生命あたりに発生する医療費の大部分の削減について大きな関心を引き起こす。

30

【0006】

PETスキャンは別の診断選択肢であるが、PETスキャンは、スクリーニングプログラムにおける使用のために、コスト的に、および一般的に受け入れられない。

【0007】

現在、年齢および喫煙歴が、大規模スクリーニング研究による選択基準として使用されているたった2つの危険因子である。放射線画像で明らかな癌（ $>0.5\text{ cm}$ ）ならびに潜伏および前悪性癌（放射線検出の限界未満）を検出することができる血液試験は、放射線学的スクリーニングを最も正当化する個体を同定し、事実上、さらなる精密検査を必要とする良性肺所見の数を減少させる。

40

【0008】

したがって、放射線技術の前記制限を克服する改善された肺癌スクリーニングおよびより良い検出ツールに対する緊急の必要性が存在することが明らかである。

【0009】

肺癌に対する診断スクリーンに加えて、検出ツールが最適な治療処置の指標を提供することができる、大きな価値がある。癌、例えば、乳癌および大腸癌において、上皮細胞増殖因子受容体（EGFR）またはGTPase KRAS（KRAS）において突然変異を有する患者に対する標的治療は、臨床試験において成功を示している。処置を患者に

50

特異的に調整することができるため、標的または「オーダーメイド医療」のこのアプローチは、患者応答を改善し、また、医療費を抑えることができる。

【0010】

生物学的マーカーを使用する癌の診断のための2、3の方法および治療的指標のための生物学的マーカーの使用が、記載されている。しかしながら、これらは、早期の最も治療可能な段階における肺癌の検出を導く無症候性個体のスクリーニングに役立つコスト的に有効な、低侵襲性の、高度予測分析手段のために有用でない。癌のマーカーの同定と関連する技術的問題は、前向き研究においてヒト血清サンプルを使用することにより、先行技術において満足に取り組みられていない。前向き研究において、肺癌を発症する高い危険性のある患者は、CTスキャンによりスクリーニングされ、サンプルが採取され、試験のために保存され、該患者を数年間追跡し、どの患者が肺癌を発症するかを決定した。どの患者が肺癌を発症するか分かったとき、これらの患者由来の保存されたサンプルを、DNAまたはタンパク質バイオマーカーにおける顕著な違いについて試験することができる。癌を有すると疑われる患者において癌を検出するための、または危険性のある患者をスクリーニングするためのこれらの先行技術研究の結果を使用する主な問題は、このアプローチは中期から後期の肺癌に対するバイオマーカーを同定するが、一方、低侵襲性でありコスト的に有効な方法を使用して肺癌の早期検出を提供し、治療的に標的とされ、かつ治療に対する患者の応答の予後指標および指標として使用されるバイオマーカーが必要とされることである。

10

【発明の概要】

20

【0011】

発明の概要

本明細書に記載されている本発明の開発に役立つために克服された1つの技術的問題は、肺癌の存在と関連のない遺伝子およびタンパク質発現における可変性のために、肺癌に対するバイオマーカーはヒト患者において同定することが難しいことである。したがって、適当な肺癌動物モデルは、再現性のある予測可能な疾患の発症および適当なネガティブコントロールを提供することができる。

【0012】

本発明の開発に役立つために克服された別の技術的問題は、癌を有する患者と癌を有さない患者とで定量的に異なっている特定のバイオマーカーを同定することであった。このようなバイオマーカーは、試験結果の統計分析を必要とするよりも、医師へのイエスかノーの答えを提供することにおける臨床状況において非常に有用であり、単純な臨床診断試験に適していない。さらに、本発明において、タンパク質の（選択されたバイオマーカーに依存して）高い、または低い患者の発現レベルを示すアッセイ結果が、さらなるスクリーニング、例えば、CTスキャンの必要性に関してイエスかノーの決定を提供することができるように、それぞれのバイオマーカーに対して閾値発現レベルを同定することができる。これは、患者が癌を有する可能性を計算するために、多数のタンパク質/mRNAの発現パターンの複合統計分析を使用する他の方法を超える利点がある。

30

【0013】

本発明の開発に役立つために克服された別の技術的問題は、動物モデルにおいて試験することができる癌処置において標的化することができる既知の機能を有するバイオマーカーを同定することであった。さらなる技術的問題は、1つの組織における癌遺伝子が必ず、異なる組織における癌遺伝子であるか否かを決定することであった。

40

【0014】

出願人は、これらの技術的問題が、肺癌マウスモデルを使用して癌バイオマーカーを同定すること、肺癌を有する可能性のある患者を同定するためにバイオマーカーを使用すること、および患者が応答する可能性のある処置を予測するために治療的指標としてバイオマーカーを使用することを含む方法を手段として解決されることを見出した。本明細書に記載されている本発明のバイオマーカーまたはバイオマーカーの誘導体は、癌に対する処置として使用され得る。また、バイオマーカーが肺組織以外の組織臓器の腫瘍に対する抗

50

癌剤として使用されるとき、重要な、予期し得ない結果がなし遂げられ得ることを見出した。

【0015】

1つの局面において、本発明は、癌のバイオマーカーおよび癌を処置するために有用な治療を同定するための、肺癌に対するトランスジェニックマウスモデル（Gr g 1マウス）の使用に関する。本発明の局面の1つの態様において、Gr g 1マウスは、患者血液サンプルにおいて定量的に測定することができるバイオマーカーを同定する、ならびに、肺癌患者および正常コントロールサンプル間の違いを検出するために使用され得る。

【0016】

別の局面において、本発明は、癌の存在または非存在が決定される患者の組織または体液サンプルを使用する肺癌の早期検出のためのアッセイ、方法およびキットに関する。1つの態様において、本発明は、一団のバイオマーカーとして存在することができる1つ以上のバイオマーカーの存在を評価することによる肺癌の検出に関する。1つの態様において、本発明は、とりわけ、癌に対する危険性について患者集団、例えば、患者の放射線イメージングおよび他のスクリーニングモダリティと共に使用されるとき、肺癌スクリーニング戦略において使用され得る。本発明は、肺癌の存在を排除するように、これらの患者のさらなる放射線分析のために癌を有する可能性が非常に高い集団を高めるために使用することができる。要するに、この局面において、本発明は、患者における肺癌の存在を検出する方法に関する。

10

【0017】

1つの態様において、患者由来の血液サンプルは、本発明における肺癌と関連するタンパク質バイオマーカーの1つまたは一団の存在について分析される。特定の態様において、本発明は、許容される試験およびプロトコルを使用して肺癌と診断されていない無症候性患者または高危険性グループの患者、すなわち、例えば、これらの患者は放射線画像で検出可能な肺癌を欠いている、に対して以下に記載されるバイオマーカーを使用するスクリーニング試験に関する。本明細書に記載されている本発明の方法は、癌に対する高い特異性で比較的安価で低侵襲性であり、現在の肺癌スクリーニング方法、例えば、胸部X線またはLow Dose CTの高いコストおよび低い特異性の代替品を提供する。

20

【0018】

別の局面において、本発明は、1つ以上の薬物処置に対する患者応答を予測するために以下に記載される1つ以上のバイオマーカーの状態を使用することにより、治療的介入を決定することに関する。本発明の別の態様において、バイオマーカー、またはバイオマーカーのアナログ、ホモログもしくはフラグメントは、癌を処置するために使用され得る。

30

【0019】

したがって、本発明のこの局面において、生物学的サンプルにおける1つ以上の肺腫瘍タンパク質バイオマーカーの同定のための方法が提供される。このような生物学的サンプルは、体液または組織、例えば、限定はしないが、血液、血清または血漿または細胞（例えば、生検から得られるもの）を含む。方法は、肺癌を有しないと同定される個体の肺腫瘍組織間で、例えば、ウェスタンブロット、プロテオーム分析、ノーザンブロット、RT-PCR、以下に記載されており、Gr g 1マウスモデルにおいて同定されている免疫測定法を使用して、同定された肺腫瘍タンパク質バイオマーカー発現を測定すること；および、肺癌患者と疑われるもの由来の生物学的サンプル、例えば、ヒト血液サンプルにおける同じ肺腫瘍タンパク質バイオマーカーの測定、それにより肺癌を有さない患者（正常またはネガティブコントロール）と比較して肺癌患者において測定できる程度に異なるタンパク質バイオマーカーを同定することの工程を含む。

40

【0020】

本発明の別の局面において、本発明は、癌、例えば、限定はしないが肺癌の検出のための1つ以上のバイオマーカーを含むキットに関する。本発明の1つの態様において、1つ以上のバイオマーカーは、Gro uch o関連タンパク質、例えば、限定はしないがTLE 1に関する。キットは、患者の体液、例えば、血液、血清または血漿における、限定は

50

しないが G r o u c h 関連タンパク質を含むバイオマーカの発現レベルを測定するための固体支持体に固定された抗体を含むことができる。固体支持体、例えば、抗体アレイは、患者サンプルにおける癌の存在の可能性を決定することにおける使用のための、癌を示さないサンプル由来の参照、コントロールまたはベースライン量の同じ1つ以上のバイオマーカをさらに含むことができる。

【0021】

種々の態様において、バイオマーカは、1つ以上の G r o u c h o 関連タンパク質、M d m 2、R a s、E r b B 1、E r b B 2 または C y c l i n D 1 / D 2 を含む。患者において癌の可能性を決定するために、本発明の方法の別の態様において、方法は、1つ以上の M d m 2、R a s、E r b B 1、E r b B 2 または C y c l i n D 1 / D 2 および / または G r o u c h o 関連タンパク質、例えば、限定はしないが T L E の量の定量測定を測定することを含む。別の局面において、本発明は、癌患者における処置の方法としてヒストン - デアセチラーゼインヒビター (H D A C インヒビター) の使用を示すための方法に関する。この方法の1つの態様において、血液サンプルは癌患者から得られ、癌患者における G r o u c h o 関連タンパク質の発現が測定され、癌を有さない患者からの該タンパク質の発現の参照値と比較される。このデータから、ヒストン - デアセチラーゼインヒビターで患者を処置する有用性が決定される。さらに別の局面において、本発明は、1つ以上の候補化学療法薬を G r g 1 肺癌マウスモデルに適用し、処置および未処置 G r g 1 マウスにおける肺腫瘍のサイズ、数および組織学的外観を定量的に比較することにより、癌処置に対する薬物を評価するための方法に関する。

10

20

【0022】

さらに別の局面において、本発明は、癌を処置するための方法に関する。1つの態様において、方法は、タンパク質バイオマーカの誘導体、例えば、アナログ、ホモログまたはフラグメントを使用する。例えば、1つの態様において、G r o u c h o 関連タンパク質の Q - ドメインは、肺癌を処置するために使用することができる。別の態様において、G r o u c h o 関連タンパク質またはそのアナログ、ホモログもしくはフラグメントは、大腸癌を処置するために使用することができる。

【0023】

本発明の別の局面において、本発明は、哺乳動物から生物学的サンプルを提供すること ; 1つ以上の高分子を含む一団を提供すること、ここで、それぞれの高分子は、非トランスジェニックマウスよりも、G r g 1 を発現するトランスジェニックマウスにおいて定量的に異なるレベルで測定可能であるバイオマーカであるか、またはバイオマーカに特異的に結合する ; バイオマーカの発現のレベルを決定するために、哺乳動物の生物学的サンプルを一団と接触させること ; 哺乳動物サンプルにおいて発現されるバイオマーカのレベルを、参照サンプルにおけるバイオマーカのレベルと比較することにより哺乳動物において肺癌を診断するための方法であって ; 参照サンプルと比較して、哺乳動物の生物学的サンプルにおけるバイオマーカの発現の定量的に異なるレベルの存在が、癌を示す、方法に関する。

30

【0024】

種々の態様において、参照サンプルは、癌と診断されておらず、癌に対する増加した危険因子を有さない健常哺乳動物由来の生物学的サンプル ; または、癌と診断されておらず、癌に対する増加した危険因子を有さない健常哺乳動物由来の生物学的サンプルにおいて測定されるレベルに対応する濃度レベルで提供される精製されたバイオマーカである。

40

【0025】

種々の態様において、高分子は、抗体、核酸、タンパク質またはそれらのフラグメントである。

【0026】

種々の態様において、バイオマーカは、タンパク質、m R N A または抗体である。

【0027】

種々の態様において、バイオマーカは、G r o u c h o 関連タンパク質、M d m 2、

50

R a s、E r b B 1、E r b B 2 および C y c l i n D 1 / D 2 であるタンパク質；または、1つのこのようなタンパク質をコードするmRNA；または、1つのこのようなタンパク質に特異的に結合する自己抗体である。好ましい態様において、少なくとも1つのバイオマーカ―はG r o u c h o 関連タンパク質を含む。バイオマーカ―タンパク質は、通常、非分泌タンパク質であるタンパク質として特徴付けられる。

【0028】

種々の態様において、一団は、非トランスジェニックマウスよりも、G r g 1 を発現するトランスジェニックマウスにおいて定量的に異なるレベルで測定可能であるバイオマーカ―タンパク質に特異的に結合する1つ以上の抗体を含むか；または、一団は、非トランスジェニックマウスよりも、G r g 1 を発現するトランスジェニックマウスにおいて定量的に異なるレベルで測定可能であるバイオマーカ―mRNAまたはその相補的配列に特異的に結合する1つ以上のcDNA分子を含むか；または、一団は、非トランスジェニックマウスよりも、G r g 1 を発現するトランスジェニックマウスにおいて定量的に異なるレベルで測定可能であるバイオマーカ―である1つ以上のタンパク質を含む。

10

【0029】

いくつかの態様において、方法は、哺乳動物の生物学的サンプルおよび参照サンプルからmRNAを単離すること、およびmRNAを定量的に増幅すること、およびcDNAを生産することをさらに含む。

【0030】

種々の態様において、哺乳動物の生物学的サンプルは液体サンプルである。液体サンプルは、血液、血漿または血清であり得る。種々の他の態様において、哺乳動物の生物学的サンプルおよび参照サンプルは、検出可能に標識されている。

20

【0031】

本発明の別の局面において、本発明は、候補患者から生物学的サンプルを提供すること；患者の生物学的サンプルにおけるT L E バイオマーカ―の発現の存在を検出すること；患者の生物学的サンプルにおけるT L E バイオマーカ―の発現のレベルを、参照サンプルにおけるT L E バイオマーカ―のレベルと比較すること；および、候補患者の生物学的サンプルにおけるT L E バイオマーカ―発現が、参照サンプルにおけるT L E バイオマーカ―のレベルよりも高いとき、H D A C インヒビター化学療法に対する応答候補として候補患者を同定することによりインヒビター化学療法に対して応答する候補患者を同定するための方法に関する。1つの態様において、癌患者は肺癌を有する。種々の態様において、T L E バイオマーカ―の発現は、T L E タンパク質レベルまたはmRNAレベルを測定することにより決定される。T L E バイオマーカ―タンパク質は、通常、非分泌タンパク質であるタンパク質として特徴付けられる。

30

【0032】

種々の態様において、参照サンプルは、癌と診断されておらず、癌に対する増加した危険因子を有さない健常哺乳動物由来の生物学的サンプル；癌と診断されておらず、癌に対する増加した危険因子を有さない健常哺乳動物由来の生物学的サンプルにおいて測定されるレベルに対応する濃度レベルで提供される精製されたバイオマーカ―；既知の非応答患者由来の生物学的サンプル；または、既知の非応答患者由来の生物学的サンプルにおいて測定されるレベルに対応する濃度レベルで提供される精製されたバイオマーカ―である。

40

【0033】

種々の態様において、患者の生物学的サンプルは液体サンプルまたは組織サンプルである。液体サンプルは、血液、血漿または血清であり得る。組織サンプルは肺組織であり得る。

【0034】

本発明の別の局面において、本発明は、処置プロトコール前に、患者から生物学的サンプルを提供すること；処置前の患者サンプルにおけるT L E バイオマーカ―の発現の存在を検出すること；処置中に、または処置後に、処置前の患者サンプルにおけるT L E バイオマーカ―の発現のレベルを、患者由来の生物学的サンプルにおけるT L E バイオマーカ

50

一の発現のレベルと、もしくは参照サンプルにおけるT L Eバイオマーカのレベルと比較することにより癌患者処置プロトコルの有効性をモニタリングするための方法であって、処置後の患者サンプルと比較して処置前の患者サンプルにおけるT L Eバイオマーカの発現のレベルの変化、または、参照サンプルにおけるT L Eバイオマーカのレベルと比較して処置後の患者サンプルのT L E発現のレベルの違いは、処置の有効性を示す、方法に関する。1つの態様において、該処置後の患者サンプルにおけるT L Eの減少したレベルは、有効な処置を示す。種々の態様において、T L Eバイオマーカの発現は、T L Eタンパク質レベルまたはm R N Aレベルを測定することにより決定される。

【0035】

種々の態様において、参照サンプルは、癌と診断されておらず、癌に対する増加した危険因子を有さない健常哺乳動物由来の生物学的サンプル；または、癌と診断されておらず、癌に対する増加した危険因子を有さない健常哺乳動物由来の生物学的サンプルにおいて測定されるレベルに対応する濃度レベルで提供される精製されたバイオマーカである。

10

【0036】

1つの態様において、処置は、治療有効量のH D A Cインヒビターを投与することを含む。1つの態様において、癌患者は肺癌を有する。

【0037】

種々の態様において、サンプルは液体サンプルまたは組織サンプルである。液体サンプルは血液、血漿または血清であり得る。組織サンプルは肺組織であり得る。

20

【0038】

本発明のさらに別の局面において、本発明は、該患者から処置後の生物学的サンプルを提供すること；該患者サンプルにおけるT L Eバイオマーカの発現の存在を検出すること；該処置後の患者サンプルにおけるT L Eバイオマーカの発現のレベルを、参照サンプルにおけるT L Eバイオマーカの発現のレベルと比較することにより癌患者処置プロトコルの有効性をモニタリングするための方法であって、該参照サンプルにおける該T L E発現のレベルと比較して該処置後の患者サンプルのT L E発現のレベルの違いが、該処置の有効性を示す、方法に関する。1つの態様において、該処置後の患者サンプルにおけるT L Eの減少したレベルが、有効な処置を示す。T L Eバイオマーカタンパク質は、通常、非分泌タンパク質であるタンパク質として特徴付けられる。

【0039】

1つの態様において、参照サンプルは、治療に対して応答しない処置後の癌患者から得られる。種々の他の態様において、参照サンプルは、癌と診断されておらず、癌に対する増加した危険因子を有さない健常哺乳動物由来の生物学的サンプル；または、癌と診断されておらず、癌に対する増加した危険因子を有さない健常哺乳動物由来の生物学的サンプルにおいて測定されるレベルに対応する濃度レベルで提供される精製されたバイオマーカである。

30

【0040】

本発明の別の局面において、本発明は、患者から生物学的サンプルを提供すること；参照サンプルにおけるT L Eバイオマーカのレベルと比較して、患者の生物学的サンプルにおけるT L Eバイオマーカのより高いレベルの存在を検出すること；および、治療有効量のG r o u c h o関連タンパク質のフラグメントの投与で癌を処置するための候補として、癌患者を同定することにより、癌患者処置候補を同定するための方法に関する。1つの態様において、癌患者は肺癌を有する。T L Eバイオマーカタンパク質は、通常、非分泌タンパク質であるタンパク質として特徴付けられる。1つの態様において、フラグメントはQドメインを含む。

40

【0041】

種々の態様において、参照サンプルは、癌と診断されておらず、癌に対する増加した危険因子を有さない健常哺乳動物由来の生物学的サンプル；癌と診断されておらず、癌に対する増加した危険因子を有さない健常哺乳動物由来の生物学的サンプルにおいて測定されるレベルに対応する濃度レベルで提供される精製されたバイオマーカ；既知の非応答患

50

者由来の生物学的サンプル；または、既知の非応答患者由来の生物学的サンプルにおいて測定されるレベルに対応する濃度レベルで提供される精製されたバイオマーカーである。

【0042】

本発明の別の局面において、本発明は、患者から生物学的サンプルを提供すること；患者の生物学的サンプルにおける不活性化APCまたはベータ-カテニン突然変異の存在を検出すること；および、癌患者への治療有効量のGroucho関連タンパク質またはGroucho関連タンパク質のフラグメントの投与で癌を処置するための候補として、不活性化APCまたはベータ-カテニン突然変異を有する癌患者を同定することにより、癌患者処置候補を同定するための方法に関する。1つの態様において、癌患者は大腸癌を有する。1つの態様において、フラグメントは少なくともWD40ドメインを含む。

