

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6324970号
(P6324970)

(45) 発行日 平成30年5月23日 (2018. 5. 23)

(24) 登録日 平成30年4月20日 (2018. 4. 20)

| | |
|---------------------------------|---------------------|
| (51) Int. Cl. | F I |
| C 0 7 K 16/28 (2006. 01) | C O 7 K 16/28 Z N A |
| C 1 2 N 5/20 (2006. 01) | C 1 2 N 5/20 |
| C 1 2 P 21/08 (2006. 01) | C 1 2 P 21/08 |
| C 1 2 N 15/02 (2006. 01) | C 1 2 N 15/00 C |
| C 0 7 K 16/00 (2006. 01) | C O 7 K 16/00 |

請求項の数 12 (全 53 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-534675 (P2015-534675)
 (86) (22) 出願日 平成25年9月26日 (2013. 9. 26)
 (65) 公表番号 特表2016-500659 (P2016-500659A)
 (43) 公表日 平成28年1月14日 (2016. 1. 14)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2013/062043
 (87) 国際公開番号 W02014/052672
 (87) 国際公開日 平成26年4月3日 (2014. 4. 3)
 審査請求日 平成28年9月26日 (2016. 9. 26)
 (31) 優先権主張番号 61/706, 312
 (32) 優先日 平成24年9月27日 (2012. 9. 27)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

微生物の受託番号 ATCC PTA-13181

(73) 特許権者 515081660
 バイオケア メディカル, エルエルシー
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 945
 20, コンコード, パイク レーン
 4040
 (74) 代理人 100107489
 弁理士 大塩 竹志
 (72) 発明者 チ, ウエイミン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 945
 53, マルティネス, ディアブロ ウ
 ェイ 437
 (72) 発明者 タチャ, デイビッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 945
 83, サン ラモン, ショー プレイ
 ス 73

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗ウロプラキンII抗体システムおよび方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

アメリカンタイプカルチャーコレクション(ATCC)にATCC特許寄託番号第PTA-13181号で寄託されているハイブリドーマによって産生される単離された抗体もしくは該単離された抗体の単離された抗原結合断片であって、配列番号4を含むウロプラキンIIに特異的に結合する、単離された抗体もしくはその単離された抗原結合断片。

【請求項2】

アメリカンタイプカルチャーコレクション(ATCC)にATCC特許寄託番号第PTA-13181号で寄託されているハイブリドーマ細胞。

【請求項3】

請求項2に記載のハイブリドーマ細胞であって、さらに該ハイブリドーマ細胞によって産生される抗体を含有するハイブリドーマ細胞。

【請求項4】

請求項1に記載のモノクローナル抗体を生産する方法であって、以下：
 ウロプラキンIIを特異的に認識することができるモノクローナル抗体を生産する、アメリカンタイプカルチャーコレクション(ATCC)にATCC特許寄託番号第PTA-13181号で寄託されている前記ハイブリドーマを培養する工程；および
 該ハイブリドーマに該モノクローナル抗体を生産させる工程、
 を包含する方法。

【請求項5】

請求項 1 に記載の単離された抗体もしくはその単離された抗原結合断片と、少なくとも 1 つの追加の単離された抗体もしくはその単離された抗原結合断片とを含有する組成物であって、該少なくとも 1 つの追加の単離された抗体もしくはその単離された抗原結合断片は、G A T A - 3、p 6 3、ウロプラキン I I I、P A X 8、N K X 3 . 1、P S A および p 4 0 からなる群より選択される抗原に特異的に結合する、組成物。

【請求項 6】

請求項 5 に記載の組成物であって、前記単離された抗体もしくはその単離された抗原結合断片と、前記少なくとも 1 つの追加の単離された抗体もしくはその単離された抗原結合断片とは、以下：

- ウロプラキン I I および G A T A - 3 ；
- ウロプラキン I I および p 6 3 ；
- ウロプラキン I I および ウロプラキン I I I ；
- ウロプラキン I I および P A X 8 ；
- ウロプラキン I I および N K X 3 . 1 ；
- ウロプラキン I I および P S A ；
- ウロプラキン I I、ウロプラキン I I I および G A T A - 3 ；
- ウロプラキン I I、P A X 8 および P S A ；
- ウロプラキン I I、P A X 8 および N K X 3 . 1 ；ならびに
- ウロプラキン I I および p 4 0、

からなる群より選択されるタンパク質にそれぞれ特異的に結合する、組成物。

【請求項 7】

標識と結合体化された請求項 1 に記載の単離された抗体もしくはその単離された抗原結合断片。

【請求項 8】

請求項 7 に記載の抗体であって、前記標識は、放射性元素、磁性粒子、放射性同位体、蛍光色素、酵素、毒素、色素、検出酵素、西洋ワサビペルオキシダーゼ (H R P)、アルカリホスファターゼ (A P)、 - ガラクトシダーゼ、色素原、F A S T R E D、3、3' - ジアミノベンジジン、3 - アミノ - 9 - エチルカルバゾール、5 - プロモ - 4 - クロロ - 3 - インドリルホスフェート、3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンジジン、5 - プロモ - 4 - クロロ - 3 - インドリル - - D - グルクロニドおよびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される、抗体。

【請求項 9】

請求項 1 に記載の単離された抗体もしくはその単離された抗原結合断片；および
ウロプラキン I I 抗原に結合した場合の該請求項 1 に記載の単離された抗体もしくはその単離された抗原結合断片の抗体検出試薬を含む、キット。

【請求項 10】

生物学的サンプル中のウロプラキン I I を検出する方法であって、

- (a) 請求項 9 に記載のキットを提供する工程；ならびに
- (b) 前記単離された抗体もしくは前記その単離された抗原結合断片のウロプラキン I I 抗原との結合を、

(i) 該生物学的サンプルを、アメリカンタイプカルチャーコレクション (A T C C) に A T C C 特許寄託番号第 P T A - 1 3 1 8 1 号で寄託されているハイブリドーマによって産生される前記単離された抗体もしくはその単離された抗原結合断片と接触させる工程であって、該抗体もしくはその抗原結合断片は、配列番号 4 を含むウロプラキン I I に特異的に結合して複合体を形成する、工程；および

(i i) 該キットにおいて提供される前記抗体検出試薬により該複合体を検出する工程

を含むイムノアッセイであって、免疫組織化学 (I H C)、F F P E の I H C、凍結組織切片の I H C、免疫細胞化学および E L I S A からなる群より選択されるイムノアッセイ

10

20

30

40

50

によって検出する工程；
を包含する、方法。

【請求項 1 1】

前記生物学的サンプルは、血液、尿、尿路上皮組織、移行細胞組織および膀胱組織を包含する、請求項 1 0 に記載の方法。

【請求項 1 2】

前記生物学的サンプルは、正常組織、新生物性組織、膀胱組織、腎臓組織、卵巣組織、甲状腺組織、子宮内膜組織、腎性組織、扁桃腺組織、膵臓組織、結腸組織、リンパ節組織、胃組織、前立腺組織、肺組織および胸部組織からなる群より選択される、請求項 1 0 に記載の方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2012年9月27日になされた米国仮出願第61/706,312号(ここで引用によってその全体が本明細書に参考として援用される)に基づく優先権および利益を主張する国際PCT特許出願である。

【0002】

本発明は新規抗ウロプラキンII抗体、組成物、混合物ならびに抗体を含むキットおよび抗体を使用するための方法に関連する。

【背景技術】

20

【0003】

本発明の背景

組織サンプル、特にバイオプシーによって得られたものの顕微鏡による観察は疾病の診断のための一般的な方法である。特に、免疫組織化学(IHC)、すなわち特異的な抗体を用いて組織サンプル内の特異的なタンパク質の発現を検出する技術は診断、特に癌の診断および検出に有益なツールである。

【0004】

ウロプラキン(「UP」もしくは「Ups」)は、正常な尿路上皮の表層(アンブレラ)細胞の管腔表面で発現する4つの膜貫通型タンパク質(Ups Ia、Ib、IIおよびIII)の群を含み、それらは尿路上皮細胞の特異的分化産物である。ウロプラキンII(「UPII」)は、尿路上皮の透過性障壁を強化し得る尿路上皮ブランクの15kDaのタンパク質成分であり得る。UPIIの発現は膀胱の膀胱移行上皮癌(TCC)において異常になり得るため、これにより癌の診断に有用なマーカーとなり得る。Wu et al.の文献には、UPII mRNAの膀胱癌の、およびおそらく膀胱癌の骨盤リンパ節への結節性転移すらの有望な診断マーカーとしての考察(「Uroplakin II as a promising marker for molecular diagnosis of nodal metastases from bladder cancer: comparison with cytokeratin 20.」

30

Wu X, Kakehi Y, Zeng Y, Taoka R, Tsunemori H, Inui M. J Urol. 2005 Dec;174(6):2138-42参照、ここで引用により本明細書に参考として援用される)が含まれている。UPII mRNAは、膀胱腫瘍組織標本19中19(100%)、転移した骨盤リンパ節サンプル16中15(93.8%)からそれぞれ検出された。一方、UPII mRNAは、66の転移のない骨盤リンパ節サンプルからは、6例(10%)のみから検出された。したがって、UPII mRNAの陽性の発現は、膀胱癌からの結節性転移を示し得る。根治的膀胱切除後の膀胱癌の患者の結節性転移を決定することは、患者のそのような分集団は生存のため至急術後の化学療法が必要となり得るため、重要であり得る。著者らは、UPII mRNAの検出が、おそらくTCCの診断および管理における有用な情報を提供することにより、根治的膀胱切除に続く臨床転帰を改善し得ると結論付けている。したがって、患者(例えば、TCC等)の組織におけるUPIIタンパク質発現を検出

40

50

するための抗UPII抗体が開発されることが望ましい。

【0005】

研究により、UPII mRNAは原発性および転移性のTCCの患者の膀胱組織および末梢血での発現が示されており、尿路上皮癌腫のバイオマーカーとしての潜在的な役割が示唆されている。UPIIの臨床的有用性は、おそらく単にそのmRNAのデータに基づくこれらの研究によって認識されているものであったかもしれない。特にタンパク質分子はmRNA分子よりも安定であり得る場合、TCC中のUPIIのタンパク質の局在を特徴付ける追加の調査が正当化され得る。ある研究では、おそらく進行した尿路上皮癌腫におけるUPの持続的な発現を実証するために、UPIb、UPIIおよびUPIIアイソフォームすらの全てと反応し得る汎UP抗体が用いられた。しかしながら、特異的なUPIIタンパク質のレベルは、汎UP抗体を用いては決定することができなかった。
(Persistent Uroplakin Expression in Advanced Urothelial Carcinomas: Implications in Urothelial Tumor Progression and Clinical Outcome. Hong-Ying Huang, Shahrokh F. Shariat, Tung-Tien Sun, Herbert Lepor, Ellen Shapiro, Jer-Tsong Hsieh, Raheela Ashfaq, Yair Lotan, and Xue-Ru Wu, Hum Pathol. 2007 November; 38(11): 1703-1713参照、ここで引用により本明細書に参考として援用される)。おそらく特異的抗UPII抗体がないことにより、尿路上皮癌腫におけるUPIIのタンパク質発現についてはほとんど知られていない。

10

20

【0006】

癌診断での使用のための、高感度で、また特異的でさえある抗ウロプラキンII抗体についての明確な必要性が存在している。抗UPII抗体は、尿路上皮起源の癌腫のマーカーとして以前に開発されている。ここで本発明は、高度に特異的であり得、そして、抗UPII抗体(クローンBC17)よりも高感度でさえあり得る抗UPII抗体(クローンBC21)を提供する。TCCの場合において、本発明の実施例は、抗UPII抗体(約59中33、約56%)に比較して向上した感度(約59中46、約78%)を示す抗UPII抗体を提供する。おそらく、その強い染色特性に加え、抗UPII抗体(BC21)は抗UPII抗体に比較してより広い局在パターンを示し得る。これは、抗UPII抗体のより優れた感度に起因するものであり得るか、もしくはおそらく2つのアイソフォームが尿路上皮プラークの形成に区別できる役割を果たすことに起因するものであり得る。両者の機能の違いは完全には知られていないが、しかしながら、UPII遺伝子を欠損したマウスであっても小さな尿路上皮プラークを維持し得るところ、UPII遺伝子を欠損したマウスでは尿路上皮プラークが見られなかった。もしUPIIとUPIIが実際に非重複の機能を示しているならば、片方のアイソフォームの測定は、TCCの有効な診断にとって十分でないかもしれない。したがって、抗UPII抗体は、UPアイソフォームのタンパク質発現をより完全にカバーするために必要とされ得る。

30

【0007】

抗UPII抗体の開発は、原発性および転移性ですらあり得るTCCの診断において有用であり得、おそらく以前の臨床研究におけるUPIIのmRNA発現の検証において有用であり得、そして、UPIIとUPII間のタンパク質発現の区別においてさえも有用であり得る。おそらく向上した染色感度を持ち、またおそらく同等のもしくはより優れた染色特異性(例えば抗ウロプラキンII抗体(BC17)と比較して)を保存してさえいる新規の抗ウロプラキンII抗体(例えば、抗ウロプラキンII抗体(BC21))が、本発明において提供されている。

40

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0008】

50

【非特許文献1】Uroplakin II as a promising marker for molecular diagnosis of nodal metastases from bladder cancer: comparison with cytokeratin 20. Wu X, Kakehi Y, Zeng Y, Taoka R, Tsunemori H, Inui M. J Urol . 2005 Dec; 174(6): 2138-42

【非特許文献2】Persistent Uroplakin Expression in Advanced Urothelial Carcinomas: Implications in Urothelial Tumor Progression and Clinical Outcome. Hong-Ying Huang, S hahrokh F. Shariat, Tung-Tien Sun, Herbert Lepor, Ellen Shapiro, Jer-Tsong Hsieh, Raheela Ashfaq, Yair Lotan, and Xue-Ru Wu, Hum Pathol. 2007 November; 38(11): 1703-1713

10

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0009】

発明の開示

本発明の一般的な実施態様には、UPIIを認識するモノクローナル抗体、それを調製する方法もしくは免疫組織化学での使用等が含まれ得る。実施態様において、抗UPII抗体クローン(例えば、抗UPII抗体クローンBC21)は、Balb/cマウスを、E.coli発現により得られたアミノ酸26-155に対応する組み換えヒトUPIIタンパク質で免疫することにより得られる。UPIIタンパク質は、アジュバントとともに、腹腔内接種により、おそらく約3週間の間をあけて約5回、BALB/cマウスに接種され得る。UPIIに対する免疫反応性は組み換えUPIIタンパク質に対するダイレクトELISAによって評価され得る。最も高い抗体価のマウスが、細胞融合によってハイブリドーマを発生させるために選ばれ得る。ヒト組織上のUPIIに対する最も良い反応性を示したハイブリドーマクローンが選ばれ、BC21として指定され得る。BC21クローンはアイソタイプについて試験され得、マウスIgG1/kappaとして同定され得る。BC21抗体は、ハイブリドーマ細胞の大規模組織培養により、またBALB/cマウスの腹水により産生され得る。上清および抗体腹水は集められ得、プロテインAアフィニティカラムにより抗体が精製され得る。BC21は、ELISA、ウェスタンブロットおよびヒト組織においてさえもヒトUPIIタンパク質に対して特異的反応性を実証した。

20

30

【0010】

抗UPII抗体(例えば、マウスモノクローナル抗UPII抗体BC21)は、組織サンプル中のUPIIの検出に有用であり得、おそらくいくつかの顕著な、しかし予期せぬ利点を現在知られている抗UPII抗体に対してもち得る。伝統的な免疫組織化学手順中で用いられる際、抗UPII抗体(例えば、マウスモノクローナル抗UPII抗体BC21)は、公知の抗UPII抗体の特異性とおそらく同様の特異性をもって、UPIIの膜もしくは細胞質における染色をもたらし得る。しかしながら、抗UPII抗体(例えばBC21)は、おそらく過去のUPII抗体と比較して向上した感度を示し得、それにより顕著な進歩を提供し得る。抗UPII抗体(例えばBC21)を用いることで、サンプルの分析は簡単にされ得、そして、腫瘍細胞におけるUPIIの発現は容易に同定可能とされ得、それ以外の場合では診断が難しいもしくは不可能でさえある場合において診断が可能になる。

40

例えば、本発明は、以下の項目を提供する。

(項目1)

アメリカンタイプカルチャーコレクション(ATCC)にATCC特許寄託番号第PT

50

A - 1 3 1 8 1 号で寄託されているハイブリドーマによって産生される抗体もしくはその断片。

(項目 2)

アメリカンタイプカルチャーコレクション (ATCC) に ATCC 特許寄託番号第 P T A - 1 3 1 8 1 号で寄託されているハイブリドーマ細胞。

(項目 3)

項目 2 に記載のハイブリドーマ細胞であって、さらに該ハイブリドーマ細胞によって産生される抗体もしくはその断片を含有するハイブリドーマ細胞。

(項目 4)

項目 1 に記載のモノクローナル抗体を生産する方法であって、以下：
ウロプラキン II を特異的に認識することができるモノクローナル抗体を生産する前記ハイブリドーマを培養する工程；および
該ハイブリドーマに該モノクローナル抗体を生産させる工程、
を包含する方法。

(項目 5)

配列番号 1、配列番号 2 および配列番号 3 からなる群より選択される核酸配列にコードされるアミノ酸配列のポリペプチドを含有する抗体もしくはその断片。

(項目 6)

抗ウロプラキン II 抗体もしくはその断片であって、配列番号 2 もしくは配列番号 3 の核酸配列にコードされるアミノ酸配列を含有する軽鎖可変領域、および配列番号 1 の核酸配列にコードされるアミノ酸配列を含有する重鎖可変領域を含有する該抗体もしくはその断片。

(項目 7)

配列番号 1、配列番号 2 および配列番号 3 からなる群より選択される核酸配列にコードされるアミノ酸配列と少なくとも約 70% の同一性を有するアミノ酸配列を含有する抗体。

(項目 8)

配列番号 1、配列番号 2 および配列番号 3 からなる群より選択される配列と少なくとも約 70% の同一性を有する核酸配列を含有する、単離および精製された核酸配列。

(項目 9)

項目 7 もしくは 8 に記載の配列であって、前記少なくとも約 70% の同一性は、配列番号 1 に対する少なくとも約 70% の同一性ならびに配列番号 2 もしくは配列番号 3 に対する少なくとも約 70% の同一性を包含する配列。

(項目 10)

項目 9 に記載の配列であって、前記少なくとも約 70% の同一性は、少なくとも約 71%、少なくとも約 72%、少なくとも約 73%、少なくとも約 74%、少なくとも約 75%、少なくとも約 76%、少なくとも約 77%、少なくとも約 78%、少なくとも約 79%、少なくとも約 80%、少なくとも約 81%、少なくとも約 82%、少なくとも約 83%、少なくとも約 84%、少なくとも約 85%、少なくとも約 86%、少なくとも約 87%、少なくとも約 88%、少なくとも約 89%、少なくとも約 90%、少なくとも約 91%、少なくとも約 92%、少なくとも約 93%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、および少なくとも約 99% からなる群から選択される割合を包含する配列。

(項目 11)

配列番号 4 の残基を含有するアミノ酸配列を有する少なくとも 1 つのポリペプチドに特異的に結合する、抗体もしくはその断片。

(項目 12)

少なくとも 2 つの抗体もしくはその断片を含有する組成物であって、該少なくとも 2 つの抗体もしくはその断片のうちの少なくとも 1 つが少なくともウロプラキン II に特異的に結合する、組成物。

10

20

30

40

50

(項目13)

項目12に記載の組成物であって、少なくともウロプラキンIIに特異的に結合する前記少なくとも2つの抗体もしくはその断片のうちの前記少なくとも1つは、前記少なくとも2つの抗体もしくはその断片のうちウロプラキンIIに特異的に結合し、そして、染色された細胞の1%より大きい陽性を指示するカットオフ値を有する、少なくとも1つを包含する、組成物。

(項目14)

項目12に記載の組成物であって、少なくともウロプラキンIIに特異的に結合する前記少なくとも2つの抗体もしくはその断片のうちの前記少なくとも1つは、ウロプラキンIIに特異的に結合し、そして、以下：

- 染色された細胞の約2%より大きい；
- 染色された細胞の約3%より大きい；
- 染色された細胞の約4%より大きい；
- 染色された細胞の約5%より大きい；
- 染色された細胞の約6%より大きい；
- 染色された細胞の約7%より大きい；
- 染色された細胞の約8%より大きい；
- 染色された細胞の約9%より大きい；および

染色された細胞の約10%より大きい、からなる群から選択される陽性を指示するカットオフ値を有する、前記少なくとも2つの抗体もしくはその断片のうち少なくとも1つを包含する、組成物。

(項目15)

項目12に記載の組成物であって、前記少なくとも2つの抗体もしくはその断片うちの、前記少なくとも1つは、配列番号2もしくは配列番号3の核酸配列にコードされるアミノ酸配列を含有する軽鎖可変領域および配列番号1の核酸配列にコードされるアミノ酸配列を含有する重鎖可変領域を含有する、組成物。

(項目16)

項目12に記載の組成物であって、前記少なくとも2つの抗体もしくはその断片のうちの前記少なくとも1つは、配列番号2もしくは配列番号3の核酸配列にコードされるアミノ酸配列と少なくとも約70%の同一性を有するアミノ酸配列を含有する軽鎖可変領域および配列番号1の核酸配列にコードされるアミノ酸配列と少なくとも約70%の同一性を有するアミノ酸配列を含有する重鎖可変領域を含有する、組成物。

