

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-193559

(P2017-193559A)

(43) 公開日 平成29年10月26日(2017.10.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00 Z N A	4 B 0 6 3
A 6 1 K 38/16 (2006.01)	A 6 1 K 38/16	4 C 0 8 4
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 5
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)	A 6 1 K 31/7105	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/711 (2006.01)	A 6 1 K 31/711	4 H 0 4 5
審査請求 有 請求項の数 41 O L (全 83 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2017-107263 (P2017-107263)	(71) 出願人	309020703
(22) 出願日	平成29年5月31日 (2017.5.31)		ボストン メディカル センター コーポ レーション
(62) 分割の表示	特願2014-551337 (P2014-551337) の分割		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ボ ストン ワン ボストン メディカル セ ンター プレイス
原出願日	平成25年1月4日 (2013.1.4)	(74) 代理人	100102978
(31) 優先権主張番号	61/583,379		弁理士 清水 初志
(32) 優先日	平成24年1月5日 (2012.1.5)	(74) 代理人	100102118
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 春名 雅夫
(特許庁注：以下のものは登録商標)		(74) 代理人	100160923
1. J A V A			弁理士 山口 裕孝
2. V I S U A L B A S I C		(74) 代理人	100119507
3. U N I X			弁理士 刑部 俊
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 腎疾患の診断および処置のための S L I T - R O B O シグナル伝達

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】慢性腎疾患およびタンパク尿症の処置、診断ならびに進行に対する処置の効果をモニターするための方法の提供。

【解決手段】腎臓のポドサイトF-アクチン細胞骨格および足突起構造の調節における S L I T - R O B O シグナル伝達経路の役割に基づき、R O B O 2 ポリペプチドに対する阻止抗体、アンチセンス分子又は短鎖干渉RNA等の阻害剤による治療や生物学的試験試料中の R O B O 2 ポリペプチドの発現レベルまたは R O B O 2 ポリペプチドをコードするRNAの発現レベルが、参照閾値レベルを上回るかどうかを判定して、慢性腎疾患の処置または療法の必要があるかを診断する方法。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

ROBO2の生物学的活性を阻害するROBO2阻害剤と薬学的に許容される担体とを含む、ネフリン不活性化変異に起因する慢性腎疾患もしくはタンパク尿症を有する対象またはネフリン不活性化変異に起因する慢性腎疾患もしくはタンパク尿症のリスクを有する対象の治療において使用するための、薬学的組成物であって、

該ROBO2阻害剤が、抗ROBO2抗体またはROBO2に特異的に結合するその抗原結合フラグメント、ROBO2をコードする核酸に対するアンチセンス分子、ROBO2をコードする核酸に対するsiRNA分子、ROBO2に結合するRNAまたはDNAアプタマー、可溶性ROBO2タンパク質、およびROBO2阻害性ポリペプチドからなる群より選択される、前記薬学的組成物。

10

【請求項 2】

ROBO2阻害剤が、SLIT2、Nckまたはその両方に対するROBO2ポリペプチドの結合を阻害するか、または低減させる、請求項1記載の薬学的組成物。

【請求項 3】

ROBO2阻害剤がドミナントネガティブROBO2ポリペプチドである、請求項1または2に記載の薬学的組成物。

【請求項 4】

ROBO2阻害剤がドミナントネガティブ融合ROBO2ポリペプチドである、請求項1～3のいずれか一項記載の薬学的組成物。

【請求項 5】

可溶性ROBO2タンパク質阻害剤が、

SEQ ID NO: 1の46～145位のアミノ酸残基、SEQ ID NO: 1の151～237位のアミノ酸残基、SEQ ID NO: 3の30～129位のアミノ酸残基、もしくはSEQ ID NO: 3の135～221位のアミノ酸残基からなる群より選択される少なくとも1つのIg SLIT結合ドメインを含む融合ポリペプチド；または

SEQ ID NO: 3の881～1378位のアミノ酸残基を含む融合ポリペプチドを含む、請求項1～4のいずれか一項記載の薬学的組成物。

20

【請求項 6】

抗ROBO2抗体またはその抗原結合フラグメントが、

(i) SEQ ID NO: 1の46～145位のアミノ酸残基、SEQ ID NO: 1の151～237位のアミノ酸残基、SEQ ID NO: 3の30～129位のアミノ酸残基、SEQ ID NO: 3の135～221位のアミノ酸残基に対応するROBO2の少なくとも1つのIg SLIT結合ドメイン、または

30

(ii) SEQ ID NO: 3の881～1378位のアミノ酸

に特異的に結合し、該抗ROBO2抗体またはその抗原結合フラグメントが、ROBO2ポリペプチドに対するSLIT2もしくはNckの結合を阻害する、請求項1～4のいずれか一項記載の薬学的組成物。

【請求項 7】

抗ROBO2抗体またはその抗原結合フラグメントが、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト抗体、およびヒト化抗体からなる群より選択される、請求項6記載の薬学的組成物。

【請求項 8】

ROBO2阻害剤が、Ig1 SLIT結合ドメイン、Ig1およびIg2 SLIT結合ドメイン、Nck細胞内結合ドメイン、またはこれらの任意の組み合わせに特異的である、請求項1～7のいずれか一項記載の薬学的組成物。

40

【請求項 9】

ROBO2阻害性ポリペプチドが、細胞内ドメインを欠いたROBO2細胞外ドメインを含むか、または細胞外ドメインを欠いたROBO2細胞内ドメインを含む、請求項1～8のいずれか一項記載の薬学的組成物。

【請求項 10】

抗ROBO2抗体またはその抗原結合フラグメントが、ROBO2ポリペプチドに特異的に結合して、(i) SEQ ID NO: 1の46～145位のアミノ酸残基、SEQ ID NO: 1の151～237位のアミノ

50

酸残基、SEQ ID NO: 3の30～129位のアミノ酸残基、SEQ ID NO: 3の135～221位のアミノ酸残基からなる群より選択されるアミノ酸残基で、ROBO2ポリペプチドに結合するSLIT2を阻害もしくは低減させるか、または (ii) SEQ ID NO: 3の881～1378位のアミノ酸残基で、ROBO2ポリペプチドに結合するNckを阻害もしくは低減させる、請求項1～9のいずれか一項記載の薬学的組成物。

【請求項 1 1】

抗ROBO2抗体またはその抗原結合フラグメントが、抗体フラグメント、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体からなる群より選択される、請求項1～10のいずれか一項記載の薬学的組成物。

【請求項 1 2】

ROBO2阻害剤が、
(i) ROBO2の免疫グロブリン (Ig) モチーフ1および2を含み、
(ii) ROBO2の免疫グロブリン (Ig) モチーフ3、4および5を含まず、
(iii) ROBO2のフィブロネクチンIII型 (FNIII) 反復配列を含まない、
請求項1記載の薬学的組成物。

【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、その内容全体が参照により本明細書に組み入れられる、2012年1月5日に提出された米国特許仮出願第61/583,379号の35U.S.C. § 119 (e) の下での恩典を主張する。

【0002】

発明の分野

本発明の分野は、慢性腎疾患およびタンパク尿症の処置のための方法、ならびに慢性腎疾患の診断のための方法、ならびに慢性腎疾患およびタンパク尿症の進行に対する処置の効果をモニターするための方法に関する。

【0003】

政府の援助

本発明は、国立衛生研究所によって与えられた契約番号DK078226の下での政府援助を受けて為された。政府は本発明に一定の権利を有する。

【発明の概要】

【0004】

一部には、腎臓のポドサイトF-アクチン細胞骨格および足突起構造の調節におけるSLIT-ROBOシグナル伝達経路の新規かつ予想外の役割を本発明者らが発見したことに基づき、慢性腎疾患およびタンパク尿症の処置のための、ならびに慢性腎疾患の診断のための新規方法、ならびに慢性腎疾患およびタンパク尿症の進行に対する処置の効果をモニターするための新規方法が本明細書で提供される。

【0005】

したがって、一部の局面では、慢性腎疾患を有するまたは慢性腎疾患のリスクがある対象に、ROBO2阻害剤を含む組成物の治療的有効量を投与する段階を含む、その必要がある対象における慢性腎疾患の処置のための方法が本明細書で提供される。

【0006】

また、一部の局面では、タンパク尿症を有するまたはタンパク尿症のリスクがある対象に、ROBO2阻害剤を含む組成物の治療的有効量を投与する段階を含む、その必要がある対象におけるタンパク尿症の軽減のための方法も本明細書で提供される。

【0007】

これらの方法および本明細書で述べるすべてのこのような方法の一部の態様では、ROBO2阻害剤は、ROBO2に特異的な阻止抗体またはその抗原結合フラグメント、ROBO2に特異的なアンチセンス分子、ROBO2に特異的な短鎖干渉RNA (siRNA)、ROBO2の低分子阻害剤、ROBO2阻害性ポリペプチド、またはROBO2構造類似体である。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 8 】

これらの方法および本明細書で述べるすべてのこのような方法の一部の態様では、ROBO2阻害剤は、SLIT、Nck、またはその両方に対するROBO2の結合をブロックするかまたは低減する。

【 0 0 0 9 】

これらの方法および本明細書で述べるすべてのこのような方法の一部の態様では、ROBO2阻害剤は、Ig1 SLIT結合ドメイン、Ig1およびIg2 SLIT結合ドメイン、Nck細胞内結合ドメイン、またはこれらの任意の組み合わせに特異的である。

【 0 0 1 0 】

これらの方法および本明細書で述べるすべてのこのような方法の一部の態様では、ROBO2阻害性ポリペプチドは、ドミナントネガティブROBO2融合タンパク質、細胞内ドメインを欠いたROBO2細胞外ドメインを含むポリペプチド、または細胞外ドメインを欠いたROBO2細胞内ドメインを含むポリペプチドである。

【 0 0 1 1 】

これらの方法および本明細書で述べるすべてのこのような方法の一部の態様では、慢性腎疾患を有するまたは慢性腎疾患のリスクがある対象は、糖尿病性腎症または高血圧症を有する。

【 0 0 1 2 】

これらの方法および本明細書で述べるすべてのこのような方法の一部の態様では、方法は、対象に付加的な治療剤を投与する段階をさらに含む。

【 0 0 1 3 】

これらの方法および本明細書で述べるすべてのこのような方法の一部の態様では、付加的な治療剤は、アンギオテンシン変換酵素（ACE）阻害剤またはアンギオテンシンII受容体遮断剤（ARB）である。

【 0 0 1 4 】

また、一部の局面では、

a. ROBO2ポリペプチドの発現レベルまたはROBO2ポリペプチドをコードするRNAの発現レベルを決定するために、対象に由来する生物学的試験試料をアッセイする段階、

b. 生物学的試験試料中のROBO2ポリペプチドの発現レベルまたはROBO2ポリペプチドをコードするRNAの発現レベルが、参照閾値レベルを上回るかどうかを判定する段階、および

c. 対象を、慢性腎疾患の処置または療法の必要があると診断する段階を含む方法も提供される。

【 0 0 1 5 】

これらの方法および本明細書で述べるすべてのこのような方法の一部の態様では、ROBO2ポリペプチドの発現レベルをアッセイする段階は、ROBO2ポリペプチドに特異的な抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて実施される。

【 0 0 1 6 】

これらの方法および本明細書で述べるすべてのこのような方法の一部の態様では、ROBO2ポリペプチドをコードするRNAの発現レベルをアッセイする段階は、PCRまたはハイブリダイゼーションアッセイ法を用いて実施される。

【 0 0 1 7 】

これらの方法および本明細書で述べるすべてのこのような方法の一部の態様では、生物学的試験試料は、腎生検試料、尿試料、血液試料、血清試料、またはペレット化された尿試料由来の細胞である。

【 0 0 1 8 】

これらの方法および本明細書で述べるすべてのこのような方法の一部の態様では、ROBO2ポリペプチドの発現レベルまたはROBO2ポリペプチドをコードするRNAの発現レベルは、参照閾値レベルを少なくとも20%上回る。

【 0 0 1 9 】

10

20

30

40

50

これらの方法および本明細書で述べるすべてのこのような方法の一部の態様では、ROBO2ポリペプチドの発現レベルまたはROBO2ポリペプチドをコードするRNAの発現レベルは、参照閾値レベルを少なくとも2標準偏差上回る。

【0020】

また、一部の局面では、

a. 対象から単離された生物学的試験試料を、ROBO2ポリペプチドを検出する試薬またはROBO2ポリペプチドをコードするRNAを検出する試薬と接触させる段階、および

b. ROBO2ポリペプチドのレベルまたはROBO2ポリペプチドをコードするRNAのレベルを測定する段階

を含むアッセイ法であって、正常生物学的試料と比較して上昇した、ROBO2ポリペプチドのレベルまたはROBO2ポリペプチドをコードするRNAのレベルによって、慢性腎疾患を有するおよび/もしくは慢性腎疾患の進行を有するまたはタンパク尿症を有する対象が同定される、前記アッセイ法も本明細書で提供される。

【0021】

これらのアッセイ法および本明細書で述べるすべてのこのようなアッセイ法の一部の態様では、ROBO2ポリペプチドの発現レベルを検出する段階は、ROBO2ポリペプチドに特異的な抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて実施される。

【0022】

これらのアッセイ法および本明細書で述べるすべてのこのようなアッセイ法の一部の態様では、ROBO2ポリペプチドをコードするRNAの発現レベルを検出する段階は、PCRまたはハイブリダイゼーションアッセイ法を用いて実施される。

【0023】

これらのアッセイ法および本明細書で述べるすべてのこのようなアッセイ法の一部の態様では、生物学的試験試料は、腎生検試料、尿試料、血液試料、血清試料、またはペレット化された尿試料由来の細胞である。

【0024】

これらのアッセイ法および本明細書で述べるすべてのこのようなアッセイ法の一部の態様では、ROBO2ポリペプチドの発現レベルまたはROBO2ポリペプチドをコードするRNAの発現レベルは、参照閾値レベルを少なくとも20%上回る。

【0025】

これらのアッセイ法および本明細書で述べるすべてのこのようなアッセイ法の一部の態様では、ROBO2ポリペプチドの発現レベルまたはROBO2ポリペプチドをコードするRNAの発現レベルは、参照閾値レベルを少なくとも2標準偏差上回る。

【0026】

これらのアッセイ法および本明細書で述べるすべてのこのようなアッセイ法の一部の態様では、対象は、糖尿病または高血圧症と診断されている。

【0027】

一部の局面では、対象に慢性腎疾患もしくはタンパク尿症のリスクがあるかどうか、または対象が慢性腎疾患を有するかどうかを判定するためのシステムであって、

a. 対象から得られた生物学的試料中のROBO2ポリペプチドの発現レベルまたはROBO2ポリペプチドをコードするRNAの発現レベルを決定するように構成された測定モジュール、

b. 前記測定モジュールによって決定されたROBO2ポリペプチドの発現レベルまたはROBO2ポリペプチドをコードするRNAの発現レベルを受け取って、ROBO2ポリペプチドの該発現レベルまたはROBO2ポリペプチドをコードするRNAの該発現レベルが所定の参照レベルまたは比率よりも高いかどうかを判定すべく少なくとも一つの分析を実施し、かつ引き出されたコンテンツを提供するように構成された、比較モジュール、および

c. 前記比較モジュールからのデータ出力に基づくコンテンツを表示するための表示モジュールであって、該コンテンツが、ROBO2ポリペプチドもしくはRNAの前記発現レベルもしくは比率が所定の参照レベルもしくは比率よりも高いことを示すシグナルを含むか、またはROBO2の前記レベルもしくは発現比率が参照レベル以下もしくは所定の比率以下であ

10

20

30

40

50

ることを示すシグナルを含む、該表示モジュールを含む、前記システムが本明細書で提供される。

【0028】

これらのシステムおよび本明細書で述べるすべてのこのようなシステムの一部の態様では、表示モジュールに表示されるコンテンツは、対象に特定の処置レジメンを受けるよう勧めることを示すシグナルをさらに含む。

【0029】

一部の局面では、対象に慢性腎疾患もしくはタンパク尿症のリスクがあるかどうか、または対象が慢性腎疾患を有するかどうかを判定するためのシステムであって、

a. 対象から得られた少なくとも一つの試験試料を受け取って、該少なくとも一つの試験試料において、

i. ROBO2の発現比率が所定の比率よりも高い状態、または

ii. ROBO2の発現レベルが所定のレベルよりも高い状態

のいずれかの存在または非存在を決定すべく少なくとも一つの分析を実施するように構成された決定モジュール、

b. 前記決定モジュールからのデータ出力を格納するように構成された記憶装置、および

c. 前記決定モジュールからのデータ出力に基づくコンテンツを表示するための表示モジュールであって、該コンテンツが、ROBO2の前記発現比率が所定の比率よりも高いもしくはROBO2の前記レベルが所定のレベルよりも高いことを示すシグナルを含むか、またはROBO2の前記発現比率が所定の比率以下であるもしくは所定のレベル以下であることを示すシグナルを含む、該表示モジュールを含む、前記システムが本明細書で提供される。

【0030】

これらのシステムおよび本明細書で述べるすべてのこのようなシステムの一部の態様では、表示モジュールに表示されるコンテンツは、対象に特定の処置レジメンを受けるよう勧めることを示すシグナルをさらに含む。

【0031】

また、一部の局面では、慢性腎疾患またはタンパク尿症のリスクがあるヒト対象を処置するための方法であって、参照閾値レベルを上回るROBO2タンパク質のレベルを有すると判定されたヒト対象に、慢性腎疾患またはタンパク尿症の発症を予防するための処置または療法を施す段階を含む方法も本明細書で提供される。

【0032】

これらの方法および本明細書で述べるすべてのこのような方法の一部の態様では、ROBO2タンパク質のレベルは参照レベルを少なくとも20%上回る。

【0033】

これらの方法および本明細書で述べるすべてのこのような方法の一部の態様では、ROBO2タンパク質のレベルは参照レベルを少なくとも2標準偏差上回る。

【0034】

これらの方法および本明細書で述べるすべてのこのような方法の一部の態様では、慢性腎疾患またはタンパク尿症の発症を予防するための処置または療法は、ROBO2阻害剤を含む。

【0035】

これらの方法および本明細書で述べるすべてのこのような方法の一部の態様では、ROBO2阻害剤は、ROBO2に特異的な阻止抗体またはその抗原結合フラグメント、ROBO2に特異的なアンチセンス分子、ROBO2に特異的な短鎖干渉RNA (siRNA)、ROBO2の低分子阻害剤、ROBO2阻害性ポリペプチド、またはROBO2構造類似体である。

【0036】

これらの方法および本明細書で述べるすべてのこのような方法の一部の態様では、ROBO2阻害剤は、SLIT、Nck、またはその両方に対するROBO2の結合をブロックするかまたは低

10

20

30

40

50

減する。

【0037】

これらの方法および本明細書で述べるすべてのこのような方法の一部の態様では、ROBO2阻害剤は、Ig1 SLIT結合ドメイン、Ig1およびIg2 SLIT結合ドメイン、Nck細胞内結合ドメイン、またはこれらの任意の組み合わせに特異的である。

【0038】

これらの方法および本明細書で述べるすべてのこのような方法の一部の態様では、ROBO2阻害性ポリペプチドは、ドミナントネガティブROBO2融合タンパク質、細胞内ドメインを欠いたROBO2細胞外ドメインを含むポリペプチド、または細胞外ドメインを欠いたROBO2細胞内ドメインを含むポリペプチドである。

10

【0039】

また、一部の局面では、慢性腎疾患の処置における使用のためのROBO2阻害剤、およびタンパク尿症の処置における使用のためのROBO2阻害剤も本明細書で提供される。

【0040】

これらの使用および本明細書で述べるすべてのこのような使用の一部の態様では、ROBO2阻害剤は、ROBO2に特異的な阻止抗体またはその抗原結合フラグメント、ROBO2に特異的なアンチセンス分子、ROBO2に特異的な短鎖干渉RNA (siRNA)、ROBO2の低分子阻害剤、ROBO2阻害性ポリペプチド、またはROBO2構造類似体である。

【0041】

これらの使用および本明細書で述べるすべてのこのような使用の一部の態様では、ROBO2阻害剤は、SLIT、Nck、またはその両方に対するROBO2の結合をブロックするかまたは低減する。

20

【0042】

これらの使用および本明細書で述べるすべてのこのような使用の一部の態様では、ROBO2阻害剤は、Ig1 SLIT結合ドメイン、Ig1およびIg2 SLIT結合ドメイン、Nck細胞内結合ドメイン、またはこれらの任意の組み合わせに特異的である。

【0043】

これらの使用および本明細書で述べるすべてのこのような使用の一部の態様では、ROBO2阻害性ポリペプチドは、ドミナントネガティブROBO2融合タンパク質、細胞内ドメインを欠いたROBO2細胞外ドメインを含むポリペプチド、または細胞外ドメインを欠いたROBO2細胞内ドメインを含むポリペプチドである。

30

【0044】

これらの使用および本明細書で述べるすべてのこのような使用の一部の態様では、慢性腎疾患またはタンパク尿症は、糖尿病性腎症または高血圧症によって引き起こされる。

【0045】

これらの局面および本明細書で述べるすべてのこのような局面の一部の態様では、ROBO2は、SEQ ID NO: 2のmRNA配列によってコードされるSEQ ID NO: 1のアミノ酸配列を有するヒトROBO2を指す。これらの局面および本明細書で述べるすべてのこのような局面の一部の態様では、ROBO2は、SEQ ID NO: 4のmRNA配列によってコードされるSEQ ID NO: 3のアミノ酸配列を有するヒトROBO2を指す。

40

【0046】

定義

便宜上、ここで、本明細書、実施例および付属の特許請求の範囲において用いられる特定の用語をここにまとめる。特に記載されない限り、または文脈から暗示されない限り、以下の用語および語句は以下で提供する意味を含む。特に明確に記載されない限り、または文脈から明らかでない限り、以下の用語および語句は、その用語または語句が関連する分野において獲得した意味を除外しない。定義は特定の態様を説明するのを助けるために提供され、本発明の範囲は特許請求の範囲によってのみ限定されるので、特許請求される本発明を限定することを意図しない。特に定義されない限り、本明細書で使用するすべての技術および学術用語は、本発明が属する分野の当業者によって一般的に理解されるのと

50

同じ意味を有する。

【 0 0 4 7 】

本明細書で使用する場合、「含むこと」または「含む」という用語は、本発明に必須である組成物、方法、およびこれらのそれぞれの成分に関して使用されるが、必須であるか否かに関わらず、特定されていない要素も包含することを受け入れる。

【 0 0 4 8 】

本明細書で使用する場合、「本質的に～からなる」という用語は、所与の態様に必要とされる要素を指す。この用語は、本発明のその態様の基本的小および新規のまたは機能的な特徴に実質的に影響を及ぼさない付加的な要素の存在を許容する。

【 0 0 4 9 】

「からなる」という用語は、本明細書で述べる組成物、方法、およびこれらのそれぞれの成分を指し、その態様の説明において列挙されないいかなる要素も除外する。

【 0 0 5 0 】

本明細書および付属の特許請求の範囲で使用する場合、単数形態の「一つの(a)」、「一つの(an)」、および「その(the)」は、文脈上明らかに異なる指示が為されない限り、複数の言及を含む。したがって例えば、「その方法」への言及は、一つもしくは複数の方法、ならびに/または本明細書で述べる小および/もしくは本開示の読了後に当業者に明らかになる種類の段階等を含む。

【 0 0 5 1 】

操作実施例以外、または異なる指示がある場合以外は、本明細書で使用する成分の量または反応条件を表すすべての数値は、いずれの場合も「約」という用語によって修飾されていると理解されるべきである。パーセンテージに関連して使用する場合の「約」という用語は、 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 、または $\pm 1\%$ を意味し得る。

【 0 0 5 2 】

本明細書で特に定義されない限り、本出願に関連して使用される学術および技術用語は、本開示が属する分野の当業者によって一般的に理解される意味を有するものとする。本発明は、本明細書で述べる特定の方法論、プロトコルおよび試薬等に限定されず、それら自体変更され得ることが理解されるべきである。本明細書で使用する用語は、特定の態様を説明することだけを目的とし、本発明の範囲を限定することを意図しておらず、本発明の範囲は特許請求の範囲によってのみ定義される。免疫学および分子生物学における一般的な用語の定義は、The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 18th Edition, published by Merck Research Laboratories, 2006 (ISBN 0-911910-18-2); Robert S. Porter et al. (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, published by Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); およびRobert A. Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, published by VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8); Immunology by Werner Luttmann, published by Elsevier, 2006に見出すことができる。分子生物学における一般的な用語の定義は、すべてその全体が参照により本明細書に組み入れられる、Benjamin Lewin, Genes IX, published by Jones & Bartlett Publishing, 2007 (ISBN-13: 9780763740634); Kenneth et al. (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, published by Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); およびRobert A. Meyers (ed.), Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., USA (1982); Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2 ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., USA (1989); Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier Science Publishing, Inc., New York, USA (1986); またはMethods in Enzymology: Guide to Molecular Cloning Techniques Vol.152, S. L. Berger and A. R. Kimmel Eds., Academic Press Inc., San Diego, USA (1987); Current Protocols in Molecular Biology (CPMB) (Fred M. Ausubel, et al. ed., John Wiley and Sons, Inc.), Current Protocols in Protein Science (CPPS) (John E. Coligan, et. al., ed.,

10

20

30

40

50

John Wiley and Sons, Inc.) および Current Protocols in Immunology (CPI) (John E. Coligan, et. al., ed. John Wiley and Sons, Inc.) に見出される。

【 0 0 5 3 】

[本発明1001]

慢性腎疾患を有するまたは慢性腎疾患のリスクがある対象に、ROBO2阻害剤を含む組成物の治療的有効量を投与する段階を含む、その必要がある対象における慢性腎疾患の処置のための方法。

[本発明1002]

タンパク尿症を有するまたはタンパク尿症のリスクがある対象に、ROBO2阻害剤を含む組成物の治療的有効量を投与する段階を含む、その必要がある対象におけるタンパク尿症の軽減のための方法。

[本発明1003]

ROBO2阻害剤が、ROBO2に特異的な阻止抗体またはその抗原結合フラグメント、ROBO2に特異的なアンチセンス分子、ROBO2に特異的な短鎖干渉RNA (siRNA)、ROBO2の低分子阻害剤、ROBO2阻害性ポリペプチド、またはROBO2構造類似体である、本発明1001または1002のいずれかの方法。

[本発明1004]

ROBO2阻害剤が、SLIT、Nck、またはその両方に対するROBO2の結合をブロックするかまたは低減する、本発明1001～1003のいずれかの方法。

[本発明1005]

ROBO2阻害剤が、Ig1 SLIT結合ドメイン、Ig1およびIg2 SLIT結合ドメイン、Nck細胞内結合ドメイン、またはこれらの任意の組み合わせに特異的である、本発明1001～1004のいずれかの方法。

[本発明1006]

ROBO2阻害性ポリペプチドが、ドミナントネガティブROBO2融合タンパク質、細胞内ドメインを欠いたROBO2細胞外ドメインを含むポリペプチド、または細胞外ドメインを欠いたROBO2細胞内ドメインを含むポリペプチドである、本発明1003の方法。

[本発明1007]

慢性腎疾患を有するまたは慢性腎疾患のリスクがある対象が、糖尿病性腎症または高血圧症を有する、本発明1001～1006のいずれかの方法。

[本発明1008]

対象に付加的な治療剤を投与する段階をさらに含む、本発明1001～1007のいずれかの方法。

[本発明1009]

付加的な治療剤が、アンギオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害剤またはアンギオテンシンⅠ受容体遮断剤 (ARB) である、本発明1008の方法。

[本発明1010]

a. ROBO2ポリペプチドの発現レベルまたはROBO2ポリペプチドをコードするRNAの発現レベルを決定するために、対象に由来する生物学的試験試料をアッセイする段階、

b. 生物学的試験試料中のROBO2ポリペプチドの発現レベルまたはROBO2ポリペプチドをコードするRNAの発現レベルが、参照閾値レベルを上回るかどうかを判定する段階、および

c. 対象を、慢性腎疾患の処置または療法の必要があると診断する段階を含む方法。

[本発明1011]

ROBO2ポリペプチドの発現レベルをアッセイする段階が、ROBO2ポリペプチドに特異的な抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて実施される、本発明1010の方法。

[本発明1012]

ROBO2ポリペプチドをコードするRNAの発現レベルをアッセイする段階が、PCRまたはハイブリダイゼーションアッセイ法を用いて実施される、本発明1010の方法。

[本発明1013]

生物学的試験試料が、腎生検試料、尿試料、血液試料、血清試料、またはペレット化された尿試料由来の細胞である、本発明1010～1012のいずれかの方法。

[本発明1014]

ROBO2ポリペプチドの発現レベルまたはROBO2ポリペプチドをコードするRNAの発現レベルが、参照閾値レベルを少なくとも20%上回る、本発明1010～1013のいずれかの方法。

[本発明1015]

ROBO2ポリペプチドの発現レベルまたはROBO2ポリペプチドをコードするRNAの発現レベルが、参照閾値レベルを少なくとも2標準偏差上回る、本発明1010～1013のいずれかの方法。

10

[本発明1016]

a. 対象から単離された生物学的試験試料を、ROBO2ポリペプチドを検出する試薬またはROBO2ポリペプチドをコードするRNAを検出する試薬と接触させる段階、および

b. ROBO2ポリペプチドのレベルまたはROBO2ポリペプチドをコードするRNAのレベルを測定する段階

を含むアッセイ法であって、正常生物学的試料と比較して上昇した、ROBO2ポリペプチドのレベルまたはROBO2ポリペプチドをコードするRNAのレベルによって、慢性腎疾患を有するおよび/もしくは慢性腎疾患の進行を有するまたはタンパク尿症を有する対象が同定される、前記アッセイ法。

[本発明1017]

ROBO2ポリペプチドの発現レベルを検出する段階が、ROBO2ポリペプチドに特異的な抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて実施される、本発明1016のアッセイ法。

20

[本発明1018]

ROBO2ポリペプチドをコードするRNAの発現レベルを検出する段階が、PCRまたはハイブリダイゼーションアッセイ法を用いて実施される、本発明1016のアッセイ法。

[本発明1019]

生物学的試験試料が、腎生検試料、尿試料、血液試料、血清試料、またはペレット化された尿試料由来の細胞である、本発明1016～1018のいずれかのアッセイ法。

[本発明1020]

ROBO2ポリペプチドの発現レベルまたはROBO2ポリペプチドをコードするRNAの発現レベルが、参照閾値レベルを少なくとも20%上回る、本発明1016～1019のいずれかのアッセイ法。

30

[本発明1021]

ROBO2ポリペプチドの発現レベルまたはROBO2ポリペプチドをコードするRNAの発現レベルが、参照閾値レベルを少なくとも2標準偏差上回る、本発明1016～1019のいずれかのアッセイ法。

[本発明1022]

対象が、糖尿病または高血圧症と診断されている、本発明1016～1021のいずれかのアッセイ法。

[本発明1023]

対象に慢性腎疾患もしくはタンパク尿症のリスクがあるかどうか、または対象が慢性腎疾患を有するかどうかを判定するためのシステムであって、

a. 対象から得られた生物学的試料中のROBO2ポリペプチドの発現レベルまたはROBO2ポリペプチドをコードするRNAの発現レベルを決定するように構成された測定モジュール、

b. 前記測定モジュールによって決定されたROBO2ポリペプチドの発現レベルまたはROBO2ポリペプチドをコードするRNAの発現レベルを受け取って、ROBO2ポリペプチドの該発現レベルまたはROBO2ポリペプチドをコードするRNAの該発現レベルが所定の参照レベルまたは比率よりも高いかどうかを判定すべく少なくとも一つの分析を実施し、かつ引き出されたコンテンツを提供するように構成された比較モジュール、および

c. 前記比較モジュールからのデータ出力に基づくコンテンツを表示するための表示モ

40

50

ジュールであって、該コンテンツが、ROBO2ポリペプチドもしくはRNAの前記発現レベルもしくは比率が所定の参照レベルもしくは比率よりも高いことを示すシグナルを含むか、またはROBO2の前記レベルもしくは発現比率が参照レベル以下もしくは所定の比率以下であることを示すシグナルを含む、該表示モジュールを含む前記システム。

[本発明1024]

表示モジュールに表示されるコンテンツが、対象に特定の処置レジメンを受けるよう勧めることを示すシグナルをさらに含む、本発明1023のシステム。

[本発明1025]

対象に慢性腎疾患もしくはタンパク尿症のリスクがあるかどうか、または対象が慢性腎疾患を有するかどうかを判定するためのシステムであって、

a. 対象から得られた少なくとも一つの試験試料を受け取って、該少なくとも一つの試験試料において、

i. ROBO2の発現比率が所定の比率よりも高い状態、または

ii. ROBO2の発現レベルが所定のレベルよりも高い状態

のいずれかの存在または非存在を決定すべく少なくとも一つの分析を実施するように構成された決定モジュール、

b. 前記決定モジュールからのデータ出力を格納するように構成された記憶装置、および

c. 前記決定モジュールからのデータ出力に基づくコンテンツを表示するための表示モジュールであって、該コンテンツが、ROBO2の前記発現比率が所定の比率よりも高いもしくはROBO2の前記レベルが所定のレベルよりも高いことを示すシグナルを含むか、またはROBO2の前記発現比率が所定の比率以下であるもしくは所定のレベル以下であることを示すシグナルを含む、該表示モジュールを含む前記システム。

[本発明1026]

表示モジュールに表示されるコンテンツが、対象に特定の処置レジメンを受けるよう勧めることを示すシグナルをさらに含む、本発明1025のシステム。

[本発明1027]

慢性腎疾患またはタンパク尿症のリスクがあるヒト対象を処置するための方法であって、参照閾値レベルを上回るROBO2タンパク質のレベルを有すると判定されたヒト対象に、慢性腎疾患またはタンパク尿症の発症を予防するための処置または療法を施す段階を含む方法。

[本発明1028]

ROBO2タンパク質のレベルが、参照レベルを少なくとも20%上回る、本発明1027の方法。

[本発明1029]

ROBO2タンパク質のレベルが、参照レベルを少なくとも2標準偏差上回る、本発明1027の方法。

[本発明1030]

慢性腎疾患またはタンパク尿症の発症を予防するための処置または療法が、ROBO2阻害剤を含む、本発明1027～1029のいずれかの方法。

[本発明1031]

ROBO2阻害剤が、ROBO2に特異的な阻止抗体またはその抗原結合フラグメント、ROBO2に特異的なアンチセンス分子、ROBO2に特異的な短鎖干渉RNA (siRNA)、ROBO2の低分子阻害剤、ROBO2阻害性ポリペプチド、またはROBO2構造類似体である、本発明1030の方法。

[本発明1032]

ROBO2阻害剤が、SLIT、Nck、またはその両方に対するROBO2の結合をブロックするかまたは低減する、本発明1030～1031のいずれかの方法。

[本発明1033]

10

20

30

40

50

ROBO2阻害剤が、Ig1 SLIT結合ドメイン、Ig1およびIg2 SLIT結合ドメイン、Nck細胞内結合ドメイン、またはこれらの任意の組み合わせに特異的である、本発明1030～1032のいずれかの方法。

[本発明1034]

ROBO2阻害性ポリペプチドが、ドミナントネガティブROBO2融合タンパク質、細胞内ドメインを欠いたROBO2細胞外ドメインを含むポリペプチド、または細胞外ドメインを欠いたROBO2細胞内ドメインを含むポリペプチドである、本発明1031の方法。

[本発明1035]

慢性腎疾患の処置における使用のためのROBO2阻害剤。

[本発明1036]

タンパク尿症の処置における使用のためのROBO2阻害剤。

[本発明1037]

ROBO2阻害剤が、ROBO2に特異的な阻止抗体またはその抗原結合フラグメント、ROBO2に特異的なアンチセンス分子、ROBO2に特異的な短鎖干渉RNA (siRNA)、ROBO2の低分子阻害剤、ROBO2阻害性ポリペプチド、またはROBO2構造類似体である、本発明1035または1036のいずれかの使用。

[本発明1038]

ROBO2阻害剤が、SLIT、Nck、またはその両方に対するROBO2の結合をブロックするまたは低減する、本発明1035～1037のいずれかの使用。

[本発明1039]

ROBO2阻害剤が、Ig1 SLIT結合ドメイン、Ig1およびIg2 SLIT結合ドメイン、Nck細胞内結合ドメイン、またはこれらの任意の組み合わせに特異的である、本発明1035～1038のいずれかの使用。

[本発明1040]

ROBO2阻害性ポリペプチドが、ドミナントネガティブROBO2融合タンパク質、細胞内ドメインを欠いたROBO2細胞外ドメインを含むポリペプチド、または細胞外ドメインを欠いたROBO2細胞内ドメインを含むポリペプチドである、本発明1037の使用。

[本発明1041]

慢性腎疾患またはタンパク尿症が、糖尿病性腎症または高血圧症によって引き起こされている、本発明1035～1040のいずれかの使用。

以下の詳細な説明および以下の実施例は単なる説明であり、本発明の範囲に対する限定と解釈されるべきではない。当業者には明らかな、開示されている態様の様々な変更および修正が、本発明の精神および範囲から逸脱することなく為され得る。さらに、特定されるすべての特許、特許出願、および公表文献は、例えば本発明に関連して使用され得るこのような公表文献において述べられている方法を説明し、開示することを目的として明確に参照により本明細書に組み入れられる。これらの公表文献は、単にこれらの開示が本出願の出願日以前であるために提供されるものである。これに関していかなる内容も、先行発明であるとの理由でまたは何らかの他の理由で本発明者らがそのような開示に先行する権利を有しないことの承認と解釈されるべきではない。これらの文献の内容に関する日付または表現についてのすべての言明は、本願の出願人らに入手可能な情報に基づいており、これらの文献の日付または内容の正確さに関する承認をなすものではない。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 5 4 】

【図 1 - 1】図1A～1Rは、Robo2が発現され、ポドサイトの基底細胞表面に局在することを明らかにする。(図1A～1Q)のすべての免疫染色は、マウスE16.5日に600×の倍率で実施した(成体マウス系球体における免疫染色については図5A～5M参照)。(図1A～1C) Robo2は、ポドサイトスリット膜タンパク質ネフリンと共局在する。(図1D～1F) Robo2は、ポドサイトスリット膜タンパク質ポドシンと共局在する。(図1G～1I) Robo2は、系球体中のアダプタータンパク質Nckと共局在する。(図1J～1L) Robo2は、系球体基底膜タンパク質ナイドジェンに隣接する基底ポドサイト表面で発現される。(図1M～1O) Robo2は、

10

20

30

40

50

系球体内皮細胞タンパク質マーカーPecam1と共局在しない。

【図1-2】(図1P)拡大した(図1L)中の箱で囲んだ領域は、Robo2が、主として系球体基底膜マーカーであるナイドジェンに隣接するポドサイト(p)の基底細胞表面(矢印)で発現されることを示す。Robo2は、ポドサイトの頂端および外側細胞表面(矢じり)では弱く発現される。(図1Q)Robo2は、ポドサイト(p)の基底細胞表面(矢印)で主として発現され、頂端または外側細胞表面(矢じり)では弱く発現される。(図1R)免疫金電子顕微鏡法は、3週齢のマウスからのポドサイトの足突起(fp)におけるRobo2抗体に結合した金粒子(矢印)の局在を示す。GBM、系球体基底膜。倍率:50,000×。図5A~5Mも参照のこと。

【図2-1】図2A~2Jは、Robo2がアダプタータンパク質Nckと相互作用し、ネフリンと複合体を形成することを明らかにする。(図2A)酵母ツーハイブリッドアッセイは、Robo2細胞内ドメイン(Robo2-ICD)とNck1との間の正の相互作用を示す。LacZレポーター(X-gal):+++,酵母は暗色になった; ++, 明色になった; -, 24時間で白色になった。ロイシンレポーター(-Leu):+, 酵母は増殖した; -, 酵母は増殖しなかった。CC、細胞質保存領域。数字は、完全長タンパク質における残基位置を示す。(図2B)酵母ツーハイブリッドアッセイは、Nck1の最初の2つのSH3ドメインがRobo2-ICDとの相互作用のために必要であることを示す。(図2C)酵母ツーハイブリッドアッセイは、Robo2とNck1との相互作用を媒介する潜在的結合ドメインを示す。配列は、Nck1に対するRobo2内の潜在的結合領域である。プロリンリッチ領域をハイライトで示す。

