

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2011-509079
(P2011-509079A)

(43) 公表日 平成23年3月24日(2011.3.24)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C 12 N 15/09 (2006.01)	C 12 N 15/00	Z N A A 2 G O 4 5
C 07 K 14/705 (2006.01)	C 07 K 14/705	4 B O 2 4
C 07 K 16/28 (2006.01)	C 07 K 16/28	4 B O 6 3
C 12 Q 1/02 (2006.01)	C 12 Q 1/02	4 B O 6 4
C 12 N 1/15 (2006.01)	C 12 N 1/15	4 B O 6 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 88 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2010-540186 (P2010-540186)	(71) 出願人	510175388 オックスフォード ビオトヘラペウトイクス エルティーディー.
(86) (22) 出願日	平成20年12月24日 (2008.12.24)	(74) 代理人	100097456 弁理士 石川 徹
(85) 翻訳文提出日	平成22年8月16日 (2010.8.16)	(72) 発明者	クフリストイアン ロフルフフ 英国 オーエックス14 4アールワイ オクオン アビングドン ミルトン パル ク 94 エー
(86) 國際出願番号	PCT/IB2008/003634		
(87) 國際公開番号	W02009/087462		
(87) 國際公開日	平成21年7月16日 (2009.7.16)		
(31) 優先権主張番号	61/008,775		
(32) 優先日	平成19年12月24日 (2007.12.24)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】エフリンA型受容体10タンパク質

(57) 【要約】

本発明は、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは脾癌の治療、スクリーニング、診断及び予後のための、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは脾癌治療の効果をモニタリングするための、並びに薬剤開発のための、エフリンA型受容体10タンパク質に基づく、方法並びに組成物を提供する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌を治療又は予防する方法であって、エフリンA型受容体10若しくはその断片に特異的結合し得る親和性試薬、及び医薬として許容し得る希釈剤若しくは担体を含む組成物の治療上有効量をその必要のある対象に投与することを含み、該エフリンA型受容体10が前記癌において過剰発現する、前記方法。

【請求項 2】

エフリンA型受容体10若しくはその断片に特異的結合し得る親和性試薬。

【請求項 3】

治療的部分を含む又は治療的部分に抱合化されている、請求項2記載の親和性試薬。

【請求項 4】

前記治療的部分が細胞傷害性部分又は放射性アイソタイプである、請求項3記載の親和性試薬。

【請求項 5】

検出可能な標識を含む又は検出可能な標識に抱合化されている、請求項2記載の親和性試薬。

【請求項 6】

抗体である、請求項2～5のいずれか1項記載の親和性試薬。

【請求項 7】

単離されたモノクローナル抗体、若しくはその抗原結合部分、抗体断片、又は抗体模倣体である、請求項6記載の抗体。

【請求項 8】

前記抗体がIgG1、IgG2、IgG3又はIgG4アイソタイプの全長抗体である、請求項7記載の単離されたモノクローナル抗体。

【請求項 9】

前記抗体が、全抗体、抗体断片、ヒト化抗体、单鎖抗体、免疫複合体、脱フコシル化抗体及び二重特異性抗体からなる群から選択される、請求項7記載の単離されたモノクローナル抗体。

【請求項 10】

前記断片が、ユニボディ、ドメイン抗体及びナノボディからなる群から選択される、請求項7記載の抗体断片。

【請求項 11】

前記模倣体が、アフィボディ、DARPin、アンチカリン、アビマー、バーサボディ及びデュオカリンからなる群から選択される、請求項7記載の抗体模倣体。

【請求項 12】

ヒト補体の存在下で、エフリンA型受容体10抗原発現細胞に対し細胞傷害性を有する、請求項7記載のモノクローナル抗体。

【請求項 13】

ヒト免疫エフェクター細胞の存在下で、エフリンA型受容体10抗原発現細胞に対し細胞傷害性を有する、請求項7記載のモノクローナル抗体。

【請求項 14】

請求項2～13のいずれか1項において定義した親和性試薬又はその断片の治療上有効量、及び医薬として許容し得る希釈剤又は担体を含む、医薬組成物。

【請求項 15】

請求項2～13のいずれか1項に定義した1以上の親和性試薬、及び医薬として許容し得る賦形剤を含む、請求項14記載の医薬組成物。

【請求項 16】

疾患を治療又は予防するのに使用するための、請求項2～13のいずれか1項に定義した作用物質、又は請求項14若しくは請求項15に定義した組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 17】

前記疾患が癌である、請求項16記載の作用物質。

【請求項 18】

前記癌が、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌又は膵癌である、請求項17記載の作用物質。

【請求項 19】

疾患を治療又は予防するのに使用するための、エフリンA型受容体10又はその断片。

【請求項 20】

前記疾患が癌である、請求項19記載のエフリンA型受容体10又はその断片。

【請求項 21】

前記癌が、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌又は膵癌である、請求項20記載のエフリンA型受容体10又はその断片。

【請求項 22】

膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌を治療又は予防する方法であって、請求項2～13のいずれか1項に定義する作用物質、又は請求項14若しくは請求項15に定義する組成物の治療上有効量を、その必要のある対象に投与することを含む、前記方法。

【請求項 23】

請求項7記載の単離された抗体又は抗原結合部分をコードする、単離された核酸分子。

【請求項 24】

請求項23記載の核酸分子を含む、発現ベクター。

【請求項 25】

請求項24記載の発現ベクターを含む、宿主細胞。

【請求項 26】

前記親和性試薬が、治療及び／又は診断における使用に適している、請求項2～13のいずれか1項記載の1以上の親和性試薬、又は請求項14に定義される組成物を含む、キット。

【請求項 27】

請求項16～18のいずれか1項記載の前記親和性試薬の使用についての取扱説明書をさらに含む、請求項26記載のキット。

【請求項 28】

ハイブリダイズ剤をさらに含む、請求項26又は請求項27記載のキット。

【請求項 29】

エフリンA型受容体10の活性を調節する化合物のスクリーニング方法であって：(a)エフリンA型受容体10若しくはその生物学的活性部分を候補化合物と接触させること；及び(b)エフリンA型受容体10の活性がこれにより調節されるかどうかを測定すること；を含む、前記方法。

【請求項 30】

(a) 試料において、エフリンA型受容体10若しくはその生物学的活性部分を、候補化合物と接触させること；及び(b)前記候補化合物との接触後の前記試料におけるエフリンA型受容体10若しくはその生物学的活性部分の活性を、前記候補化合物との接触前の前記試料におけるエフリンA型受容体10又はその生物学的活性部分の活性と、又は参照レベルの活性と比較すること；を含む、請求項29記載の方法。

【請求項 31】

エフリンA型受容体10の活性を阻害する化合物のスクリーニングの方法である、請求項29又は請求項30記載の方法。

【請求項 32】

エフリンA型受容体10又はその生物学的活性部分が、細胞上に、又は細胞により発現される、請求項29～31のいずれか1項記載の方法。

【請求項 33】

10

20

30

40

50

エフリンA型受容体10又はその生物学的活性部分が、それを発現する細胞から単離される、請求項29～31のいずれか1項記載の方法。

【請求項34】

エフリンA型受容体10又はその生物学的活性部分が、固相上に固定されている、請求項3記載の方法。

【請求項35】

エフリンA型受容体10又はエフリンA型受容体10をコードする核酸の発現を調節する化合物のスクリーニング方法であって：(a)エフリンA型受容体10又はエフリンA型受容体10をコードする核酸を発現している細胞を候補化合物と接触させること；及び(b)エフリンA型受容体10又はエフリンA型受容体10をコードする核酸の発現がこれにより調節されるかどうかを測定すること；を含む、前記方法。10