(項目17)

項目16に記載の組成物であって、前記少なくとも約70%の同一性は、少なくとも約71%、少なくとも約72%、少なくとも約73%、少なくとも約74%、少なくとも約75%、少なくとも約76%、少なくとも約77%、少なくとも約78%、少なくとも約79%、少なくとも約80%、少なくとも約81%、少なくとも約82%、少なくとも約83%、少なくとも約84%、少なくとも約85%、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、および少なくとも約99%からなる群から選択される割合を包含する、組成物。

(項目18)

項目12に記載の組成物であって、前記少なくとも2つの抗体もしくはその断片のうちの前記少なくとも1つは、配列番号4の残基を包含するアミノ酸配列を有する少なくとも1つのポリペプチドに特異的に結合する、組成物。

(項目19)

項目12に記載の組成物であって、前記少なくとも2つの抗体もしくはその断片のうちの前記少なくとも1つは、配列番号4の残基に対する少なくとも70%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する少なくとも1つのポリペプチドに特異的に結合する、組成物。

10

20

30

40

50

(項目20)

項目19に記載の組成物であって、前記少なくとも約70%の同一性は、少なくとも約71%、少なくとも約72%、少なくとも約73%、少なくとも約74%、少なくとも約75%、少なくとも約76%、少なくとも約77%、少なくとも約78%、少なくとも約79%、少なくとも約80%、少なくとも約81%、少なくとも約82%、少なくとも約83%、少なくとも約84%、少なくとも約85%、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、および少なくとも99%からなる群から選択される割合を包含する、組成物。

10

(項目21)

項目12に記載の組成物であって、前記少なくとも2つの抗体もしくはその断片のうちの前記少なくとも1つは、アメリカンタイプカルチャーコレクション(ATCC)にATCC特許寄託番号第PTA-13181号で寄託されているハイブリドーマによって産生される抗体もしくはその断片を含む、組成物。

(項目22)

項目12に記載の組成物であって、1次抗体混合物を含有する、組成物。

(項目23)

項目12に記載の組成物であって、前記少なくとも2つの抗体もしくはその断片は、少なくとも2種の異なった生物種に由来する、組成物。

20

(項目24)

項目23に記載の組成物であって、前記少なくとも2種の異なった生物種は、マウス、ウサギ、ヤギ、ウマ、ニワトリ、ヒトおよびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される、組成物。

(項目25)

項目12に記載の組成物であって、前記少なくとも2つの抗体もしくはその断片は、二重染色手順を包含する、組成物。

(項目26)

項目12に記載の組成物であって、前記少なくとも2つの抗体もしくはその断片は、異なる可視化の結果を提供することが可能である、組成物。

30

(項目27)

項目26に記載の組成物であって、前記可視化の結果は色彩の結果を包含する、組成物。

(項目28)

項目12に記載の組成物であって、前記少なくとも2つの抗体もしくはその断片のうちの前記抗原に特異的に結合する抗体もしくはその断片でない少なくとも1つの抗体もしくはその断片は、GATA-3、p63、ウロプラキンIII、PAX8、NKX3.1、PSA、p40およびその任意の組み合わせからなる群より選択される抗原に特異的に結合する組成物。

(項目29)

項目12に記載の組成物であって、前記少なくとも2つの抗体もしくはその断片は、以下：

- ウロプラキンIIおよびGATA-3；
- ウロプラキンIIおよびp63；
- ウロプラキンIIおよびウロプラキンIII；
- ウロプラキンIIおよびPAX8；
- ウロプラキンIIおよびNKX3.1；
- ウロプラキンIIおよびPSA；
- ウロプラキンII、ウロプラキンIIIおよびGATA-3；
- ウロプラキンII、PAX8およびPSA；

40

50

- ウロブラキン I I、P A X 8 および N K X 3 . 1 ; ならびに

- ウロブラキン I I および p 4 0、

からなる群より選択されるタンパク質にそれぞれ特異的に結合する、組成物。

(項目 3 0)

項目 1 2 に記載の組成物であって、尿路上皮癌検出組成物、腎細胞癌検出組成物、前立腺癌検出組成物およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される検出組成物を含有する、組成物。

(項目 3 1)

ウロブラキン I I に特異的に結合し、そして、染色された細胞の 1 % より大きい陽性を指示するカットオフ値を有する、モノクローナル抗体もしくはその断片。

10

(項目 3 2)

項目 3 1 に記載のモノクローナル抗体もしくはその断片であって、前記陽性を指示するカットオフ値が以下：

- 染色された細胞の約 2 % より大きい；

- 染色された細胞の約 3 % より大きい；

- 染色された細胞の約 4 % より大きい；

- 染色された細胞の約 5 % より大きい；

- 染色された細胞の約 6 % より大きい；

- 染色された細胞の約 7 % より大きい；

- 染色された細胞の約 8 % より大きい；

- 染色された細胞の約 9 % より大きい；および

- 染色された細胞の約 1 0 % より大きい、

20

からなる群から選択される、モノクローナル抗体もしくはその断片。

(項目 3 3)

項目 5、6、1 1、1 2 もしくは 3 1 のいずれかに記載の抗体であって、該抗体もしくはその断片はアメリカンタイプカルチャーコレクションに A T C C 特許寄託番号第 P T A - 1 3 1 8 1 号で寄託されているハイブリドーマ細胞によって産生される、抗体。

(項目 3 4)

項目 1、3、1 1 もしくは 3 1 のいずれかに記載の抗体であって、該抗体もしくはその断片は、配列番号 1、配列番号 2 および配列番号 3 からなる群より選択される核酸配列にコードされるアミノ酸配列のポリペプチドを含有する、抗体。

30

(項目 3 5)

項目 1、3、1 1 もしくは 3 1 のいずれかに記載の抗体であって、該抗体もしくはその断片は、配列番号 1 および配列番号 2 または配列番号 3 の核酸配列にコードされるアミノ酸配列のポリペプチドを含有する、抗体。

(項目 3 6)

項目 1、3、1 1 もしくは 3 1 のいずれかに記載の抗体であって、該抗体もしくはその断片は、配列番号 1 および配列番号 2 または配列番号 3 の核酸配列にコードされるアミノ酸配列に対する少なくとも約 7 0 % の同一性を有するポリペプチドを含有する、抗体。

(項目 3 7)

項目 1、3、1 1 もしくは 3 1 のいずれかに記載の抗体であって、該抗体もしくはその断片は、配列番号 1 および配列番号 2 もしくは配列番号 3 の核酸配列にコードされるアミノ酸配列に対する少なくとも約 7 0 % の同一性を有するポリペプチドを含有する、抗体。

40

(項目 3 8)

項目 1、3、5 もしくは 3 1 のいずれかに記載の抗体であって、該抗体もしくはその断片は、配列番号 4 の残基を含有するアミノ酸配列を有する少なくとも 1 つのポリペプチドに特異的に結合する、抗体。

(項目 3 9)

項目 1、3、5 もしくは 3 1 のいずれかに記載の抗体であって、該抗体もしくはその断片は、配列番号 4 の残基に対する少なくとも約 7 0 % の同一性を有するアミノ酸配列を有

50

する少なくとも1つのポリペプチドに特異的に結合する、抗体。

(項目40)

項目39に記載の抗体であって、前記少なくとも約70%の同一性は、少なくとも約71%、少なくとも約72%、少なくとも約73%、少なくとも約74%、少なくとも約75%、少なくとも約76%、少なくとも約77%、少なくとも約78%、少なくとも約79%、少なくとも約80%、少なくとも約81%、少なくとも約82%、少なくとも約83%、少なくとも約84%、少なくとも約85%、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、および少なくとも99%からなる群から選択される割合を包含する、抗体。

10

(項目41)

項目1、3、5、6、11、12もしくは31のいずれかに記載の抗体であって、該抗体はモノクローナル抗体を含有する、抗体。

(項目42)

項目41に記載の抗体であって、前記モノクローナル抗体は染色された細胞の1%より大きい陽性を指示するカットオフ値を有する、抗体。

(項目43)

項目42に記載の抗体であって、前記陽性を指示するカットオフ値が以下：

- 染色された細胞の約2%より大きい；
- 染色された細胞の約3%より大きい；
- 染色された細胞の約4%より大きい；
- 染色された細胞の約5%より大きい；
- 染色された細胞の約6%より大きい；
- 染色された細胞の約7%より大きい；
- 染色された細胞の約8%より大きい；
- 染色された細胞の約9%より大きい；および
- 染色された細胞の約10%より大きい、

からなる群より選択される、抗体。

20

(項目44)

項目41に記載の抗体であって、前記モノクローナル抗体は、マウスモノクローナル抗体、ウサギモノクローナル抗体、ヤギモノクローナル抗体、ウマモノクローナル抗体、ニワトリモノクローナル抗体、ヒト化モノクローナル抗体、キメラ抗体およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される、抗体。

30

(項目45)

項目1、3、5、6、11、12もしくは31のいずれかに記載の抗体であって、該抗体はポリクローナル抗体を包含する、抗体。

(項目46)

項目45に記載の抗体であって、前記ポリクローナル抗体は、ウサギポリクローナル抗体、マウスポリクローナル抗体、ヤギポリクローナル抗体、ウマポリクローナル抗体、ニワトリポリクローナル抗体、ヒト化ポリクローナル抗体およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される、抗体。

40

(項目47)

項目1、3、5、6、11、12もしくは31のいずれかに記載の抗体であって、該抗体は単離された抗体を包含する、抗体。

(項目48)

項目1、3、5、6、11、12もしくは31のいずれかに記載の抗体であって、前記抗体の断片は抗体の抗原結合断片を包含する、抗体。

(項目49)

項目1、3、5、6、11、12もしくは31のいずれかに記載の抗体であって、さら

50

に前記抗体もしくはその断片に結合された標識を含有する、抗体。

(項目50)

標識と結合体化された項目1、3、5、6、11、12もしくは31に記載の抗体もしくはその断片を含有する、癌診断剤。

(項目51)

項目49に記載の抗体であって、前記標識は、放射性元素、磁性粒子、放射性同位体、蛍光色素、酵素、毒素、信号、色素、検出酵素、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)、アルカリホスファターゼ(AP)、 α -ガラクトシダーゼ、色素原、FAST RED、3,3'-ジアミノベンジジン、3-アミノ-9-エチルカルバゾール、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリルホスフェート、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル-D-グルクロニドおよびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される、抗体。

10

(項目52)

項目50に記載の抗体であって、前記標識は、放射性元素、磁性粒子、放射性同位体、蛍光色素、酵素、毒素、信号、色素、検出酵素、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)、アルカリホスファターゼ(AP)、 α -ガラクトシダーゼ、色素原、FAST RED、3,3'-ジアミノベンジジン、3-アミノ-9-エチルカルバゾール、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリルホスフェート、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル-D-グルクロニドおよびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される、抗体。

20

(項目53)

診断のもしくは予後の検査キットであって以下：
- 項目1、3、5、6、11、12もしくは31に記載の抗体もしくはその断片；および
- 抗原に結合した場合の該抗体もしくは該その断片の抗体検出要素、
を含有する、検査キット。

(項目54)

項目53のキットを用いて生物学的サンプル中のウロプラキンIIを検出する方法であって、以下：
- 生物学的サンプルを前記抗体もしくはその断片と接触させる工程；および
- 前記抗体検出要素を用いて該抗体もしくは該その断片と該生物学的サンプル中の抗原との結合を検出する工程、
を包含する、方法。

30

(項目55)

項目1、3、5、6もしくは11のいずれかに記載の抗体であって、前記抗体もしくは前記その断片はウロプラキンIIに特異的に結合する、抗体。

(項目56)

癌を検出するための項目1、3、5、6、11もしくは31に記載の抗体もしくはその断片または組成物の使用。

(項目57)

癌の診断もしくは予後のための項目1、3、5、6、11もしくは31に記載の抗体もしくはその断片または組成物の使用。

40

(項目58)

癌の治療の転帰を予想するための項目1、3、5、6、11もしくは31に記載の抗体もしくはその断片または組成物の使用。

(項目59)

項目1、3、5、6、11もしくは31のいずれかに記載の抗体もしくはその断片または組成物の、癌の治療の有効性を評価するための使用。

(項目60)

癌の再発を予想するための項目1、3、5、6、11もしくは31に記載の抗体もしくはその断片または組成物の使用。

50

(項目 6 1)

項目 5 6 に記載の抗体もしくはその断片または組成物であって、前記抗体もしくはその断片または組成物の前記使用が、自動化染色装置上で行われる、抗体もしくはその断片または組成物。

(項目 6 2)

項目 5 6 に記載の抗体もしくはその断片または組成物であって、前記検出が手動で行われる、抗体もしくはその断片または組成物。

(項目 6 3)

項目 5 6 に記載の抗体もしくはその断片または組成物であって、前記検出が自動で行われる、抗体もしくはその断片または組成物。

10

(項目 6 4)

項目 5 6 に記載の抗体もしくはその断片または組成物であって、前記検出が画像解析によって行われる、抗体もしくはその断片または組成物。

(項目 6 5)

生物学的サンプルに対して項目 1、3、5、6、11、12 もしくは 31 の抗体もしくはその断片が結合するタンパク質を検出する方法であって、生物学的サンプルを該抗体もしくはその断片と接触させる工程；および該生物学的サンプル中の該タンパク質に結合した該抗体もしくはその断片の存在を検出する工程、を包含する方法。

(項目 6 6)

項目 6 5 に記載の方法であって、前記生物学的サンプルは、血液、尿、尿路上皮組織、移行細胞組織および膀胱組織を包含する、方法。

20

(項目 6 7)

項目 6 5 に記載の方法であって、前記生物学的サンプルは、正常組織、新生物性組織、膀胱組織、腎臓組織、卵巣組織、甲状腺組織、子宮内膜組織、腎性組織、扁桃腺組織、膵臓組織、結腸組織、リンパ節組織、胃組織、前立腺組織、肺組織および胸部組織からなる群より選択される、方法。

(項目 6 8)

項目 6 5 に記載の方法であって、前記タンパク質に結合した抗体もしくはその断片の前記存在を検出する前記工程は、自動化染色装置上で行われる、方法。

(項目 6 9)

項目 6 5 に記載の方法であって、前記タンパク質に結合した抗体もしくはその断片の前記存在を検出する前記工程が手動で行われる、方法。

30

(項目 7 0)

項目 6 5 に記載の方法であって、前記タンパク質に結合した抗体もしくはその断片の前記存在を検出する前記工程が自動で行われる、方法。

(項目 7 1)

項目 6 5 に記載の方法であって、前記タンパク質に結合した抗体もしくはその断片の前記存在を検出する前記工程はが画像解析によって行われる、方法。

(項目 7 2)

項目 6 5 に記載の方法であって、前記検出は免疫組織化学 (I H C)、 F F P E の I H C、凍結組織切片の I H C、免疫細胞化学および E L I S A からなる群より選択される方法を包含する、方法。

40

(項目 7 3)

生物学的サンプル中の少なくとも 2 つの異なるタンパク質を検出する方法であって、以下：

- 該生物学的サンプルと、少なくとも 2 つの抗体もしくはその断片を含有する組成物とを接触させる工程であって、該少なくとも 2 つの抗体もしくはその断片のうち少なくとも 1 つが少なくともウロプラキン I I に特異的に結合して抗原 - 抗体複合体を形成する工程；および

- 該抗原 - 抗体複合体を検出する工程、

50

を包含する、方法。

(項目74)

項目73に記載の方法であって、少なくともウロプラキンIIに特異的に結合する前記少なくとも2つの抗体もしくはその断片のうちの前記少なくとも1つは、少なくともウロプラキンIIに特異的に結合し、そして、染色された細胞の1%より大きい陽性を指示するカットオフ値を有する該少なくとも2つの抗体もしくはその断片のうちの前記少なくとも1つを包含する、方法。

(項目75)

項目74に記載の方法であって、陽性を指示するカットオフ値は以下：

- 染色された細胞の約2%より大きい；
- 染色された細胞の約3%より大きい；
- 染色された細胞の約4%より大きい；
- 染色された細胞の約5%より大きい；
- 染色された細胞の約6%より大きい；
- 染色された細胞の約7%より大きい；
- 染色された細胞の約8%より大きい；
- 染色された細胞の約9%より大きい；および
- 染色された細胞の約10%より大きい、

からなる群より選択される、方法。

(項目76)

項目73に記載の方法であって、前記少なくとも2つの抗体もしくはその断片は、少なくとも1つの第一の1次抗体および少なくとも1つの第二の1次抗体を包含する、方法。

(項目77)

項目73に記載の方法であって、前記少なくとも2つの抗体もしくはその断片のうちの前記少なくとも1つは、配列番号2もしくは配列番号3の核酸配列にコードされるアミノ酸配列を含有する軽鎖可変領域および配列番号1の核酸配列にコードされるアミノ酸配列を含有する重鎖可変領域を含有する、方法。

(項目78)

項目73に記載の方法であって、前記少なくとも2つの抗体もしくはその断片のうちの前記少なくとも1つは、配列番号2もしくは配列番号3の核酸配列にコードされるアミノ酸配列と少なくとも約70%の同一性を有するアミノ酸配列を含有する軽鎖可変領域および配列番号1の核酸配列にコードされるアミノ酸配列と少なくとも約70%の同一性を有するアミノ酸配列を含有する重鎖可変領域を含有する、方法。

(項目79)

項目78に記載の方法であって、前記少なくとも約70%の同一性は、少なくとも約71%、少なくとも約72%、少なくとも約73%、少なくとも約74%、少なくとも約75%、少なくとも約76%、少なくとも約77%、少なくとも約78%、少なくとも約79%、少なくとも約80%、少なくとも約81%、少なくとも約82%、少なくとも約83%、少なくとも約84%、少なくとも約85%、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、および少なくとも約99%からなる群から選択される割合を包含する、方法。

(項目80)

項目73に記載の方法であって、前記少なくとも2つの抗体もしくはその断片のうちの前記少なくとも1つは、配列番号4の残基を包含するアミノ酸配列を有する少なくとも1つのポリペプチドに特異的に結合する、方法。

(項目81)

項目73に記載の方法であって、前記少なくとも2つの抗体もしくはその断片のうちの前記少なくとも1つは、配列番号4の残基に対する少なくとも約70%の配列同一性を有

10

20

30

40

50

するアミノ酸配列を有する少なくとも1つのポリペプチドに特異的に結合する、方法。

(項目82)

項目81に記載の方法であって、前記少なくとも約70%の同一性は、少なくとも約71%、少なくとも約72%、少なくとも約73%、少なくとも約74%、少なくとも約75%、少なくとも約76%、少なくとも約77%、少なくとも約78%、少なくとも約79%、少なくとも約80%、少なくとも約81%、少なくとも約82%、少なくとも約83%、少なくとも約84%、少なくとも約85%、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、および少なくとも99%からなる群から選択される割合を包含する、方法。

10

(項目83)

項目73に記載の方法であって、前記少なくとも2つの抗体もしくはその断片のうちの前記少なくとも1つは、アメリカンタイプカルチャーコレクション(ATCC)にATCC特許寄託番号PTA-13181号で寄託されているハイブリドーマによって産生される抗体もしくはその断片を包含する、方法。

(項目84)

項目73に記載の方法であって、前記組成物は、1次抗体混合物を含有する、方法。

(項目85)

項目73に記載の方法であって、前記少なくとも2つの抗体もしくはその断片は、少なくとも2種の異なった生物種に由来する、方法。

20

(項目86)

項目85に記載の方法であって、前記少なくとも2種の異なった生物種は、マウス、ウサギ、ヤギ、ウマ、ニワトリ、ヒトおよびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される、方法。

(項目87)

項目73に記載の方法であって、さらに前記生物学的サンプルの二重染色工程を包含する、方法。

(項目88)

項目73に記載の方法であって、さらに異なる可視化の結果を提供する工程を包含する、方法。

30

(項目89)

項目88に記載の方法であって、前記可視化の結果は色彩の結果を包含する、方法。

(項目90)

項目73に記載の方法であって、前記少なくとも2つの抗体もしくはその断片は、以下

- ウロブラキンIIおよびGATA-3;
- ウロブラキンIIおよびp63;
- ウロブラキンIIおよびウロブラキンIII;
- ウロブラキンIIおよびPAX8;
- ウロブラキンIIおよびNKX3.1;
- ウロブラキンIIおよびPSA;
- ウロブラキンII、ウロブラキンIIIおよびGATA-3;
- ウロブラキンII、PAX8およびPSA;
- ウロブラキンII、PAX8およびNKX3.1;ならびに
- ウロブラキンIIおよびp40、

40

からなる群より選択されるタンパク質にそれぞれ特異的に結合する、方法。

(項目91)

項目73に記載の方法であって、前記抗原-抗体複合体を検出する前記工程は、前記サンプル上で少なくとも2つの抗原-抗体複合体の形成を検出する工程であって、前記第一

50

の抗体はウロプラキン I I に特異的に結合し、前記第二の抗体は G A T A - 3、p 6 3、ウロプラキン I I I、P A X 8、N K X 3 . 1、P S A、p 4 0 およびその任意の組み合わせからなる群より選択される抗原に特異的に結合する工程を包含する、方法。

(項目 9 2)

動物もしくはヒト中のウロプラキン I I タンパク質を検出するイムノアッセイ法であって、下記：

- 試験される動物もしくはヒトから組織を得る工程；

- 該組織を項目 1、3、5、6、11、12 もしくは 31 に記載の抗体もしくはその断片と、該組織にウロプラキン I I タンパク質が存在した場合に該抗体もしくはその断片が該タンパク質に結合するような量および条件で接触させる工程；ならびに