10

【0043】

本発明の別の局面において、本発明は、治療有効量のGroucho関連タンパク質またはGroucho関連タンパク質のフラグメントを哺乳動物に投与することにより哺乳動物における癌を処置するための方法に関する。1つの態様において、癌は肺癌である。1つの態様において、フラグメントはQドメインを含む。さらに別の態様において、癌は大腸癌である。1つの態様において、フラグメントは、少なくともWD40ドメインを含む。

【0044】

本発明の別の局面において、本発明は、治療有効量のベータ-カテニンを癌に投与することにより、哺乳動物における癌を処置するための方法に関する。1つの態様において、癌は肺癌である。

20

【0045】

本発明の別の局面において、本発明は、ゲノムが、Apc遺伝子が少なくともコドン1638で切断されているAPCタンパク質をコードする遺伝子のヘテロ接合のヌル対立遺伝子、およびGroucho関連遺伝子の半接合の導入遺伝子の対立遺伝子を含み、腫瘍の形成を示す、トランスジェニックマウスに関する。

【0046】

本発明の別の局面において、本発明は、ゲノムが、Apc遺伝子が少なくともコドン1638で切断されているAPCタンパク質をコードする遺伝子のヘテロ接合のヌル対立遺伝子、およびGroucho関連遺伝子の半接合の導入遺伝子の対立遺伝子を含み、腫瘍の形成を示すトランスジェニックマウスを作製すること；作製されたトランスジェニックマウスを候補化合物で処置すること；腫瘍細胞の数、腫瘍の体積または腫瘍細胞生存能力を測定することにより、候補化合物で処置されたトランスジェニックマウスにおける腫瘍のレベルを決定すること；および、腫瘍細胞の数または腫瘍の体積が、候補化合物での処置前にトランスジェニックマウスにおける腫瘍細胞の数または腫瘍の体積と比較して減少されているとき、または、腫瘍細胞のアポトーシスが、候補化合物での処置後に誘導されているとき、抗腫瘍活性を有する化合物として候補化合物を同定することの工程を含む、抗腫瘍活性に対して化合物をスクリーニングする方法に関する。

30

【0047】

本発明の別の局面において、本発明は、非トランスジェニックマウスよりも、Grig1を発現するトランスジェニックマウスにおいて定量的に異なるレベルである1つ以上のバイオマーカーを含む診断キットに関する。

40

【0048】

1つの態様において、キットの1つ以上のバイオマーカーは、Groucho関連タンパク質、Mdm2、Ras、ErbB1、ErbB2またはCyclinD1/D2である。好ましい態様において、少なくとも1つのバイオマーカーはGroucho関連タンパク質を含む。1つの態様において、キットは、固体支持体に結合されているバイオマーカーの一団として提供される1つ以上のバイオマーカーを含む。バイオマーカータンパク質は、通常、非分泌タンパク質であるタンパク質として特徴付けられる。

【0049】

50

本発明の別の局面において、本発明は、Gr g 1を発現するトランスジェニックマウス由来の生物学的サンプルおよびGr g 1を発現しないマウス由来の生物学的サンプルを提供すること；Gr g 1を発現するトランスジェニックマウスおよびGr g 1を発現しないマウスにおけるバイオマーカの発現を測定すること；および、サンプルにおいて異なるレベルで発現されるバイオマーカを同定することによる、非小細胞性肺癌に対するマーカを同定するための方法に関する。バイオマーカタンパク質は、通常、非分泌タンパク質であるタンパク質として特徴付けられる。

【0050】

1つの態様において、バイオマーカは、タンパク質またはmRNAである。種々の態様において、サンプルは液体サンプルまたは組織サンプルである。液体サンプルは、血液、血清または血漿であり得る。組織サンプルは肺組織であり得る。

10

【0051】

1つの態様において、方法は、測定する工程前に、生物学的サンプルを結合パートナーと接触させることをさらに含む。結合パートナーは、抗体、核酸、リガンドまたはアプタマーであり得る。種々の態様において、同定する工程は、結合パートナーへの結合を検出することを含む。したがって、生物学的サンプルは検出可能に標識されていてもよい。他の態様において、検出する工程は、マーカ-結合パートナー複合体を第2の結合パートナーと接触させることを含む。このような態様において、第2の結合パートナーは、検出可能に標識されていてもよい。いくつかの態様は、液体クロマトグラフィー分析およびタンデム質量分析を含む。

20

【0052】

1つの態様において、バイオマーカ発現のレベルは、Gr g 1を発現しないマウスにおけるバイオマーカ発現のレベルと比較したとき、Gr g 1を発現するトランスジェニックマウスにおいて増加されている。別の態様において、バイオマーカ発現のレベルは、Gr g 1を発現しないマウスにおけるバイオマーカ発現のレベルと比較したとき、Gr g 1を発現するトランスジェニックマウスにおいて減少されている。

【0053】

いくつかの態様において、方法は、mRNAレベルを比較する工程前に、サンプルをDNAと接触させることをさらに含む。さらに他の態様において、方法は、サンプルからmRNAを単離すること、およびmRNAを定量的に増幅すること、およびcDNAを生産

30

【0054】

本発明のこれらの、および他の特徴、局面および利点は、以下の記載および請求の範囲によってより良く理解される。

【図面の簡単な説明】

【0055】

【図1】図1は、Gr g 1およびGr g 5トランスジェニックマウスに対するタンパク質発現における変化の要約の図表示である；

【図2】図2は、抗体マイクロアレイのために使用される抗体希釈の表である；

【図3】図3は、抗体アレイマップを描写する表である；

40

【図4】図4は、抗体マイクロアレイに対する検出およびスポット分析を示す表である；

【図5】図5は、抗体マイクロアレイに対するイメージ例である（ネガティブイメージ、145145A5とインキュベートされるアレイ）；

【図6】図6は、スライドインキュベーション中のサンプル再分配を示す表である（14アレイ/スライド）；

【0056】

【図7】図7は、それぞれのアレイまたはサンプルに対する標識化BSAポジティブコントロールの平均値、SDおよびCVの表である；

【図8】図8は、それぞれのサンプルでのコントロール：抗アルブミンおよび抗-H1抗体の平均値（正味のシグナル、除去されたバックグラウンドシグナル）、SDおよびCV

50

の表である；

【図 9】図 9 は、それぞれのサンプルに対するネガティブコントロール（PBS）およびバックグラウンド（B635）の平均値、SD および CV の表である；

【図 10】図 10 は、血清およびインキュベーションコントロールに対する平均正味のシグナルの表である；

【図 11】図 11 は、強調された値の例を示す表である；

【図 12】図 12 は、10 個の抗体に対して得られた結果の表である；

【0057】

【図 13】図 13 は、MDM2 抗体のボックスプロットである（ $p = 0.03$ 、Mann & Whitney）；

【図 14】図 14 は、TLE1 抗体のボックスプロットである（ $p = 0.03$ 、Mann & Whitney）；

【図 15】図 15 は、トリコスタチン A での処置後の Gr g 1 トランスジェニックマウスにおける腫瘍発生を示す表である；

【図 16】図 16 は、トリコスタチン A 処置を有さない、または該処置を有する Gr g 1 h P L A P トランスジェニックマウス由来の腫瘍切片の写真である；

【図 17】図 17 は、APC^{mi n} / Gr g 1 h P L A P マウスにおける腸ポリープおよび肺腺腫の定量を示す表である；および、

【図 18】図 18 A および B は、脊椎動物 G r o u c h o 関連タンパク質の構造的および配列的保存を示す概略である。

【発明を実施するための形態】

【0058】

詳細な説明

サンプルの不均一性のために、ヒトサンプルを使用してバイオマーカーを同定することが難しい。多数の違いが、疾患と関連しないヒトサンプル中で起こる。この困難性を克服するために、予測可能な疾患進行および適当なネガティブコントロールの利用可能性を提供する動物モデルを、本明細書に記載されている本発明を開発することにおいて使用した。

【0059】

Gr g 1 トランスジェニックマウス系を、肺癌に対する生物学的タンパク質マーカーを同定するために使用した。Gr g 1 マウスは、ヒト非小細胞肺腺癌に似ている肺腫瘍を発生する。Gr g 1 マウスを、肺腫瘍発生中の遺伝子およびタンパク質の違いの測定のためのサンプルを提供するために、組織の供給源として使用した。Gr g 1 トランスジェニックマウスの生産は、Allen, Tら “Grg1 Acts as a Lung-Specific Oncogene in a Transgenic Mouse Model”, *Cancer Res*, 66:3, 1294-1301(2006) (出典明示により本明細書に包含させる) に記載されている。本発明において、Gr g 1 トランスジェニックマウスを、肺癌に対する生物学的タンパク質マーカーを同定するために使用した。肺癌を有する患者を同定するために関連する同定された生物学的タンパク質マーカーは、ヒトにおける癌を診断する慣用の手段により分析される場合に、癌を有さないヒトコントロール患者において同定されるタンパク質と定量的または定性的に異なるヒト癌患者由来の血清において測定可能なタンパク質であった。本発明は、肺癌を検出するためのアッセイおよび方法を提供する。要するに、癌を有する疑いのある、または診断として癌を排除する必要性のある患者または対象由来のサンプル、例えば、血液サンプルを得て、肺癌に対するバイオマーカーの存在または非存在について分析する。肺癌とある程度関連している 1 つのバイオマーカーまたはバイオマーカーの一群を使用する。本発明のバイオマーカーは、ヒトにおいてトランスデュースン様エンハンサーオブスプリット (enhancer-of-split) (TLE) と呼ばれる G r o u c h o 関連タンパク質、G r o u c h o 関連タンパク質に対する自己抗体、または G r o u c h o 関連タンパク質をコードする核酸を含むが、これらに限定されない。本発明のバイオマーカーは、M d m 2 タンパク質、M d m 2 タンパク質に対する自己抗体、または M d m 2 タンパク質をコードする核酸をさらに含むが、これらに限定さ

10

20

30

40

50

れない。

【0060】

Grouchoタンパク質は、多くの転写因子およびヒストンデアセチラーゼ-1 (HDAC-1)と相互作用し、標的遺伝子の転写を抑制する転写共抑制因子である。Grouchoタンパク質ファミリーは、マウスにおけるGrg1-5およびヒトにおけるTLE1-5によってコードされる。大多数のGrouchoタンパク質は、ショウジョウバエGrouchoタンパク質のプロトタイプの全てのドメインを有するが、Grg5/TLE5、あるいはGrg3のスプライス変異体は、アミノ末端QおよびG/Pドメインのみを有するGrouchoアイソフォームをコードする。Qドメインを、Grouchoタンパク質のオリゴマー形成のために使用する。したがって、短いGrouchoタンパク質は、非機能性複合体を形成することにより、長いタンパク質の活性を阻害し得る。

10

【0061】

図18Aは、上部でショウジョウバエGrouchoタンパク質の構造機構を示し、Grouchoドメインの全てが保存されているか、またはQおよびB/Pドメインのみを含む関連脊椎動物タンパク質を下部に示す。Grouchoホモログの命名法は、左欄に示されている。数は、ショウジョウバエGrouchoタンパク質(斜線の左)またはヒトTLEタンパク質(斜線の右)とのアミノ酸同一性パーセントを示す。

【0062】

図18Bは、マウスGrouchoホモログのQおよびWD40ドメインのアラインメントを示す。ダッシュ記号は、アミノ酸同一性を示す。右側のパーセントは、Grg3との相同性を示す。Grg3において、ヒトTLE3に対する保存が、丸括弧内に挙げられている。

20

【0063】

表1は、TLEタンパク質のそれぞれに対するアミノ酸番号によりQドメインおよびWD40ドメインを同定している。Grg1-5およびTLE1-5のアミノ酸およびポリヌクレオチド配列は、添付物Aにおいて提供される。

表1

【表1】

| タンパク質 | Qドメイン | WD40ドメイン |
|-------|--------|----------|
| TLE1 | 1-135 | 483-726 |
| TLE2 | 1-132 | 456-740 |
| TLE3 | 1-124 | 473-764 |
| TLE4 | 8-140 | 477-720 |
| TLE5 | 76-190 | n/a |

30

【0064】

Mdm2(マウス二重微小染色体2(mdm2)遺伝子)のヒトホモログは、p53腫瘍抑制剤のネガティブレギュレーターであるE3ユビキチン-タンパク質リガーゼをコードする。この遺伝子の過剰発現は、腫瘍タンパク質p53の過剰不活性化をもたらす、腫瘍抑制機能を減少させることができる。ヒトMDM2のアミノ酸およびポリヌクレオチド配列は、添付物Aにおいて提供される。

40

【0065】

本発明のバイオマーカー、Groucho関連タンパク質(マウスにおけるタンパク質のGrgファミリー;ヒトにおけるタンパク質のTLEファミリー)、Mdm2、Ras、ErbB1、ErbB2およびCyclinD1/D2は、細胞中に存在し、機能するタンパク質である。したがって、本発明のタンパク質バイオマーカーは、通常、非分泌タンパク質である。液体生物学的サンプル、例えば、血液、血清または血漿においてバイオマーカーを検出することができるアッセイは、分泌タンパク質の検出に限定されるである

50

うことが予期される。したがって、本発明の局面が、液体生物学的サンプル、例えば、血液、血漿または血清における測定可能なレベルの本発明のバイオマーカーを検出するための診断アッセイおよびキットであるということは、驚くべき予測し得ないことである。

【0066】

本発明の全ての局面および態様において、本発明のバイオマーカーは、一団として示すことができ、一団は、本発明のアッセイまたは方法において選択または提供される特定のバイオマーカーまたはバイオマーカーのグループ；または、本発明のキットにおいて提供される特定のバイオマーカーまたはバイオマーカーのグループを示す。

【0067】

本発明の全ての局面および態様において、バイオマーカーは、高分子として提供される。高分子は、そのタンパク質、核酸、抗体またはフラグメントであり得る。高分子がタンパク質であるとき、フラグメントは、限定はしないが、抗原フラグメント、種々の長さのN-末端ドメイン、種々の長さのC-末端ドメイン、当分野で同定されている指定されたドメイン（例えば、G r o u c h o 関連タンパク質のQドメインまたはWD40ドメイン）を含むことができる。高分子が核酸であるとき、核酸は、限定はしないが、そのmRNA、cDNA、ゲノムDNAおよびフラグメントを含むことができる。核酸のフラグメントは、限定はしないが、コード配列および上記種々のタンパク質フラグメントに対応する配列を含むことができる。高分子が抗体であるとき、抗体は、限定はしないが、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、組換え抗体、ヒト化抗体およびそれらのフラグメントを含むことができる。抗体のフラグメントは、あらゆる抗原結合フラグメント、例えば、限定はしないがF(a b)フラグメントおよびF(a b')₂フラグメントを含むことができる。

10

20

【0068】

以下により詳細に記載されているとおり、本発明のアッセイおよび方法は、ステージIまたはステージII肺癌を有することが知られている患者を同定することができる。現行のアッセイおよびスクリーニングモダリティは、強固かつ費用効率の良い方法で早期肺癌患者の同定を行う能力をほとんど有さないため、早期肺癌を有する患者の同定は特に価値がある。アッセイはまた、多くのサンプルを同時に試験することを可能にするアッセイフォーマットを使用することにより、例えば、マイクロアレイを使用することにより（任意の集団に対してコントロールサンプルを並行して実施して、信頼度の高い識別データを得ることができ、ここに、複数のコントロールは、できるだけ多くのパラメーターについて、該試験集団に合致させる）、汎用的である。

30

【0069】

本発明はまた、変化するバイオマーカーに基づいて、有効であり得る処置治療を決定するための方法を提供する。バイオマーカーまたはバイオマーカーと相互作用する他のタンパク質を標的化する処置を選択することができる。

【0070】

本発明はまた、APC経路タンパク質が変化する他の癌、例えば、限定はしないが大腸癌の処置のために提供する。処置は、治療有効量においてG r o u c h o 関連タンパク質またはG r o u c h o 関連タンパク質のホモログもしくはフラグメントを癌患者に導入することにより、もたらされ得る。

40

【0071】**バイオマーカー選択**

肺癌関連マーカー、例えば、タンパク質バイオマーカーまたはタンパク質に対する自己抗体の選択および同定は、G r g 1トランスジェニックマウスを使用して行われた。G r g 1マウス由来の組織サンプルを回収し、差別的(differential)RNAアレイ、ウェスタンブロットまたはプロテオミクス方法、例えばLC-MS/MSを含む方法により分析した。G r g 1マウスにおけるタンパク質または遺伝子発現レベルを、非腫瘍コントロールマウスと比較した。隣接正常肺組織と比較してG r g 1マウスまたは腫瘍において異なるレベルで発現されたタンパク質または遺伝子は、肺癌の早期検出における使用のための可

50

能性のある肺癌バイオマーカーを示す。これらのタンパク質を、ヒト肺癌患者サンプルにおける存在について試験した。

【0072】

バイオマーカーに対する抗体は、「診断チップ」上にまとめられ、例えば、一団の抗体は、マイクロアレイとしての固相基質上に存在し、肺癌患者のサンプルと非肺癌集団のサンプルとの区別における独立した予測値についてさらに評価した。診断マーカーを、対象における放射線学的に検出可能な肺癌の存在または将来的存在を同定する能力について選択した。

【0073】

患者サンプルにおけるバイオマーカー測定

以下により詳細に議論されているとおり、本発明は、異なるアッセイフォーマットの使用を意図する。マイクロアレイは、複数のマーカーおよびサンプルの同時試験を可能にする。したがって、多くのポジティブおよびネガティブコントロールを、マイクロアレイに含ませることができる。次に、アッセイは、複数のサンプル、例えば、既知の癌を有する患者由来の1つ以上のサンプル（ポジティブコントロール）、および癌を有さない患者由来の1つ以上のサンプル（ネガティブコントロール）の同時処置を、試験され、比較されるべき1つ以上のサンプル、例えば患者サンプルと共に行うことができる。アッセイにおいて内部ポジティブおよびネガティブコントロールを含むことは、アッセイ内でのシグナル強度の正常化、校正および標準化を可能にする。例えば、ポジティブコントロール、ネガティブコントロールおよび患者サンプルのそれぞれを複数で行うことができ、複数のサンプルは連続希釈物であり得る。コントロール部位および患者サンプル部位は、また、試験デバイス上のサンプル部位位置によって変化を最小限にするように、マイクロアレイデバイス上にランダムに配置することができる。

【0074】

したがって、このような内部コントロールを有するマイクロアレイまたはチップは、マイクロアレイまたはチップ上で同時に試験される患者の診断を可能にする。このような制御手段における試験およびデータ獲得の多重方法は、適当なコントロールが説明されるので、アッセイデバイス内で患者の診断を可能にし、マーカーの一団が個々に合理的に高い予測力を有するものである場合、ケア診断結果のポイントを得ることができる。

【0075】

サンプルおよび試験の例示

試験、特にスクリーニングアッセイに適しているサンプルは、一般的に、好ましくは、非侵襲性または低侵襲性手段において、患者から容易に得ることができるものである。血液サンプル、血漿または血清は、かかる適当なサンプルであり、非常に免疫測定法フォーマットに容易に適している。血液サンプルの文脈において、多数の既知の血液回収チューブが存在し、多くは5または10mlの液体を回収する。最も一般的に秩序化された診断血液試験と同様に、5mlの血液を回収することができるが、マイクロアレイとして操作するアッセイは、1ml未満の血液を必要とし得る。血液回収容器は、抗凝固剤、例えば、ヘパリン、クエン酸塩またはEDTAを含むことができる。細胞成分を、一般的に、4で10分間、例えば、1000 * g (RCF)で遠心分離により分離し（分析のための~40%血漿を生じ）、一般的に、使用するまで冷蔵庫温度で、または4で保存することができる。好ましくは、血漿サンプルは、回収から3日以内にアッセイされるか、または、例えば、-20で冷凍保存される。過剰なサンプルは、必要とされる繰り返し分析のために最大2週間、（サンプルの凍結融解を回避するために、霜なし冷蔵庫において）-20で貯蔵される。2週間よりも長い期間の保存は、-80でされるべきである。血清サンプルは、抗凝固剤を提供せず、サンプルを凝固させないことにより得ることができる。当分野で知られているタンパク質構造および機能を保存する標準処理および保存方法が実行される。