【図2-2】(図2D)Robo2およびNckの共沈。レーン5の細胞溶解物は、His-myc-Robo2トランスフェクト細胞(レーン1および2で使用する)から収集する; レーン6の細胞溶解物は、His-myc-Robo2-ΔNBDトランスフェクト細胞(レーン3および4で使用する)から収集する。(図2E)Robo2、Nckおよびネフリンの共沈。(図2F)His-myc-Robo2の代わりにHis-myc-ネフリンが沈降することを除き、(図2E)と同様の共沈。

【図2-3】(図2G)腎内因性Robo2、Nckおよびネフリンの共免疫沈降。(図2H)マウス抗ネフリン抗体を使用して沈殿物を調製することを除き、(図2G)と同様のアッセイ。(I)Slit2はRobo2-Nck-ネフリン複合体形成を促進する。His-myc-Robo2、ネフリンおよびFynは、Slit2馴化培地(レーン1、3)または対照馴化培地(レーン2、4)で刺激したHEK細胞において発現される。(図2J)(図2I)の強度の定量化。データは平均±SEMとして表示する; n=7、対照と比較して * p<0.05、* * p<0.01、ペアードスチューデントt検定。図6A~6F'も参照のこと。

【図3-1】図3A~3Gは、Slit2-Robo2シグナル伝達がネフリン媒介性アクチン重合を阻害することを明らかにする。(図3A)CD16/7-NCDをHEK細胞においてRobo2と共発現させ、これらの細胞をSlit2馴化培地(Slit)または対照馴化培地(CTL)の存在下、抗CD16抗体およびローダミン結合抗IgG抗体で処理する。次に細胞を固定し、F-アクチンを明らかにするためにFITC結合ファロイジンで染色する。スケールバー、5μm。NCD:ネフリン細胞質ドメイン。(図3B)CD16/7-NCDをCD16/7-HAに置き換えて、対照アッセイとして使用することを除き、(図3A)と同様のアッセイ。(図3C)各々の群において、CD16/7クラスターを有する全細胞に対しての、F-アクチン尾部を有する細胞のパーセンテージを定量化する。データは平均±SEMとして表示し、* p<0.01、n=5。

【図3-2】(図3D)(図3A)のCD16/7-NCDを、Slit2馴化培地刺激(レーン1および3)または対照馴化培地刺激(レーン2および4)後に抗CD16抗体によって免疫沈降させる。レーン1におけるF-アクチン減少に注目されたい。CD16/7-HAを陰性対照として使用する。(図3E)(図3D)の強度の定量化。データは平均±SEMとして表示する; n=4、対照と比較して * p<0.05、ペアードスチューデントt検定。(図3F)抗ネフリン抗体を用いたRobo2ノックアウトホモ接合型(Robo2-/-)、ヘテロ接合型(Robo2+/-)、および野生型(Robo2+/+)マウス腎からのネフリンの免疫沈降。レーン3におけるF-アクチン増加に注目されたい。(図3G)(図3F)の強度の定量化。データは平均±SEMとして表示する; n=4、野生型およびヘテロ接合型と比較して * p<0.05、ANOVA分析。図7A~7Cも参照のこと。

【図4-1】図4A~4Wは、Robo2ホモ接合ヌル、Robo2ポドサイト特異的ノックアウト、な

らびにRobo2およびNphs1二重ノックアウトマウスにおけるポドサイト構造表現型を明らかにする。(図4Aおよび4B)新生児腎の代表的画像は、野生型(図4A)およびRobo2ホモ接合ヌルマウス(図4B)におけるポドサイト体(podocyte body)(矢じり)およびボーマン嚢(矢印)を示す。(図4Cおよび4D)(図4Aおよび4B)の高倍率画像は、新生児腎におけるポドサイト足突起(矢印)を示す。スケールバー、 $1\mu\text{m}$ 。(図4Eおよび4F)低倍率での3週齢腎の代表的画像は、年齢をマッチさせた対照(図4E)と比較したRobo2ホモ接合ヌルマウス(図4F)におけるポドサイト細胞体(矢じり)を示す。(図4Gおよび4H)(図4Eおよび4F)のより高い倍率の画像は、年齢をマッチさせた対照における十分に組織化されたジッパー様の足突起(図4G)と比較した3週齢のRobo2ホモ接合ヌルマウスにおける組織崩壊したより短い曲がりくねった足突起(矢印)(図4H)を示す。スケールバー、 $2\mu\text{m}$ 。

【図4-2】(図4Iおよび4J)代表的な透過型電子顕微鏡画像(倍率5000 $\times$)は、1か月齢のRobo2ポドサイト特異的ノックアウトマウスにおける巣状分節性のポドサイト足突起消失(図4J中の矢印)および対照における正常表現型(図4I)を描写する。略語:gc:糸球体毛細血管;us:尿腔。(図4Kおよび4L)より高い倍率の透過型電子顕微鏡画像(倍率40000 $\times$)は、対照(図4K)と比較して2か月齢のRobo2ポドサイト特異的突然変異マウスにおけるより幅の広いポドサイト足突起(図4L中の矢印)を示す。略語:fp、ポドサイト足突起;GBM、糸球体基底膜。(図4M)1か月齢のRobo2^{del5/flox};Tg^{Nphs2-Cre+}ポドサイト特異的ノックアウトマウス(Robo2 KO)および野生型同腹子対照(WT)におけるポドサイト足突起幅の定量化。データは平均 $\pm$ SEMとして表示し、 $n=333$ 、 $*p<0.01$ 。(図4N)スポット尿のELISAアッセイは、対照野生型(WT)と比較してRobo2^{del5/flox};Nphs2-Cre+(KO)成体マウスにおける上昇したアルブミン/クレアチニン比を示す。データは平均 $\pm$ SEMとして表示し、 $n=20$ 、 $*p<0.01$ 。(図4O)ウェスタンブロット分析は尿中のアルブミンの存在を示す;尿 $1\mu\text{l}$ を各々のウェルに負荷し、アルブミン $0.2\mu\text{g}$ を陽性対照として使用した。WT、3匹の野生型同腹子;Robo2 KO、3匹の個別のRobo2^{del5/flox};Nphs2-Cre+マウス。

【図4-3】(図4Pおよび4Q)代表的な走査型電子顕微鏡画像は、Nphs1-/-単一ホモ接合新生児マウス腎における組織崩壊した細胞突出(矢印)に類似する、破壊された相互嵌合(interdigitating)ポドサイト足突起を示す。スケールバー、 $1\mu\text{m}$ 。(図4Rおよび4S)Nphs1-/-Robo2-/-二重ホモ接合新生児マウスからの糸球体は、修復された相互嵌合足突起(矢印)を示し、Robo2をノックアウトすることによるネフリンヌル表現型の軽減を示す。(図4Tおよび4U)Robo2-/-単一ホモ接合新生児マウスからの糸球体は、不規則でより幅の広い足突起を示すが、広範囲の相互嵌合パターンの形成(矢印)も示す。(図4Vおよび4W)足突起の正常な規則正しい相互嵌合パターン(矢印)を有する新生児野生型マウスからの糸球体。図8A~8Zおよび表1~4も参照のこと。

【図5】図5A~5Mは、Robo2が、発生中の糸球体および成体の糸球体において発現されることを明らかにする。(図5Aおよび5B)インサイチュウハイブリダイゼーション分析は、Robo2転写産物がE16.5の発生中の糸球体において発現されることを示す(矢印)。倍率:60 $\times$ (図5A)および200 $\times$ (図5B)。(図5C~5F)免疫組織化学(IHC)試験はRobo2がE14.5からE17.5の発生中の糸球体において発現されることを明らかにする。倍率:600 $\times$ 。(図5G)IHCは、Robo2が5週齢の成体マウス糸球体において特異的に発現されることを示す(図5G)。DAPIは腎における細胞核を指し示す。倍率:400 $\times$ 。(図5H)5週齢の腎のIHC共局在染色は、Robo2が糸球体においてポドサイトマーカーWt1と共発現されることを示す。倍率:600 $\times$ 。(図5I~5K)Robo2およびWT1はE16.5のマウス糸球体において共発現される。倍率:600 $\times$ 。(図5Lおよび5M)5週齢の腎のIHC共局在染色は、Robo2が糸球体においてメサングウム細胞マーカーPdgfrb(図5L)および内皮細胞マーカーPecam1(図5M)と共発現されることを示す。倍率:600 $\times$ 。

【図6-1】図6A~6F'は、Robo2がNckと相互作用し、およびネフリンと複合体を形成し、これがSlit2刺激によって促進されることを明らかにする。(図6A)内因性NckとRobo2およびネフリンとの共IP。Robo2、ネフリンおよびFynをHEK細胞において発現させ、Slit2によって刺激する。内因性Nckを抗Nck抗体によって免疫沈降させる。マウスIgGを対照と

10

20

30

40

50

して使用する。ネフリンとの複合体形成はSlit2およびFyn発現によって促進される。(図6Bおよび6C) Slit2を、免疫ペルオキシダーゼ染色により新生児マウス系球体において発現させ(図6B)、系球体においてポドサイトマーカーであるシナプトボジンと共発現させる(図6C)。倍率: 600×。

【図6-2】(図6Dおよび6D') CD16/7-NCDをSlit2の存在下でHEK細胞においてRobo2と共発現させ、抗CD16抗体およびローダミン結合抗IgG抗体で処理して、次に抗Robo2抗体で固定し、染色する。CD16/7-NCDクラスターはRobo2と共局在する(図6D)が、対照CD16/7-HAクラスターでは共局在は認められない(図6D')。スケールバー: 5 μm。NCD: ネフリン細胞質ドメイン。(図6Eおよび6E') Robo2におけるNck結合ドメイン(NBD)の欠失は、Slit2の存在下でCD16/7-NCDとの共局在を低減させる。CD16/7-NCDクラスターはRobo2と共局在する(図6E)が、Robo2-ΔNBDクラスターでは共局在は認められない(図6E')。スケールバー: 5 μm。(図6Fおよび6F') Slit2刺激はHEK細胞におけるCD16/7-NCDとRobo2の共局在を促進する。CD16/7-NCDクラスターはSlit2の存在下でRobo2と共局在する(図6F)が、対照馴化培地では共局在しない(図6F')。スケールバー: 5 μm。

【図7-1】図7A~7Cは、Robo2におけるNck結合ドメインの欠失がネフリン誘導性アクチン重合に対するSlit2-Robo2阻害を障害することを明らかにする。(図7A) CD16/7-NCDおよびRobo2をHEK細胞において共発現させ、Slit2馴化培地(Slit2)または対照馴化培地(CTL)の存在下、抗CD16抗体およびローダミン結合抗IgG抗体でクラスター化した。次に細胞を固定し、F-アクチン線維を明らかにするためにFITC結合ファロイジンで染色した。共焦点顕微鏡検査を用いてF-アクチン線維とCD16/7-NCDのクラスターを検査した。スケールバー: 5 μm。NCD、ネフリン細胞質ドメイン。(図7B) CD16/7-NCDおよびRobo2-ΔNBDをHEK細胞において共発現させた。スケールバー: 5 μm。NBD、Nck結合ドメイン。

【図7-2】(図7C) 各々の群において、CD16/7-NCDクラスターを有する全細胞に対しての、F-アクチン尾部を有する細胞のパーセンテージを定量化した。データは平均±SEMとして表示し、* $p = 1.436 \times 10^{-5}$ 、** $p = 6.32 \times 10^{-5}$ 、 $n = 5$ 、ANOVA。

【図8-1】図8A~8Zは、Robo2ホモ接合ヌル、Robo2ポドサイト特異的ノックアウト、Robo2およびNphs1二重ノックアウトマウスにおける系球体表現型、ならびにRobo2-ネフリンシグナル伝達の提案モデルを明らかにする。(図8A~8F) 新生児(NB) Robo2^{del5/del5}突然変異マウス腎における系球体超微細構造の透過型電子顕微鏡分析。(図8A、8C、8E) 低倍率(図8A、2200×)、中倍率(図8C、15500×)および高倍率(図8E、52000×)での新生児ヘテロ接合Robo2対照マウスからの系球体超微細構造。(図8B、8D、8F) 低倍率(図8B)、中倍率(図8D)および高倍率(図8F)での新生児ホモ接合Robo2(-/-)(すなわちRobo2^{del5/del5})突然変異マウスからの系球体超微細構造。矢印は巣状足突起消失を指し示す。略語: gc: 系球体毛細血管; us: 尿腔; GBM: 系球体基底膜。

【図8-2】(図8G~8N) Robo2ポドサイト特異的ノックアウトマウスにおける異常なポドサイト足突起パターン。(図8G~8J) 1か月齢のRobo2^{del5/flox};Nphs2-Cre⁺ポドサイト特異的ノックアウトマウスおよび年齢をマッチさせたRobo2^{flox/+}対照マウスからの系球体の代表的な走査型電子顕微鏡画像。相互嵌合ポドサイト足突起の軽度の不規則性が1か月齢のRobo2ポドサイト特異的ノックアウトマウスにおいて認められた(図8Kおよび8N)。7か月齢で、Robo2ポドサイト特異的ノックアウトマウスは著しく不規則な足突起を発現した(図8Lおよび8N)。スケールバー: 10 μm(図8G、8H、8K、8L、倍率2000×)および2 μm(図8I、8J、8M、8N、倍率13000×)。

【図8-3】(図8O~8T) Robo2ポドサイト特異的ノックアウトマウスにおける系球体形態。(図8O~8R) 過ヨウ素酸-シッフ(PAS)染色は、年齢をマッチさせた対照(図8O、8Q)と比較して、2か月齢および6か月齢のRobo2ポドサイト特異的ノックアウトマウスからの系球体においてメサンギウム基質の拡大を示した(図8P、8R)。(図8S) 系球体の定量的分析は、年齢をマッチさせた野生型(WT)対照と比較して12か月齢のRobo2ポドサイト特異的ノックアウトマウス(MU)におけるメサンギウム基質の拡大を示す。データは平均±SEMとして表示し、 $n = 5$ 、* $p < 0.01$ 。(T) Robo2ポドサイト特異的ノックアウトはポドサイト数に影響を及ぼさない。WT-1染色を用いてポドサイト細胞を同定した。系球体断面

当たりのポドサイトの数を、4匹の年齢をマッチさせた野生型マウス (WT) と比較して4匹の1年齢Robo2^{del5/flox};Tg^{Nphs2-Cre+}ポドサイト特異的ノックアウトマウス (MU) においてカウントした。データは平均 ± SEMとして表示し、p = 0.645、t検定; 突然変異体:n = 165系球体; 対照:n = 166系球体。

【図8 - 4】(図8U~8Y) Robo2およびNphs1二重ノックアウトマウスにおける系球体表現型。(図8U) H&E染色は、Nphs1^{-/-}単一ホモ接合新生児マウスにおけるボーマン腔の特徴的な拡張(星印)を有する系球体を示す。400×。(図8V) Robo2^{-/-}単一ホモ接合新生児マウスからの系球体は、ボーマン腔の拡張が存在しないことを示す。400×。(図8W) Robo2^{-/-};Nphs1^{-/-}二重ホモ接合新生児マウスでは、有意のボーマン腔拡張を有しない正常に見える系球体(星印)が示され、Nphs1^{-/-}系球体表現型の軽減を示す; 400×。(図8X) 年齢をマッチさせた野生型新生児マウス対照からの正常な腎および系球体のH&E染色; 400×。(図8Y) 新生児マウスにおける拡張したボーマン腔を有する系球体の定量化は、Nphs1^{-/-}単一ホモ接合型(Robo2^{+/+};Nphs1^{-/-})と比較してRobo2^{-/-};Nphs1^{-/-}二重ホモ接合型におけるボーマン腔の特徴的な拡張表現型を有する系球体の有意の減少を示す。データは平均 ± SEMとして表示し、* p < 0.01。

【図8 - 5】(図8Z) ポドサイト足突起構造に影響を及ぼすネフリンに対するSlit2-Robo2シグナル伝達の阻害作用のモデル:生理的条件下で(例えば足突起発生の間)、ネフリンの細胞内リン酸化チロシンドメイン(YDxV-p)は、SH2ドメインとの相互作用を介してNckを動員する。次に今度はNckがそのSH3ドメインを介して細胞骨格調節因子を動員し、アクチン重合を促進する。Slit2はRobo2に結合して、NckのSH3ドメインとのRobo2細胞内ドメイン相互作用を増大させ、細胞骨格調節因子に対するNckの結合を妨げて、ネフリン誘導性アクチン重合の阻害をもたらす。正常な足突起構造のためのポドサイト発生の間、均衡のとれたアクチン重合が維持される。Slit2-Robo2シグナル伝達が存在しない場合(例えばRobo2がノックアウトされている場合)、ネフリン誘導性重合に対するRobo2の阻害作用が失われる。NckのSH3ドメインは下流の細胞骨格調節因子と相互作用してアクチン重合を増大させることができ、このことは、Robo2突然変異マウスにおける変化したポドサイト足突起構造を説明し得る。略語: Ig:免疫グロブリンドメイン; FN3:フィブロネクチン3型ドメイン; SH2:Srcホモログ2ドメイン; SH3:Srcホモログ3ドメイン; CC0、CC1、CC2、CC3:細胞質保存領域 0、1、2、3。

【発明を実施するための形態】

【0055】

詳細な説明

Robo2は、反発誘導キューであるSlitについての細胞表面受容体であり、神経系における軸索誘導および神経細胞移動に関与することが以前に示されている。ネフリンは腎の系球体過障壁において機能するポドサイトスリット膜タンパク質である。本発明者らは本明細書において、Robo2がマウスポドサイトなどのポドサイトの基底表面で発現され、ネフリンと共局在することを明らかにする。生化学的試験は、Robo2がアダプタータンパク質Nckを介して腎においてネフリンと複合体を形成することを示す。アクチン重合を促進するネフリンの役割とは対照的に、本発明者らは本明細書において、Slit2-Robo2シグナル伝達がネフリン誘導性アクチン重合を阻害することを示す。例えば、変化したポドサイト足突起構造および微量アルブミン尿を発現するRobo2ノックアウトマウスでは、ネフリンと結合したF-アクチンの量が増大する。遺伝子相互作用試験はさらに、Robo2の喪失がネフリンヌルマウスにおける異常なポドサイト表現型を軽減することを明らかにする。本明細書で提供する結果は、Robo2シグナル伝達がネフリンに対する負の調節因子として働き、ポドサイト足突起構造に影響を及ぼすことを示す。

【0056】

加えて、膀胱尿管逆流(VUR)を有する患者は、ROBO2遺伝子を破壊し、SLIT2-ROBO2シグナル伝達経路を無効にするドミナントネガティブROBO2融合タンパク質を生成する染色体転座を有することが示されている。通常、VURは膀胱から尿管および腎への尿の逆流を特徴とする疾患であり、VUR患者は、重篤なタンパク尿症として現れる状態、逆流性腎症

を呈し得る。VUR患者によって生成されるドミナントネガティブROBO2融合タンパク質はSLIT2-ROBO2シグナル伝達経路をブロックし、患者を逆流性腎症およびタンパク尿症から保護することが示されており、したがってこれは、慢性腎疾患の処置のためにSLIT2-ROBO2シグナル伝達経路を標的とすることの治療的価値についての動物モデルにおける本発明者らの結果を裏付け、さらに支持するものである。

【0057】

正常な腎では、有窓内皮細胞、基底膜およびポドサイトからなる、三層の糸球体毛細血管壁が血漿タンパク質に対する透過性を制限している。ポドサイトは、一次および二次突起を伸ばして糸球体基底膜の外側表面を覆う特殊な内皮細胞である。アクチンに富む互いにかみ合った二次突起または隣接するポドサイトからの足突起は、タンパク質透過に対する最終的な障壁を形成する半多孔性スリット膜によって結ばれたろ過スリットをつくる。ネフリンなどのポドサイトスリット膜タンパク質の遺伝子突然変異は、タンパク尿性腎疾患の遺伝形式と関連付けられているが (Tryggvason et al., 2006)、スリット膜を形成し、これを構成しおよびこれに結合するこれらのタンパク質は、単なる構造障壁にとどまらないことが明らかになっている。これらのタンパク質は、ポドサイト足突起構造に影響を及ぼし、F-アクチン細胞骨格との相互作用を介して機能しうる、均衡のとれたシグナル伝達ネットワークを形成している (Faul et al., 2007; Jones et al., 2006; Verma et al., 2006)。

【0058】

Roundabout (Robo) ファミリータンパク質、Robo1、Robo2、Robo3およびRobo4は、分泌リガンドSlitについての細胞表面受容体である (Dickson and Gilestro, 2006)。Slit1、Slit2およびSlit3は、もともと神経系の発生の間の軸索誘導および遊走ニューロンのための反発誘導キューとして見出された (Guan and Rao, 2003)。膜貫通タンパク質Roboは、その細胞外ドメイン内に5つのIgモチーフと3つのフィブロネクチンIII型 (FNIII) 反復配列を含む (Dickson and Gilestro, 2006)。免疫グロブリン (Ig) モチーフ1および2はどちらもSlitと相互作用するが、Roboの最初のIg1モチーフがSlitについての主要結合部位である (Dickson and Gilestro, 2006)。Roboの細胞内ドメインは、CC0、CC1、CC2およびCC3と命名された4つの細胞質保存 (CC) 配列を有する (Bashaw et al., 2000; Kidd et al., 1998; Morlot et al., 2007; Zallen et al., 1998)。CC0およびCC1はチロシンを含み、一方CC2およびCC3はプロリンに富む一続きの配列である。Slit-Roboシグナル伝達の反発活性はアクチン重合を阻害するか (Guan and Rao, 2003) またはF-アクチンの脱重合を誘導する (Piper et al., 2006)。

【0059】

Slit-Roboシグナル伝達はまた、初期腎誘導および尿管芽成長においても極めて重要な役割を果たす。Slit2またはRobo2を欠くマウス突然変異体は過剰尿管芽を発現し、重複腎、尿管膀胱移行部異常および水腎症を含む広範囲の尿管表現型を導く (Grieshammer et al., 2004; Lu et al., 2007)。ヒトにおけるROBO2の破壊は腎臓および尿路の先天異常 (CAKUT) を引き起こし、ROBO2の点突然変異が、膀胱尿管逆流 (VUR) を有する患者において同定されている (Lu et al., 2007)。本発明者らの最近の試験は、Robo2が正常な尿管口の形成のためおよび有効な逆流防止機構の維持のために極めて重要であることを明らかにしている (Wang et al., 2011)。

【0060】

本明細書で本発明者らは、Robo2が腎の糸球体ポドサイトの基底表面で発現される新規ポドサイトタンパク質であり、ネフリンおよびポドシンと共局在することを明らかにする。Robo2はアダプタータンパク質NckのSH3ドメインと直接相互作用し、ネフリンと複合体を形成する。Robo2ノックアウトマウスは変化したポドサイト足突起を発現するが、Robo2の喪失は、ネフリンヌルマウスで見られる足突起構造異常を軽減する。本明細書で述べるこれらの結果は、Robo2シグナル伝達がネフリンシグナル伝達に対する負の調節因子として働き、ポドサイト足突起構造に影響を及ぼすことを示す。加えて、本明細書で明らかにするように、患者によって生成されるドミナントネガティブROBO2融合タンパク質はSLIT2

-ROBO2シグナル伝達経路をブロックし、患者を逆流性腎症およびタンパク尿症から保護することが発見されており、したがってこれは、慢性腎疾患の処置のためにSLIT2-ROBO2シグナル伝達経路を標的とすることの治療的価値についての動物モデルにおける本明細書で述べる結果を裏付け、さらに支持するものである。

【0061】

したがって、一部の局面では、慢性腎疾患を有するまたは慢性腎疾患のリスクがある対象に、SLIT2-ROBO2シグナル伝達経路阻害剤を含む組成物の治療的有效量を投与する段階を含む、その必要がある対象における慢性腎疾患の処置のための方法が本明細書で提供される。

【0062】

また、一部の局面では、タンパク尿症を有するまたはタンパク尿症のリスクがある対象に、SLIT2-ROBO2シグナル伝達経路阻害剤を含む組成物の治療的有效量を投与する段階を含む、その必要がある対象におけるタンパク尿症の軽減のための方法も本明細書で提供される。

【0063】

他の局面では、対象において腎疾患を防止するまたは腎疾患の予防を促進するためにSLIT2-ROBO2シグナル伝達経路阻害剤を含む組成物の治療的有效量を対象に投与する段階を含む、その必要がある対象において腎疾患を防止するまたは腎疾患の予防を促進するための方法が本明細書で提供される。

【0064】

また、一部の局面では、その必要がある対象において腎疾患の影響を緩和する、腎疾患の重症度を軽減する、腎疾患を発症する可能性を軽減するおよび/または腎疾患の進行を遅らせるための方法も本明細書で提供される。

【0065】

本明細書で使用する場合、「ROBO2」は、例えばNP_001122401.1によって記載され、NM_001128929.2 (SEQ ID NO: 2) によってコードされる、アミノ酸配列

MARRHERVTRRMWTWAPGLLMMTVVFWGHQNGQGQGSRLRQEDFPPIVEHPSDVIVSK
GEPTTLNCKAEGRPPTIEWYKDGERTVTDKDDPRSHRMLLPSGSLFFLRIVHGRRSKPDEGS
YVCVARNYLGEAVSRNASLEVALLRDDFRQNPTDVVVAAGEPAILECQPPRGHPEPTIYWKK
DKVRIDDKEERISIRGGKLMISNTRKSDAGMYTCVGTNMVGERDSDPAELTVFERPTFLRPI
NQVVLIEEEAVEFRQCQVQGDQPQTVRWKKDDADLPRGRYDIKDDYTLRIKKTMTSTDEGYM
CIAENRVGKMEASATLTVRAPPQFVVRPRDQIVAQGRVTFTPCETKGNPQPAVFWQKEGSQ
NLLFPNQPPQNSRCSVSPTGDLTITNIQRSDAGYYICQALTVAGSILAKAQLEVTDVLTDRPP
PIILQGPANQTLAVDGTALLKCKATGDPLPVISWLKEGFTFPGRDPRATIQEQGTLQIKNLRIS
DTGTYTCVATSSSGETSWSAVLDTESGATISKNYDLSDLPGPPSKPQVTDVTKNSTVLSWQ
PGTPGTLPASAYIIEAFSQSVSNWQTVANHVKTTLTYVRGLRPNTIYLFMVRAINPQGLSDPS
PMSDPVRTQDISPPAQGVDRHVQVQKELGDVLVRLHNPVVLTPTTVQVTWTVDRQPQFIQGY
RVMYRQTSGLQATSSWQNLDKVPTERS AVLNLKKGVTYEIKVRPYFNEFQGMDSKSTV
RTTEEAPSAPPQSVTVLTVGSYNSTSSISVSWDPPPPDHQNGHIEYKIWCLGNETRFHINKTVD
AAIRSVIIGGLFPGIQYRVEVAASTSAGVGKSEPQPIIIGRRNEVVITENNNSITEQITDVVKQP
AFIAGIGGACWVILMGFSIWLYWRRKKRKGLSNYAVTFQRGDGGLMSNGSRPGLLNAGDPS
YPWLADSWPATSLPVNNSNSGPNEIGNFGRGDVLPVPGQGDKTATMLSDGAIYSSIDFTTKT
SYNSSSQITQATPYATTQILHSNSIHELAVDLPDPQWKSSIQQKTDLMGFGYSLPDQNKGNNG

10

20

30

40

GKGGKKKKKNKNSSKPQKNNGSTWANVPLPPPPVQPLPGTELEHYAVEQQENGYDSDSWCPPLPVQTYLHQGLEDELEEDDDRVPVTPVVRGVASSPAISFGQQSTATLTPSPREEMQPMLQAHLD
ELTRAYQFDIAKQTWHIQSNNQPPQPPVPPLGYVSGALISDLETDVADDDADDEEEALEIPRP
LRALDQTPGSSMDNLDSSVTGKAFTSSQRPRPTSPFSTDSNTSAALSQSQRPRPTKKHKGGRM
DQQPALPHRREGMTDEEALVPYSKPSFPSPGGHSSSGTASSKGSTGPRKTEVLRAGHQRNAS
DLLDIGYMGSNSQGQFTGEL

(ヒト (Homo sapiens) roundabout ホモログ2アイソフォームROB02a; SEQ ID NO: 1); または、例えばNP_002933.1によって記載され、NM_002942.4 (SEQ ID NO: 4) によってコードされる、アミノ酸配列

MSLLMFTQLLLCGFLYVRVDGSRLRQEDFPPIRIVEHPSDVIVSKGEPTTLNCKAEGRPPTIE
WYKDGERVETDKDDPRSHRMLLPSSGLFFLRIVHGRRSKPDEGSYVCVARNYLGEAVSRNA
SLEVALLRDDFRQNPTDVVVAAGEPAILECQPPRGHPEPTIYWKKDKVRIDDKEERISIRGGK
LMISNTRKSDAGMYTCVGTNMVGERDSDPAELTVFERPTFLRRPINQVVLEEEAVEFRCQVQ
GDPQPTVRWKKDDADLPRGRYDIKDDYTLRIKKTMTSTDEGTYMCIAENRVGKMEASATLTV
RAPPQFVVRPRDQIVAQGRTVTFPCETKGNPQPAVFWQKEGSQNLLFPNQPPQNSRCSVSP
TGDLTTNIQRSDAGYYICQALTVAGSILAKAQLEVTDVLTDRPPPIILQGPANQTLAVDGTAL
LKCKATGDPLPVISWLKEGFTFPGRDPRATIQEQGTLQIKNLRISDTGTYTCVATSSSGETSW
AVLDVTESGATISKNYDLSDLPGPSKPQVTDVTKNSVTLWSWQPGTPGTLPASAYIIEAFSQSV
SNSWQTVANHVKTTLTYTVRGLRPNTIYLFMVRAINPQGLSDPSPMSDPVRTQDISPPAQGV
HRQVQKELGDVLVRLHNPVVLTPPTVQVTWTVDQRQPFIQGYRVMYRQTSGLQATSSWQN
LDAKVPTERSAVLVNLKKGVTYEIKVRPYFNEFQGMDSKTVRTTEEAPSAPPQSVTVLTV
GSYNSTSSISVSWDPPPPDHQNGHIQEYKIWCLGNETRFHINKTVDAAIRSVIIGGLFPGIQYRVE
VAASTSAGVGKSEPQPIIIGRRNEVVITENNNNSITEQITDVVKQPAFIAGIGGACWVILMGFSI
WLYWRRKKRKGLSNYAVTFQRGDGGLMSNGSRPGLLNAGDPSYPWLADSWPATSLPVNNS
NSGPNEIGNFGRGDVLPVPGQGDKTATMLSDGAIYSSIDFTTKTSYNSSSQITQATPYATTQI
LHSNSIHELAVDLPDPQWKSSIQQKTDLMGFGYSLPDQNKGNNGGKGGKKKKKNKNSSKPQK
NNGSTWANVPLPPPPVQPLPGTELEHYAVEQQENGYDSDSWCPPLPVQTYLHQGLEDELEED
DDRVPVTPVVRGVASSPAISFGQQSTATLTPSPREEMQPMLQAHLDLTRAYQFDIAKQTWHIQ
SNNQPPQPPVPPLGYVSGALISDLETDVADDDADDEEEALEIPRPLRALDQTPGSSMDNLDSS
VTGKAFTSSQRPRPTSPFSTDSNTSAALSQSQRPRPTKKHKGGRMMDQQPALPHRREGMTDEE
ALVPYSKPSFPSPGGHSSSGTASSKGSTGPRKTEVLRAGHQRNASDLLDIGYMGSNSQGQFTG
EL

(ヒトroundabout ホモログ2アイソフォームROB02b; SEQ ID NO: 3) を有するポリペプチド、ならびにこれらの任意の天然に存在する対立遺伝子変異体、スプライス変異体、およびプロセシングされた形態を指す。典型的には、ROB02はヒトROB02を指す。ROB02遺伝子は、チンパンジー、アカゲザル、イヌ、ウシ、マウス、ラット、ニワトリ、ゼブラフィッシュ、ミバエ、蚊、および線虫 (C. elegans) において保存されている。ROB02の特定の残基は、例えば「ROB02 (30)」と称され得る。

【 0 0 6 6 】

ROB02の特定のドメインもこのような命名法によって称され得る。例えば、5つの免疫グロブリンモチーフおよび3つのフィブロネクチンIII型 (FNIII) 反復配列を含む、N末端ま

たは「ROBO2の細胞外ドメイン」は、SEQ ID NO: 1のROBO2 (46~848) またはSEQ ID NO: 3の ROBO2 (30~832) と称され得る。Slit2と相互作用する免疫グロブリン (Ig) モチーフ1および2、または「Ig SLIT 結合ドメイン」は、SEQ ID NO: 1のそれぞれROBO2 (46~145) およびROBO2 (151~237)、ならびにSEQ ID NO: 3のそれぞれROBO2 (30~129) およびROBO2 (135~221) と称され得る。同様に、本明細書で述べる、4つの細胞内プロリンリッチモチーフを含む、「Nck細胞内結合ドメイン」を含む「細胞内ドメイン」は、SEQ ID NO: 3のROBO2 (881~1378) と称され得る。

【0067】

本明細書で使用する場合、「ROBO2阻害剤」、「ROBO2アンタゴニスト」、「ROBO2阻害薬」および「ROBO2アンタゴニスト剤」という用語は、例えばROBO2のアダプタータンパク質Nckとの相互作用および/もしくはネフリンとの複合体形成、ネフリン媒介性アクチン重合のSLIT2-ROBO2を介した阻害、ならびに/またはROBO2に対する細胞応答の誘導などの、ROBO2シグナル伝達によって媒介される下流経路の活性を含む、インビトロ、インサイチュー、および/またはインビボでのROBO2 (ヒトROBO2などの、哺乳動物ROBO2) の生物学的活性を有意にブロックする、阻害する、低減するまたは妨げる分子または剤を指す。ROBO2阻害剤に関して本明細書で使用する「剤」という用語は、低分子、核酸、ポリペプチド、ペプチド、薬剤、イオン等のような、しかしこれらに限定されるわけではない任意の化合物または物質を意味する。「剤」は、限定されることなく、合成および天然に存在するタンパク質性および非タンパク質性実体を含む、任意の化学物質、実体、または成分であり得る。本明細書で述べる局面の一部の態様では、剤は、核酸、核酸類似体、タンパク質、抗体、ペプチド、アプタマー、核酸のオリゴマー、アミノ酸、または炭水化物であり、限定されることなく、タンパク質、オリゴヌクレオチド、リボザイム、DNAザイム、糖タンパク質、アンチセンスRNA、siRNA、リボタンパク質、アプタマー、およびこれらの修飾物および組み合わせ等を含む。本明細書で述べる治療用組成物および方法における使用のための化合物は、所望の活性および/もしくは特性を有することが公知であり得るか、または当業者に公知のスクリーニング方法を用いて、多様な化合物のライブラリから選択することができる。

【0068】

本明細書で述べる様々な局面および態様における使用のために企図される例示的なROBO2阻害剤は、抗ROBO2抗体またはROBO2に特異的に結合するその抗原結合フラグメント；ROBO2 (例えばROBO2aまたはROBO2bまたは両方) をコードする核酸に対するアンチセンス分子；ROBO2 (例えばROBO2aまたはROBO2bまたは両方) をコードする核酸に対する短鎖干渉RNA (「siRNA」) 分子；ROBO2に結合し、かつROBO2媒介性シグナル伝達を阻害する/低減する/ブロックするRNAまたはDNAアプタマー；ROBO2構造類似体；ならびに可溶性ROBO2タンパク質阻害性ポリペプチド、例えばドミナントネガティブポリペプチドまたはその融合ポリペプチドを含むが、これらに限定されるわけではない。これらの局面および本明細書で述べるすべてのこのような局面の一部の態様では、ROBO2阻害剤 (例えば抗体またはその抗原結合フラグメント) は、ROBO2に結合し (ROBO2と物理的に相互作用し)、下流のROBO2シグナル伝達を標的とし、および/またはROBO2の合成、産生もしくは放出を阻害する (低減する)。これらの局面および本明細書で述べるすべてのこのような局面の一部の態様では、ROBO2阻害剤は、SLIT2などのSLITタンパク質リガンドに結合し、その結合を妨げる。これらの局面および本明細書で述べるすべてのこのような局面の一部の態様では、ROBO2阻害剤は、一つまたは複数のROBO2アイソフォームの発現 (すなわち転写または翻訳) を特異的に低減するまたは失わせる。

【0069】

本明細書で使用する場合、ROBO2阻害剤またはアンタゴニストは、細胞 (例えばボドサイト) におけるROBO2の活性および/または発現を、ROBO2阻害剤が存在しない場合の活性または発現レベルと比較して、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少な

くとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、またはそれ以上低減する能力を有する。

【0070】

したがって、本明細書で述べる組成物および方法の一部の態様では、ROBO2阻害剤はROBO2媒介性シグナル伝達を阻害する。本明細書で述べる組成物および方法の一部の態様では、ROBO2阻害剤は、ROBO2のアダプタータンパク質Nckとの相互作用および/もしくはネフリンとの複合体形成、ネフリン媒介性アクチン重合のSLIT2-ROBO2を介した阻害、ならびに/またはROBO2に対する細胞応答の誘導を標的とする。

【0071】

本明細書で述べる組成物および方法の一部の態様では、抗体またはその抗原結合フラグメントなどのROBO2阻害剤の結合部位は、SLIT2リガンド相互作用部位などの、ROBO2リガンド相互作用部位を対象とする。本明細書で述べる組成物および方法の一部の態様では、抗体またはその抗原結合フラグメントなどのROBO2阻害剤の結合部位は、Nck相互作用部位などのROBO2アダプター相互作用部位またはROBO2の4つの細胞内プロリンリッチモチーフを含むNCK細胞内結合ドメインを対象とする。本明細書で述べる組成物および方法の一部の態様では、ROBO2阻害剤の結合部位は、受容体（例えばROBO2）とそのリガンド（例えばSLIT2）との相互作用に対して立体障害を与えるために、リガンド相互作用部位の近傍の標的上の部位を対象とする。ROBO2リガンド相互作用部位に結合することにより、本明細書で述べるROBO2阻害剤は、ROBO2の活性または発現、および下流のROBO2シグナル伝達の結果（例えばROBO2のアダプタータンパク質Nckとの相互作用および/もしくはネフリンとの複合体形成、ネフリン媒介性アクチン重合のSLIT2-ROBO2を介した阻害、ならびに/またはROBO2に対する細胞応答の誘導）を低減するまたは阻害することができる。例えば、本明細書で述べる組成物および方法の一部の態様では、ROBO2阻害剤の結合部位は、例えば、ROBO2上の少なくともIg1、好ましくはIg1およびIg2の両方の部位、すなわちSEQ ID NO: 1のそれぞれROBO2（46～145）およびROBO2（151～237）、ならびにSEQ ID NO: 3のそれぞれROBO2（30～129）およびROBO2（135～221）をブロックするまたは標的とする。本明細書で述べる組成物および方法の一部の態様では、ROBO2阻害剤の結合部位は、Nck細胞内結合ドメインを含むROBO2細胞内ドメイン、すなわちSEQ ID NO: 3のROBO2（881～1378）をブロックするまたは標的とする。本明細書で述べる組成物および方法の一部の態様では、ROBO2阻害剤の結合部位は、ROBO2の4つの細胞内プロリンリッチモチーフを含むROBO2 Nck細胞内結合ドメインをブロックするまたは標的とする。これは、抗体およびその抗原結合フラグメント、阻害剤RNA等のような当技術分野において周知の様々な手段によって、および本明細書で述べるように達成することができる。