- 該結合した抗体の存在を検出する工程、

を包含する、イムノアッセイ法。

(項目 9 3)

項目 9 2 に記載の、動物もしくはヒト中のウロプラキン I I タンパク質を検出するイムノアッセイ法であって、さらに前記組織を固定または凍結する工程を包含する、イムノアッセイ法。

(項目 9 4)

項目 9 3 に記載の、動物もしくはヒト中のウロプラキン I I タンパク質を検出するイムノアッセイ法であって、前記固定もしくは凍結された組織を、ウロプラキン I I のエピトープを露出させるために処理する工程をさらに包含する、イムノアッセイ法。

(項目 9 5)

項目 9 2 に記載の、ウロプラキン I I タンパク質を検出するイムノアッセイ法であって、さらに免疫組織化学 (I H C)、F F P E の I H C、凍結組織切片の I H C、免疫細胞化学および E L I S A からなる群より選択される方法を用いて前記動物もしくはヒト中の前記ウロプラキン I I を検出する工程を包含する、イムノアッセイ法。

(項目 9 6)

ウロプラキン I I タンパク質に特異的に結合する抗体の単離された調製物であって、該抗体は配列番号 4 (該ウロプラキン I I タンパク質の 36 - 50 残基) のペプチド中のエピトープに結合する、調製物。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図 1】図 1 は、膀胱 T C C 組織 (グレード 3) における抗 U P I I 抗体 (B C 2 1) の染色の例を示している。

【図 2】図 2 は、図 1 と同一の膀胱 T C C 組織の連続切片における抗 U P I I I 抗体 (B C 1 7) の染色の例を示している。

【図 3】図 3 は、膀胱 T C C 組織 (グレード 2) における抗 U P I I 抗体 (B C 2 1) の染色の例を示している。

【図 4】図 4 は、図 3 と同一の膀胱 T C C 組織の連続切片における抗 U P I I I 抗体 (B C 1 7) の染色の例を示している。

【図 5】図 5 は、膀胱 T C C 組織 (グレード 3) における抗 U P I I 抗体 (B C 2 1) の染色の例を示している。

【図 6】図 6 は、図 5 と同一の膀胱 T C C 組織の連続切片における抗 U P I I I 抗体 (B C 1 7) の染色の例を示している。

【図 7】図 7 は、膀胱 T C C 組織 (グレード 3) における抗 U P I I 抗体 (B C 2 1) の染色の例を示している。

【図 8】図 8 は、図 7 と同一の膀胱 T C C 組織の連続切片における抗 U P I I I 抗体 (B C 1 7) の染色の例を示している。

【図 9】図 9 A および 9 B は、B C 2 1 および B C 1 7 抗体とウロプラキン I I タンパク質およびウロプラキン I I I タンパク質の交差反応性をウェスタンブロットによって示したものである。

10

20

30

40

50

【図10】図10は、UPIIとUPIIIの混合物の尿路上皮癌腫の染色の例を示している。UPIIの染色（茶色）は膜性および細胞質性である。

【図11】図11は、UPIIとGATA3の混合物の尿路上皮癌腫の染色の例を示している。UPIIの染色（赤）は膜性および細胞質性である。GATA3の染色（茶色）は核性である。

【図12】図12は、UPIIとGATA3の混合物の尿路上皮癌腫の染色の例を示している。UPIIの染色（赤）は膜性および細胞質性である。GATA3の染色（茶色）は核性である。

【図13】図13は、UPIIとUPIIIとGATA3の混合物の尿路上皮癌腫の染色の例を示している。UPIIおよびUPIIIの染色（赤）は膜性および細胞質性である。GATA3の染色（茶色）は核性である。

10

【図14】図14は、UPIIとPAX8の混合物の尿路上皮癌腫の染色の例を示している。UPIIの染色（赤）は膜性および細胞質性である。PAX8の染色（核性、茶色）はこのサンプルでは減少、あるいはおそらく消失している。

【図15】図15は、UPIIとPAX8の混合物の尿路上皮癌腫の染色の例を示している。UPIIの染色（赤）は膜性および細胞質性である。PAX8の染色（核性、茶色）はこのサンプルでは減少、あるいはおそらく消失している。

【図16】図16はUPIIとPAX8の混合物の腎細胞癌腫の染色の例を示している。PAX8の染色（茶色）は核性である。UPIIの染色（膜性および細胞質性、赤）はこのサンプルでは減少、あるいはおそらく消失している。

20

【図17】図17はUPIIとPAX8の混合物の腎細胞癌腫の染色の例を示している。PAX8の染色（茶色）は核性である。UPIIの染色（膜性および細胞質性、赤）はこのサンプルでは減少、あるいはおそらく消失している。

【図18】図18は、UPIIとPAX8とPSAの混合物の尿路上皮癌腫の染色の例を示している。UPIIの染色（赤）は膜性および細胞質性である。PAX8およびPSAの染色（それぞれ核性および細胞質性、茶色）はこのサンプルでは減少、あるいはおそらく消失している。

【図19】図19は、UPIIとPAX8とPSAの混合物の腎細胞癌腫の染色の例を示している。PAX8の染色（茶色）は細胞質性である、UPIIの染色（膜性および細胞質性、赤）およびPSAの染色（細胞質性、茶色）はこのサンプルでは減少、あるいはおそらく消失している。

30

【図20】図20は、UPIIとPAX8とPSAの混合物の前立腺癌の染色の例を示している。PSAの染色（茶色）は細胞質性である。UPIIの染色（膜性および細胞質性、赤）およびPAX8の染色（核性、茶色）はこのサンプルでは減少、あるいはおそらく消失している。

【図21】図21は、UPIIとPAX8とPSAの混合物の尿路上皮癌腫の染色の例を示している。UPIIの染色（茶色）は膜性および細胞質性である。PAX8およびPSAの染色（それぞれ核性および細胞質性、赤）はこのサンプルでは減少、あるいはおそらく消失している。

【図22】図22は、UPIIとPAX8とPSAの混合物の腎細胞癌腫の染色の例を示している。PAX8の染色（赤）は核性である。UPIIの染色（膜性および細胞質性、茶色）およびPSAの染色（細胞質性、赤）はこのサンプルでは減少、あるいはおそらく消失している。

40

【図23】図23は、UPIIとPAX8とPSAの混合物の前立腺癌の染色の例を示している。PSAの染色（赤）は細胞質性である。UPIIの染色（膜性および細胞質性、茶色）およびPAX8の染色（核性、赤）はこのサンプルでは減少、あるいはおそらく消失している。

【図24】図24は、UPIIとNKX3.1の混合物の尿路上皮癌腫の染色の例を示している。UPIIの染色（赤）は膜性および細胞質性である。NKX3.1の染色（核性、茶色）はこのサンプルでは減少、あるいはおそらく消失している。

50

【図25】図25は、UPIIとNKX3.1の混合物の前立腺癌の染色の例を示している。NKX3.1の染色(茶色)は核性である。UPIIの染色(膜性および細胞質性、赤色)はこのサンプルでは減少、あるいはおそらく消失している。

【図26】図26は、UPIIとPAX8とNKX3.1の混合物の尿路上皮癌腫の染色の例を示している。UPIIの染色(茶色)は膜性および細胞質性である。PAX8の染色(核性、茶色)およびNKX3.1の染色(核性、赤)はこのサンプルでは減少、あるいはおそらく消失している。

【図27】図27は、UPIIとPAX8とNKX3.1の混合物の腎細胞癌腫の染色の例を示している。PAX8の染色(茶色)は核性である。UPIIの染色(膜性および細胞質性、茶色)およびNKX3.1の染色(核性、赤)はこのサンプルでは減少、あるいはおそらく消失している。

10

【図28】図28は、UPIIとPAX8とNKX3.1の混合物の前立腺癌の染色の例を示している。NKX3.1の染色(赤)は核性である。UPIIの染色(膜性および細胞質性、茶色)およびPAX8の染色(核性、茶色)はこのサンプルでは減少、あるいはおそらく消失している。

【図29】図29は、UPIIとp63の混合物の尿路上皮癌腫の染色の例を示している。p63の染色(茶色)は核性である。UPIIの染色(赤)は膜性および細胞質性である。

【図30】図30は、UPIIとp63の混合物の尿路上皮癌腫の染色の例を示している。UPIIの染色(茶色)は膜性および細胞質性である。p63の染色(核性、茶色)はこのサンプルでは減少、あるいは消失している。

20

【図31】図31は、UPIIとp63の混合物の前立腺上皮内新生物(PIN)の染色の例を示している。p63の染色(茶色)は核性である。UPIIの染色(膜性および細胞質性、茶色)はこのサンプルでは減少、あるいは消失している。

【図32】図32は、UPIIとp63の混合物の正常前立腺の染色の例を示している。p63の染色(茶色)は核性である。UPIIの染色(膜性および細胞質性、茶色)はこのサンプルでは減少、あるいは消失している。

【図33】図33は、UPIIとp63の混合物の尿路上皮癌腫の染色の例を示している。p40の染色(茶色)は核性である。UPIIの染色(赤)は膜性および細胞質性である。

30

【図34】図34は、本発明の様々な実施態様に従いキットの模式的な概要の例を示している。

【図35】図35は、本発明の様々な実施態様に従い免疫アッセイ法の模式的な概要の例を示している。

【図36】図36は、図1のカラー版であり、膀胱TCC組織(グレード3)における抗UPII抗体(BC21)の染色の例を示している。

【図37】図37は、図2のカラー版であり、図36と同一の膀胱TCC組織の連続切片における抗UPII抗体(BC17)の染色の例を示している。

【図38】図38は、図3のカラー版であり、膀胱TCC組織(グレード2)における抗UPII抗体(BC21)の染色の例を示している。

40

【図39】図39は、図4のカラー版であり、図38と同一の膀胱TCC組織の連続切片における抗UPII抗体(BC17)の染色の例を示している。

【図40】図40は、図5のカラー版であり、膀胱TCC組織(グレード3)における抗UPII抗体(BC21)の染色の例を示している。

【図41】図41は、図6のカラー版であり、図40と同一の膀胱TCC組織の連続切片における抗UPII抗体(BC17)の染色の例を示している。

【図42】図42は、図7のカラー版であり、膀胱TCC組織(グレード3)における抗UPII抗体(BC21)の染色の例を示している。

【図43】図43は、図8のカラー版であり、図42と同一の膀胱TCC組織の連続切片における抗UPII抗体(BC17)の染色の例を示している。

50

【図44】図44Aおよび44Bは図9Aおよび9Bのカラー版であり、BC21およびBC17抗体とウロプラキニンIIタンパク質およびウロプラキニンIIIタンパク質の交差反応性をウェスタンブロットによって示したものである。

【図45】図45は、図10のカラー版であり、UPIIとUPIIIの混合物の尿路上皮癌腫の染色の例を示している。UPIIの染色(茶色)は膜性および細胞質性である。

【図46】図46は、図11のカラー版であり、UPIIとGATA3の混合物の尿路上皮癌腫の染色の例を示している。UPIIの染色(赤)は膜性および細胞質性である。GATA3の染色(茶色)は核性である。

【図47】図47は、図12のカラー版であり、UPIIとGATA3の混合物の尿路上皮癌腫の染色の例を示している。UPIIの染色(赤)は膜性および細胞質性である。GATA3の染色(茶色)は核性である。

10

【図48】図48は、図13のカラー版であり、UPIIとUPIIIとGATA3の混合物の尿路上皮癌腫の染色の例を示している。UPIIおよびUPIIIの染色(赤)は膜性および細胞質性である。GATA3の染色(茶色)は核性である。

【図49】図49は、図14のカラー版であり、UPIIとPAX8の混合物の尿路上皮癌腫の染色の例を示している。UPIIの染色(赤)は膜性および細胞質性である。PAX8の染色(核性、茶色)はこのサンプルでは減少、あるいはおそらく消失している。

【図50】図50は、図15のカラー版であり、UPIIとPAX8の混合物の尿路上皮癌腫の染色の例を示している。UPIIの染色(赤)は膜性および細胞質性である。PAX8の染色(核性、茶色)はこのサンプルでは減少、あるいはおそらく消失している。

20

【図51】図51は、図16のカラー版であり、UPIIとPAX8の混合物の腎細胞癌腫の染色の例を示している。PAX8の染色(茶色)は核性である。UPIIの染色(膜性および細胞質性、赤)はこのサンプルでは減少、あるいはおそらく消失している。

【図52】図52は図17のカラー版であり、UPIIとPAX8の混合物の腎細胞癌腫の染色の例を示している。PAX8の染色(茶色)は核性である。UPIIの染色(膜性および細胞質性、赤)はこのサンプルでは減少、あるいはおそらく消失している。

【図53】図53は、図18のカラー版であり、UPIIとPAX8とPSAの混合物の尿路上皮癌腫の染色の例を示している。UPIIの染色(赤)は膜性および細胞質性である。PAX8およびPSAの染色(それぞれ核性および細胞質性、茶色)はこのサンプルでは減少、あるいはおそらく消失している。

30

【図54】図54は、図19のカラー版であり、UPIIとPAX8とPSAの混合物の腎細胞癌腫の染色の例を示している。PAX8の染色(茶色)は細胞質性である、UPIIの染色(膜性および細胞質性、赤)およびPSAの染色(細胞質性、茶色)はこのサンプルでは減少、あるいはおそらく消失している。

【図55】図55は、図20のカラー版であり、UPIIとPAX8とPSAの混合物の前立腺癌の染色の例を示している。PSAの染色(茶色)は細胞質性である。UPIIの染色(膜性および細胞質性、赤)およびPAX8の染色(核性、茶色)はこのサンプルでは減少、あるいはおそらく消失している。

【図56】図56は、図21のカラー版であり、UPIIとPAX8とPSAの混合物の尿路上皮癌腫の染色の例を示している。UPIIの染色(茶色)は膜性および細胞質性である。PAX8およびPSAの染色(それぞれ核性および細胞質性、赤)はこのサンプルでは減少、あるいはおそらく消失している。

40

【図57】図57は、図22のカラー版であり、UPIIとPAX8とPSAの混合物の腎細胞癌腫の染色の例を示している。PAX8の染色(赤)は核性である。UPIIの染色(膜性および細胞質性、茶色)およびPSAの染色(細胞質性、赤)はこのサンプルでは減少、あるいはおそらく消失している。

【図58】図58は、図23のカラー版であり、UPIIとPAX8とPSAの混合物の前立腺癌の染色の例を示している。PSAの染色(赤)は細胞質性である。UPIIの染色(膜性および細胞質性、茶色)およびPAX8の染色(核性、赤)はこのサンプルでは減少、あるいはおそらく消失している。

50

【図59】図59は、図24のカラー版であり、UPIIとNKX3.1の混合物の尿路上皮癌腫の染色の例を示している。UPIIの染色（赤）は膜性および細胞質性である。NKX3.1の染色（核性、茶色）はこのサンプルでは減少、あるいはおそらく消失している。

【図60】図60は、図25のカラー版であり、UPIIとNKX3.1の混合物の前立腺癌の染色の例を示している。NKX3.1の染色（茶色）は核性である。UPIIの染色（膜性および細胞質性、赤色）はこのサンプルでは減少、あるいはおそらく消失している。

【図61】図61は、図26のカラー版であり、UPIIとPAX8とNKX3.1の混合物の尿路上皮癌腫の染色の例を示している。UPIIの染色（茶色）は膜性および細胞質性である。PAX8の染色（核性、茶色）およびNKX3.1の染色（核性、赤）はこのサンプルでは減少、あるいはおそらく消失している。

10

【図62】図62は、図27のカラー版であり、UPIIとPAX8とNKX3.1の混合物の腎細胞癌腫の染色の例を示している。PAX8の染色（茶色）は核性である。UPIIの染色（膜性および細胞質性、茶色）およびNKX3.1の染色（核性、赤）はこのサンプルでは減少、あるいはおそらく消失している。

【図63】図63は、図28のカラー版であり、UPIIとPAX8とNKX3.1の混合物の前立腺癌の染色の例を示している。NKX3.1の染色（赤）は核性である。UPIIの染色（膜性および細胞質性、茶色）およびPAX8の染色（核性、茶色）はこのサンプルでは減少、あるいはおそらく消失している。

20

【図64】図64は、図29のカラー版であり、UPIIとp63の混合物の尿路上皮癌腫の染色の例を示している。p63の染色（茶色）は核性である。UPIIの染色（赤）は膜性および細胞質性である。

【図65】図65は、図30のカラー版であり、UPIIとp63の混合物の尿路上皮癌腫の染色の例を示している。UPIIの染色（茶色）は膜性および細胞質性である。p63の染色（核性、茶色）はこのサンプルでは減少、あるいは消失している。

【図66】図66は、図31のカラー版であり、UPIIとp63の混合物の前立腺上皮内新生物（PIN）の染色の例を示している。p63の染色（茶色）は核性である。UPIIの染色（膜性および細胞質性、茶色）はこのサンプルでは減少、あるいは消失している。

30

【図67】図67は、図32のカラー版であり、UPIIとp63の混合物の正常前立腺の染色の例を示している。p63の染色（茶色）は核性である。UPIIの染色（膜性および細胞質性、茶色）はこのサンプルでは減少、あるいは消失している。

【図68】図68は、図33のカラー版であり、UPIIとp40の混合物の尿路上皮癌腫の染色の例を示している。p40の染色（茶色）は核性である。UPIIの染色（赤）は膜性および細胞質性である。

【発明を実施するための形態】

【0012】

発明を実施するための態様

前述の議論から理解され得るように、本発明は様々に組み合わせることのできる種々の局面を含んでいる。以下の説明は、構成要素を列挙し、本発明の実施形態のいくつかを説明するために提供される。これらの構成要素は初期の実施形態と共に記載されるが、追加の実施形態を作り出すために、これらの構成要素は任意の様式、数量において組み合わせられ得ることが理解されるべきである。様々に説明される実施例及び好ましい実施形態は、本発明を明示されたシステム、技術、及び応用に限定するものと解釈されるべきではない。さらに、この説明は、この適用または後に続く任意の適用内において、開示された任意の数量の構成要素、個々の構成要素単独および全ての構成要素の任意のおよび全ての並び換えおよび組み合わせを伴う、様々な実施態様、システム、技術、方法、装置、および応用の全ての記載および特許請求の範囲を支持および包含するものと理解されるべきである。

40

50

【 0 0 1 3 】

本発明の実施態様は、UPIIに特異的に結合し、いくつかの種類のガンの診断においてUPIIの検出に使用され得る抗体およびそれに関する方法を提供し得る。抗体は、抗体のフラグメント、マウスモノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化モノクローナル抗体、ヒトモノクローナル抗体、それ自体またはその断片に標識を結合もしくはコンジュゲートさせた抗体、検出可能な信号または色素で標識された抗体、毒素で標識された抗体等であり得る。標識としては、放射性元素、磁性粒子、放射性同位体、蛍光色素、酵素、毒素、信号、色素、検出酵素、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)、アルカリホスファターゼ(AP)、 α -ガラクトシダーゼ、色素原、FAST RED、3,3'-ジアミノベンジジン、3-アミノ-9-エチルカルバゾール、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリルホスフェート、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル-D-グルクロニドおよびそれらの任意の組み合わせ等が挙げられ得るが、それに限定されない。本発明のシステムおよび方法は、上記抗体またはUPIIと結合できるその抗原結合部位と関連し得る。

10

【 0 0 1 4 】

本発明の実施態様は、UPIIに特異的に結合し、いくつかの種類のガンの診断においてUPIIの検出に使用され得るモノクローナル抗体およびそれに関する方法を提供し得る。モノクローナル抗体は、抗体のフラグメント、マウスモノクローナル抗体、ウサギモノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化モノクローナル抗体、ヒトモノクローナル抗体、検出可能な信号または色素で標識された抗体、毒素で標識された抗体等であり得る。本発明のシステムおよび方法は、上記モノクローナル抗体またはそのUPIIと結合できる抗原結合部位と関連し得る。

20

【 0 0 1 5 】

マウスモノクローナル抗体は、免疫組織化学手順の1次抗体を含む、特定の分析物を同定するためのイムノアッセイ法に一般的に用いられ得る。目的のタンパク質標的に特異的なマウスモノクローナル抗体は、一般的に知られている過程を用いて生産することができる。一般的に、マウスを目的の抗原(所望の標的のペプチド断片またはタンパク質標的全長)に曝露することで免疫応答を引き起こし得、その免疫応答において、マウスは上記抗原に結合する複数の抗体を産生し、抗体の各々は特定のB細胞によって産生され得る。これらのB細胞は、マウス脾臓から単離され得、また産生された抗体はIHCの1次抗体としてその適性を評価され得る。最適な抗体を選択した後、関連するB細胞は、公知の方法を用いて腫瘍細胞と融合され得、おそらく結果としてハイブリドーマとなり、無限に増殖することができ継続的に所望の抗体を産生し得る新しい細胞系統となり得る。

30

【 0 0 1 6 】

モノクローナル抗体はいくつかの理由により、ポリクローナル抗体より好まれ得る。特に、モノクローナル抗体は単一のB細胞から誘導され得、そのため単一のエピトープを認識し得、おそらく結果としてより高い特異性を持ち得る。またモノクローナル抗体は細胞培養において簡便にまた再現可能に産生され得、おそらく結果として所望の抗体の継続的な供給をし得る。無論、いくつかの実施態様ではポリクローナル抗体も使用され得る。