【請求項36】

(a) 試料において、エフリンA型受容体10を発現する細胞、若しくはエフリンA型受容体10をコードする核酸を、候補化合物と接触させること；及び(b)前記候補化合物との接触後の前記試料におけるエフリンA型受容体10若しくはエフリンA型受容体10をコードする核酸の発現を、前記候補化合物との接触前の前記試料におけるエフリンA型受容体10又はエフリンA型受容体10をコードする核酸の発現と、又は参照レベルの発現と比較すること；を含む、請求項35記載の方法。

【請求項37】

エフリンA型受容体10又はエフリンA型受容体10をコードする核酸の発現を阻害する化合物のスクリーニングの方法である、請求項35又は請求項36記載の方法。20

【請求項38】

請求項29～37のいずれか1項記載の方法により得られる化合物。

【請求項39】

エフリンA型受容体10若しくはエフリンA型受容体10をコードする核酸の活性又は発現を調節する化合物。

【請求項40】

エフリンA型受容体10若しくはエフリンA型受容体10をコードする核酸の活性又は発現を阻害する、請求項39記載の化合物。

【請求項41】

膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは肺癌を治療又は予防するのに使用するための、請求項38～40のいずれか1項記載の化合物。30

【請求項42】

膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは肺癌を治療又は予防する方法であって、請求項38～40のいずれか1項記載の化合物の治療上有効量を、その必要のある対象に投与することを含む、前記方法。

【請求項43】

エフリンA型受容体10をコードする核酸にハイブリダイズしてmRNAの転写を阻害できる、ハイブリダイズ剤。

【請求項44】

検出可能な標識を含む、又は検出可能な標識に抱合化されている、請求項43記載のハイブリダイズ剤。40

【請求項45】

請求項43又は請求項44に定義した1以上のハイブリダイズ剤、及び医薬として許容し得る希釈剤若しくは担体を含む、医薬組成物。

【請求項46】

前記ハイブリダイズ剤が、治療及び／又は診断の使用に適している、請求項43～45のいずれか1項記載の1以上のハイブリダイズ剤を含むキット。

【請求項47】

前記ハイブリダイズ剤のそれらの結合パートナーへの結合を検出して報告できる試薬を

10

20

30

40

50

さらに含む、請求項46記載のキット。

【請求項 4 8】

治療に使用するための、請求項43又は請求項44のいずれか1項に定義した、ハイブリダイズ剤。

【請求項 4 9】

前記治療が癌のためのものである、請求項48記載のハイブリダイズ剤。

【請求項 5 0】

前記癌が、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌又は膵癌から選択される、請求項49記載のハイブリダイズ剤。

【請求項 5 1】

膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌を治療又は予防する方法であって、エフリンA型受容体10をコードする核酸にハイブリダイズし得るハイブリダイズ剤、及び医薬として許容し得る希釈剤若しくは担体を含む組成物の治療上有効量を、その必要のある対象に投与することを含む、前記方法。

10

【請求項 5 2】

エフリンA型受容体10若しくはそのエピトープ含有断片、又はエフリンA型受容体10若しくはその断片をコードする核酸を、任意に免疫賦活剤と共に含む、免疫原性組成物。

【請求項 5 3】

エフリンA型受容体10若しくはそのエピトープ含有断片、又はエフリンA型受容体10若しくはそのエピトープ含有断片をコードする核酸を、任意に免疫賦活剤と共に含む、ワクチン組成物。

20

【請求項 5 4】

請求項52記載の組成物を対象に投与することを含む、免疫応答賦活法。

【請求項 5 5】

膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌を治療又は予防する方法であって、請求項52又は請求項53記載の組成物の治療上有効量を、その必要のある対象に投与することを含む、前記方法。

【請求項 5 6】

膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌を予防又は治療するのに使用するための、請求項52又は請求項53記載の組成物。

30

【請求項 5 7】

対象において、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌を検出、診断及び／又はスクリーニングし、若しくはこれらの進行をモニタリングする方法、又は抗膀胱癌、抗乳癌、抗結腸直腸癌、抗頭頸部癌、抗腎癌、抗肺癌若しくは抗膵癌の薬剤若しくは療法の効果をモニタリングする方法であって、前記対象における、エフリンA型受容体10若しくはその1以上の断片の存在若しくはレベル、又はエフリンA型受容体10をコードする核酸の存在若しくはレベル、又はエフリンA型受容体10の活性の存在若しくはレベルを検出することを含む、又は該レベルの変化を検出することを含む、前記方法。

【請求項 5 8】

候補対象における膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌を検出、診断及び／又はスクリーニングする方法であって、前記候補対象におけるエフリンA型受容体10若しくはその1以上の断片の存在、又はエフリンA型受容体10をコードする核酸の存在、又はエフリンA型受容体10の活性の存在を検出することを含み、ここで(a)健常対象のレベルと比較しての該候補対象における、エフリンA型受容体10若しくはその1以上の断片のレベルの上昇、若しくはエフリンA型受容体10をコードする核酸のレベルの上昇の存在、又はエフリンA型受容体10活性レベルの上昇の存在、又は(b)健常対象において対応する検出不可能なレベルと比較しての該候補対象における、エフリンA型受容体10若しくはその1以上の断片の検出可能なレベル、若しくはエフリンA型受容体10をコードする核酸の検出可能なレベルの存在、又はエフリンA型受容体10活性の検出可能なレベルの存在が、前記対象における膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌

40

50

の存在を示す、前記方法。

【請求項 5 9】

対象において、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌の進行をモニタリングする方法、又は抗膀胱癌、抗乳癌、抗結腸直腸癌、抗頭頸部癌、抗腎癌、抗肺癌若しくは抗膵癌の薬剤若しくは療法の効果をモニタリングする方法であって、第1の時点及びその後の時点での前記候補対象におけるエフリンA型受容体10若しくはその1以上の断片の存在、若しくはエフリンA型受容体10をコードする核酸の存在、若しくはエフリンA型受容体10の活性の存在、又は前記第1の時点での該対象におけるレベルと比較してその後の時点での対象におけるエフリンA型受容体10若しくはその1以上の断片のレベルの上昇若しくは低下、若しくはエフリンA型受容体10をコードする核酸のレベルの上昇若しくは低下の存在、又はエフリンA型受容体10の活性のレベルの上昇若しくは低下の存在を検出することを含み、これが前記対象における、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌の進行若しくは退行を示し、又は抗膀胱癌、抗乳癌、抗結腸直腸癌、抗頭頸部癌、抗腎癌、抗肺癌若しくは抗膵癌の薬剤若しくは療法の効果若しくは非効果を示す、前記方法。10

【請求項 6 0】

前記エフリンA型受容体10若しくはその1以上の断片の存在、若しくはエフリンA型受容体10をコードする核酸の存在、若しくはエフリンA型受容体10の活性の存在が、前記対象から得られる生体試料の分析により検出される、請求項57～59のいずれか1項記載の方法。20

【請求項 6 1】

前記対象から分析のために前記試料を得るステップを含む、請求項60記載の方法。

【請求項 6 2】

前記試料が、膀胱、胸部、結腸直腸、頭頸部、腎臓、肺又は膵臓組織の試料である、請求項60又は請求項61記載の方法。

【請求項 6 3】

エフリンA型受容体10若しくはその1以上の断片の存在、又はエフリンA型受容体10をコードする核酸の存在、又はエフリンA型受容体10の活性の存在が、定量的に検出される、請求項57～62のいずれか1項記載の方法。30

【請求項 6 4】

エフリンA型受容体10若しくはその1以上の断片の存在、又はエフリンA型受容体10をコードする核酸の存在、又はエフリンA型受容体10の活性の存在が、イメージング技術の使用を含む手段によって定量的に検出される、請求項63記載の方法。

【請求項 6 5】

エフリンA型受容体10若しくはその1以上の断片の存在、又はエフリンA型受容体10をコードする核酸の存在、又はエフリンA型受容体10の活性の存在を測定し、これにより膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌の細胞を限局化するための組織切片における免疫組織化学の使用を含む、請求項57～63のいずれか1項記載の方法。