【0072】

したがって、本明細書で述べる組成物および方法の一部の態様では、ROBO2阻害剤は、ROBO2と選択的に結合するまたは物理的に相互作用する抗体またはその抗原結合フラグメントである。本明細書で述べる組成物および方法の一部の態様では、ROBO2阻害剤は、ROBO2に結合し、Nckとの相互作用および/またはネフリンとの複合体形成を阻害するおよび/またはブロックするおよび/または妨げる抗体またはその抗原結合フラグメントである。本明細書で述べる組成物および方法の一部の態様では、抗体またはその抗原結合フラグメントは、ROBO2のIg SLIT結合ドメインに結合する。本明細書で述べる組成物および方法の一部の態様では、抗体またはその抗原結合フラグメントは、ROBO2のIg1 SLIT結合ドメインまたはROBO2のIg1 SLIT結合ドメインおよびIg2 SLIT結合ドメインの両方、すなわちSEQ ID NO: 1のそれぞれROBO2（46～145）およびROBO2（151～237）、ならびにSEQ ID NO: 3のそれぞれROBO2（30～129）およびROBO2（135～221）に結合する。本明細書で述べる組成物および方法の一部の態様では、抗体またはその抗原結合フラグメントは、ROBO2細胞内ドメイン、すなわちSEQ ID NO: 3のROBO2（881～1378）に結合するまたはこれをブロックする。本明細書で述べる組成物および方法の一部の態様では、抗体またはその抗原結合フラグメントは、ROBO2の4つの細胞内プロリンリッチモチーフを含むNck細胞内結合ドメインに結合するまたはこれをブロックする。

10

20

30

40

50

【 0 0 7 3 】

本明細書で述べる組成物における使用および本明細書で述べる方法の実施に適した、ROBO2に特異的なまたはROBO2に選択的に結合する抗体は、好ましくはモノクローナルであり、一本鎖抗体、Fabフラグメント、F(ab')フラグメント、Fab発現ライブラリによって生成されるフラグメント、および/または上記のいずれかの結合フラグメントを含む、ヒト、ヒト化またはキメラ抗体を含み得るが、これらに限定されるわけではない。抗体はまた、免疫グロブリン分子および免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分、すなわち抗原または標的結合部位または「抗原結合フラグメント」を含む分子を指す。本明細書で述べる免疫グロブリン分子は、当業者に理解されるように、任意のタイプ（例えばIgG、IgE、IgM、IgD、IgAおよびIgY）、クラス（例えばIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1およびIgA2）またはサブクラスの免疫グロブリン分子であり得る。

【 0 0 7 4 】

したがって、本明細書で述べる組成物および方法の一部の態様では、本明細書で述べるROBO2阻害剤は、モノクローナル抗ROBO2抗体または抗原結合フラグメントである。

【 0 0 7 5 】

本明細書で述べる組成物および方法の一部の態様では、本明細書で述べるROBO2阻害剤は、ROBO2抗体フラグメントまたは抗原結合フラグメントである。本明細書で使用する「抗体フラグメント」、「抗原結合フラグメント」および「抗体誘導体」という用語は、一般にはインタクトな抗体の抗原結合部位を含む、したがって抗原に結合する能力を保持する、インタクトな抗体の一部分だけを含むタンパク質フラグメントを指す。抗体フラグメントまたは抗原結合フラグメントという用語に包含される抗体フラグメントの例は、(i) V_L 、 C_L 、 V_H および C_H1 ドメインを有する、Fabフラグメント、(ii) C_H1 ドメインのC末端に一つまたは複数のシステイン残基を有するFabフラグメントである、Fab'フラグメント、(iii) V_H および C_H1 ドメインを有するFdフラグメント、(iv) V_H および C_H1 ドメインならびに C_H1 ドメインのC末端に一つまたは複数のシステイン残基を有するFd'フラグメント、(v) 抗体の一本の腕の V_L および V_H ドメインを有するFvフラグメント、(vi) V_H ドメインまたは V_L ドメインからなるdAbフラグメント (Ward et al., Nature 341, 544-546 (1989))、(vii) 単離されたCDR領域、(viii) ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって連結された2つのFab'フラグメントを含む二価フラグメントである、 $F(ab')_2$ フラグメント、(ix) 一本鎖抗体分子（例えば一本鎖Fv、scFv） (Bird et al., Science 242:423-426 (1988))；およびHuston et al., PNAS (USA) 85:5879-5883 (1988))、(x) 同じポリペプチド鎖中で軽鎖可変ドメイン (V_L) に結合された重鎖可変ドメイン (V_H) を含む、2つの抗原結合部位を有する「ダイアボディ」（例えばEP 404,097；国際公開公報第93/11161号；およびHollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993) 参照）、(xi) 相補的軽鎖ポリペプチドと共に、一対の抗原結合領域を形成する一対のタンデムFdセグメント (V_H - C_H1 - V_H - C_H1) を含む「直鎖抗体」 (Zapata et al. Protein Eng. 8 (10): 1057-1062 (1995))；および米国特許第5,641,870号)、ならびに前記のいずれかの修飾型（例えばポリアルキレングリコール（例えばポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリブチレングリコール）または他の適切なポリマーの共有結合によって修飾された）を含む。

【 0 0 7 6 】

本明細書で述べる組成物および方法の一部の態様では、ROBO2阻害剤またはアンタゴニストは、ROBO2アンタゴニスト抗体またはその抗原結合フラグメントのキメラ抗体誘導体である。

【 0 0 7 7 】

本明細書で述べるROBO2阻害剤またはアンタゴニスト抗体およびその抗原結合フラグメントはまた、一部の態様では、ヒト化抗体誘導体であり得る。

【 0 0 7 8 】

一部の態様では、本明細書で述べるROBO2阻害剤またはアンタゴニスト抗体およびその抗原結合フラグメントは、修飾された、すなわち抗体に対する任意のタイプの分子の共有

結合によって修飾された誘導体を含み、ただし、共有結合は抗体が標的抗原、例えばROBO2に結合するのを妨げない。

【0079】

本明細書で述べる組成物および方法の一部の態様では、ヒト患者の治療的処置のために特に望ましい、完全なヒト抗体を使用する。

【0080】

本明細書で述べる組成物および方法の一部の態様では、ROBO2阻害剤は、ROBO2、例えばSEQ ID NO: 2もしくはSEQ ID NO: 4もしくは両方、またはその関連ドメインをコードする核酸を標的とすることにより、特定の機能性ROBO2の発現をブロックするまたは低下させることができる少なくとも一つのアンチセンス分子を含む。本明細書で述べる組成物および方法の一部の態様では、少なくとも一つのアンチセンス分子は、ROBO2のIg SLIT結合ドメインをコードする核酸を標的とする。本明細書で述べる組成物および方法の一部の態様では、少なくとも一つのアンチセンス分子は、ROBO2のIg1 SLIT結合ドメインをコードする核酸またはROBO2のIg1 SLIT結合ドメインとIg2 SLIT結合ドメインの両方をコードする核酸を標的とする。本明細書で述べる組成物および方法の一部の態様では、少なくとも一つのアンチセンス分子は、ROBO2細胞内ドメインをコードする核酸を標的とする。本明細書で述べる組成物および方法の一部の態様では、少なくとも一つのアンチセンス分子は、ROBO2の4つの細胞内プロリンリッチモチーフを含むNck細胞内結合ドメインをコードする核酸を標的とする。他のポリヌクレオチドと交差反応することなくROBO2 mRNAに特異的に結合するアンチセンスオリゴヌクレオチド分子の調製のための方法は当業者に公知である。標的化の例示的な部位は、開始コドン、プロモーターまたはエンハンサーを含む5'調節領域、任意の保存されたコンセンサス領域を含むコード配列、および3'非翻訳領域を含むが、これらに限定されるわけではない。これらの局面および本明細書で述べるすべてのこのような局面の一部の態様では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、約10から約100ヌクレオチド長、約15から約50ヌクレオチド長、約18から約25ヌクレオチド長、またはそれ以上である。ある態様では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば当業者に公知のホスホロチオエート結合および2'-O-糖修飾などの、ヌクレアーゼ耐性を高める等の化学修飾をさらに含む。

【0081】

本明細書で述べる組成物および方法の一部の態様では、ROBO2阻害剤は、ROBO2をコードする、またはROBO2の両方のアイソフォーム、例えばSEQ ID NO: 2もしくはSEQ ID NO: 4、またはその関連ドメインをコードする核酸を標的とすることにより、機能性ROBO2の発現をブロックするまたは低下させることができる少なくとも一つの短鎖干渉RNA (siRNA) 分子を含む。本明細書で述べる組成物および方法の一部の態様では、少なくとも一つのsiRNA分子は、ROBO2のIg SLIT結合ドメインをコードする核酸を標的とする。本明細書で述べる組成物および方法の一部の態様では、少なくとも一つのsiRNA分子は、ROBO2のIg1 SLIT結合ドメインをコードする核酸またはROBO2のIg1 SLIT結合ドメインとIg2 SLIT結合ドメインの両方をコードする核酸を標的とする。本明細書で述べる組成物および方法の一部の態様では、少なくとも一つのsiRNA分子は、ROBO2細胞内ドメインをコードする核酸を標的とする。本明細書で述べる組成物および方法の一部の態様では、少なくとも一つのsiRNA分子は、ROBO2の4つの細胞内プロリンリッチモチーフを含むNck細胞内結合ドメインをコードする核酸を標的とする。他のポリヌクレオチドと交差反応することなくROBO2 mRNAを特異的に標的とするsiRNA分子を調製することは慣例的である。本明細書で述べる組成物および方法における使用のためのsiRNA分子は、典型的な固相オリゴヌクレオチド合成などの当技術分野において公知の方法によって作製することができ、siRNA剤の半減期および/もしくは効果を高めるために、ならびに/またはより堅固な送達製剤を可能にするためにしばしば化学修飾が組み込まれる。あるいは、siRNA分子は、siRNAの細胞内転写のための発現カセットをコードするベクターを用いて送達される。

【0082】

本明細書で述べる組成物および方法の一部の態様では、ROBO2阻害剤は、ROBO2の一つま

たは複数のアイソフォームに結合するRNAまたはDNAアダプターである。本明細書で述べる組成物および方法の一部の態様では、ROBO2阻害剤またはアンタゴニストは、ROBO2と結合するかまたは物理的に相互作用し、かつROBO2とリガンドまたはアダプター分子、例えばそれぞれSLIT2またはNckとの間の相互作用をブロックするRNAまたはDNAアダプターである。本明細書で述べる組成物および方法の一部の態様では、ROBO2阻害剤またはアンタゴニストは、ROBO2と結合するかまたは物理的に相互作用し、ネフリン媒介性アクチン重合のSLIT2-ROBO2を介した阻害、および/またはROBO2に対する細胞応答の誘導などの、下流のROBO2シグナル伝達を低減する、妨げる、またはブロックするRNAまたはDNAアダプターである。本明細書で述べる組成物および方法の一部の態様では、RNAまたはDNAアダプターは、ROBO2のIg SLIT結合ドメインと結合するまたは物理的に相互作用する。本明細書で述べる組成物および方法の一部の態様では、RNAまたはDNAアダプターは、ROBO2のIg1 SLIT結合ドメインまたはROBO2のIg1 SLIT結合ドメインおよびIg2 SLIT結合ドメインの両方、すなわちSEQ ID NO: 1のそれぞれROBO2 (46~145) およびROBO2 (151~237)、ならびにSEQ ID NO: 3のそれぞれROBO2 (30~129) およびROBO2 (135~221) と結合するまたは物理的に相互作用する。本明細書で述べる組成物および方法の一部の態様では、RNAまたはDNAアダプターは、ROBO2細胞内ドメイン、すなわちSEQ ID NO: 3のROBO2 (881~1378) と結合するまたは物理的に相互作用する。本明細書で述べる組成物および方法の一部の態様では、RNAまたはDNAアダプターは、ROBO2の4つの細胞内プロリンリッチモチーフを含むNck細胞内結合ドメインと結合するまたは物理的に相互作用するまたはこれをブロックする。

10

20

30

40

50

【0083】

本明細書で述べる組成物および方法の一部の態様では、ROBO2阻害剤は、低分子ペプチドまたはペプチド様分子、可溶性ペプチド、および合成非ペプチジル有機または無機化合物を含むが、これらに限定されるわけではない、ROBO2を標的とするまたはROBO2に結合する低分子化合物または剤である。本明細書で使用する場合、「低分子」という用語は、ペプチド、ペプチドミメティック、アミノ酸、アミノ酸類似体、ポリヌクレオチド、ポリヌクレオチド類似体、アダプター、ヌクレオチド、ヌクレオチド類似体、約10,000g/mol未満の分子量を有する有機または無機化合物（例えばヘテロ有機化合物および有機金属化合物を含む）、約5,000g/mol未満の分子量を有する有機または無機化合物、約1,000g/mol未満の分子量を有する有機または無機化合物、約500g/mol未満の分子量を有する有機または無機化合物、ならびにこのような化合物の塩、エステル、および他の薬学的に許容される形態を含み得るが、これらに限定されるわけではない化学的な剤を指す。低分子結合の例示的な部位は、SLIT2またはアダプターNckに結合するROBO2の部分、すなわちROBO2のIg1 SLIT結合ドメインもしくはROBO2のIg1 SLIT結合ドメインとIg2 SLIT結合ドメインの両方、ROBO2細胞内ドメイン、またはROBO2の4つの細胞内プロリンリッチモチーフを含むNck細胞内結合ドメインを含むが、これらに限定されるわけではない。

【0084】

本明細書で述べる組成物および方法の一部の態様では、ROBO2阻害剤またはアンタゴニストは、ROBO2に結合し、ROBO2の生物学的活性を阻害する低分子を含む。

【0085】

本明細書で述べる組成物および方法の一部の態様では、ROBO2阻害剤またはアンタゴニストは、ドミナントネガティブROBO2ポリペプチドなどの、少なくとも一つのROBO2構造類似体を含む。ROBO2構造類似体という用語は、本明細書で使用する場合、ROBO2の三次元構造の一部と類似の三次元構造を有し、インビトロまたはインビボの生理的条件下でSLIT2および/またはNckに結合する化合物を指し、前記結合は、ネフリン媒介性アクチン重合のSLIT2-ROBO2を介した阻害、および/またはROBO2に対する細胞応答の誘導などの、ROBO2の生物学的活性を少なくとも部分的に阻害する。適切なROBO2構造類似体は、例えばROBO2-SLIT2結合の分子モデリングを介して設計し、合成することができる。ROBO2構造類似体は、単量体、二量体、または改善された親和性および生物学的作用を得るための同じかまたは異なる構造の任意の望ましい組み合わせの高次多量体であり得る。

【0086】

本明細書で述べる組成物および方法の一部の態様では、ROBO2阻害剤またはアンタゴニストは、少なくとも一つの可溶性ROBO2受容体または、例えばROBO2阻害性ポリペプチドなどの、その融合ポリペプチドを含む。一部のこのような態様では、ROBO2阻害性ポリペプチドはドミナントネガティブROBO2融合タンパク質である。本明細書で述べる組成物および方法の一部の態様では、ROBO2阻害性ポリペプチドは、細胞内ROBO2ドメインを欠いたROBO2細胞外ドメイン、例えばROBO2のIg1 SLIT結合ドメインまたはROBO2のIg1 SLIT結合ドメインとIg2 SLIT結合ドメインの両方を含む。

【0087】

本明細書で述べる組成物および方法における使用のためのROBO2阻害剤またはアンタゴニストは、本明細書で実施例の中で述べるものを含むが、これらに限定されるわけではなく、当技術分野において周知のタンパク質-タンパク質結合アッセイ法、生化学的スクリーニングアッセイ法、免疫測定法、および細胞ベースのアッセイ法などの、当技術分野で公知の方法を用いて同定するまたは特性づけることができる。

10

【0088】

例えば、ROBO2とそのリガンド、例えばSLIT2との間の相互作用を阻害する分子を同定するために、結合アッセイ法が使用できる。例えば、ROBO2またはSLITを共有結合または非共有結合によってマイクロタイタープレートに固定化する。検出可能な標識によって標識化できる、固定化していない成分（リガンドまたは受容体）を、試験剤の存在下または非存在下で固定化成分に添加することによってアッセイ法を実施する。反応が完了したとき、未反応成分を除去し、結合複合体を検出する。結合複合体の形成が試験剤の存在によって阻害される場合、試験剤は、例えば、ROBO2とSLIT2との間の結合を阻害する候補アンタゴニストとみなすことができる。細胞ベースのアッセイ法または膜ベースのアッセイ法も、ROBO2阻害剤を同定するために使用できる。他の態様では、ROBO2遺伝子発現を検出するおよび/またはROBO2遺伝子発現のレベルを測定することにより、ROBO2遺伝子発現を阻害するROBO2阻害剤分子を試験することができる。ROBO2遺伝子発現は、RT-PCR、酵素結合免疫吸着検定法（「ELISA」）、ノーザンブロット法、またはフローサイトメトリなどの様々な方法によって、および当業者に公知のように、検出するおよび/または測定することができる。

20

【0089】

このようにして同定されたROBO2阻害剤を、慢性腎疾患のインビボ動物モデル、例えば系球体および間質損傷モデル（例えばNZB、（NZB×NZW）F1雑種（NZB/Wと称される）、およびそのコンジェニック派生体（congenic derivative）、MRL/lprおよびBXSB系統のマウスを含む、ループス腎炎の動物モデル）、加齢の動物モデル（例えば老齢スブラグドリーラットおよび老齢C57BL/6マウス）、自然発症高血圧症ラット（SHR）、ヒト特発性ネフローゼ症候群のモデルである、Buffalo/mnaラット、成体における高血圧症および塩感受性の発症の素因となるネフロン数の先天性欠損に関連する遺伝子モデルである、Munich Wistar Fromter（MWF）ラット、ポドサイト特異的遺伝性原発性巣状分節性系球体硬化症モデル（primary podocyte-specific genetic FSGS models）、HIV関連腎症（HIV AN）トランスジェニックマウスモデル、IV型コラーゲンの $\alpha 3$ 、 $\alpha 4$ または $\alpha 5$ 鎖の突然変異（COL4A3、COL4A4およびCOL4A5）を含む、アルポート症候群の動物モデル、メサングウム増殖性系球体腎炎（MsPGN）の実験ラットモデルであるThy-1腎炎モデルなどの、免疫誘導モデル、抗系球体基底膜（GBM）モデル、ならびに非免疫誘導モデルを使用してさらに試験することができる。

30

40

【0090】

本明細書で使用する場合、ROBO2阻害剤に関して、「選択的に結合する」または「特異的に結合する」または「～に特異的」は、例えばROBO2アンタゴニスト抗体またはそのROBO2抗原結合フラグメントなどの本明細書で述べるROBO2阻害剤の、標的、すなわちROBO2に、 10^{-5}M （10000nM）以下、例えば 10^{-6}M 以下、 10^{-7}M 以下、 10^{-8}M 以下、 10^{-9}M 以下、 10^{-10}M 以下、 10^{-11}M 以下、または 10^{-12}M 以下の K_D で結合する能力を指す。例えば、本明細書で述べるROBO2阻害剤/アンタゴニストが 10^{-5}M 以下の K_D でROBO2に結合するが、例えば他のROBO

50

ファミリー成員などの関連分子には結合しない場合、その剤はROBO2に特異的に結合すると言われる。特異的結合は、例えばROBO2阻害剤/アンタゴニスト抗体またはその抗原結合フラグメントの親和性およびアビディティーならびにポリペプチド剤の濃度によって影響され得る。当業者は、適切な細胞結合アッセイ法におけるポリペプチド剤の滴定などの、任意の適切な方法を用いて本明細書で述べるポリペプチド剤が選択的に標的に結合する適切な条件を決定することができる。

【0091】

ROBO2活性を阻害することによって慢性腎疾患を処置する方法に関して、「慢性腎疾患」またはCKDという用語は、ネフロン of 漸進的な喪失および結果として生じる腎機能の喪失のために経時的に緩やかにおよび漸進的に悪化する腎疾患を指す。初期段階では、症状が存在しないこともある。機能の喪失は通常、数か月または数年間を要して起こる。非常に緩やかであるので、腎機能が正常の10分の1未満になるまで症状が現れないこともある。慢性腎疾患の最終段階は末期腎疾患（ESRD）と呼ばれる。この段階では、腎臓はもはや身体から老廃物および過剰の体液を十分に除去することができない。患者は透析または腎移植が必要である。糖尿病性腎症を導く糖尿病、および高血圧症は、慢性腎疾患の2つの最も一般的な原因であり、大部分の症例を占める。腎臓を損傷し、慢性腎疾患を導き得る他の疾患および状態は、自己免疫障害（全身性エリテマトーデスおよび強皮症など）、腎の出生時欠損（多発性嚢胞腎など）、特定の毒性化学物質、糸球体腎炎、損傷または外傷、腎結石および感染、腎に至るまたは腎内の動脈に関する障害、一部の鎮痛薬および他の薬剤（癌治療薬など）、逆流性腎症（腎への尿の逆流によって腎が損傷される）等を含む。

10

20

【0092】

したがって、これらの局面および本明細書で述べるすべてのこのような局面の一部の態様では、慢性腎疾患を有するまたは慢性腎疾患のリスクがある対象は、糖尿病性腎症を有する。

【0093】

本明細書で述べる慢性腎疾患およびタンパク尿症の処置方法に関して「低減する」または「阻害する」により、慢性腎疾患の所与のパラメータまたは症状について、好ましくは20%以上、30%以上、40%以上、45%以上、より好ましくは50%もしくはそれ以上、55%以上、60%以上、65%以上、70%以上、最も好ましくは75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、または95%以上の全体的な減少を生じさせる能力が意味される。低減するまたは阻害するは、例えば処置されている障害の症状、例えば高血圧症、尿中のタンパク質等に言及し得る。

30

【0094】

高血圧症は慢性腎疾患のすべての段階においてほとんど常に存在する。神経系の検査は神経損傷の徴候を示し得る。医療提供者は、聴診器で聴いたとき異常な心音または肺音を聞き取り得る。慢性腎疾患の初期症状は他の疾病の症状でもある。これらの症状は、状態がより進行するまで腎疾患の唯一の徴候であり得る。慢性腎疾患の症状は、食欲不振、全身的な不調感および疲労、頭痛、かゆみ（そう痒）および皮膚乾燥、吐気、体重を減らそうとしない場合の体重減少等を含み得る。特に腎機能が悪化した場合、発現し得る他の症状は、異常な暗色または明色の皮膚；骨痛；脳および神経系症状；嗜眠状態および錯乱；集中または思考の障害；手、足または他の領域のしびれ；筋攣縮または痙攣；口臭；容易にできる痣、出血または血便；過度の口渴；頻繁なしゃっくり；低レベルの性的関心および不能症；月経期の停止（無月経）；呼吸困難；不眠、不穏下肢症候群および閉塞性睡眠時無呼吸などの睡眠障害；足および手の腫脹（水腫）；典型的には朝の、嘔吐を含み得る。

40

【0095】

したがって、本明細書で述べる方法の一部の態様では、慢性腎疾患の症状を緩和するために本明細書で述べるROBO2阻害剤を含有する組成物の有効量を対象に投与する。本明細

50

書で使用する場合、「慢性腎疾患の症状を緩和する」は、慢性腎疾患に関連する任意の状態または症状を改善することである。あるいは、慢性腎疾患の症状を緩和することは、慢性腎疾患に罹患している未処置の対照と比較してまたは処置前の対象と比較して、対象における慢性腎疾患の一つまたは複数の症状を低減することを含み得る。同等の未処置対照またはROBO2阻害剤による処置前の対象と比較して、このような低減または予防の程度は、任意の標準的な技術によって検出した場合、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、またはそれ以上である。望ましくは、慢性腎疾患は、当技術分野において公知の任意の標準的な方法によって検出した場合、有意に低減されるかまたは検出不能であり、この場合、慢性腎疾患は処置されたとみなされる。慢性腎疾患のために処置されている患者は、医師がこのような状態を有していると診断した患者である。診断は、当業者に公知の任意の適切な手段によって行われ得る。診断およびモニタリングは、例えば尿、血液もしくは血清試料中の特定のタンパク質もしくは分子、例えばアルブミン、カルシウム、コレステロール、全血球算定（CBC）、電解質、マグネシウム、リン、カリウム、ナトリウムもしくはこれらの任意の組み合わせのレベルを検出すること；例えば、クレアチニクリアランスを検出するアッセイ法；クレアチニンレベル；BUN（血液尿素窒素）；特定の技術もしくは手法、例えば腹部CTスキャン、腹部MRI、腹部超音波、腎生検、腎スキャン、腎超音波などの使用を介して；エリトロポエチン、PTHに関するアッセイ法もしくは検査の結果における変化の検出によって；骨密度検査もしくはビタミンD；またはこのような検出方法およびアッセイ法の任意の組み合わせを含み得る。

10

20

30

40

50

【0096】

本明細書で述べる方法のいずれかに関して使用される「対象」および「個体」という用語は、本明細書では交換可能に使用され、本明細書で述べるROBO2阻害剤の動物レシピエント、例えばヒトレシピエントを指す。ヒト対象などの特定の動物に特異的な疾患状態の処置に関して、「対象」という用語はその特定の動物を指す。「非ヒト動物」および「非ヒト哺乳動物」という用語は、本明細書では交換可能に使用され、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ネコ、イヌ、ウシ、ブタ、および非ヒト霊長動物などの哺乳動物を含む。「対象」という用語はまた、哺乳動物、爬虫類、両生類および魚類を含むがこれらに限定されるわけではない任意の脊椎動物を包含する。しかし、好都合には、対象は、ヒトなどの哺乳動物、または飼いならされた哺乳動物、例えばイヌ、ネコ、ウマ等のような他の哺乳動物である。

【0097】

これらの方法および本明細書で述べるすべてのこのような方法の一部の態様では、方法は、ROBO2阻害剤に加えて、付加的な治療剤を対象に投与することをさらに含む。このような付加的な治療剤は、ROBO2阻害剤と同時投与され得る。本明細書で使用する場合、「同時投与すること」または「同時投与する」という語句は、本明細書で述べるROBO2阻害剤と別の化合物、例えば治療剤を別々に、一斉に、および/または資格を有する介護者によって決定される期間にわたって連続的に、投与することを意味する。

【0098】

一部のこのような態様では、付加的な治療剤は、アンギオテンシン変換酵素（ACE）阻害剤、アンギオテンシンII受容体遮断剤（ARB）、または鉱質コルチコイド受容体（MR）アンタゴニストである。

【0099】

本明細書で述べるROBO2阻害剤と共に使用するためのACE阻害剤は、ベナゼプリル（LOTE NSIN（商標）として米国で市販されている）、カプトプリル（CAPOTEN（商標）として米国で市販されている）、エナラプリル/エナラプリラート（経口および注射用VASOTEC（商標）として米国で市販されている）、フォシノプリル（MONOPRIL（商標）として米国で市販されている）、リシノプリル（ZESTRIL（商標）およびPRINIVIL（商標）として米国で

市販されている)、モエキシプリル (UNIVASC (商標) として米国で市販されている)、ペリンドプリル (ACEON (商標) として米国で市販されている)、キナラプリル (ACCUPRIL (商標) として米国で市販されている)、ラミプリル (ALTACE (商標) として米国で市販されている)、およびトランドラプリル (MAVIK (商標) として米国で市販されている) を含むが、これらに限定されるわけではない。本明細書で述べるROBO2阻害剤と共に使用するためのARBは、カンデサルタン (ATACAND (商標) として米国で市販されている)、イルベサルタン (AVAPRO (商標) として米国で市販されている)、オルメサルタン (BENICAR (商標) として米国で市販されている)、ロサルタン (COZAAR (商標) として米国で市販されている)、パルサルタン (DIOVAN (商標) として米国で市販されている)、テルミサルタン (MICARDIS (商標) として米国で市販されている)、およびエプロサルタン (TEVETEN (商標) として米国で市販されている) を含む。

【0100】

これらの方法および本明細書で述べるすべてのこのような方法の一部の態様では、方法は、ROBO2阻害剤に加えて、有効量の利尿薬を対象に投与することをさらに含む。利尿薬は、トルセミド (DEMADEX (商標) として米国で市販されている)、フロセミド (LASIX (商標) として米国で市販されている)、ブメタニド (BUMEX (商標) として米国で市販されている)、エタクリン酸 (EDECRIN (商標) として米国で市販されている)、トルセミド (DEMADEX (商標) として米国で市販されている)、アミロリド (MIDAMOR (商標) として米国で市販されている)、アセタゾラミド (DIAMOX (商標) として米国で市販されている)、パマプロム (AQUA-BAN (商標) として米国で市販されている)、マンニトール (ARIDOL (商標) またはOSMITROL (商標) として米国で市販されている)、トリウムテレン (DYRENIUM (商標) として米国で市販されている)、スピロノラクトン (ALDACTONE (商標) として米国で市販されている)、アミロリド (MIDAMOR (商標) として米国で市販されている)、インダパミド (LOZOL (商標) として米国で市販されている)、ヒドロクロロチアジド (HYDRODIURIL (商標) として米国で市販されている)、メトラゾン (ZAROXOLYN (商標) またはMYKROX (商標) として米国で市販されている)、メチルクロロチアジド (AQUATENSEN (商標) またはENDURON (商標) として米国で市販されている)、ヒドロクロロチアジド (AQUAZIDE H (商標) またはESIDRIX (商標) またはMICROZIDE (商標) として米国で市販されている)、クロロチアジド (DIURIL (商標) として米国で市販されている)、ベンドロフルメチアジド (NATURETIN (商標) として米国で市販されている)、ポリチアジド (RENESE (商標) として米国で市販されている)、ヒドロフルメチアジド (SALURON (商標) として米国で市販されている)、およびクロルタリドン (THALITONE (商標) として米国で市販されている) を含むが、これらに限定されるわけではない。完全なリストについては、例えばPhysician's Desk Reference、2012 Edition、PDR Network (2011) も参照のこと。

【0101】

本明細書で使用する場合、本明細書で述べるROBO2阻害剤を含む組成物および方法またはこれらの組み合わせ処置のいずれかに関して、「処置する」、「処置」、「処置すること」または「改善」という用語は、目的が、疾患または障害に関連する状態の進行または重症度を逆転させる、緩和する、改善する、阻害する、遅らせるまたは停止させることである、治療的処置を指す。「処置すること」という用語は、糖尿病性腎症などの、しかしこれに限定されるわけではない、慢性腎疾患に関連する状態、疾患または障害の少なくとも一つの有害作用または症状を低減するまたは緩和することを含む。処置は、一つまたは複数の症状または臨床マーカーが低減する場合、一般に「有効」である。あるいは、疾患の進行が低減するまたは停止する場合、処置は「有効」である。すなわち、「処置」は、単に症状またはマーカーの改善だけでなく、処置を行わない場合に予想される症状の進行または悪化の停止または少なくとも鈍化も含む。有益なまたは望ましい臨床結果は、検出可能であるか検出不能であるかに関わらず、一つまたは複数の症状の緩和、疾患の程度の縮小、疾患の状態の安定化 (すなわち悪化しないこと)、疾患進行の遅延または鈍化、疾患状態の改善または緩和、および寛解 (部分的または全体的) を含むが、これらに限定さ

れるわけではない。疾患の「処置」という用語はまた、疾患の症状または副作用の軽減を提供することを含む（待期療法を含む）。

【0102】

本明細書で使用する「有効量」という用語は、処置される疾患または障害の少なくとも一つまたは複数の症状を緩和するために必要な、本明細書で述べるROB02阻害剤の量を指し、所望の作用を提供するための薬理的組成物の十分な量に関する。「治療的有效量」という用語は、それゆえ、本明細書で述べる方法を用いて、典型的な対象に投与された場合に特定の作用を提供するのに十分な、本明細書で述べるROB02阻害剤の量を指す。本明細書で使用する場合の有効量はまた、疾患の症状の発現を遅らせる、疾患の症状の経過を変化させる（例えば、限定されることなく、疾患の症状の進行を鈍化させる）、または疾患の症状を逆転させるのに十分な量も含む。したがって、正確な「有効量」を特定することは不可能である。しかし、任意の所与の症例に関して、適切な「有効量」は、通常の実験だけを使用して当業者によって決定され得る。

10

【0103】

有効量、毒性、および治療効果は、例えばLD50（母集団の50％に致死的な用量）およびED50（母集団の50％において治療的に有効な用量）を決定するための、細胞培養または実験動物における標準的な薬学的手順によって決定することができる。投与量は、使用される剤形および利用される投与経路に依存して異なり得る。毒性作用と治療作用の用量比が治療指数であり、LD50/ED50比として表すことができる。大きな治療指数を示す組成物および方法が好ましい。治療的有效量は、最初は細胞培養アッセイ法から推定することができる。また、用量は、細胞培養においてまたは適切な動物モデルにおいて決定される、IC50（すなわち測定される機能または活性の最大半数阻害を達成する、本明細書で述べるROB02阻害剤の濃度）を含む循環血漿濃度範囲を達成するように動物モデルにおいて策定することができる。血漿中のレベルは、例えば高速液体クロマトグラフィによって測定できる。任意の特定の投与量の作用は、適切なバイオアッセイ法によってモニターできる。投与量は医師によって決定され、処置の認められる作用に適合するように、必要に応じて調整され得る。慢性腎疾患のタイプおよび重症度に依存して、本明細書で述べるROB02阻害剤の約1 µg/kgから100 mg/kg（例えば0.1～20 mg/kg）が、例えば1回または複数の別々の投与によるか、または持続注入によるかに関わらず、対象への投与のための当初の候補用量範囲である。

20

30

【0104】

投与方法

本明細書で述べるROB02阻害剤またはその組み合わせ処置は、対象において有効な処置をもたらす任意の適切な経路によって、それを必要とする対象に投与することができる。本明細書で使用する場合、「投与すること」および「導入すること」という用語は交換可能に使用され、所望の作用が生じるように、所望の部位においてこのような剤の少なくとも部分的な局在をもたらす方法または経路によって対象にROB02阻害剤を配置することを指す。

【0105】

一部の態様では、ROB02阻害剤は、この剤を全身的にまたは所望の表面または標的に送達する、注射、注入、点滴、および吸入投与を含み得るが、これらに限定されるわけではない任意の投与方法によって慢性腎疾患を有する対象に投与される。ポリペプチド剤が消化管における不活性化から保護され得る限り、経口投与形態も企図される。「注射」は、限定されることなく、静脈内、筋肉内、動脈内、クモ膜下腔内、脳室内、嚢内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、被膜下、クモ膜下、脊椎内、脳脊髄内、および胸骨内注射および注入を含む。一部の態様では、本明細書で述べる方法における使用のためのROB02阻害剤は、静脈内注入または注射によって投与される。

40

【0106】

本明細書で使用する「非経口投与」および「非経口的に投与される」という語句は、通常は注射による、腸内および局所投与以外の投与の方法を指す。本明細書で使用する「全

50

身投与」、「全身的に投与される」、「末梢投与」および「末梢的に投与される」という語句は、ROBO2阻害剤が対象の循環系に入り、したがって代謝および他の同様に過程を受けるように、腫瘍部位などの標的部位、組織または器官への直接投与以外の、ROBO2阻害剤の投与を指す。

【0107】

本明細書で述べる方法の臨床使用に関して、本明細書で述べるROBO2阻害剤の投与は、非経口投与、例えば静脈内、粘膜、例えば鼻内、眼科的、または他の投与方法のための薬学的組成物または薬学的製剤への製剤化を含み得る。一部の態様では、本明細書で述べるROBO2阻害剤は、対象において有効な処置をもたらす任意の薬学的に許容される担体化合物、材料または組成物と共に投与することができる。したがって、本明細書で述べる方法における使用のための薬学的製剤は、一つまたは複数の薬学的に許容される成分と組み合わせて、本明細書で述べるROBO2阻害剤を含有し得る。

10

【0108】

「薬学的に許容される」という語句は、健全な医学的判断の範囲内で、妥当な利益/リスク比に相応する、過度の毒性、刺激、アレルギー反応、または他の問題もしくは合併症を伴わずにヒトおよび動物の組織と接触させて使用するのに適した化合物、材料、組成物、および/または剤形を指す。本明細書で使用する「薬学的に許容される担体」という語句は、ROBO2阻害剤の安定性、溶解度または活性を維持することに関与する、液体もしくは固体充填剤、希釈剤、賦形剤、溶媒、媒質、封入材料、製造助剤（例えば潤滑剤、タルクマグネシウム、ステアリン酸カルシウムもしくは亜鉛、またはステアリン酸）、または溶媒封入材料などの、薬学的に許容される材料、組成物またはビヒクルを意味する。各々の担体は、製剤の他の成分と適合性であり、および患者に有害ではないという意味で「許容され」なければならない。薬学的に許容される担体として役割を果たし得る材料の一部の例は以下を含む：（１）糖、例えばラクトース、グルコースおよびスクロース、（２）デンプン、例えばトウモロコシデンプンおよびジャガイモデンプン、（３）セルロースおよびその誘導体、例えばカルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、エチルセルロース、微結晶セルロースおよび酢酸セルロース、（４）粉末トラガカント、（５）麦芽、（６）ゼラチン、（７）賦形剤、例えばココアバターおよび坐剤ワックス、（８）油、例えば落花生油、綿実油、サフラワー油、ゴマ油、オリーブ油、トウモロコシ油およびダイズ油、（９）グリコール、例えばプロピレングリコール、（１０）ポリオール、例えばグリセリン、ソルビトール、マンニトールおよびポリエチレングリコール（PEG）、（１１）エステル、例えばオレイン酸エチルおよびラウリン酸エチル、（１２）寒天、（１３）緩衝剤、例えば水酸化マグネシウムおよび水酸化アルミニウム、（１４）アルギン酸、（１５）発熱性物質除去水、（１６）等張生理食塩水、（１７）リンガー液、（１９）pH緩衝液、（２０）ポリエステル、ポリカーボネートおよび/またはポリ無水物、（２１）増量剤、例えばポリペプチドおよびアミノ酸、（２２）血清成分、例えば血清アルブミン、HDLおよびLDL、（２３）C2～C12アルコール、例えばエタノール、ならびに（２４）薬学的製剤において使用される他の非毒性適合性物質。剥離剤、被覆剤、防腐剤および抗酸化剤も製剤中に存在し得る。「賦形剤」、「担体」、「薬学的に許容される担体」等のような用語は、本明細書で交換可能に使用される。

20

30

40

【0109】

本明細書で述べるROBO2阻害剤は、（１）例えば滅菌溶液もしくは懸濁液、または持続放出製剤として、例えば皮下、筋肉内、静脈内または硬膜外注射による非経口投与、（２）例えばクリーム、軟膏、または皮膚に適用される制御放出パッチまたはスプレーとしての局所適用、（３）例えばベッサリー、クリームまたは泡としての、腔内または直腸内、（４）眼科的、（５）経皮的、（６）経粘膜的、または（７）経鼻的投与に適合されるものを含む、固体、液体またはゲル形態での対象への化合物の投与のために特別に製剤することができる。加えて、ROBO2阻害剤は、薬剤送達システムを用いて患者に移植するまたは注射することができる。例えば、Urquhart, et al, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 24: 199-236 (1984); Lewis, ed. "Controlled Release of Pesticides and Pharmaceuticals"

50

(Plenum Press, New York, 1981); 米国特許第3,773,919号; および米国特許第35 3,270, 960号参照。

【0110】

本明細書で述べる方法において使用できる、本明細書で述べるROBO2阻害剤を含有する組成物の製剤および投与方法のさらなる態様を以下で述べる。

【0111】

非経口剤形

非経口剤形のROBO2阻害剤も、皮下、静脈内（ボラス注射を含む）、筋肉内、および動脈内を含むが、これらに限定されるわけではない様々な経路によって慢性腎疾患を有する対象に投与することができる。非経口剤形の投与は、典型的には汚染物質に対する患者の自然防御機構を回避するため、非経口的剤形は、好ましくは無菌であるかまたは患者に投与する前に滅菌することできる。非経口剤形の例は、注射用溶液、注射用の薬学的に許容されるビヒクルに溶解または懸濁させて使用できる乾燥製品、注射用懸濁液、制御放出非経口剤形、およびエマルジョンを含むが、これらに限定されるわけではない。