40

【 0 0 1 7 】

抗UPII抗体(例えば、マウスモノクローナル抗UPII抗体BC21)は、上記の一般的な過程によって産生され得、おそらく特に既知の抗UPII抗体(BC17)と比較して、様々な正常および新生物性の組織に対する免疫組織化学的な感度および特異性によって評価され得る。

【 0 0 1 8 】

UPIIタンパク質発現の例:アミノ酸配列26から155のUPII組み換えタンパク質はE.coliからクローニング、発現させ得る。手軽にはUPII cDNAがクローニング、精製され得る。該UPII cDNAは制限酵素により分解され得、pET30a-GSTベクター中にライゲーションされ得る。BL21細胞はコンストラクトによって形質転換され得る。正確なサイズの組み換えタンパク質が発現しているコロニーは選択

50

され得、シーケンシングされ得る。0.5 mMのIPTGを含むLB培地でE. coliを培養することによってさらに規模を拡大した生産を実現し得る。最終的なUPII組み換えタンパク質はSDS-PAGEによって精製され得、分析され得る。

【0019】

宿主免疫の例：雌性BALB/c（約6週から8週齢）マウスは、フロイント完全アジュバント中の個体あたり約100 µgのヒトUPIIタンパクを用いて、腹腔内（i.p.）免疫され得る。約3週間後、さらにフロイント不完全アジュバント中の個体あたり100 µgのヒトUPIIタンパクを用いて、約3週間の間隔をおいてさらに約4回、上記マウスを追加免疫し得る。マウスは尾部から採血され得、後の酵素免疫測定法（ELISA）による抗体価の分析のため血清を集め - 20 で保存し得る。

10

【0020】

ハイブリドーマの例：UPIIに対する抗体を産生するハイブリドーマはUPIIで免疫されたBALB/cマウスの脾臓細胞から標準的な技術によって作成され得る。例えば、約50%のポリエチレングリコールを用いてインキュベーションすることで、約4:1の比率で、UPIIで免疫されたマウスの脾臓細胞を、P3-X63-Ag 8.653骨髄腫細胞（SP2/0 Balb/c骨髄腫細胞に由来する非分泌性骨髄腫）と融合させ得る。インキュベーションに続いて、細胞はおそらく約300 × g、約10分間の遠心分離によってペレット状にされ得、約25 mlのPBS中で洗浄され得、再遠心分離され得、細胞のペレットは約20%のウシ胎児血清（Hyclone, Utah, Co）を含む約100 mlの新鮮なダルベッコ培地に再懸濁され得る。約100 µlずつのアリコートは、10枚の96ウェルマイクロタイタープレート（Corning, Lowell, MA）の各ウェルに添加することができる。約24時間後、約1 Mのヒポキサンチン（HT）、約4 mMのアミノプテリンおよび約160 mMのチミジン（HAT）を添加した約100 µlのDMEM培養培地をマイクロタイターの各ウェルに添加することができる。培地は、おそらく約4日後に完全培地（おそらくHATとHTを含む）に変更され得る。その後約10日間にわたり、培地は除去され得、HATおよびHTの添加量を減らした、もしくはおそらく添加を無くした新鮮な培地に変更され得る。ハイブリドーマの上清はUPIIへの抗体反応性によりELISAでスクリーニングされ得、また、ハイブリドーマのクローンはそこで選択され得、おそらく限界希釈による2回のクローニングによって安定化され得る。

20

30

【0021】

抗ヒトUPIIハイブリドーマクローンBC21とも言われるハイブリドーマ細胞は、アメリカンタイプカルチャーコレクション（ATCC）にATCC特許寄託番号第PTA-13181号で寄託されている。本発明の実施態様は、ATCCに寄託されている該ハイブリドーマによって産生される抗体もしくはそのフラグメントを提供し得、ウロプラキニンIIを特異的に認識することができるモノクローナル抗体を産生する該ハイブリドーマ細胞を培養することによってモノクローナル抗体を産生するための方法、また該ハイブリドーマにモノクローナル抗体を産生させる方法をも含み得る。

【0022】

ELISA：宿主のUPIIに対する抗血清免疫反応はELISAによって測定され得る。例えば、リン酸緩衝食塩水（PBS）中のUPIIの溶液（約1 µg/ml）は、約96ウェルの平底ポリスチレンプレートを被覆するのに使用され得る。該プレートは、次に約1%のウシ血清アルブミン（BSA）-PBSによってブロックされ得る。希釈された免疫血清もしくはハイブリドーマ上清のいずれかが添加され得、約37 で約1時間インキュベートされ得る。該プレートをPBSで洗浄後、該プレートはヤギ抗マウスHRP試薬（Jackson Labs）とともにインキュベートされ得る。インキュベートは約37、約30分間で完了し得る。発色させるためにABTS基質が加えられ得、また約405 nmにおける吸光度（A405）がマイクロタイタープレートリーダーによって測定され得る。

40

【0023】

50

モノクローナル抗体のアイソタイプ：抗UPII抗体（例えばBC21モノクローナル抗体）は、マウスモノクローナル抗体アイソタイプキット（Invitrogen, Carlsbad CA）を用いてアイソタイプングされ得る。例えば、マウスモノクローナル抗体（BC21）細胞からの約100 μ lの上清が、ヤギ抗マウスIgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3, IgMおよびIgA抗体で被覆したプレートに添加され得る。約30分間のインキュベーションの後、プレートはPBSで3回洗浄され得、ヤギ抗マウスIg-HRP試薬とともにインキュベーションされ得る。発色させるためにABTS基質が加えられ得、また約405nmにおける吸光度（A405）がマイクロタイタープレートリーダーによって測定され得る。該BC21クローンはアイソタイプについて試験され得、マウスIgG1/ κ と同定され得る。

10

【0024】

抗体産生および精製：クローンBC21から選択されたハイブリドーマ細胞は10% FBSを添加したDMEM培養培地もしくは任意の無血清培地で培養され得る。培養上清はプロテインAアフィニティカラムによってさらに精製され得る。該ハイブリドーマ細胞は抗体腹水を産生させるためプリスタン刺激されたBALB/cマウスにインジェクションもされ得る。該抗体腹水はプロテインAアフィニティカラムによってさらに精製され得る。IgGの濃度はヒトIgGの吸光係数約1.4（280nmにおいて約0.1%）を用いて分光測光法により測定され得る。IgGの純度はSDS-PAGEにより決定され得る。

【0025】

20

ウェスタンブロッティングによって検査される交差反応性：精製されたモノクローナル抗体（BC21）はウェスタンブロッティングによって特徴づけられ得る。完全長のUPIIもしくはUPIITタンパク質は、トリス-グリシン緩衝液と約4から12%のSDS-PAGEを用いたタンパク質ゲル電気泳動に供され得、トリス-グリシン緩衝液中のニトロセルロースフィルターに転写され得る。プロット上のタンパク質は、ブロッキングバッファでブロックした後、BC21抗体と室温で約60分間インキュベーションすることにより、おそらくそれに続いてペルオキシダーゼがコンジュゲートされたヤギの抗マウス免疫グロブリンとインキュベーションすることにより、可視化され得る。

【0026】

VHおよびVL配列の決定：全RNAはQiagen kit（USA, Gaithersburg, MD）を用いて該製造会社の指示通りにハイブリドーマから抽出され得る。1段階目のRT-PCRはQIAGEN（登録商標）One Step RT-PCR Kitによって行われ得る。RT-PCRは重鎖および軽鎖に特異的なプライマーセットによって行われ得る。それぞれのRNAサンプルについて、約12の別々の重鎖および約11の別々の軽鎖のRT-PCR反応を、可変領域のリーダー配列をカバーする縮重フォワードプライマー混合物を用いて設定することができる。リバープライマーは重鎖および軽鎖の定常部分に位置し得る。制限酵素認識部位は該プライマーに組み込まれないようにされ得る。1段階目の反応からの該RT-PCR産物は2段階目のPCRで増幅され得る。約12の別々の重鎖および約11の別々の軽鎖のRT-PCR反応を、抗体可変領域に特異的なセミステッドプライマーセットを用いて設定することができる。増幅されたcDNAはゲルで精製することができ、次にシーケンシングされ得る。

30

40

【0027】

配列番号4で同定されるUPIIのエピトープLSPALTESLLVALPPに結合する本明細書に記載されるモノクローナル抗体の重鎖および/もしくは軽鎖可変領域のCDRのうちの一つあるいはそれ以上のアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む単離されたポリヌクレオチドを提供するために、（BC21）可変領域はシーケンシングされた。重鎖可変領域の配列は配列番号1で同定され、軽鎖可変領域の配列は配列番号2もしくは配列番号3で同定される。抗体もしくはそのフラグメントは配列番号1および/もしくは配列番号2および/もしくは配列番号3の核酸配列にコードされるアミノ酸配列のポリペプチドを含み得る。抗体もしくはそのフラグメントは、配列番号2および/もしくは配列

50

番号3の核酸配列にコードされるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含み得、また配列番号1の核酸配列にコードされるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域をも含み得る。抗体もしくはそのフラグメントは配列番号4のアミノ酸配列の少なくとも1つのポリペプチドに特異的に結合し得る。本明細書に記載するように、そのフラグメントは抗原結合フラグメントを含み得る。

【0028】

実施態様において、抗体もしくはそのフラグメントもしくは単離および精製された核酸配列まで、配列番号1および/もしくは配列番号2および/もしくは配列番号3の核酸配列にコードされるアミノ酸配列と少なくとも約70%の同一性を有するアミノ酸配列をもち得る。抗体もしくはそのフラグメントは、配列番号4の残基と少なくとも約70%の同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドの少なくとも1つ以上と特異的に結合し得る。少なくとも約71%、少なくとも約72%、少なくとも約73%、少なくとも約74%、少なくとも約75%、少なくとも約76%、少なくとも約77%、少なくとも約78%、少なくとも約79%、少なくとも約80%、少なくとも約81%、少なくとも約82%、少なくとも約83%、少なくとも約84%、少なくとも約85%、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%およびおそらく少なくとも約99%等にいたるまでの、他の割合が挙げられ得るがそれに限定されない。

重鎖および軽鎖の可変領域の配列を、当業者にとって公知のソフトウェアを用いてコンピュータ処理し、相補性決定領域(CDR)を生成することができる。したがって、重鎖の可変領域の配列である配列番号1は、配列番号5(CDR1)、配列番号6(CDR2)および配列番号7(CDR3)のCDR配列をもたらず。軽鎖の可変領域の配列である配列番号2は、配列番号8(CDR1)、配列番号9(CDR2)および配列番号10(CDR3)のCDR配列をもたらず。軽鎖の可変領域の配列である配列番号3は、配列番号11(CDR1)、配列番号12(CDR2)および配列番号13(CDR3)のCDR配列をもたらず。

【0029】

マウス抗UPII(BC21)結合配列のエピトープマッピング：抗UPII抗体(例えば、BC21)によって認識されるUPIIのペプチド配列を決定するために、おそらくダイレクトELISAおよびドットプロットの2つのアッセイを用いてエピトープマッピングが行われ得る。ELISAアッセイでは、抗UPII(BC21)抗体の感度および特異性が、約1:500および約1:1000で抗体価を測定することにより、決定され得る。それぞれ長さ約15アミノ酸のオーバーラッピングペプチドは、おそらく26から155アミノ酸までのヒトUPIIタンパク質配列をカバーし、より好ましいBC21結合配列を決定するために用いられ得る。

【0030】

BC21のエピトープは、配列番号4で同定されるLSPALTESLLVALPPである、UPIIの36から50のアミノ酸残基に含まれることが示された。マウスモノクローナルUPII抗体のエピトープ、もしくはその部分は、マウス以外の生物種(例えばウサギ、ヤギ、ウマ、ニワトリ等)での産生を含む新規モノクローナル抗体の産生に有用な抗原であり得る。無論、ポリクローナル抗体も、ウロプラキニンIIタンパク質の36から50残基に関連する配列番号4中のエピトープに特異的に結合し得る。

【0031】

ダイレクトELISAの手順のために、まずプレートはコーティングバッファー(pH約9.5)中の約100μlの約5μg/mLのUPIIペプチドを用いて約4でオーバーナイトで被覆し得、続いて1ウェルあたり約200μlでのブロッキング(約3%BSA)を室温で約1時間行い得る。プレートは約100ng/mLおよび約200ng/

mLの精製されたUPII抗体とともに別々に、ELISAプレートシェーカー上でおよそ室温で約1時間インキュベートされ得る。次にプレートはPBST(1ウェルあたり約300 μ l)でおそらく5回洗浄され得、続いてヤギ抗マウスIgG-HRPが該プレートに加えられ得、プレートシェーカー上で約1時間インキュベートされ得る。次にプレートはPBST(1ウェルあたり約300 μ l)で洗浄され得、乾燥させるために吸収され得、1ウェルあたり約100 μ lのTMBが加えられ得、約5分間シェーカー上で発色され得、また続いてストップソリューション(1ウェルあたり約50 μ l)までもが加えられ得る。吸光度は、おそらく該製造会社の推奨に従ってELISAプレートリーダー上で約450nmにおいて測定され得る。

【0032】

ドットプロットアッセイのために、ニトロセルロースメンブレンは濃度約1mg/mLの、ペプチドあたり4連でペプチド約1 μ lでプロットされ得る。このメンブレンは完全に乾燥し得るまで室温で約1時間インキュベートされ得る。該メンブレンはTBST(例えば、約50mMのTris、約0.5MのNaCl、約0.05%のTween-20、pH約7.4)中の約3%のBSAで室温で約1時間ブロックされ得、次にTBST中にマウス抗UPII抗体(BC21)約200ng/mLが約1時間室温で加えられ得る。次に該メンブレンはオービタルシェーカー上でTBSTで約3回(それぞれ約10分間)洗浄され得、続いてヤギ抗マウスIgG1-AP二次抗体とともにTBST中で約1時間室温でインキュベートされ得る。該メンブレンは振盪機上でTBSTでおそらく約3回(それぞれ約10分間)洗浄され得る。結合はWestern Glo Chemiluminescent検出試薬を加えてフィルムに露出することで検出され得る。

【0033】

抗UPII BC21を用いた免疫組織化学手法：抗UPII抗体(例えば、マウスモノクローナル抗UPII抗体BC21)を用いた免疫組織化学は、ホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)組織サンプル上で、当業者に一般的に知られている手順を用いて、下記の非限定的な例で一般的に例示されるように行われ得る(例えばステップ間でpH約7.6のトリス緩衝生理食塩水で洗浄する)。

【0034】

1)ホルマリン固定パラフィン包埋組織の切片(~5 μ m)はおそらくポリリジン被覆された市販のスライドガラス上に載せられ得る。

2)切片は脱パラフィンされ得(キシレンもしくはキシレン代用品を用いて)、おそらく一連のアルコール/水溶液を通じて再水和され得、おそらく続いておそらく約3%の過酸化水素水溶液により内在性のペルオキシダーゼをブロックし得る。

3)サンプルは圧力釜(Reveal, Decloaking Chamber; Biocare Medical)中でクエン酸バッファーを用いて熱誘導性抗原回復に供され得、約30秒間約125 $^{\circ}$ Cに加熱され得る。(他の当業者に知られた抗原回復手法(例えば、スチーマー、マイクロ波オープン、酵素等)もまた許容される。)組織は約10分間放冷され得、次に脱イオン水ですすがれ得る。

4)UPII抗体BC21は、キャリアタンパク質としてのウシ血清アルブミンとともにリン酸緩衝液(pH約6.0)に約30分間アブライされ得る。

5)おそらく西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)を結合体化した二次抗体を用いたUPII抗体の検出(MACH 4 Universal HRP-Polymer Detection, Biocare Medical)は2つのステップで完成され得る。最初にウサギ抗マウスIgG抗体が約10分間アブライされ得、続いてヤギ抗ウサギHRP結合体とともに約10分間インキュベートされ得る。

6)おそらく最後の検出ステップとして、おそらく約0.02%の過酸化水素を含有するバッファー中の3,3'-ジアミノベンジジン(DAB)(Betazoid DAB, Biocare Medical)がアブライされ得る。HRPを介した機構を通じたDABの酸化により、茶色の発色性の産物の沈殿が起こり得、おそらくUPIIの発現部位を同定することを可能にし得る。

10

20

30

40

50

7) スライドガラスはおそらく改良マイヤー処方ヘマトキシリンにより手軽に対比染色され得る。

【0035】

マウスモノクローナル抗UPII抗体BC21を用いた免疫組織化学染色の結果：上記の手順を用いて、様々な正常および新生物性の組織のUPIIの発現がBC21を用いて評価され、マウスモノクローナル抗UPII抗体(BC17, Biocare Medical)を用いた染色パターンと比較された。両方の抗体は当業者に周知の方法を用いて抗体価について最適化された(例えば、濃度)。例えば、様々な抗体価は染色の強度を最大化し、おそらく同時にバックグラウンドの染色を最小化あるいは消去までするように評価された。それぞれの抗体に対して、最大の染色強度とおそらく同時に最小のバックグラウンドの染色を与える抗体価が用いられた。

10

【0036】

図1~8は、いくつかの膀胱移行上皮癌の抗UPII抗体(BC21)による染色の例を、抗UPII抗体(BC17)を用いた染色と比較して、同一の試料の連続的な切片上で示している。

【0037】

表1は、組織マイクロアレイ(TMA)を用いた178の膀胱癌の試料(例えば、移行上皮癌(TCC)および乳頭状TCC)を染色した抗UPII抗体(BC21)の感度を示している。約5%以上の腫瘍細胞の染色のカットオフをUPII「陽性」のケースを決定する基準として用い、反対に約5%未満の腫瘍細胞の染色は「陰性」のケースを決定する基準として用いたところ、178中137(約77%)がUPII(BC21)に対して陽性であることが分かった。より高いグレードの腫瘍の診断は往々にして困難であることがある。これらの試料において抗UPII抗体(BC21)は83中68(約82%)のグレードIIの腫瘍を、また44中25(約57%)のグレードIIIの腫瘍を同定した。

20

【表1】

表1：膀胱癌(TCCおよび乳頭状TCC)における抗UPII抗体(BC21)のTMA

| グレード | 試料数 | 陽性試料数 | 陽性割合 | 陰性試料数 | 陰性割合 |
|--------------------|-----|-------|------|-------|------|
| グレードI、II およびIII | 178 | 137 | 77% | 41 | 23% |
| グレードII | 83 | 68 | 82% | 15 | 18% |
| グレードIII | 44 | 25 | 57% | 19 | 43% |

30

【0038】

抗UPII抗体(BC17)と比較した抗UPII抗体(BC21)のより高い感度は、それぞれの抗体を用いたグレードI、IIおよびIIIのTCCの59の同一の試料の染色によって決定された(表2)。同一の基準を用いて、33の試料(約56%)が抗UPII抗体(BC17)によって陽性と決定されたのに比較して、抗UPII抗体(BC21)は46の試料(約78%)を陽性と同定した。グレードIIの試料では、抗UPII抗体(BC21)および抗UPII抗体(BC17)は、それぞれ約77%(35中27)および約54%(35中19)の感度を示した。グレードIIIの試料では、抗UPII抗体(BC21)および抗UPII抗体(BC17)は、約64%(11中7)の同様の感度を示した。多数の比較において、抗UPII抗体(BC21)は、抗UPII抗体(BC17)よりも濃い染色を与えた。

40

【表 2】

表 2：膀胱癌（TCCおよび乳頭状TCC）における抗UPII抗体（BC21）および抗UPIII抗体（BC17）のTMAの比較

| 抗体 | グレード | 試料数 | 陽性試料数 | 陽性割合 | 陰性試料数 | 陰性割合 |
|------|----------------|-----|-------|------|-------|------|
| BC21 | グレードI、IIおよびIII | 59 | 46 | 78% | 13 | 22% |
| BC17 | グレードI、IIおよびIII | 59 | 33 | 56% | 26 | 44% |
| BC21 | グレードII | 35 | 27 | 77% | 8 | 23% |
| BC17 | グレードII | 35 | 19 | 54% | 16 | 46% |
| BC21 | グレードIII | 11 | 7 | 64% | 4 | 36% |
| BC17 | グレードIII | 11 | 7 | 64% | 4 | 36% |

10

【0039】

抗UPII抗体（BC21）は、おそらく様々な正常（表3）および新生物性（表4）組織においてすら評価された際、高度に特異的であり得る。膀胱および尿道のみが、UPII（BC21）で陽性として染色される正常組織であり得る。そのような染色が期待され得るが、おそらく正常尿管上皮での知られているUPII発現を考慮すると、抗UPII抗体（BC21）が他のどんな正常もしくは新生物性の組織を染色し得ないということはその高い特異性を示すものであり得る。

20

【表 3 - 1】

表 3：通常組織の抗UPII抗体（BC21）による染色

| 組織 | サンプル数 | 陽性であったサンプル数 |
|--------|-------|-------------|
| 副腎 | 3 | 0 |
| 膀胱 | 7 | 5 |
| 骨髄 | 1 | 0 |
| 眼 | 2 | 0 |
| 胸部 | 3 | 0 |
| 小脳 | 3 | 0 |
| 大脳皮質 | 3 | 0 |
| 卵管 | 3 | 0 |
| 消化管-食道 | 3 | 0 |
| 消化管-胃 | 3 | 0 |
| 消化管-小腸 | 3 | 0 |
| 消化管-結腸 | 3 | 0 |