【0076】

本発明において、次に、癌を有する疑いのある、または診断として癌を排除する必要性

10

20

30

40

50

のあるヒト患者由来の液体サンプルは、例えば、本明細書において議論されているバイオマーカーに対する抗体を負荷された部位を含む試験組成物、例えば、マイクロアレイに、1つの態様において、好ましくは適当なポジティブコントロールおよび/またはネガティブコントロールサンプルと共に適用される。患者、ポジティブコントロールおよびネガティブコントロールサンプルは、定量化を可能にするために、段階的な量、例えば連続希釈において提供することができる。サンプルは、マイクロアレイのあらゆる位置効果に取り組みするために、マイクロアレイ上にランダムに配置することができる。インキュベーション後、マイクロアレイを洗浄し、次に、検出器に暴露する。再び、マイクロアレイを洗浄し、次に、1つの態様において、レポーターの検出を可能にするために試薬に暴露する。したがって、レポーターが着色粒子、例えば金属ゾルを含むとき、特定の検出手段を必要としない。本発明の別の態様において、蛍光分子を使用し、適当な入射光で検出する。あるいは、本発明の別の態様において、酵素を使用し、マイクロアレイを視覚化のための適当な基質に暴露する。マイクロアレイは、部位に結合された反応産物について評価する。視覚的評価することができるが、他のデバイスが検出し、必要なとき、シグナル強度を定量する。次に、データは、例えば、ポジティブおよびネガティブコントロールサンプルを観察することにより、反応の有効性の情報を提供するために解釈され、有効であるとき、患者サンプルを評価する。アッセイから得られたデータを、患者サンプルにおける1つ以上のバイオマーカーが、ネガティブコントロールサンプルと定量的に異なるか否かを決定するために分析する。患者サンプルが、選択されたバイオマーカーに依存して、ネガティブコントロールサンプルよりも、より多いまたはより少ない量のバイオマーカーを有するとき、該患者は肺癌に対してポジティブとして診断される。

10

20

30

40

50

【0077】

キットおよびアッセイの使用

本発明の血液アッセイ（試験）は、複数の使用および応用を有するが、後の経過観察のための早期診断または早期警告が、疾患の結果に対する潜在的な影響のために非常に説得力がある。本発明は、肺癌に対する放射線スクリーニングを補足するために、診断ツールとして使用され得る。連続CTスクリーニングは、一般的に肺癌に対して感受性であるが、非常に高価であり、非特異的（報告された特異性64%）である傾向にある。したがって、CTは、約10分の4という多数の偽陽性を生じる。放射線イメージング中の不確定な肺結節の日常的な同定は、頻繁に、高価な後処理および潜在的に有害な介入、例えば侵襲性生検に至る。現在、年齢および喫煙歴が、肺癌に対して大規模スクリーニング試験により選択基準として使用されているたった2つの危険因子である。

【0078】

放射線画像で明らかな癌（ $> 0.5 \text{ cm}$ ）および/または潜伏および前悪性癌（放射線検出の限界未満）を検出するための本発明の方法は、さらなるスクリーニングが最も正当化される個体を定義する。したがって、本明細書に記載されている本発明のアッセイは、癌の存在を示すポジティブ結果が、当分野で慣用かつ知られているさらなる試験、例えば、放射線分析によるさらなる試験、例えば、CT、PET、X線などの適応を示す一次スクリーニング試験として役立たせることができる。加えて、定期的再試験は、新たな非小細胞性肺癌NSCLCを同定し得る。

【0079】

本明細書に記載されている本発明のアッセイの臨床的適用の例は、医療行為における使用であり、高い危険性の喫煙者（例えば、20年以上、1日に1パック相当の喫煙者）由来の体液サンプル、例えば血液が、毎年の身体試験の一環として本明細書に記載されている1つ以上の肺癌バイオマーカーについてアッセイされ得る。何らさらなる明らかな症状のないネガティブなアッセイ結果は、少なくとも毎年、さらなる試験を指示することができる。試験結果がポジティブであるとき、患者は、診断イメージングにより可能性のある腫瘍を同定するために、さらなる試験、例えば、アッセイの繰り返しおよび/またはCTスキャンもしくはX線を受けるであろう。腫瘍がCTスキャンまたはX線において明らかでないとき、腫瘍が直径で少なくとも 0.5 mm であり、検出され、外科的に除去するこ

とができるまで、アッセイは、1年以内に1または2回および翌年以降に複数回繰り返されるであろう。臨床的スクリーニングプロトコルにおけるその使用に加えて、本発明のアッセイおよび方法はまた、CTスクリーニングにおいて同定される悪性結節から良性結節を区別することにおいて有用であり得る。孤立性肺結節(SPN)は、正常肺組織により完全に囲まれる、イメージングにより直径で3cm未満の単一の球状病変として定義される。SPNにおける悪性腫瘍の報告された有病率が、約10%から約70%の範囲であるが、SPNの現代の定義を使用する非常に最近の試験は、約40%から約60%である悪性腫瘍の有病率を示す。大多数の良性病変は肉芽腫の結果であるが、大多数の悪性病変は原発性肺癌である。SPNの最初の診断評価は、悪性腫瘍に対する危険因子、例えば、年齢、喫煙歴、悪性腫瘍の前歴、および結節の胸部放射線特性、例えば、サイズ、石灰化、境界(針骨状(spiculated)、または平滑(smooth))および古い胸部X線の評価に基づく成長パターンの評価に基づく。次に、これらの因子は、悪性腫瘍の可能性を決定するために、およびさらなる患者管理を導くために使用される。

10

20

30

40

50

【0080】

最初の評価後、多数の結節は、悪性腫瘍の中間確率(25-75%)を有するとして分類される。該グループにおける患者は、生検または手術前のアッセイでのさらなる試験から利益を得るであろう。成長を評価する連続スキャンまたは代謝イメージング(例えば、PETスキャン)は、現在利用できる唯一の非侵襲性選択肢であり、理想から程遠い。連続放射線分析は、成長の測定に依存しており、病変が2年の時間枠にわたって成長を示さないことを必要とする;スキャン間の理想的な間隔は決定されていないが、2年間3月毎のCTスキャンが慣用の経時的評価である。PETスキャンは、肺癌に対して90-95%特異性および80-85%感受性を有する。これらの予測値は、良性肉芽腫性疾患(例えばヒストプラズマ症)の局所有病率に基づいて変化し得る。

【0081】

PETスキャンは、現在、試験あたり\$2000から\$4000かかる。非外科手術、例えば、気管支鏡検査または経胸腔針生検(TTNB)からの診断率は、40%から95%の範囲である。非診断手段の設定における後の管理は、問題になり得る。外科的介入は、しばしば、他の診断後処理と共に、または該処理なしで、非常に実行可能な選択肢として続行される。該選択肢は、悪性腫瘍の試験前危険性が高いか、低いか、特定の施設での試験の利用可能性、結節の特性(例えば、サイズおよび位置)、患者の外科的危険性、および患者の選択に依存する。他の胸腔外悪性腫瘍の以前の病歴は、即座に肺への転移性癌の可能性を示唆し、非侵襲性試験の関連は、無視できるようになる。肺癌に対する不確かな臨床的疑いを有するSPNの混乱する臨床的シナリオにおいて、循環腫瘍マーカーは、有害な侵襲性診断後処理の可能性を回避し、逆に侵襲性外科的介入の理論的根拠を支持する手助けをすることができる。

【0082】

したがって、記載されている発明は、侵襲性診断の代わりに結節を連続的にイメージングするために選択する臨床的快適性を増強する。本発明はまた、連続X線またはCTスクリーニングに関する間隔における影響を有し、それにより臨床的医療費を低くする。記載されている発明は、肺癌が存在または非存在である確率をさらに増加させるための費用効率の良い方法として、PETスキャンを補足するか、または置き換えられる。

【0083】

本発明は、治療的介入後の疾患再発を評価することにおいて有用である。大腸および前立腺癌に対する血液試験は、一般的に、マーカーレベルが処置成功または失敗の指標として追跡される場合、および、上昇するマーカーレベルが治療的介入に至る再発に対するさらなる診断評価の必要性を示す場合に、該能力において使用される。

【0084】

したがって、本明細書に記載されている本発明のアッセイは、処置の経過、処置の成功、再発、ケアなどをモニタリングするために、スクリーニング、処置の選択および処置中の継続使用のための重要な診断ツールである。アッセイの試薬、特定の一群のマーカーは

、特定の目的に適合するように操作することができる。例えば、スクリーニングアッセイにおいて、マーカーのより大きい一団または非常に一般的なマーカーの一団は、より多くの個体に対する予測力を最大化するために使用され得る。しかしながら、処置を受けている個体の文脈において、例えば、患者の特定の腫瘍型の特定のバイオマーカーフィンガープリントを得ることができ、スクリーニングのために使用されるバイオマーカーの全ておよび恐らくサブセットのみを必要としてもよく、または必要としなくてもよい。バイオマーカーの特定化されたサブセットは、患者における腫瘍の存在、および後の治療的介入をモニタリングするために使用することができる。

【0085】

本発明のアッセイおよびキットの成分は、配分および使用のための多くの異なるフォーマットにおいて構成することができる。例えば、1つ以上の抗体は、アリコートし、1つ以上の容器、例えば、ガラスバイアル、遠心チューブなどに保存することができる。抗体溶液は、当分野で知られている防腐剤、抗菌剤、安定剤などを含む適当なバッファーなどを含むことができる。抗体は、保存された形態、例えば、乾燥させた形態、フリーズドライ形態などであり得る。抗体は、特定のアッセイにおける使用のための適当な固相上に置くことができる。したがって、抗体は、培養プレートのウェルに置かれ、乾燥され、層状アッセイまたは側方フロー免疫測定法デバイスにおける膜上にスポットされ、マイクロアレイのためのスライドまたは他の支持体上にスポットされるなどされ得る。物(item)は、最大保存期間を保証するために当分野で知られているとおり、例えば、プラスチックフィルムラップまたは不透明なラップでパッケージし、箱に詰めることができる。アッセイコンテナは、容器(vessel)中に、ポジティブおよびネガティブコントロールサンプルをそれぞれ含むことができ、これは、サンプルが液体であるとき、ドロPPERを有する容器か、またはこれは、滴(drops)を分注することを可能にするキャップを有する容器、サンプル回収デバイス、他の液体輸送デバイス、検出試薬、現像試薬、例えば、銀染色試薬および酵素基質、酸/塩基溶液、水などを含む。使用のために適切な指示書を含んでもよい。

【0086】

例えば、ビーズベースのアッセイまたはキットを使用する他のフォーマットにおいて、複数の抗体を、患者サンプルに暴露されるように準備されたビーズの種々の集団(これは、次に単一の試薬中に混合することができる)に添付することができる。

【0087】

今回、本発明は、以下の非限定的な実施例において例示される。

【0088】

実施例

実施例 1

抗体マイクロアレイ

非小細胞性肺癌に対する候補バイオマーカーは、非腫瘍を有するマウスと比較して、肺腫瘍を発生する Gr g 1 を発現するマウスにおけるタンパク質レベルを測定するためにウェスタンブロットを使用して、Gr g 1 トランスジェニックマウスにおいて同定した。Gr g 1 トランスジェニックマウスにおいて変化されると同定されるタンパク質は、図 1 に示される。

【0089】

抗体マイクロアレイ実験の目的は、30個のヒト血清に対するカスタム抗体アレイを使用して、肺癌 対 コントロールサンプルにおける10個のヒトタンパク質の相対存在量を評価することである。

【0090】

スライドのスポットティングプロトコールおよびインキュベーション

1. スライドのスポットティング

スポットティングは、Quill Pins Microspot 2500を備えたMicrogrid II スポッターにより行った。スポット直径は150 μmである。スポッターは、4 にセットされた温度制御Bio bankによって、備えられている。

【0091】

使用されるスライドは、ニトロセルローススライド (Gentel PATH PLUS Protein Micro array slides) であった。

【0092】

抗体を、市販の保存バッファ中、14パッドにスポットするか、またはリン酸緩衝生理食塩水 (0.01 M、pH 7.4) で希釈した。それぞれの抗体に対して使用される希釈を最適化した (図2参照)。それぞれの抗体の3つの複製物を、1アレイあたりにスポットした。

【0093】

それぞれのパッドにおいてトリプリケートにてスポットされた4つの異なるコントロールが存在した (図3参照)。第1のPBS (リン酸緩衝生理食塩水) はネガティブコントロールである。第2の標識化BSA (0.05 mg/mlにおいてスポットされている) は、グリッド位置/ポジティブコントロールである。第3は、血清インキュベーションのポジティブコントロールである抗アルブミン抗体 (0.1 mg/mlにおいてスポットされている) である。最後のコントロールは、ネガティブコントロールである抗H1抗体 (0.5 mg/mlでスポットされている抗ヒストンH1) である。

10

【0094】

2. サンプルの標識化およびインキュベーション

血清サンプルは、肺癌患者ドナー由来のAsterand: Asterand Xpress B ANKTM ヒト血清およびヒト正常コントロール血清から得た。ヒト正常コントロール血清は、本明細書に記載されている参照サンプルに対応する。それぞれの患者の癌のステージは、腫瘍組織学にしたがって決定した。

20

【0095】

500 µlのそれぞれの血清 (1/10で希釈された) を、50 µlのSulfo-NHS-LC-ビオチン 40 mMで標識化した。混合物を、10分毎に短いボルテックスで室温で1時間インキュベートした。プロトコールは、最も良いシグナル/ノイズ比率を得るように最適化される。

【0096】

スライドを、震盪 (50 rpm) しながら2回2分洗浄し、室温で1時間、穏やかに震盪 (15 rpm) しながら5mlのPBS (0.01 M; pH = 7.4) Tween 0.1% カゼイン 1%でブロックした。

30

【0097】

70 µlのそれぞれのサンプルを、穏やかに震盪しながら室温で1時間、1/300 (PBS + Tween 0.05% + カゼイン 0.1%) とインキュベートした。次に、それぞれのウェルを、35 rpmで80 µlのPBS + Tween 0.05% カゼイン 0.1%で5回5分洗浄した。

【0098】

70 µlのストレプトアビジン AlexaFluor 647溶液を、穏やかに震盪 (15 rpm) しながら暗所において室温で1時間、それぞれのウェルにて1 µg/mlでインキュベートした。それぞれのウェルを、暗所において35 rpmで80 µlのPBS + Tween 0.05% カゼイン 0.1%で5回5分洗浄し、スライドを、暗所において35 rpmで5分間5mlのPBS + Tween 0.05% カゼイン 0.1%で2回洗浄した。最後に、スライドを蒸留水で濯ぎ、暗い無菌の場所で乾燥させ、スキャンする。

40

【0099】

イメージ分析

スライドを、Innoscan 700 蛍光 マイクロアレイスキャナー (Innoscan 700 - InnopsysTM) でスキャンした。スキャンパラメーターを最適化した。

【0100】

50

イメージを、ソフトウェア M a p i x (登録商標) (V e r s . 2 . 8 . 2) で処理した。検出グリッドおよびスポット同定を、対応するイメージに重ね合わせた。

【0101】

分析パラメーター

イメージ分析を支援するソフトウェアは、スポット検出パラメーター(スポット検出閾値、可変または不変スポット直径、異常検出)を構成することができる。M a p i x で該分析のために構成されたパラメーターは、図4に示される。例示的イメージを図5に示す。インキュベーションマップを図6に示す。

【0102】

検出グリッド位置をチェックし、異常の存在または謝ったスポット検出(ダスト検出、高いバックグラウンド)を検出するために、イメージをまた、視覚化した。いくつかのサンプルは2回インキュベートされている。最も良いイメージは、これらのサンプルのそれぞれに対して選択されている。

10

【0103】

品質管理

1. スポットイングコントロール

第1の品質管理は、視覚的に行った。分析に影響し得る異常は示されなかった。

【0104】

それぞれのグリッドは、位置決めポジティブコントロールスポット: 標識化 B S A (パッドあたり3スポット) および抗アルブミン抗体(パッドあたり3スポット)を含んだ。最後のスポットされた標識化 B S A スポットを、グリッド位置決めおよび全てのスポットがスポットされたコントロールのために使用した(図7)。抗アルブミン抗体は、マイクロアレイ上の血清インキュベーションコントロールである。予期されるとおり、該ポジティブコントロールは高い反応性を示した(図8)。

20

【0105】

ネガティブコントロールスポット: P B S および抗 - H 1 抗体もあった。P B S (グリッドあたり51)は、非特異的シグナルのチェックのために使用した。対応するシグナルは、およそバックグラウンドレベルであると予期された(図9)。抗 - H 1 抗体は、血清のインキュベーションのためのネガティブコントロールである。予期されるとおり、ネガティブコントロールは低い反応性を示した(図8)。

30

【0106】

2 インキュベーションコントロール

2つのアレイを、ストレプトアビジン A l e x a f l u o r 溶液のインキュベーションのみで得られた非特異的シグナルをチェックするために、患者サンプルの代わりにインキュベーションバッファーとインキュベートした。

【0107】

該コントロールで測定された全てのシグナルは、「R b h y p o」抗体を除けば、ほぼバックグラウンド(バックグラウンド近接カットオフの下)であった。該抗体において、得られたシグナルは、カットオフより高いが、サンプルをインキュベートしたとき、測定されたシグナルと比較して非常に低い(図10)。

40

【0108】

生のデータ処置

それぞれのスポットの強度を、スポットに含まれるピクセルの中央値から計算した。

【0109】

スポットに対して測定されるシグナルは、シグナルを増加させるローカルバックグラウンド(スポット周囲のエリアにおいて測定される)により影響される。したがって、ローカルバックグラウンドは、系統的に、シグナルから引き、正味のシグナルを得る。正味のシグナルは、スポットシグナル(弱いスポットシグナル)よりも少し高いバックグラウンドレベルによって、ネガティブであり得る。この場合、ネガティブ正味値(中央スポットシグナル - 中央ローカルバックグラウンドシグナル)を、値「10」: 修正値に置き換え

50

る。

【0110】

それぞれの抗体は、それぞれのアレイ上にトリプリケートにてスポットした。これは、再現間の値一致を立証するシグナル有効性をチェックすることができる。トリプリケートが $CV > 50\%$ を示すとき、計算された中央値は、表および対応する標準値においてアスタリスク（*）で強調されている。

【0111】

バックグラウンド付近のシグナルレベルを示すスポットは、バックグラウンド変化に対する重要な感受性を有する。したがって、バックグラウンド付近のデータの対の比較は、低いシグナルにもかかわらず良い比率をもたらし得る。これらの値を明白に同定するために、本発明者らは、以下のとおりに計算されるそれぞれのスポットに対してバックグラウンド近接カットオフを設定する：

ローカルバックグラウンドの（ピクセルの）平均 + 3SD

【0112】

1つの再現がカットオフ下でシグナルを示すとき、その正味のシグナル値を表においてカラット（^）で強調する。スポットの3つの再現のうち少なくとも2つがカットオフ下でシグナルを示すとき、タンパク質シグナルはバックグラウンド付近として考える。この場合、トリプリケートから計算された中央値は、スポットトリプリケート間の CV の値と関係なく、表においてハッチ記号（#）で強調される。ハイライトは、対応する標準値において報告される（実施例、図11）。

【0113】

分析および標準化

異なるサンプルおよびスライドで得られるシグナルの集団を比較するために、それぞれの集団の標準化が必要である。確かに、実験パラメーターは変化し得、タンパク質濃度は正確に同じではない。

【0114】

次に、強度の平均における標準化を選択した。標準化のための参照は、コントロールスポットを除けば、それぞれのサンプルに対する全てのスポット（正味のシグナル）の強度の平均を計算することにより計算した。

【0115】

次に、それぞれのタンパク質に対するシグナルを、以下のとおりに標準化した：

$$\text{標準化値 (VN)} = (\text{シグナル} - \text{Bkg}) \text{抗体} / \text{平均}(\text{シグナル} - \text{Bkg}) \text{アレイ} \times K$$

K：定常値（データ読み取り快適(comfort)に関する）= 10000

以下に記載される種々の分析は、これらの標準値で行う。

【0116】

比較コントロールグループ vs 肺癌グループ

2グループのサンプル：コントロールおよび肺癌が存在した。以下の比較をした：肺癌/コントロール（図12）。それぞれのグループは15サンプル含み、それぞれのグループの中央を計算した。比率（中央肺癌グループ）/（中央コントロールグループ）および Log_2 （比率）を標準値から計算した。

【0117】

グループにおける値の少なくとも半分が強調されるとき、グループの得られる中央値はまた、図12においてカラット（^）で強調される。

【0118】

サンプルのグループを比較するために、Mann & Whitney 試験も使用した。Mann & Whitney は、独立したサンプルに対して使用されるノンパラメトリック試験である。試験のためのヌル仮説は H_0 であり：集団中央は等しい。試験に対して選択された有意性のレベルは 5% （ < 0.05 ）であった。