【0112】

本開示の非経口剤形を提供するために使用できる適切なビヒクルは当業者に周知である。例は、限定されることなく、滅菌水; USP規格の注射液用蒸留水; 食塩水; グルコース溶液; 塩化ナトリウム注射液、リンガー注射液、デキストロース注射液、デキストロースおよび塩化ナトリウム注射液、ならびに乳酸加リンガー注射液などの、しかしこれらに限定されるわけではない水性ビヒクル; エチルアルコール、ポリエチレングリコールおよびプロピレングリコールなどの、しかしこれらに限定されるわけではない水混和性ビヒクル; ならびにトウモロコシ油、綿実油、落花生油、ゴマ油、オレイン酸エチル、ミリスチン酸イソプロピル、および安息香酸ベンジルなどの、しかしこれらに限定されるわけではない非水性ビヒクルを含む。

【0113】

一部の態様では、有効量のROBO2阻害剤を含有する組成物は、例えば、錠剤（限定されることなく割線入りもしくは被覆錠剤を含む）、丸剤、カプレット、カプセル、チュアブル錠、粉末パッケージ、カシェ剤、トローチ、オブラート、エアロゾルスプレーなどの、しかしこれらに限定されるわけではない個別の剤形として、またはシロップ、エリキシル、水性液体中の溶液もしくは懸濁液、非水性液体、水中油型エマルジョンもしくは油中水型エマルジョンなどの、しかしこれらに限定されるわけではない液体として、経口投与に適するように製剤される。このような組成物は、所定の量の開示化合物の薬学的に許容される塩を含有し、当業者に周知の薬剤学の方法によって調製され得る。一般に、Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed., Mack Publishing, Easton, Pa. (1990) 参照。

【0114】

投与の容易さのために、錠剤とカプセルは最も好都合な固体経口剤単位形態であり、これらの場合、固体の薬学的賦形剤が使用される。所望する場合は、錠剤を標準的な水性または非水性技術によって被覆することができる。これらの剤形は薬剤学の方法のいずれかによって調製できる。一般に、薬学的組成物および剤形は、有効成分を液体担体、微粉化された固体担体、またその両方と均一におよび緊密に混合し、その後必要に応じて生成物を所望の形状に成形することによって調製される。一部の態様では、経口剤形は抗生物質には使用されない。

【0115】

有効量のROBO2阻害剤を含有する組成物の典型的な経口剤形は、従来の薬剤調合技術に従って緊密な混合物中のROBO2阻害剤の薬学的に許容される塩を少なくとも一つの賦形剤と組み合わせることによって調製される。賦形剤は、投与のために望ましい組成物の形態に応じて広範囲の形態をとることができる。例えば、経口液体またはエアロゾル剤形における使用に適した賦形剤は、水、グリコール、油、アルコール、着香剤、防腐剤および着色剤を含むが、これらに限定されるわけではない。固体経口剤形（例えば粉末、錠剤、カプセルおよびカプレット）における使用に適した賦形剤の例は、デンプン、糖、微結晶セ

ルロース、カオリン、希釈剤、造粒剤、潤滑剤、結合剤および崩壊剤を含むが、これらに限定されるわけではない。

【0116】

本明細書で述べる薬学的製剤における使用に適した結合剤は、トウモロコシデンプン、ジャガイモデンプンまたは他のデンプン、ゼラチン、天然および合成ゴム、例えばアラビアゴム、アルギン酸ナトリウム、アルギン酸、他のアルギン酸塩、粉末トラガカント、グアーガム、セルロースおよびその誘導体（例えばエチルセルロース、酢酸セルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウム、カルボキシメチルセルロースナトリウム）、ポリビニルピロリドン、メチルセルロース、アルファ化デンプン、ヒドロキシプロピルメチルセルロース（例えばNo. 2208、2906、2910）、微結晶セルロース、ならびにこれらの混合物を含むが、これらに限定されるわけではない。

10

【0117】

本明細書で述べる薬学的製剤における使用に適した充填剤の例は、タルク、炭酸カルシウム（例えば顆粒または粉末）、微結晶セルロース、粉末セルロース、デキストレート、カオリン、マンニトール、ケイ酸、ソルビトール、デンプン、アルファ化デンプン、およびこれらの混合物を含むが、これらに限定されるわけではない。本明細書で述べる薬学的組成物中の結合剤または充填剤は、典型的には薬学的組成物の約50重量%から約99重量%で存在する。

【0118】

崩壊剤は、水性環境に曝露されたとき崩壊する錠剤を提供するために本明細書で述べる経口薬学的製剤において使用される。有効成分の放出を有害に変化さるほどには少なすぎず多すぎない十分な量の崩壊剤が、本明細書で述べるROBO2阻害剤の固体経口剤形を形成するために使用されるべきである。使用される崩壊剤の量は製剤のタイプに基づいて異なり、当業者には容易に認識できる。経口薬学的製剤を形成するために使用できる崩壊剤は、寒天、アルギン酸、炭酸カルシウム、微結晶セルロース、クロスカルメロースナトリウム、クロスボビドン、ポラクリンカリウム、デンプングリコール酸ナトリウム、ジャガイモまたはタピオカデンプン、他のデンプン、アルファ化デンプン、粘土、他のアルギン、他のセルロース、ゴム、およびこれらの混合物を含むが、これらに限定されるわけではない。

20

【0119】

本明細書で述べるROBO2阻害剤の経口薬学的製剤を形成するために使用できる潤滑剤は、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、鉱油、軽油、グリセリン、ソルビトール、マンニトール、ポリエチレングリコール、他のグリコール、ステアリン酸、ラウリル硫酸ナトリウム、タルク、硬化植物油（例えば落花生油、綿実油、サフラワー油、ゴマ油、オリーブ油、トウモロコシ油およびダイズ油）、ステアリン酸亜鉛、オレイン酸エチル、ラウリン酸エチル、寒天、ならびにこれらの混合物を含むが、これらに限定されるわけではない。さらなる潤滑剤は、例えば、シロイドシリカゲル（W. R. Grace Co. of Baltimore, Md.によって製造されている、AEROSIL（登録商標）200）、合成シリカの凝集エアロゾル（Degussa Co. of Piano, Tex.によって市販されている）、CAB-O-SIL（登録商標）（Cabot Co. of Boston, Mass.によって販売されている発熱性二酸化ケイ素）、およびこれらの混合物を含む。使用される場合、潤滑剤は、典型的にはそれらが組み込まれる薬学的組成物または剤形の約1重量%未満の量で使用される。

30

40

【0120】

他の態様では、乳糖不含の薬学的製剤および剤形が提供され、このような組成物は、乳糖または他の単糖類または二糖類を、皆無ではないとしても、好ましくはほとんど含まない。本明細書で使用する場合、「乳糖不含」という用語は、存在する乳糖の量が、皆無ではないとしても、有効成分の分解速度を実質的に高めるには不十分であることを意味する。本開示の乳糖不含組成物は、当技術分野において周知であり、参照により本明細書に組み入れられる、USP（XXI）/NF（XVI）に記載されている賦形剤を含み得る。

【0121】

50

水は一部の化合物の分解を促進し得るので、ROBO2阻害剤の経口製剤は、一部の態様では、本明細書で述べるROBO2阻害剤を有効成分として含有する無水薬学的組成物および剤形をさらに包含する。例えば、水（例えば5%）の添加は、経時的な製剤の貯蔵寿命または安定性などの特徴を決定するために長期保存をシミュレートする手段として薬剤学分野において広く受け入れられている。例えばJens T. Carstensen, Drug Stability: Principles & Practice, 379-80 (2nd ed., Marcel Dekker, NY, N.Y. : 1995) 参照。本明細書で述べる無水薬学的組成物および剤形は、無水または低含水率成分および低水分または低湿度条件を用いて調製することができる。ラクトースおよび第一級または第二級アミンを含む少なくとも一つの有効成分を含有する薬学的組成物および剤形は、製造、包装および/または貯蔵の間に水分および/または湿度との実質的な接触が予想される場合、好ましくは無水である。無水組成物は、好ましくは、適切な処方キットに含めることができるように水に対する曝露を防止することが公知の材料を用いて包装される。適切な包装の例は、密封ホイル、プラスチック、乾燥剤を含むまたは含まない単位用量容器（例えばバイアル）、プリスターパック、およびストリップパックを含むが、これらに限定されるわけではない。

10

【0122】

エアロゾル製剤

ROBO2阻害剤は、従来のアジュバントと適切な噴射剤、例えばプロパン、ブタンまたはイソブタンのような炭化水素噴射剤と共に加圧エアロゾル容器に包装することができる。ROBO2阻害剤はまた、ネブライザまたはアトマイザなどの非加圧形態で投与することもできる。ROBO2阻害剤はまた、乾燥粉末の形態で、例えば吸入器の使用によって、気道に直接投与することもできる。

20

【0123】

適切な粉末組成物は、例として、ラクトースまたは気管内投与のために許容される他の不活性粉末と十分に混合されたROBO2阻害剤の粉末調製物を含む。粉末組成物は、エアロゾルディスペンサーによって投与でき、または、対象が、カプセルに穴をあけ、吸入に適した一定な流れで粉末を噴き出す装置に挿入することができる割ることの可能なカプセルに入れることができる。組成物は、噴射剤、界面活性剤および共溶媒を含有することができ、適切な定量弁によって閉じられる従来のエアロゾル容器に充填され得る。

【0124】

気道への送達のためのエアロゾルは当技術分野において公知である。例えば、すべての内容全体が参照により本明細書に組み入れられる、Adjei, A. and Garren, J. Pharm. Res., 1:565-569 (1990); Zanen, P. and Lamm, J.-W. J. Int. J. Pharm., 114:111-115 (1995); Gonda, I. "Aerosols for delivery of therapeutic and diagnostic agents to the respiratory tract," in Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 6:273-313 (1990); Anderson et al., Am. Rev. Respir. Dis., 140: 1317-1324 (1989)) および同様にペプチドおよびタンパク質の全身送達に対する可能性も有する (Patton and Platz, Advanced Drug Delivery Reviews, 8: 179-196 (1992)); Timsina et al., Int. J. Pharm., 101 : 1-13 (1995); and Tansey, I. P., Spray Technol. Market, 4:26-29 (1994); French, D. L., Edwards, D. A. and Niven, R. W., Aerosol Sci., 27: 769-783 (1996); Visser, J., Powder Technology 58: 1-10 (1989)); Rudt, S. and R. H. Muller, J. Controlled Release, 22: 263-272 (1992); Tabata, Y, and Y. Ikada, Biomed. Mater. Res., 22: 837-858 (1988); Wall, D. A., Drug Delivery, 2 : 10 1-20 1995); Patton, J. and Platz, R., Adv. Drug Del. Rev., 8: 179-196 (1992); Bryon, P., Adv. Drug. Del. Rev., 5: 107-132 (1990); Patton, J. S., et al., Controlled Release, 28: 15 79-85 (1994); Damms, B. and Bains, W., Nature Biotechnology (1996); Niven, R. W., et al, Pharm. Res., 12 (9); 1343-1349 (1995); およびKobayashi, S., et al, Pharm. Res., 13 (1): 80-83 (1996) 参照。

30

40

【0125】

水は一部の化合物の分解を促進し得るので、本明細書で述べるROBO2阻害剤の製剤は、

50

開示する化合物を有効成分として含有する無水薬学的組成物および剤形をさらに包含する。例えば、水（例えば5%）の添加は、経時的な製剤の貯蔵寿命または安定性などの特徴を決定するために長期保存をシミュレートする手段として薬剤学分野において広く受け入れられている。例えばJens T. Carstensen, Drug Stability: Principles & Practice, 379-80 (2nd ed., Marcel Dekker, NY, N.Y.: 1995) 参照。本開示の無水薬学的組成物および剤形は、無水または低含水率成分および低水分または低湿度条件を用いて調製することができる。ラクトースおよび第一級または第二級アミンを含む少なくとも一つの有効成分を含有する薬学的組成物および剤形は、製造、包装および/または貯蔵の間に水分および/または湿度との実質的な接触が予想される場合、好ましくは無水である。無水組成物は、好ましくは、適切な処方キットに含めることができるように水に対する曝露を防止することが公知の材料を用いて包装される。適切な包装の例は、密封ホイル、プラスチック、乾燥剤を含むまたは含まない単位用量容器（例えばバイアル）、プリスターバック、およびストリップバックを含むが、これらに限定されるわけではない。

10

20

30

40

50

【0126】

制御および遅延放出剤形

本明細書で述べる局面の一部の態様では、ROBO2阻害剤は制御放出または遅延放出手段によって対象に投与することができる。理想的には、医学的処置における最適に設計された制御放出調製物の使用は、最小限の時間で状態を治癒するまたは管理するために最小限の薬剤物質が使用されることを特徴とする。制御放出製剤の利点は、1) 薬剤の長時間の活性、2) 投与頻度の低減、3) 高い患者のコンプライアンス、4) より少ない薬剤総量の使用、5) 局所的または全身的副作用の低減、6) 薬剤蓄積の最小化、7) 血中レベルの変動の低減、8) 処置効果の改善、9) 薬剤活性の相乗作用または損失の低減、および10) 疾患または状態の管理の速度の改善を含む。(Kim, Chong-ju, Controlled Release Dosage Form Design, 2 (Technomic Publishing, Lancaster, Pa.: 2000))。制御放出製剤は、式(1)の化合物の作用の開始、作用の期間、治療ウィンドウ内の血漿レベル、およびピーク血中レベルを制御するために使用できる。特に、制御放出または遅延放出剤形または製剤は、薬剤を過小投与すること（すなわち最小治療レベル未満になる）ならびに薬剤についての毒性レベルを超えることの両方から起こり得る潜在的な有害作用および安全性の懸念を最小限に抑えながら、式(1)の化合物の最大有効性を確保するために使用できる。

【0127】

様々な公知の制御放出または遅延放出剤形、製剤および装置を、本明細書で述べるROBO2阻害剤に関する使用に適合させることができる。例は、各々その全体が参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第3,845,770号、同第3,916,899号、同第3,536,809号、同第3,598,123号、同第4,008,719号、同第5,674,533号、同第5,059,595号、同第5,591,767号、同第5,120,548号、同第5,073,543号、同第5,639,476号、同第5,354,556号、同第5,733,566号および同第6,365,185 B1号に記載されているものを含むが、これらに限定されるわけではない。これらの剤形は、例えばヒドロキシプロピルメチルセルロース、他のポリマーマトリックス、ゲル、透過性膜、浸透圧システム（OROS（登録商標）（Alza Corporation, Mountain View, Calif. USA）など）、多層コーティング、マイクロ粒子、リポソームもしくはミクロスフェア、または様々な比率で所望の放出プロファイルを提供するこれらの組み合わせを使用して、一つまたは複数の有効成分の徐放または制御放出を提供するために使用できる。加えて、イオン交換材料が、開示化合物の固定化された吸着塩形態を調製するために、したがって薬剤の制御送達を生じさせるために使用できる。特定の陰イオン交換体の例は、DUOLITE（登録商標）A568およびDUOLITE（登録商標）AP143（（Rohm&Haas, Spring House, Pa. USA）を含むが、これらに限定されるわけではない。

【0128】

本明細書で述べる方法の一部の態様では、本明細書で述べる方法における使用のためのROBO2阻害剤を持続放出によってまたはパルスで対象に投与する。パルス療法は、同じ量の組成物を経時的に不連続投与する形態ではなく、同じ用量の組成物を少ない頻度で投与

するまたは低い用量を投与することを含む。持続放出またはパルス投与は、障害が対象において継続的に起こる場合、例えば対象が慢性腎疾患を有する場合に特に好ましい。各々のパルス用量を低減することができ、対象または患者への処置の経過を通じて投与される本明細書で述べるROBO2阻害剤の総量を最小限に抑える。

【0129】

パルスの間隔は、必要な場合は、当業者によって決定され得る。しばしば、パルスの間隔は、次のパルスの送達前に組成物または組成物の活性成分が対象においてもはや検出不能であるときに別の用量の組成物を投与することによって計算できる。間隔はまた、組成物のインビボ半減期から計算することもできる。間隔は、インビボ半減期より長く、または組成物の半減期より2、3、4、5倍、さらには10倍長くなるように計算することができる。患者への注入または他の形態の送達によって組成物をパルスするための様々な方法および装置が米国特許第4,747,825号、同第4,723,958号、同第4,948,592号、同第4,965,251号および同第5,403,590号に開示されている。

10

【0130】

一部の態様では、ROBO2阻害剤を含有する持続放出調製物を調製することができる。持続放出調製物の適切な例は、阻害剤を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスを含み、このマトリックスは成形品の形態、例えばフィルムまたはマイクロカプセルである。持続放出マトリックスの例は、ポリエステル、ヒドロゲル（例えばポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)、またはポリ(ビニルアルコール)、ポリラクチド（米国特許第3,773,919号）、L-グルタミン酸と γ -エチル-L-グルタメートのコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、LUPRON DEPOT（乳酸-グリコール酸コポリマーおよび酢酸ロイプロリドからなる注入可能なミクロスフェア）などの分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、ならびにポリ-D-(-)-3-ヒドロキシ酪酸を含む。

20

【0131】

インビボ投与に使用されるROBO2阻害剤を含有する製剤は、好ましくは無菌である。これは、例えば無菌ろ過膜を通したろ過、および当業者に公知の他の方法によって容易に達成される。

【0132】

また、一部の局面では、慢性腎疾患または慢性腎疾患もしくはタンパク尿症の素因を示すバイオマーカーとしてのROBO2の発現プロファイルまたは配列情報に基づき、個体が慢性腎疾患を有するかどうかまたは個体が慢性腎疾患もしくはタンパク尿症の素因を有するかどうかを判定するための、アッセイ法、方法およびシステムも本明細書で提供される。本明細書で明らかにされるように、ROBO2は、慢性腎疾患を有するまたは慢性腎疾患もしくはタンパク尿症の高いリスクがある対象を同定するための、または慢性腎疾患もしくはタンパク尿症の進行に対する処置の効果をモニターするためのバイオマーカーとして有用である。

30

【0133】

本明細書で使用する場合、「バイオマーカー」は、ある表現型状態（例えば疾患を有する）の対象から採取した試料において、別の表現型状態（例えば疾患を有しない）と比較して差次的に存在する有機生体分子を指す。バイオマーカーは、異なる群におけるバイオマーカーの平均または中央値発現レベルが統計的に有意であると計算される場合、異なる表現型状態の間で差次的に存在する。統計的有意性に関する一般的な検定は、中でも特に、t検定、ANOVA、Kruskal-Wallis、Wilcoxon、Mann-Whitneyおよびオッズ比を含む。バイオマーカーは、単独でまたは組み合わせで、対象がある表現型状態または別の表現型状態に属する相対的リスクの尺度を提供する。これ自体、疾患のマーカー（診断）、薬剤の治療有効性（セラノスティック）および薬剤毒性のマーカーとして有用である。

40

【0134】

本明細書で述べるアッセイ法における使用のためのROBO2発現は、タンパク質レベルの検出またはmRNA発現レベルの検出を含む、任意の適切な方法によって検出することができる。ROBO2ポリペプチドは、対象から得られた生物学的試料中に見出され得る任意の形態

50

で、または生物学的試料の操作から（例えば試料の処理の結果として）生じ得る任意の形態で検出することができる。ROBO2の修飾形態は、対立遺伝子変異体、スプライス変異体、翻訳後修飾（例えばグリコシル化、タンパク質分解切断（例えば親タンパク質のフラグメント）、グリコシル化、リン酸化、脂質化、酸化、メチル化、システイン化、スルホン化、アセチル化等）、オリゴマー化、脱オリゴマー化（タンパク質の多量体形態から単量体を分離する）、変性等の産物である修飾タンパク質を含み得る。

【0135】

本明細書で述べるアッセイ法は、ROBO2のすべての形態または特定の形態を検出するように設計することができる。所望する場合は、異なる形態のROBO2、例えば異なるアイソフォームの間の識別を、形態間で異なる物理的特徴、例えば異なる分子量、異なる分子サイズ、異なるエピトープの存在/非存在等に依存する検出方法の使用によって達成することができる。

10

【0136】

したがって、一部の局面では、慢性腎疾患を有するまたは慢性腎疾患もしくはタンパク尿症のリスクがある対象の診断のためのアッセイ法が本明細書で提供され、該アッセイ法は、対象から得られた生物学的試料中のROBO2タンパク質または核酸のレベルを測定する段階を含み、ここで、対象由来の生物学的試料中のROBO2のレベルが、ROBO2についての閾値参照レベルと同じレベルであるかまたは閾値参照レベルを上回る（例えば統計的に有意の量だけ上回る）場合、対象はおそらく慢性腎疾患もしくはタンパク尿症のリスクがあるかまたは慢性腎疾患を有する。例えば、ROBO2の参照閾値レベルと比較して、ROBO2のレベルの約10%超、または約20%超、または約30%超、または約40%超、または約50%超、または約60%超、またはそれ以上の上昇である。一部の態様では、ROBO2のレベルの上昇は、中央値または平均ROBO2参照閾値レベルを少なくとも1標準偏差、または少なくとも2標準偏差、またはそれ以上上回る。このような中央値または平均ROBO2参照レベルは、例えば慢性腎疾患もしくはタンパク尿症を有していない対象から得られた5以上の試料から、または異なる時点で同じ対象から得られた5以上の試料から得ることができる。

20

【0137】

これらのアッセイ法の一部の態様では、生物学的試料中で測定されたROBO2の量を、参照閾値レベル、または年齢がマッチする正常対照（例えば慢性腎疾患もしくはタンパク尿症のリスクを有しない、年齢がマッチする対象）もしくは健常対象、例えば健常個体から得られた生物学的試料などの参照生物学的試料と比較する。

30

【0138】

一部の態様では、本明細書で開示するアッセイ法、システムおよびキットはまた、対象に投与されている処置の経過をモニターするためにも有用である。例えば、最初の時点（例えばt1）で対象において生物学的試料中のROBO2のレベルを測定し、ROBO2バイオマーカー参照閾値レベルと比較することができ、ROBO2の測定されたレベルが参照閾値レベルと同じかまたはより高い場合、対象に、慢性腎疾患またはタンパク尿症の発症を遅延させるまたは低減する適切な治療的処置またはレジメン、例えば本明細書の方法において開示する、運動を増やす、心臓圧を低下させる、食事を調整する等の治療的処置またはレジメンを投与することができ、次にROBO2バイオマーカータンパク質のパネルのレベルを2番目の時点（例えばt2）およびその後の時点（例えばt3、t4、t5、t5...等）で測定して、一つもしくはそれ以上の時点（例えばt1もしくは任意のその後の時点）のtROBO2のレベルまたはROBO2の参照閾値レベルと比較し、慢性腎疾患またはタンパク尿症のリスクを低下させるまたは発症を遅延させるもしくは低減する処置のための治療的処置または医学的処置もしくはレジメンが有効であるかどうかを判定することができる。一部のこのような態様では、本明細書で開示するアッセイ法、システムおよびキットは、有効な処置が対象におけるROBO2の低下であり得る、症候性対象（例えば慢性腎疾患またはタンパク尿症を有することが既知の対象）において治療的処置をモニターするために使用でき、あるいは本明細書で開示するアッセイ法、システムおよびキットは、例えば、対象が、本明細書で開示する方法または当技術分野において公知の他の方法により、または例えば遺伝的な理由の

40

50

ために慢性腎疾患またはタンパク尿症のリスクがあると同定されている、無症候性対象における予防的処置の効果（例えば対象において慢性腎疾患またはタンパク尿症の発症を予防する）をモニターするために使用できる。

【0139】

本明細書で使用する「試料」という用語は、一般に核酸、DNAもしくはRNAのいずれか、またはアミノ酸を含む任意の材料を指す。一般に、このような材料は、血液試料、糞便試料、組織試料、細胞、細菌、組織学的切片、または口腔スワブの形態である。試料は調製することができ、例えば試料は新鮮であり得るか、固定する、凍結する、またはパラフィンに包埋することができる。本明細書で使用する「生物学的試料」という用語は、対象由来の細胞もしくは細胞の集団または一定量の組織もしくは体液を指す。ほとんどの場合、試料は対象から取り出されているが、「生物学的試料」という用語はまた、インビボで分析される、すなわち対象から取り出されていない細胞または組織も意味し得る。しばしば、「生物学的試料」は動物からの細胞を含むが、この用語はまた、遺伝子発現レベルを測定するために使用できる血液、唾液または尿の非細胞画分などの、非細胞生物学的材料も意味し得る。生物学的試料は、組織生検材料、擦過標本、全血、血漿、血清、尿、唾液、細胞培養物、または脳脊髄液を含むが、これらに限定されるわけではない。生物学的試料はまた、組織生検材料、細胞培養物も含む。生物学的試料または組織試料は、例えば尿、血液、血漿、血清、腎生検材料、糞便、痰、脊髄液、胸膜液、乳頭吸引液、リンパ液、皮膚、気道、腸管および尿生殖路の外部切片、涙、唾液、乳、細胞（血球を含むがこれに限定されるわけではない）、腫瘍、器官、およびまたインビトロ細胞培養物成分の試料を含むがこれらに限定されるわけではない、個体から単離された組織または体液の試料を意味し得る。一部の態様では、尿試料を得た場合、尿試料を遠心分離して任意の腎細胞をペレット化し、これに関して本明細書で述べるアッセイ法および方法を実施することができる。一部の態様では、試料は、腎またはその部分のコア針生検材料、例えばボドサイト試料などの、腎生検由来である。加えて、細針吸引物試料が使用される。一部の態様では、生物学的試料は調製することができ、例えば生物学的試料は新鮮であり得るか、固定する、凍結する、またはパラフィンに包埋することができる。試料は、対象から細胞の試料を取り出すことによって得ることができるが、以前に単離された細胞（例えば別の人物によって単離された）を使用することによって、または本明細書で述べる方法をインビボで実施することによっても達成できる。

【0140】

本明細書で使用する「発現」という用語は、ポリペプチドもしくはタンパク質の発現またはポリヌクレオチドの発現または遺伝子の発現を交換可能に指す。発現はまた、翻訳前修飾されたおよび翻訳後修飾されたタンパク質の発現、ならびにブレ mRNA 分子、あるいはスプライシングされた成熟 mRNA 分子の発現も指す。ポリヌクレオチドの発現は、例えば、RNA 転写産物分子の産生、例えばメッセンジャー RNA (mRNA) 転写産物レベルを測定することによって決定できる。タンパク質またはポリペプチドの発現は、例えば、ポリペプチドと結合する抗体を使用した免疫測定法によって決定できる。ポリヌクレオチドに適用される場合の「コードする」という用語は、その天然の状態または当業者に周知の方法によって操作された場合に、転写されて RNA を生成することができ、この RNA がアミノ酸配列に翻訳されてポリペプチドおよび/またはそのフラグメントを作製することができる場合、ポリペプチドまたはタンパク質を「コードする」と言われるポリヌクレオチドを指す。アンチセンス鎖はこのような核酸の相補物であり、コード配列はこれから推定することができる。「内因性に発現された」または「内因性発現」という用語は、その細胞型についての正常レベルでのおよび正常な調節下での遺伝子産物の発現を指す。

【0141】

試料または生物学的試料中の ROBO2 タンパク質または核酸のレベルを測定するための本明細書で述べるアッセイ法、方法およびシステムに関して使用できる検出方法は、光学的方法、電気化学的方法（ボルタンメトリーおよびアンペロメトリー技術）、原子間力顕微鏡法、および高周波法、例えば多重共鳴分光法を含む。光学的方法は、共焦点および非共

10

20

30

40

50

焦点の両方の顕微鏡検査、蛍光、ルミネセンス、化学発光、吸光度、反射率、透過率、および複屈折または屈折率（例えば表面プラズモン共鳴、偏光解析法、共鳴ミラー法、格子カプラー導波管法または干渉計）の検出を含む。

【0142】

例えばSEQ ID NO: 1またはSEQ ID NO: 3のタンパク質のレベルなどの、ROBO2タンパク質のレベルを決定する本明細書で述べるアッセイ法、方法およびシステムの態様では、生物学的試料中のバイオマーカータンパク質のレベルを測定するための当業者に一般的に公知の任意のプロテオミックスアプローチを使用することができる。測定が、生物学的試料中のROBO2タンパク質のレベルがROBO2タンパク質についての参照閾値と同じであるか、または参照閾値より上もしくは下であるかを判定するまたは示すことができる限り、測定は定量的または定性的のいずれであってもよい。

10

【0143】

ROBO2タンパク質の測定されたレベルは、一部の態様では、試料中のROBO2タンパク質分子の数を検出することなどによる、ROBO2タンパク質自体の量を測定するROBO2タンパク質のレベルの一次測定であり得るか、または、一部の態様では、ROBO2タンパク質の二次測定（機能活性の測定もしくはROBO2タンパク質をコードする、mRNAなどの核酸の測定などの、そこからROBO2タンパク質の量を推定し得るが、必ずしも推定する必要があるとは限らない測定）であり得る。定性的データも、一次測定から導き出すまたは得ることができる。

20

【0144】

本明細書で述べるアッセイ法および方法の一部の態様では、親和性に基づく測定技術を用いてROBO2タンパク質レベルを測定することができる。抗体に関する場合の「親和性」は、当技術分野において十分に理解されている用語であり、抗体の、本明細書で述べるバイオマーカー（またはそのエピトープ）などの結合パートナーに対する結合の程度または強さを意味する。親和性は、平衡解離定数（ K_D または K_d ）、見かけ平衡解離定数（ K_D または K_d ）、および IC_{50} （競合アッセイ法において50%阻害を生じさせるのに必要な量；本明細書では「150」と交換可能に使用される）を含むが、これらに限定されるわけではない、当技術分野で公知の多くの方法で測定するおよび/または表すことができる。本発明の目的に関して、親和性は、エピトープに結合する抗体の所与の集団に対する平均親和性であることが理解される。

30

【0145】

親和性に基づく測定技術は、測定されるバイオマーカータンパク質に特異的に結合する分子（抗体またはアプタマーなどの「親和性試薬」）を利用するが、分光法に基づく技術（例えばマトリックス支援レーザー脱離イオン化-飛行時間型、MALDI-TOF分光法）または生物活性を測定するアッセイ法（例えば増殖因子の分裂促進性を測定するアッセイ法）などの他の技術も使用できる。本明細書で述べるアッセイ法および方法に関する使用のための親和性に基づく技術は、抗体に基づくアッセイ法（免疫測定法）およびELONAなどのアプタマー（他の分子に特異的に結合する核酸分子）を利用するアッセイ法を含み得る。加えて、抗体とアプタマーの両方を利用するアッセイ法も企図される（例えば捕捉のために抗体を利用し、および検出のためにアプタマーを利用するサンドイッチ形式のアッセイ法）。多種多様な親和性に基づくアッセイ法も当技術分野において公知である。

40

【0146】

親和性に基づくアッセイ法は、典型的にはバイオマーカータンパク質、すなわちROBO2に由来する少なくとも一つのエピトープを利用し、多くの親和性に基づくアッセイ形式は複数のエピトープを利用する（例えば2またはそれ以上のエピトープが「サンドイッチ」形式のアッセイ法に含まれる；少なくとも一つのエピトープを、バイオマーカータンパク質を捕捉するために使用し、および少なくとも一つの異なるエピトープを、マーカーを検出するために使用する）。

【0147】

親和性に基づくアッセイ法は、競合形式または直接反応形式であり得、サンドイッチ型

50

形式を利用することができ、さらに不均質（例えば固体支持体を利用する）または均質（例えば単相で起こる）であり得、および/または免疫沈降を利用することができる。多くのアッセイ法は、標識親和性試薬（例えば抗体、ポリペプチドまたはアプタマー）の使用を含む；標識は、例えば酵素分子、蛍光分子、化学発光分子、放射性分子または色素分子であり得る。プローブからのシグナルを増幅するアッセイ法も公知である；その例は、ピオチンとアビジンを使用するアッセイ法、ならびにELISAおよびELONAアッセイ法などの、酵素標識および酵素媒介性免疫測定法である。例えば、生物学的液体試料からのバイオマーカー濃度をLUMINEX（登録商標）アッセイ法またはELISAによって測定し得る。バイオマーカーまたはバイオマーカーに特異的な試薬のいずれかを表面に結合することができ、レベルを直接または間接的に測定できる。

10

【0148】

本明細書で述べるアッセイ法、方法およびシステムの一部の態様では、免疫測定法の親和性に基づく測定技術を用いてROBO2タンパク質レベルを測定することができる。

【0149】

免疫測定法技術は、生物学的試料中のROBO2タンパク質のレベルを定量的または定性的に測定できる任意の免疫測定法技術を含み得る。適切な免疫測定法技術は、放射性免疫測定法、ELISA（酵素結合免疫吸着検定法）、「サンドイッチ」免疫測定法、免疫放射定量測定法、免疫拡散アッセイ法、インサイチュー免疫測定法（例えばコロイド状金、酵素または放射性同位体標識を使用する）、ウェスタンブロット分析、免疫沈降法、免疫蛍光アッセイ法、免疫電気泳動アッセイ法、蛍光免疫測定法（FIA）、免疫放射定量測定法（IRMA）、イムノエンザイモメトリックアッセイ法（immunoenzymometric assay）（IEMA）、免疫発光アッセイ法および免疫蛍光アッセイ法（Madersbacher S, Berger P. Antibodies and immunoassays. Methods 2000;21:41-50）、化学発光アッセイ法、免疫PCR、ならびにウェスタンブロットアッセイ法を含むが、これらに限定されるわけではない。同様に、生物学的試料中のバイオマーカーレベルを定量的または定性的に測定することができるアプタマーに基づくアッセイ法が、本明細書で述べるアッセイ法、方法およびシステムにおいて使用できる。一般に、アプタマーはほとんどすべての形式の免疫測定法において抗体の代わりとなり得るが、アプタマーはさらなるアッセイ形式（PCRなどの核酸増幅技術を用いた結合アプタマーの増幅（米国特許第4,683,202号）または複合プライマーを用いる等温増幅（米国特許第6,251,639号および同第6,692,918号）など）を可能にする。

20

30

【0150】

ROBO2タンパク質レベルを免疫測定法の親和性に基づく測定技術を用いて測定する、本明細書で述べるアッセイ法、方法およびシステムの一部の態様では、免疫測定法を、タンパク質/抗体相互作用またはバイオマーカー/抗体相互作用の程度を測定することによって実施する。免疫測定法の任意の公知の方法が使用できる。

【0151】

一部の態様では、結合アッセイ法における結合パートナー、例えばROBO2タンパク質に結合する抗体またはリガンドは、好ましくは標識された特異的結合パートナーであるが、必ずしも抗体である必要はない。結合パートナーは、通常はそれ自体が標識されているが、選択的に、例えば別の標識物質から、シグナルが生成される二次反応によって検出することもできる。

40

【0152】

したがって、ROBO2タンパク質に特異的に結合する抗体を、生物学的試料中のROBO2タンパク質の存在および/または量を決定する、本明細書で述べるアッセイ法、方法およびシステムにおいて使用することができ、これを用いて、診断試料中に存在するROBO2タンパク質の濃度上昇または濃度低下を検出することができる。このような抗体は、免疫診断分野において周知の方法のいずれかによって得ることができる。抗体は、任意の生物学的に適切な状態のタンパク質に対する抗ROBO2タンパク質抗体であり得る。したがって、例えば、体内ではグリコシル化形態で存在する、ROBO2タンパク質の非グリコシル化形態に対して、またはROBO2タンパク質の関連エピトープを担持するペプチドに対して抗体を得る

50

ことができる。

【0153】

これらのアッセイ法、方法およびシステムの一部の態様では、検出しようとする比較的低レベルのタンパク質から、増強された「シグナル」を生成する、増幅アッセイ形態が使用できる。増幅免疫測定法の一つの特定の形態は、増強化学発光アッセイ法である。例えば、ルミノール、過酸化物質および放射光の強度と持続期間を増強する化合物、典型的には4-ヨードフェノールまたは4-ヒドロキシ桂皮酸との化学発光反応に關与する、ホースラディッシュペルオキシダーゼで抗体を標識する。

【0154】

これらのアッセイ法、方法およびシステムの一部の態様では、免疫PCRを含む増幅免疫測定法が使用できる。この技術では、抗体を、PCRプライマーを含む任意のDNAの分子に共有結合で連結し、それにより抗体が結合しているDNAをポリメラーゼ連鎖反応によって増幅する。例えばE. R. Hendrickson et al., *Nucleic Acids Research* 23: 522-529 (1995) 参照。

【0155】

したがって、本明細書で述べるアッセイ法、方法およびシステムすべての態様において、ROBO2タンパク質のレベルは、本明細書では「タンパク質結合実体」とも称する、タンパク質結合剤を使用して決定することができ、または「親和性試薬」、特に抗体が使用できる。例えば、親和性試薬、特に抗バイオマーカー抗体などの抗体が、免疫測定法、特にELISA（酵素結合免疫吸着検定法）において使用できる。いくつかの態様では、バイオマーカータンパク質のレベルは、例えばアイソフォーム特異的化学物質またはアイソフォームタンパク質の酵素的切断、免疫プロット法、免疫組織化学分析、ELISA、および質量分析を含むがこれらに限定されるわけではない、当技術分野において一般的に公知の方法を用いて生物学的試料中で測定することができる。

【0156】

本明細書で述べるアッセイ法、方法およびシステムの一部の形態では、「酵素結合免疫吸着検定法（ELISA）」を用いてROBO2タンパク質レベルを測定する。ELISAは、標識された（例えば酵素結合した）形態の抗体を使用して抗原を検出し、抗原の濃度を測定するための技術である。当業者に周知の種々の形態のELISAがある。ELISAについての当技術分野で公知の標準的な技術は、"Methods in Immunodiagnosis", 2nd Edition, Rose and Bigazzi, eds. John Wiley & Sons, 1980; Campbell et al., "Methods and Immunology", W. A. Benjamin, Inc., 1964; および Oellerich, M. 1984, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 22:895-904に記載されている。

【0157】

本明細書で述べるアッセイ法、方法およびシステムの一部の態様では、サンドイッチアッセイELISAを用いてROBO2タンパク質レベルを測定する。「サンドイッチELISA」では、抗体（例えば抗酵素）を固相（すなわちマイクロタイタープレート）に結合し、抗原（例えば酵素）を含有する生物学的試料に曝露する。次に固相を洗浄して非結合抗原を除去する。次に標識された抗体（例えば酵素結合した）を結合抗原（存在する場合）に結合し、抗体-抗原-抗体サンドイッチを形成する。したがって、この方法を用いて、ROBO2タンパク質に対する第一抗体をプラスチックマイクロタイタープレートのウェルなどの固相に結合し、試料およびアッセイするROBO2タンパク質に特異的な標識二次抗体と共にインキュベートする。抗体に結合することができる酵素の例は、アルカリホスファターゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、ルシフェラーゼ、ウレアーゼ、および β -ガラクトシダーゼである。酵素結合抗体は基質と反応して、測定できる着色した反応産物を生成する。

【0158】

本明細書で述べるアッセイ法、方法およびシステムの一部の態様では、抗体捕捉アッセイ法または競合的ELISAを用いてROBO2タンパク質レベルを測定する。「競合的ELISA」では、抗体を、抗原（すなわち酵素）を含有する試料と共にインキュベートする。次に抗原-抗体混合物を抗原（すなわち酵素）で被覆した固相（例えばマイクロタイタープレート

）と接触させる。試料中により多くの抗原が存在するほど、固相に結合するために使用できる遊離抗体はより少なくなる。次に標識された（例えば酵素結合した）二次抗体を固相に添加し、固相に結合した一次抗体の量を決定する。したがって、一部のこのような態様では、生物学的試験試料を固相に結合させ、抗ROBO2タンパク質抗体（例えばROBO2タンパク質に特異的に結合する抗体）を添加して、結合させることができる。非結合材料を洗い流した後、固相に結合した抗体の量を、第一抗体に対する標識二次抗体を用いて決定する。

【0159】

これらのアッセイ法、方法およびシステムの一部の態様では、標識は、好ましくは酵素である。酵素の基質は、例えば発色性、蛍光性または化学発光性であり得る。

10

【0160】

本明細書で述べるアッセイ法、方法およびシステムの一部の態様では、免疫組織化学を用いてROBO2タンパク質レベルを測定する。「免疫組織化学アッセイ法」では、アッセイするタンパク質に特異的な抗体に組織を曝露することによって組織の切片を特定のタンパク質に関して試験する。次に、タンパク質の存在および存在するタンパク質の量を決定する多くの方法のいずれかによって抗体を視覚化する。抗体を視覚化するために使用される方法の例は、例えば、抗体に結合した酵素（例えばルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、または β -ガラクトシダーゼ）を介する方法、または化学的方法（例えばDAB/発色基質）である。その後試料を顕微鏡で、最も好ましくは可視スペクトル内で検出される染料で染色した試料の光学顕微鏡検査によって、種々のこのような染色法のいずれかおよび当業者に公知の試薬を用いて、分析する。