30

40

【表 3 - 2】

| | | |
|--------|---|---|
| 消化管-直腸 | 3 | 0 |
| 心臓 | 3 | 0 |
| 腎臓 | 6 | 0 |
| 肝臓 | 3 | 0 |
| 肺 | 3 | 0 |
| 卵巣 | 3 | 0 |
| 膵臓 | 3 | 0 |
| 副甲状腺 | 1 | 0 |
| 脳下垂体 | 2 | 0 |
| 胎盤 | 3 | 0 |
| 前立腺 | 3 | 0 |
| 皮膚 | 2 | 0 |
| 脊髄 | 2 | 0 |
| 脾臓 | 2 | 0 |
| 横紋筋 | 3 | 0 |
| 精巣 | 3 | 0 |
| 胸腺 | 3 | 0 |
| 甲状腺 | 3 | 0 |
| 扁桃腺 | 3 | 0 |
| 尿管 | 3 | 3 |
| 子宮頸部 | 3 | 0 |
| 子宮内膜 | 3 | 0 |

10

20

【表 4】

表 4：様々な腫瘍組織の抗UPII抗体（BC21）の染色

| 腫瘍タイプ | サンプル数 | 陽性であったサンプル数 |
|-------|-------|-------------|
| 前立腺癌 | 10 | 0 |
| 肺癌 | 20 | 0 |
| 乳癌 | 10 | 0 |
| 結腸癌 | 30 | 0 |
| 腎癌 | 5 | 0 |

30

【0040】

抗UPII抗体（例えばモノクローナルマウス抗UPII抗体（BC21））は、おそらくモノクローナルマウス抗UPII抗体（BC17）と比較したとしても、改善された感度によって明確な利点を提供し得る。図1～8は、膀胱TCCの同一の試料の連続的な切片のBC21とBC17の染色の比較の例を示しており、おそらくBC21のより高い感度を示している。例えば、図1および2の試料は、BC21による膜および細胞質の強い染色（図1）を表し得、一方この場合のBC17の染色は最小限であり得る（図2）。図3および4では、BC21の強く広範な染色が観察され得（図3）、それに対してBC17の同一の試料上では疎らで限局的な染色のみが観察され得る（図4）。同様に図5および6の試料はBC21による強い染色を示し得る（図5）が、BC17によっては限られた染色のみがあり得る（図6）。最後に図7および8はまたBC21の強い染色を表し得る試料を示している（図7）が、それに対してBC17はこの同一の試料上で陰性であり得る（図8）。

40

【0041】

50

これらの例は、病理医が、より感度の低い抗体（例えばBC17（図1、2、7および8））では不可能であった、抗UPII抗体（例えば、BC21）を用いた尿路上皮癌の存在の確定的な同定ができるようになり得た場合を証明している。あるいは、抗UPII抗体（例えば、BC17）による曖昧な結果は信頼性の欠如した疑わしい診断を招き得た一方で、抗UPII抗体（例えばBC21）ははっきりした明確な結果を提供し得る（図3、4、5および6）。

【0042】

図3、4、5および6で観察されるBC17による最小限の染色は、病理医がより感度の低い抗体を使う際に直面し得る困難、特に観察された染色が疎らで薄くあり得た際に、これがUPIIの存在を示しておりおそらく尿路上皮癌を示す真に陽性の染色であるのか、あるいは、誤解を招くような人為的結果の染色であり却下されるべきものであるのか確信を持って決定するのが難しいというような困難の優れた例を提供し得る。より感度の低い抗体に関連した曖昧さは、疑わしい、もしくは不正確な診断までも招き得、尿路上皮癌の患者は適時に適切な治療を受けることができなくなり得る。それに対して、抗UPII抗体（例えば、BC21）は、その向上した感度によって、診断にとって顕著な利点を提供し得る。抗UPII抗体（例えば、BC21）は尿路上皮癌の強く明確な染色をもたらし得、それにより病理医は正確に尿路上皮癌の診断を返すことができ得、おそらく患者は迅速に最も適切な治療を受け得る。

【0043】

マウスモノクローナル抗UPII抗体BC21によるウェスタンブロットの結果：BC21のUPIIタンパク質に対する結合はウェスタンブロット（図9A）によって証明され得る。BC21のUPIIタンパク質に対する同様の結合がないこともまたウェスタンブロットによって示され得る（図9A）。反対に抗UPII抗体BC17はUPIIタンパク質に結合し得ないが、UPIIタンパク質を認識し得る（図9B）。

【0044】

本発明のいくつかの実施態様において、抗UPII抗体（例えば、モノクローナルマウス抗UPII抗体BC21）は上記手順の多数のバリエーションおよび当業者に知られた他の方法での使用に適切であり得る。BC21で染色された試料は永久標本封入剤およびカバーガラスを用いて保管され得る。BC21抗体は標準的な手順を用いて自動化染色装置においても使用され得る。また当業者に一般的に知られた多数の代替の検出手法（例えば、蛍光）、検出酵素（例えば、アルカリホスファターゼ（AP）、ベータ-ガラクトシダーゼ等）およびおそらく色素原（例えば、3-アミノ-9-エチルカルバゾール、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリルホスフェート、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル-D-グルクロニド等）すら使用もまた想定することができる。

【0045】

抗UPII抗体（例えば、モノクローナルマウス抗UPII抗体）のエピトープ、もしくはその部分は、当業者が理解しているように、マウス以外の生物種（例えばウサギ、ヤギ、ウマ、ニワトリ等）での産生を含む新規モノクローナル抗体の産生に有用な抗原であり得る。ウロプラキンIIIに対するモノクローナル抗体としては、マウスモノクローナル抗体、ウサギモノクローナル抗体、ヤギモノクローナル抗体、ウマモノクローナル抗体、ニワトリモノクローナル抗体、ヒト化モノクローナル抗体、キメラ抗体、任意のそれらの組み合わせ等が挙げられるが、それに限定されない。他の実施態様において、ウロプラキンIIIに対するポリクローナル抗体としては、ウサギポリクローナル抗体、マウスポリクローナル抗体、ヤギポリクローナル抗体、ウマポリクローナル抗体、ニワトリポリクローナル抗体、ヒト化ポリクローナル抗体、任意のそれらの組み合わせ等が挙げられ得るが、それに限定されない。さらに他の実施態様において抗体は単離された抗体であり得る。

【0046】

抗UPII抗体（例えば、BC21）のホルマリン固定パラフィン包埋組織の免疫組織

化学における使用が本明細書に記載され得るが、他のイムノアッセイでの有用性が容易に想像され得、全て本出願に包含される。特に、FFPEのIHCで用いられるのと同じの試薬の多数が凍結組織切片のIHCにおいても使用され得るということは、周知であり得る。抗UPII抗体(BC21)は、ELISAを含むおそらく一般的に知られた方法を用いた他のイムノアッセイにおいてもまた有用であり得る。

【0047】

おそらくIHCと関連する本発明の他の局面において、抗UPII抗体は、「二重染色」手順(多重染色もしくはマルチプレックスとも記載される)を行うため、混合物の一部として1つもしくはそれ以上の追加の1次抗体と共同して使用され得る。そのような「二重染色」手順は当該分野で一般的に周知であり得るが、特定の診断への適用のための最適な1次抗体の組み合わせは知られていない。

10

【0048】

この方法において、抗UPII抗体(例えば、モノクローナルマウス抗UPII抗体BC21)は、1次抗体混合物中で1つもしくはそれ以上の抗体と組み合わせることが可能である。追加の抗体のうち少なくとも1つは、マウス以外の生物種に由来するもの(例えば、ウサギ抗体等)であり得る。抗体は、少なくとも2つの異なる生物種に由来するもの(例えば、マウス宿主もしくはウサギ宿主等)であり得るが、それに限定されない。生物種としてはマウス、ウサギ、ヤギ、ウマ、ニワトリ、ヒト、それらの任意の組み合わせ等が挙げられ得るが、それに限定されない。抗体はモノクローナルもしくはポリクローナルであり得る。このように、1次抗体混合物中の多重抗体は、それに続く検出および可視化のステップにおいてさえも区別され得る。例えば、組織サンプルを1次抗体混合物とインキュベーションすることについて、通常のHRP結合ヤギ抗マウス抗体がアプライされ得、おそらく適切な色素原(例えば、DAB等)がそれに続き得る。続いて、AP結合ヤギ抗ウサギ抗体を用いて、おそらく適切な色素原(例えば、Fast Red等)がそれに続いて、2次検出ステップが行われ得る。このように、2つもしくはそれ以上の標的が、結果として生じる2色によって同一の組織サンプル上で同定され得る。この具体例において、マウス1次抗体(BC21を含む)は茶色(DAB)の染色をもたらし、またウサギ1次抗体は赤(Fast Red)の染色をもたらし得る。

20

【0049】

抗体-酵素結合体を含む抗マウスもしくは抗ウサギ抗体は、マウス、ウサギ、ニワトリ、ウマ、ラット、ヤギ、ヒツジ等を含むがそれに限定されない異なる宿主生物種に由来し得る。1次抗体は、マウス、ウサギ、ニワトリ、ウマ、ラット、ヤギ、ヒツジ等を含むがそれに限定されない様々な宿主生物種に由来し得る。実施態様において、抗体は抗体-酵素結合体を含み得、また1次抗体は2つの異なる宿主生物種から得られ得る。DABおよび/もしくはFast Red以外の色素原もまた使用され得る。

30

【0050】

2以上の抗体の使用、マウスおよびウサギ以外の生物種の使用、他の色素原および検出システム、検出ステップの異なる順序ならびにおそらく3もしくはそれ以上の色数をもたらす変更(変性ステップを必要とし得る)までも含むがそれに限定されない、二重染色法の多重の代替も可能である。

40

【0051】

本発明の実施態様は、少なくとも2つの抗体もしくはその断片を、その2つのうちの少なくとも1つの抗体もしくはその断片が少なくともウロプラキンIIに対して特異的に結合するようなおそらく混合物として有する組成物を提供し得る。これは、生物学的サンプル中の少なくとも2つの異なるタンパク質を検出する方法を提供し得、おそらくそれは、少なくとも2つの抗体もしくはその断片を含み、その少なくとも2つのうちの少なくとも1つの抗体もしくはその断片が少なくともウロプラキンIIに対して特異的に結合し得、抗原-抗体複合体を形成し、抗原-抗体複合体が検出され得るような組成物と生物学的サンプルを接触させることによる。組成物は少なくとも1つの第一の1次抗体および少なくとも1つの第二の1次抗体を有し得る。生物学的サンプルとしては、血液、尿、膀胱組織

50

、尿路上皮組織、移行細胞、正常組織、新生物性組織、腎臓組織、卵巣組織、甲状腺組織、子宮内膜組織、腎性組織、扁桃腺組織、膵臓組織、結腸組織、リンパ節組織、新生物性膵臓組織、胃組織、前立腺組織、肺組織および胸部組織等が挙げられ得るがそれに限定されない。

【0052】

少なくとも1つの抗体もしくはその断片は少なくともウロプラキンIIに対して特異的に結合し得、染色された細胞の1%より大きい陽性を指示するカットオフ値までも有し得る。本明細書で記載されるように、陽性を指示するカットオフ値は陽性の染色結果を指示するために必要とされる染色された細胞の割合を提供し得る。他のカットオフ値には染色された細胞の約1%より大きい、染色された細胞の約2%より大きい、染色された細胞の約3%より大きい、染色された細胞の約4%より大きい、染色された細胞の約5%より大きい、染色された細胞の約6%より大きい、染色された細胞の約7%より大きい、染色された細胞の約8%より大きい、染色された細胞の約9%より大きい、おそらく染色された細胞の約10%さえよりも大きいもしくはそれ以上の割合等が挙げられ得るがそれに限定されない。

10

【0053】

実施態様において、本発明は、異なる可視化された結果（例えば、異なる色の結果）を提供することができ得るような少なくとも2つの抗体もしくはその断片を含む組成物を提供し得る。他の実施態様で下記の通り考察されるように、組成物は、少なくとも2つの抗体もしくはその断片のうちの抗UPII抗体以外の少なくとも1つがGATA-3、p63、ウロプラキンIII、PAX8、NKX3.1、PSA、それらの任意の組み合わせ等に対して特異的に結合し得ることを提供し得る。抗体、その組成物は、おそらく抗ウロプラキンII抗体とともに、尿路上皮癌検出組成物、腎細胞癌検出組成物、前立腺細胞癌検出組成物、任意のそれらの組み合わせ等を含むがそれに限定されない検出システムを提供し得る。

20

【0054】

いくつかの実施態様では、1次抗体混合物のために単色の染色が使用され得る。1つの例では、1次抗体混合物が全て同一の宿主生物種に由来する抗体から構成されている場合に、1つの抗体酵素結合体が、全ての抗体の存在を1つの色で染色するために使用され得る。それぞれの抗体の存在もしくは不存在は細胞内局在に基づいて決定され得、あるいはおそらくそのような決定は不要で、それぞれの個々の抗体の存在もしくは不存在の同定無しに染色が有効に解釈され得る。

30

【0055】

IHC手順のいくつかのステップは、当業者に知られているように、おそらく試薬の混合物を用いることによって、順番にもしくは同時に行われ得る。例えば、1次抗体混合物中のものとして記載される抗体は、代わりに1つもしくはそれ以上の抗体の連続的なステップの中でアプライされ得る。同様に検出試薬は、試薬混合物中で同時に、もしくは連続的なステップ中の別々の試薬でアプライされ得る。

【0056】

いくつかの実施態様において、第一の1次抗体がアプライされ得、続いて第一の抗体-酵素結合体および第一の色素原、そして次に変性ステップを経て、その後第二の1次抗体のアプライに進み、続いて第二の抗体-酵素結合体、第二の色素原と続き得る。このように、2つの異なる色の2重染色は、同一の生物種由来の1次抗体を用いて実現され得る。

40

【0057】

抗UPII抗体（例えば、マウスモノクローナル抗UPII抗体BC21）と1次抗体混合物中で多重染色手順での使用のために組み合わせた際に診断に有用となり得る抗体としては、以下のものが挙げられる。

【表 5】

表 5

| 抗体混合物 | 有用性 | |
|---|---|----|
| UPII + UPIII | 感度の向上した尿路上皮のマーカー | |
| UPII + GATA3 | 感度の向上した尿路上皮のマーカー | |
| UPII + UPIII + GATA3 | 感度の向上した尿路上皮のマーカー | |
| UPII + PAX8 | 膀胱と腎臓の区別のマーカー | 10 |
| UPII + PAX8 + PSA | 膀胱、腎臓および前立腺の差示的マーカー | |
| UPII + NKX3.1 | 膀胱と前立腺の差示的マーカー | |
| UPII + PAX8 + NKX3.1 | 膀胱、腎臓および前立腺の差示的マーカー | |
| UPII + p63 | 感度の向上した尿路上皮のマーカーおよび膀胱と前立腺の差示的マーカーおよび膀胱性と非膀胱性の扁平上皮癌腫の差示的マーカー | 20 |
| UPII + GATA-3 および/もしくは p63 + PAX8 + PSA および/もしくは NKX3.1 | 膀胱、腎臓および前立腺腫瘍の差示的マーカー | |
| UPII + p40 | 感度の向上した尿路上皮のマーカーおよび膀胱と前立腺の差示的マーカーおよび膀胱性と非膀胱性の扁平上皮癌腫の差示的マーカー | 30 |

【 0 0 5 8 】

抗UPII抗体（例えば、マウスモノクローナル抗UPII抗体BC21）はUPII検出に特異的であり得、またヒト組織サンプルにおけるいくつかのタイプの癌の診断のための免疫組織化学的手順に有用であり得る。特に、抗UPII抗体（例えば、BC21）は、抗UPII抗体BC17に対して、より高い感度を含むがそれに限定されない利点を持つ。

【 0 0 5 9 】

UPIIタンパク質の発現レベルは、膀胱癌の場合の患者転帰の予後的マーカーであり得る。抗体（例えば、BC21）を用いたUPII発現の決定は、肯定的な転帰（例えば、より長い生存期間、より長い時間での疾患の進行、腫瘍サイズの縮小等）または肯定的もしくは良い予後をより経験しそうな患者なのか、あるいは否定的な転帰（例えば、より短い生存期間、より短い時間での疾患の進行等）または否定的もしくは悪い予後をより経験しそうな患者であるのかを同定することを支援し得る。抗体（例えば、BC21）を用いたUPII発現の決定は、ある治療処置に対する患者の反応を予想することもまた支援し得る。例えば、UPII発現のレベルは、患者が特定の医薬品（抗体を用いた医薬品も含む）から利益を得られる可能性を決定することを支援し得る。反対に、UPII発現は、患者が特定の治療処置から利益を得られない可能性を決定することを支援し得る。

【 0 0 6 0 】

10

20

30

40

50

抗UPII抗体（例えば、マウスモノクローナルUPII抗体BC21）と1次抗体混合物中で多重染色手順での使用のために組み合わせた際に診断に有用となり得る抗体の他の実施態様としては、以下のものが挙げられる。

【表6 - 1】

表6

| 抗体の組み合わせ(宿主生物、細胞内局在、染色の色*) | 考えられる診断的有用性 | 実施例で用いられた検出システムおよび図表番号 |
|---|---|------------------------|
| UPIII (マウス、膜および細胞質、茶色) UPII (マウス、膜および細胞質、茶色) | UPIIおよび／もしくはUPIIIの染色が尿路上皮癌腫中に観察され得る。 | ヤギ抗マウスHRP 図10 |
| UPII(マウス、膜および細胞質、赤) GATA3(ウサギ、核、茶色) | UPIIおよび／もしくはGATA3の染色が尿路上皮癌腫中に観察され得る。 | DS#1 図11、12 |
| UPII(マウス、膜および細胞質、赤) UPIII (マウス、膜および細胞質、赤) GATA3(ウサギ、核、茶色) | UPIIおよび／もしくはUPIIIおよび／もしくはGATA3の染色が尿路上皮癌腫中に観察され得る。 | DS#1 図13 |

10

20

【表 6 - 2】

| 抗体の組み合わせ(宿主生物、細胞内局在、染色の色*) | 考えられる診断的有用性 | 実施例で用いられた検出システムおよび図表番号 | |
|--|--|------------------------|----|
| UPII(マウス、膜および細胞質、赤) PAX8(ウサギ、核、茶色) | UPIIの染色が尿路上皮癌腫中に観察され得る。 PAX8の染色が腎細胞癌腫中に観察され得る。 | DS#1 図14、15、16、17 | |
| UPII(マウス、膜および細胞質、赤) PAX8(ウサギ、核、茶色) PSA(ウサギ、細胞質、茶色) | UPIIの染色が尿路上皮癌腫中に観察され得る。 PAX8の染色が腎細胞癌腫中に観察され得る。 PSAの染色が前立腺癌腫中に観察され得る。 | DS#1 図18、19、20 | 10 |
| UPII(マウス、膜および細胞質、茶色) PAX8(ウサギ、核、赤) PSA(ウサギ、細胞質、赤) | UPIIの染色が尿路上皮癌腫中に観察され得る。 PAX8の染色が腎細胞癌腫中に観察され得る。 PSAの染色が前立腺癌腫中に観察され得る。 | DS#2 図21、22、23 | 20 |
| UPII(マウス、膜および細胞質、茶色) NKX3. 1(ウサギ、核、赤) | UPIIの染色が尿路上皮癌腫中に観察され得る。 NKX3. 1の染色が前立腺癌腫中に観察され得る。 | DS#2 図24、25 | |
| UPII(マウス、膜および細胞質、茶色) PAX8(マウス、核、茶色) NKX3. 1(ウサギ、核、赤) | UPIIの染色が尿路上皮癌腫中に観察され得る。 PAX8の染色が腎細胞癌腫中に観察され得る。 NKX3. 1の染色が前立腺腫癌中に観察され得る。 | DS#2 図26、27、28 | 30 |

【表 6 - 3】

| 抗体の組み合わせ(宿主生物、細胞内局在、染色の色*) | 考えられる診断的有用性 | 実施例で用いられた検出システムおよび図表番号 | |
|---------------------------------------|---|---------------------------------|----|
| UPII(マウス、膜および細胞質、赤) p63(マウス、核、茶色) | UPIIの染色が尿路上皮癌腫中に観察され得る。 p63の染色が尿路上皮癌腫中に観察され得る。 | ヤギ抗マウスHRP およびヤギ抗マウスAP 図29 | 40 |
| UPII(マウス、膜および細胞質、茶色) p63(マウス、核、茶色) | UPIIの染色が尿路上皮癌腫中に観察され得る。 p63の染色が正常前立腺もしくはPIN中に観察され得る。 | ヤギ抗マウスHRP 図30、31、32 | |
| UPII(マウス、膜および細胞質、赤) p40(マウス、核、茶色) | UPIIの染色が尿路上皮癌腫中に観察され得る。 p40の染色が尿路上皮癌腫中に観察され得る。 | ヤギ抗マウスHRP およびヤギ抗マウスAP 図33 | |

【 0 0 6 1 】

*それぞれの染色の挙げられた色は、検出システムの結果であり得、検出システムにはおそらくHRPと結合体化された抗マウス抗体およびおそらくAPと結合体化された抗マウス抗体さえも、おそらく色素原としてDABおよびFast Redとともに含まれ得、マウス抗体には茶色の染色、ウサギ抗体には赤色の染色をもたらし得る(DS#2として記載)。他方、検出システムにはおそらくAPと結合体化された抗マウス抗体およびおそらくHRPと結合体化された抗ウサギ抗体さえも、おそらく色素原としてDABおよびFast Redとともに含まれ得、マウス抗体には赤色の染色、ウサギ抗体には茶色の染色をもたらし得る(DS#1として記載)。いくつかの場合では、抗原が染色の細胞内局在によって区別され得るため2つの色は不必要であり得、あるいはどの抗原が染色されているかを決定することが診断的におそらく重要ではない。他の色の組み合わせは、他の検出システムもしくは色素原を用いて得られ得、全部がこの開示に包含されることが意図されている。