【0119】

全ての抗体に対して得られた比率の値は、比較的弱い、Mann & Whitney

10

20

30

40

50

yの統計的試験は、2つの抗体：MDM2（図13）およびTLE1（図14）の単離を可能にした（仮説H0が拒絶される）。これらの2つの抗体について、タンパク質は、コントロールグループと比較して、肺癌グループにおいて過剰に発現される。

【0120】

結論

データ分析は、Mann & Whitney試験を使用して、2つの可能性のある特異的に発現されたタンパク質を明らかにした：MDM2およびTLE1。これらの2つのタンパク質は、コントロールグループと比較して、肺癌グループにおいて過剰に発現される。

【0121】

実施例2

薬物処置

バイオマーカーを、薬物処置の有効性を予測するために使用することができる。Grg1トランスジェニックマウスは、HDAC複合体と相互作用し、その機能を引き起こすGrg1（ヒトTLE1）タンパク質を過剰発現する。したがって、Grg1トランスジェニックマウスにおける肺腫瘍は、HDACインヒビターでの処置により阻害され得る。HDACインヒビター薬物は、多数の癌の処置において使用されるが、どの患者が応答するか明確でない。さらに、HDACインヒビターは深刻な副作用を有し、したがって、より特異的な活性を有するHDACインヒビターが開発されている。Grg1マウスモデルは、非小細胞性肺癌に対する有効性について新規HDACインヒビターを試験するための理想的な状況を提供する。

【0122】

トリコスタチンA（TSA）は、肺癌腫細胞系の増殖を阻害するヒストンデアセチラーゼインヒビターである。しかしながら、動物モデルにおいて肺癌の発症に対するTSAの効果は試験しなかった。本実施例において、TSAを、Grg1の過剰発現によって気管支肺胞上皮肺癌腫を発生するトランスジェニックマウスを処置するために使用した。TSA処置時に、肺腫瘍増殖がGrg1トランスジェニックマウスにおいて阻害されたことを発見した。TSA処置Grg1トランスジェニックマウスのグループにおいて、6つのうち1つのみが腫瘍を発症した。加えて、腫瘍血管形成もまた、TSAにより阻害された。これらの発見は、TSAが肺腫瘍増殖をインビボで有効に阻害することができ、ヒストンデアセチラーゼ活性の阻害が気管支肺胞上皮腺癌に関して治療的可能性を有することを示す。

【0123】

材料および方法

トランスジェニックマウスは、Grg1（マウスTLE1）のCre条件発現で作製した。導入遺伝子は、最初に、lacZレポーター遺伝子を発現する。Creリコンビナーゼが導入されたとき、loxP-側面lacZ遺伝子は切除され、導入遺伝子はGrg1および別のレポーター遺伝子、ヒト胎盤アルカリホスファターゼ（hPLAP）を発現する。Cre切除前および後の両方の導入遺伝子の広範な発現が証明され、Grg1過剰発現が肺腺癌の発症を引き起こすことを見出した。

【0124】

Cre切除前にlacZレポーターを発現するマウスは、Grg1^{lacZ}マウスと称し、Cre切除後にGrg1およびhPLAPを発現するマウスは、Grg1^{hPLAP}マウスと称する。該記載はGrg1を発現する（Grg1^{hPLAP}）マウスのみに関し、したがって、それらは、代替的に、Grg1^{hPLAP}マウスまたは単にGrg1トランスジェニックマウスと称する。

【0125】

129個のバックグラウンドにおけるGrg1トランスジェニックマウスを作製し、Allen, Tら “Grg1 Acts as a Lung-Specific Oncogene in a Transgenic Mouse Model”, Cancer Res, 66:3, 1294-1301(2006)に記載されているとおりに、アルカリホスファター

10

20

30

40

50

ゼ染色により遺伝子型を決定した。T S A (BIOMOL Research Laboratories, Plymouth Meeting, Pennsylvania)を、 $0.5 \text{ mg} / \text{kg}$ で $40 \mu\text{l}$ の 10% DMSO / PBS (Mishraら、2003)にて1月齢Gr g 1 h P L A Pマウスおよびコントロール同腹子に腹腔内に注射した。 $40 \mu\text{l}$ の 10% DMSO / PBSのコントロール溶液を、Gr g 1マウスおよびコントロール同腹子の他のグループに注射した。それぞれのグループは6匹のオスマウスからなり、注射を30日間続けた。3月後、マウスを殺し、肺を組織学的試験のために解剖した。左肺の下葉を 4% パラホルムアルデヒドで固定し、次に、葉全体を $100 \mu\text{m}$ 距離間隔で、 $5 \mu\text{m}$ の連続切片化のためにパラフィンに埋め込んだ。切片をH & Eで染色し、 $10\times$ 倍率で腺腫/癌腫増殖についてスクリーニングした。病変の数を記録し、統計的有意性をANOVAにより測定した。

10

【0126】

結果

5月齢時、Gr g 1を過剰発現するマウスは、連続切片上に見える腫瘍を発生した。T S A処置Gr g 1トランスジェニックマウスのグループは健常であり、組織学的切片は、腫瘍増殖において有意な減少を示した(図15)。6匹のGr g 1マウスのうち5匹が腫瘍を発生した未処置グループと比較して、6匹のT S A処置Gr g 1マウスのうち1匹のみが腫瘍を発生した。非トランスジェニック動物は、T S A処置有り、または無しで、腫瘍を発生しなかったか、または何ら明らかな表現型を示さなかった。

【0127】

H & E染色連続切片の試験は、Gr g 1を過剰発現するマウスにおいて発生した腫瘍が広範囲の増殖を示したことを示し、血管が腫瘍に成長していることが観察された。図16は、T S A処置後に腫瘍を発生した単一のマウス由来の病変を示す。病変は、同様の細胞形態を有したが、ずっと小さいサイズであった。血管は、病変周囲に観察されなかった。他の異常は、T S A処置Gr g 1トランスジェニックマウスおよび非トランスジェニックマウス由来の肺組織において観察されなかった。

20

【0128】

実施例3

腫瘍を処置するために使用することができるGROUCHOタンパク質

ベータ-カテニン/Tcf機能に関してGr g タンパク質に対する提案されたアンタゴニスト役割を考慮すると、Gr g タンパク質は、異常Wnt/ベータ-カテニンシグナル伝達により引き起こされる悪性腫瘍に対して腫瘍サプレッサー役割を果たし得る。しかしながら、Gr g 1の肺腫瘍表現型は、該仮説に矛盾する。さらに、該問題に取り組むために、Gr g 1およびGr g 5を過剰発現するマウスをAPC^{min}対立遺伝子を有するマウスと交配させた。APC^{min/+}マウスは、マウスAPC遺伝子の1コピーのコドン850における短縮型突然変異を有する。野生型APC対立遺伝子の喪失は、これらのマウスにおいて上昇したレベルのベータ-カテニンおよび腸腺腫の形成を引き起こす。本発明者らは、Gr g 1過剰発現が、APC^{min/+}モデルにおける腸ポリープの発生に対する有意な効果を有することを見出した。逆に、APC^{min}対立遺伝子の存在はまた、Gr g 1により誘導される肺腺腫の結果を有する。

30

【0129】

Gr g 1は、APC^{min/-}マウスにおける巨大腺腫の数を減少させる

C57BL/6Jバックグラウンドにおいて、APC^{min/+}マウスは4から6月の生存期間を有し、複数の腸腺腫を発生する。腺腫多様性および致死性は、修飾因子部座位の存在によって、非近交系バックグラウンドにおいて減少される。本発明者らは、C57BL/6J APC^{min/+}マウスをGr g 1およびGr g 5マウスと交配し、APC^{min}対立遺伝子を有し、Gr g 1またはGr g 5を過剰発現もするマウスを生産した。導入遺伝子挿入と関連する効果を排除するために、APC^{min/+}マウスも、Gr g 1^{lacZ}およびGr g 5^{lacZ}マウスと交配し、APC^{min}対立遺伝子および非切除導入遺伝子を有するマウスを生産した。これらの交配により生産されたマウスの非近交系バックグラウンドは、6月時点でのマウスの評価ならびにGr g 1関連肺腫瘍およびAP

40

50

C^{min}/+ 関連腸ポリープの同時試験を可能にした。本発明者らは、この時点は、Grg1を過剰発現するマウスにおける肺腺腫の定量に理想的であったことを見出した。

【0130】

マウスの小腸および大腸の全体を取り出し、腸ポリープの数およびサイズを測定した。図17は、試験されたそれぞれの遺伝子型を有するマウスにおける腸ポリープの平均数を示す。ポリープは、APC^{min}対立遺伝子を有さないGrg1 (n=6)またはGrg5 (n=5)マウスにおいて見出されなかった。APC^{min}/+マウスにおいて、平均49.9のポリープを発生し、同様に、コントロールGrg^{lacZ}/APC^{min}/+マウスにおいて、平均47.6のポリープであった。ポリープの総数は、Grg1またはGrg5過剰発現を有するGrg1/APC^{min}/+またはGrg5/APC^{min}/+マウスにおいて有意に変化しなかったが、APC^{min}マウスよりも少数のポリープである傾向があった。

10

【0131】

C57BL/6J APC^{min}/+マウスにおける致死性は、通常、1つ以上の腺腫の進行によって腸閉塞と関連する。したがって、腺腫のサイズは、疾患重症度の重要な決定因子である。本発明者らは、Grg1およびGrg5過剰発現の非存在または存在下でAPC^{min}/+マウスにおいて発生した腸ポリープのサイズを測定した。Grg1を過剰発現するAPC^{min}/+マウスにおいて見られた巨大腺腫 (>2mm)の数は、有意に減少した。Grg5/APC^{min}/+マウスは、大型腸腺腫の数における同様に強い減少を示さなかった。したがって、全長Grouchoタンパク質であるGrg1の過剰発現は、巨大腺腫の数を減少させた。Grg1/APC^{min}/+マウスの体重、小腸の長さおよび大腸の長さは、試験された他のグループと比較して有意に異ならなかった。

20

【0132】

肺腫瘍組織量は、APC^{min}対立遺伝子を有するGrg1マウスにおいて低下する

Grg1マウスは、180日で胸膜表面上に見える8.3+/-6.0 (n=28)肺病変を発生する。C57BL/6Jバックグラウンドへの1世代の交配は、肺腺腫数における有意な変化を生じず、Grg1誘導表現型に対する株特異的効果がなかったことを示す(図17、列5; 7.4+/-3.1 表面に見える腺腫)。しかしながら、APC^{min}対立遺伝子の存在は、胸膜表面上および肺連続切片中に見ることができる病変の数を劇的に減少させた(図17、列5、7)。一般的に、Grg1マウスにおける腺腫は、Grg1/APC^{min}/+マウスにおいて見られるものよりも大きい。高い倍率での腺腫の試験は、2つの遺伝子型間で細胞形態において見える違いは示さなかった。したがって、APC^{min}対立遺伝子は、Grg1による肺腺腫の誘導を完全に破壊しないが、肺腫瘍組織量を有意に減少させた。

30

【0133】

材料および方法

マウス系および遺伝子型決定

APC^{min}/+マウスを生産し、The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) から得られたストックからのC57BL/6Jバックグラウンド上に維持した。iZ/AP-Grg1 (2F12系) およびiZ/AP-Grg5 (H2系) マウスは、Allen, Tら “Grg1 Acts as a Lung-Specific Oncogene in a Transgenic Mouse Model”, Cancer Res, 66:3, 1294-1301(2006)に記載されている。非切除導入遺伝子を有するマウスは、Grg1^{lacZ}およびGrg5^{lacZ}と称する。全体的に切除されたiZ/AP-Grg導入遺伝子を有するマウスは、Grg1またはGrg5と称する。APC^{min}対立遺伝子およびiZ/AP-Grg導入遺伝子を有するマウスを作製するために、C57BL/6J、APC^{min}/+マウスを、非切除(Grg^{lacZ})または切除(Grg)導入遺伝子のいずれかを有するF2およびF3世代iZ/AP-Grgトランスジェニックマウスと交配した。APC^{min}対立遺伝子に対する遺伝子型決定は、ietrich, W.ら “Genetic identification of Mom-1, a major modifier locus affecting Min-induced intestinal neoplasia in the mouse”, Cell, 75:4, 63

40

50

1-639 (1993)に記載されているプライマーおよび条件を使用する競合PCRにより行った。Gr g 1およびGr g 5導入遺伝子の存在について、マウスを、耳パンチ組織のlac ZまたはhPLAP染色のいずれかにより遺伝子型同定した。

【0134】

腸ポリープおよび肺腺腫の定量

動物を約6月齢で殺した。小腸および大腸を、それぞれのマウスから全体にて取り出し、PBSでそれらの内容物を流した。腸を、4%パラホルムアルデヒド/PBSで一晩で固定した。次の日、腸をPBSで洗浄し、70%エタノール(v/v)に保存した。試験において、固定された腸を、縦方向に開き、ペトリ皿中の硬化3%アガロースの層以下に内腔側をピンで留めた。解剖顕微鏡(20-40X)およびキャリバーの使用で、ポリープ数およびサイズの両方を、小腸および大腸全体に対してスコア化した。ポリープサイズを、それぞれのポリープの最大直径を測定することにより決定した。わずか0.3mmの直径の腸ポリープを、この様式においてスコア化することができた。同じマウス由来の肺を、解剖顕微鏡(10X)を使用して、胸膜表面上の腫瘍について試験した。パラフィンに埋め込まれた肺の連続切片を、胸膜表面上に見えない腫瘍について検査を行った。5μm切片を、左葉中100μm間隔で切った。切片をヘマトキシリンおよびエオシンで染色し、100X倍率で微小腺腫について視覚的にスキャンした。隣接切片上に存在するほど十分な大きさの腺腫は、2回カウントしなかった。10個の連続切片を、マウスあたりでスコア化した。

【0135】

統計分析

分散分析(ANOVA)を、ポリープ多様性、小腸の長さ、大腸の長さおよび重さにおける有意な変化について試験するために行った。Dunn's試験の後にノンパラメトリッククラスカル・ウォリス検定を、ポリープサイズにおける有意な差異について評価するために使用した。胸膜表面または肺連続切片における腫瘍数の変化の統計的有意性を、Mann-Whitney試験を使用して分析した。

【0136】

ウェスタンブロットティング

全組織タンパク質抽出物を、150mMのNaCl、25%グリセロール、0.2mMのEDTA、20mMのHepes pH7.8、0.5mMのDTT、0.5mMのPMSF、0.5mg/mlのロイペプチン、0.7mg/mlのペプスタチン、2mg/mlのアプロチニンの冷溶解バッファーを使用して、新たに解剖された組織から作製した。組織を音波処理し、破片を簡単な遠心分離により除去した。上清を新たなチューブに移し、-80で即座に冷凍した。タンパク質濃度を、Bradford方法(Bio-Rad)を使用して測定した。ウェスタンブロット分析において、100μgの溶解物を10%ポリアクリルアミドゲル上に流し、PVDF膜に移した。ブロッキングを、10mMのTris HCl pH8.0、150mMのNaCl、0.1%Tween(TBST)中の10%スキムミルク粉末にて一晩で行った。一次および二次抗体の結合は、5%スキムミルク粉末TBST中であった。Gr g 5に対するウサギポリクローナル血清を、C-末端18アミノ酸ペプチドを使用して作製した。主な市販の抗体は、-TLE1ウサギポリクローナル血清M-101(Santa Cruz Biotechnology)(Husainら1996)、マウスモノクローナル-ベータ-ガラクトシダーゼ(Promega)、マウスモノクローナル-ベータ-アクチンAC-15(Sigma)、-ベータ-カテニンH-102ウサギポリクローナル血清(Santa Cruz Biotechnology)、マウスモノクローナル-アクティブベータ-カテニン(-ABC)8E7(Upstate)、および-ホスホ-ベータ-カテニン(Ser-33、37、Thr-41)ウサギ抗血清(Cell Signaling)であった。HRP結合二次抗体は、Santa Cruz Biotechnologyから購入した。

【0137】

免疫染色

脱パラフィン化、再水和および抗原回復後、切片を、-Gr g 3/TLE2ウサギポ

10

20

30

40

50

リクローナル血清 (Santa Cruz Biotechnology)、
 - G r g 1 / T L E 1 ウサギポリク
 ローナル血清、
 - ベータ - カテニンウサギポリクローナル血清、
 - A B C マウスモノ
 クローナル抗体または
 - ホスホ - ベータ - カテニン (S e r - 3 3、3 7、T h r - 4
 1) ウサギ抗血清とインキュベートした。次に、切片を、
 ビオチン化二次抗体、アビジン
 - ビオチン複合体および D A B (Vector Laboratories Inc.) とインキュベートした。切
 片を、ヘマトキシリンで対比染色した。免疫蛍光において、ヤギ
 - マウステトラメチル
 ローダミン結合二次抗体 (Molecular Probes) を使用した。

【 0 1 3 8 】

組織化学的染色

固定、ならびに組織および凍結切片の染色は、対比染色は l a c Z または h P L A P 染
 色凍結切片において使用しなかったことを除いて、Lobe C ら “Z/AP, a double reporter
 for Cre-mediated Recombination”, Dev. Biol. 208:2 281-292 に本質的に記載されて
 いた。

10

【 0 1 3 9 】

配列表

配列番号：1

ヒト T L E 1 タンパク質

【表 2】

| | | | | | |
|--------------|------------|------------|------------|-------------|----|
| mfpqsrhptp | hqaagqpfkf | tipesldrik | eefqflgagy | hslkleceki | |
| asektemgrh | yvmyyemsg | lniemhkgte | iakrlntica | qvipflsqeh | 20 |
| qqqvaqaver | akqvtmaeln | aiigqqqlga | ghlshghgpp | vpltpgpsgl | |
| qppgippigg | sagllalssa | lsggshlaik | ddkkhhdaeh | hrdrepigtsn | |
| sllvpdsirg | tdkrrngpef | sndikkrkvd | dkdsshysd | gdksddnlvv | |
| dvsnedpssp | raspahspre | ngidknrlk | kdassspast | assasstslk | |
| skemslheka | stpvksstp | tprsdmptpg | tsatpglrpg | lgkppaidpl | |
| vnqaaaglrt | plavpgppya | pfgmvphagm | ngeltspgaa | yaslhnmispq | |
| msaaaaaaaaav | vaygrspmvv | fdppphmrpv | tippnlagip | ggkpaysfhv | |
| tadgqmcpvp | fppdaligpg | iprhargint | lnhgevvcav | tisnptrhvy | |
| tggkgcvkvw | dishpgnksp | vsqldclnrd | nyirsckllp | dgctlivgge | 30 |
| astlsiwdla | aptprikael | tssapacyal | aispdkvcf | sccsdgniav | |
| wdlhnqtlvr | qfqqhtdgas | cidisndgtk | lwtggldntv | rswdlregrq | |
| lqqhdftsqi | fslgycptge | wlavgmessn | vevlhvknkp | kyqlhlhesc | |
| vlslkfaycg | kfwfstgkdn | llnawrtpyg | asifqskess | svlscdisvd | |
| dkiyvtgsgd | kkatvyeviy | | | | |

【 0 1 4 0 】

配列番号：2

ヒト T L E 2 タンパク質

【表 3】

| | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|
| mypqgrhptp | lqsgqpfkfs | ileicdrike | efqflqaqyh | sklecekla |
| sektemqrhy | vmyyemsgl | niemhkqaei | vkrlsgicaq | iipfltgehq |
| qgvlqavera | kqvtvgelns | ligqqlqpls | hhappvpltp | rpaglvggsa |
| tglallsgal | aaqaqlaaav | kedragveae | gsrverapsr | saspsppesl |
| veeerpspgg | gggkqradek | epsgpyesde | dksdynlvvd | edqpseppsp |
| attpcgkvpi | ciparrdlvd | spaslasslg | splprakeli | lndlpastpa |
| skscdssppq | dastpgpssa | shlcqlaakp | apstdsvalr | spltlsspft |
| tsfslgshst | lngdlsvpss | yvslhlspqv | sssvvygrsp | vmafeshphl |
| rgssvssslp | sipggkpays | fhsvsadgqm | pvpfpdaldv | gagiprharq |
| lhtlahgevv | cavtisgstq | hvytgqgkcv | kwvdvqppga | ktpvaqldcl |
| nrdnyirsck | llpdgrsliv | ggeastlsiw | dlaaptprik | aeltssapac |
| yalavspdak | vcfscsdgn | ivvwldlnqt | mvrqfqqhtd | gascidisd |
| gtrlwtggld | ntvrcwdlre | grqlqghdfs | sqifslghcp | nqdwlavgme |
| ssnveilhvr | kpekyqlhlh | escvlslkfa | scgrwfvstg | kdnllnawrt |
| pygasifqsk | esssvlscdi | srnnkyivtg | sgdkkatvye | vvy |