20

【0161】

本明細書で述べるアッセイ法、方法およびシステムの一部の態様では、放射免疫測定法を用いてROBO2タンパク質レベルを測定する。放射免疫測定法は、標識された（例えば放射性標識または蛍光標識された）形態の抗原を使用して、抗原、すなわちROBO2を検出し、濃度を測定するための技術である。抗原に対する放射性標識の例は、 ^3H 、 ^{14}C 、および ^{125}I を含む。生物学的試料中のROBO2の濃度は、生物学的試料中のROBO2を、ROBO2に対する抗体の結合に関して標識された（例えば放射性標識）ROBO2と競合させることによって測定する。標識ROBO2と非標識ROBO2の間の競合結合を確実にするために、標識ROBO2は、抗体の結合部位を飽和させるのに十分な濃度で存在する。試料中のROBO2の濃度が高いほど、抗体に結合する標識ROBO2の濃度は低くなる。

30

【0162】

本明細書で述べるアッセイ法、方法およびシステムの一部の態様では、免疫放射定量測定法（IRMA）を用いてROBO2タンパク質レベルを測定する。IRMAは、抗体試薬が放射性標識されている免疫測定法である。IRMAは、タンパク質、例えばウサギ血清アルブミン（RSA）への結合などの技術による、多価抗原コンジュゲートの作製を必要とする。多価抗原コンジュゲートは1分子当たり少なくとも2個の抗原残基を有していなければならない。抗原残基は、少なくとも2つの抗体による抗原への結合を可能にするのに十分な距離だけ離れていなければならない。例えば、IRMAでは多価抗原コンジュゲートをプラスチックスフェアなどの固体表面に結合することができる。非標識「試料」抗原および放射性標識された抗原に対する抗体を、多価抗原コンジュゲートで被覆したスフェアを含む試験管に添加する。試料中の抗原は、抗原抗体結合部位に関して多価抗原コンジュゲートと競合する。適切なインキュベーション期間後、非結合反応物を洗浄によって除去し、固相上の放射能の量を決定する。結合放射性抗体の量は、試料中の抗原の濃度に反比例する。

40

【0163】

生物学的試料中のROBO2タンパク質のレベルを検出するために使用できる他の技術は、医師の選択に応じて、ならびに本開示および生物学的試料のタイプ（すなわち血漿、尿、組織試料等）に基づいて実施できる。一つのこのような技術はウェスタンブロット法（Towbin et al., Proc. Nat. Acad. Sci. 76:4350 (1979)）であり、この方法では、適切に処理した試料をSDS-PAGEゲル上で泳動させた後、ニトロセルロースフィルターなどの固体

50

支持体に移す。次に検出可能に標識された抗ROBO2抗体またはタンパク質結合分子を使用してROBO2タンパク質のレベルを評価することができ、検出可能な標識からのシグナルの強度がROBO2タンパク質の量に対応する。存在するROBO2タンパク質の量のレベルを、例えばデンストメトリーによって定量化することもできる。

【0164】

本明細書で述べるアッセイ法、方法およびシステムの一部の態様では、ROBO2タンパク質レベルを質量分析、例えばMALDI/TOF（飛行時間型）、SELDI/TOF、液体クロマトグラフィ-質量分析（LC-MS）、ガスクロマトグラフィ-質量分析（GC-MS）、高速液体クロマトグラフィ-質量分析（HPLC-MS）、キャピラリー電気泳動-質量分析、核磁気共鳴分光法、またはタンデム質量分析（例えばMS/MS、MS/MS/MS、ESI-MS/MS等）を用いて測定する。例えば、その全体が参照により本明細書に組み入れられる、米国特許出願第20030199001号、同第20030134304号、同第20030077616号参照。

10

【0165】

一部のこのような態様では、これらの方法を、生物学的試料中のROBO2タンパク質のレベルを決定するための自動化システムを作り出すための機械、コンピュータシステムおよび媒体ならびに、例えば生物学的試料中のROBO2タンパク質のレベルを同定する、印刷可能な報告書を作成するための解析と組み合わせることができる。一部の場合、ROBO2のレベルの測定は決定および比較モジュールから遠隔操作で行われる。

【0166】

質量分析法は当技術分野において周知であり、タンパク質などの生体分子を定量するおよび/または同定するために使用されている（例えばLi et al. (2000) Tibtech 18: 151-160; Rowley et al. (2000) Methods 20: 383-397; およびKuster and Mann (1998) Curr. Opin. Structural Biol. 8: 393-400参照）。さらに、単離されたタンパク質の少なくとも部分的なデノボ配列決定を可能にする質量分析技術が開発されている。Chait et al., Science 262:89-92 (1993); Keough et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96:7131-6 (1999); reviewed in Bergman, EXS 88: 133-44 (2000)。

20

【0167】

特定の態様では、気相イオン分光光度計を使用する。他の態様では、レーザー-脱離/イオン化質量分析を用いて試料を分析する。最近のレーザー脱離/イオン化質量分析（「LDI-MS」）は、二種類の主要な変法:マトリックス支援レーザー脱離/イオン化（「MALDI」）質量分析および表面増強レーザー脱離/イオン化（「SELDI」）質量分析で実施することができる。MALDIでは、分析物を、マトリックスを含有する溶液と混合し、この液体の1滴を基板の表面に置く。次にこのマトリックス溶液を生物学的分子と共に共結晶化させる。基板を質量分析計に挿入する。レーザーエネルギーを基板表面に向け、生物学的分子を有意にフラグメント化することなく脱離し、イオン化する。例えば、参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第5,118,937号（Hillenkamp et al.）および米国特許第 5,045,694号（Beavis & Chait）参照。

30

【0168】

SELDIでは、基板表面を、脱離過程で基板表面が有効な関与因子となるように改変する。一つの変法では、関心対象のタンパク質に選択的に結合する吸着剤および/または捕捉試薬で表面を誘導体化する。別の変法では、レーザーが当たったときに脱離されないエネルギー吸収分子で表面を誘導体化する。別の変法では、関心対象のタンパク質に結合し、およびレーザーの適用時に壊れる光分解性結合を含む分子で表面を誘導体化する。これらの方法の各々において、誘導体化剤は一般に、試料を適用する基板表面の特定の場所に局在化させる。例えば、参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第5,719,060号および国際公開公報第98/59361号参照。これら2つの方法は、例えば、分析物を捕捉するためにSELDI親和性表面を使用し、およびエネルギー吸収材料を提供するためにマトリックス含有液体を捕捉した分析物に添加することによって組み合わせることができる。

40

【0169】

質量分析計に関するさらなる情報については、例えば、Principles of Instrumental A

50

nalysis, 3rd edition., Skoog, Saunders College Publishing, Philadelphia, 1985;およびKirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, 4th ed. Vol. 15 (John Wiley & Sons, New York 1995), pp. 1071-1094参照。

【0170】

ROBO2タンパク質のレベルの検出は、典型的には信号強度の検出に依存する。これは、次に、基板に結合されたポリペプチドの量および特性を反映し得る。例えば、特定の態様では、第一試料と第二試料のスペクトルからのピーク値の信号強度を比較して（例えば視覚的に、またはコンピュータ解析等によって）、特定の生体分子の相対的な量を決定することができる。Biomarker Wizardプログラム（CIPHERGEN Biosystems, Inc., Fremont, Calif.）などのソフトウェアプログラムが、質量スペクトルの解析を助けるために使用できる。質量分析計およびこれらの技術は当業者に周知である。

10

【0171】

本明細書で述べるアッセイ法、方法およびシステムの一部の態様では、ROBO2タンパク質レベルを、ゲル電気泳動技術、特にSDS-PAGE（ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動）、中でも二次元PAGE（2D-PAGE）、好ましくは二次元SDS-PAGE（2D-SDS-PAGE）を用いて測定する。特定の例によれば、アッセイ法は、特に、好ましくはpH 4～9にわたるpH範囲の固定化pH勾配（IPG）を使用する、2D-PAGEに基づく。

【0172】

本明細書で述べるアッセイ法、方法およびシステムの一部の態様では、ROBO2タンパク質レベルを、ゲル電気泳動技術、特に上述した技術を他のタンパク質分離方法、特に当業者に公知の方法、中でもクロマトグラフィおよび/またはサイズ排除と組み合わせて用いて測定する。

20

【0173】

本明細書で述べるアッセイ法、方法およびシステムの一部の態様では、共鳴技術、特にプラズマ表面共鳴を用いてROBO2タンパク質レベルを測定する。

【0174】

本明細書で述べるアッセイ法、方法およびシステムの一部の態様では、タンパク質バイオチップを使用してROBO2タンパク質レベルを測定する。バイオチップは一般に、捕捉試薬（例えば吸着剤または親和性試薬）が結合された、実質的に平らな表面を有する固体基板を含む。しばしば、バイオチップの表面は、結合捕捉試薬を結合させる複数の指定可能な場所を含む。バイオチップはまた、対照としての役割を果たす結合捕捉試薬も含み得る。タンパク質バイオチップは、ポリペプチドの捕捉に適合されたバイオチップである。多くのタンパク質バイオチップが当技術分野において記述されている。これらは、例えば、CIPHERGEN Biosystems, Inc. (Fremont, Calif.), ZYOMYX (Hayward, Calif.), INVITROGEN (Carlsbad, Calif.), BIACORE (Uppsala, Sweden) およびPROCIGNIA (Berkshire, UK) により製造されたタンパク質バイオチップを含む。このようなタンパク質バイオチップの例は、以下の特許または公開特許出願：米国特許第6,225,047号（Hutchens & Yip）、米国特許第6,537,749号（Kuimelis and Wagner）、米国特許第6,329,209号（Wagner et al.）、PCT国際公開番号第00156934号（Englert et al.）、PCT国際公開番号第031048768号（Boutell et al.）および米国特許第5,242,828号（Bergstrom et al.）に記載されている。

30

40

【0175】

参照閾値レベルまたは対象からのROBO2タンパク質のレベルとの比較のために使用されるROBO2タンパク質レベルの値は、本明細書全体を通じておよび以下で理解されるように、実施される本明細書で述べる局面または態様に依存して異なり得る。参照閾値は、個々の試料の値、例えば試験される対象に由来するが、より早い時点（例えば1番目の時点（t1）、例えば測定された最初のバイオマーカーレベル、または例えば2番目の時点（t2））の生物学的試料から得た値に基づき得る。参照閾値はまた、試料のプール、例えば試験される対象のプール由来の試料から得た値に基づき得る。例えば、一部の態様では、ROBO2タンパク質についての参照閾値は、慢性腎疾患またはタンパク尿症を有することが既知の

50

対象において測定されたROBO2タンパク質の測定50%値（例えば中央値）に基づく。例えば、ROBO2タンパク質についての上位50%（例えば中央値レベルまたはそれより上のレベル）の対象を、慢性腎疾患またはタンパク尿症を有するリスクがあると選択することができる。参照値はまた、試験する試料が含まれたまたは除外された試料のプールに基づき得る。参照値は、多数の試料、例えば暦年齢がマッチする群の健常対象の集団から、または慢性腎疾患もしくはタンパク尿症を有しないまたは慢性腎疾患もしくはタンパク尿症のリスクを有しない対象からの多数の試料に基づき得る。一部の態様では、参照値は、これらのアッセイのいずれかの平均値もしくは中央値、または所定の平均値もしくは中央値を少なくとも1標準偏差、または典型的には少なくとも2標準偏差上回り得る。

【0176】

10

本明細書で開示するアッセイ法、方法およびシステムによって慢性腎疾患またはタンパク尿症を経験するまたは有する可能性がある対象のリスクを評価するために、「参照閾値」は、典型的には所定の参照閾値レベル、例えば試験対象の暦年齢とマッチする暦年齢群の中の健常対象の集団から得た尿、血清または血中ROBO2タンパク質の中央値である。先に示したように、一部の状況では、参照試料はまた、性別がマッチし得るおよび/または民族性に基いてマッチし得る。一部の態様では、ROBO2タンパク質についての参照閾値は、同じ民族性、例えばコーカサス人、黒人、ヒスパニック、アジア人、アジア系インド人、パキスタン人、中東人および/または太平洋諸島人のパネル対象における一つのタイプの生物学的試料、例えば尿、血液、血清中のバイオマーカーの中央値レベルである。

【0177】

20

本明細書で開示するアッセイ法、方法およびシステムによって慢性腎疾患またはタンパク尿症を経験するまたは有する可能性がある対象のリスクを評価するために、ROBO2タンパク質についての参照閾値レベルは、所定のレベル、例えば試験対象の暦年齢とマッチする暦年齢群の中の健常対象の集団から得たレベルの平均値または中央値であり得る。あるいは、ROBO2タンパク質についての参照閾値レベルは、同じ対象に由来するが、より早い時点の、および/または対象が慢性腎疾患もしくはタンパク尿症のリスクを有していなかったときの試料から得た、特定の対象についての歴史的参照レベルであり得る。一部の場合には、ROBO2タンパク質についての参照閾値レベルは、全員が、例えば糖尿病に起因する、慢性腎疾患またはタンパク尿症を有していたことがある特定の群の対象についてのROBO2タンパク質の歴史的参照レベルであり得る。

30

【0178】

一部の態様では、健常対象を対照対象として選択する。一部の態様では、対照は年齢がマッチする対照である。健常対象は、例えば尿または血清試料中の、ROBO2タンパク質の参照閾値レベルを得るために使用できる。本明細書で使用する「健常」対象または「健常」対象もしくは個体からの試料は、当業者に一般的に理解されるものと同じである。例えば、本明細書で述べる診断および処置方法のための健常対象として対照対象を選択するために、本明細書で述べるように、腎機能の評価するための一般的に公知の方法を使用し得る。一部の態様では、慢性腎疾患を示唆する徴候または症状を有しない良好な健康状態の対象を健常対照対象として採用することができる。対象を、病歴、家族歴、臨床医による理学的および腎検査、検査室検査からなる広範囲の評価に基づいて評価する。慢性腎疾患および/またはタンパク尿症の分析の例は、尿、血液または血清試料中の特定のタンパク質または分子、例えばアルブミン、カルシウム、コレステロール、全血球算定（CBC）、電解質、マグネシウム、リン、カリウム、ナトリウムもしくはこれらの任意の組み合わせのレベルを検出すること；例えば、クレアチニンクリアランスを検出するアッセイ法；クレアチニンレベル；BUN（血液尿素窒素）；特定の技術もしくは手法、例えば腹部CTスキャン、腹部MRI、腹部超音波、腎生検、腎スキャン、腎超音波などの使用を介して；エリトロポエチン、PTHに関するアッセイ法もしくは検査の結果における変化の検出によって；骨密度検査もしくはビタミンD；またはこのような検出方法およびアッセイ法の任意の組み合わせを含むが、これらに限定されるわけではない。

40

【0179】

50

年齢がマッチする集団（これから参照値を得ることができる）は、理想的には試験される対象または個体と同じ歴年齢であるが、おおよそ年齢がマッチする集団も許容される。おおよそ年齢がマッチする集団は、試験される個体の歴年齢の1、2、3、4もしくは5年以内であり得るか、または試験される個体の歴年齢を包含する異なる歴年齢の群であり得る。

【0180】

「歴年齢がマッチする群」と比較される対象とは、一般に、対象が5から20年の範囲内で歴年齢がマッチする群と比較されることを指す。おおよそ年齢がマッチする集団は、2、3、4、5、6、7、8、9、10または15または20年単位であり得る（例えば62歳の対象についての参照値の供給源として役立ち得る「5年単位」の群は、58～62歳の個体、59～63歳の個体、60～64歳の個体、61～65歳の個体、または62～66歳の個体を含み得る）。より広い定義では、異なる歴年齢群の間により大きな隔たりがある場合、例えば参照値に利用可能な異なる歴年齢群が少数存在し、異なる歴年齢群間の隔たりが本明細書で述べる2、3、4、5、6、7、8、9、10または15または20年単位を上回る場合、「歴年齢がマッチする群」は、対象の歴年齢により近くマッチする年齢群を指し得る（例えば高齢群（例えば80～90歳）と若齢群（例えば20～30歳）について参照値が利用可能である場合、51歳についての歴年齢がマッチする群は、試験対象の歴年齢により近い、若齢群（20～30歳）を参照レベルとして使用することができる。

10

【0181】

対照対象を選択する際に考慮すべき他の因子は、種、性別、民族性等を含むが、これらに限定されるわけではない。したがって、一部の態様では、参照レベルは、所定の参照レベル、例えば試験対象の性別と性別がマッチする健常対照対象の集団から得たレベルの平均値または中央値であり得る。一部の態様では、参照レベルは、所定の参照レベル、例えば試験対象の民族性（例えばコーカサス人、黒人、ヒスパニック、アジア人、アジア系インド人、パキスタン人、中東人および/または太平洋諸島人）と民族性がマッチする健常対照対象の集団から得たレベルの平均値または中央値であり得る。他の態様では、健常対象の集団の歴年齢および性別の両方が、それぞれ試験対象の歴年齢および性別とマッチする。他の態様では、健常対象の集団の歴年齢および民族性の両方が、それぞれ試験対象の歴年齢および民族性とマッチする。他の態様では、健常対照対象の集団の歴年齢、性別および民族性が、それぞれ試験対象の歴年齢、性別および民族性とすべてマッチする。

20

30

【0182】

対象由来の生物学的試料中のROBO2タンパク質のレベルとROBO2タンパク質についての参照閾値レベルを比較する工程は、当業者にとって適切で公知の任意の好都合な方法で実施することができる。一般に、本明細書で述べるアッセイ法、方法およびシステムを用いて決定されるROBO2タンパク質レベルの値は、定量的値（例えば濃度の定量的値、例えば試料1リットル当たりのROBO2タンパク質ミリグラム（例えばmg/L）、または絶対量）であり得る。あるいは、ROBO2タンパク質レベルの値は、測定技術に依存して定性的であり得、したがって対象からの値と参照値を比較する方法は、使用される測定技術に依存して異なり得る。例えば、比較は、数値データを検査することによって、データの表示を検査する（例えば棒グラフまたは折れ線グラフなどのグラフ表示を検査する）ことによって、および、例えば少なくとも一つの標準偏差、または少なくとも2つの標準偏差を用いて行うことができる。一例では、定性的アッセイ法を使用してROBO2タンパク質レベルを測定する場合、着色した反応産物の強度を視覚的に比較することによって、または着色反応産物のデンストメトリーまたは分光測定からのデータを比較する（例えば数値データまたは測定装置から導かれた、棒グラフなどのグラフデータを比較する）ことによって、レベルを比較することができる。

40

【0183】

本明細書で述べるように、ROBO2タンパク質レベルは、定量的に（絶対値）または定性的に（相対値）測定することができる。一部の態様では、生物学的試料中のROBO2タンパク質レベルの定量的値は、慢性腎疾患またはタンパク尿症のリスクの所与のレベル（また

50

は等級)を示すことができる。

【0184】

一部の態様では、比較は、対象からの値と参照値との差の大きさを決定する(例えば対象から得た測定ROBO2タンパク質レベルと参照閾値ROBO2タンパク質値との「倍数」またはパーセンテージ差を比較する)ために実施される。倍数差は、ROBO2タンパク質レベルの絶対濃度を測定し、これを参照閾値ROBO2タンパク質レベルの絶対値と比較することによって決定できるか、または倍数差は、参照値と試料値がどちらも絶対濃度の測定ではない場合、および/または両方の値が同時に測定される場合に、参照値と試料値の相対的な差によって測定することができる。例えば、ELISAは、絶対含量または参照物中の同じタンパク質の絶対濃度と比較して倍数変化を決定するタンパク質の濃度を測定する。別の例として、抗体アレイは、そこから倍数変化を決定する相対濃度を測定する。したがって、特定の診断を示唆するまたは示す測定値と参照値の差の大きさは、実施される方法に依存する。

10

【0185】

当業者に明らかなように、ROBO2タンパク質レベルの測定のために反復測定を行う場合、対象からの測定値を参照閾値ROBO2タンパク質レベルと比較し、反復測定を考慮に入れることができる。反復測定は、測定値の平均値または中央値のいずれかを使用することによって考慮に入れることができる。

【0186】

一部の態様では、比較する工程は手作業であり得るかまたは、好ましくは自動化することができる。例えば、アッセイ装置(化学発光シグナルを測定するためのルミノメータなど)は、対象からの値をROBO2タンパク質についての参照値と比較することを可能にする電気回路とソフトウェアを含み得る。あるいは、別個の装置(例えばデジタルコンピュータ)を使用して、対象からの測定されたROBO2タンパク質レベルとROBO2タンパク質についての参照閾値レベルを比較することができる。比較のための自動装置は、ROBO2タンパク質についての格納された参照値を含み得るか、または対象からの測定ROBO2タンパク質レベルを、同時期に測定された参照試料から導かれるROBO2タンパク質の参照閾値レベルと比較することができる。

20

【0187】

一部の態様では、ROBO2タンパク質レベルに関して試験する対象を、本明細書で述べるアッセイ法、方法およびシステムの結果に基づき2またはそれ以上の群(状態)の一つに割り当てる。本明細書で述べる診断アッセイ法、方法およびシステムは、多数の異なる状態を分類するために使用できる。

30

【0188】

したがって、一部の態様では、対象が慢性腎疾患またはタンパク尿症を有する高いリスクを有するかどうか(状態:低リスク対高リスク)の判定を、本明細書で述べる診断アッセイ法、方法およびシステムを用いて実施する。様々なリスク状態、例えば高リスク、中リスクまたは低リスクの特徴であると判定されたバイオマーカー量またはROBO2タンパク質のパターンを同定する。慢性腎疾患またはタンパク尿症を発症するリスクは、ROBO2タンパク質を単独でまたは他の公知のバイオマーカーと組み合わせて測定し、次にこれらを分類アルゴリズムに供するかまたは特定のリスクレベルに関連する参照量(例えば本明細書で開示するカットオフ参照量)と比較することによって判定される。

40

【0189】

一部の態様では、対象において慢性腎疾患またはタンパク尿症の重症度または病期または慢性腎疾患もしくはタンパク尿症を有するリスクを判定するための診断アッセイ法、方法およびシステムが本明細書で提供される。慢性腎疾患の各々の病期は、例えばROBO2タンパク質の特徴的な量またはROBO2タンパク質の相対的な量を有する。疾患の病期は、ROBO2タンパク質を単独でまたは他のバイオマーカーと組み合わせて測定し、これらを分類アルゴリズムに供するかまたは参照量および/もしくは特定の病期に関連するバイオマーカーのパターン、例えば対象がどのくらいで慢性腎疾患もしくはタンパク尿症を発症する可

50

能性があるかを比較することによって判定される。例えば、1年以内に慢性腎疾患またはタンパク尿症を有する可能性が高い（例えば予後不良）対象または今後5年間で慢性腎疾患またはタンパク尿症を有する可能性が高い対象を分類することができる。

【0190】

診断アッセイ法、方法およびシステムのさらなる態様は、例えば専門家、医師または患者への結果または診断またはその両方の伝達に関する。特定の態様では、コンピュータを使用してアッセイ結果または診断またはその両方を関係者、例えば医師および医師の患者に伝達する。一部の態様では、例えば結果または診断を伝達する国または管轄区域とは異なる国または管轄区域においてアッセイ法を実施するまたはアッセイ結果を分析する。一部の態様では、対象由来の生物学的試料中のROBO2タンパク質のレベルに基づく慢性腎疾患またはタンパク尿症を有するリスクを、レベルまたは予後を得た後で対象に伝達する。予後または診断は、対象を処置する医師によって対象に伝達され得る。あるいは、予後または診断は、eメールによって対象に送るかまたは電話によって対象に伝達することができる。コンピュータを使用して、eメールもしくは電話によって、またはセキュアゲートウェイの患者ログインサービスを使用してインターネットによって予後または診断を伝達することができる。特定の態様では、予後または診断試験の結果を含むメッセージを作成し、遠隔通信の当業者にはよく知られたコンピュータハードウェアとソフトウェアの組み合わせを使用して対象に自動的に送達することができる。本明細書で述べるアッセイ法、方法およびシステムの特定の態様では、試料のアッセイ法、疾患の診断、およびアッセイ結果または診断の伝達を含む方法段階の全部または一部を、異なる（例えば外国の）管轄区域において実施することができる。

10

20

【0191】

本明細書で述べる慢性腎疾患またはタンパク尿症のリスクを特定するまたは評価する診断アッセイ法、方法およびシステムの一部の態様では、アッセイ法、方法またはシステムは、慢性腎疾患またはタンパク尿症を有するリスクの判定に基づき対象の処置を管理することをさらに含む。このような管理は、慢性腎疾患またはタンパク尿症を有するリスクがあると対象を判定した後の医師または臨床家の行為を含む。例えば、医師が、対象は慢性腎疾患またはタンパク尿症のリスクがあるという診断を下した場合は、続いて特定の処置レジメンが実施され得る。適切な処置レジメンは、限定されることなく、監視下での運動プログラム、血圧、糖摂取および/または脂質レベルの管理、ならびに薬物療法を含み得る。一部の態様では、慢性腎疾患またはタンパク尿症を有するリスクの診断に続いて、患者が慢性腎疾患に罹患しているかどうか、または患者が関連疾患に罹患しているかどうかを判定するためにさらなる検査が行われ得る。また、診断試験が重要な有害事象状態のリスクに関して不確定な結果を与えた場合、さらなる試験が求められ得る。本明細書で述べる慢性腎疾患またはタンパク尿症のリスクを特定するまたは評価する診断アッセイ法、方法およびシステムの一部の態様では、医師が、対象は慢性腎疾患またはタンパク尿症のリスクがないという診断を下した場合、処置は行われない。

30

【0192】

本明細書で述べるアッセイ法およびROBO2検出方法は、ロボット工学およびコンピュータ指示システムを用いて自動化することができる。尿、血漿または血液試料などの生物学的試料を、試料の投入から結果の出力までを完全にロボットステーションによって実施するマイクロ流体デバイスなどのシステムに注入することができる。

40

【0193】

したがって、一部の局面では、発現プロファイルまたは配列情報に基づき、個体が慢性腎疾患もしくはタンパク尿症を有するかどうかまたは個体が慢性腎疾患もしくはタンパク尿症の素因を有するかどうかを判定するための方法を実施するシステム（およびコンピュータシステムを生じさせるためのコンピュータ可読媒体）も本明細書で提供される。

【0194】

一部の局面では、対象が慢性腎疾患もしくはタンパク尿症を有するかどうか、または対象に慢性腎疾患もしくはタンパク尿症の高いリスクがあるかどうかを評価するためのシス

50

テムであって、(a)少なくとも一つの生物学的試料を受け取って、該生物学的試料において、該生物学的試料中のROBO2のレベルを測定すべくまたは所定のレベルもしくは閾値参照レベルと比較したROBO2の発現比率を決定すべく少なくとも一つの分析を実施し、かつ測定されたレベルまたは発現比率を出力するように構成された決定モジュール、(b)前記決定モジュールからのデータ出力情報を格納するように構成された記憶装置、(c)前記記憶装置からの入力を受け取って、前記記憶装置に格納されたデータを少なくとも一つの参照閾値ROBO2レベルと比較するように適合された比較モジュールであって、測定されたROBO2タンパク質レベルが参照閾値レベルと少なくとも同じまたはより高い場合に、前記生物学的試料が参照閾値バイオマーカーレベルからはずれた対象と関連しているという情報を出力モジュールに与える該比較モジュール、および(d)情報をユーザーに表示するための出力モジュールを含む、前記システムが本明細書で提供される。

10

【0195】

本発明のすべての局面において、ROBO2タンパク質のレベルを決定する方法は、自動化された機械またはシステムを用いて実施することができる。このような機械およびシステムは、ROBO2タンパク質のレベルを示す、ならびに/またはROBO2タンパク質についての参照閾値レベルより高いこともしくは同じであることおよび/または試料を得た対象が慢性腎疾患もしくはタンパク尿症のリスクを有するかどうかを報告する、目に見えるスクリーン上の報告書または印刷可能な報告書を表示するなどの、報告書を作成する。

【0196】

したがって、本明細書で述べる一部の態様はまた、(i) ROBO2タンパク質のレベルを決定する段階、および(ii)対象が慢性腎疾患またはタンパク尿症を有するリスクを有するかどうかを示すまたは報告する段階、を実施するための機械、コンピュータシステムおよびコンピュータ可読媒体も提供する。

20

【0197】

これらの局面の態様を、コンピュータ可読媒体に記録されたコンピュータ実行可能命令によって定義され、実行する場合にコンピュータに方法段階を実施させる、機能モジュールを通して説明する。モジュールは、明瞭さのために機能によって分けられている。しかし、モジュールは個別のコードブロックに対応する必要はなく、記述される機能は、様々な媒体に格納され、様々な時点で実行される様々なコード部分の実行によって実施されることが理解されるべきである。さらに、モジュールは他の機能を実施することができ、したがってモジュールは、いずれかの特定の機能または機能のセットを有することに限定されないことが認識されるべきである。

30

【0198】

コンピュータ可読媒体は、コンピュータによってアクセスできる任意の利用可能な有形媒体であり得る。コンピュータ可読媒体は、コンピュータ可読命令、データ構造、プログラムモジュールまたは他のデータなどの情報の格納のために任意の方法または技術で実行される揮発性および不揮発性、取り外し可能および取り外しできない有形媒体を含む。コンピュータ可読媒体は、RAM(ランダムアクセスメモリ)、ROM(読み取り専用メモリ)、EPROM(消去可能プログラム可能読み取り専用メモリ)、EEPROM(電氣的に消去およびプログラム可能な読み取り専用メモリ)、フラッシュメモリまたは他の記憶技術、CD-ROM(コンパクトディスク読み取り専用メモリ)、DVD(デジタル多目的ディスク)または他の光学記憶媒体、磁気カセット、磁気テープ、磁気ディスク記憶媒体または他の磁気記憶媒体、他のタイプの揮発性および不揮発性メモリ、ならびに所望の情報を格納するために使用でき、および前記の任意の適切な組み合わせを含むコンピュータによってアクセスできる任意の他の有形媒体を含むが、これらに限定されるわけではない。

40

【0199】

一つまたは複数のコンピュータ可読媒体上で具体化されたコンピュータ可読データ、またはコンピュータ可読媒体は、例えばコンピュータによって実行された結果として、本明細書で述べる機能(例えばシステムまたはコンピュータ可読媒体に関して)、ならびに/またはその様々な態様、変形および組み合わせの一つまたは複数を実施するようにコンピ

50

ユーザに命令する、一つまたは複数のプログラムの一部として、命令を定義することができる。このような命令は、複数のプログラム言語、例えばJava、J#、Visual Basic、C、C#、C++、Fortran、Pascal、Eiffel、Basic、COBOLアセンブリ言語等のいずれか、またはその様々な組み合わせのいずれかで書かれ得る。このような命令が具体化されるコンピュータ可読媒体は、システムもしくは本明細書で述べるコンピュータ可読媒体のいずれかの構成要素の一つもしくは複数上に存在してもよく、このような構成要素の一つもしくは複数にわたって分布してもよく、およびその間で移行してもよい。

【0200】

コンピュータ可読媒体は、その上に格納された命令を本明細書で論じる本発明の局面を実行するために任意のコンピュータリソースにロードすることができるように、可搬型であり得る。加えて、上述した、コンピュータ可読媒体上に格納された命令またはコンピュータ可読媒体は、ホストコンピュータ上で行われるアプリケーションプログラムの一部として具体化される命令に限定されないことが認識されるべきである。むしろ、命令は、本発明の局面を実行するようにコンピュータをプログラムするために使用できる任意のタイプのコンピュータコード（例えばソフトウェアまたはマイクロコード）として具体化され得る。コンピュータ実行可能命令は、適切なコンピュータ言語またはいくつかの言語の組み合わせで書かれ得る。基本的なコンピュータ生物学方法は当業者に公知であり、例えば、Setubal and Meidanis et al., Introduction to Computational Biology Methods (PWS Publishing Company, Boston, 1997); Salzberg, Searles, Kasif, (Ed.), Computational Methods in Molecular Biology, (Elsevier, Amsterdam, 1998); Rashidi and Buehler, Bioinformatics Basics: Application in Biological Science and Medicine (CRC Press, London, 2000) およびOuelette and Bzevanis Bioinformatics: A Practical Guide for Analysis of Gene and Proteins (Wiley & Sons, Inc., 2nd ed., 2001) に記載されている。

【0201】

本明細書で述べる局面の特定の態様の機能モジュールは、決定モジュール、記憶装置、比較モジュールおよび表示モジュールを含む。機能モジュールは、一つもしくは複数のコンピュータ上で、または一つもしくは複数のコンピュータネットワークもしくはコンピュータシステムを用いることによって実行され得る。

【0202】

一部の局面では、対象が慢性腎疾患またはタンパク尿症を有するまたはそのリスクを有する可能性があるかどうかを判定するために使用できるコンピュータシステムが本明細書で提供される。一部の態様では、コンピュータシステムは決定モジュールに接続され、生物学的試料に関する決定モジュールからの出力データを取得するように構成され、決定モジュールは、対象から得られた生物学的試料中のROBO2タンパク質のレベルを検出するように構成され、ならびにコンピュータシステムは以下を含む：(a) 決定モジュールからのデータ出力ならびに参照データを格納するように構成された記憶装置、記憶装置は(b)に接続されている；(b)一部の態様では、記憶装置上に格納された出力データを格納された参照データと比較するように適合されており、代替的な態様では、出力データをそれ自体と比較するように適合されている、比較モジュール、比較モジュールは報告データを作成するものであり、(c)に接続されている；(c)引き出されたコンテンツ（すなわち比較モジュールからの報告データ）のページをユーザーに対してクライアントコンピュータ上に表示するための表示モジュール、引き出されたコンテンツは、ROBO2のレベルおよび/または対象が将来慢性腎疾患またはタンパク尿症を経験する可能性を示し得る。

【0203】

一部の態様では、決定モジュールは、発現データ、配列情報、コンピュータ可読形態の配列情報に関連する情報を提供するコンピュータ実行可能命令を有する。本明細書で使用する場合、「配列情報」は、完全長ヌクレオチドおよび/もしくはアミノ酸配列、部分的ヌクレオチドおよび/もしくはアミノ酸配列、または突然変異配列を含むがこれらに限定されるわけではない、任意のヌクレオチドおよび/またはアミノ酸配列を指す。さらに、

配列情報「に関連する」情報は、配列の存在または非存在の検出（例えば突然変異または欠失の検出）、試料中の配列の濃度（例えばアミノ酸配列発現レベル、またはヌクレオチド（RNAもしくはDNA）発現レベル）の決定等を含む。「配列情報」という用語は、翻訳後修飾（例えばリン酸化、グリコシル化、SUMO化、ファルネシル化等）の存在または非存在を含むことが意図されている。

【0204】

一例として、ROBO2配列または核酸発現情報を決定するために決定モジュールは、以下を含むがこれらに限定されるわけではない自動配列分析のための公知のシステムを含み得る：Hitachi FMBIO（登録商標）およびHitachi FMBIO（登録商標）II蛍光スキャナ（Hitachi Genetic Systems, Alameda, Californiaより入手可能）；SPECTRUMEDIX（登録商標）SCE 9610完全自動化96-キャピラリー電気泳動遺伝子解析システム（SpectruMedix LLC, State College, Pennsylvaniaより入手可能）；ABI PRISM（登録商標）377 DNAシーケンサー、ABI（登録商標）373 DNAシーケンサー、ABI PRISM（登録商標）310遺伝子分析器、ABI PRISM（登録商標）3100遺伝子分析器、およびABI PRISM（登録商標）3700 DNA分析器（Applied Biosystems, Foster City, Californiaより入手可能）；Molecular Dynamics FLUORIMAGER（商標）575, SI蛍光スキャナおよび Molecular Dynamics FLUORIMAGER（商標）595蛍光スキャナ（Amersham Biosciences UK Limited, Little Chalfont, Buckinghamshire, Englandより入手可能）；GENOMYXSC（商標）DNA配列決定システム（Genomix Corporation (Foster City, California) より入手可能）；ならびにPHARMACIA ALF（商標）DNAシーケンサーおよびPharmacia ALFEXPRESS（商標）（Amersham Biosciences UK Limited, Little Chalfont, Buckinghamshire, Englandより入手可能）。

【0205】

配列またはタンパク質情報を決定するための一部の態様では、決定モジュールは、タンパク質およびDNA分析のためのシステムを含む。例えば、マトリックス支援レーザー脱離イオン化-飛行時間型（MALDI-TOF）システム；SELDI-TOF-MS ProteinChipアレイプロファイリングシステム、例えばCIPHERGEN PROTEIN BIOLOGY SYSTEM II（商標）ソフトウェアを備えた機械；遺伝子発現データを分析するためのシステム（例えば米国特許出願第2003/0194711号）；アレイに基づく発現分析のためのシステム、例えばAffymetrix（Santa Clara, CA 95051）AutoLoaderから入手可能なHTアレイシステムおよびカートリッジアレイシステム、COMPLETE GENECHIP（登録商標）Instrument System、Fluidics Station 450、ハイブリダイゼーションオープン645、QC Toolboxソフトウェアキット、スキャナ3000 7G、スキャナ3000 7Gプラス標的遺伝子型決定システム、スキャナ3000 7G Whole-Genome Association System、GENETITAN（商標）装置、GeneChip（登録商標）アレイステーション、HTアレイ；自動ELISAシステム（例えばDynax, Chantilly, VA からのDSX（登録商標）もしくはDS2（登録商標）またはENEASYSTEM III（登録商標）、TRITURUS（登録商標）、THE MAGO（登録商標）Plus）；デンシトメータ（例えばX-Rite-508-Spectro Densitometer（登録商標）、The HYRYS（商標）2デンシトメータ）；自動蛍光インサイチューハイブリダイゼーションシステム（例えば米国特許第6,136,540号参照）；2D画像化ソフトウェアを備えた2Dゲル画像化システム；マイクロプレートリーダー；蛍光活性化セルソーター（FACS）（例えばFlow Cytometer FACSVantage SE, Becton Dickinson）；放射性同位体分析器（例えばシンチレーションカウンター）、またはこれらの組み合わせを含む質量分析システム。

【0206】

この局面および本発明のすべての他の局面の一部の態様では、様々なソフトウェアプログラムおよびフォーマットを使用して、バイオマーカータンパク質レベル情報を記憶装置に格納することができる。任意の数のデータプロセッサ構造化フォーマット（例えばテキストファイルまたはデータベース）を用いて、配列情報または発現レベル情報をその上に記録した媒体を得るまたは作成することができる。

【0207】

決定モジュールにおいて決定されたROBO2発現情報またはROBO2発現に関連する情報は、

10

20

30

40

50

記憶装置によって読み取られ得る。本明細書で使用する場合、「記憶装置」は、データまたは情報を格納するように構成されたまたは適合された任意の適切なコンピュータ装置または処理装置または他のデバイスを含むことが意図されている。本発明と共に使用するのに適した電子装置の例は、独立型コンピュータ装置、ローカルエリアネットワーク（LAN）、ワイドエリアネットワーク（WAN）、クラウドストレージシステム、インターネット、イントラネット、およびエクストラネットを含むデータ通信ネットワーク、ならびにローカルおよび分散型コンピュータ処理システムを含む。記憶装置はまた、フロッピーディスク、ハードディスク記憶媒体、磁気テープなどの磁気記憶媒体、CD-ROM、DVDなどの光学記憶媒体、RAM、ROM、EPROM、EEPROM等のような電子記憶媒体、クラウドストレージシステム、汎用ハードディスク、および磁気/光学記憶媒体などのこれらのカテゴリーの混成物を含むが、これらに限定されるわけではない。記憶装置は、配列情報または発現レベル情報がその上に記録されるように適合または構成される。このような情報は、例えばインターネットによって、クラウドシステムによって、ディスク上で、USB（ユニバーサルシリアルバス）によって、または任意の他の適切な通信方式によって電子的に送信し、読み取ることができるデジタル形態で提供され得る。