【請求項 6 6】

エフリンA型受容体10若しくはその1以上の断片の存在、又はエフリンA型受容体10をコードする核酸の存在、又はエフリンA型受容体10の活性の存在が、インサイチュウ分析により検出される、請求項57～59のいずれか1項記載の方法。40

【請求項 6 7】

エフリンA型受容体10若しくはその1以上のエピトープ含有断片の存在が検出される、請求項57～66のいずれか1項記載の方法。

【請求項 6 8】

エフリンA型受容体10若しくはその1以上の断片の存在が、エフリンA型受容体10若しくはその1以上の断片に特異的結合し得る親和性試薬を使用して検出される、請求項67記載の方法。

【請求項 6 9】

10

20

30

40

50

前記親和性試薬が抗体である、請求項68記載の方法。

【請求項70】

エフリンA型受容体10をコードする核酸が検出される、請求項57～66のいずれか1項記載の方法。

【請求項71】

エフリンA型受容体10をコードする核酸が、エフリンA型受容体10をコードする核酸にハイブリダイズし得るハイブリダイズ剤を使用して検出される、請求項70記載の方法。

【請求項72】

エフリンA型受容体10の活性が検出される、請求項57～66のいずれか1項記載の方法。

【請求項73】

対象において、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌を検出、診断及び／又はスクリーニングし、若しくはこれらの進行をモニタリングする方法、又は抗膀胱癌、抗乳癌、抗結腸直腸癌、抗頭頸部癌、抗腎癌、抗肺癌若しくは抗膵癌の薬剤若しくは療法の効果をモニタリングする方法であって、前記対象における、エフリンA型受容体10若しくはその1以上のエピトープ含有断片に免疫特異的に結合し得る抗体の存在若しくはレベルを検出することを含む、又はそのレベルの変化を検出することを含む、前記方法。

10

【請求項74】

対象において、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌を検出、診断及び／又はスクリーニングする方法であって、前記対象において、エフリンA型受容体10若しくはその1以上のエピトープ含有断片に免疫特異的に結合し得る抗体の存在を検出することを含み、ここで(a)健常対象のレベルと比較しての前記対象におけるエフリンA型受容体10若しくはその1以上のエピトープ含有断片に免疫特異的に結合し得る抗体のレベルの上昇の存在、又は(b)健常対象において対応する検出不可能なレベルと比較しての前記対象におけるエフリンA型受容体10若しくはその1以上のエピトープ含有断片に免疫特異的に結合し得る抗体の検出可能なレベルの存在が、前記対象における膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌の存在を示す、前記方法。

20

【請求項75】

対象において、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌の進行をモニタリングする方法、又は抗膀胱癌、抗乳癌、抗結腸直腸癌、抗頭頸部癌、抗腎癌、抗肺癌若しくは抗膵癌の薬剤若しくは療法の効果をモニタリングする方法であって、第1の時点及びその後の時点での前記対象におけるエフリンA型受容体10若しくはその1以上のエピトープ含有断片に免疫特異的に結合し得る抗体の存在、前記第1の時点での前記対象におけるレベルと比較してその後の時点での前記対象におけるエフリンA型受容体10若しくはその1以上のエピトープ含有断片に免疫特異的に結合し得る抗体のレベルの上昇若しくは低下の存在を検出することを含み、これが前記対象における、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌の進行若しくは退行を示し、又は抗膀胱癌、抗乳癌、抗結腸直腸癌、抗頭頸部癌、抗腎癌、抗肺癌若しくは抗膵癌の薬剤若しくは療法の効果若しくは非効果を示す、前記方法。

30

【請求項76】

前記エフリンA型受容体10若しくはその1以上のエピトープ含有断片に免疫特異的に結合し得る抗体の存在が、前記対象から得られる生体試料の分析により検出される、請求項73～75のいずれか1項記載の方法。

40

【請求項77】

前記対象からの分析のために前記試料を得るステップを含む、請求項76記載の方法。

【請求項78】

前記試料が、膀胱、胸部、結腸直腸、頭頸部、腎臓、肺又は膵臓組織の試料である、請求項76又は請求項77記載の方法。

【請求項79】

膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌を有する候補対象にお

50

いて検出され得るレベルが、健常対象におけるレベルより2倍以上高い、請求項57～78のいずれか1項記載の方法。

【請求項 8 0】

エフリンA型受容体10若しくはその断片を発現する細胞を殺傷する方法であって、前記細胞を、エフリンA型受容体10若しくはその断片に特異的結合し得る親和性試薬と接触させることを含み、前記親和性試薬が治療的部分を含むか又は治療的部分に抱合化されている、前記方法。

【請求項 8 1】

前記治療的部分が、細胞傷害性部分又は放射性アイソタイプである、請求項80記載の親和性試薬。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

(1. 緒言)

本発明は、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌及び脾癌のマーカーとしての有用性を有し、かつそれに対し治療抗体（若しくは他の親和性試薬）又は他の医薬品を製造し得る生物学的標的も形成する、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌及び脾癌に関連するタンパク質の同定、前記タンパク質／ポリペプチドを含む製剤／組成物、療法における前記タンパク質／ポリペプチド若しくはそれらを含む組成物の使用、療法における使用的ための抗体、関連ポリペプチドに対する治療抗体若しくは抗体の組合せを含む組成物、並びに療法におけるそれらの使用に関する。また、本発明は、関連するタンパク質、その断片、又は膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌及び脾癌の1以上の診断のために該タンパク質等に対して指示された抗体、前記タンパク質、断片若しくは抗体を含むキット、並びに診断方法における前記キットの使用にも及ぶ。

20

【背景技術】

【0 0 0 2】

(本発明の背景)

(膀胱癌)

米国において、膀胱癌は、男性の4番目に最も一般的な型の癌、及び女性の9番目に最も一般的な型の癌である。毎年、51,000人超の男性及び17,000人の女性が膀胱癌と診断され、合計約14,000人が死亡する。男性における膀胱癌のより高い発生率の1つの理由は、女性においてよりも男性において非常に高度に活性であるアンドロゲン受容体が、その癌の発生において主要な役割を果たすということである。

30

【0 0 0 3】

膀胱癌の発生率は、年齢と共に増加する。70歳よりも上の人々は、55-69歳の人々より2～3倍高頻度に、及び30～54歳の人々より15～20倍高頻度に、該疾患を発生する。膀胱癌は、男性において2～3倍より一般的である。喫煙は、主要な寄与因子であり、先進諸国において、男性の事例では最高65パーセント、及び女性の事例では30パーセントの割合を占める。

40

【0 0 0 4】

米国において、およそ20億米国ドルが膀胱癌を治療することに費やされていると推定されている。膀胱癌調査へのNCIの投資は、2000年の19,100,000米国ドルから2005年の推定34,800,000米国ドルへ増加した。

【0 0 0 5】

(膀胱癌診断)

ほとんどの患者は、最初に膀胱癌と診断されたとき、膀胱（74%）に限定されるそれらの癌を有する。19%の事例においてこの癌は膀胱の外側で隣接組織に広がり、3%においてこの癌は遠い部位まで広がった。

【0 0 0 6】

膀胱癌は、静脈腎盂像（FVP）、コンピュータ断層撮影（CT）走査、磁気共鳴映像法（M

50

RI) 走査又は超音波などの膀胱鏡検査、生検、尿細胞学及びイメージング試験を使用して診断できる。

【0007】

膀胱癌は、米国対癌合同委員会(AJCC)TNMシステムを使用して、ステージI~IVに段階化した。

【0008】

(膀胱癌治療)

膀胱癌の治療の主要型は、手術、放射線療法、免疫療法及び化学療法である。手術は、単独又は他の処置と併用して、事例の90%超において使用される。初期又は表在性膀胱癌については、経尿道的切除(TUR)が最も一般的である。最初に診断されたとき、患者の約70-80%は表在性癌を有する。膀胱癌が侵襲性の場合、膀胱切除がしばしば必要である。局所的に進行した膀胱癌についての代替的方法は、放射線療法及び化学療法を伴うTURであり得る。