10

【 0 1 4 1 】

配列番号：3

20

ヒト T L E 3 タンパク質

【表 4】

| | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|
| mypqgrhpap | hqpgqpgfkf | tvaescdrik | defqflqaqy | hslkveydkl |
| anektemqrh | yvmyyemsg | lniemhkqte | iakrlntila | qimpflsqeh |
| qqqvaqaver | akqvtmteln | aiigqqqlqa | qhlshathgp | pvqlpphpsg |
| lqppgippvt | gsssgllalg | algsqahltv | kdeknheld | hreressann |
| svspseslra | sekhrgsady | smeakkrkae | ekdlsryds | dgdkssddl |
| dvsnedpatp | rvspahsppe | ngldkarslk | kdaptspasv | asssstpssk |
| tkdlghndks | stpglkentp | tprndaptpg | tsttpqlrsm | pgkppgmdpi |
| gimasalrtp | isitssyaap | fammshhemn | gsltspgaya | glhnippqms |
| aaaaaaaaay | grspmvqfdp | hppmratglp | sslasipggk | paysfhvsad |
| gqmqpvppfh | dalagpgipr | harqintlsh | gevvcavtis | nptrhvvtgg |
| kgcvkiwdis | qpgskspisq | ldclnrdnyi | rsckllpdgr | tlivggeast |
| ltiwldaspt | prikaeltss | apacyalais | pdakvcfsc | sdgniavwdl |
| hnqtlvrqfq | ghtdgascid | ishdgtklwt | gglndtvrs | dlregrqlqg |
| hdftsqifsl | gycptgewla | vgmessnvev | lhhtkpdkyq | lhlhescvls |
| lkfaycgkwf | vstgkdnlln | awrtpygasi | fqskeessvl | scdisaddky |
| ivtgsgdkka | tvyeviy | | | |

30

40

【 0 1 4 2 】

配列番号：4

ヒト T L E 4 タンパク質

【表 5】

mirdlskmyp qtrhpaphqp aqpfkftise scdrikeefq flqaqyhslk
 leceklasek temqrhyvmy yemsglnie mhkqaeivkr lnaicaqvip
 flsqehqqqv vqaverakqv tmaelnaiig qqlqaghls ghglpvpltp
 hpsglqppai ppigssagll alssalggqs hlpikdekkh hdndhqrvsp
 sasfrgaekh rnsadysses kkqkteekei aarydsdgek sddnlvvdvs
 nedpssprgs pahsprengl dktrllkkda pispasiass sstpsskske
 lslneksttp vksntptpr tdaptpgsns tpglrpvpgk ppgvdplass 10
 lrtpmavpcp yptpfgivph agmngeltsp gaayaglhni spqmsaaaa
 aaaaaaygrs pvvgfdphhh mrvpaippnl tgipggkpay sfhvsadgqm
 qpvpfpddal igpgiprhar qintlnhgev vcavtisnpt rhvytgkgc
 vkvwdishpg nkspvsqldc lnrdnyirsc rllpdgrtli vggeastlsi
 wdlaaptpri kaeltssapa cyalaispds kvcfscsdg niavwdlhng
 tlvrqfqqht dgascidism dgtklwtggl dntvrswdlr egrqlqghdf
 tsqifslgyc ptgewlavgm ensnevhlv tkpdkyqlhl hescvlslkf
 ahcgkwfvst gkdllnawr tpygasifqs kesssvlscd isvddkyivt 20
 gsgdkkatvy eviy

【0143】

配列番号：5

ヒト T L E 5 タンパク質

【表 6】

mchknqfpqe ggitaafllqk rklrlsknhr parakvtehv rgtrpgrata
 gpaastraag slffdrwgnr gpagcrgssh lpqqlkftts dscdrikdef
 qllqaqyhsll klecdklase ksemqrhyvm yyemsglni emhkqaeivk 30
 rlngicaqvl pylsqehqqq vlgaierakq vtapelnsii rqqqlqahqls
 qlqalalplt plpvglqpps lpavsagtgl lsalsalgsqa hlskedkngh
 dgdthqeddg eksd

【0144】

配列番号：6

ヒト T L E 1 コード配列

【表 7】

atgttcccgcagagccggcaccggacggcaccaggctgcaggccagccctcaagttcactatcccggagtccttgaccgg
 attaaagggaattccagttcctgcaggcgcagiatcacagcctaaattggaatgtgagaaactggcaagtgaaaagacagaaat
 gcagaggcactatgtgatgtattatgaaatgtcatatggattaacaatgaaatgcacaaacagactgaaatgccaaagagattgaat
 acgatttgtgcacaagtcaicccatttctgtctcagggaacatcaacaacagggtggcccaggctgttgaacgtgccaaacaggtgacc
 atggcagagttgaatgccatcatcgggcaagcagcagttgcaagctcagcatcttctcatggccacggacccccagttccccttacg
 cctcacccttcgggacttcagcctcctggaatcccgcctcgggggcagtgccggccttcttgcgtgtctagtgtctgagtgagg
 cagttctacttgcaataaaagatgacaagaagcaccacgatgcagagcaccacagagacagagagccgggacaaagtaattcc
 ctctggtcaccagacagtciaagaggcacagataaacgcagaaatggacctgaatttccaatgacatcaagaaaagggaagggtgg
 atgataaggactccagccactatgacagtgatggtgacaaaagcgaatgacaacttagttgtggatgtgtctaataaggacccttctct
 ccgcgagcaagccctgccactogccccgggaaaatggaatgcacaaaatcgccgtctaaagaaggatgcttctagcagttca
 gcttccacggcctcctcggcaagttccacttcttgaatcacaagaaatgagcttgcataaaaaagccagcacgcctgttctgaat
 ccagcacaccaacgcctcgggagcgaatgccaacgcgggaccagcgcactccaggcctcctcaggtctcggcaagcct
 ccagccatagacccctcgttaaccaagcggcagctggttggaggacaccctggcagtgcccggcccatactctgctcttttgg
 gatggtccccacgctggcatgaacggcgagctgaccagcccaggcgtgcctacgccagttacacaacatgtcggcccagat
 gagcggcgcagccgcggcggcggcgtggtggcctacgggcgtccccatgggtggggttggatcctcccctcacatgagagt
 acctaccattctccaaacctggcaggaatccctgggggaaacctgcatactcctccacgttactgcagacggtcagatgcagc
 ctgtcccttttccccgcagccctcatcgaccccgaatccccggcatgctcggcagatcaacacctcaaccacggggaggt
 ggtgtgcgtgtgaccatcagcaaccccacgagacacgtgtacacaggcggggaagggtcgtcaaggtctgggacatcagcc
 accctggcaataagagccctgtctcccagctcgaatgtctgaacagagacaattatccgttccctgtaaattgctaccgatggtg
 cactctcatagtgggaggggaagccagtaacttctccatttgggacctggcggctccaacccccgcgatcaaggcgggagctgacg
 tccctggccccgcctgtacgccttgccatcagccccgattccaaggtctgcttctcatgtcgcagcgacggcaacatcgtgtg
 tgggatctgcacaaccagacactagtggaggcaattccaggggccacacagacggagccagctgtattgacatttctaagatggcac
 caagctctggacgggtgttggacaacacagtcaggctcctgggacctgcgcgagggggcggcagctgcagcagcacgacttcac
 ctcccagatcttctccctggggtactgccccaccggggagtggtggcagtgggcatggagagcagcaatgtggaggtgctgcac
 gtgaacaagcctgacaagtagcagctgcacctgcatgagagctgcgtgtctccctgaaattgcttactgtgtaaatggtttgtga
 gtactggaaaagataacctctcaatgcttggcggacccccatggagccagcatattccagttccaaagagtcctctgtagtctta
 gctgtgacatctctgtggatgafaagtaacatagtcactggctcgggggacaagaaggctacagctctatgaagtcatctactga

10

20

【 0 1 4 5 】

配列番号：7

ヒト T L E 2 コード配列

30

【表 8】

atgtacccccagggaaggcaccggacccccgtccagtcggccagccctcaagttctc gatcttggagatctgcgaccgcatcaa
agaagaattccagttctcaggctcaataccacagcccaagctagaatgtgagaagctggccagcggagaagacggaaatgcag
cgacaitatgfcaltgtattatgagatgicgtacgggctcaacatfgaaatgcataagcaggcggagattgtgaagcgtctgagcggta
ctgctgctcagattatccccctcctgaccaggagcatcagcagcaggtgctccaggccgtagaacgcgccaaagcagggtcac cgt
gggggagctgaacagccctcatcgggcagcagctccagccgtgtcccaccacgcacccccctgtgcccctcaccccccgccag
ccgggctgggtgggcccagtgctacgggctgctgctgctgctggagccctggctgcccaggctcagctggcggcggctgtca
aggaggaccgtgcgggcgtggagggccgaggggtccagagtgagagagcccccagcaggagtgatctcctcgcgccctga
gagctcgtggagggagcagcaccgagtgccctgggtggcgggaagcagagagcagatgagaaggagccatcaggacct
tatgaaagcgacgaagacaagagtgattacaatctgggggggagcaggaccaccctcagagccccccagccggctaccacc
ccctgcggaaaggtaccatctgcatctcctgcccgtcgggacctggtggacagtcagcctccttgcccctctagccctggctcaccg
ctgcctlagagccaaggagctcatcctgaatgacctcctccagcactcctgcccctcaaatcctgtgactcctccccgccccagga
cgttccacccccgggcccagctcggccagtcacctctgcccagcttctgctccaaagccagcaccctccacggacagcgtcgcctg
aggagccccctgactctgtccagctccctcaccacgtcctcagccctgggctcccacagcactctcaacggagacctctcctgccc
agctcctacgtcagcctccacctgtccccccaggtcagcagctctgtggtgtacggagcctccccgtgatggcatttgatctc atc
cccctcctcggagggtcatcctctctcctcctcctaccagcatccctgggggaaagccggcctactcctccacgtgctcgggagc
ggcagatgcagccgggttccctcctcctggatgcactggtagggcggggcatcccgcggcacgccccggcagctgcacacgctg
gcccattggcgaggtggctcgcgggtcaccatcagcggctccacacagcatgtgtacacgggcggcaagggctgtgtgaagggtg
tgggacgtgggcccagcctggggccaagacgcccgtggcccagctcagctgcccgaaccgagacaactacattcgttctgcaag
ttgctgccggatggccggagctgaltctgtgggcgggtgaggccagcacctgtccattgggacctggcggcggccccccccgta
lcaaggccgagctgacttctcagccccagcctgctacgccctggcggctcagccccagcggccaaggttggcttctcctgctgcagc
gatggcaacattgtggctgggacctgcagaatcagactatggtcaggcagttccagggccacacggagcggcggccagctgcaattg
atattccgattacggcactcggctctggacagggggcctggacaacacgggtgcgctgctgggacctgcccggaggggccgccagc
tgcagcagcatgacttccagctcccagatttctcctgggcccactgcccctaaccaggactggctggcgggtcggaaatggagagtagc
aacgtggagatcctgcacgtccgcaagccggagaaataccagctgcacctccacgagagctgcgtgctgtccctgaagtttgctc
ctcgggacgggtgtttgtgagcaccgggaaggacaacctgctcaacgcctggaggacgcccgtacggggccagcatttccagtc
caaggagtcgtcctcagctcctgagttgtgacatctccagaaataacaaatacctgtgacaggctcgggggacaagaaaggccacc
gtgtatgagggtggtctactga

10

20

【 0 1 4 6 】

配列番号： 8

ヒト T L E 3 コード配列

30

【表 9】

atgtatccgcagggcagacatccggctccccatcaaccgggcagccgggatttaaattcacgggtggctgagtctgtgacaggat
 caaagacgaattccagttccctgcaagctcagtatcacagcctcaagtggagtacgacaagctggcaaacgagaagacggagatg
 cagcggccattatgtagtactatgagatgtcctatggcttgaacattgaaatgcacaagcagacagagattgcgaagagactgaa
 acaatttagcacagatcatgcttctctgacaaagagcaccagcagcaggggcgcaggcagtgaggcggccaagcagggtca
 ccatgacggagctgaacgccatcatcgggcagcagcagctccaggcgcagcacctctcccatgccacacacggcccccggtc
 cagttgccaccccaccggctcaggtctccagcctccaggaatccccccagtgacagggagcagctccgggctgctggcactgggc
 gccctgggcagccagggccatctgacgggtgaaggatgagaagaaccacatgaactc gatcacagagagagagaatccagtgc
 gaataactctgtgacacctcggaaagcctccggggcagtgagaagcaccggggctctgaggactacagcatggaagccaagaa
 gcggaaaggtggaggagaaggacagcttgagccgatacagcagtgatggagacaagatgatgatctggtggtgagttccaat
 gaggaaccccgaacgccccgggtcagccccggcacactccccctctgaaaatgggctggacaaggccccgtagcctgaaaaaga
 tccccaccagcctgctcgggtggcctctccagtagcacacctctccaagacaaaagaccttggctataacgacaaatcctc
 caccctgggctcaagtcacaacaccaacccccaaaggaacgacgccccaaactccaggcaccagcagcaccagggtcaggat
 cgatgccgggtgaaacctccgggcatggaccgataggtataatggcctcggctctgcgcacgcccatctccatcaccagctcctat
 gcggcgccctcggccatgatgagccaccatgagatgaacggctccccaccagctctggcgccctacgccggcctccacaacatcc
 caccacagatgagcggccgccggcctgctgacggcctgatggccatcggcaatggtgagctttggagctgtgtgtttgac
 cctcacccccgatggggccacaggcctcccccaagcctggcctccattcctggaggaaaaccagcgtactcattccatgtgag
 tctgatgggcagatgacggccgtgcccctccccacgacgcccctggcaggccccggcatccgaggcacgcccggcagatca
 acacactcagccacgggggggtgtgtgcccgtgaccatcagcaaccccagcaggcacgtctacacaggtggcaagggctgc
 gtgaagatctgggacatcagccagccaggcagcaagagccccatctccagctggactgacctgaacagggaacaattacatgccc
 tctgcaagctgcacctgagggcgcacgctcatcgtggcgaggaggcagcacgctcaccatctgggacctggcctcggcc
 acgccccgatcaaggccgagctgacgtcctcggcctcccgctgtatgcccggccattagccctgacgccaaagtctgctctcc
 tctgacagcgaagggaacatgctgtctgggacctgcacaaccagacctggctcaggcagttccagggccacacagatggggcc
 agctgcatagacatctcccatgatggcaccaaaactgtggacagggggcctggacaacacgggtgcgctcctgggacctgcccggag
 ggccgacagctacagcagcatgacttccctccagatctctcgtgggctactgcccactggggagtggctggctgtggccat
 ggagagcagcaacgtggaggtgctgcaccacaccaagcctcacaagtaccagctgcaacctgcacgagagctgctgctctccct
 caagctgctactcgggcaagtggtcgtgagcactgggaaagataaccttctcaacgccggaggacgccctatggagccagca
 tateccagctaaagaatcctcgtctgtctgagttgtgacattcagcggatgacaaatacattgtaacaggctctggtgacaagaag
 gccacagtttatgaggtcatctactaa

10

20

【 0 1 4 7 】

30

配列番号：9
ヒト T L E 4 コード配列

【表 1 0】

atgattcgcgacctgagcaagatgtacccgcagaccagacacccggcaccgcatcagcctgctcaaccctttaaattfacaattcc
 gaatcctgtgatcggattaaggaagagtftcagttttacaggctcaataccacagtctgaagctggaatgtgagaaactcggcagtg
 agaagacagagatgcagcggcaltatgtcatgtattalgaatgtcclatgggtgaatatagaaatgcacaagcaggcagagattgt
 caagaggctgaatgctatctgtgcacaagtcattccttccctgcccagagcaccagcaacaagtgggtgaggctgtggaacggg
 ccaagcagggtgaccalggcagaactgaacgccatcattgggcaacaactccaggcccagcatttatcatalggacatggtctccc
 gtacctgtactccacacccctcagggtccagcccctgccattccacccatcggtagcagtgccgggcttctggccctccagt
 gctctaggaggtcagtcctcctccaataaagatgagaagaagcaccatgacaatgatcaccaagagacagagactccatcaa
 gagctctcagtatccccatcagccagttccgaggtgctgagaaagcagaaactccgcagactactcctcagagagcaaaaagc
 agaaaactgaagaaaaggaaattgcagctcgttatgacagcgatggfgagaaaagtgatgacaacttgggtggtgacgttccaatg
 aggatccatctcccctcaggggagcccagcacattccccagagagaatggcctagacaagacacgcctgctcaagaaagatg
 ccccgatlagtccagcctcattgtcattccagcagctaccctctccaaatccaaagaacttagccttaagaaaaatctactactc
 ccgtctcaaagtcfaatccctactccacgaactgatgcccaccccaggcagtaactctactcccggattgaggcctgtacctg
 gaaaaccaccaggaggtgacctttggcctcaagcctaaggaccccattggcagcttctgccaatccaactccattgggattgt
 gccccatgctggaalgaacgggagagctgaccagccccgggagcggcctacgctgggtccacaacatctcccctcagatgagcgc
 agctgtgcccggcggctgctgctgctgctatgggagatcaccagtgggtgggattgatccacaccatcacatgctgtgcccag
 caatacctccaaacctgacaggcattccaggaggaaaaccagcatactcttccatgttagcgcagatgggtcagatgacgcctgtcc
 ctttccaccggacgccctcctcggacctggaatccccggcagctgctgcccagatcaacacccctcaaccacggggaggtggtgtg
 cggggtgaccatcagcaaccccacgagacacgtgtacacgggtgggaagggtcgtcgaaggctgggacatcagccaccag
 gcaataagagtctgtctcccagctcgaactgttgaacagggaactacatccgttctcagattgtcctctgatggtcgcaccct
 aatigtggagggggaagccagtactttgtccattgggacctggcggctccaaccccacgcatcaaggcagagctgacatccctgg
 cccccgctgctatgcccgtgccatcagccccgatccaaggctcgtctcatgctgagcagcggcaacatcgtgtgtgggac
 tgcacaaccagaccttggtagggcaatccaggggccacacagatggagccagctgtattgacattictaalgatggcaccaaagctct
 ggacaggtggtttgacaacacggctcaggtcctgggacctgcccggaggggcgagctgcagcagcagcacttccactccag
 atctttctctgggctactcccactggagagtggcttgcagtggggatggagaacgaatgtggaagtttgcattgacccaagc
 cagacaataccaactacatctcatgagagctgtgtgctgctgctcaagttgccattgtggcaaatggttgtaagcactggaaag
 gacaaccttctgaatgctggagaacaccttalggggccaatattccagtcacaagaatctcctcctgggtgcttagctgtgacatctc
 cgtggacgacaaatacatgtcactggctctggggalaagaaggccacagttatgaagttattat

10
20

【 0 1 4 8】

30

配列番号：10
 ヒト T L E 5 コード配列
 【表 1 1】

atgtgtcacaagaatggcttccctcaggaaggcggcattaccgctgcttctcgcagaaaaggaaactaaggctcagcaagaacca
 ccgcccagccagagccaaggtcacagagcacgtccgtggcacgcgtccaggtcgtgccacagcaggggcggcggcttcgacg
 cgggcagccgggtccctttcttgacagatggggaaaccgaggcccggcggctgcccggggctcctcgcacctaccocagcaa
 ctcaaattcaccactcggactctgacgaccgcatcaaagacgaatttcagctactgcaagctcagtagccacagcctcaagctcga
 tgtgacaagttggccagtgagaagtgcagagatgcagcgtcactatgtgatgtactacgagatgtcctacggcttgaacatcgagatg
 cacaacaggctgagatcgtcaaaaggctgaacgggatttgtcccaggctcctgacctctcccaagagcaccagcagcagg
 tcttgggagccattgagaggccaagcaggtcaccgctcccagctgaactctatcctccgacagcagctccaagcccaccagct
 gtcccagctgcaggccctggccctgcccttgacccccactaccctgtggggtgcagccgcttctgctgcccggggtcagcgcagg
 caccggcctcctctgctgctcgcgtgggttcccaggcccactctccaaggaagacaagaacggggcacgatgggtgacacca
 ccaggaggatgatggcgagaagtcgggattag