10

20

30

40

50

【0208】

本明細書で使用する場合、「発現レベル情報」は、完全長ヌクレオチドおよび/もしくはアミノ酸配列、部分的ヌクレオチドおよび/もしくはアミノ酸配列、または突然変異配列を含むがこれらに限定されるわけではない、任意のヌクレオチドおよび/またはアミノ酸発現レベル情報を指す。さらに、発現レベル情報「に関連する」情報は、配列の存在または非存在（例えばアミノ酸配列、ヌクレオチド配列または翻訳後修飾の存在または非存在）の検出、試料中の配列の濃度（例えばアミノ酸配列レベル、またはヌクレオチド（RNAもしくはDNA）発現レベル、または翻訳後修飾のレベル）の決定等を含む。

【0209】

本明細書で使用する場合、「格納される」とは、記憶装置上に情報をコードするための工程を指す。当業者は、配列情報または発現レベル情報を含む製造物を生成するために公知の媒体上で情報を記録するための現在公知の方法のいずれかを容易に採用することができる。

【0210】

様々なソフトウェアプログラムおよびフォーマットを使用して、配列情報または発現レベル情報を記憶装置に格納することができる。任意の数のデータプロセッサ構造化フォーマット（例えばテキストファイルまたはデータベース）を用いて、配列情報または発現レベル情報をその上に記録した媒体を入手するまたは作成することができる。

【0211】

配列情報または発現レベル情報をコンピュータ可読形態で提供することにより、比較モジュールにおいて可読形態の配列情報または発現レベル情報を使用して、特定の配列または発現プロファイルを記憶装置内の参照データと比較することができる。例えば、検索プログラムを使用して、特定の配列（参照データ、例えば対照試料から得た配列情報）とマッチする配列のフラグメントもしくは領域を同定することができ、または決定された発現レベルを参照データの発現レベル（例えば対照試料から得た発現レベル情報）と直接比較することができる。コンピュータ可読形態で行われた比較は、様々な手段によって処理することができるコンピュータ可読な比較結果を提供する。比較結果に基づくコンテンツを比較モジュールから引き出し、慢性腎疾患またはタンパク尿症などの特定の疾患または障害を示すことができる。

【0212】

一部の態様では、比較モジュールによって読み取られる記憶装置に格納された参照データは、試験する生物学的試料と同じタイプの対照生物学的試料から得たROB02配列または発現情報データである。あるいは、参照データは、データベース、例えば生物の全ゲノム配列の一部、またはタンパク質ファミリーの配列、または発現レベルプロファイル（RNA、タンパク質もしくはペプチド）である。一部の態様では、参照データは、慢性腎疾患ま

たはタンパク尿症などの特定の疾患または障害を示す配列情報または発現レベルプロファイルである。

【0213】

一部の態様では、参照データは、ゲノム、EST、SNPS、Traces、Celara、Ventor Reads、Watson reads、HGTS等のようなGenBank (NCBI) のタンパク質およびDNAデータベース; ENZYME、PROSITE、SWISS-2DPAGE、Swiss-ProtおよびTrEMBLデータベースなどのSwiss Institute of Bioinformaticsデータベース; MelanieソフトウェアパッケージまたはExPASy WWWサーバー等; SWISS-MODEL、Swiss-Shopおよび他のネットワークに基づくコンピュータツール; Comprehensive Microbial Resourceデータベース (The Institute of Genomic Researchより入手可能) を含むが、これらに限定されるわけではないデータベースから電子的またはデジタル的に記録され、注釈される。生じた情報は、ゲノム内およびゲノム間で参照データまたは遺伝子またはタンパク質間の相同性を決定するために使用し得る、リレーショナルデータベースに格納することができる。

【0214】

ROBO2のレベルを可読形態で比較モジュールに提供することにより、記憶装置内のROBO2の参照閾値レベルと比較するために使用することができる。コンピュータ可読形態で行われた比較は、様々な手段によって処理することができるコンピュータ可読なコンテンツを提供する。

【0215】

「比較モジュール」は、決定モジュールにおいて決定されたROBO2配列または発現レベル情報を参照ROBO2配列または発現レベルデータと比較するように機能する、比較のための種々の利用可能なソフトウェアプログラムおよびフォーマットを用いることができる。一部の態様では、比較モジュールは、一つまたは複数の入力からのROBO2配列または発現レベルデータを一つまたは複数の参照データパターンと比較するためにパターン認識技術を用いるように構成される。比較モジュールは、パターンを比較するために既存の市販されているまたは無料で利用できるソフトウェアを用いて構成することができ、実施される特定のデータ比較用に最適化することができる。比較モジュールは、例えば配列の存在または非存在の検出 (例えば突然変異または欠失 (タンパク質もしくはDNA) の検出、異なる対立遺伝子に関する情報、翻訳後修飾または配列の欠落もしくは反復の検出)、試料中の配列の濃度 (例えばアミノ酸配列/タンパク質発現レベル、またはヌクレオチド (RNAもしくはDNA) 発現レベル、または翻訳後修飾のレベル) の決定、または発現プロファイルの決定を含み得る、配列情報に関連するコンピュータ可読情報を提供する。

【0216】

一部の態様では、比較モジュールは、決定モジュールの出力データからのROBO2のレベルと各々のROBO2についての参照閾値レベルデータとの比較を可能にする。

【0217】

一部の態様では、比較モジュールは、質量分析スペクトルとの比較を実施し、例えば、ペプチドフラグメント配列情報の比較は、「Qcalign」 (例えば、参照により本明細書に組み入れられる、国際公開公報第2007/022248号参照) および「Qpeaks」 (Spectrum Square Associates, Ithaca, NY) と称されるスクリプト、またはCIPHERGEN Peaks 2.1 (商標) ソフトウェアを用いてMATLABにおいて処理されるスペクトルを使用して実施することができる。処理されたスペクトルを、次に、基本補正データを取ることににより最小エントロピーアルゴリズムを使用して試料データを対照データに整列させる、整列アルゴリズムを用いて整列させることができる (例えば、参照により本明細書に組み入れられる、WIPO公開第WO2007/022248号参照)。比較結果は、比率を計算することによってさらに処理することができる。タンパク質発現プロファイルを識別することができる。

【0218】

CIPHERGEN Express (CE) and Biomarker Patterns Software (BPS) パッケージ、CIPHERGEN Biosystems, Inc., CA, USAを含むがこれに限定されるわけではない、任意の利用可能な比較ソフトウェアが使用できる。比較分析は、プロテインチップシステムソフトウェ

ア（例えばBio-Rad Laboratories用のProteinchip）を用いて行うことができる。

【0219】

比較モジュール、または本明細書で述べる任意の他のモジュールは、その上でリレーショナルデータベース管理システム、ワールドワイドウェブアプリケーション、およびワールドワイドウェブサーバーを運用するオペレーティングシステム（例えばUNIX）を含み得る。ワールドワイドウェブアプリケーションは、データベース言語ステートメント（例えば構造化照会言語（SQL）ステートメント）の作製に必要な実行可能コードを含む。一般に、実行可能コードは埋め込みSQLステートメントを含む。加えて、ワールドワイドウェブアプリケーションは、ポインタならびにサーバーおよびユーザーリクエストに応えるためにアクセスしなければならない様々な外部および内部データベースを含む種々のソフトウェア実体へのアドレスを含有する構成ファイルを含み得る。構成ファイルはまた、サーバーリソースに関するリクエストを適切なハードウェアに送信し--これは、サーバーが2またはそれ以上の別々のコンピュータに分散されている場合に必要となり得る。一部の態様では、ワールドワイドウェブサーバーは、TCP/IPプロトコルをサポートする。このようなローカルネットワークは、時として「イントラネット」と称される。このようなイントラネットの利点は、ワールドワイドウェブ上に存在するパブリックドメインデータベース（例えばGenBankまたはSwiss Proのワールドワイドウェブサイト）との通信が容易になることである。したがって、一部の好ましい態様では、ユーザーは、ウェブブラウザおよびウェブサーバーによって提供されるHTMLインターフェースを使用して、インターネットデータベース上に存在するデータに直接アクセスすることができる（例えばHypertextリンクを通じて）。 10 20

【0220】

一部の態様では、比較モジュールは遺伝子発現プロファイルと比較する。例えば、遺伝子発現プロファイルの検出は、Affymetrix Microarray Suiteソフトウェアバージョン5.0（MAS 5.0）（Affymetrix, Santa Clara, Californiaより入手可能）を使用して決定し、プローブセットからのシグナルの強度に基づいて、遺伝子の相対的存在率を分析することができ、MAS 5.0データファイルをデータベースに転送して、Microsoft ExcelおよびGene Spring 6.0ソフトウェア（Agilent Technologies, Santa Clara, Californiaより入手可能）を用いて分析することができる。MAS 5.0ソフトウェアの検出アルゴリズムを使用して、所与の試料中でいくつかの転写産物が検出されるかについての包括的概観を得ることができ、2またはそれ以上のマイクロアレイデータセットの比較分析が可能になる。 30

【0221】

一部の態様では、比較モジュールはタンパク質発現プロファイルと比較する。Ciphergen Express（CE） and Biomarker Patterns Software（BPS）パッケージ（Ciphergen Biosystems, Inc., Freemont, Californiaより入手可能）を含むがこれに限定されるわけではない、任意の使用可能な比較ソフトウェアを用いることができる。比較分析は、プロテインチップシステムソフトウェア（例えばThe Proteinchip Suite（Bio-Rad Laboratories, Hercules, Californiaより入手可能）を用いて行うことができる。発現プロファイルを同定するためのアルゴリズムは、平均分散アルゴリズム（例えばJMP Software Cary, North Carolinaより入手可能なJMP Genomicsアルゴリズム）などの最適化アルゴリズムの使用を含み得る。 40

【0222】

比較モジュールは、表示モジュールを使用してユーザーのリクエストに応じて保存および出力され得る、一部は比較結果に基づくコンテンツを提供するように、既定の基準またはユーザーによって定義される基準によってコンピュータ可読形態で処理され得るコンピュータ可読な比較結果を提供する。表示モジュールは、一部は比較結果に基づくコンテンツをユーザーに対して表示することを可能にし、この場合のコンテンツは、慢性腎疾患またはタンパク尿症を示すシグナルである。このようなシグナルは、例えば、コンピュータモニター上の慢性腎疾患もしくはタンパク尿症の存在もしくは非存在を示すコンテンツの表示、プリンタからの慢性腎疾患もしくはタンパク尿症の存在もしくは非存在を示すコン 50

テンツの印刷されたページ、または慢性腎疾患もしくはタンパク尿症の存在もしくは非存在を示す光または音であり得る。

【0223】

比較結果に基づくコンテンツは、一つもしくは複数のタンパク質の発現プロファイル、または一つもしくは複数の遺伝子の発現プロファイルを含み得る。一部の態様では、比較結果に基づくコンテンツは、単にROBO2タンパク質レベルに基づく慢性腎疾患またはタンパク尿症の存在または非存在を示すシグナルである。

【0224】

一部の態様では、比較結果に基づくコンテンツはコンピュータモニター上に表示される。本発明の一つの態様では、比較結果に基づくコンテンツは印刷可能な媒体を通して表示される。本発明の一つの態様では、比較結果に基づくコンテンツはインジケータライトまたはサウンドとして表示される。表示モジュールは、コンピュータ可読情報をコンピュータから受け取り、ユーザーに表示するように構成された任意の適切なデバイスであり得る。非限定的な例は、例えばIntel PENTIUM型プロセッサ、Appleコンピュータおよびタブレットデバイス、Motorola PowerPC、Sun UltraSPARC、Hewlett-Packard PA-RISCプロセッサ、Advanced Micro Devices (AMD) of Sunnyvale, Californiaから入手可能な種々のプロセッサのいずれか、または他の任意のタイプのプロセッサに基づくコンピュータなどの汎用コンピュータ、タブレットデバイス、スマートフォンモバイルデバイス、フラットパネルディスプレイ、陰極線管等のような視覚的表示デバイス、ならびに様々なタイプのコンピュータプリンタを含む。

10

20

【0225】

一部の態様では、ワールドワイドウェブブラウザは、比較結果に基づくコンテンツの表示のためのユーザーインターフェースを提供するために使用される。本発明の他のモジュールは、ウェブブラウザインターフェースを有するよう適合され得ることが理解されるべきである。ウェブブラウザを通して、ユーザーは、比較モジュールからデータを引き出すリクエストを作成し得る。したがって、ユーザーは、典型的にはユーザーインターフェース要素、例えばボタン、プルダウンメニュー、スクロールバーおよびグラフィカルユーザーインターフェースにおいて従来から使用されている同様の要素にポインタを合わせ、クリックする。ユーザーのウェブブラウザでこのようにして作成されたリクエストは、これらをフォーマットするウェブアプリケーションに送信され、配列情報に関連する適切な情報、例えば突然変異または欠失（DNAもしくはタンパク質）の存在または非存在のしるしの表示；アミノ酸配列（タンパク質）の発現レベルの表示；ヌクレオチド（RNAもしくはDNA）発現レベルの表示；発現、SNP、もしくは突然変異プロファイル、もしくはハプロタイプの表示、またはこれらに基づく情報の表示を引き出すために使用できるクエリを作成する。一つの態様では、参照試料データの配列情報も表示される。

30

【0226】

一部の態様では、表示モジュールは、比較結果および比較結果が疾患を示すかどうか、例えばROBO2の発現プロファイルが慢性腎疾患またはタンパク尿症を示すかどうかを表示する。

40

【0227】

一部の態様では、表示される比較結果に基づくコンテンツは、慢性腎疾患またはタンパク尿症の存在または非存在を示すシグナル（例えば陽性または陰性シグナル）であり、したがって陽性または陰性のしるしのみが表示され得る。

【0228】

したがって、発現プロファイルまたは配列情報に基づき、個体が慢性腎疾患もしくはタンパク尿症を有するかどうかまたは個体が慢性腎疾患もしくはタンパク尿症の素因を有するかどうかを判定するためのアッセイ法および方法を実施するためのシステム（およびコンピュータシステムを生じさせるためのコンピュータ可読媒体）が本明細書で提供される。

【0229】

50

システムおよびコンピュータ可読媒体は、単に、発現プロファイルまたは配列情報に基づき、個体が特定の疾患もしくは障害を有するかどうかまたは個体が特定の疾患もしくは障害の素因を有するかどうかを判定するアッセイ法および方法を実施するための本発明の例示的態様であり、本発明の範囲を限定することを意図されない。システムおよびコンピュータ可読媒体の変形は、可能であり、本発明の範囲内に含まれることが意図されている。

【0230】

システムのモジュールまたはコンピュータ可読媒体において使用されるモジュールは、数多くの機器構成をとることができる。例えば、機能は、単一の機械上で提供され得るかまたは複数の機械に分散され得る。

10

【0231】

Robo2はマウスポドサイトの基底細胞表面に局在するポドサイトタンパク質である

腎発生の間、Robo2 mRNAは、分岐中の尿管芽を取り囲む後腎間葉においておよびその後、始原ポドサイトの位置であるS字体の近位端 (Piper et al., 2000) において発現される。Robo2が、初期腎誘導におけるその役割に加えて、ポドサイトの成熟にも関与するかどうかを調べるために、本発明者らはインサイチューハイブリダイゼーションを実施し、Robo2 mRNAが胎生16.5日 (E16.5) のマウス胚の発生中の糸球体の毛細血管係蹄段階で発現されることを見出した (図5Aおよび 5B)。Robo2タンパク質は、およそE14.5で発生中の糸球体において免疫蛍光染色によって検出可能になり、E16.5にピーク発現に達した (図5C~5E)。発生の間E17.5以降は発現が低下したが (図5F)、特異的Robo2発現は出生後の糸球体において維持され、5週齢の成体マウスにおいて検出可能であった (図5G、5H、5L~5M)。

20

【0232】

発生中の糸球体におけるRobo2の細胞局在を決定するために、本発明者らは、糸球体細胞型特異的マーカーを用いた二重標識免疫組織化学を実施した。本発明者らは、Robo2タンパク質が、2つのポドサイトスリット膜関連タンパク質、ネフリン (図1A~1C) およびポドシン (図1D~1F) と共局在することを認めた。Robo2はまた、ネフリン相互作用性アダプタータンパク質Nck (図1G、1I) およびポドサイト核の成分であるWT1 (図5H~5K) と糸球体において共発現された。基底膜マーカーであるナイドジェン (図1J~1Lおよび1P) および内皮細胞マーカー (図1M~1O、5M) であるPecam1に対する抗体による二重標識化は、Robo2が糸球体基底膜の外表面に隣接して局在し、内皮細胞には存在しないことを示した。高分解能共焦点顕微鏡法は、細胞下Robo2がポドサイトの基底表面で最も豊富であることをさらに明らかにした (図1Q)。細胞質ドメインに対する抗体を用いた生後マウス腎の免疫金電子顕微鏡法は、Robo2がスリット膜の細胞質面に近いポドサイト足突起に局在することを確認した (図1R)。これらの結果は、Robo2がポドサイトタンパク質であることを明らかにし、足突起におけるその基底細胞下局在は、Robo2がポドサイト足突起構造を調節するうえで役割を果たすことを示す。

30

【0233】

Robo2細胞内ドメインはアダプタータンパク質NckのSH3ドメインと直接相互作用する

ネフリン細胞外ドメインの係合は、Srcキナーゼによるその細胞内ドメインのチロシンリン酸化およびアダプタータンパク質NckのSH2ドメインの動員を導き、これが次にアクチン重合を誘導する (Jones et al., 2006; Verma et al., 2006)。NckはC末端に一つのSH2ドメインを担持し、N末端の近くに3つのSH3ドメインを担持する。アクチン重合はNckのSH3ドメインによって媒介され (Rivera et al., 2004)、これは、N-WASPおよびPakを含む様々な細胞骨格調節因子を動員することができる (Jones et al., 2006)。以前の試験は、ショウジョウバエ (*Drosophila*) NckホモログDreadlock (Dock) のSH3ドメインもRoboの細胞内ドメインと直接相互作用して、アクチン重合を阻害することを示した (Fan et al., 2003; Yang and Bashaw, 2006)。

40

【0234】

本発明者らは、哺乳動物NckもポドサイトにおいてRobo2と直接相互作用し、F-アクチン

50

細胞骨格を調節することができるかどうかを試験した。この問いに答えるために、本発明者らは酵母ツーハイブリッドアッセイ法を使用して、Robo2がNckと相互作用するかどうかを検討した。2つの哺乳動物Nck（すなわちNck1、Nck2）は腎発生において類似の構造および機能を共有するので（Jones et al., 2006）、本発明者らはこの試験においてNck1を使用し、Robo2の細胞内ドメインがNck1と直接相互作用することを認めた（図2A～2C）。Nck1に対するRobo2中の結合部位のマッピングは、4つのプロリンリッチモチーフを含む、アミノ酸1085から1301の配列が相互作用のために極めて重要であることを示した（図2Aおよび2C）。このプロリンリッチ領域の欠如はNck1との相互作用を妨げた（図2A）。Robo2についてのNck1中の結合部位のマッピングは、最初の2つのSH3ドメインのいずれかまたは両方の欠失が相互作用を無効にしたため、これらのドメインがRobo2との相互作用に必要であることを示した（図2B）。したがってRobo2とNck1の相互作用は、2つの十分に特性づけられたタンパク質ドメイン、SH3ドメインとプロリンリッチモチーフによって媒介された（図2C）。もう一つのポドサイトアダプタータンパク質であるCD2APも、そのN末端に3つのSH3ドメインを担持する（Shih et al., 2001）が、本発明者らは、酵母ツーハイブリッドアッセイ法または共沈アッセイ法のいずれにおいてもCD2APとRobo2の間でいかなる相互作用も検出しなかった。これらの所見は、ポドサイトにおけるRobo2とNck1の間の結合が特異的相互作用であることを示す。

10

【0235】

完全長Robo2はNckを介してネフリンと複合体を形成する

本発明者らは、プルダウンアッセイ法および共沈アッセイ法によってRobo2とNckの間の相互作用を確認した。hisおよびmycタグヒト完全長Robo2（His-myc-Robo2）またはNck1結合ドメインの欠失を有するhisおよびmycタグヒトRobo2（His-myc-Robo2-ΔNBD）をHEK細胞において発現させた。トランスフェクトしたHEK細胞をSlit2馴化培地（Slit2を安定にトランスフェクトした細胞から調製した）で刺激して、Robo2を活性化し、Nck結合を増大させた（Fan et al., 2003）。Nckは、Ni-NTAビーズを用いてHEK細胞溶解物からHis-myc-Robo2と共にプルダウンしたが、His-myc-Robo2-ΔNBDとはプルダウンしなかった（図2D）。NckのSH2ドメインはネフリン細胞質ドメイン（NCD）のホスホチロシンと相互作用するので（Jones et al., 2006; Verma et al., 2006）、本発明者らは、共沈アッセイ法を用いてRobo2がNckを介してネフリンと複合体を形成するかどうかを検討した。原理証明を確立するために、本発明者らは、ネフリンのリン酸化を増大させるFynキナーゼを用いて（Verma et al., 2006）、HEK細胞においてRobo2およびネフリンを共発現させた。Ni-NTAビーズを用いたHEK細胞溶解物からのHis-myc-Robo2のプルダウンは、Fynが発現されたときNckとネフリンを共沈させた（図2E）。逆の順序で、His-myc-ネフリンのプルダウンは、Fynキナーゼが発現されたときNckとRobo2を共沈させた（図2F）。さらに、抗Nck抗体で調製した沈殿物は、Fynが過剰発現されたときRobo2とネフリンの両方を含んだ（図6A）。これらのデータは、ネフリン、NckおよびRobo2がインビトロで複合体を形成することを示す。これらの所見をインビボで実証するために、本発明者らは、Robo2を新生児マウス腎溶解物から免疫沈降させ、Nckとネフリンが共沈することを認めた（図2G）。逆に、抗ネフリン抗体で調製した沈殿物もNckとRobo2を含んだ（図2H）。ネフリンはポドサイトで独自に発現され、およびNckとRobo2も腎においてこれらの細胞に局在するので、これらの結果は、ネフリン、NckおよびRobo2がポドサイトで複合体を形成することができることを示す。

20

30

40

【0236】

Robo2-Nck-ネフリンタンパク質複合体の形成におけるSlit2の役割を決定するために、His-myc-Robo2、ネフリンおよびFynを、共沈の前にSlit2馴化培地またはSlit2を含まない対照馴化培地で刺激したHEK細胞において共発現させた（図2I）。本発明者らは、Slit2刺激がNckへのRobo2結合およびネフリンとの複合体形成を増大させることを認めた。Nck1対Robo2およびネフリン対Robo2の両方の比率がSlit2刺激後に増大した（図2J）。この所見と一致して、本発明者らは、Slit2が新生児マウス系球体において強く発現されることを認めた（図6B、6C）。

【0237】

50

Slit2-Robo2シグナル伝達はネフリン誘導性アクチン重合を阻害する

SlitはRoboに結合してDockおよびsrGAPを動員し、アクチン重合を阻害する (Fan et al., 2003) ので、本発明者らは、アクチン重合を促進するネフリンとは逆の役割として、Robo2も哺乳動物細胞においてNckを動員し、アクチン重合を阻害するかどうかを試験したいと考えた。この疑問に対処するために、本発明者らは、以前に記述されているように (Jones et al., 2006; Verma et al., 2006) CD16/7-NCDキメラタンパク質を発現する細胞においてF-アクチン尾部を分析することにより、アクチン重合を検討した。このモデルは、ネフリン細胞質ドメイン (NCD) に融合したヒト免疫グロブリンFc受容体CD16およびCD7の細胞外および膜貫通ドメインを利用する。NCDをHAタグに置き換えたCD16/7-HAを陰性対照として使用した。これらのキメラタンパク質をHEK細胞においてRobo2と共発現させ、抗CD16抗体およびローダミンに結合した二次抗体で処理することによってクラスター化した。本発明者らは最初に、ネフリン細胞質ドメインのクラスター化がRobo2を動員できるかどうかを検討した。Robo2の大部分がCD16/7-NCDクラスターと共局在したので、CD16/7-NCDの係合はRobo2をクラスターに取り込むことを認めた (図6D~6F)。しかし、CD16/7-HA対照 (図6D') またはRobo2 Nck結合ドメイン (NBD) が欠失したRobo2-ΔNBD構築物 (図6E') とRobo2の共局在はいずれも認めなかった。興味深いことに、Slit2が存在しない場合、CD16/7-NCDとRobo2の共局在は有意に減少した (図6F')。これらのデータは、ネフリン細胞質ドメインがSlit2の存在下でRobo2細胞内ドメインと複合体化できることのさらなる証拠を提供し、Robo2-Nck-ネフリン複合体の形成がアクチン重合の形成に影響を及ぼすかどうかを確かめるためのモデルを実証する。

10

20

【0238】

CD16/7-NCDおよびRobo2を発現するHEK細胞を、抗CD16抗体によってクラスター化しながら、Slit2馴化培地またはSlit2を含まない対照馴化培地で刺激した。可視F-アクチン尾部を有するHEK細胞の数を定量することによってアクチン重合を評価した (Rivera et al., 2004)。本発明者らは、CD16/7-NCDクラスター化細胞の約80%が、以前に報告されているように (Jones et al., 2006; Verma et al., 2006) ファロイジン染色によって明らかにすることができるF-アクチン尾部を形成することを認めた。Slit2刺激後、しかし、F-アクチン尾部を有する細胞の数は約40%まで有意に減少した (図3Aおよび3C)。対照CD16/7-HAタンパク質をクラスター化した場合は、ごくわずかな細胞だけがより短いF-アクチン尾部を含むことが認められた (図3Bおよび3C)。アクチン重合のこの阻害がNckを必要とするかどうかをさらに調べるために、本発明者らは、Nck結合ドメインを欠いたRobo2 (Robo2-ΔNBD) を使用してこのアッセイ法を反復し、Robo2に対するNck結合のブロックがネフリン誘導性アクチン重合に対するSlit2-Robo2阻害を妨げるかどうかを確かめた。CD16/7-NCDをHEK細胞において完全長Robo2 (図7A) またはRobo2-ΔNBD (図7B) のいずれかと共発現させた。本発明者らは、Robo2におけるNck結合ドメインの欠失がネフリン誘導性アクチン重合に対するSlit2-Robo2阻害を有意に低下させることを認めた (図7C)。

30

【0239】

以前の試験は、ネフリンがF-アクチン細胞骨格に結合することを示した (Yuan et al., 2002)。Slit2-Robo2シグナル伝達がネフリンに結合したF-アクチンを阻害し得るかどうかを確かめるために、本発明者らは、CD16/7-NCDおよびCD16/7-HAを抗CD16抗体で免疫沈降させ、ウェスタンブロット法によって沈殿物中F-アクチンの量を検査した。本発明者らは、ネフリンと結合したF-アクチンの存在率がSlit2刺激後に有意に低減することを認めた (図3Dおよび3E)。逆に、インビボ免疫沈降アッセイ法は、Robo2新生児ヌルマウス腎からの抗ネフリン抗体によって免疫沈降するネフリンと結合したF-アクチンが、野生型またはRobo2ヘテロ接合マウス腎からのものと比較して有意に増大することを示した (図3Fおよび3G)。合わせて考慮すると、これらの結果は、Slit2-Robo2シグナル伝達がネフリン誘導性アクチン重合を阻害することを示す。

40

【0240】

マウスにおけるポドサイト中のRobo2の喪失は変化した足突起構造を生じさせる

本発明者らおよび他の著者らは以前に、混合遺伝的背景のほとんどすべてのRobo2ホモ

50

接合ヌルマウスが重篤なCAKUT表現型のために出生後間もなく死亡することを示した (Grieshammer et al., 2004; Lu et al., 2007; Wang et al., 2011)。Robo2^{del5}突然変異対立遺伝子を有するマウスを5世代にわたってC57BL/6遺伝的背景に交配した後、Robo2^{del5/+}ヘテロ接合親の交配は、3匹のRobo2^{del5/del5}ホモ接合ヌルマウスが3週間生存したことを明らかにした (離乳時に分析した合計160匹のマウスのうちで)。Robo2が発生の間のポドサイト足突起形成のために必要であるかどうかを確かめるために、本発明者らは、出生時および3週齢のRobo2ヌルマウスにおける系球体の超微細構造を検討した。ポドサイト体、足突起およびスリット膜は出生時に形成されたが、透過型電子顕微鏡法は、新生児Robo2^{del5/del5}ホモ接合ヌルマウスにおける巣状足突起消失を示した (図8A~8F)。走査型電子顕微鏡法により、本発明者らは、出生時および3週齢のRobo2^{del5/del5}ホモ接合ヌルマウスにおける不規則な相互嵌合足突起を認めた (図4A~4H)。これらの所見は、Robo2が腎発生の際の正常なポドサイト足突起パターン化のために必要であることを示す。

10

【0241】

成熟系球体の足突起構造の維持におけるRobo2の役割を検討するために、本発明者らは、条件的Robo2^{flox/flox}マウスを、ポドシン-Cre導入遺伝子を担持するRobo2^{del5/+};Tg^{Nphs2-Cre/+}ヘテロ接合マウスと交雑させることによってポドサイト特異的Robo2ノックアウトマウスを作製した。Robo2^{del5/flox};Tg^{Nphs2-Cre/+}遺伝子型を有する20匹のポドサイト特異的Robo2突然変異マウスおよび20匹の同腹子対照マウスを最大1年まで分析した。ポドサイト特異的Robo2ノックアウトマウスは生存可能であり、繁殖可能であった。しかし、これらのマウスは、1か月目に異常に幅の広いポドサイト足突起および巣状分節性足突起消失を呈した (図4I~4M)。6週齢で突然変異マウスは重大なミクロアルブミン尿を発現し、これはELISAおよびウェスタンブロット分析の両方によって検出された (図4Nおよび4O)。加えて、走査型電子顕微鏡法は、Robo2ポドサイト特異的ノックアウトマウスにおける足突起パターン化欠損を明らかにした。野生型における規則正しいジッパー様相互嵌合二次足突起の代わりに、Robo2ポドサイト特異的ノックアウトマウスは1か月目に不規則で組織崩壊した足突起相互嵌合パターン形成を示した (図8G~8J)。これらの欠陥は経時的により明らかになった。7か月齢で、明白に組織崩壊したより短い曲がりくねった足突起がRobo2ポドサイト特異的ノックアウトマウスにおいて認められ (図8K~8N)、3週齢のRobo2ヌルマウスの表現型に類似していた。Robo2ポドサイト特異的ノックアウトマウスは正常なポドサイト数を示したが、基質沈着は系球体において有意に増加していた (図8O~8T、表1および2)。これらの形態学的変化は、Robo2が系球体ポドサイト足突起構造を調節し、維持するうえで役割を果たすことを示す。

20

30

【0242】

Robo2の喪失はネフリンヌルマウスにおいてポドサイト構造欠陥を緩和する

ネフリンホモ接合マウスは、ボーマン腔の拡張、異常に幅の広い足突起、系球体スリット膜の欠如、および重篤なタンパク尿症を伴う特徴的な表現型を発現する (Done et al., 2008; Hamano et al., 2002)。Robo2はネフリンと複合体を形成し、Slit2-Robo2シグナル伝達はネフリン誘導性アクチン重合を阻害したので、本発明者らは、Robo2の喪失がネフリンヌルマウスにおいてポドサイト表現型を改変するのではないかと考えた。Robo2とネフリンの間の遺伝子相互作用の可能性というこの仮説を試験するために、本発明者らは、生殖細胞系Robo2^{-/-};Nphs1^{-/-}およびポドサイト特異的Robo2^{flox/flox};Tg^{Nphs2-Cre/+};Nphs1^{-/-}二重Robo2-ネフリンノックアウトマウスの両方を作製した。Nphs1^{-/-}単一ホモ接合体と同様に、Robo2^{-/-};Nphs1^{-/-} (4/4、100%) およびRobo2^{flox/flox};Tg^{Nphs2-Cre/+};Nphs1^{-/-} (3/3、100%) 二重ノックアウトマウスの両方が出生後10時間以内に死亡した。組織学的分析は、しかし、Robo2^{-/-};Nphs1^{-/-}二重ホモ接合マウスにおける系球体の形態が、拡張したボーマン腔を有するNphs1^{-/-}単一ネフリンホモ接合マウスにおける表現型と比較して比較的正常に見えることを明らかにした (図8U~8X)。拡張したボーマン腔を有する系球体の数が、Robo2^{-/-};Nphs1^{-/-}二重ホモ接合マウス (2/55、3.6%) ではネフリン単一ヌルマウス (31/122、25.4%) と比較して有意に少なかった (図8Yおよび表3)。加えて、走査型電子顕微鏡法による系球体超微細構造の分析は、相互嵌合ポドサイト足突起

40

50

構造が、Robo2^{-/-}単一ホモ接合体（図4Tおよび4U）および野生型対照（図4Vおよび4W）における100%と比較して、ネフリン単一ホモ接合マウス（図4Pおよび4Q）からの15の系球体のうち一つ（6.67%）においてしか認められないことを示した。意外にも、ポドサイト足突起の相互嵌合パターンは、Robo2^{-/-};Nphs1^{-/-}二重ホモ接合新生児マウス腎からの16の系球体のうち12（75%）において回復され（図4Rおよび4S、表4）、Robo2とネフリンの同時喪失がこれらのマウスにおけるポドサイト足突起構造表現型を緩和することを示した。これらの所見は、Robo2およびネフリンの発現のレベルが遺伝的に変化している場合、上述したRobo2-Nck-ネフリンの物理的相互作用がインビボでポドサイト足突起の形態に実質的な影響を及ぼすことを示す。

【0243】

ポドサイトは著しい度合いの可塑性を示す。発生の際に、ポドサイトは単純な立方上皮細胞から本発明者らが成熟ポドサイトとして認識する複雑な突起を有する細胞へと分化する（Reeves et al., 1978）。この可塑性は成熟後も保持される。これは、硫酸プロタミンによる実験的な表面電荷の中和後の可逆的な足突起消失とヘパリンによる回復として（Seiler et al., 1975）、および微小変化群を有する小児におけるタンパク尿症の再発と寛解の間に（Nachman et al., 2008）最も明瞭に認められる。足突起のより微妙な変化は、おそらく血行力学、ホルモンまたはパラクリン刺激の形態で正のシグナル伝達および負のシグナルに応答して生理的条件下で起こる。足突起におけるF-アクチンの存在率を考慮すると、理論に拘束されるまたは制限されることを望むものではないが、このような刺激が、F-アクチン細胞骨格に伝達された正のシグナル伝達および負のシグナルに応答して微妙な変化をもたらすと考えられる。多すぎる、不均衡な正のシグナルは、疾患表現型を導き得る。実際に、生理的なリガンドはまだ同定されていないが、ネフリンのクラスター化およびリン酸化が、Nckを動員することによってアクチン重合を誘導することは明らかであり、これは、ネフリンの細胞外ドメインに対する腎炎原性モノクローナル抗体によってラットにおいて誘発されるタンパク尿症（Topham et al., 1999）および腎移植後に抗ネフリン同種抗体を発現する先天性ネフローゼ症候群の症例（Patrakka et al., 2002）に関与し得る機構である。

【0244】

本明細書で述べる本発明者らの試験は、Robo2が、Slitによって結合された場合に、ネフリン誘導性アクチン重合を阻害する、ポドサイトアクチン重合のもう一つのレベルの負の調節を明らかにする。本発明者らは、理論に拘束されるまたは制限されることを望むものではないが、Slit2-Robo2シグナル伝達は以下のようにしてネフリン誘導性アクチン重合を阻害し、正常なポドサイト足突起構造を維持することができると提案する：生理的条件下で（例えば足突起発生の際）、ネフリンの係合は、細胞内Y191/1208/1232のリン酸化を導き、これにNck SH2ドメインが結合する（Jones et al., 2006; Verma et al., 2006）。Nckは、次に、そのSH3ドメインを介してN-WASPなどの細胞骨格調節因子を動員し、ポドサイト足突起伸長または伸展のためにアクチン重合を促進する（図8Z）。Slitの局所的な分泌と結合は、そのプロリンリッチ領域およびNckの最初の2つのSH3ドメインを介してNckとRobo2の相互作用を増大させる。Robo2によるNckの最初の2つのSH3ドメインの隔離は、ネフリン-Nck媒介性アクチン重合を阻害し、ネフリンと結合したF-アクチンを減少させて、動的で均衡のとれたF-アクチン細胞骨格および正常なポドサイト足突起構造を維持する（図8Z）。Nckを介したネフリン誘導性アクチン重合の直接阻害に加えて、Slit-Robo2シグナル伝達は、以前に報告されているように（Bashaw et al., 2000; Wong et al., 2001）F-アクチン細胞骨格を負に調節するEna、Abl、srGAPを動員することなどの他の経路を通してアクチン重合を不活性化することができる。Slit2-Robo2シグナル伝達が存在しない場合（例えばRobo2がロックアウトされている場合）、ネフリン誘導性重合に対するRobo2の阻害作用は失われる。NckのSH3ドメインは下流の細胞骨格調節因子と相互作用してアクチン重合を増大させることができ（図8Z）、これは、Robo2突然変異マウスにおいて同定される変化したポドサイト足突起構造を説明し得る。本明細書で述べる本発明者らの結果は、したがって、Slit-Roboシグナル伝達がF-アクチン細胞骨格を負に調節すること

10

20

30

40

50

によってポドサイトの可塑性を調節することができる機構を裏づけ、この機構は、軸索成長の円錐経路探索におけるSlit-Roboシグナル伝達の役割に類似する (Guan and Rao, 2003)。Robo2突然変異マウスの系球体における基質沈着の増大という病理学的所見は、おそらく二次的な応答である。

【0245】

Robo2がポドサイトの基底表面に局在し、その細胞内ドメインを介して他の確立された足突起スリット膜タンパク質と複合体を形成することは、本明細書で述べる本発明者らの試験から明らかであるが、これが実際にスリット膜自体の一部を形成するかどうかは不明のままである。興味深いことに、Robo2の細胞外ドメインは、8つの免疫グロブリン (Ig) 様モチーフと一つのフィブロネクチンドメインを有する、ネフリンのものに類似しており、Robo2は5つのIg様モチーフと3つのフィブロネクチンドメインを有する (図8Z) (Tryggvason et al., 2006)。本発明者らは、Robo2の細胞内ドメインとネフリンの細胞質ドメインの相互作用を酵母ツーハイブリッドアッセイ法において試験した。本発明者らの生化学的データ (図2Eおよび2F) も、インビトロでのこれら2つの受容体間の直接の相互作用を支持しなかった。しかし、Robo2の細胞外ドメインが、スリット膜におけるトランス相互作用を通して隣接する足突起の細胞膜上で、インビボでネフリンの細胞外ドメインと結合し得ることは可能である。

【0246】

本発明者らは、Robo2ホモ接合ヌルおよびポドサイト特異的ノックアウトマウスが、ネフリンヌルマウスのもとは異なる表現型である、変化した足突起相互嵌合パターンを表現することを認めた (Hamano et al., 2002; Done, 2008)。ネフリンとRobo2はポドサイトF-アクチン細胞骨格を調節するうえで反対の役割を果たすので、これは意外ではない。ネフリンシグナル伝達は局所的アクチン重合を誘導するが、Slit2-Robo2シグナル伝達はアクチン重合に対する負の調節因子として働き、ポドサイト足突起の可塑性と動態を維持する。同様の足突起組織化の欠陥が、ポドサイトにおけるF-アクチン細胞骨格のもう一つの負の調節因子である、アクチン脱重合因子コフィリン-1がノックアウトされているマウスにおいて認められることは注目に値する (Garg et al., 2010)。これは、ネフリンシグナル伝達などのアクチン重合促進因子またはRobo2シグナル伝達などの阻害因子のいずれかの欠如はポドサイトの正常な構造に影響を及ぼすであろうことを示す。したがって、ポドサイトにおける正と負のF-アクチン細胞骨格調節因子の間の均衡は、正常な足突起構造を維持するために重要である。正のシグナル (ネフリン) および負のシグナル (Robo2) の両方をノックアウトすることによるこの均衡の回復は、Robo2-ネフリン二重ノックアウトマウスにおけるポドサイト足突起相互嵌合の回復およびより穏やかな系球体表現型を説明することができる。本明細書で述べる本発明者らの試験は、一方では系球体の透過選択性を制御するスリット膜の必須成分として (Tryggvason et al., 2006) および他方ではアクチン細胞骨格との相互作用を介した足突起形態の調節因子として (Jones et al., 2006; Verma et al., 2006) のネフリンの二元的役割を明らかにする。Robo2シグナル伝達は明らかに、足突起に対するネフリンの正のシグナル伝達作用に対抗するが、スリット膜の完全性にも影響を及ぼすかどうかはまだ確かめられていないままである。