10

【0009】

バチルス属のカルメット ゲラン桿菌(BCG)を、低ステージ膀胱癌を治療するための免疫療法として使用できる。

【0010】

腫瘍免疫賦活剤又はアジュバント化学療法は、膀胱癌の治療に使用できる。マイトマイシン及びチオテパは、膀胱内化学療法に最も高頻度で使用される薬剤である。膀胱癌を治療するために使用される全身化学療法の併用には、M-VAC(メトトレキサート、ビンプラスチン、ドキソルビシン及びシスプラチン)、MCV(メトトレキサート、シスプラチン及びビンプラスチン)及びGemCIS(ゲムシタビン及びシスプラチン)を含む。

20

【0011】

外照射療法又は局所若しくは組織内放射線療法は、手術後に化学療法と併用できる。

【0012】

ステージごとの膀胱癌生存:

【表1】

ステージ	相対的5年生存率
0	95%
I	85%
II	55%
III	38%
IV	16%

30

【0013】

(乳癌)

世界的に、乳癌は、最も一般的な癌であり(全ての癌事例の10%)、かつ女性における癌死の主要な原因(癌死の6%)である。乳癌の世界的な発生率は、1年あたり1,000,000超の事例であり、約400,000人が死亡する。北アメリカの女性は、世界中で最も高い乳癌の割合を有する(1年あたり200,000超の新規事例で約40,000人が死亡する)。女性の人生におけるある時点で侵襲性乳癌を発生する可能性は、約8分の1である。乳癌発生率は年齢と共に増加し、40歳以降で急上昇する。米国において、侵襲性乳癌の約77%は、50歳を超えた女性に起こる。米国において、およそ8,100,000,000米国ドルが、毎年、乳癌を治療することに費やされていると推定されている。

40

(乳癌診断)

初期診断は、処理が成功する可能性を向上させる。乳房X線写真、臨床胸部検査及び胸部自己診断などのスクリーニング方法は、乳癌を検出することに有用である。現在の診断

50

法には、胸部超音波、ダクトグラム（ductogram）、全視野デジタル乳房X線撮影（FFDM）、シンチマンモグラフィ（scintimammography）及びMRIを含む。生検（細針吸引生検、コア生検又は外科的生検）は、その後、乳癌の存在を確認するために実行される。胸部X線、骨のスキャン、CT、MRI及びPETなどのイメージング試験は、乳癌が拡散したかどうかを検出するために使用される。

【0014】

（乳癌ステージング）

乳癌は、米国対癌合同委員会（AJCC）TNMシステムを使用して、ステージ0～ステージIVに段階化した。非浸潤性癌である腺管上皮内癌（DCIS）は、新規乳癌事例の20%を占め、これはステージ0である。乳癌のこの初期で診断されるほぼ全ての女性は、治癒可能である。浸潤性（侵襲性）腺管癌（IDC）は、侵襲性乳癌及び浸潤性（侵襲性）小葉癌（ILC）の80%を占め、これは侵襲性乳癌の5%を占め、より重篤なステージI～IVの癌であり、転移し得る。

10

【0015】

（乳癌治療）

乳房温存手術（乳腺腫瘍摘出）又は乳房切除は、乳癌についての通常の治療である。ステージI又はIIの乳癌については、乳房温存手術は、乳房切除と同程度に効果的である。患者は、それから再建手術を受けることができる。腋窩リンパ節サンプリング及び除去又はセンチネルリンパ節生検（SLNB）は、この癌がリンパ節まで広がったかどうかを知るために実行される。

20

【0016】

腫瘍免疫賦活剤化学療法は、手術の前に、大きな癌を縮小させるために実施できる。手術後のアジュvant化学療法は、乳癌再発の危険性を低下させる。化学療法は、癌が胸部及び腕下領域の外側に拡散した女性についての主要な治療として使用することもできる。使用される化学療法薬には、アントラサイクリン（例えば、メトトレキサート、フルオロウラシル、ドキソルビシン、エピルビシン）、タキサン（例えば、パクリタキセル、ドセタキセル、ビノレルビン）及びアルキル化剤（例えば、シクロホスファミド）を含む。

【0017】

いったん化学療法が完了すると、放射線療法（通常は外照射であるが、しばしば近接照射療法）が与えられる。

30

【0018】

選択的エストロゲン受容体モジュレータ（例えばタモキシフェン）とのホルモン療法は、エストロゲン受容体陽性乳癌を有する女性に与えることができる。手術後5年間タモキシフェンを摂取することは、初期の乳癌を有する女性において約50%再発を減らすことができる。エクセメスタン、レトロゾール又はアナストロゾールなどのアロマターゼ阻害薬も使用できる。

【0019】

HER2陽性の癌（乳癌の約1/3）を有する女性は、トラスツヅマブ（ハーセプチン）などの生物学的反応修飾物質を与えられることが可能である。臨床試験は、化学療法へのトラスツヅマブの追加が、HER2陽性初期乳癌を有する女性において、手術後化学療法単独よりも再発割合及び死亡率を低下させることを示した。

40

【0020】

（ステージごとの乳癌生存）

1995～1998年に乳癌と診断された患者は、ステージ0及びIについて100%、ステージIIAについて92%、ステージIIBについて81%、ステージIIIAについて67%、ステージIIIBについて54%、及びステージIVについて20%の5年相対生存率を有した。

【0021】

（結腸直腸癌）

結腸直腸癌（CRC）は、癌関連の罹患率及び死亡率の主要な原因であり、1年あたり推定500,000人の死に関与し、大部分が西側の先進国におけるものである。これらの領域にお

50

いて、CRCは、3番目に一般的な悪性病変である（米国及びEUの1年あたりの推定新規事例数は、1年あたりおよそ350,000である）。米国において結腸直腸癌の治療に関連した推定保健医療費は、8,000,000,000ドルを超える。

【0022】

(結腸直腸癌診断)

今日において、便潜血試験、及び高度に浸潤的手順である結腸鏡検査は、結腸直腸癌の最も頻繁に使用されるスクリーニング及び診断方法である。他の診断ツールには、軟性S状結腸鏡検査（結腸の約半分のみの観察を可能にする）及び二重造影バリウム注腸（DCBE、X線像を得るために）を含む。

【0023】

(結腸直腸癌ステージング)

CRCは、4つの異なるステージを有する：米国国立衛生研究所（NIH）によると、ステージI疾患を有する患者は90%超の5年生存率を有し、転移性ステージIV疾患を有する患者は5%未満の生存率を有する。

【0024】

(結腸直腸癌治療)

いったんCRCと診断されたならば、正しい治療を選択すべき必要がある。手術は通常、直腸癌の主要な治療であるが、放射線及び化学療法がしばしば手術前になされる。手術の可能的副作用は、手術における出血、深部静脈血栓、及び手術中の近傍器官への損傷を含む。

【0025】

現在、結腸直腸癌患者の60パーセントは、それらの疾患を治療するために化学療法を受けるが、この治療形態は、人口の数パーセントのみに利益になる一方、大きな毒性の危険性をもたらし、それゆえ患者の選択基準をよりよく規定する必要を示す。

【0026】

結腸直腸癌は、初期診断後、平均18ヵ月以内に30～40パーセントの再発率を有する。全ての癌と同様に、それがより早く検出されるほど、特に病理学者が大多数のCRC腫瘍が良性腺腫から一連の明確に規定されたステージで発生することを認めることができることほど、その癌が治癒する見込みは高くなる。

【0027】

ステージごとの結腸癌生存

【表2】

ステージ	生存率
I	93%
IIA	85%
IIB	72%
IIIA	83%
IIIB	64%
IIIC	44%
IV	8%

【0028】

(頭頸部癌)