40

【 0 1 4 9】

配列番号：11
 マウス G r g 1 タンパク質

【表 1 2】

mfpqsrhptp hqaagqpfkf tipesldrik eefqflqaqy hsklecekl
 asektemqrh yvmyyemsg lnienhkgte iakrlntica qvipflsgeh
 qggvaqaver akqvtmaeln aiigvrglpg lpptqqqlqa qhlshghgpp
 vpltpphpsgl qppgippigg sasllalssa lsggshlaik ddkkhdaer
 hrdrepqtsn sllvpdsirg tdkrrngpef ssdikkrkvd dkdnydsdgd
 ksddnlvvdv snedpsspha spthspreng idknrlkkd asgspastas
 sgsssslsk evslhekant pvksstptp rsdmpptpgts atpglrpglg 10
 kppameplvn qaaaglrtpl avpgypapf gmvphagmng eltspgaaya
 glhsmspqms aaaaaaaaaav vaygrspmvf fdppphmrpv sippnlagip
 ggkpaysfhv tadgqmqpvp fppdaligpg iprhargint lnhgevvca
 tispnrhvvy tggkgcvkwv dishpgnksp vsqldclnrd nyirsckllp
 dgctlivgge astlsiwla aptprikael tssapacyal aispdskvcf
 scsddgnia wdlhnqtlvr qfggtdgas cidisndgtk lwtggldntv
 rswdlregrq lqqhdftsqi fslgycptge wlvagmessn vevlhvknkp
 kyqlhlhesc vlskfcygc kwfvstgkdn llawrtpyg asifqskess 20
 svlsdisvd dkyivtgsgd kkatvyeviy

【0 1 5 0】

配列番号：1 2

マウス Gr g 2 タンパク質

【表 1 3】

myppqsrhptp lqsgqpfkfs vleicdrike eefqflqaqyh sklecekla
 sektemqrhy vmaaphqcpq ggtsyphwpr lsplqyyems yglniemhkq
 aeivkrllsai cagmvpfltq ehqqqvlqav drakqvtvge lnsllqqgnq 30
 lqplshappv pltprpaglv gagatgllal sgalaagaql vaavkedrvg
 vdaegsrvdr aasrssspsp peslveedhp ssrggsgkqg raedkdlsqp
 ydseedksdy nlvdedqps eppspvttpc gkaplcipar rdltdspasl
 asslgsplpr skdialndlp tgtpasrscg tsppqdsstp gpssashlqg
 laagpaapt d sialrspltl sspftssfs l gshstlngdl smpgsyvgh
 lspqvsssvv ygrsplqmaf eshphlrgss vsllpgipvak paysfhvsad
 ggmqpvpfps dalvgtgipr harqlhtlah gevvcavtis sstqhvytgg
 kgcvkwdvg qpgsktpvaq ldclnrdnyi rsckllpdgq slivggeast 40
 lsiwdlaapt prikaeltss apacyalavs pdakvcfsc sdgnivvwdl
 qnqamvrqfq ghtdgascid isdygtrlwt ggldntvrcw dlregrqlqg
 hdfssqifsl ghcpngdwa vmesshhev lhvrkpekyg lrlhescvls
 lkfascgrwf vstgkdnl n awrtpygasi fgskeessvl scdisrnnky
 ivtgsgdkka tvyevvy

【0 1 5 1】

配列番号：1 3

マウス Gr g 3 タンパク質

【表 1 4】

mypqgrhpap hqpgqpgfkf tvaescdrik defqflqagy hslkveydkl
 anektemqrh yvmyyemsg lniemhkqte iakrlntila qimpflsgeh
 qqqvaqaver akqvtmteln aiigvrglpn lpltqqqlqa qhlshathgp
 pvqlpphpsg lqppgippvt gsssgllalg algsqahlav kdeknhheld
 hreresstnn svspeslra sekhrgsady smeakkrkae ekdlsryds
 dgdkssddl v dvsnedpatp rvspahsppe ngldkarglk kdaptspasv
 assstpsk tkdlghndks stpglksntp tprndaptpg tsttpglrsm 10
 pgkppgmdpi gimasalrtp itltssypap fammshhemn gsltspaya
 glhnipsqms aaaaaaaaaay grspmvsga vgf dphppmr atglpsslas
 ipggkpaysf hvsadggmqp vpfphdalag pgiprharqi ntshgevc
 avt isnptrh vytggkgcvk iwdisqpgsk spisqldcln rdnyirsckl
 lpdgrtlivg geastltiwd lasptprika eltssapacy alaispdakv
 cfscsdgni avwdlnhqt lvrqfqgtdg ascidishdg tkltwgldn
 tvrswdlreg rqlqghdfts qifslgycpt gewlavgmes snvevlhhtk
 pdkyqlhlhe scvlslkfay cgkwfvstgk dnllnawrtp ygasifqske 20
 sssvlscdis addkyivtgs gdkkatvyev iy

【0 1 5 2】

配列番号：1 4

マウス Gr g 4 タンパク質

【表 1 5】

mirdlskmyp qtrhpaphqp aqpfkftise scdrikeepf flqagyhslk
 leceklasek temqrhyvmy yemsglnie mhkqaeivkr lnaicagvip
 flsgehqqqv vgaverakqv tmaelnaiig qqlqaqhlsh ghglpvpltp 30
 hpsglppai ppigssagll alssalggqs hlpikdekkh hdndhqrdrd
 siksssvsps asfrgsekhr nstdyksesk kqkteekeia arydsdgesk
 ddnlvvdvsn edpssprgsp ahsprenld ktrllkkdap ispasvasss
 stpskskel slneksttpv sksntptprt daptpgsnst pglrvpgkp
 pgvdplassl rtpmavpcpy ptpfgivpha gmgeltspg aayaglnhis
 pqmsaaaaaa aaaaaygrsp vvgfdphhmm rvpaippnlt gipggkpays
 fhvsadggmq pvpfpdali gpgiprharq intlnhgevv cavt isnptr
 hvytggkgcv kvwdishpgn kspvsqldcl nrdnyirscr llpdgrtliv 40
 ggeastlsiw dlaaptprik aeltssapac yalaispdsk vcfscsdgn
 iavwdlnhqt lvrqfqgtd gascidisnd gtklwtggld ntvrswdlre
 grqlqghdft sqifslgycp tgewlavgme nsnvevlhvt kpdkyqlhlh
 escvlslkfa hcgkwfvstg kdnl nawrt pygasifqsk esssvlscdi
 svddkyivtg sgdkkatvye viy

【0 1 5 3】

配列番号：1 5

10

20

30

40

50

マウス Gr g 5 タンパク質

【表 1 6】

```
mmfpqsrhsg sshlpqqlkf ttsdscdrik defgllqagy hsklecdkl
aseksemerh yvmyemsg lniemhkqae ivkrlngica qvlpylsgeh
qqqvlgaier akqvtapeln siirqqlqah qlsqlqalal pltplpvglq
ppslpavsag tglslsalg sqthlskedk nghdgdthqe ddgeksd
```

【 0 1 5 4】

配列番号：16

10

ヒト MDM 2 タンパク質

【表 1 7】

```
mvrsrcmcnt nmsvptdgav ttsqipaseq etlvrpkpl1 lklksvgag
kdytmkevl fylggyimtk rlydekqghi vycsndllgd lfgvpsfsvk
ehrkitymiy rnlvvvnqge sdsqtsvse nrchleggsd qkdlvqelqe
ekpssshlvs rpstssrrra iseteensde lsgqrkrh ksdsislsfd
eslalcvire iccerssse stgtpsnpdl dagvsehsd wldqdsvsdq
fsvefevesl dsedyslsee ggelsdedde vyqvtvyqag esdtdsfeed
peisladywk ctscnempp lpshcnrcwa lrenwlpedk gkdkgeisek
aklenstqae egfdvpdckk tivndsresc veenddkitq asqsgesedy
sqpstsssi yssgedvkef ereetqdkee svesslplna iepcvicqgr
pkngcivhgk tghlmacftc akklkrnkp cpvcrqpiqm ivlityfp
```

20

【 0 1 5 5】

配列番号：17

ヒト MDM 2 コード配列

【表 1 8】

atggtgaggagcaggcaaatgtgcaataccaacatgtctgtacctactgatggtgctgtaa
 ccacctcacagattccagcttcggaacaagagaccctggtagaccaagocattgctttt
 gaagttattaagctgttggcgcacaaaaagacacttatactatgaaagaggttcttttt
 tatcttggccagtatattatgactaaacgattatatgatgagaagcaacaacatattgtat
 attgttcaaatgatcttctaggagatttgtttggcgtgccaagcttctctgtgaaagagca
 caggaatatataccatgatctacaggaacttggtagtagtcaatcagcaggaatcatcg
 gaactcaggtacatctgtgagtgagaacaggtgtcaccttgaaggtgggagtgatcaaaagg
 accttgtacaagagcttcaggaagagaaaaccttcatcttccatttggtttctagaccatc
 tacctcatctagaaggagagcaattagtgagacagaagaaaattcagatgaattatctggg
 gaacgacaaaagaaaacgccacaaatctgatagatttcccttcccttggatgaaagcctgg
 ctctgtgtgtaataaggagatatgttgtgaaagaagcagtagcagtgaaatctacagggac
 gccatcgaatccggatcttgatgctgggtgtaagtgaacattcaggtgattgggtggatcag
 gattcagtttcagatcagtttagtgtagaatttgaagttgaatctctcgaactcagaagatt
 atagccttagtgaaagaaggacaagaactctcagatgaagatgatgaggtatatcaagttac
 tgtgtatcaggcaggggagagtgatcacagattcatttgaagaagatcctgaaatttctta
 gotgactattggaaatgcacttcatgcaatgaaatgaatcccccttccatcacattgca
 acagatggtgggcccctcgtgagaattggcttccctgaagataaagggaagataaaggggga
 aatctctgagaaagccaaactggaaaactcaacacaagctgaagagggcttggatgttcc
 gattgtaaaaaactatagtgaaatgattccagagagtcattgtgttgaggaaaatgatgata
 aaattacacaagcttcacaatcacaagaaagtgaagactattctcagccatcaacttctag
 tagcattatttatagcagccaagaagatgtgaaagagtttgaaggggaagaaaccaagac
 aaagaagagagtggtggaatctagtttggcccttaatgccattgaaccttgtgtgatttgtc
 aaggtcgacctaaaaatgggttgcaattgtccatggcaaacaggacatcttatggcctgctt
 tacatgtgcaagaagctaagaagaaaggaataagccctgccagtatgtagacaaccaatt
 caaatgattgtgctaacttatttccctag

10

20

【 0 1 5 6】

30

配列番号：1 8

マウス Gr 1 コード配列

【表 19】

atgtcccgcagagccggcacccaacsccgcaccaagctgcaggccagcccttaagttaactafoccggaggtctctggaccggat
 taaagaggaartccagttcctgcaggcgcagtatcacagtttaaatggagtgtagaaactggcaagtgaaaagacagaaatgc
 agaggcactacgtgatgtattatgaaatgcatatggattaaacattgaaatgcacaaacagactgaaatgccaaagagattgaacac
 caittggtcccaagacatcccattctgtctcaggaacatcaacaacaggtggccaggtgtggaacgtgccaaacaggtgaccat
 ggacaggtgaaatgccatcatcgggcagcagcaggtgcaagctcagcatctctccatggccatggaccccagtaacctctcacgc
 ctcaacctcaggacttcagcctcctggaatcccggccctcgggggagtgccggccctcttgcgctgtctagtgtctgagtgggc
 agtctcactlggcaataaaaagtgacaagaagcaccatgatgcagagcgcacagagacagagagcctggcacgagtaatcctc
 ctgggtcccagacagcctaagaggcacagataagcgcagaaatggfccagagtttccagtgacatcaaaaaaggaaaggtggat
 galaaggataaactatgacagtgatggggacaagagtgatgacaacttagttggtgagtggtctaacaggaccctctctccacatg
 caagccccacacactcaccccgggaaaacggaaatgacaaaaaccgtctgctgaaagaaagatgctcaggtagcccggcatcca
 cagctctctggaagtctctctccctgaaatcacaagaagtgcagctgcatgaaaaagccaactcctgttctgaaatccagcag
 accgacgctcggagcgcacatgccaacccccaggcaccagcgtactcaggcctccgtccaggtcttgcaagcctccagccat
 ggaaccccttgtaaccaagcagcagctggcctgaggacgccctggcagtgccctggccataccctgccccccttggcatggtg
 cccatgctgggcatgaacggagagctgaccagccctggtgctgctatgcaggtctacacagcagctcaccagatgagcgtg
 cagctgctgagctgctgctgctggtggcctatgggctcctcccaatggttggtttgatcctcctccacatgagagtaccttcta
 tcccccaacctggcaggaatcctggagggaaccagcatactcctccacgtactgctgagggcaaatgcagcctgttccctt
 tccccctatgccccctatggacctggatccccgacatgctcggcagatcaacaccctcaaccacggggaggtggtgtgcgcag
 tgaccatcagcaaccccacaaggcacgtgtacacaggtggcaagggtgctgtaagggtgtaggacalcagccaccccggcaaca
 agagccccgtctcagctggattgctgaaatagagataactacatccgaacctgtaaattgtacctgatgactgactctcatalgtg
 ggaggggaagccagtttgtccattgggacctggcggctccaaccccgcgatcaaggcggagctgacgtcctcggcccc
 gcctgctacgccctggccatcagccccgactccaaggctgcttctcatgctgagtgacggcaacatcgcagtgtagggacctgca
 caaccagacccctggtagggcaatccaggggccacagacggagccagctgtattgacatttctaagatggcaccaagctctgga
 caggcggtttagacaacactgtgaggtcctgggacctgagagaaggcggcagctgcagcagcatgacttcacttcacagatctc
 tcttgggatactgcccactgggagtggtgctgtggtggcatggaaagcagcaacgtggaagttctgcatgtgaacaagcctga
 caagtaccagctgcacctccacgagagctgctgctgctcctaaagttgcttattgtgcaaatggttggtagtactggaaaagata
 acctcctcaatgcttggcggacccccatggagccagcattccagtcacaagagctcctcgtcagtgcttagctgtgacatctctgtg
 gatgataagtacatagtcactggctcgggggacaagaaggctacagttatgaagtcatctactga

10

20

【0157】

配列番号：19

マウス Gr g 2 コード配列

30

【表 2 0】

atgtaccctcagggaaggcaccgaccccgctgcagctcggccagcccttcaagttctcagtactggaaatctgtgaccggatcaaa
gaggaatfcagttctcaagctcagtagccacagcccaagctagaatgtgagaagctggccagcgagaagacagaaatgcaaa
ggcattatgtagtggtgcaccccatcagtgctcccagggtggcaccagctatccacactggccaagactgtctcctttcagtagta
cgagatgtcctacggactcaacattgagatgcataaacaggctgagatgtgaaacgcccagtcagtcggtgcccagatggtccc
gttccctcactcaggagcatcagcagcagggtgctccaggctgtggaccggccaagcagggtgaccgtgggggaaactgaacagcct
cctggggcagcagaatcagctccagccgctgtcccacgcacccccgctcctcaccocggccagccggcctggtgggtgc
cggggccacigggctgtggccctatctggggcactggctgcgcaggccagctgggtggctgccgtaaaggaaagaccgtgtgg
gtgtggacgccgaggggtccagagtggacagagctgcccagcaggagtctcctcccctgagagctggtggaagagg
accatcccagcagccgagggcggcagtgaggaaacagcagagagctgaagacaaggatctgtcagggtctatgacagtggaggaa
gacaagagtgactataacctggtagtgatgaggaccaaccgtcagagccccccagccctgtgaccacccctgtgggaaggcg
ccctctgcattcctgcccgcagggaacctcacagacagctccagcctccttggcctccagttgggctcaccactcccagaagcaa
agacatagccctgaacgatctcccacaggcactcctgcctccaggctcattggttaoctctccaccccaggactcgtccaccccg
ggcccagctcagccagctcactctgccagctggcggctcagccggcagcaccacagacagcctcgcctgaggagctcccctg
acctgtccagcccttccactcactcctcagcctggctcccacagcaccctcaatggggacctctccatgctggctcctatgctgg
cctccactgtccccaggtcagcagctctgtcgtgatggacgctcacctctgcagatggcattgaatcgcacccccatctccga
ggctcgtctgtctccttgcctggcctcctgtggctaagccggcttactcctccacgtgtctgaggatggccagatgcagcctgtgc
ccttcccgtctgactctggttaggcacaggcatccctgccacgcaaggcagctacacacgctggcccacgggtgaggtggtgtgt
gccgtcaccatcagcagctccacacagcacgctgtacacaggcggcaaggatgctgtaagggtgtgggacgtggccagccgg
gtagcaagacccctgtggcacagctggattgctgaaccgagacaactacatccctcctgcaagctgctgccgacgggcaga
gcctgattgtagggtggcagggccagctaccctgtcattgggacctggcagcaccacaccacggatcaaaagcagagctgacttc
gtctgccccggcctgctatgctctggccgtcagctccggacgccaaggctgtctcctgctgcagcgcaggtaacatcgtggtctg
ggacctgcagaaccaggccatggtcagacagttccaggggccacaggacggggccagctgcatcgacatcagactacggga
ccccgctgtggactggggcctggacaacactgtgcctgtctgggacctgcgcgagggccgccagctcagcagcatgacttca
gttccagatttctcattggggcactgtcccaatcaggactgggtggctgtggggatggagagcagccacgtggaggtctctcatg
tgcgcaagcctgagaagtaccagctccgctccatgagagctgctgtgctgactcaagttcgtctcctgtggacgctggittgta
gcacaggcaaggacaacctgctcaatgctggaggacacctatggggccagcattttcagtcacaagaatcactctctgactga
gctgcgacatctccaggaataataagtacatcgtgacaggctcagggggacaagaaggccactgtgtatgaggtggtgactga

10

20

【 0 1 5 8】

配列番号：20

マウス Gr g 3 コード配列

30

【表 2 1】

atgtatccgcaaggcagacatccggcaccccatcaacccgggcagccgggattaaaitcactgtggccgagtcctgtgacaggat
caaagacgaattccagttcctgcaagctcagtatcacagcctcaaagtgggagtatgacaagctggctaaccgagaagacgggagatg
cagcgcattatgtgatgtactatgagatgtcctatggccttgaatatgaaatgcacaagcagacagagattgcgaagagactgaaca
caatcctagccagatcatgcctttttgtcacaggagcatcagcagcaagtggcgaggctgtggaacgcgccaaagcaggtcacc
atgacggagttgaacgccatcaccgggttacgtggactccccaatcgtcctcaccagcagcaactccaggcccagcacctctc
ccatgccacgcattggtccccgggtccagctgccacccccaccgacagcctccagcctcctgggattccccagtgacaggaaag
cagctctgggttgcctggcacttgggtgccctgggaagtcaagctcacttggcggtgaaggatgagaagaaccaccatgaactggatc
acagagagagagagtgccagcacgaacaattccgtgtcacctctgaaagcctccgggccagtgagaagcaccggggtctgtca
gactacagcatggaagccaagaagcgggaaggcgaagagaagaagacagcctcagcagatagatagc gatggggacaagagt
gacgacctgtgtgggtggaatgctctaatgaggaccacagcaacacccccgggtgagcaccagcacactccccctctgaaaatgggctgg
acaaagcccgtggtctgaagaaagatgccccaccagcccagcctcctggtctctccagcagcaacacctctccaaagaccaa
agacctgggtcataatgacaaatctccacacctgggctcaagtccaacacaccaacgccaaagaatgatgccccaactccaggca
ccagcaccacccccggggtcctgggtcaatgcgggcaaacctccaggcatggaccggataggtataatggcctcggcctgctgaa
caccatcacctcaccagctcctatccagcaccttggcctgatgagccaccacgagatgaatggctccccaccagcccagc
gectatgctggcctacacaacatccatccagatgagcggccgcagccogctgcagccgcccctatggccgatcggcaatg
gtgagcttgggagctgttgggtttgacctcaacccccaatgagggccacaggcctgcccctccagctcgcctccattcctggaggga
aacgggcatactcttccatgtgagtgctgatgggcagatgcaacctgtgcccctccccatgatgcactagcaggccctggcattc
ccaggcatgcccggcagatcaatacgetcagccatggagaggtggtatgtctgtgaccatcagcaacccacacgacacgtcfa
cacaggcggcaagggctgtggaagatgaggacatcagccagccgggcagcaagagtcaccatccccagctggactgctgaa
cagggacaactacatccgctcgtgcaagcttccccgatgggcccagcgtcattgtgggtggtgaggccagcacgctcaccatct
gggacctggctcaccacaccccgcataaggctgagctgacgtcctcggctccagcctgttatgccctggccatcagctctgat
gccaaagtctgttttctgtctgcagcgacgggaacattcgggttgggatctgcacaaccagaccctggtcaggcagttccaggggc
cacacagatggggccaagctgtatagacatctcctatgatggcactaagctgtggaccggggcctggacaacaccgtgcgctcct
gggacctacgtgaaggacggcagttacagcaacacgatitcaccctccagatcttctcctggggtactgcccactggggagtgg
ctggccgtgggcatggagagcagcaatgtggaggtcctgcaccacactaagcccagacaaataaccagctgcacctgcagagag
ctgcgtgtgtcctcaagttcgcctattgtggcaagtgtttgtgagcactgggaagacaaccttctcaatgcctggaggagcct
tatggagccagcattcagtcaaaagaatcctcatctgtcttgagctgtgacattcagccgatgacaaatataattgtaacaggtct
ggtgacaagaaggccacagttiacgaggtcattctactga