【0247】

したがって、本明細書で述べるように、本発明者らは、Robo2を腎におけるポドサイト細胞間接合部の新しい成分として同定した。本発明者らは、生化学的、機能的および遺伝的技術を用いてRobo2とネフリンの間の相互作用を明らかにし、Slit2-Robo2シグナル伝達がネフリン誘導性アクチン動態を阻害することを示した。本発明者らの結果は、Robo2シグナル伝達がポドサイト足突起構造を調節するためのネフリンに対する負の調節因子として働くことを示す。この試験は、Slit-Roboシグナル伝達の役割についての理解を広げ、誘導キュー受容体であるRoboがF-アクチン細胞骨格動態に影響を及ぼし得る新規クロストーク機構を同定する。

【0248】

本明細書で特に定義されない限り、本出願に関連して使用される学術および技術用語は

、本開示が属する分野の当業者によって一般的に理解される意味を有するものとする。本発明は、本明細書で述べる特定の方法論、プロトコルおよび試薬等に限定されず、それら自体変更され得ることが理解されるべきである。本明細書で使用する用語は、特定の態様を説明することだけを目的とし、本発明の範囲を限定することを意図しておらず、本発明の範囲は特許請求の範囲によってのみ定義される。免疫学および分子生物学における一般的な用語の定義は、The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 18th Edition, published by Merck Research Laboratories, 2006 (ISBN 0-911910-18-2); Robert S. Porter et al. (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, published by Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); および Robert A. Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, published by VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8); Immunology by Werner Luttmann, published by Elsevier, 2006に見出すことができる。分子生物学における一般的な用語の定義は、すべてその全体が参照により本明細書に組み入れられる、Benjamin Lewin, Genes IX, published by Jones & Bartlett Publishing, 2007 (ISBN-13: 9780763740634); Kendrew et al. (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, published by Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); および Robert A. Meyers (ed.), Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., USA (1982); Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2 ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., USA (1989); Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier Science Publishing, Inc., New York, USA (1986); または Methods in Enzymology: Guide to Molecular Cloning Techniques Vol.152, S. L. Berger and A. R. Kimmerl Eds., Academic Press Inc., San Diego, USA (1987); Current Protocols in Molecular Biology (CMB) (Fred M. Ausubel, et al. ed., John Wiley and Sons, Inc.), Current Protocols in Protein Science (CPPS) (John E. Coligan, et. al., ed., John Wiley and Sons, Inc.) および Current Protocols in Immunology (CPI) (John E. Coligan, et. al., ed. John Wiley and Sons, Inc.)に見出される。

【0249】

本明細書で使用する場合、「含むこと」という用語は、提示される定義された要素に加えて他の要素も存在し得ることを意味する。「含むこと」の使用は、限定ではなく包含を示す。

【0250】

本明細書で使用する場合、「本質的に～からなる」という用語は、所与の態様に必要とされる要素を指す。この用語は、本発明のその態様の基本的小および新規のまたは機能的な特徴に実質的に影響を及ぼさない付加的な要素の存在を許容する。

【0251】

「からなる」という用語は、本明細書で述べる組成物、方法、およびこれらのそれぞれの成分を指し、その態様の説明において列挙されないいかなる要素も除外する。

【0252】

さらに、文脈上特に必要でない限り、単数の用語は複数を包含し、複数の用語は単数を包含するものとする。本明細書および付属の特許請求の範囲で使用する場合、単数形態の「一つの(a)」、「一つの(an)」、および「その(the)」は、文脈上明らかに異なる指示が為されない限り、複数の言及を含む。したがって例えば、「その方法」への言及は、一つもしくは複数の方法、ならびに/または本明細書で述べるおよび/もしくは本開示の読了後に当業者に明らかになる種類の段階等を含む。

【0253】

操作実施例以外、または異なる指示がある場合以外は、本明細書で使用する成分の量または反応条件を表すすべての数値は、いずれの場合も「約」という用語によって修飾されていると理解されるべきである。パーセンテージに関連して使用する場合の「約」という用語は、 $\pm 1\%$ を意味し得る。

10

20

30

40

50

【0254】

本発明は、本明細書で述べる特定の方法論、プロトコルおよび試薬等に限定されず、それら自体変更され得ることが理解されるべきである。本明細書で使用する用語は、特定の態様を説明することだけを目的とし、本発明の範囲を限定することを意図しておらず、本発明の範囲は特許請求の範囲によってのみ定義される。

【0255】

特定されるすべての特許および他の公表文献は、例えば本発明に関連して使用され得るこのような公表文献において述べられている方法を説明し、開示することを目的として明確に参照により本明細書に組み入れられる。これらの公表文献は、単にこれらの開示が本出願の出願日以前であるために提供されるものである。これに関していかなる内容も、先行発明であるとの理由でまたは何らかの他の理由で本発明者らがそのような開示に先行する権利を有しないことの承認と解釈されるべきではない。これらの文献の内容に関する日付または表現についてのすべての言明は、本願の出願人らに入手可能な情報に基づいており、これらの文献の日付または内容の正確さに関する承認をなすものではない。

10

【0256】

本明細書に記載の様々な局面の態様を、以下の番号の付いた項目によって説明する。

2. 慢性腎疾患を有するまたは慢性腎疾患のリスクがある対象に、ROBO2阻害剤を含む組成物の治療的有効量を投与する段階を含む、その必要がある対象における慢性腎疾患の処置のための方法。

3. タンパク尿症を有するまたはタンパク尿症のリスクがある対象に、ROBO2阻害剤を含む組成物の治療的有効量を投与する段階を含む、その必要がある対象におけるタンパク尿症の軽減のための方法。

20

4. ROBO2阻害剤が、ROBO2に特異的な阻止抗体またはその抗原結合フラグメント、ROBO2に特異的なアンチセンス分子、ROBO2に特異的な短鎖干渉RNA (siRNA)、ROBO2の低分子阻害剤、ROBO2阻害性ポリペプチド、またはROBO2構造類似体である、項目1または2のいずれか一項目に記載の方法。

5. ROBO2阻害剤が、SLIT、Nck、またはその両方に対するROBO2の結合をブロックするかまたは低減する、項目1~3のいずれか一項目に記載の方法。

6. ROBO2阻害剤が、Ig1 SLIT結合ドメイン、Ig1およびIg2 SLIT結合ドメイン、Nck細胞内結合ドメイン、またはこれらの任意の組み合わせに特異的である、項目1~4のいずれか一項目に記載の方法。

30

7. ROBO2阻害性ポリペプチドが、ドミナントネガティブROBO2融合タンパク質、細胞内ドメインを欠いたROBO2細胞外ドメインを含むポリペプチド、または細胞外ドメインを欠いたROBO2細胞内ドメインを含むポリペプチドである、項目3に記載の方法。

8. 慢性腎疾患を有するまたは慢性腎疾患のリスクがある対象が、糖尿病性腎症または高血圧症を有する、項目1~6のいずれか一項目に記載の方法。

9. 対象に付加的な治療剤を投与する段階をさらに含む、項目1~7のいずれか一項目に記載の方法。

10. 付加的な治療剤が、アンギオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害剤またはアンギオテンシンII受容体遮断剤 (ARB) である、項目8に記載の方法。

40

11. a. ROBO2ポリペプチドの発現レベルまたはROBO2ポリペプチドをコードするRNAの発現レベルを決定するために、対象に由来する生物学的試験試料をアッセイする段階、

b. 生物学的試験試料中のROBO2ポリペプチドの発現レベルまたはROBO2ポリペプチドをコードするRNAの発現レベルが、参照閾値レベルを上回るかどうかを判定する段階、および

c. 対象を、慢性腎疾患の処置または療法の必要があると診断する段階を含む方法。

12. ROBO2ポリペプチドの発現レベルをアッセイする段階が、ROBO2ポリペプチドに特異的な抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて実施される、項目10に記載の方法。

13. ROBO2ポリペプチドをコードするRNAの発現レベルをアッセイする段階が、PCRまた

50

はハイブリダイゼーションアッセイ法を用いて実施される、項目10に記載の方法。

14. 生物学的試験試料が、腎生検試料、尿試料、血液試料、血清試料、またはペレット化された尿試料由来の細胞である、項目10～12のいずれか一項目に記載の方法。

15. ROBO2ポリペプチドの発現レベルまたはROBO2ポリペプチドをコードするRNAの発現レベルが、参照閾値レベルを少なくとも20%上回る、項目10～13のいずれか一項目に記載の方法。

16. ROBO2ポリペプチドの発現レベルまたはROBO2ポリペプチドをコードするRNAの発現レベルが、参照閾値レベルを少なくとも2標準偏差上回る、項目10～13のいずれか一項目に記載の方法。

17. a. 対象から単離された生物学的試験試料を、ROBO2ポリペプチドを検出する試薬またはROBO2ポリペプチドをコードするRNAを検出する試薬と接触させる段階、および

b. ROBO2ポリペプチドのレベルまたはROBO2ポリペプチドをコードするRNAのレベルを測定する段階

を含むアッセイ法であって、

c. ここで、正常生物学的試料と比較して上昇した、ROBO2ポリペプチドのレベルまたはROBO2ポリペプチドをコードするRNAのレベルによって、慢性腎疾患を有するおよび/もしくは慢性腎疾患の進行を有するまたはタンパク尿症を有する対象が同定される、前記アッセイ法。

18. ROBO2ポリペプチドの発現レベルを検出する段階が、ROBO2ポリペプチドに特異的な抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて実施される、項目16に記載のアッセイ法。

19. ROBO2ポリペプチドをコードするRNAの発現レベルを検出する段階が、PCRまたはハイブリダイゼーションアッセイ法を用いて実施される、項目16に記載のアッセイ法。

20. 生物学的試験試料が、腎生検試料、尿試料、血液試料、血清試料、またはペレット化された尿試料由来の細胞である、項目16～18のいずれか一項目に記載のアッセイ法。

21. ROBO2ポリペプチドの発現レベルまたはROBO2ポリペプチドをコードするRNAの発現レベルが、参照閾値レベルを少なくとも20%上回る、項目16～19のいずれか一項目に記載のアッセイ法。

22. ROBO2ポリペプチドの発現レベルまたはROBO2ポリペプチドをコードするRNAの発現レベルが、参照閾値レベルを少なくとも2標準偏差上回る、項目16～19のいずれか一項目に記載のアッセイ法。

23. 対象が、糖尿病または高血圧症と診断されている、項目16～21のいずれか一項目に記載のアッセイ法。

24. 対象に慢性腎疾患もしくはタンパク尿症のリスクがあるかどうか、または対象が慢性腎疾患を有するかどうかを判定するためのシステムであって、

a. 対象から得られた生物学的試料中のROBO2ポリペプチドの発現レベルまたはROBO2ポリペプチドをコードするRNAの発現レベルを決定するように構成された測定モジュール、

b. 前記測定モジュールによって決定されたROBO2ポリペプチドの発現レベルまたはROBO2ポリペプチドをコードするRNAの発現レベルを受け取って、ROBO2ポリペプチドの該発現レベルまたはROBO2ポリペプチドをコードするRNAの該発現レベルが所定の参照レベルまたは比率よりも高いかどうかを判定すべく少なくとも一つの分析を実施し、かつ引き出されたコンテンツを提供するように構成された比較モジュール、および

c. 前記比較モジュールからのデータ出力に基づくコンテンツを表示するための表示モジュールであって、該コンテンツが、ROBO2ポリペプチドもしくはRNAの前記発現レベルもしくは比率が所定の参照レベルもしくは比率よりも高いことを示すシグナルを含むか、またはROBO2の前記レベルもしくは発現比率が参照レベル以下もしくは所定の比率以下であることを示すシグナルを含む、該表示モジュールを含む前記システム。

25. 表示モジュールに表示されるコンテンツが、対象に特定の処置レジメンを受けるよう勧めることを示すシグナルをさらに含む、項目23に記載のシステム。

10

20

30

40

50

26. 対象に慢性腎疾患もしくはタンパク尿症のリスクがあるかどうか、または対象が慢性腎疾患を有するかどうかを判定するためのシステムであって、

a. 対象から得られた少なくとも一つの試験試料を受け取って、該少なくとも一つの試験試料において、

i. ROBO2の発現比率が所定の比率よりも高い状態、または

ii. ROBO2の発現レベルが所定のレベルよりも高い状態

のいずれかの存在または非存在を決定すべく少なくとも一つの分析を実施するように構成された決定モジュール、

b. 前記決定モジュールからのデータ出力を格納するように構成された記憶装置、および

c. 前記決定モジュールからのデータ出力に基づくコンテンツを表示するための表示モジュールであって、該コンテンツが、ROBO2の前記発現比率が所定の比率よりも高いもしくはROBO2の前記レベルが所定のレベルよりも高いことを示すシグナルを含むか、またはROBO2の前記発現比率が所定の比率以下であるもしくは所定のレベル以下であることを示すシグナルを含む、該表示モジュールを含む前記システム。

27. 表示モジュールに表示されるコンテンツが、対象に特定の処置レジメンを受けるよう勧めることを示すシグナルをさらに含む、項目25に記載のシステム。

28. 慢性腎疾患またはタンパク尿症のリスクがあるヒト対象を処置するための方法であって、参照閾値レベルを上回るROBO2タンパク質のレベルを有すると判定されたヒト対象に、慢性腎疾患またはタンパク尿症の発症を予防するための処置または療法を施す段階を含む方法。

29. ROBO2タンパク質のレベルが、参照レベルを少なくとも20%上回る、項目27に記載の方法。

30. ROBO2タンパク質のレベルが、参照レベルを少なくとも2標準偏差上回る、項目27に記載の方法。

31. 慢性腎疾患またはタンパク尿症の発症を予防するための処置または療法が、ROBO2阻害剤を含む、項目27～29のいずれか一項目に記載の方法。

32. ROBO2阻害剤が、ROBO2に特異的な阻止抗体またはその抗原結合フラグメント、ROBO2に特異的なアンチセンス分子、ROBO2に特異的な短鎖干渉RNA (siRNA)、ROBO2の低分子阻害剤、ROBO2阻害性ポリペプチド、またはROBO2構造類似体である、項目30に記載の方法。

33. ROBO2阻害剤が、SLIT、Nck、またはその両方に対するROBO2の結合をブロックするかまたは低減する、項目30～31のいずれか一項目に記載の方法。

34. ROBO2阻害剤が、Ig1 SLIT結合ドメイン、Ig1およびIg2 SLIT結合ドメイン、Nck細胞内結合ドメイン、またはこれらの任意の組み合わせに特異的である、項目30～32のいずれか一項目に記載の方法。

35. ROBO2阻害性ポリペプチドが、ドミナントネガティブROBO2融合タンパク質、細胞内ドメインを欠いたROBO2細胞外ドメインを含むポリペプチド、または細胞外ドメインを欠いたROBO2細胞内ドメインを含むポリペプチドである、項目31に記載の方法。

36. 慢性腎疾患の処置における使用のためのROBO2阻害剤。

37. タンパク尿症の処置における使用のためのROBO2阻害剤。

38. ROBO2阻害剤が、ROBO2に特異的な阻止抗体またはその抗原結合フラグメント、ROBO2に特異的なアンチセンス分子、ROBO2に特異的な短鎖干渉RNA (siRNA)、ROBO2の低分子阻害剤、ROBO2阻害性ポリペプチド、またはROBO2構造類似体である、項目35または36のいずれか一項目に記載の使用。

39. ROBO2阻害剤が、SLIT、Nck、またはその両方に対するROBO2の結合をブロックするかまたは低減する、項目35～37のいずれか一項目に記載の使用。

40. ROBO2阻害剤が、Ig1 SLIT結合ドメイン、Ig1およびIg2 SLIT結合ドメイン、Nck細胞内結合ドメイン、またはこれらの任意の組み合わせに特異的である、項目35～38のい

10

20

30

40

50

れが一項目に記載の使用。

41. ROBO2阻害性ポリペプチドが、ドミナントネガティブROBO2融合タンパク質、細胞内ドメインを欠いたROBO2細胞外ドメインを含むポリペプチド、または細胞外ドメインを欠いたROBO2細胞内ドメインを含むポリペプチドである、項目37に記載の使用。

42. 慢性腎疾患またはタンパク尿症が、糖尿病性腎症または高血圧症によって引き起こされている、項目35～40のいずれか一項目に記載の使用。

【0257】

本発明を以下の実施例によってさらに説明するが、これらの実施例は限定と解釈されるべきではない。

【実施例】

10

【0258】

組織インサイチューハイブリダイゼーション、免疫組織化学、および免疫金電子顕微鏡法
インサイチューハイブリダイゼーション分析を、以前に記述されているように (Grieshammer et al., 2004) ジゴキシゲニン標識Robo2リボプローブを用いて実施した。免疫組織化学は、4%パラホルムアルデヒドに固定したマウス胚腎組織に関しておよびメタノールに固定した成体マウス腎組織において実施した。免疫金電子顕微鏡法のために、野生型マウスの腎臓を切除し、パラホルムアルデヒド-リシン-過ヨウ素酸塩 (PLP) に固定した。マウス腎の超薄切片を調製し、ヤギ抗Robo2抗体 (DAKO Corporation) および10 nmコロイド状金に結合した二次抗体 (Ted Pella) と共にインキュベートした。

20

【0259】

酵母ツーハイブリッドアッセイ法、共沈アッセイ法、およびアクチン重合アッセイ法

DUPLEX-A (商標) 酵母ツーハイブリッドシステム (OriGene Tech) を、Robo2とNck1の相互作用を特性づけるために製造者の指示に従って使用した。細胞培養、Hisタグタンパク質の共沈、および免疫沈降は、以前に報告されているように実施した (Fan et al., 2003)。内因性免疫沈降には、マウス新生児腎を使用した。CD16/7融合タンパク質のCD16抗体媒介性架橋およびアクチン重合アッセイ法は、以前に記述されているように実施した (Jones et al., 2006; Rivera et al., 2004; Verma et al., 2006)。

【0260】

ノックアウトマウス試験、透過型および走査型電子顕微鏡法、ならびに腎系球体分析

マウスプロトコルは、Boston University Medical Centerの施設内動物管理使用委員会 (Institutional Animal Care and Use Committee) (IACUC) によって承認された (#14388)。Robo2^{fllox}条件的対立遺伝子、Robo2^{del5} (本明細書では交換可能にRobo2⁻とも呼ばれる) 生殖細胞系突然変異対立遺伝子、およびRobo2⁺野生型対立遺伝子の作製および遺伝子型決定は以前に記述されている (Lu et al., 2007; Wang et al., 2011)。Robo2-ネフリン二重ノックアウトマウスを作製するために、Robo2^{+/+}マウスを以前に作製されたNphs1^{+/+}マウス (Hamano et al., 2002) と交配した。透過型電子顕微鏡法のために、腎臓を固定し、0.15 Mカルコジル酸ナトリウム中の2%グルタルアルデヒド中でインキュベートし、段階的エタノール中で脱水して、エポンに包埋し、切片にして、酢酸ウラニルとクエン酸鉛で染色した。超薄腎切片を、JEM-1011電子顕微鏡を用いて検査した。走査型電子顕微鏡法のために、標準的なプロトコルに従って腎臓を調製した。腎臓の病理学試験のために、腎臓を4%パラホルムアルデヒドに固定し、パラフィン包埋して、切片にし、標準的な過ヨウ素酸-シッフ (PAS) またはエオシンヘマトキシリン (H&E) 法を用いて染色した。ポドサイト数の定量化のために、WT1をポドサイト核マーカーとして使用し、標準的なプロトコルに従って腎切片で免疫ペルオキシダーゼ染色を実施した。各々の系球体断面におけるWT1陽性ポドサイト核をカウントした。タンパク尿分析のために、6週齢のマウスからの「スポット」尿標本を、マウスアルブミン尿ELISA定量キット (Exocell) を製造者の指示に従って使用し、尿試験紙 (Multistix, Bayer, IN) をスクリーニング方法として用いて検査した。

30

40

【0261】

組織インサイチューハイブリダイゼーションおよび免疫組織化学

50

インサイチューハイブリダイゼーション分析を、以前に記述されているように (Grieshammer et al., 2004) ジゴキシゲニン標識Robo2リボプローブを用いて実施した。Robo2 cDNAをNotIで直鎖状にし、DIG DNA標識化および検出キット (Roche Applied Science) を用いてプローブを作製した。4%パラホルムアルデヒドに固定してOCT包埋したマウス胚腎凍結切片に関してハイブリダイゼーションを実施した。4%パラホルムアルデヒドに固定し、次いで30%スクロースで凍結保護したマウス胚腎組織に関して (Mugford et al., 2008) およびメタノールに固定した成体マウス腎組織において免疫組織化学を実施した。OCT化合物に包埋したマウス腎を凍結し、低温保持装置を用いて8~10 μ mの切片にした。切片を一次抗体で染色し、次いで適切なFITCまたはCy3結合二次抗体で染色した。この試験で使用した一次抗体は、ROBO2 (R&D System, Abnova, Santa Cruz Biotechnology)、ネフリン (カスタム合成) (Topham et al., 1999)、Nck (Upstate/Millipore)、ポドシン (Sigma)、ナイドジェン (Santa Cruz Biotechnology)、Pecam1 (BD Biosciences)、WT1 (Santa Cruz Biotechnology)、SLIT2 (Santa Cruz Biotechnology)、PDGFR β (Cell Signaling)、シナプトポジン (Santa Cruz Biotechnology) に対する抗体を含む。Perkin Elmer UltraView LCIマルチポイントスピニングディスクレーザー走査型共焦点顕微鏡および60 $\times$ 油浸対物レンズを備えたZeiss LSM 510共焦点レーザー走査型顕微鏡を使用して画像を得た。

10

【0262】

免疫金電子顕微鏡法

野生型マウス腎を切除し、パラホルムアルデヒド-リシン-過ヨウ素酸塩 (PLP) に4で一晩固定した。組織を1 $\times$ PBSで洗浄し、段階的エタノール中で脱水して、LR白色樹脂 (Electron Microscopy Sciences) に包埋した。マウス腎の超薄切片を調製し、Formvar被覆金グリッドに移して、1 $\times$ PBS中の1%ウシ血清アルブミンおよび5%正常ヤギ血清でブロックした。次に切片をDAKOに1:50希釈したヤギ抗Robo2抗体 (DAKO Corporation) と共に4で一晩インキュベートした。非免疫血清を対照として使用した。1 $\times$ PBSで3回洗浄した後、切片を、10 nmコロイド状金に結合したIgG二次抗体 (Ted Pella) と共に室温で2時間インキュベートした。切片を、最後に1%グルタルアルデヒドで後固定し、酢酸ウラニルで対比染色した。切片を80kVのJEM-1011透過型電子顕微鏡 (JEOL, Tokyo, Japan) で検査し、AMTデジタルイメージングシステム (Advanced Microscopy Techniques, Danvers, MA) を用いて画像を取得して、Adobe Photoshopに取り込んだ。非免疫血清で染色した対照顕微鏡写真と比較して、糸球体における金粒子で染色したRobo2の細胞下局在をデジタル電子顕微鏡写真で認めた。

20

30

【0263】

酵母ツーハイブリッドアッセイ法

DUPLEX-A (商標) 酵母ツーハイブリッドシステム (OriGene Tech, Rockville, MD) を、Robo2とNck1の相互作用を特性づけるために使用した。ヒトRobo2の細胞内ドメインをコードするcDNAおよびそのトランケート型をEcoRI/XhoI部位でpJG4-5ベクターにクローニングし、これらをB42の転写活性化ドメインに融合した。ヒトNck1のcDNAおよびそのトランケート型をEcoRI/XhoIでpEG202ベクターにクローニングし、これらをLexAのDNA結合ドメインに融合した。構築物pSH18-34中のlacZ遺伝子およびEGY48株の酵母ゲノム中のLEU2遺伝子をレポーター遺伝子として使用した。pEG202、pSH18-34およびpJG4-5構築物を酵母EGY48細胞に同時形質転換した。酵母細胞がX-galの存在下で青色になり、ロイシンの非存在下で増殖した場合、相互作用を陽性とみなした。

40

【0264】

細胞培養、DNA構築物、トランスフェクション、共沈、およびウェスタンブロット分析

HEK (293T) 細胞を、リン酸カルシウムトランスフェクションを用いて60%の集密度でトランスフェクトした。C末端hisおよびmycタグ融合タンパク質を作製するために、全長ヒトネフリンおよびRobo2をそれぞれHind III/EcoRIおよびEcoRI/XhoI制限部位でpSecTag Bベクター (Invitrogen) にクローニングした。QUICKCHANGE部位指定突然変異誘発キット (Stratagene) を製造者の指示に従って使用してNck結合ドメインを欠失させることにより、R

50

obo2- Δ NBDを得た(図2C)。非タグRobo2およびNck1をEcoRI/XhoI部位で、ネフリンをHind III/EcoRI部位でpCS2ベクター(Addgene)にクローニングした。ヒトFynおよびmycタグSlit2構築物は以前に報告されている(Li et al., 2008; Wong et al., 2001)。CD16/7-NCDおよびCD16/7-HA構築物も以前に報告されている(Verma et al., 2006)。Robo2とNck1の相互作用を検出するために、C末端HisおよびmycタグヒトRobo2またはRobo2- Δ NBDをHEK細胞において発現させた。トランスフェクションの48時間後に、細胞を溶解緩衝液(50 mM NaH₂PO₄、300 mM NaCl、10 mMイミダゾール、0.5%TX100、1×プロテアーゼ阻害剤[pH 8.0])に溶解した。細胞溶解物を4℃で10分間遠心分離した;上清をNi-NTA樹脂(Qiagen)と共に4℃で2時間インキュベートしてHis-Robo2を沈殿させ、Niを含まないNTA樹脂を対照として使用した。樹脂を洗浄緩衝液(50 mM NaH₂PO₄、300 mM NaCl、20 mMイミダゾール、0.5%TX100 [pH 8.0])で3回洗浄し、95℃で10分間加熱した。沈殿物をSDS-PAGEゲルで分離し、1:1000希釈のウサギ抗myc、ウサギモノクローナル抗Nck1(Cell Signaling)抗体を用いてプロットした。Robo2、Nck1およびネフリンの間の三者相互作用を調べるために、His-myc-Robo2またはHis-myc-Robo2- Δ NBDをHEK細胞においてヒトネフリンおよびヒトFynと共発現させた。His-myc-Robo2を上述したようにNi-NTAビーズで沈殿させた。三者相互作用を確認するために、His-myc-ネフリンをHEK細胞においてRobo2およびFynと共発現させ、His-myc-ネフリンをNi-NTAビーズによってプルダウンさせた。沈殿物を1:1000希釈のウサギポリクローナル抗myc、ウサギモノクローナル抗Nck1、ウサギポリクローナル抗ネフリン、マウスモノクローナル抗Robo2(R&D systems)、およびウサギポリクローナル抗Fyn(Santa Cruz Biotechnology)抗体でプロットした。内因性タンパク質の共免疫沈降のために、新生児マウスからの腎臓を、氷上のRIPA緩衝液(50 mMトリス[pH 7.4]、150 mM NaCl、0.1%SDS、1%NP-40、0.5%デオキシコール酸ナトリウム、1 mM Na₃VO₄、1 mM NaF、1×プロテアーゼ阻害剤)中でホモジナイズした。試料を4℃で10分間遠心分離し、上清を1μgマウスモノクローナル抗Robo2抗体(R&D Systems)と共に4℃で1時間インキュベートした。対照ヤギIgG(Santa Cruz Biotechnology)を対照として使用した。次に試料を30μlのタンパク質A/G Plusアガロースビーズスラリー(Santa Cruz Biotechnology)と混合し、4℃でさらに12時間インキュベートした。その後ビーズをRIPA緩衝液中で3回洗浄し、タンパク質を95℃で10分間加熱することによって1×タンパク質負荷緩衝液に溶出した。沈殿物をSDS-PAGEゲルで分離し、上述したようにマウス抗Robo2、ウサギ抗ネフリン、およびウサギ抗Nck1抗体を用いてプロットした。アクチンをSigmaからの抗β-アクチンマウス抗体でプロットした。ImageJを用いてバンドの強度を測定した。タンパク尿の検出のために、マウススポット尿を収集し、1×タンパク質負荷緩衝液で1:100希釈した。次に尿タンパク質をSDS-PAGEゲルで分離し、精製したアルブミンを対照として使用した(MP Biomedicals)。ゲルをウサギ抗アルブミンポリクローナル抗体(MP Biomedicals)でプロットした。

10

20

30

50

【0265】

CD16/7-NCD架橋およびアクチン重合アッセイ法

CD16抗体を介したCD16/7融合タンパク質の架橋は以前に記述されている(Jones et al., 2006; Rivera et al., 2004; Verma et al., 2006)。簡単に述べると、CD16/7-NCDまたはCD16/7-HAをHEK細胞においてRobo2と共発現させた。24時間後、細胞をポリリシンで被覆したカバーガラス上に移し、さらに24時間接種した。次に細胞を1μg/mlのマウスモノクローナル抗CD16(Beckman Coulter)と共に37℃で30分間インキュベートし、DMEMで1回洗浄して、Slit2馴化培地(Wong et al., 2001)に希釈したローダミン結合二次抗体(The rmo Scientific)または対照馴化培地と共に30分間インキュベートし、1×PBS中の4%パラホルムアルデヒドに固定した。FITC結合ファロイジン(Invitrogen)を製造者の指示に従って使用してF-アクチンを染色した。新たに形成されたF-アクチン束はクラスター化したネフリン(CD16/7-NCD)に固着し、蛍光顕微鏡下で彗星の尾のように見える(すなわち本文中のアクチン尾部)。この実験において、本発明者らは、CD16/7-NCDのクラスター化によって形成され、クラスターに結合したF-アクチン束だけを分析した。F-アクチン尾部を有する細胞をカウントし、全CD16/7-NCDトランスフェクト細胞と比較した。定量化の式は以下

40

50

のとおりである：パーセンテージ% = (F-アクチン尾部を有するトランスフェクト細胞の数/トランスフェクト細胞の総数) × 100。60×油浸対物レンズを備えたLSM510共焦点顕微鏡を用いて画像を得た。

【0266】

Robo2ポドサイト特異的ノックアウトマウスおよびRobo2-ネフリン二重ノックアウトマウスの作製と特性づけ

Robo2^{fllox}条件的対立遺伝子、Robo2^{del5}（本明細書では交換可能にRobo2⁻とも呼ばれる）生殖細胞系突然変異対立遺伝子、およびRobo2⁺野生型対立遺伝子の作製および遺伝子型決定は以前に記述されている（Lu et al., 2007; Wang et al., 2011）。標準的な交配スキームに従って、一つのRobo2^{del5}対立遺伝子および一つのRobo2^{fllox}対立遺伝子を担持する、Robo2ポドサイト特異的Robo2^{del5/fllox};Tg^{Nphs2-Cre/+}ノックアウトマウスを作製した。この複合変異体において、ポドサイトプロモーターによって駆動されるポドサイト特異的Creリコンビナーゼは、表現型の浸透度を促進するようにRobo2^{fllox}対立遺伝子だけを欠失させ、というのは、他方の対立遺伝子Robo2^{del5}は生殖細胞発現から普遍的に欠失しているからである。Robo2^{del5/fllox};Tg^{Nphs2-Cre/+}マウスの真正性を、Robo2^{del5}およびRobo2^{fllox}対立遺伝子ならびにTg^{Nphs2-Cre}導入遺伝子の存在に関する尾部DNA遺伝子型決定によって決定した。Robo2^{del5}対立遺伝子およびTg^{Nphs2-Cre}導入遺伝子を有しないF2同腹子Robo2^{fllox/+}マウスを対照として使用した。Robo2-ネフリン二重ノックアウトマウスを作製するために、Robo2^{+/-}ヘテロ接合マウスを、以前に作製された（Hamano et al., 2002）Nphs1^{+/-}ヘテロ接合マウスと交配した。Robo2^{+/-};Nphs1^{+/-}二重ヘテロ接合マウスの作製後、二重ヘテロ接合マウスの交配を実施して、Robo2^{-/-};Nphs1^{-/-}二重ホモ接合マウスならびにNphs1^{-/-}単一ホモ接合、Robo2^{-/-}単一ホモ接合、およびRobo2^{+/+};Nphs1^{+/+}野生型対照を作製した。マウスプロトコルは、Boston University Medical Centerの施設内動物管理使用委員会（IACUC）によって承認された（#14388）。

【0267】

透過型および走査型電子顕微鏡法

透過型電子顕微鏡法のために、Robo2ホモ接合ヌルマウスおよびポドサイト特異的ノックアウトマウスから腎臓を切除し、PLPに4で一晩固定して、その後0.15 Mカコジル酸ナトリウム中の2%グルタルアルデヒド中で6時間インキュベートした。1×PBS中で洗浄した後、固定した腎臓を段階的エタノール中で脱水し、エポンに包埋して、切片にし、酢酸ウラニルとクエン酸鉛で染色した。超薄腎切片を調製し、JEM-1011電子顕微鏡を用いて検査した。野生型同腹子を対照として使用した。走査型電子顕微鏡法のために、Robo2ホモ接合ヌルマウス、ポドサイト特異的ノックアウトマウス、ネフリンホモ接合ヌルマウス、およびRobo2-ネフリン二重ホモ接合マウスからの腎試料を、以前に記述されている（Friedman and Ellisman, 1981）プロトコルに従い、これにわずかな修正を加えて調製した。簡単に述べると、腎を0.1 Mカコジル酸緩衝液（カルノフスキー固定液、Electron Microscopy Sciences）中の2.5%グルタルアルデヒドおよび2%パラホルムアルデヒド溶液で灌流し、その後カルノフスキー固定液に24時間固定して、次いで2%四酸化オスミウム溶液（Electron Microscopy Sciences）に固定した。腎試料を凍結切断し、脱水して、ヘキサメチルジシラザン（Electron Microscopy Sciences）を用いて乾燥した。Amray 1000AおよびJeol 6340F走査型電子顕微鏡を用いて腎試料を撮像した。各動物から3つの系球体を検査し、代表的な画像を得た。

【0268】

マウス腎の病理学試験、ポドサイト数の定量化、およびタンパク尿分析

腎の病理学試験のために、腎臓を切除し、4%パラホルムアルデヒドに一晩固定して、次にパラフィン包埋のために段階的エタノールシリーズで処理した。腎パラフィンブロックを、MT-920ミクロトーム（MICROM）を用いて4μmの切片にし、標準的な過ヨウ素酸-シッフ（PAS）またはエオシンヘマトキシリン（H&E）法を用いて染色した。系球体を、SPOTデジタルカメラシステムを備えたOlympus BHT光学顕微鏡を用いて基質沈着、分節性系球体硬化症、およびボーマン腔の拡張に関して検査し、評価した。ポドサイト数の定量化の

ために、WT1をポドサイト核マーカーとして使用し、以前に記述された (Sanden et al., 2003) プロトコルに従って腎切片で免疫ペルオキシダーゼ染色を実施した。簡単に述べると、4匹の1年齢のRobo2^{del5/flox};Tg^{Nphs2-Cre+}ポドサイト特異的ノックアウトマウスおよび4匹の年齢をマッチさせた野生型対照マウスからのパラフィン包埋した腎切片を4μmの切片にし、マイクロ波による抗原回復後にWT1抗体 (Santa Cruz Biotechnology) で染色した。ビオチン化二次抗体およびVectastain ABCキット (Vector Laboratories) を使用してWT1シグナルを検出した。各々の糸球体断面中のWT1陽性ポドサイト核を、4匹の突然変異マウスからの合計165の糸球体および4匹の対照マウスからの166の糸球体においてカウントした。タンパク尿分析のために、6週齢のマウスからの「スポット」尿標本を、高感度マウスアルブミン尿ELISA定量キット (Exocell) を製造者の指示に従って使用し、尿試験紙 (Bayer, INからのMultistix) をスクリーニング方法として用いて検査した。尿中アルブミンを、クレアチニンを用いて基準化し、アルブミン/クレアチニン比を得た。クレアチニン検出キット (Sigma) を製造者の指示に従って使用して尿中クレアチニンを決定した。尿中アルブミンも、12%SDS-PAGEによって検査し、抗アルブミン抗体 (MP Bio medicals) でプロットした。突然変異体および対照からのデータを、一方向ANOVA、スチューデントt検定、およびカイ二乗検定を用いて分析した。

10

【0269】

(表1) 対照 (野生型) と比較した、2~9か月齢のRobo2ポドサイト特異的ノックアウトマウス (突然変異型) における増大した基質拡大を有する糸球体の定量的分析

20

遺伝子型	マウスID番号	年齢 (月数)	糸球体総カウント	メサンギウム基質の拡大を有する糸球体	メサンギウム基質の拡大*を有する糸球体の%
突然変異型	4048	2	96	13	12.35%
突然変異型	1721	3	107	18	16.82%
突然変異型	4005	6	103	17	16.51%
突然変異型	1190	7	102	20	19.61%
突然変異型	2396	9	80	14	17.50%
突然変異型合計			488	82	16.80%
野生型	4058	2	90	4	4.44%
野生型	4052	3	105	6	5.71%
野生型	3919	6	107	4	3.74%
野生型	1191	7	103	5	4.85%
野生型	2385	9	106	5	4.72%
野生型合計			511	24	4.70%

30

40

* p < 0.01、n = 5、t検定。

【0270】

(表2) 対照 (野生型) と比較した、12か月齢のRobo2ポドサイト特異的ノックアウトマウス (突然変異型) における増大した基質拡大を有する糸球体の定量的分析

遺伝子型	マウス ID番号	年齢 (月数)	糸球体 総カウント	メサンギウム基質 の拡大を有する 糸球体	メサンギウム基質 の拡大*を有する 糸球体の%
突然変異型	1844	12	136	17	12.50%
突然変異型	1847	12	125	18	14.40%
突然変異型	1877	12	127	11	8.66%
突然変異型	1878	12	132	20	15.15%
突然変異型	1948	12	142	28	19.72%
突然変異型合計			662	94	14.20%
野生型	1901	12	125	5	4.00%
野生型	2429	12	179	8	4.47%
野生型	2834	12	154	9	5.84%
野生型	2836	12	159	7	4.40%
野生型	2837	12	124	5	4.03%
野生型合計			741	34	4.59%

10

20

* $p < 0.01$ 、 $n = 5$ 、 t 検定。

【 0 2 7 1 】

(表3) $Robo2^{-/-}; Nphs1^{-/-}$ 二重ホモ接合新生児マウスと比較した、 $Nphs1^{-/-}$ 単一ホモ接合 ($Robo2^{+/+}; Nphs1^{-/-}$) におけるボーマン腔拡張を有する糸球体の組織学による形態学的分析

遺伝子型	糸球体 総カウント	ボーマン腔の拡張 を有する糸球体	ボーマン腔の拡張 を有する糸球体の%
$Robo2^{+/+}; Nphs1^{-/-}$	122	31	25.4%
$Robo2^{-/-}; Nphs1^{-/-}$	55	2	3.6%
$Robo2^{-/-}; Nphs1^{+/+}$	158	3	1.9%
$Robo2^{+/+}; Nphs1^{+/+}$	271	1	0.4%

30

注: 図S4Uに示すものと類似の表現型を呈する糸球体が認められた場合は、糸球体をボーマン腔拡張に関して陽性と評価し、図8V~8Xに示すものと類似の糸球体が認められた場合は陰性と評価した。各遺伝子型から3匹のマウスを分析した。 $Robo2^{-/-}; Nphs1^{+/+}$ および野生型 ($Robo2^{+/+}; Nphs1^{+/+}$) を対照として使用した。

【 0 2 7 2 】

(表4) $Robo2^{-/-}; Nphs1^{-/-}$ 二重ホモ接合新生児マウスと比較した、 $Nphs1^{-/-}$ 単一ホモ接合マウス ($Robo2^{+/+}; Nphs1^{-/-}$) における糸球体ポドサイト相互嵌合足突起 (FP) 表現型の走査型電子顕微鏡法による形態学的分析

40

遺伝子型	糸球体 総カウント	相互嵌合FP構造 を有する糸球体	相互嵌合FP構造 を有する糸球体の%
<i>Robo2^{+/-};Nphs1^{-/-}</i>	15	1	6.67%
<i>Robo2^{-/-};Nphs1^{-/-}</i>	16	12	75%
<i>Robo2^{-/-};Nphs1^{+/-}</i>	13	13	100%
<i>Robo2^{+/-};Nphs1^{+/-}</i>	13	13	100%

【 0 2 7 3 】

10

参考文献

- Bashaw, G. J., Kidd, T., Murray, D., Pawson, T., and Goodman, C. S. (2000). Repulsive axon guidance: Abelson and Enabled play opposing roles downstream of the roundabout receptor. *Cell* *101*, 703-715.
- Dickson, B. J., and Gilestro, G. F. (2006). Regulation of commissural axon pathfinding by slit and its Robo receptors. *Annu Rev Cell Dev Biol* *22*, 651-675.
- Done, S. C., Takemoto, M., He, L., Sun, Y., Hultenby, K., Betsholtz, C., and Tryggvason, K. (2008). Nephrin is involved in podocyte maturation but not survival during glomerular development. *Kidney Int* *73*, 697-704.
- Fan, X., Labrador, J. P., Hing, H., and Bashaw, G. J. (2003). Slit stimulation recruits Dock and Pak to the roundabout receptor and increases Rac activity to regulate axon repulsion at the CNS midline. *Neuron* *40*, 113-127.
- Faul, C., Asanuma, K., Yanagida-Asanuma, E., Kim, K., and Mundel, P. (2007). Actin up: regulation of podocyte structure and function by components of the actin cytoskeleton. *Trends Cell Biol* *17*, 428-437.
- Furness, P. N., Hall, L. L., Shaw, J. A., and Pringle, J. H. (1999). Glomerular expression of nephrin is decreased in acquired human nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transplant* *14*, 1234-1237.
- Garg, P., Verma, R., Cook, L., Soofi, A., Venkatareddy, M., George, B., Mizuno, K., Gurniak, C.,

20

30

Witke, W., and Holzman, L. B. (2010). Actin-depolymerizing factor cofilin-1 is necessary in maintaining mature podocyte architecture. *J Biol Chem* 285, 22676-22688.