10

【0062】

表6に列挙された様々な混合物の非限定的な例は、単なる例示であり、またある癌の全ての場合に同じ結果が生じることを示唆することを意図するものではない。例えば、尿路上皮癌の全ての場合でUPIIおよび/もしくはGATA3に対して陽性になり得るわけではない。加えて、腎細胞癌の全ての場合でPAX8に対して陽性になり得るわけではない等である。それぞれのマーカーは他の場合では減少もしくは消失すらし得る。

【0063】

いくつかの実施態様では、尿路上皮組織を染色するもう1つの抗体(例えばUPIII)とUPIIを組み合わせることは、それぞれの抗体で別々に染色した場合と比較しておそらく感度が向上し、有用であり得る。図10は、尿路上皮癌の標本を染色したUPIIとUPIIIの混合物の例を示している。いくつかの場合では、おそらくUPIIIの染色が減少もしくは消失している場合に、UPIIの染色が観察され得る。他の場合では、おそらくUPIIの染色が減少もしくは消失している場合に、UPIIIの染色が観察され得る。

20

【0064】

UPIIとGATA3の混合物もまた尿路上皮癌に対する向上した感度を提供し得る。UPIIとGATA3の混合物により染色された尿路上皮癌の標本が図11に示されている。いくつかの場合では、おそらくGATA3の染色が減少もしくは消失している場合に、UPIIの染色が観察され得る。他の場合では、おそらくUPIIの染色が減少もしくは消失している場合に、GATA3の染色が観察され得る。

30

【0065】

尿路上皮癌の複数のマーカーを組み合わせることは、感度をさらに向上させ得る。UPIIとGATA3の混合物によって染色された標本が図12に示されている。UPIIとUPIIIとGATA3の混合物によって染色された同一の標本が図13に示されている。おそらくUPIIとUPIIIとGATA3の混合物の方がより染色が観察され、改善した感度をもたらし得る。

【0066】

UPIIとPAX8を組み合わせることは、尿路上皮癌と腎細胞癌を区別するのに有用であり得る。UPIIは尿路上皮癌を染色し得るが、尿路上皮癌はPAX8によっては染色されない(図14および15)。それに対して、腎細胞癌はPAX8によっては染色され得るが、おそらくUPIIによってはされない(図16および17)。

40

【0067】

UPIIとPAX8とPSAを組み合わせることは、尿路上皮癌、腎細胞癌および前立腺癌を区別するのに有用であり得る。UPIIは尿路上皮癌を染色し得るが、尿路上皮癌はPAX8もしくはPSAによっては染色されない(図18および21)。それに対して、腎細胞癌はPAX8によっては染色され得るが、おそらくUPIIもしくはPSAによってはされない(図19および22)。加えて、前立腺癌はPSAによっては染色され得るが、おそらくUPIIもしくはPAX8によってはされない(図20および23)。

50

【0068】

UPIIとNKX3.1を組み合わせることは、尿路上皮癌と前立腺癌を区別するのに有用であり得る。UPIIは尿路上皮癌を染色し得るが、尿路上皮癌はNKX3.1によっては染色されない(図24)。それに対して、前立腺癌はNKX3.1によって染色され得るが、おそらくUPIIによってはされない(図25)。

【0069】

UPIIとPAX8とNKX3.1を組み合わせることは、尿路上皮癌、腎細胞癌および前立腺癌を区別するのに有用であり得る。UPIIは尿路上皮癌を染色し得るが、尿路上皮癌はPAX8もしくはNKX3.1によっては染色されない(図26)。それに対して、腎細胞癌はPAX8によって染色され得るが、おそらくUPIIもしくはNKX3.1によってはされない(図27)。加えて、前立腺癌はNKX3.1によって染色され得るが、おそらくUPIIもしくはPAX8によってはされない(図28)。

10

【0070】

UPIIとp63の混合物もまた、尿路上皮癌への向上した感度を提供し得る。UPIIとp63の混合物で染色された尿路上皮癌の標本が図29および30に示されている。正常前立腺もしくはおそらく前立腺上皮内新生物(PIN)はp63によって染色され得るが、おそらくUPIIによってはされない(図31および32)。

【0071】

UPIIとp40の混合物もまた、尿路上皮癌への向上した感度を提供し得る。UPIIとp40の混合物で染色された尿路上皮癌の標本が図33に示されている。

20

【0072】

図34は、本発明の様々な実施態様の模式的な概要を示しており、おそらくハイブリドーマによっても提供される抗体、その断片、その部分を、組成物もしくは混合物中にさえおいて提供し得るキット(5)を含んでおり、抗体(1)等は生物学的サンプル(2)と接触させられ得、少なくとも1つの抗体-抗原複合体(3)を形成し、次に抗体-抗原複合体は検出器(4)によって検出され得る。

【0073】

イムノアッセイ法の一例として、本発明の実施態様は、試験される動物もしくはヒトからの組織の採取(6)、前記組織の固定もしくは凍結(7)、ウロプラキンIIIのエピトープを露出させるための固定もしくは凍結された前記組織への処理(8)、前記処理された組織と本明細書で考察される抗体もしくはその断片を、前記組織にウロプラキンIIIタンパク質が存在した場合に抗体もしくはその断片がウロプラキンIIIタンパク質に結合するような量、条件で接触させること(9)、おそらく前記結合した抗体の存在を検出すること(10)までも、図35に模式的に示されたように提供し得る。

30

【0074】

本発明は、抗体もしくはその断片(本明細書で考察されるように)を、該抗体もしくはその断片がおそらく抗原に結合した際に抗体を検出する要素とともに、含み得る診断もしくは予後の診断のキットを、実施態様において提供し得る。これは、生物学的サンプルを抗体もしくはその断片と接触させる方法、生物学的サンプル中の抗原と共存もしくはタンパク質と結合した抗体もしくはその断片の結合もしくは存在を、おそらく抗体検出要素を用いて検出する方法すらも提供し得る。実施態様は、おそらく試験される動物もしくはヒトから組織を採取することによって、本明細書で表された様々な実施態様に従い、ウロプラキンIIが組織の中に存在していた場合に抗体もしくはその断片がウロプラキンIIと結合し得るような量および条件で組織を抗体もしくはその断片と接触させることによって、また結合した抗体の存在の検出にさえもよって、哺乳動物もしくはヒトにおいてウロプラキンIIIタンパク質を検出するためのイムノアッセイ法を提供し得る。生物学的サンプルとしては、おそらく使用される抗体もしくは混合物にも依存して、血液、尿、尿路上皮組織、移行細胞組織、膀胱組織、正常組織、新生物性組織、腎臓組織、卵巣組織、甲状腺組織、子宮内膜組織、腎性組織、扁桃腺組織、膵臓組織、結腸組織、リンパ節組織、新生物性膵臓組織、胃組織、前立腺組織、肺組織および胸部組織等が挙げられ得るがそれに限

40

50

定されない。

【0075】

なお、用語（例えば、UPII、UPII抗体、UPIII、UPIII抗体、BC21もしくはBC17等）の使用は、当業者が適切であると理解する場合に、抗UPII抗体もしくは抗UPIII抗体等に関連し得る。

【0076】

前述の内容によって容易に理解できるように、本発明の基本的なコンセプトは様々な方法で具体化され得る。それは抗体の技術ならびに適切な抗体を完成させる装置の両方に関連する。本出願において、抗体技術は、記載された様々な装置によって実現されたことが示されている結果の一部として、また利用することが固有の特徴であるステップとして開示されている。それらは単に、意図および記載の通りに装置を利用したことによる自然な結果である。加えて、いくつかの装置が開示されているが、これらは特定の方法を実現させるだけでなく様々な方法で変更もされ得ることが理解されるべきである。重要なことに、前述の内容の全てに関して、これらの面の全てはこの開示に包含されることが理解されるべきである。

10

【0077】

本出願に含まれる考察は、基礎的な説明として役立つことが意図されている。読者は、具体的な考察は明示的に可能な全ての実施態様を記載しているわけではなく、多数の代替が暗示されていることに注意すべきである。それはまた、発明の一般的な性質全てを説明し得ず、また個々の特徴もしくは要素が、どのようにより広範な機能または多彩な代替もしくは等価の要素を実際に代表しているのかということについて明示的に示し得ない。重ねて、これらはこの開示に暗示的に包含される。装置志向の用語法で本発明が記載される場合、装置のそれぞれの要素は暗示的に機能を果たす。装置は、装置に関する特許請求の範囲のだけのために含まれ得るのみではなく、方法もしくは手順の特許請求の範囲もまた、発明およびそれぞれの要素が実現する機能に関連するものとして含まれ得る。記載および用語法は、そのどちらも任意の後に続く特許出願に含まれる特許請求の範囲を制限することを意図するものではない。

20

【0078】

様々な変更が発明の本質から離れることなく行われ得ることもまた理解されるべきである。そのような変更もまた、記載に暗示的に含まれる。それらもまた本発明の範囲に属する。明示的に示された（複数の）実施態様を包含する広範な開示、多様な暗示的な代替の実施態様および広範な方法もしくは手順等はこの開示に包含され、後に続く任意の特許出願の特許請求の範囲を起草する際に依存され得る。そのような言語の変更および、より広いもしくはより詳細な請求項作成は後日（例えば、任意の必要とされる期限までに）、あるいは出願人が続いてこの内容に基づいた現特許の内容を求める場合に完成され得るということが理解されるべきである。この理解とともに、読者はこの開示が、任意の後に続いて出願された特許出願であって、出願者の権利の範囲内とみなされる特許請求の範囲に基づき審査を求め得るような、また本発明の多数の局面をカバーする特許を、独立におよび1つの総体的なシステムの双方として生じさせるように計画され得るような、特許出願を支持するものとして理解されるべきであることに注意すべきである。

30

40

【0079】

さらに、本発明および請求項の様々な要素のそれぞれもまた様々な方法で実現され得る。加えて、使用もしくは暗示される際、要素は物理的に接続されてもされなくてもよい個々の複数の構造を包含すると解釈されるべきである。この開示は、任意の装置に関する実施態様、方法もしくは手順の実施態様である実施態様の変更であっても、あるいはこれらの任意の要素の単なる変更でさえあっても、それぞれのそのような変更を包含すると理解されるべきである。特に、本開示が本発明の要素に関係している場合、たとえ機能もしくは結果のみが同一であったとしても、それぞれの要素の用語は等価の装置に関する用語もしくは方法に関する用語で表現され得る。そのような等価の、より広範なもしくはより一般的でさえある用語は、それぞれの要素もしくは行為の記載に含まれると考えられるべきである

50

。そのような用語は、本発明が権利を受ける暗示的な広範な範囲を明示的にすることが望まれた場合に置き換えられることが可能である。1つの例としては、全ての行為は、その行為をおこなうための手段としてもしくはその行為を生じさせるような要素として表現され得ることが理解されるべきである。同様に、開示されたそれぞれの物理的要素は、その物理的要素が促進する行為の開示も包含すると理解されるべきである。最後の側面に関連して、1つの例としては、「検出」もしくは「検出器」の開示は、明示的に考察されているかいないかに関わらず、「検出する」という行為の開示を包含すると理解されるべきであり、また反対に、「検出する」という行為が有効に開示されている場合に、そのような開示は「検出器」および「検出するための手段」の開示さえも包含すると理解されるべきである。そのような変更および代替の用語は、本記載に明示的に含まれると理解されるべきである。さらに、そのようなそれぞれの手段（明示的にそう記載されているかいないかに関わらず）は、与えられた機能を実施できる全ての要素を包含するとして理解されるべきであり、また記載された機能を実施できる要素の全ての記載は、その機能を実施するための手段の非限定的な例として理解されるべきである。

10

【0080】

この特許出願で言及されたいかなる法律、法令、規定もしくは規則またはこの特許出願で言及された特許、文献または他の参照は、本明細書において参考として援用される。本出願によって主張される全ての優先権は参考として援用される。加えて、使用されるそれぞれの用語に関して、その本出願における使用が広く支持されている解釈と一致しない場合には、共通の辞書的定義が、それぞれの用語に対して組み入れられると理解されるべきであり、また全ての定義、代替の用語および同意語（例えば、ランダムハウスウェブスター大辞典第2版に含まれるような）は参考として援用される。最後に、下記に列挙されたもしくは引用文献の任意のリスト中の全ての参照または本出願によって提出される他の情報の記述は参考として援用されるが、しかしながら、上記のそれぞれに関して、参考として援用されたそのような情報もしくは記述が、この/これらの発明の特許権付与と一致しないと考えられ得る限りは、そのような記述は明示的に出願人によってなされたものと考えられるべきではない。

20

【表 7 - 1】

表 7

米国特許

| 特許番号 | 種別コード | 発行日 | 引用文献の特許権者もしくは出願人の氏名 |
|---------|-------|------------|---------------------|
| 7846762 | B2 | 2010-12-07 | Li et al. |

米国特許出願公開

| 公開番号 | 種別コード | 公開日 | 引用文献の特許権者もしくは出願人の氏名 |
|-------------|-------|------------|---------------------|
| 20070015908 | A1 | 2007-01-18 | Fischer et al. |

10

米国特許出願公開

| 外国文献番号 | 国コード | 種別コード | 公開日 | 引用文献の特許権者もしくは出願人の氏名 |
|------------|------|-------|------------|----------------------|
| 2012154983 | WO | A2 | 2012-11-15 | Biocare Medical, LLC |

20

非特許文献

| | |
|---|----|
| Brown, H. M. Et al. 原発性陰部パジェット病を尿路上皮癌腫続発性パジェット病と区別するためのウロプラキン I I I, Human Path. 2002;33:545-548. | |
| Koga, F. et al. 障害された p 6 3 発現は膀胱の浸潤性尿路上皮癌において悪い予後およびウロプラキン I I I 発現に関係する, Clin Cancer Res. 2003;9:5501-5507. | |
| Logani, S. et al. 新規尿路上皮マーカーを用いた推定移行細胞（尿路上皮性）分化を伴う卵巣腫瘍の免疫プロファイル：組織形成および診断的意味, Am J Surg Pathol 2003;27:1434-1441 | 30 |
| Matsumoto, K. et al. ウロプラキン I I I の発現の欠損は、侵襲性膀胱癌の臨床病理学的特徴と関係する, Urology. 2008;72:444-449. | |
| Mhaweck, P. et al. 高悪性度尿路上皮膀胱癌腫および前立腺腺癌の免疫組織化学的プロファイル, Human Path. 2002;33:1136-1140. | |
| Ogawa, K. et al. 雌性生殖器の卵巣ブレンナー腫瘍、正常組織ならびに良性および新生物性の病変におけるウロプラキン、尿路上皮特異的タンパク質の免疫組織化学的分析, Am J Pathol. 1999;155:1047-1050. | |
| Ohtsuka, Y. et al. ウロプラキン I I I の発現の欠損は、上部尿路の尿路上皮癌腫の患者の悪い予後に関係する, BJU International, 2006;97:1322-1326 | 40 |
| Parker, D. C. et. al. ウロプラキン I I I、トロンボモジュリン、高分子量サイトケラチンおよびサイトケラチン 20 の、非侵襲性、侵襲性および転移性の尿路上皮（転移細胞）癌における潜在的な有用性, Am J Surg Pathol 2003;27:1-10. | |
| Wu, X. R. et. al. 哺乳動物ウロプラキン、高度に保存された尿路上皮の分化に関連する膜タンパク質の群, J Biol Chem. 1994;269:13716-13724. | |

【表 7 - 2】

| | |
|--|----|
| Moll, R. et al. 転移性移行細胞癌腫の組織学的マーカーとしてのウロプラキン、尿路上皮アンブレラ細胞の特異的膜タンパク質, American Journal of Pathology, Vol. 147, No. 5, November 1995. | |
| Kaufmann, O. et al. ウロプラキン I I I は高度に特異的で中程度に高感度な原発性および転移性の尿路上皮癌腫の免疫組織化学的マーカーである, Am J Clin Pathol 2000;113:683-687 | |
| Wu XR, Kong XP, Pellicer A, Kreibich G, Sun TT.; 尿路上皮の生物学、機能および疾患におけるウロプラキン; Kidney Int. 2009 Jun;75(11):1153-65. | |
| Wu X, Kakehi Y, Zeng Y, Taoka R, Tsunemori H, Inui M. J ; 膀胱癌からの結節性の転移の分子診断のための有望なマーカーとしてのウロプラキン I I : サイトケラチン 2 0 との比較; Urol. 2005 Dec;174(6):2138-42. | 10 |
| Olsburgh J, Harnden P, Weeks R, Smith B, Joyce A, Hall G, Poulson R, Selby P, Southgate J.J; 正常ヒト組織および局所的に進行した膀胱癌におけるウロプラキン遺伝子の発現, Pathol. 2003 Jan;199(1):41-9. | |
| Lu JJ, Kakehi Y, Takahashi T, Wu XX, Yuasa T, Yoshiki T, Okada Y, Terachi T, Ogawa O; 尿路上皮癌患者の末梢血におけるウロプラキン I I の逆転写ポリメラーゼ連鎖反応による循環癌細胞の検出; Clin Cancer Res. 2000 Aug;6(8):3166-71. | |
| Li SM, Zhang ZT, Chan S, McLenan O, Dixon C, Taneja S, Lepor H, Sun TT, Wu XR; 膀胱の移行細胞癌腫患者のウロプラキン陽性循環細胞の検出; J Urol. 1999 Sep;162(3 Pt 1):931-5. | 20 |
| Kong XT, Deng FM, Hu P, Liang FX, Zhou G, Auerbach AB, Genieser N, Nelson PK, Robbins ES, Shapiro E, Kachar B, Sun TT.; プラーク形成、アンブレラ細胞の肥大および尿管疾患におけるウロプラキンの役割, J Cell Biol. 2004 Dec 20;167(6):1195-204. | |
| Okegawa T, Kinjo M, Nutahara K, Higashihara E.; 尿路上皮癌患者の末梢血における逆転写ポリメラーゼ連鎖アッセイの意義, J Urol. 2004 Apr;171(4):1461-6. | |
| Hong-Ying Huang, Shahrokh F. Shariat, * Tung-Tien Sun, Herbert Lepor, Ellen Shapiro, Jer-Tsong Hsieh, Raheela Ashfaq, Yair Lotan, and Xue-Ru Wu, ; 進行した尿路上皮癌腫におけるウロプラキンの持続的発現: 尿路上皮腫瘍の進行と臨床転帰における意味, Hum Pathol. 2007 November; 38(11): 1703-1713. | 30 |
| Hoang, L. L. et al., 膀胱の尿路上皮癌腫における向上した感度を持つ新規に開発されたウロプラキン I I 抗体, 欄外見出し: 尿路上皮膀胱癌腫におけるウロプラキン I I, 2013年4月17日に "Archives of Pathology and Laboratory Medicine" に公開のため提出 | |
| 2013年3月14日に出願された米国非仮出願番号 13/830, 473 名称: 抗ウロプラキン I I I 抗体のためのシステムおよび方法 | |
| 2012年9月27日に出願された米国仮出願番号 61/706, 312 名称: 抗ウロプラキン I I 抗体のためのシステムおよび方法 | |
| 寄託に関するブダペスト機密証明書 特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約 国際様式規則 7. 3 に基づく原寄託についての受託証および規則 10. 2 に基づく生存に関する証明書、抗ヒト UP II マウスハイブリドーマ: BC 21、PTA-13181、25 パイアル、Biocare Medical Inc. のための寄託、ATCC (登録商標) による種/系統の受領日: 2012年9月6日 | 40 |

【0081】

したがって、出願人は、少なくとも、i) 本明細書で開示および記載された抗体装置のそれぞれ、ii) 開示および記載された関連の方法、iii) これらの装置および方法それぞれの類似の、等価のもしくは暗示されさえした変更、iv) 開示及び記載されたように示された機能のそれぞれを実現するそれらの代替の設計、v) 開示され記載されて示さ

れた機能のそれぞれを、それを実現すると暗示されているように実現するそれらの代替の設計および方法、v i) 分離され独立した発明として示されたそれぞれの特徴、構成物およびステップ、v i i) 開示された様々なシステムまたは構成物によって促進される適用、v i i i) そのようなシステムもしくは構成物によって生産された結果物、i x) 言及された任意の具体的な分野もしくは装置に現在応用されると示されもしくは記載されたそれぞれのシステム、方法および要素、x) 付随する任意の例示に関し、また上記で実質的に記載された方法および装置、x i) ステップを実行するための手段を含む本明細書に記載された方法を実行するための装置、x i i) 開示された要素それぞれの様々な組み合わせおよび並べ替え、x i i i) それぞれの潜在的な従属項、またはそれぞれのおよび全ての独立項もしくは提示された概念への従属としての概念およびx i v) 本明細書に記載された全ての発明に対して請求項を支持し、発明の記述を行ったと理解されるべきである。