10

20

【 0 1 5 9 】

30

配列番号：2 1
マウス Gr g 4 コード配列

【表 2 2】

atgattcggacctgagcaagatgtacccgcagacgcgccacccggcaccgcatcagcctgctcaacccttcaattacaattca
 gaatcctgtgatcggattaaggaagagtttcagttttacaggctcaataccacagctctgaaagctggaatgigagaagctcggcagcg
 agaagacagagatgcagcggcattatgtcatgtatfatgaaatgtccatgggtigaacatagaaatgcacaagcaggcagagattg
 taaacgactaaatgtctatctgtgacaggtcaticcttccigtcccaagagcaccagcaacaagtggtgagggctgtggaacggg
 ccaagcaggtgaccatggcagaactgaacgccatcattgggcaacaactccaagctcagcattiatcacatggacatggtctgct
 gtgctctgacaccacaccttcagggttcagccccagccatcccacctatcggtagcagtgaggacttctggccctctccagt
 gactaggaggtcagctcaccctcccaattaaggatgagaaagcaccatgacaatgatcaccaaagagacagagactccatca
 agagctcttccgtatccccatcagccagtttccgggttcigagaacataggaactctacagactattctcagagagcaaaaagc
 agaaaacagaagaaaaagaaattgcagctcgcctatgacagtgatggtgagaagagtgatgacaacttggtagtgtgtgtccaat
 gaggatccatctccccggaggaagccagcacatcccccaagggagaatggcctggacaagacacgactcctcaagaaagat
 gcccccatcagccccgtctgtgtgcatctccagcagctactctctcccaatccaagagcttagcctaatgaaaagctactact
 cctgtttcaaaagccaalaccctactccacgaactgatgcacctaccctggcagtaattctactcctggactgaggcctgtacctgg
 aaagccaccaggtgtggacccttagcatcaagcctgaggacccccgatggtgtacttgtccatccaaccccccttgggatcgt
 gcccatgctgggatgaacggagagctgaccagccccggagccgctatgctgggctacacaacatctccccagatgagtg
 agctgctgctgagctgctggcagcagcagcctatggaagatcacctgtggtgggattgatccacaccatcacatgagagtgccag
 caatacctccaatctaacaggcattccaggaggaaaaccagcatactccttcacgctcagtgccgatggccagatgacgctgtcc
 ctttccccctgatgcccctattggaccagggatccccgacacgctcgacagatcaacacctcaacctatggggagggtgtgt
 gcagtgaccatcagcaaccccacaaggcacgtglacacaggtggcaaggctgtgttaaggcttgggacatcagccacctggc
 aacaagagcccagctctcagctggaactgtgaacagggaactacatccgttctgcagattgctccctgatggtcgcacctaa
 ttgtggagggggaagccaagcactgtccatctgggacctggcagctccaactccacgcatcaaggcagagctgacatcctcagc
 ccttgcctgctatgctctggccatcagccccgactccaaggctgctctcctatgctgcagcgacggtaacatcgcagtggtggatct
 gcacaaccagactctgggtgaggcaattcaggggacacacagatggagccagctgtattgacatttcaatgatggcaccagctct
 ggacagggtggttggacaacactgtgaggctctgggacctgctgaaagggcggcagctgcagcaacatgacttccacctcagat
 ctttcatgggctattgcccactggagagtggtctgcagtggggatggagaatagcaatgtggaagtattgcatgtcaccaaacca
 gacaaataccagttgcatctcatgagagctgtgtgctgtcactcaagttgcccactgtggcaaatggttgaagcactggaaggga
 caacctctgaatgcttggaggacgcttatggggccagcatatccagtcacaagaatctctatcggtgcttagctgtgacatctctg
 tggatgacaagtacatgtcactggctctggggacaagaagactacggttatgaagtattattaa

10

20

【 0 1 6 0 】

配列番号：2 2

マウス Gr g 5 コード配列

【表 2 3】

atgatgttccgcaaagccggcactcgggctcctccacctcctcagcagctcaagttcaccacctcagactcctgtgaccgcatc
 aaagatgagttccagctgctgcaagcgcagtatcacagcctgaagctggagtgcgacaagctggccagcgagaagtcagagatg
 cagaggcattacgtcatgactatgagatgtctacggattgaacatcgagatgcacaaacaggcggaaattgtgaagaggctgaat
 gggatttgcgcccagggtctgcccatttgtcaccaggagcatcagcagcaggtcctgggagccatcgagagagccaagcagggtca
 cggctcctgagctgaactccatcatccgacagcagctccaggctcaccagctgtcccagctgcagggcctggccctgcccctgac
 accgctgctgtgggctcagccaccgtccctccctgcagtcagtgaggcacaggcctgctgtcactctgctctgggttctca
 gacccacctctccaaggaggacaagaacggacacgatggggacaccaccaggaggatgacggagagaagtcggattag

40

【 5 】

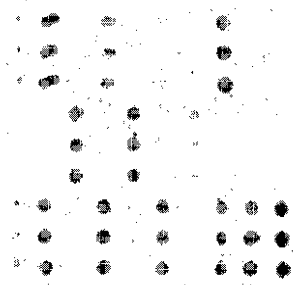


Fig. 5

【 7 】

| コントロールグループ | | | | | | | | | | | | |
|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| FE651 中央 * | 145145A5 | 145342A5 | 145331A6 | 145144A7 | 130854A7 | 130878A5 | 62633A8 | 145151A7 | 6335A7 | 145147A8 | 61703A4 | 61715A1 |
| 86591 85A * | 52499.8 | 62565.7 | 64857.2 | 64282.5 | 65005.7 | 62807.8 | 65196.0 | 62224.0 | 63638.7 | 65219.0 | 65208.7 | 65171.8 |
| 平均 | 572.5 | 1483.0 | 1338.4 | 1173.9 | 6.4 | 3905.6 | 112.6 | 729.2 | 1670.9 | 18.5 | 13.1 | 9.1 |
| SD | 0.01 | 0.02 | 0.02 | 0.00 | 0.06 | 0.00 | 0.01 | 0.01 | 0.03 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| CV | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.00 | 0.01 | 0.00 | 0.01 | 0.01 | 0.03 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 調整グループ | | | | | | | | | | | | |
| FE651 中央 * | 132499A5 | 153425A5 | 153424A5 | 153554A6 | 120944A7 | 125798A8 | 128832A8 | 157751A5 | 157766A7 | 123272A8 | 139450A6 | 157757A7 |
| 86591 85A * | 64235.2 | 57020.2 | 64693.8 | 60608.0 | 64503.0 | 64810.3 | 63961.0 | 62108.2 | 62113.8 | 64680.3 | 65299.0 | 65183.3 |
| 平均 | 1539.2 | 2946.1 | 549.2 | 3382.9 | 1120.6 | 643.7 | 1100.5 | 1003.5 | 1931.6 | 1603.8 | 784.7 | 8.0 |
| SD | 0.02 | 0.05 | 0.01 | 0.06 | 0.02 | 0.01 | 0.02 | 0.02 | 0.03 | 0.03 | 0.01 | 0.00 |
| CV | 0.02 | 0.02 | 0.01 | 0.01 | 0.02 | 0.01 | 0.02 | 0.02 | 0.03 | 0.03 | 0.01 | 0.00 |

Fig. 7

【 6 】

| | |
|-----------|------------|
| 166967A6 | 61703A4 |
| 61713A3 | 157757A7 |
| 132491A8 | 61156A4 |
| 61708A3 | 139450A6-2 |
| 132497A8 | 61715A1 |
| 61156A4-2 | 132497A8-2 |
| 61715A1-2 | 41244 |

| | |
|----------|------------|
| 130854A7 | 12094A7 |
| 125758A8 | 130878A5 |
| 62633A8 | 128832A8 |
| 157751A5 | 132499A5-2 |
| 157766A7 | 145151A7 |
| 123272A8 | 63335A7 |
| 139450A6 | 145147A8 |
| | 41238 |

| | |
|------------|------------|
| 132499A5 | 61713A3-2 |
| 132491A8-2 | 145147A8-2 |
| スロットテック-1 | - |
| 153425A5 | スロットテック-2 |
| 145145A5 | 145342A5 |
| 145331A6 | 153442A5 |
| 153554A6 | 145144A7 |
| | 41237 |

Fig. 6

【 8 】

| コントロールグループ | | | | | | | | | | | | |
|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| FE651 中央 * | 145145A5 | 145342A5 | 145331A6 | 145144A7 | 130854A7 | 130878A5 | 62633A8 | 145151A7 | 6335A7 | 145147A8 | 61703A4 | 61715A1 |
| 86591 85A * | 11321.5 | 11884.7 | 12052.0 | 11038.7 | 12785.2 | 11320.0 | 9962.7 | 15327.0 | 9174.0 | 13012.3 | 15275.0 | 19747.3 |
| 平均 | 1955.7 | 586.3 | 1046.0 | 2220.8 | 1484.1 | 3130.6 | 1639.4 | 1475.0 | 886.8 | 2281.2 | 4684.0 | 288.9 |
| SD | 0.17 | 0.05 | 0.09 | 0.20 | 0.14 | 0.23 | 0.13 | 0.13 | 0.09 | 0.14 | 0.41 | 0.03 |
| CV | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.03 | 0.35 |
| 調整グループ | | | | | | | | | | | | |
| FE651 中央 * | 132499A5 | 153425A5 | 153424A5 | 153554A6 | 120944A7 | 125798A8 | 128832A8 | 157751A5 | 157766A7 | 123272A8 | 139450A6 | 157757A7 |
| 86591 85A * | 10146.8 | 15012.3 | 11791.7 | 14718.5 | 10700.8 | 17761.3 | 14190.8 | 11948.0 | 10306.0 | 11246.7 | 17101.8 | 7988.0 |
| 平均 | 1524.3 | 5188.3 | 1926.7 | 2556.7 | 1007.9 | 1332.2 | 1279.7 | 1926.4 | 905.5 | 1162.6 | 1106.6 | 1586.5 |
| SD | 0.15 | 0.35 | 0.17 | 0.17 | 0.09 | 0.10 | 0.09 | 0.17 | 0.09 | 0.10 | 0.06 | 0.12 |
| CV | 0.01 | 0.07 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 |

| コントロールグループ | | | | | | | | | | | | |
|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| FE651 中央 * | 145145A5 | 145342A5 | 145331A6 | 145144A7 | 130854A7 | 130878A5 | 62633A8 | 145151A7 | 6335A7 | 145147A8 | 61703A4 | 61715A1 |
| 86591 85A * | 490.5 | 683.5 | 604.7 | 412.8 | 502.0 | 480.7 | 449.8 | 562.7 | 561.8 | 442.7 | 411.7 | 1351.3 |
| 平均 | 21.7 | 42.3 | 128.6 | 11.0 | 66.8 | 31.4 | 61.9 | 9.9 | 31.2 | 9.0 | 24.5 | 7.4 |
| SD | 0.04 | 0.06 | 0.21 | 0.03 | 0.13 | 0.07 | 0.14 | 0.02 | 0.06 | 0.02 | 0.05 | 0.01 |
| CV | 0.04 | 0.06 | 0.21 | 0.03 | 0.13 | 0.07 | 0.14 | 0.02 | 0.06 | 0.02 | 0.05 | 0.01 |
| 調整グループ | | | | | | | | | | | | |
| FE651 中央 * | 132499A5 | 153425A5 | 153424A5 | 153554A6 | 120944A7 | 125798A8 | 128832A8 | 157751A5 | 157766A7 | 123272A8 | 139450A6 | 157757A7 |
| 86591 85A * | 455.0 | 688.8 | 447.3 | 473.3 | 477.0 | 534.2 | 378.7 | 546.8 | 492.8 | 683.0 | 483.5 | 356.3 |
| 平均 | 27.5 | 21.0 | 44.4 | 25.8 | 82.9 | 43.8 | 12.0 | 114.5 | 47.0 | 53.7 | 33.3 | 31.9 |
| SD | 0.06 | 0.03 | 0.10 | 0.05 | 0.17 | 0.08 | 0.03 | 0.22 | 0.10 | 0.08 | 0.07 | 0.09 |
| CV | 0.06 | 0.03 | 0.10 | 0.05 | 0.17 | 0.08 | 0.03 | 0.22 | 0.10 | 0.08 | 0.07 | 0.09 |

Fig. 8

【 図 9 】

| グループ | | コントロールドグループ | | | | | | | | | | 腫瘍グループ | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------|----|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|---------|---------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| B635 | 平均 | 1451545 | 14533146 | 14514447 | 13065447 | 13087845 | 6263348 | 14515147 | 6333547 | 14514748 | 6170344 | 6171343 | 6115844 | 6170843 | 6171541 | 1324945 | 1534245 | 1533245 | 15355446 | 12064447 | 12575848 | 12883248 | 15775145 | 15776647 | 12372248 | 13945046 | 16696746 | 15775147 | 13249148 | 13249748 |
| SD | | 280.2 | 330.4 | 288.3 | 252.1 | 305.8 | 230.1 | 251.0 | 371.5 | 279.9 | 283.8 | 326.7 | 434.2 | 437.5 | 327.4 | 287.0 | 344.1 | 317.7 | 280.8 | 362.5 | 270.2 | 271.8 | 423.3 | 388.0 | 315.5 | 342.6 | 377.8 | 479.9 | 550.5 | 402.0 |
| CV | | 12.6 | 11.1 | 18.0 | 7.0 | 20.7 | 14.2 | 14.0 | 21.6 | 29.7 | 15.4 | 13.2 | 21.1 | 26.9 | 21.6 | 28.0 | 40.0 | 94.4 | 25.5 | 82.8 | 58.9 | 48.8 | 57.4 | 87.6 | 57.4 | 75.3 | 49.1 | 63.0 | 79.8 | 93.1 |
| CV | | 0.05 | 0.08 | 0.38 | 0.03 | 0.07 | 0.06 | 0.06 | 0.06 | 0.09 | 0.06 | 0.05 | 0.06 | 0.06 | 0.07 | 0.10 | 0.12 | 0.30 | 0.10 | 0.23 | 0.22 | 0.18 | 0.14 | 0.23 | 0.18 | 0.22 | 0.13 | 0.13 | 0.15 | 0.23 |
| B635 | 平均 | 1324945 | 1534245 | 1533245 | 15355446 | 12064447 | 12575848 | 12883248 | 15775145 | 15776647 | 12372248 | 13945046 | 16696746 | 15775147 | 13249148 | 13249748 | | | | | | | | | | | | | | |
| SD | | 348.7 | 428.8 | 307.2 | 306.1 | 342.0 | 345.7 | 305.6 | 270.3 | 282.8 | 516.6 | 307.9 | 226.1 | 377.8 | 327.1 | 380.1 | | | | | | | | | | | | | | |
| CV | | 17.5 | 24.4 | 9.0 | 18.7 | 15.1 | 19.3 | 16.1 | 7.6 | 19.3 | 20.6 | 18.8 | 23.0 | 17.9 | 16.1 | 27.7 | | | | | | | | | | | | | | |
| CV | | 0.05 | 0.06 | 0.03 | 0.06 | 0.04 | 0.08 | 0.05 | 0.03 | 0.07 | 0.04 | 0.06 | 0.10 | 0.05 | 0.05 | 0.07 | | | | | | | | | | | | | | |

| F635 中央 | | コントロールドグループ | | | | | | | | | | 腫瘍グループ | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------|----|-------------|----------|----------|----------|----------|---------|----------|---------|----------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| PBS | 平均 | 1451545 | 14533146 | 14514447 | 13065447 | 13087845 | 6263348 | 14515147 | 6333547 | 14514748 | 6170344 | 6171343 | 6115844 | 6170843 | 6171541 | 1324945 | 1534245 | 1533245 | 15355446 | 12064447 | 12575848 | 12883248 | 15775145 | 15776647 | 12372248 | 13945046 | 16696746 | 15775147 | 13249148 | 13249748 |
| SD | | 287.0 | 344.1 | 317.7 | 280.8 | 362.5 | 270.2 | 271.8 | 423.3 | 388.0 | 315.5 | 342.6 | 377.8 | 479.9 | 550.5 | 402.0 | | | | | | | | | | | | | | |
| CV | | 28.0 | 40.0 | 94.4 | 25.5 | 82.8 | 58.9 | 48.8 | 57.4 | 87.6 | 57.4 | 75.3 | 49.1 | 63.0 | 79.8 | 93.1 | | | | | | | | | | | | | | |
| CV | | 0.10 | 0.12 | 0.30 | 0.10 | 0.23 | 0.22 | 0.18 | 0.14 | 0.23 | 0.18 | 0.22 | 0.13 | 0.13 | 0.15 | 0.23 | | | | | | | | | | | | | | |

Fig. 9

【 図 10 】

| | | | |
|-----------|----------------------|--|-----|
| Rb hypo 1 | 平均 (F635-B635) 血清 | 平均 (F635-B635) インキキュベーション コントロール | 845 |
| | 38244 | | |

Fig. 10

【 図 11 】

| ブロッック | 群 | 列 | 名前 | F635-B635 補正 | 中央 F635- B635 補正 | F635-B635 標準化 | 補正 標準化 | 中央 F635-B635 補正 標準化 |
|-------|---|---|-------------------|-----------------|---------------------|------------------|---------------|------------------------|
| 3 | 4 | 7 | Cyclin D2 16.5 | ^ 51 | | ^ 53.09135704 | | |
| 3 | 5 | 7 | Cyclin D2 16.5 | ^ 1 | | ^ 1.041007001 | | |
| 3 | 6 | 7 | Cyclin D2 16.5 | ^ 42 | # 42 | ^ 43.72229403 | # 43.72229403 | |
| 3 | 1 | 8 | MDM2 0.5 | 6802 | | 7080.929619 | | |
| 3 | 2 | 8 | MDM2 0.5 | 6785.5 | | 7063.753004 | | |
| 3 | 3 | 8 | MDM2 0.5 | 7018 | 6802 | 7305.787131 | 7080.929619 | |
| 3 | 7 | 8 | Cyclin D1 10 | 2702.5 | | 2813.32142 | | |
| 3 | 8 | 8 | Cyclin D1 10 | 6126 | | 6377.208887 | | |
| 3 | 9 | 8 | Cyclin D1 10 | 10911 | * 6126 | 11358.42739 | * 6377.208887 | |
| 3 | 1 | 9 | Rb hypo 1 | 36268.5 | | 37755.76241 | | |
| 3 | 2 | 9 | Rb hypo 1 | 37117 | | 38639.05685 | | |
| 3 | 3 | 9 | Rb hypo 1 | 35598.5 | 36268.5 | 37058.28772 | 37755.76241 | |

Fig. 11

【 図 12 】

| 名前 | 中央 コントロール | 中央腫瘍 | 比率 腫瘍/コントロール | Log2 比率 腫瘍/コントロール | P- 値 | $\alpha=0.05$ で H0 仮説の変態 |
|-------------------|--------------|----------|-----------------|----------------------|---------|-----------------------------|
| MDM2 0.5 | 4264.7 | 5028.5 | 1.18 | | 0.03 | ノー |
| Cyclin D2 16.5 | ^ 231.0 | ^ 263.3 | 1.14 | 0.24 | 0.81 | イエス |
| ErbB2 1 | ^ 455.6 | ^ 504.1 | 1.11 | 0.15 | 1.00 | イエス |
| EGF 0.5 | ^ 3648.3 | ^ 3992.8 | 1.09 | 0.13 | 0.25 | イエス |
| TLE1 0.5 | 10428.7 | 11255.1 | 1.08 | 0.11 | 0.03 | ノー |
| p53 0.5 | 8921.1 | 9193.9 | 1.03 | 0.04 | 1.00 | イエス |
| Rb 0.5 | 3023.6 | 3096.6 | 1.02 | 0.03 | 0.84 | イエス |
| Rb hypo 1 | 37012.5 | 36388.5 | 0.98 | -0.02 | 0.81 | イエス |
| Cyclin D1 10 | 11966.5 | 11681.3 | 0.98 | -0.03 | 0.93 | イエス |
| NKIRAS1 0.5 | 19051.1 | 16603.3 | 0.87 | -0.20 | 0.07 | イエス |