用語頭頸部癌とは、口唇、口腔（口）、鼻腔、副鼻腔、咽頭及び喉頭を含む、上気道消化管から生じる生物学的に類似の癌の群をいう。大部分の頭頸部癌は扁平上皮癌であり、これらの領域の粘膜的裏打ち（上皮）から生じる。頭頸部癌はしばしば首のリンパ節まで

10

20

30

40

50

広がり、これはしばしば診断時の疾患の第1の徴候である。

【0029】

米国における頭頸部癌の新規事例数は、2006年に40,490であり、成人悪性の約3%を占めた。11,170人の患者が、2006年にそれらの疾患で死亡した。世界的な発生率は、毎年500,000事例を上回る。頭頸部癌の85%は、タバコ使用に関連する。北アメリカ及びヨーロッパにおいて、腫瘍は通常、口腔、中咽頭又は喉頭から生じるが、鼻咽頭癌は、地中海の国々及び極東においてより一般的である。東南中国及び台湾において、頭頸部癌、特に鼻咽頭癌は、青年において最も一般的な死因である。アフリカ系アメリカ人は、若年齢での発生、高い死亡率、及び提示に際してより進行した疾患を伴い、頭頸部癌に偏って罹患する。

【0030】

(頭頸部癌診断)

頭頸部癌は、理学的検査、内視鏡検査、X線、コンピュータ断層撮影(CT)走査、磁気共鳴映像法(MRI)走査、PET走査及び生検を含むことができる試験の組合せを使用して診断される。頭頸部癌の初期徴候はしばしば検出されず、大多数の頭頸部癌患者は進行した疾患を呈し、かつしばしば二次腫瘍を有する。

【0031】

(頭頸部癌ステージング)

頭頸部癌は、米国対癌合同委員会(AJCC)TNMシステムを使用して、ステージI~IVに段階化される。頭頸部癌の全てのステージについての5年生存は35~50%であり、これは部分的には遅い提示に起因する。ステージI及びIIの生存率は40~95%であり、ステージIII及びIVの生存率は0~50%である。頭頸部癌患者の少なくとも1/3は、それらの疾患の結果として最終的に死亡すると予測される。5年死亡率は、治療モダリティの進歩にもかかわらず、この数十年間それほど変化していない。

【0032】

(頭頸部癌治療)

手術及び放射線療法は主要な療法モダリティであり、しばしば併用される。化学療法は、手術の有無にかかわらず、導入療法として、又は放射線療法に対する補助として、使用できる。

【0033】

(腎臓)

腎癌は、世界的に癌事例の約1.9%及び死の1.5%を占める。腎癌の世界的な発病率は、約208,000事例であり、100,000超が死亡する。腎癌の発病率は先進諸国において非常に高く、西ヨーロッパにおいて6番目に一般的な癌の形態である。毎年米国において、約38,900の腎癌の新規事例が診断され、約12,800が死亡する。腎癌は45歳未満では非常に稀であり、その発生率は55歳~84歳において最も高い。腎癌を呈している人々の割合は、1年あたり約1.5%増加してきたが、死亡率は増加していかなかった。腎細胞癌は、悪性腎腫瘍の90%超を占める。米国において毎年、およそ19億米国ドルが腎癌を治療することに費やされていると推定された。

【0034】

(腎癌診断)

多くの腎細胞癌が遅い段階で発見される。腎細胞癌はいかなる痛み又は不快も生じることなく非常に大きくなることができ、早期に腎細胞癌を検出できる単純な試験は存在しない。腎細胞癌患者の約25%は、診断されるときに、既にそれらの癌の転移拡散を有する。

【0035】

腎細胞癌はしばしば、CTスキャン、MRI、超音波、陽電子放射断層撮影(PET)走査、静脈腎盂像(FVP)及び/又は血管造影法を使用して、生検を必要とすることなく診断できる。しかし細針吸引生検は、イメージング結果が腎臓を取り出すことを正当化するのに十分決定的でない場合、価値があり得る。

【0036】

(腎癌ステージング)

10

20

30

40

50

腎細胞癌は、通常、1~4のスケールに等級分けされる。腎細胞癌はまた、米国対癌合同委員会（AJCC）TNMシステムを使用して、ステージI~IVに段階化される。カリフォルニア大学ロサンゼルス校の総合ステージングシステムを使用することもでき、これは拡散腫瘍を有しない患者を3群、すなわち低リスク、中リスク及び高リスクに分類する。5年癌特異的生存は、低リスク群について91%であり、中リスク群について80%であり、高リスク群について55%である。拡散腫瘍を有する患者はまた、3群、すなわち低リスク、中リスク及び高リスクに分類される。5年癌特異的生存は、低リスク群について32%であり、中リスク群について20%であり、高リスク群について0%である。

【0037】

(腎癌治療)

10

根治的腎摘除（及び、しばしば局所的リンパ節切除）、部分的な腎摘除又は腹腔鏡腎摘除による手術は、腎細胞癌の主要な治療である。腎細胞癌腫は放射線にほとんど感受性がなかった。研究が生存率の改良を示さなかつたので、この癌を取り除く前又は後に放射線療法を使用することは日常的に推奨されない。

【0038】

腎細胞癌は、現在の形態の化学療法に非常に抵抗性である。ビンプラスチン、フロキシウリジン及び5-フルオロウラシル（5-FU）などのある種の薬剤は、若干効果的である。5-FU及びゲムシタビンの併用は、一部の患者のためになった。5-FU様薬剤であるカペシタビンも、いくつかの利点を有し得る。

【0039】

20

サイトカイン（インターロイキン-2（IL-2）及びインターフェロン- γ ）は、転移性腎細胞癌の標準治療のうちの1つになった。サイトカインは、患者の約10%~20%において、この癌をその元のサイズの半分未満に縮小させる。IL-2に応答する患者は、持続的な応答を有する傾向がある。IL-2、インターフェロン及び化学療法（5-フルオロウラシルを使用）の併用を用いた最近の研究も有望であり、部分的な又は完全な寛解のより良好なチャンスを提供し得る。しかしながら、サイトカイン療法は、重篤な副作用を有する。

【0040】

ソラフェニブ（ネクサバル（Nexavar））、スニチニブ（スーテント（Sutent））及びベバシヅマブ（アバスチン）は、腎細胞癌に対しても有効であり得る他の薬剤である。

【0041】

30

ステージごとの腎癌生存

【表3】

Tステージの癌	5/10年癌特異的生存
T1	95%/91%
T2	80%/70%
T3a	66%/53%
T3b	52%/43%
T3c	43%/42%

40

【0042】

(肺癌)

肺癌は、世界的に最も一般的な癌であり（癌事例の約12%を占める）、癌からの主要な死因である（死亡の約18%を占める）。肺癌の世界的な発病率は、1年あたり1,300,000であり、1,100,000超の死亡数を有する。米国において、1年あたり約170,000の新規事例（全ての癌の約13%）があり、約160,000が死亡（癌死の約28%）である。肺癌は、女性より

50

男性においてより高度に蔓延している。肺癌と診断される人々のほぼ70%は、65歳より上であり、全ての事例の3%未満は、45歳未満の人々で発見される。全ての肺癌の約15%は、体内に広く拡散する傾向がある小細胞型（SCLC）であり、残りの85%は非小細胞（NSCLC）である。米国において毎年、およそ9.6億米国ドルが肺癌を治療することに費やされると推定されている。

【0043】

(肺癌診断)

肺癌は胸部X線で検出できる前でさえもしばしば転移するので、肺癌は致命的な疾患である。通常、肺癌の症状は、進行した段階まで現れない。これまでに、人の治癒機会向上させることを示したスクリーニング試験は存在しない。胸部X線、CTスキャン、MRI走査又はPET走査などのイメージング試験を使用して、肺癌を検出することができる。診断を確認する試験をそれから実行する。該試験には、痰細胞学、針生検、気管支鏡法、気管支内超音波及び完全血球測定（CBC）を含む。

10

【0044】

(肺癌ステージング)