10

【0082】

現在もしくは後日のいずれでも審査のために提示される請求項に関して、実用的な理由でおよび審査の負担の大きな増大を避けるために、出願人はいつでも初期の請求項のみもしくはおそらく初期の従属項のみを伴う初期の請求項のみを提示し得ることが理解されるべきである。本出願もしくは後に続く出願の可能性のある範囲に関心のある官庁および任意の第三者は、予備的な補正、その他の補正、特許請求の範囲の言語もしくは記載された議論に関わらず本願発明、本願発明の利益を主張する場合、または任意の継続において、後日より広い特許請求の範囲が提示され得ることを理解するべきであり、それにより、任意の場合が係属している間にわたり、いかなる潜在的な主題も否認もしくは放棄する意図はない。任意の補正、特許請求の範囲の言語、またはこのもしくは任意の後に続く出願において提示された議論が先行技術を回避するためになされたと考えられる限り、そのような理由は後に提示される特許請求の範囲等によって抹消され得る可能性があるため、より広い特許請求の範囲が提示された場合もしくは時において、そのような特許請求の範囲は、任意の以前の時点で考案された任意の関連する先行技術に立ち返る必要があり得ることを要求することが理解されるべきである。審査官および、現在もしくは後の潜在的な範囲に関心のある、または任意の時点において潜在的な範囲の否認もしくは放棄の指示の可能性があるか考慮しているその他の者の両者は、そのような放棄もしくは否認は、このもしくは任意の後に続く出願においてまったく意図されていないもしくはまったく存在しないことに注意すべきである。制限(例えば、Hakim v. Cannon Aven t Group, PLC, 479 F.3d 1313 (Fed. Cir 2007) で起こったような)等は明確にこのもしくは任意の後に続く関連事項において意図されていない。加えて、サポートは新規事項制限法(ヨーロッパ特許条約123条(2)および米国特許法(USC35)132条もしくは他の同様の法規を含むがこれに限定されない)において、様々な従属項または1つの独立な請求項もしくは従属としての概念の下に提示される他の要素または他の任意の独立の請求項もしくは概念の下の要素を追加するのを可能にするために要求される程度に存在していると理解されるべきである。任意の時点で任意の請求項を起案する際に、この出願においてか、任意の後に続く出願においてかに関わらず、出願人は法的に可能な限りすべてのかつ広範な権利範囲を獲得することを意図しているということもまた理解されるべきである。微細な置換がなされる範囲において、出願人が任意の特定の実施態様を文言上包含するように任意の請求項を起案しなかった範囲において、およびその他の適用可能な場合において、出願人はどのような形であれ、出願人がすべての不測の事態を予期することが単純にでき得ないような範囲について意図もしくは実際には放棄しようとするものと理解されるべきではなく、当業者は、文言上そのような代替の実施態様を包含するような請求項を起案できたであろうとは合理的に期待されるべきではない。

20

30

40

【0083】

さらに、移行句「含む」の使用は、使用された場合もしくは時において、本明細書では「オープンエンド」請求項を維持するために、慣習的な請求項の解釈にしたがって使用される。したがって、文脈が他の意味を要求しない限り、「含む」という用語、または「含

50

んだ」もしくは「含んでいる」というバリエーションは、述べられた要素、ステップ、要素の群もしくは複数のステップを含むということを暗示することを意図するが、他のいかなる要素、ステップ、要素の群もしくは複数のステップも排除することを暗示することを意図するものではないことが理解されるべきである。そのような用語は、出願人が法的に許容される最も広い権利範囲を得るために、もっとも拡張された形で解釈されるべきである。「もしくは他のいずれかの請求項」という句の使用は、他の任意の請求項（例えば他の従属項、他の独立項、以前に挙げられた請求項および後に挙げられた請求項等）に従属する任意の請求項のためのサポートを提供するために用いられる。1つの明確にする例としては、請求項が「請求項20もしくは他のいずれかの請求項に」従属する場合などでは、所望され、なお開示の範囲内にある場合には、請求項1、請求項15、もしくは請求項25にさえも（そのようなものが存在している場合）従属するとして書き直されることが可能である。この句はまた、請求項中の要素の任意の組み合わせのためのサポートを提供し、特定の請求項の組み合わせ（例えば、方法、装置、プロセス等に関する請求項の組み合わせ）のための任意の所望の適切な先行する基礎を組み込みさえすることが理解されるべきである。

10

【0084】

最後に、任意の時点で記載された任意の請求項はここで本発明の本明細書の一部として参考として援用される。また、出願人は、任意のもしくはすべての請求項または任意の要素またはその構成物を支持するための追加の記載としての請求項のそのように援用された内容のすべてもしくは一部を使用する権利を明確に有する。また、さらに出願人は、その
20
ような請求項もしくは任意の要素もしくはその構成物の援用された内容の全部もしくは任意の部分を説明から請求項へ移動させる権利を明確に有し、あるいは、この出願による、または任意の後に続く継続、分割、もしくはその一部継続出願による保護を求める事項を特定するため必要である場合における逆の場合の権利を明確に有し、または任意の国もしくは協定の特許法律、法令もしくは規則から利益を得、それらに従い料金を減少させもしくはそれらに従うための権利も明確に有する。また、参考として援用されたそのような内容はこの出願の全体の係属（後に続く任意の継続、分割、もしくは一部係属出願、任意の再出願もしくはその上の延長を含む）している期間において有効であるとする。