Fig. 12

【 図 1 3 】

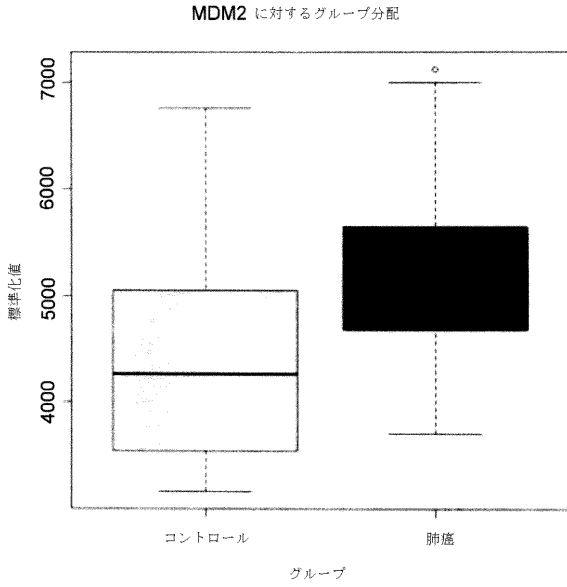


Fig. 13

【 図 1 4 】

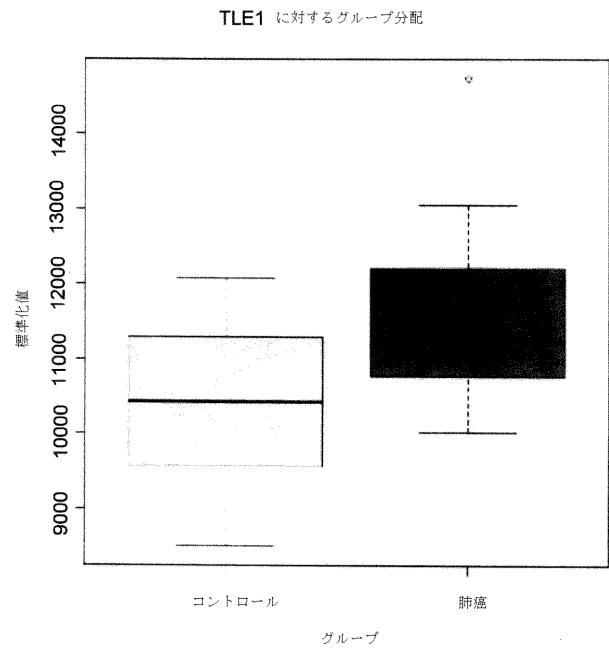


Fig. 14

【 図 1 5 】

| マウス遺伝子型および処置 | 野生型 | 野生型 + TSA | Grg1 | Grg1 + TSA |
|----------------------|-----|-----------|---------------|---------------|
| 連続切片において見える腫瘍を有するマウス | 0/6 | 0/6 | 5/6 | 1/6 |
| 病変の平均数 +/- SD | 0 | 0 | 1.17 +/- 0.75 | 0.33 +/- 0.82 |

Fig. 15

【 図 1 6 】

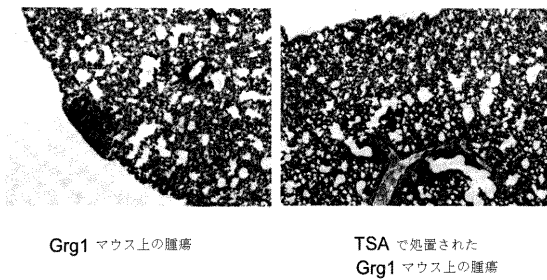


Fig. 16

【 図 1 7 】

| | 肺サンプルの数 (+/- S.D.) | 腫瘍の数を有する肺の数 (+/- S.D.) | 切片化された肺の数 (+/- S.D.) | 10 連続切片において見える腫瘍の数 (+/- S.D.) | |
|---|--------------------|------------------------|----------------------|-------------------------------|---------------|
| APC ^{min} | 27 | 49.9 +/- 27.5 | 27 | 0 | ND |
| Grg1 ^{lacZ} /APC ^{min} | 33 | 47.6 +/- 37.7 | 33 | 0 | ND |
| Grg1 ^{hPLAP} | 6 | 0 | 11 | 7.4 +/- 3.1 | 15.0 +/- 4.4 |
| Grg1 ^{hPLAP} /APC ^{min} | 19 | 34.7 +/- 24.5 | 19 | 1.1 +/- 1.3* | 9.8 +/- 4.0** |
| Grg5 ^{hPLAP} | 5 | 0 | 5 | 0 | ND |
| Grg5 ^{hPLAP} /APC ^{min} | 21 | 37.4 +/- 18.1 | 21 | 0 | ND |

ND; 決定されなかった
 * P < 0.001, Grg1^{hPLAP} マウスと比較して
 ** P < 0.05, Grg1^{hPLAP} マウスと比較して

Fig. 17

【 1 8 A 】

A.

| ショウジョウバエ groucho | | マウス | | ラット | | ヒト | |
|------------------|--------|-------|-------|--------|-------|------------|--|
| | Q | G/P | CcN | S/P | WD40 | | |
| Grg1 | 73/99 | 26/99 | 31/91 | 28/90 | 86/99 | TLE1 | |
| Grg3a (ESG) | 72/96 | 17/99 | 37/99 | 31/97 | 90/98 | TLE2 | |
| Grg3b | 73/100 | 17/99 | | | | TLE3 | |
| Grg4 | 65/- | 9/- | 35/- | 30/100 | 94/99 | TLE4 | |
| Grg5 (Grg, AES) | 73/100 | 12/98 | | | | Grg5 (AES) | |

Fig. 18A

【 1 8 B 】

B.

| | Q | ドメイン |
|-------------|--|--|
| Groucho 21 | --- | I-DTLE---E-N---H---I-L-CE-S----- |
| Grg1 19 | --- | IP-L---E---L-CE-S----- |
| Grg3 18 | KFTVAESCDRIKDFQFLQAYHSLKVEYKLANENTEMQHVYVYEMSYGLNVEHMQ | |
| Grg4 18 | --- | ---S-----I----- |
| Grg5 24 | --- | TS-----L-----S-S-----I----- |
| Groucho 81 | --- | LIN-LL---QAD---L---L---IH---QVFG 136 73% |
| Grg1 79 | --- | C-DI-----A----- 135 89% |
| Grg3 78 | TEIAKRLNFIQAIFFLSOFHQOQVAOVERAKQVTELNALIGQQOQLQQLSH 134 (96) | |
| Grg4 37 | A--V-----G-C--VL--Y----- | |
| Grg5 84 | A--V-----G-C--VL--Y-----LG-I-----AP--S-- R-----HQ--Q 140 80% | |
| WD40 | | ドメイン |
| Groucho 522 | -A-----S-----EI-----P--SR----- | |
| Grg1 572 | -----S-----N----- | |
| Grg3 573 | SSAPACYALAIKSPDKVFCSCSDGNIAVMDLHNGTIVRFQFGHTDASCIDISHDGTKLMTGTLNTRVSWDLREG | |
| Grg4 544 | -----S-----KE-----N----- | |
| Groucho | -----S-----D-----N-H-----AS-----R-A----- 90% | |
| Grg1 | -----VN----- | |
| Grg3 | ROLQHDFTSQIFSLGTCGENLAVGMESNVEVHLHFKEDKYQLHLESVCVLSLKFAYCGKFWFVTCGNLINA (98) | |
| Grg4 | -----N-----V-----H----- 97% | |

Fig. 18B

【 配列表 】

2014512515000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2012/000161

| | | |
|---|---|--|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: <i>C12Q 1/68</i> (2006.01), <i>A01K 67/027</i> (2006.01), <i>A61K 38/17</i> (2006.01), <i>A61P 35/00</i> (2006.01), <i>C12Q 1/00</i> (2006.01), <i>G01N 33/48</i> (2006.01) (more IPCs on the last page) 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: <i>C12Q 1/68</i> (2006.01), <i>A01K 67/027</i> (2006.01), <i>A61K 38/17</i> (2006.01), <i>A61P 35/00</i> (2006.01), <i>C12Q 1/00</i> (2006.01), <i>G01N 33/48</i> (2006.01) (more IPCs on the last page) | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | |
| Electronic database(s) consulted during the international search (name of database(s) and, where practicable, search terms used) Totalpatent, pubmed, Scopus, Google, Canadian Patent Database (keywords: Lung cancer, biomarker, groucho-related protein, Mdm2, Ras, ErbB1, ErbB2, CyclinD1/D2, inactivated APC or beta-catenin mutation, APC gene truncated at 1638, transgenic mouse) | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| Y | ALLEN T. ET AL. "Grg1 acts as a lung-specific oncogene in a transgenic mouse model", <i>Cancer Research</i> 2006, Vol. 66 pages 1294-1301 | 1 - 15 and 55 - 59 |
| Y | CINNAMON e. AND PAROUSH Z. "Context-dependent regulation of Groucho/TLE-mediated repression", <i>Current Opinion in Genetics & Development</i> 2008, Vol 18 pages 435 - 440 | 23 - 43 |
| Y | GUO W. ET AL. "siRNA-mediated MDM2 inhibition sensitizes human lung cancer A549 cells to radiation", <i>International Journal of Oncology</i> 2007, Vol. 30 pages 1447 - 1452 | 1 - 15 and 55 - 59 |
| Y | MASCAUX C. ET AL. "The role of RAS oncogene in survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis", <i>British Journal of Cancer</i> 2005, Vol. 92 pages 131 - 139 | 1 - 15 and 55 - 59 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex. | | |
| * Special categories of cited documents : | "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 |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance | "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 |
| "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date | "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 |
| "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) | "&" | document member of the same patent family |
| "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 | | |
| Date of the actual completion of the international search 26 April 2012 (26-04-2012) | Date of mailing of the international search report 27 June 2012 (27-06-2012) | |
| Name and mailing address of the ISA/CA Canadian Intellectual Property Office Place du Portage I, C114 - 1st Floor, Box PCT 50 Victoria Street Gatineau, Quebec K1A 0C9 Facsimile No.: 001-819-953-2476 | Authorized officer Ken Steinberg (819) 934-7929 | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2012/000161

G01N 33/53 (2006.01), *G01N 33/564* (2006.01), *G01N 33/574* (2006.01), *G01N 33/68* (2006.01),
C40B 30/04 (2006.01)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2012/000161

| C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|---|---|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| Y | YARDEN Y. AND SLIWKOWSKI M. X. "Untagling the ErbB signalling network", Molecular Cell Biology 2001, Vol 2 pages 127 - 137 | 1 - 15 and 55 - 59 |
| Y | FONG K. M. ET AL. "Lung cancer 9: molecular biology of lung cancer: clinical implications", Molecular Biology of Lung Cancer 2003, Vol. 58 pages 892 - 900 | 1 - 15 and 55 - 59 |
| Y | HIRSCH F. R. ET AL. "Epidermal growth factor family of receptors in preneoplasia and lung cancer: perspectives for targeted therapies", Lung Cancer 2003, Vol. 41 pages S29 - S42 | 1 - 15 and 55 - 59 |
| Y | DRISCOLL B. ET AL. "Cyclin D ₁ antisense RNA destabilizes pRb and retards lung cancer cell growth", Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 1997, Vol 273 pages L941 - L949 | 1 - 15 and 55 - 59 |
| Y | CAPUTI M. ET AL. "Prognostic role of Cyclin D1 in Lung Cancer - Relationship to proliferating cell nuclear antigen", Am J Respir. Cell Mol. Biol. 1999, Vol 20 pages 746 - 750 | 1 - 15 and 55 - 59 |
| Y | SPARKS A. B. ET AL. "Mutational analysis of the APC/ β -catenin/Tcf pathway in colorectal cancer", Cancer Res 1998, Vol. 58 pages 1130 - 1134 | 44 - 46 |
| Y | POWELL S. M. ET AL. "APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis", Nature 1992, Vol. 359 pages 235 - 237 | 44 - 46 |
| Y | MIYAKI M. ET AL. "Frequent mutation of β -Catenin and APC genes in primary colorectal tumors from patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer", Cancer Res 1999, Vol. 59 pages 4506 - 4509 | 44 - 46 |
| Y | IWAI S. ET AL. "Mutations of the APC, beta-catenin, and axin 1 genes and cytoplasmic accumulation of beta-catenin in oral squamous cell carcinoma", J Cancer Res Clin Oncol 2005, Vol 131 pages 773 - 782 | 44 - 46 |
| Y | KATDARE M. ET AL. (1) "Efficacy of chemopreventive agents for growth inhibition of Apc (+/-) 1638NCOL colonic epithelial cells", Int J Mol Med 2002, Vol. 10(4) pages 427 - 432 | 44 - 46 |
| Y | KATDARE M. ET AL. (2) "Chemopreventive agents inhibit aberrant proliferation of the aneuploid phenotype in colon epithelial cell line established from Apc 1638N [+/-] mouse", Ann N Y Acad Sci 2001, Vol 952 pages 169 - 174 | 44 - 46 |
| Y | ARCE L. "The repressor activities of Groucho/TLE and tumor suppressor activities of dominant negative TCF-1 are averted in Wnt-linked colon cancer", ProQuest Dissertations & Theses 2006, 157 pages | 16 - 43 |
| Y | ALEXANDER J. "Use of transgenic mice in identifying chemopreventive agents", Toxicology Letters 2000, Vol. 112 - 113 pages 507 - 512 | 54 and 55 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/CA2012/000161

| C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|---|--|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| Y | CLEVERS H. "Wnt/ β -catenin signaling in development and diseases", Cell 2006, Vol. 127 pages 469 - 480 | 1 - 15 and 40 - 75 |
| Y | GORDON M. D. AND NUSSE R. "Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors", Journal of Biological Chemistry 2006, Vol. 281(32) pages 22429 - 22433 | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/CA2012/000161**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:
- a. (means)
- on paper
- in electronic form
- b. (time)
- in the international application as filed
- together with the international application in electronic form
- subsequently to this Authority for the purposes of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments :

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| |
|--|
| International application No. PCT/CA2012/000161 |
|--|

| | |
|--|--|
| Box No. II | Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of the first sheet) |
| <p>This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons :</p> <p>1. <input checked="" type="checkbox"/> Claim Nos. : 40 - 54 because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely :</p> <p>Claims 40 - 53 is directed to a method for treatment of the human or animal body by surgery or therapy which the International Search Authority is not required to search. However, this Authority has carried out a search based on the alleged effect or purpose/use of the product defined in claims 47 - 53.</p> <p>Claim 54 is directed to a plant or animal variety/varieties which the International Search Authority is not required to search.</p> <p>2. <input type="checkbox"/> Claim Nos. : 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 :</p> <p>3. <input type="checkbox"/> Claim Nos. : because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</p> | |
| Box No. III | Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet) |
| <p>This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows :</p> <p>1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.</p> <p>2. <input checked="" type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.</p> <p>3. <input type="checkbox"/> 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 claim Nos. :</p> <p>4. <input type="checkbox"/> 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 claim Nos. :</p> <p>Remark on Protest <input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.</p> <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.</p> <p><input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.</p> | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2012/000161**Continuation of BOX III:**

Group A - Claims 1 - 15, 47 - 53 and 56 - 59 (all in part) are directed to A method for diagnosing lung cancer in a mammal comprising providing a panel comprising one or more macromolecule, method of treating cancer in a mammal comprising administering a therapeutically effective amount of a Groucho-related protein (Grg) or fragment thereof and kits thereof, **wherein each of the biomarkers Grg, Ras, ErbB1, ErbB2, cyclinD1/D2 or combination thereof is viewed To represent a separate invention;**

Group B - Claims 16 - 43 (wholly) are directed to method for identifying a candidate patient responsive to inhibitory chemotherapy, monitoring effectiveness of cancer patient treatment protocol and identifying a cancer patient treatment candidate comprising monitoring the expression levels of a TLE biomarker,

Group C - Claims 44 - 46 (all in part) are directed to method of identifying a cancer patient treatment candidate comprising detecting the presence of an inactivated APC or beta-catenin mutation **wherein each of the biomarkers, inactivated APC or beta-catenin mutation, or combination thereof is viewed To represent a separate invention;**

Group D - Claim 54 is directed to transgenic mouse whose genome comprises a heterozygous, null allele of the gene encoding APC protein, wherein the APC gene is truncated at least at codon 1638;

Group E - Claim 55 is directed to a method of screening a compound for anti-tumor activity comprising preparing a transgenic mouse whose genome comprises a heterozygous, null allele of the gene encoding APC protein, wherein the APC gene is truncated at least at codon 1638; and

Group F - Claims 60 - 75 are directed to a method for identifying markers for non-small cell lung cancer comprising measuring the expression of biomarkers in a Grg1 expressing transgenic mouse and a non Grg1 expressing mouse and identifying biomarkers that are expressed at a different level in said sample.

The claims must be limited to one inventive concept as set out in Rule 13 of the PCT.

フロントページの続き

| (51) Int.Cl. | F I | テーマコード(参考) |
|--------------------------|----------------|------------|
| A 0 1 K 67/027 (2006.01) | A 0 1 K 67/027 | |
| A 6 1 K 38/00 (2006.01) | A 6 1 K 37/02 | |
| A 6 1 P 35/00 (2006.01) | A 6 1 P 35/00 | |
| A 6 1 P 11/00 (2006.01) | A 6 1 P 11/00 | |
| A 6 1 P 1/00 (2006.01) | A 6 1 P 1/00 | |
| C 1 2 N 15/09 (2006.01) | C 1 2 N 15/00 | A |

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

(74) 代理人 100081422
弁理士 田中 光雄

(74) 代理人 100084146
弁理士 山崎 宏

(74) 代理人 100122301
弁理士 富田 憲史

(74) 代理人 100157956
弁理士 稲井 史生

(74) 代理人 100170520
弁理士 笹倉 真奈美

(72) 発明者 コリーン・ローブ
カナダ、エム4エル・3ティ5、オンタリオ、トロント、ウェイバリー・ロード273番

Fターム(参考) 2G045 AA26

4B024 AA01 AA12

4B063 QA18 QA19 QQ02 QQ03 QQ08 QQ42 QQ53 QR08 QR32 QR36

QR42 QR50 QR55 QR62 QR66 QR72 QR77 QS25 QS28 QS34

QS36 QS39 QX02

4C084 AA02 BA01 BA02 BA08 BA22 BA23 BA44 NA14 ZA592 ZA662

ZB262

| | | | |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | 癌症的诊断和治疗 | | |
| 公开(公告)号 | JP2014512515A | 公开(公告)日 | 2014-05-22 |
| 申请号 | JP2013554760 | 申请日 | 2012-02-23 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 科琳长袍 CORRINNE LOBE 迈阿密小鼠研究公司 迈阿密会展 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 科琳·勒布 迈阿密小鼠研究公司 | | |
| [标]发明人 | コリーンローブ | | |
| 发明人 | コリーン・ローブ | | |
| IPC分类号 | G01N33/574 G01N33/53 G01N33/50 G01N33/15 C12Q1/68 A01K67/027 A61K38/00 A61P35/00 A61P11/00 A61P1/00 C12N15/09 | | |
| CPC分类号 | A61P1/00 A61P11/00 C12Q1/6886 C12Q2600/156 C12Q2600/158 G01N33/57423 G01N2333/485 G01N2800/52 G01N33/6893 | | |
| FI分类号 | G01N33/574.ZNA.A G01N33/53.M G01N33/50.Z G01N33/15.Z C12Q1/68.A A01K67/027 A61K37/02 A61P35/00 A61P11/00 A61P1/00 C12N15/00.A | | |
| F-TERM分类号 | 2G045/AA26 4B024/AA01 4B024/AA12 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ53 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR36 4B063/QR42 4B063/QR50 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR66 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS25 4B063/QS28 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QS39 4B063/QX02 4C084/AA02 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/BA44 4C084/NA14 4C084/ZA592 4C084/ZA662 4C084/ZB262 | | |
| 代理人(译) | 田中，三夫 山崎 宏 富田健二 | | |
| 优先权 | 61/445972 2011-02-23 US | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

已经描述了针对癌症（例如肺癌）的诊断测定。测定还可用于在治疗期间跟踪患者并评估治疗后的疾病复发。该测定利用转基因小鼠模型中鉴定的肿瘤发生的生物标志物。测定用于基于患者生物标志物表达鉴定患者的治疗适应症。生物标志物及其片段也可用于治疗癌症，例如肺癌或结肠癌。