肺癌と診断された人々の約60%は、診断の1年範囲内で死亡し、75%は2年以内に死亡する。NSCLCと診断された人々についての5年生存率は約15%であり、SCLCについての5年生存率は約6%である。NSCLCは、米国対癌合同委員会（AJCC）TNMシステムを使用して、ステージ0～ステージIVに段階化される。ステージごとの5年生存率は、以下の通りである：ステージI:47%、ステージII:26%、ステージIII:8%、及びステージIV:2%。SCLCは、2段階システム、すなわち限られたステージ及び広いステージを有する。SCLC患者の約2/3は、診断で広範疾患を有する。SCLCが非常に初期に見つかり、肺のみに限局される場合、5年生存率は約21%であるが、患者の6%のみがこのカテゴリ内である。癌が拡散した場合、5年生存は約11%である。広範疾患を有する患者について、5年生存はわずか2%である。

20

【0045】

(肺癌治療)

手術は、NSCLCを治癒するための唯一の信頼性の高い方法である。手術の種類には、肺葉切除術、肺切除、部分切除術、及びビデオ補助胸部手術（小腫瘍について）を含む。特に患者の健康が手術を受けるにはあまりに劣っている場合、外照射療法がしばしば一次治療として使用される。放射線療法は、手術後に使用することもできる。化学療法は、一次治療として、又は手術に対する補助として、提供できる。他の治療が失敗した後、ゲフィチニブ又はエルロチニブなどの上皮細胞増殖因子受容体（EGFR）アンタゴニストを使用する標的治療を提供することもできる。ベバシズマブなどの抗血管新生薬は、進行した肺癌患者の生存を延長することが見出された。光力学性治療は、肺癌の治療としても調査されている。

30

【0046】

SCLCのための主要な治療は、化学療法単独、又は外照射療法及びごくまれに手術と併用しての化学療法である。

【0047】

NSCLC及びSCLCのために使用する化学療法薬には、シスプラチン、カルボプラチン、マイトマイシンC、イフォスファミド、ビンプラスチン、ゲムシタビン、エトポシド、ビノレルビン、パクリタキセル、ドセタキセル及びイリノテカンを含む。

40

【0048】

(膵癌)

膵癌は検出するのが非常に困難な癌であり、通常、患者の予後は非常に悪い。1年あたりの新規事例及び死亡の数は、ほぼ等しい。膵癌の世界的な発病率は、1年あたりおよそ30,000事例（全ての癌事例の約2%）であり、約225,000が死亡する（癌死の3.4%）。膵癌は、先進世界においてより高度に蔓延している。米国において、1年あたり約34,000の新規事例があり、約32,000が死亡である。米国において毎年、およそ1,500,000,000米国ドルが膵癌を治療することに費やされていると推定されている。

50

【0049】

(脾癌診断)

脾癌は検出するのが非常に困難であり、極めて少数の脾癌が早期に発見される。脾癌が他の器官に広がるまで、患者は通常症状がない。現在、初期の脾臓癌を正確に検出できる血液検査又は容易に利用できるスクリーニング試験は存在しない。内視鏡超音波とそれに続く生検は、脾癌を診断する最善の方法である。他の検出方法には、CT、CTガイド針生検、PET、超音波検査法及びMRIを含む。CA 19-9及び癌胚抗原(CEA)の血中濃度は上昇し得るが、血中濃度が検出されるのに十分高い頃には、脾癌はもはや初期ではない。

【0050】

(脾癌ステージング)

脾癌は、米国対癌合同委員会(AJCC)TNMシステムに従う4つのステージ、すなわちステージI~ステージIVを有する。脾癌は、除去可能、局所的進行(切除不能)、及び転移性の癌にも分けられる。進行癌患者について、全体の生存率は5年で1%未満であり、大部分の患者は1年以内に死亡する。

【0051】

(脾癌治療)

手術は、脾癌を治癒する唯一の方法である。脾癌の約10%は診断時に脾臓の範囲内に完全に含まれ、手術によって全ての癌を取り除く試みはこれらの患者の一部において成功し得る。癌を完全に取り除く意図をもって手術を受けた患者の5年生存は、約20%である。癌の全てを取り除くことが可能であり得る場合、潜在的には治療的手術、通常では脾十二指腸切除(ホイップル手順)によって使用される。腫瘍を取り除くにはあまりに広範囲である場合、対症手術を実行できる。癌の一部だけを取り出すことは、患者を長生きさせない。脾癌手術は、合併症の高い可能性を有するので、実行するのが困難である。

【0052】

化学療法と併用した外照射療法は手術の前又は後に提供でき、腫瘍が手術によって取り除かれるにはあまりに広範囲にわたる患者に提供することもできる。使用される主な化学療法薬は、ゲムシタビン及び5-フルオロウラシルである。エルロチニブ及びセツキシマブなどの薬剤を使用する標的治療は、進行した脾癌を有する患者の利益であり得る。

【0053】

(治療的挑戦)

先に記載した癌の治療における主な挑戦は、特に5年生存が未だ不良である高度に進行性の疾患について、早期検出率を向上させること、疾患進行を追跡して再発を確認するために使用することができる新規な非侵襲性のマーカーを発見すること、改良されかつより中毒性の低い療法を発見することである。癌細胞に高度に特異的である標的、例えば腫瘍細胞の表面に発現されるものを同定する大きな必要性があり、これにより該癌細胞を免疫療法及び標的毒素のような有望な新規アプローチで攻撃できる。

【発明の概要】

【0054】

(本発明の要旨)

本発明は、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは脾癌のスクリーニング、診断、予後及び療法のための、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは脾癌患者の層化のための、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは脾癌治療の有効性をモニターするための、並びに膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは脾癌の治療用薬剤開発のための、方法及び組成物を提供する。

【0055】

出願人らは、質量分析を使用して、iTRAQ試薬、及び結腸直腸癌、腎癌又は肺癌組織試料から抽出された膜タンパク質のトリプシン消化を用いたタグ化により生じたペプチドを同定した。ペプチド配列は、既存のタンパク質及びcDNAデータベース並びに同定された対応する遺伝子配列と比較した。免疫組織化学実験を行い、強い染色が膀胱癌、乳癌、結腸

10

20

30

40

50

直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌及び膵癌試料において観察された。本発明のタンパク質は、以前に、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌の細胞膜から生じること又はこれらの癌において発見されたことの報告がなされておらず、これは本発明のタンパク質が新たな診断的及び治療的価値のあるタンパク質であることを表す。

【0056】

本発明の第1の態様は、癌、特に膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌などの疾患の治療、スクリーニング、検出及び／又は診断における使用のための、エフリンA型受容体10若しくはその断片に特異的に結合し得る作用物質、又はエフリンA型受容体10若しくはその断片をコードする核酸にハイブリダイズし得るハイブリダイズ剤、又はエフリンA型受容体10の活性を検出し得る作用物質である。

10

【0057】

本発明の別の態様は、癌、特に膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌などの疾患の治療、スクリーニング、検出及び／又は診断における使用のための、エフリンA型受容体10若しくはその断片である。

【0058】

本発明の別の態様は、エフリンA型受容体10若しくはその断片に特異的結合し得る親和性試薬であり、例えば、検出可能な標識を含むか若しくはそれに抱合化されている、又は細胞傷害性部分などの治療的部を含むか若しくはそれに抱合化されている、親和性試薬である。親和性試薬は、例えば、抗体であり得る。

20

【0059】

いくつかの実施態様において、本発明の抗体は、以下からなる群から選択される：全抗体、抗体断片、ヒト化抗体、単鎖抗体、免疫複合体、脱フコシル化抗体、及び二重特異性抗体。抗体断片は、以下からなる群から選択できる：ユニボディ、ドメイン抗体及びナノボディ。いくつかの実施態様において、本発明の免疫複合体は、治療剤を含む。本発明の別の態様において、治療剤は、細胞傷害剤又は放射性同位元素である。