【 図 1 】

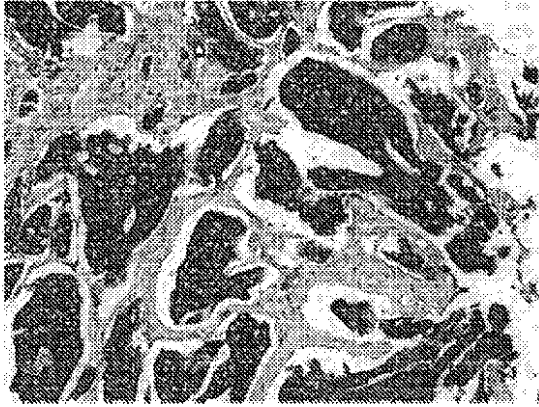


FIG. 1

【 図 2 】

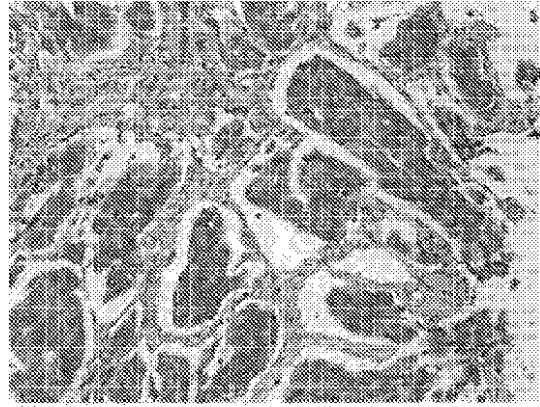


FIG. 2

【 図 3 】



FIG. 3

【 図 4 】

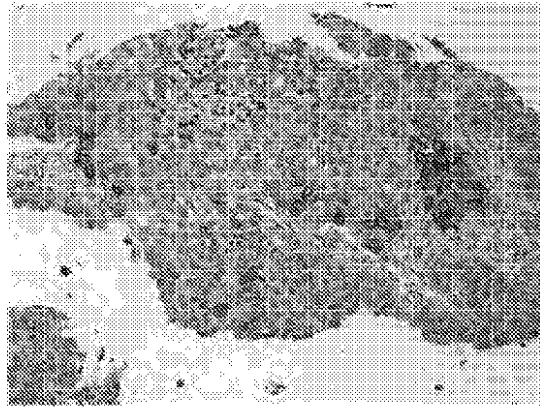


FIG. 4

【 図 5 】

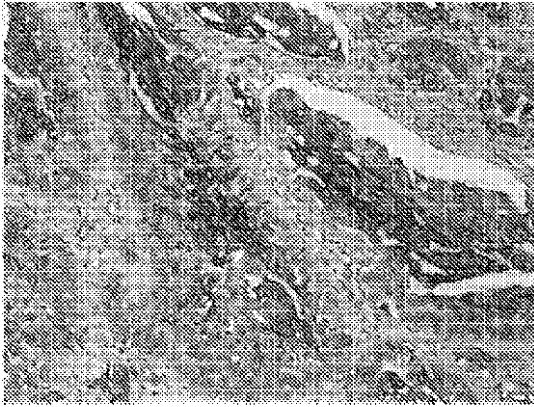


FIG. 5

【 図 6 】

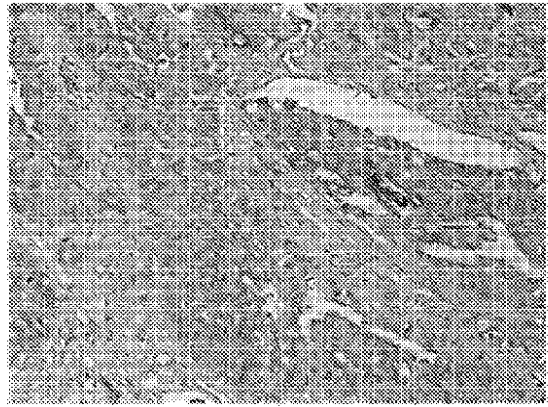


FIG. 6

【 図 7 】

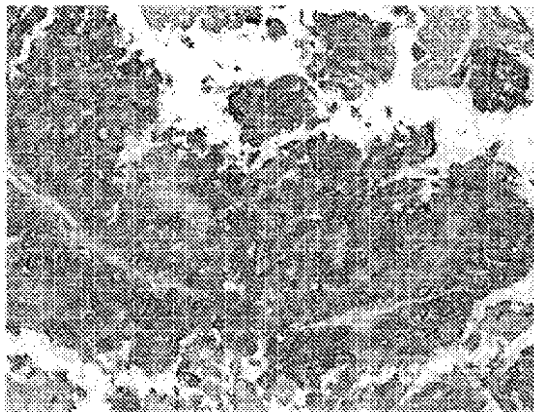


FIG. 7

【 図 8 】

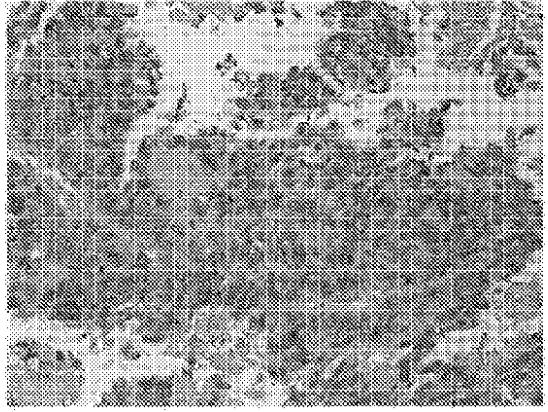


FIG. 8

【 図 9 】

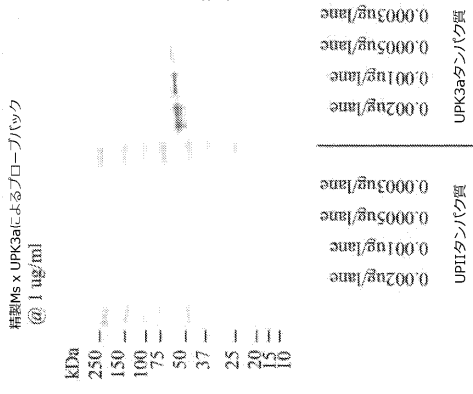


Fig. 9B

【 図 10 】

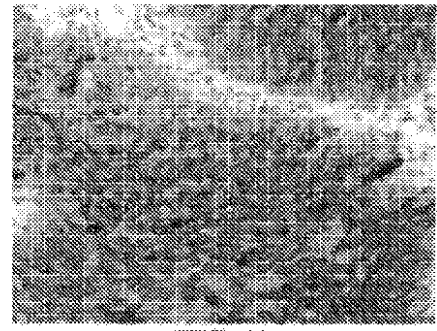


FIG. 10

【 図 11 】



FIG. 11

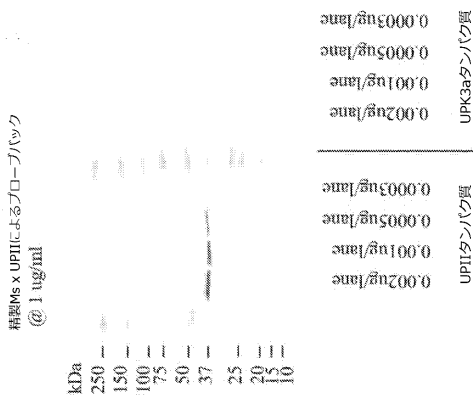


Fig. 9A

【 図 12 】



FIG. 12

【 図 14 】

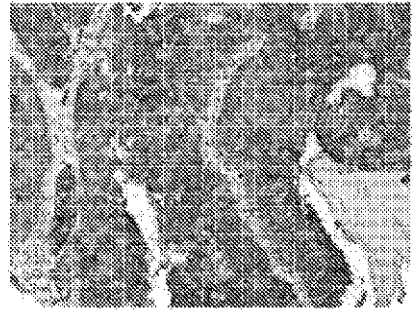


FIG. 14

【 図 13 】

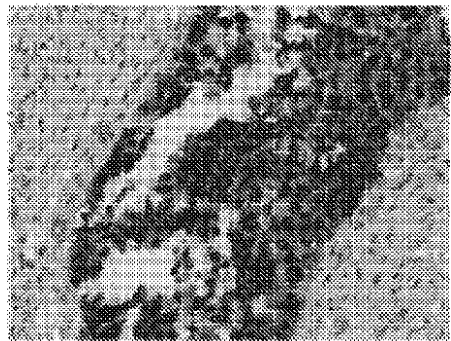


FIG. 13

【 図 15 】

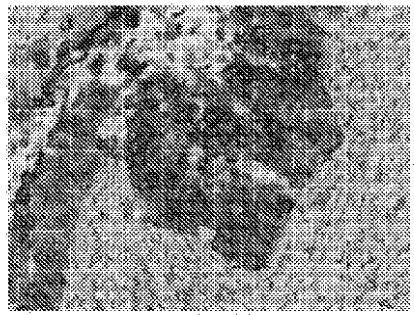


FIG. 15

【図16】

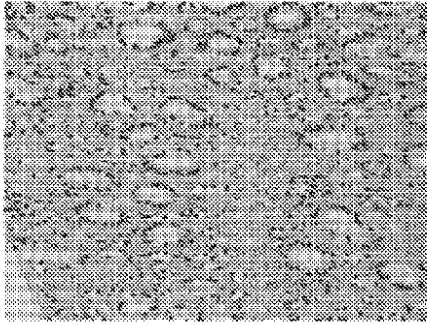


FIG. 16

【図18】

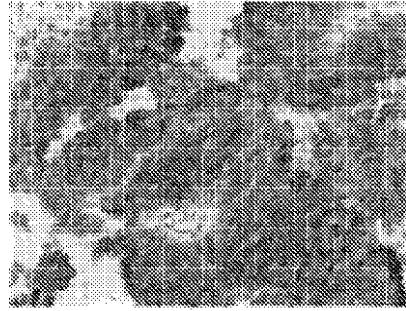


FIG. 18

【図17】

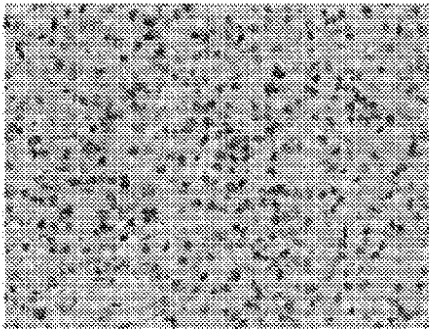


FIG. 17

【図19】

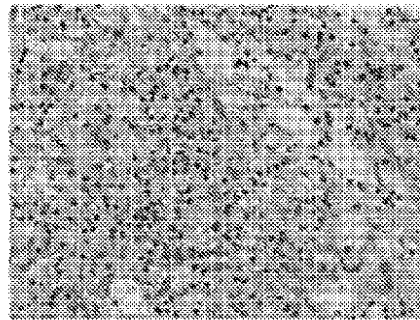


FIG. 19

【図20】

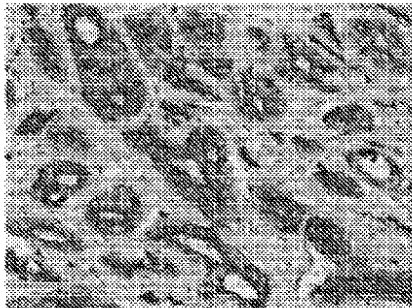


FIG. 20

【図22】

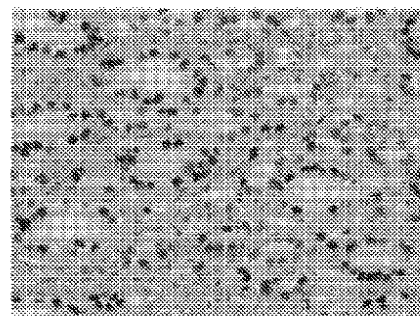


FIG. 22

【図21】

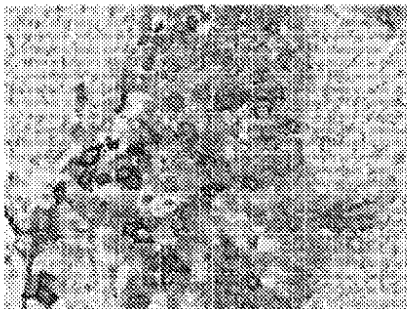


FIG. 21

【図23】

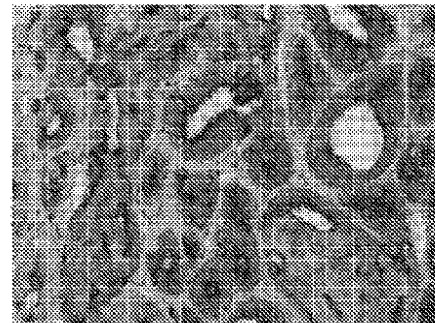


FIG. 23

【 図 2 4 】

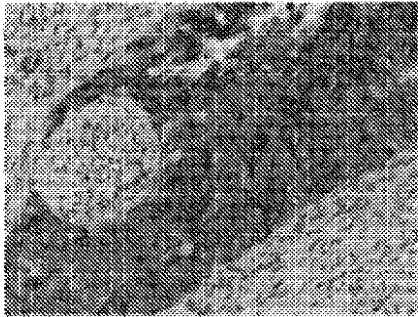


FIG. 24

【 図 2 6 】

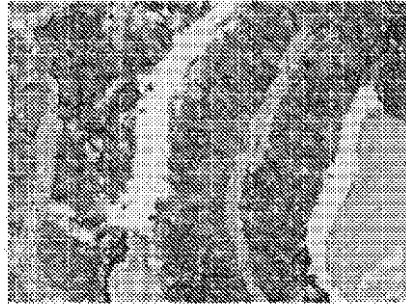


FIG. 26

【 図 2 5 】

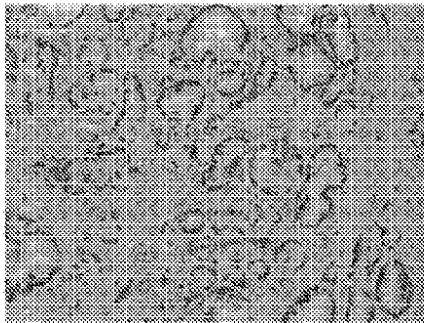


FIG. 25

【 図 2 7 】

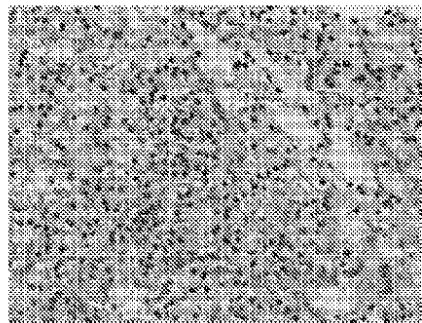


FIG. 27

【 図 2 8 】

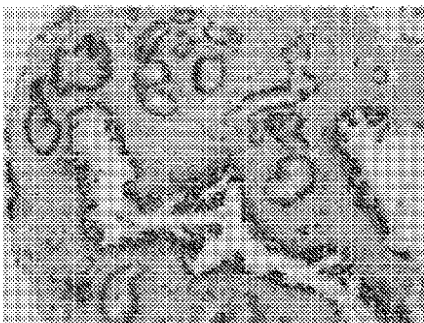


FIG. 28

【 図 3 0 】



FIG. 30

【 図 2 9 】



FIG. 29

【 図 3 1 】

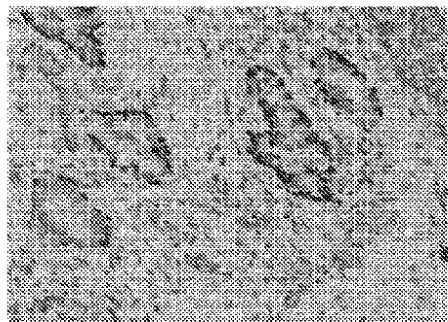


FIG. 31

【 3 2 】

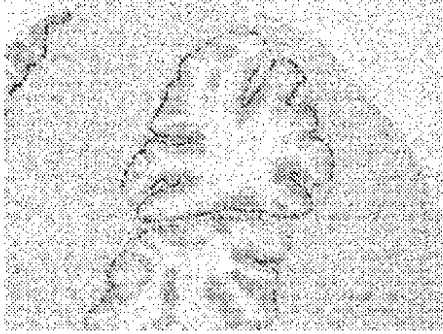


FIG. 32

【 3 3 】

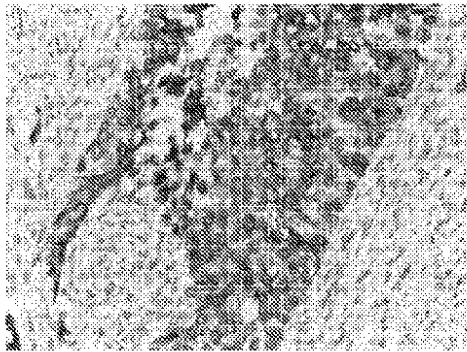


FIG. 33

【 3 5 】

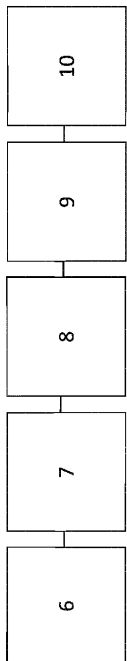


Fig. 35

【 3 4 】

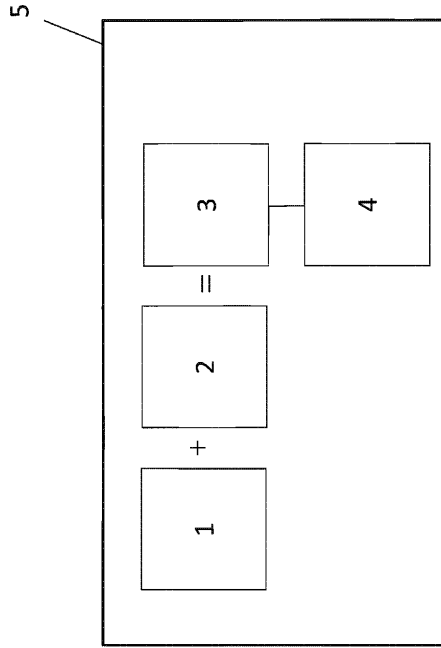


Fig. 34

【 3 6 】

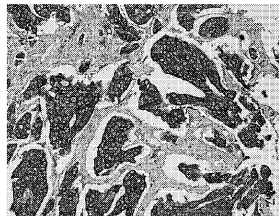


FIG. 36

【 3 7 】

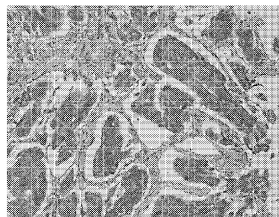


FIG. 37

【 3 8 】

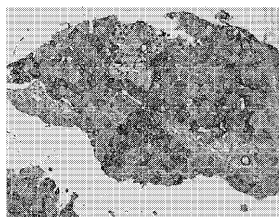


FIG. 38

【 図 3 9 】



FIG. 39

【 図 4 2 】

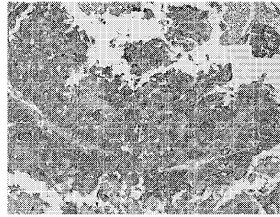


FIG. 42

【 図 4 0 】



FIG. 40

【 図 4 3 】

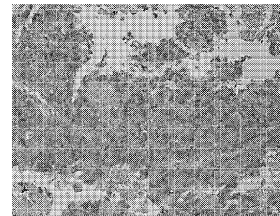


FIG. 43

【 図 4 1 】

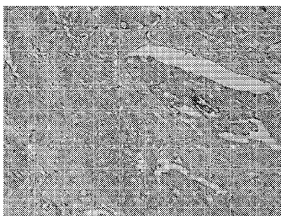


FIG. 41

【 図 4 4 】

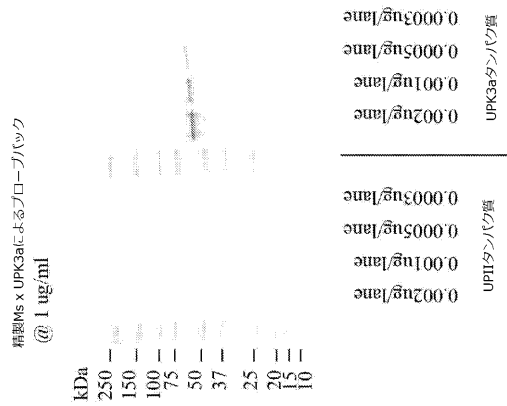


FIG. 44B

【 図 4 5 】

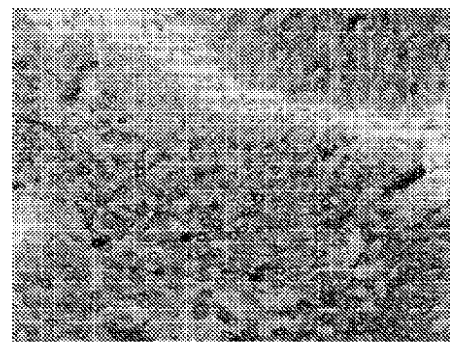


FIG. 45

【 図 4 4 】

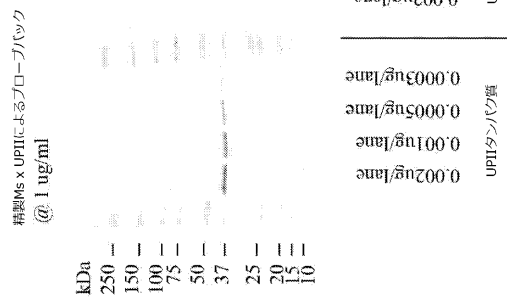


FIG. 44A

【 図 4 6 】

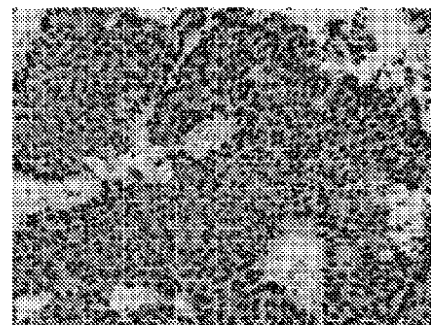


FIG. 46

【 図 4 7 】

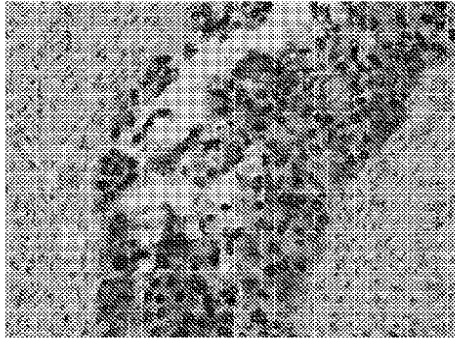


FIG. 47

【 図 4 9 】

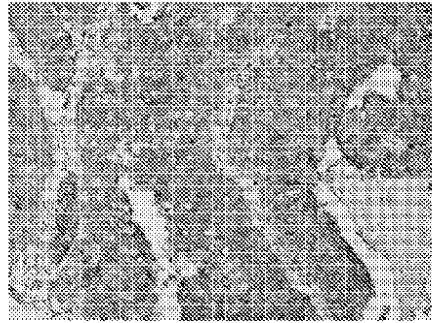


FIG. 49

【 図 4 8 】

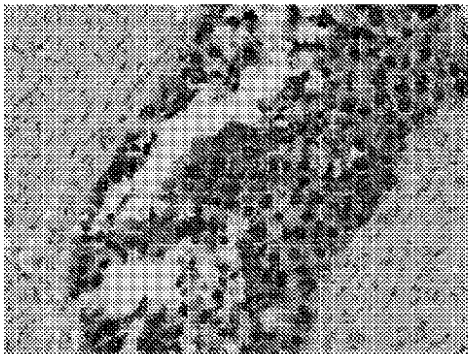


FIG. 48

【 図 5 0 】

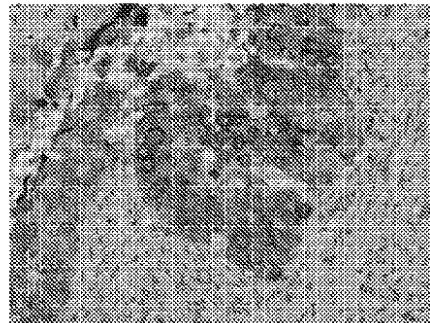


FIG. 50

【 図 5 1 】

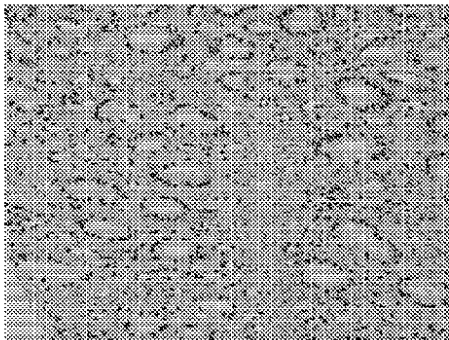


FIG. 51

【 図 5 3 】

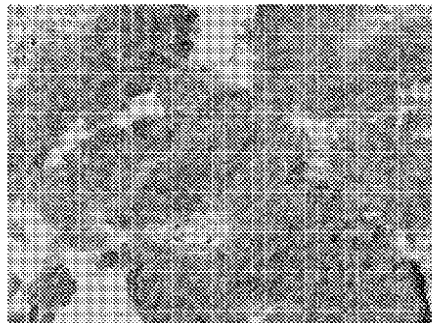


FIG. 53

【 図 5 2 】

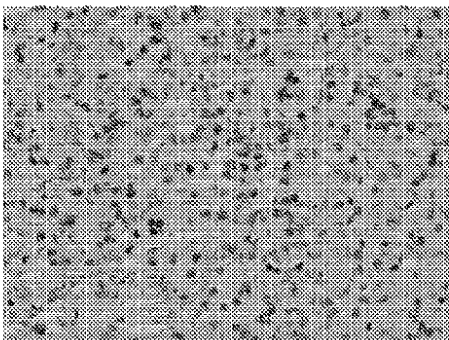


FIG. 52

【 図 5 4 】

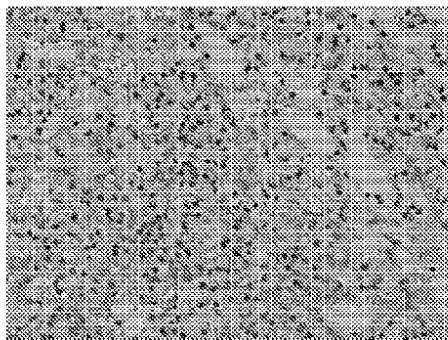


FIG. 54

【 図 5 5 】

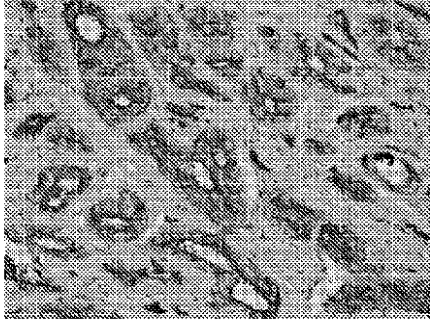


FIG. 55

【 図 5 7 】

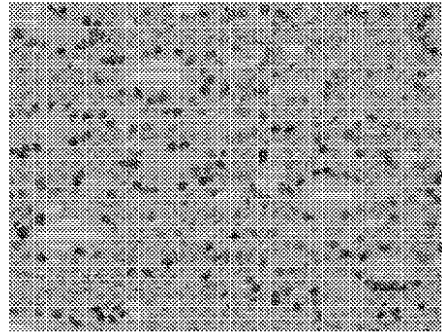


FIG. 57

【 図 5 6 】

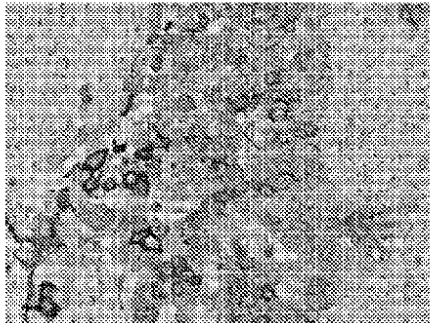


FIG. 56

【 図 5 8 】

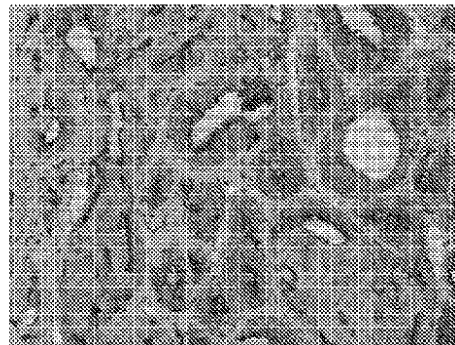


FIG. 58

【 図 5 9 】

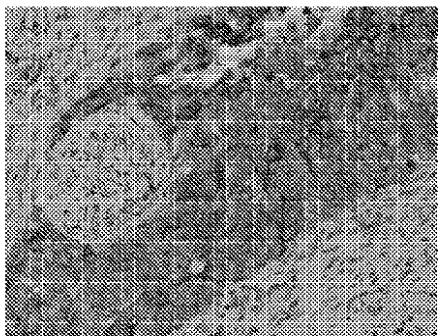


FIG. 59

【 図 6 1 】

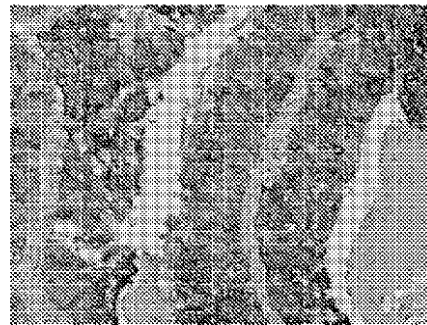


FIG. 61

【 図 6 0 】

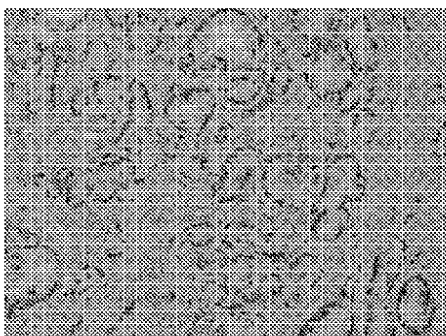


FIG. 60

【 図 6 2 】

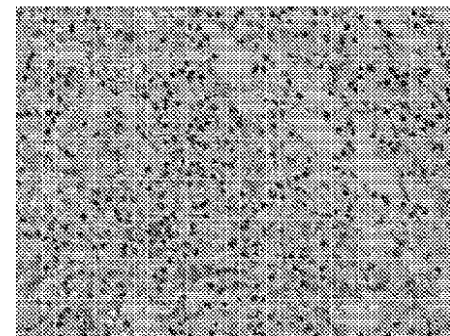


FIG. 62

【 図 6 3 】

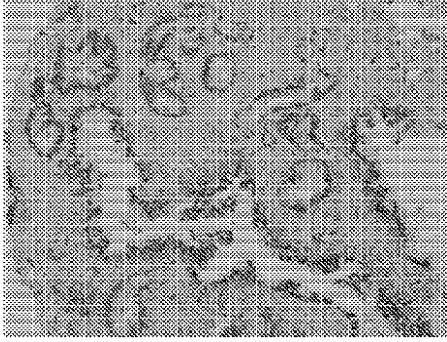


FIG. 63

【 図 6 5 】

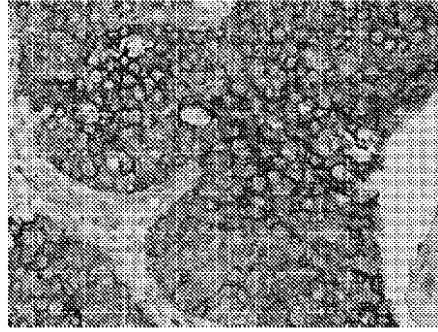


FIG. 65

【 図 6 4 】

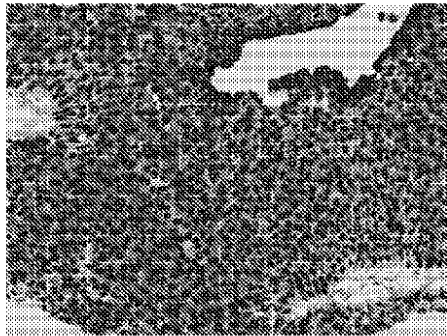


FIG. 64

【 図 6 6 】

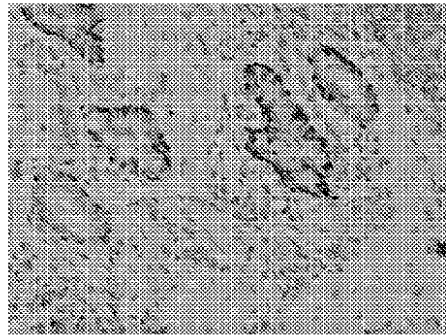


FIG. 66

【 図 6 7 】



FIG. 67

【 図 6 8 】

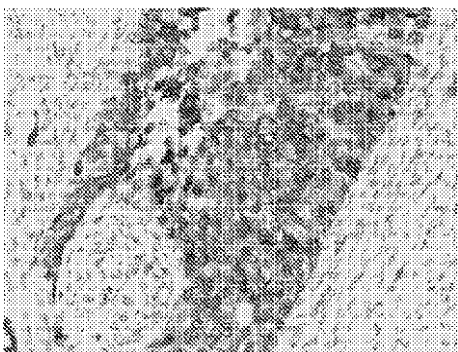


FIG. 68

【配列表】

0006324970000001.app

フロントページの続き

| | | | | |
|---------------------------------|--|----------------|--|---|
| (51)Int.Cl. | | F I | | |
| G 0 1 N 33/574 (2006.01) | | G 0 1 N 33/574 | | A |
| G 0 1 N 33/48 (2006.01) | | G 0 1 N 33/48 | | P |
| G 0 1 N 33/53 (2006.01) | | G 0 1 N 33/53 | | Y |

審査官 厚田 一拓

(56)参考文献 米国特許出願公開第2002/0009745(US,A1)
特開2006-010633(JP,A)
米国特許出願公開第2007/0015167(US,A1)
特表2005-517403(JP,A)
CANCER RESEARCH, 1998年 3月15日, Vol.58, No.6, pp.1291-1297

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 15/00 - 15/90
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN)

| | | | |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | Antiuroplakin II抗体系统和方法 | | |
| 公开(公告)号 | JP6324970B2 | 公开(公告)日 | 2018-05-23 |
| 申请号 | JP2015534675 | 申请日 | 2013-09-26 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 保科医疗LLC | | |
| 申请(专利权)人(译) | 保科医疗, 有限责任公司 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 保科医疗, 有限责任公司 | | |
| [标]发明人 | チウェイミン タチャデイビッド | | |
| 发明人 | チ, ウエイミン タチャ, デイビッド | | |
| IPC分类号 | C07K16/28 C12N5/20 C12P21/08 C12N15/02 C07K16/00 G01N33/574 G01N33/48 G01N33/53 | | |
| CPC分类号 | G01N33/57492 C07K16/28 C07K16/3038 C07K2317/20 C07K2317/34 C07K2317/56 C07K2317/565 G01N2333/705 | | |
| FI分类号 | C07K16/28.ZNA C12N5/20 C12P21/08 C12N15/00.C C07K16/00 G01N33/574.A G01N33/48.P G01N33/53.Y | | |
| 优先权 | 61/706312 2012-09-27 US | | |
| 其他公开文献 | JP2016500659A5 JP2016500659A | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

本发明涉及抗uroplakin II抗体, 试剂盒, 混合物和抗uroplakin抗体用于检测癌症的用途。本发明的一般实施方式可以包括识别UPII的单克隆抗体, 其制备方法或用于免疫组织化学等等。在一个实施方案中, 通过用对应于通过大肠杆菌表达获得的氨基酸26-155的重组人UPII蛋白免疫Balb / c小鼠获得抗UPII抗体克隆 (例如抗UPII抗体克隆BC21) 是的。

| | | |
|---|-----------------------------------|--|
| (19) 日本国特許庁(JP) | (12) 特許公報(B2) | (11) 特許番号 特許第6324970号 (P6324970) |
| (45) 発行日 平成30年5月23日 (2018. 5. 23) | (24) 登録日 平成30年4月20日 (2018. 4. 20) | |
| (51) Int. Cl. | F I | |
| C07K 16/28 (2006.01) | C07K 16/28 | ZNA |
| C12N 5/20 (2006.01) | C12N 5/20 | |
| C12P 21/08 (2006.01) | C12P 21/08 | |
| C12N 15/02 (2006.01) | C12N 15/00 | C |
| C07K 16/00 (2006.01) | C07K 16/00 | |
| 請求項の数 12 (全 53 頁) 最終頁に続く | | |
| (21) 出願番号 特願2015-534675 (P2015-534675) | (73) 特許権者 515081600 | |
| (86) (22) 出願日 平成25年9月26日 (2013. 9. 26) | バイオケア メディカル, エルエルシー | |
| (65) 公表番号 特表2016-500659 (P2016-500659A) | アメリカ合衆国 カリフォルニア 945 | |
| (43) 公表日 平成28年1月14日 (2016. 1. 14) | 20, コンコード, バイク レーン | |
| (86) 国際出願番号 PCT/US2013/062043 | 4040 | |
| (87) 国際公開番号 W02014/052672 | (74) 代理人 100107489 | |
| (87) 国際公開日 平成26年4月3日 (2014. 4. 3) | 弁理士 大塚 竹志 | |
| 審査請求日 平成28年9月26日 (2016. 9. 26) | (72) 発明者 チ, ウエイミン | |
| (31) 優先権主張番号 61/706, 312 | アメリカ合衆国 カリフォルニア 945 | |
| (32) 優先日 平成24年9月27日 (2012. 9. 27) | 53, マルティネス, ディアブロ ウ | |
| (33) 優先権主張国 米国 (US) | エイ 437 | |
| 微生物の受託番号 ATCC PTA-13181 | (72) 発明者 タチャ, デイビッド | |
| | アメリカ合衆国 カリフォルニア 945 | |
| | 83, サン クラモン, ショー プレイ | |
| | ス 73 | |
| | 最終頁に続く | |
| (54) 【発明の名称】 抗ウロプラキン I I 抗体システムおよび方法 | | |