Grieshammer, U., Le, M., Plump, A. S., Wang, F., Tessier-Lavigne, M., and Martin, G. R. (2004). SLIT2-mediated ROBO2 signaling restricts kidney induction to a single site. *Dev Cell* 6, 709-717.

Guan, K. L., and Rao, Y. (2003). Signalling mechanisms mediating neuronal responses to guidance cues. *Nat Rev Neurosci* 4, 941-956.

Hamano, Y., Grunkemeyer, J. A., Sudhakar, A., Zeisberg, M., Cosgrove, D., Morello, R., Lee, B., Sugimoto, H., and Kalluri, R. (2002). Determinants of vascular permeability in the kidney glomerulus. *J Biol Chem* 277, 31154-31162.

Jones, N., Blasutig, I. M., Eremina, V., Ruston, J. M., Bladt, F., Li, H., Huang, H., Larose, L., Li, S. S., Takano, T., *et al.* (2006). Nck adaptor proteins link nephrin to the actin cytoskeleton of kidney podocytes. *Nature* 440, 818-823.

Lu, W., van Eerde, A. M., Fan, X., Quintero-Rivera, F., Kulkarni, S., Ferguson, H. L., Kim, H., Fan, Y., Xi, Q., Li, Q. G., *et al.* (2007). Disruption of ROBO2 is associated with urinary tract anomalies and confers risk of vesicoureteral reflux. *Am J Hum Genet* 80, 616-632.

Nachman, P. H., Jennette, J. C., and Falk, R. J. (2008). Primary glomerular disease. In Brenner & Rector's The Kidney, B. M. Brenner, ed. (Philadelphia, Saunders), pp. 987-1066.

Patrakka, J., Ruotsalainen, V., Reponen, P., Qvist, E., Laine, J., Holmberg, C., Tryggvason, K., and Jalanko, H. (2002). Recurrence of nephrotic syndrome in kidney grafts of patients with congenital nephrotic syndrome of the Finnish type: role of nephrin. *Transplantation* 73, 394-403.

Piper, M., Anderson, R., Dwivedy, A., Weinl, C., van Horck, F., Leung, K. M., Cogill, E., and Holt, C. (2006). Signaling mechanisms underlying Slit2-induced collapse of *Xenopus* retinal growth cones. *Neuron* 49, 215-228.

Piper, M., Georgas, K., Yamada, T., and Little, M. (2000). Expression of the vertebrate Slit gene family and their putative receptors, the Robo genes, in the developing murine kidney. *Mech Dev* 94, 213-217.

Reeves, W., Caulfield, J. P., and Farquhar, M. G. (1978). Differentiation of epithelial foot processes and filtration slits: sequential appearance of occluding junctions, epithelial polyanion, and slit membranes in developing glomeruli. *Lab Invest* 39, 90-100.

Rivera, G. M., Briceno, C. A., Takeshima, F., Snapper, S. B., and Mayer, B. J. (2004). Inducible clustering of membrane-targeted SH3 domains of the adaptor protein Nck triggers localized actin polymerization. *Curr Biol* 14, 11-22.

Seiler, M. W., Venkatachalam, M. A., and Cotran, R. S. (1975). Glomerular epithelium: structural alterations induced by polycations. *Science* 189, 390-393.

Shih, N. Y., Li, J., Cotran, R., Mundel, P., Miner, J. H., and Shaw, A. S. (2001). CD2AP localizes to the slit diaphragm and binds to nephrin via a novel C-terminal domain. *Am J Pathol* 159, 2303-2308.

Topham, P. S., Kawachi, H., Haydar, S. A., Chugh, S., Addona, T. A., Charron, K. B., Holzman, L. B., Shia, M., Shimizu, F., and Salant, D. J. (1999). Nephritogenic mAb 5-1-6 is directed at the extracellular

10

20

30

40

domain of rat nephrin. *J Clin Invest* 104, 1559-1566.

Tryggevason, K., Patrakka, J., and Wartiovaara, J. (2006). Hereditary proteinuria syndromes and mechanisms of proteinuria. *N Engl J Med* 354, 1387-1401.

Verma, R., Kovari, I., Soofi, A., Nihalani, D., Patrie, K., and Holzman, L. B. (2006). Nephrin ectodomain engagement results in Src kinase activation, nephrin phosphorylation, Nck recruitment, and actin polymerization. *J Clin Invest* 116, 1346-1359.

Wang, H., Li, Q., Liu, J., Mendelsohn, C., Salant, D. J., and Lu, W. (2011). Noninvasive assessment of antenatal hydronephrosis in mice reveals a critical role for Robo2 in maintaining anti-reflux mechanism. *PLoS One* 6, e24763.

Wong, K., Ren, X. R., Huang, Y. Z., Xie, Y., Liu, G., Saito, H., Tang, H., Wen, L., Brady-Kalnay, S. M., Mei, L., *et al.* (2001). Signal transduction in neuronal migration: roles of GTPase activating proteins and the small GTPase Cdc42 in the Slit-Robo pathway. *Cell* 107, 209-221.

Yuan, H., Takeuchi, E., and Salant, D. J. (2002). Podocyte slit-diaphragm protein nephrin is linked to the actin cytoskeleton. *Am J Physiol Renal Physiol* 282, F585-591.

Friedman, P. L., and Ellisman, M. H. (1981). Enhanced visualization of peripheral nerve and sensory receptors in the scanning electron microscope using cryofracture and osmium-thiocarbohydrazide-osmium impregnation. *J Neurocytol* 10, 111-131.

Li, X., Gao, X., Liu, G., Xiong, W., Wu, J., and Rao, Y. (2008). Netrin signal transduction and the guanine nucleotide exchange factor DOCK180 in attractive signaling. *Nat Neurosci* 11, 28-35.

Mugford, J. W., Sipila, P., Kobayashi, A., Behringer, R. R., and McMahon, A. P. (2008). Hoxd11 specifies a program of metanephric kidney development within the intermediate mesoderm of the mouse embryo. *Dev Biol* 319, 396-405.

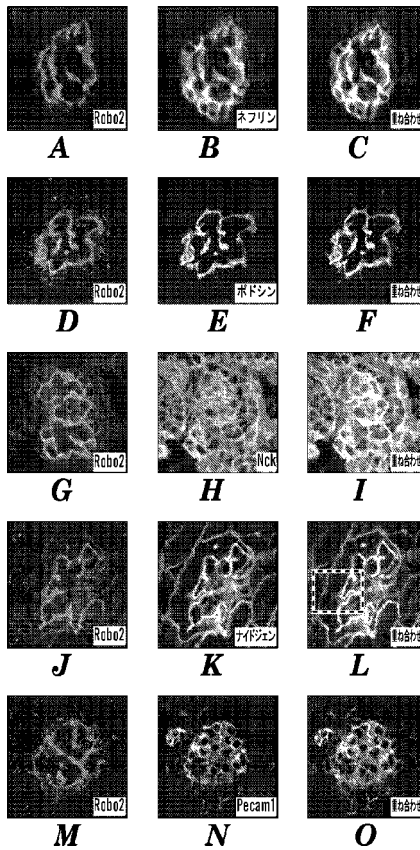
Sanden, S. K., Wiggins, J. E., Goyal, M., Riggs, L. K., and Wiggins, R. C. (2003). Evaluation of a thick and thin section method for estimation of podocyte number, glomerular volume, and glomerular volume per podocyte in rat kidney with Wilms' tumor-1 protein used as a podocyte nuclear marker. *J Am Soc Nephrol* 14, 2484-2493.

10

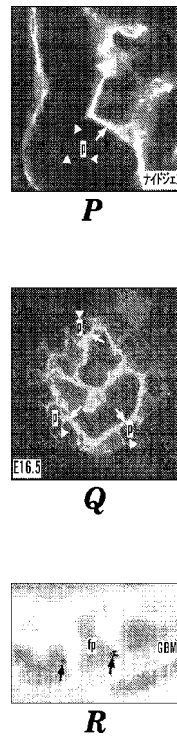
20

30

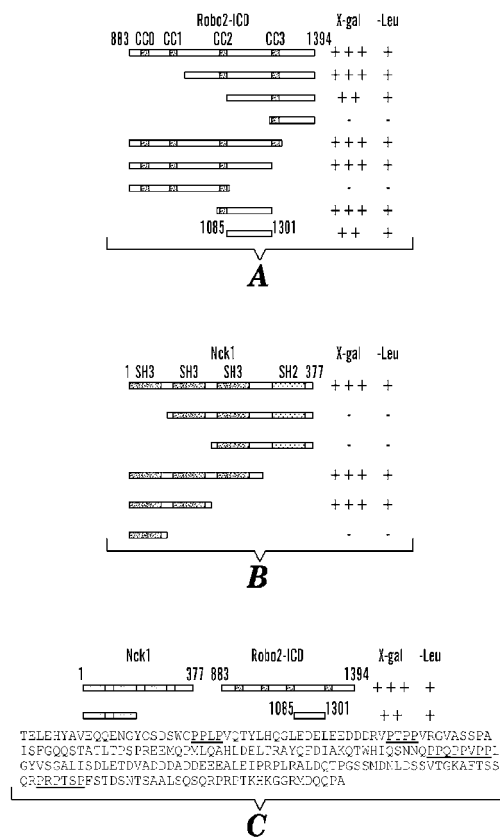
【図 1 - 1】



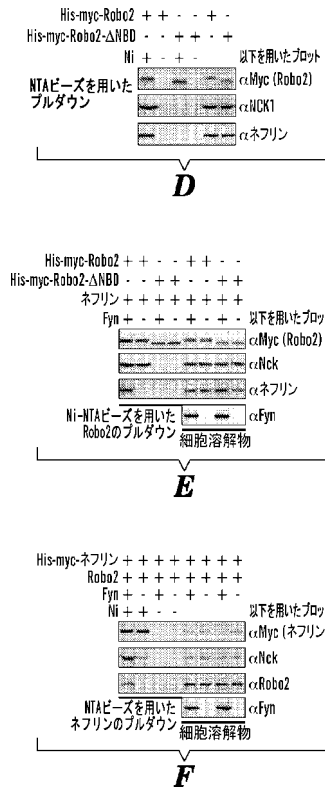
【図 1 - 2】



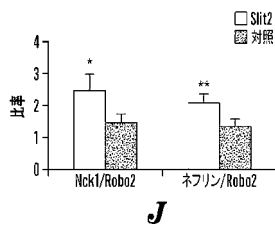
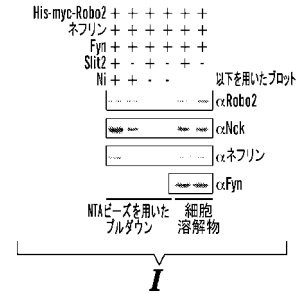
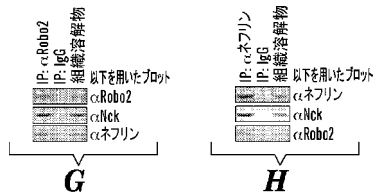
【図 2 - 1】



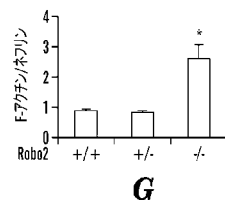
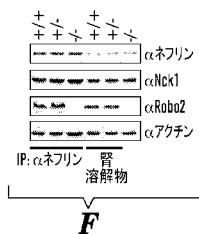
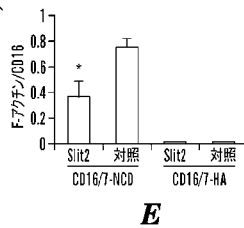
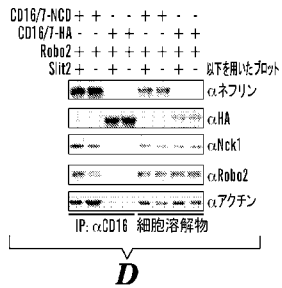
【図 2 - 2】



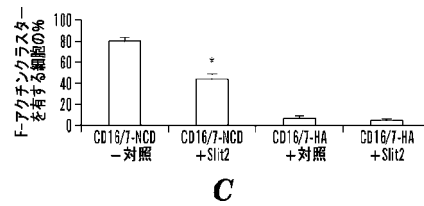
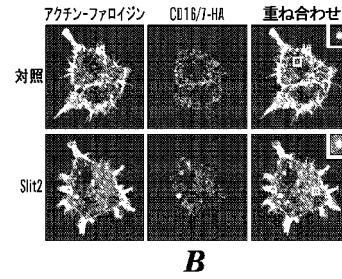
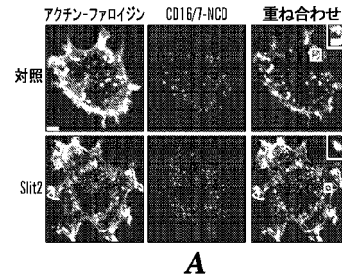
【図 2 - 3】



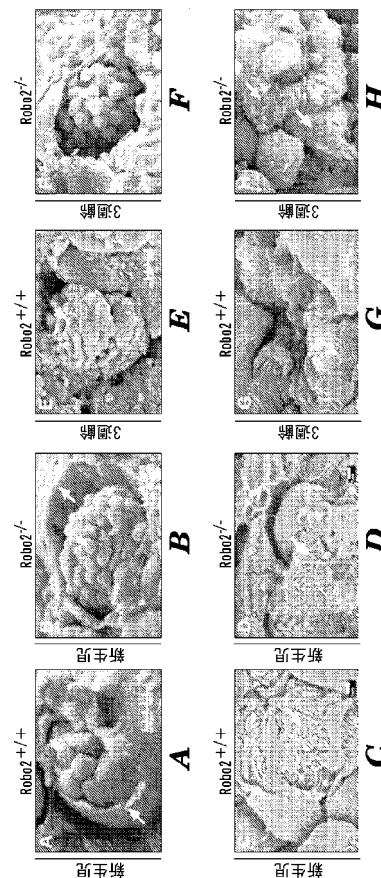
【図 3 - 2】



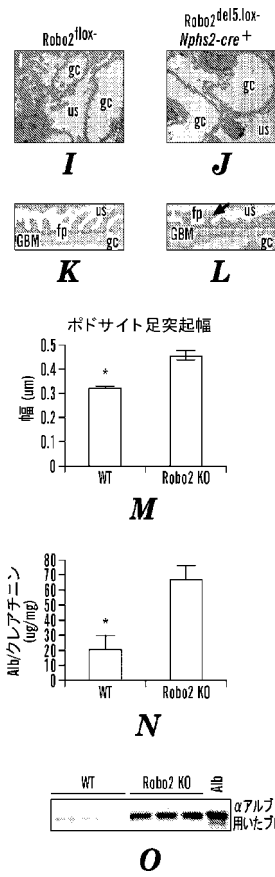
【図 3 - 1】



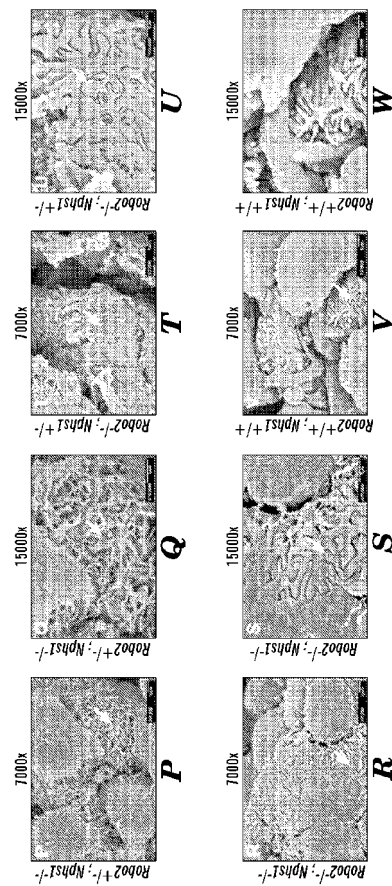
【図 4 - 1】



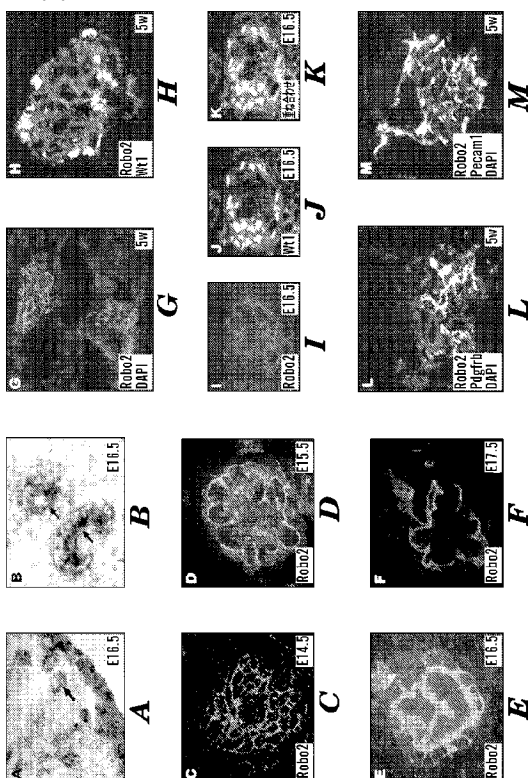
【図 4 - 2】



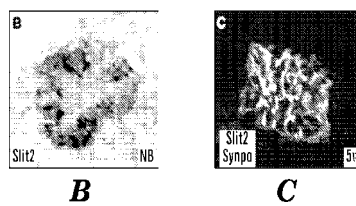
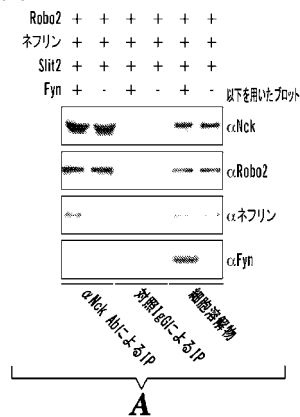
【図 4 - 3】



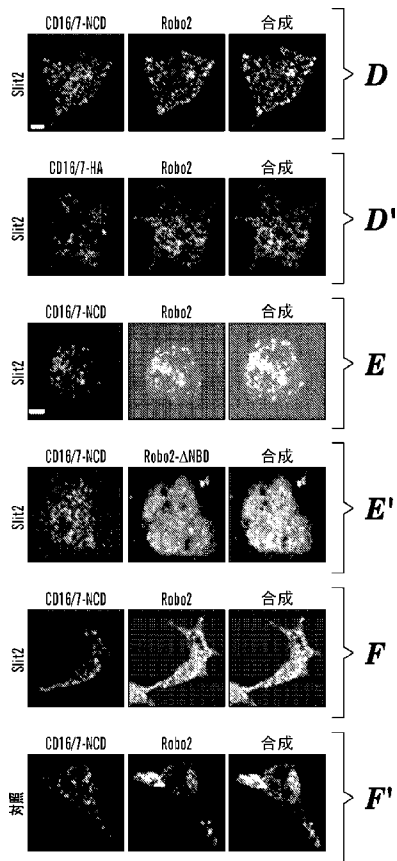
【図 5】



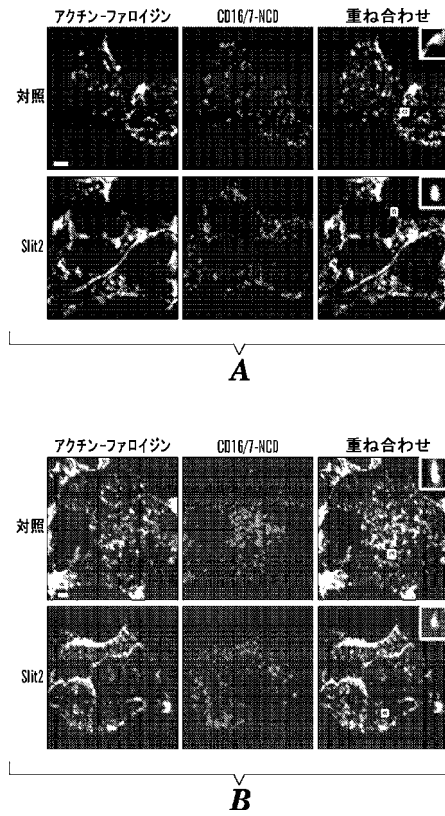
【図 6 - 1】



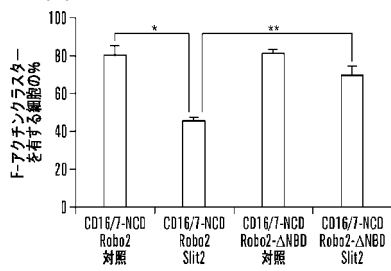
【図 6 - 2】



【図 7 - 1】

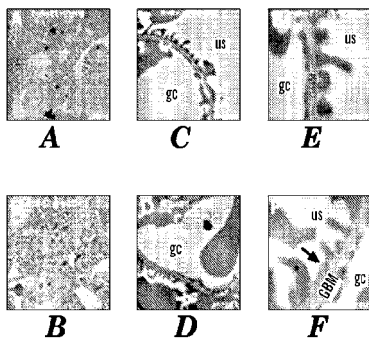


【図 7 - 2】

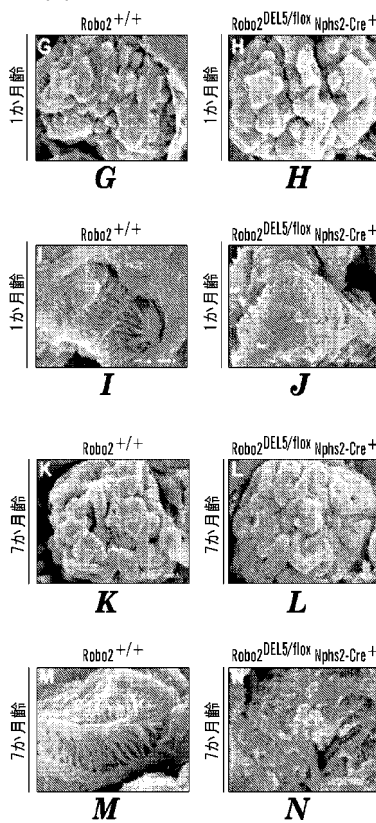


C

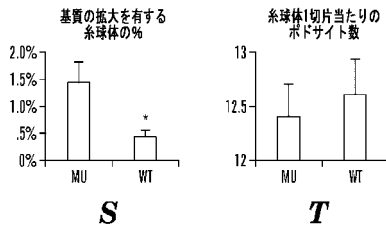
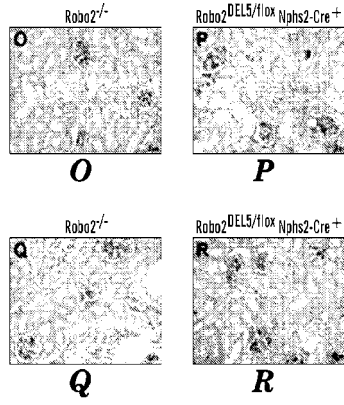
【図 8 - 1】



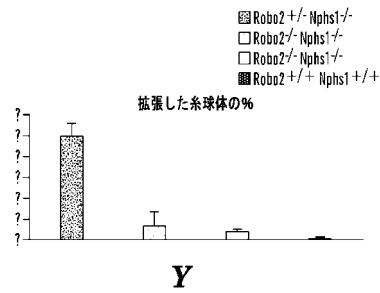
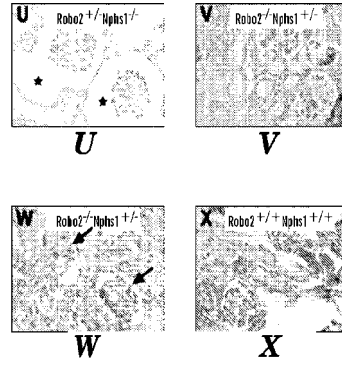
【図 8 - 2】



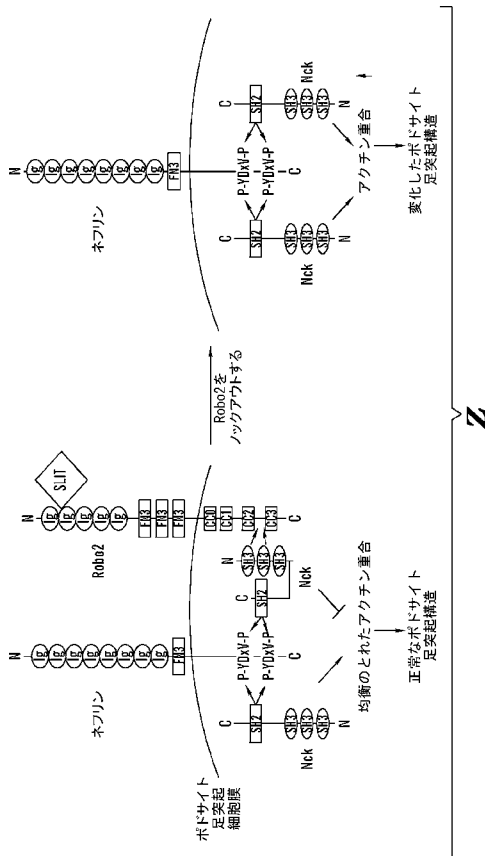
【図 8 - 3】



【図 8 - 4】



【図 8 - 5】



【配列表】

2017193559000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成29年5月31日(2017.5.31)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

慢性腎疾患を有するまたは慢性腎疾患のリスクがある対象に、ROBO2阻害剤を含む組成物の治療的有効量を投与する段階を含む、その必要がある対象における慢性腎疾患の処置のための方法。

【請求項2】

タンパク尿症を有するまたはタンパク尿症のリスクがある対象に、ROBO2阻害剤を含む組成物の治療的有効量を投与する段階を含む、その必要がある対象におけるタンパク尿症の軽減のための方法。

【請求項3】

ROBO2阻害剤が、ROBO2に特異的な阻止抗体またはその抗原結合フラグメント、ROBO2に特異的なアンチセンス分子、ROBO2に特異的な短鎖干渉RNA (siRNA)、ROBO2の低分子阻害剤、ROBO2阻害性ポリペプチド、またはROBO2構造類似体である、請求項1または2のいずれか一項に記載の方法。

【請求項4】

ROBO2阻害剤が、SLIT、Nck、またはその両方に対するROBO2の結合をブロックするかまたは低減する、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項5】

ROBO2阻害剤が、Ig1 SLIT結合ドメイン、Ig1およびIg2 SLIT結合ドメイン、Nck細胞内結合ドメイン、またはこれらの任意の組み合わせに特異的である、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】

ROBO2阻害性ポリペプチドが、ドミナントネガティブROBO2融合タンパク質、細胞内ドメインを欠いたROBO2細胞外ドメインを含むポリペプチド、または細胞外ドメインを欠いたROBO2細胞内ドメインを含むポリペプチドである、請求項3に記載の方法。

【請求項7】

慢性腎疾患を有するまたは慢性腎疾患のリスクがある対象が、糖尿病性腎症または高血圧症を有する、請求項1～6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項8】

対象に付加的な治療剤を投与する段階をさらに含む、請求項1～7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項9】

付加的な治療剤が、アンギオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害剤またはアンギオテンシンⅠ受容体遮断剤 (ARB) である、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

a. ROBO2ポリペプチドの発現レベルまたはROBO2ポリペプチドをコードするRNAの発現レベルを決定するために、対象に由来する生物学的試験試料をアッセイする段階、

b. 生物学的試験試料中のROBO2ポリペプチドの発現レベルまたはROBO2ポリペプチドをコードするRNAの発現レベルが、参照閾値レベルを上回るかどうかを判定する段階、および

c. 対象を、慢性腎疾患の処置または療法の必要があると診断する段階

を含む方法。

【請求項 1 1】

ROBO2ポリペプチドの発現レベルをアッセイする段階が、ROBO2ポリペプチドに特異的な抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて実施される、請求項10に記載の方法。

【請求項 1 2】

ROBO2ポリペプチドをコードするRNAの発現レベルをアッセイする段階が、PCRまたはハイブリダイゼーションアッセイ法を用いて実施される、請求項10に記載の方法。

【請求項 1 3】

生物学的試験試料が、腎生検試料、尿試料、血液試料、血清試料、またはペレット化された尿試料由来の細胞である、請求項10～12のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 4】

ROBO2ポリペプチドの発現レベルまたはROBO2ポリペプチドをコードするRNAの発現レベルが、参照閾値レベルを少なくとも20%上回る、請求項10～13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 5】

ROBO2ポリペプチドの発現レベルまたはROBO2ポリペプチドをコードするRNAの発現レベルが、参照閾値レベルを少なくとも2標準偏差上回る、請求項10～13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 6】

a. 対象から単離された生物学的試験試料を、ROBO2ポリペプチドを検出する試薬またはROBO2ポリペプチドをコードするRNAを検出する試薬と接触させる段階、および

b. ROBO2ポリペプチドのレベルまたはROBO2ポリペプチドをコードするRNAのレベルを測定する段階

を含むアッセイ法であって、正常生物学的試料と比較して上昇した、ROBO2ポリペプチドのレベルまたはROBO2ポリペプチドをコードするRNAのレベルによって、慢性腎疾患を有するおよび/もしくは慢性腎疾患の進行を有するまたはタンパク尿症を有する対象が同定される、前記アッセイ法。

【請求項 1 7】

ROBO2ポリペプチドの発現レベルを検出する段階が、ROBO2ポリペプチドに特異的な抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて実施される、請求項16に記載のアッセイ法。

【請求項 1 8】

ROBO2ポリペプチドをコードするRNAの発現レベルを検出する段階が、PCRまたはハイブリダイゼーションアッセイ法を用いて実施される、請求項16に記載のアッセイ法。

【請求項 1 9】

生物学的試験試料が、腎生検試料、尿試料、血液試料、血清試料、またはペレット化された尿試料由来の細胞である、請求項16～18のいずれか一項に記載のアッセイ法。

【請求項 2 0】

ROBO2ポリペプチドの発現レベルまたはROBO2ポリペプチドをコードするRNAの発現レベルが、参照閾値レベルを少なくとも20%上回る、請求項16～19のいずれか一項に記載のアッセイ法。

【請求項 2 1】

ROBO2ポリペプチドの発現レベルまたはROBO2ポリペプチドをコードするRNAの発現レベルが、参照閾値レベルを少なくとも2標準偏差上回る、請求項16～19のいずれか一項に記載のアッセイ法。

【請求項 2 2】

対象が、糖尿病または高血圧症と診断されている、請求項16～21のいずれか一項に記載のアッセイ法。

【請求項 2 3】

対象に慢性腎疾患もしくはタンパク尿症のリスクがあるかどうか、または対象が慢性腎疾患を有するかどうかを判定するためのシステムであって、

a. 対象から得られた生物学的試料中のROBO2ポリペプチドの発現レベルまたはROBO2ポリペプチドをコードするRNAの発現レベルを決定するように構成された測定モジュール、
b. 前記測定モジュールによって決定されたROBO2ポリペプチドの発現レベルまたはROBO2ポリペプチドをコードするRNAの発現レベルを受け取って、ROBO2ポリペプチドの該発現レベルまたはROBO2ポリペプチドをコードするRNAの該発現レベルが所定の参照レベルまたは比率よりも高いかどうかを判定すべく少なくとも一つの分析を実施し、かつ引き出されたコンテンツを提供するように構成された比較モジュール、および
c. 前記比較モジュールからのデータ出力に基づくコンテンツを表示するための表示モジュールであって、該コンテンツが、ROBO2ポリペプチドもしくはRNAの前記発現レベルもしくは比率が所定の参照レベルもしくは比率よりも高いことを示すシグナルを含むか、またはROBO2の前記レベルもしくは発現比率が参照レベル以下もしくは所定の比率以下であることを示すシグナルを含む、該表示モジュールを含む前記システム。

【請求項 24】

表示モジュールに表示されるコンテンツが、対象に特定の処置レジメンを受けるよう勧めることを示すシグナルをさらに含む、請求項23に記載のシステム。

【請求項 25】

対象に慢性腎疾患もしくはタンパク尿症のリスクがあるかどうか、または対象が慢性腎疾患を有するかどうかを判定するためのシステムであって、

a. 対象から得られた少なくとも一つの試験試料を受け取って、該少なくとも一つの試験試料において、

i. ROBO2の発現比率が所定の比率よりも高い状態、または

ii. ROBO2の発現レベルが所定のレベルよりも高い状態

のいずれかの存在または非存在を決定すべく少なくとも一つの分析を実施するように構成された決定モジュール、

b. 前記決定モジュールからのデータ出力を格納するように構成された記憶装置、および

c. 前記決定モジュールからのデータ出力に基づくコンテンツを表示するための表示モジュールであって、該コンテンツが、ROBO2の前記発現比率が所定の比率よりも高いもしくはROBO2の前記レベルが所定のレベルよりも高いことを示すシグナルを含むか、またはROBO2の前記発現比率が所定の比率以下であるもしくは所定のレベル以下であることを示すシグナルを含む、該表示モジュールを含む前記システム。

【請求項 26】

表示モジュールに表示されるコンテンツが、対象に特定の処置レジメンを受けるよう勧めることを示すシグナルをさらに含む、請求項25に記載のシステム。

【請求項 27】

慢性腎疾患またはタンパク尿症のリスクがあるヒト対象を処置するための方法であって、参照閾値レベルを上回るROBO2タンパク質のレベルを有すると判定されたヒト対象に、慢性腎疾患またはタンパク尿症の発症を予防するための処置または療法を施す段階を含む方法。

【請求項 28】

ROBO2タンパク質のレベルが、参照レベルを少なくとも20%上回る、請求項27に記載の方法。

【請求項 29】

ROBO2タンパク質のレベルが、参照レベルを少なくとも2標準偏差上回る、請求項27に記載の方法。

【請求項 30】

慢性腎疾患またはタンパク尿症の発症を予防するための処置または療法が、ROBO2阻害剤を含む、請求項27～29のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 1】

ROBO2阻害剤が、ROBO2に特異的な阻止抗体またはその抗原結合フラグメント、ROBO2に特異的なアンチセンス分子、ROBO2に特異的な短鎖干渉RNA (siRNA)、ROBO2の低分子阻害剤、ROBO2阻害性ポリペプチド、またはROBO2構造類似体である、請求項30に記載の方法。

【請求項 3 2】

ROBO2阻害剤が、SLIT、Nck、またはその両方に対するROBO2の結合をブロックするかまたは低減する、請求項30～31のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 3】

ROBO2阻害剤が、Ig1 SLIT結合ドメイン、Ig1およびIg2 SLIT結合ドメイン、Nck細胞内結合ドメイン、またはこれらの任意の組み合わせに特異的である、請求項30～32のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 4】

ROBO2阻害性ポリペプチドが、ドミナントネガティブROBO2融合タンパク質、細胞内ドメインを欠いたROBO2細胞外ドメインを含むポリペプチド、または細胞外ドメインを欠いたROBO2細胞内ドメインを含むポリペプチドである、請求項31に記載の方法。

【請求項 3 5】

慢性腎疾患の処置における使用のためのROBO2阻害剤。

【請求項 3 6】

タンパク尿症の処置における使用のためのROBO2阻害剤。

【請求項 3 7】

ROBO2阻害剤が、ROBO2に特異的な阻止抗体またはその抗原結合フラグメント、ROBO2に特異的なアンチセンス分子、ROBO2に特異的な短鎖干渉RNA (siRNA)、ROBO2の低分子阻害剤、ROBO2阻害性ポリペプチド、またはROBO2構造類似体である、請求項35または36のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 3 8】

ROBO2阻害剤が、SLIT、Nck、またはその両方に対するROBO2の結合をブロックするかまたは低減する、請求項35～37のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 3 9】

ROBO2阻害剤が、Ig1 SLIT結合ドメイン、Ig1およびIg2 SLIT結合ドメイン、Nck細胞内結合ドメイン、またはこれらの任意の組み合わせに特異的である、請求項35～38のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 4 0】

ROBO2阻害性ポリペプチドが、ドミナントネガティブROBO2融合タンパク質、細胞内ドメインを欠いたROBO2細胞外ドメインを含むポリペプチド、または細胞外ドメインを欠いたROBO2細胞内ドメインを含むポリペプチドである、請求項37に記載の使用。

【請求項 4 1】

慢性腎疾患またはタンパク尿症が、糖尿病性腎症または高血圧症によって引き起こされている、請求項35～40のいずれか一項に記載の使用。

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K 31/713	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 9/12 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 13/12 (2006.01)	A 6 1 P 9/12	
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	A 6 1 P 13/12	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	G 0 1 N 33/53	M
C 0 7 K 14/47 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	G
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 14/47	
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 0 7 K 16/18	
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A
	C 0 7 K 19/00	

- (74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一
- (74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
- (74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
- (74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
- (74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
- (74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘
- (74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
- (72)発明者 ルー ウェイニン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ウェスト ロックスベリー オークメア ストリート 9
1
- (72)発明者 ファン シュエピン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ブレントリー シャーブルック アベニュー 57
- (72)発明者 サラント デイビッド ジェイ.
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ニュートン アラートン ロード 161
- F ターム(参考) 4B063 QA01 QA19 QQ03 QQ08 QQ53 QR08 QR42 QR55 QR62 QS25
QS34 QX02
4C084 AA02 AA13 AA17 BA02 BA22 BA23 BA41 MA13 MA17 MA22
MA23 MA35 MA37 MA43 MA52 MA56 MA57 MA58 MA59 MA66
NA14 ZA81 ZC41
4C085 AA13 AA14 AA16 CC22 CC23 EE01 GG02 GG03 GG04 GG05
GG06 GG08 GG10
4C086 AA01 AA02 EA16 NA14 ZA81 ZC41
4H045 AA10 AA11 AA30 BA41 CA40 DA50 DA76 EA50 FA71 FA74
GA26