【0060】

いくつかの実施態様において、本発明の抗体は、以下からなる群から選択される：アフィボディ、DARPin、アンチカリン、アビマー、バーサボディ及びデュオカリン。

【0061】

本発明の別の態様は、エフリンA型受容体10若しくはその断片をコードする核酸にハイブリダイズし得るハイブリダイズ剤、例えば検出可能な標識を含むか又はこれに抱合化されているハイブリダイズ剤である。ハイブリダイズ剤の1つの例は、抑制RNA（RNAi）である。他の例は、アンチセンスオリゴヌクレオチド及びリボザイムを含む。

30

【0062】

また本発明は、先に記載した方法におけるそれらの使用のための取扱説明書と共に、エフリンA型受容体10及び／又はその1以上の断片を含むか、又は1以上の先に記載した親和性試薬及び／又はハイブリダイズ剤を含むか、又はエフリンA型受容体10の活性を検出し得る1以上の作用物質を含む、キットを提供する。本キットは、前記親和性試薬及び／又はハイブリダイズ剤のそれらの結合パートナーへの結合を検出して報告できる試薬をさらに含むことができる。

40

【0063】

本発明の別の態様は、エフリンA型受容体10若しくはその断片に特異的結合し得る親和性試薬の治療上有効量を含む医薬組成物である。

【0064】

本発明の別の態様は、先に記載した1以上の親和性試薬若しくはハイブリダイズ試薬及び医薬として許容し得る希釈剤又は担体を含む、医薬として許容し得る希釈剤若しくは担体及び医薬組成物である。

【0065】

いくつかの実施態様において、本発明は抗エフリンA型受容体10抗体を生産する方法であって：本発明の抗体をコードする1以上の核酸分子を含む宿主細胞を得る工程；該宿主

50

細胞を宿主細胞培養で増殖させる工程；1以上の核酸分子が発現される宿主細胞培養条件を提供する工程；及び、該宿主細胞から又は該宿主細胞培養から抗体を回収する工程；を含む、前記生産方法を提供する。

【0066】

他の本発明の態様は、本発明の抗体を生産する方法であって：ヒト免疫グロブリン遺伝子を含むトランスジェニック動物をエフリンA型受容体10ペプチドで免疫をする工程；前記トランスジェニック動物からB細胞を回収する工程；前記B細胞からハイブリドーマを作る工程；エフリンA型受容体10を結合する抗体を発現するハイブリドーマを選択する工程；及び、前記選択されたハイブリドーマからエフリンA型受容体10を結合する前記抗体を回収する工程；を含む、前記生産方法に関する。 10

【0067】

他の実施態様において、抗エフリンA型受容体10抗体を生産する方法は：
ヒト免疫グロブリン遺伝子を含むトランスジェニック動物をエフリンA型受容体10ペプチドで免疫する工程；
前記トランスジェニック動物のB細胞からmRNAを回収する工程；
前記mRNAをcDNAに変換する工程；
前記cDNAによってコードされる抗エフリンA型受容体10抗体が前記ファージの表面に提示されるように、ファージにおいて前記cDNAを発現させる工程；
抗エフリンA型受容体10抗体を提示するファージを選択する工程；
前記抗エフリンA型受容体10免疫グロブリンをコードする前記選択されたファージから核酸分子を回収する工程；
宿主細胞において前記回収された核酸分子を発現させる工程；及び、
エフリンA型受容体10を結合する前記宿主細胞から抗体を回収する工程；を含む。 20

【0068】

本発明の別の態様は、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌の治療又は予防のための、エフリンA型受容体10ポリペプチド、その1以上の免疫原性断片又は誘導体の使用を提供する。

【0069】

別の態様において、本発明は、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌を治療する方法であって、(a)膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌の発症又は発生を予防するために、(b)膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌の進行を予防するために、又は(c)膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌の症状を寛解させるために、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌を有する患者に、本発明のタンパク質の発現若しくは生物活性（又はその両方）を調節（例えば、上方制御するか又は下方制御する）又は補完する化合物の治療上有効量を投与することを含む、前記方法を提供する。 30

【0070】

本発明の別の態様では、出願人らは、対象において、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌を検出、診断及び／若しくはスクリーニングし、若しくはこれらの進行をモニタリングする方法、又は抗膀胱癌、抗乳癌、抗結腸直腸癌、抗頭頸部癌、抗腎癌、抗肺癌若しくは抗膵癌の薬剤若しくは療法の効果をモニタリングする方法であって、前記対象における、エフリンA型受容体10若しくはその1以上の断片の存在若しくはレベル、又はエフリンA型受容体10をコードする核酸の存在若しくはレベル、又はエフリンA型受容体10の活性の存在若しくはレベルを検出することを含む、又は該レベルの変化を検出することを含む、前記方法を提供する。 40

【0071】

本発明の別の態様によると、出願人らは、候補対象における膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌を検出、診断及び／又はスクリーニングする方法であって、前記候補対象におけるエフリンA型受容体10若しくはその1以上の断片の存在、又はエフリンA型受容体10をコードする核酸の存在、又はエフリンA型受容体10の活性の存在 50

を検出することを含み、ここで(a)健常対象のレベルと比較しての候補対象における、エフリンA型受容体10若しくはその1以上の断片のレベルの上昇、若しくはエフリンA型受容体10をコードする核酸若しくはその相補体のレベルの上昇の存在、又はエフリンA型受容体10の活性レベルの上昇の存在、又は(b)健常対象において対応する検出不可能なレベルと比較しての候補対象における、エフリンA型受容体10若しくはその1以上の断片の検出可能なレベル、若しくはエフリンA型受容体10をコードする核酸の検出可能なレベルの存在、又はエフリンA型受容体10活性の検出可能なレベルの存在のいずれかが、前記対象における膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌の存在を示す、前記方法を提供する。

【0072】

10

本発明の別の態様によると、出願人らは、対象において、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌の進行をモニタリングする方法、又は抗膀胱癌、抗乳癌、抗結腸直腸癌、抗頭頸部癌、抗腎癌、抗肺癌若しくは抗膵癌の薬剤若しくは療法の効果をモニタリングする方法であって、第1の時点及びその後の時点での前記候補対象におけるエフリンA型受容体10若しくはその1以上の断片の存在、若しくはエフリンA型受容体10をコードする核酸の存在、若しくはエフリンA型受容体10の活性の存在、前記第1の時点での該対象におけるレベルと比較してその後の時点での該対象におけるエフリンA型受容体10若しくはその1以上の断片のレベルの上昇若しくは低下、若しくはエフリンA型受容体10をコードする核酸のレベルの上昇若しくは低下の存在、又はエフリンA型受容体10の活性のレベルの上昇若しくは低下の存在を検出することを含み、これが前記対象における、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌の進行若しくは退行を示し、又は抗膀胱癌、抗乳癌、抗結腸直腸癌、抗頭頸部癌、抗腎癌、抗肺癌若しくは抗膵癌の薬剤若しくは療法の効果若しくは非効果を示す、前記方法を提供する。

20

【0073】

エフリンA型受容体10若しくはその1以上の断片の存在、若しくはエフリンA型受容体10をコードする核酸の存在、若しくはエフリンA型受容体10の活性の存在は、例えば、前記対象から得られる生体試料の分析により検出されてよい。

【0074】

発明の方法は、典型的には、前記対象から分析のために生体試料を得る工程を含み得る。

30

【0075】

使用される試料は、血清試料又は組織試料、例えば膀胱、胸部、結腸直腸、頭頸部、腎臓、肺又は膵臓組織などの任意の供給源由来であり得る。例えば、転移性膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌の根拠を探す場合、1つには、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌転移の主要部位、例えば、膀胱癌については前立腺、子宮、腎、骨、肝臓又は肺；乳癌については肝臓、肺及び骨；結腸直腸癌については肝臓、腹膜腔、骨盤、後腹膜及び肺；頭頸部癌については肺、骨及び肝臓；腎癌については骨、肺及び肝臓；肺癌については脳、肝臓、骨及び副腎；及び、膵癌については肝臓；を調べるであろう。

【0076】

40

あるいは、エフリンA型受容体10若しくはその1以上の断片の存在、又はエフリンA型受容体10をコードする核酸の存在、又はエフリンA型受容体10の活性の存在は、インサイチュウ分析により検出できる。

【0077】

ある種の実施態様において、本明細書中に記載されている診断の方法は、少なくとも部分的に又は完全に、インビトロで実施できる。

【0078】

好適には、エフリンA型受容体10若しくはその1以上の断片の存在、又はエフリンA型受容体10をコードする核酸の存在、又はエフリンA型受容体10の活性の存在は、定量的に検出される。

50

【0079】

例えば、定量的に検出することは、以下を含むことができる：

- (a)生体試料を、エフリンA型受容体10に特異的な親和性試薬（前記親和性試薬は、任意に検出可能な標識に抱合化されている）と接触させること；及び、
- (b)結合が、該試料において該親和性試薬と少なくとも1つの種との間に発生したかどうかを検出すること（前記検出は、直接的又は間接的に実施される）。

【0080】

あるいは、エフリンA型受容体10若しくはその1以上の断片の存在、又はエフリンA型受容体10をコードする核酸の存在、又はエフリンA型受容体10の活性の存在は、イメージング技術の使用を含む手段によって定量的に検出できる。

10

【0081】

別の実施態様において、本発明の方法は、エフリンA型受容体10若しくはその1以上の断片の存在、又はエフリンA型受容体10をコードする核酸の存在、又はエフリンA型受容体10の活性の存在を測定し、これにより膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは肺癌の細胞を限局化するための、組織切片における免疫組織化学の使用を含む。

【0082】

一実施態様において、エフリンA型受容体10若しくはその1以上のエピトープ含有断片の存在は、例えば抗体などの、エフリンA型受容体10若しくはその1以上の断片に特異的結合し得る親和性試薬を使用して、検出される。

20

【0083】

別の実施態様において、エフリンA型受容体10の活性が検出される。エフリンA型受容体10は、受容体タンパク質チロシンキナーゼである。エフリンA型受容体10の活性は、特定のリガンドの結合に応答してのチロシン、セリン又はスレオニン残基（好ましくはチロシン）のリン酸化を測定することにより、検出される。好ましくは、エフリンA型受容体10の活性は、特定のリガンドの結合に応答してのエフリンA型受容体10アミノ酸配列のリン酸化を測定することにより、検出される。あるいは、特定のリガンドのエフリンA型受容体10への結合に応答してのエフリンA型受容体10結合タンパク質（好ましくは受容体タンパク質チロシンキナーゼのEphファミリーの別のメンバー）の特定のリン酸化を測定してもよい。受容体タンパク質チロシンキナーゼのEphファミリー及びそれらのそれぞれの天然結合リガンドの活性の説明は、H. Surawskaらの文献、Cytokine & Growth Factor Reviews 15:419-433, 2004に含まれる。

30

【0084】

本発明の別の態様によると、対象において、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは肺癌を検出、診断及び／又はスクリーニングし、若しくはこれらの進行をモニタリングする方法、又は抗膀胱癌、抗乳癌、抗結腸直腸癌、抗頭頸部癌、抗腎癌、抗肺癌若しくは抗肺癌の薬剤若しくは療法の効果をモニタリングする方法であって、前記対象における、エフリンA型受容体10若しくはその1以上のエピトープ含有断片に免疫特異的に結合し得る抗体の存在若しくはレベルを検出することを含み、又はそのレベルの変化を検出することを含む、前記方法が提供される。

40

【0085】

本発明の別の態様によると、対象において、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは肺癌を検出、診断及び／又はスクリーニングする方法であって、前記対象において、エフリンA型受容体10若しくはその1以上のエピトープ含有断片に免疫特異的に結合し得る抗体の存在を検出することを含み、ここで(a)健常対象のレベルと比較しての前記対象におけるエフリンA型受容体10若しくはその1以上のエピトープ含有断片に免疫特異的に結合し得る抗体のレベルの上昇の存在、又は(b)健常対象において対応する検出不可能なレベルと比較しての前記対象におけるエフリンA型受容体10若しくはその1以上のエピトープ含有断片に免疫特異的に結合し得る抗体の検出可能なレベルの存在のいずれかが、前記対象における膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは肺癌の存在を示す、前記方法も提供される。

50

【0086】

1つの具体的方法は、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌を検出、診断及び／又はスクリーニングする方法であって：

(a) 試験すべき生体試料をエフリンA型受容体10若しくはその1以上のエピトープ含有断片との接触に供すること；及び、

(b) 該対象において、エフリンA型受容体10若しくはその1以上のエピトープ含有断片に免疫特異的に結合し得る抗体の存在を検出すること；を含む。

【0087】

本発明の別の態様によると、対象において、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌の進行をモニタリングする方法、又は抗膀胱癌、抗乳癌、抗結腸直腸癌、抗頭頸部癌、抗腎癌、抗肺癌若しくは抗膵癌の薬剤若しくは療法の効果をモニタリングする方法であって、第1の時点及びその後の時点での前記対象におけるエフリンA型受容体10若しくはその1以上のエピトープ含有断片に免疫特異的に結合し得る抗体の存在、前記第1の時点での前記対象におけるレベルと比較してその後の時点での前記対象におけるエフリンA型受容体10若しくはその1以上のエピトープ含有断片に免疫特異的に結合し得る抗体のレベルの上昇若しくは低下の存在を検出することを含み、これが前記対象における、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌の進行若しくは退行を示し、又は抗膀胱癌、抗乳癌、抗結腸直腸癌、抗頭頸部癌、抗腎癌、抗肺癌若しくは抗膵癌の薬剤若しくは療法の効果若しくは非効果を示す、前記方法が提供される。

10

【0088】

エフリンA型受容体10若しくはその1以上のエピトープ含有断片に免疫特異的に結合し得る抗体の存在は、典型的には、前記対象から得られる生体試料（例示的な生体試料は、先に記載しており、当該試料は、膀胱、胸部、結腸直腸、頭頸部、腎臓、肺若しくは膵臓の組織、又は他には血液若しくは唾液の試料である）の分析によって検出される。

20

【0089】

該方法は、典型的には、前記対象から分析のために前記生体試料を得るステップを含む。

【0090】

検出できる抗体には、IgA、IgM及びIgG抗体を含む。

30

【0091】

上記方法のいずれかにおいて、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌を有する候補対象において検出され得るレベルは、健常対象におけるレベルよりも2倍以上高い。

【0092】

一実施態様において、検出され、予防され又は治療される癌は、膀胱癌である。

【0093】

別の実施態様において、検出され、予防され又は治療される癌は、乳癌である。

【0094】

別の実施態様において、検出され、予防され又は治療される癌は、結腸直腸癌である。

40

【0095】

別の実施態様において、検出され、予防され又は治療される癌は、頭頸部癌である。

【0096】

別の実施態様において、検出され、予防され又は治療される癌は、腎癌である。

【0097】

別の実施態様において、検出され、予防され又は治療される癌は、肺癌である。

【0098】

別の実施態様において、検出され、予防され又は治療される癌は、膵癌である。

【0099】

本発明の他の態様は、本明細書の以下において、及び特許請求の範囲において、記載される。

50

【図面の簡単な説明】**【0100】**

【図1】本発明のタンパク質のアミノ酸配列を示す。質量分析によって実験的に検出されるトリプシンペプチドはハイライト表示し、質量マッチペプチドは太字とし、タンデムペプチドには下線を引いている。

【図2】該核酸配列を示す。**【発明を実施するための形態】****【0101】****(発明の詳細な説明)**

以下に詳細に記載されている本発明は、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌を治療又は予防するための、哺乳動物対象への治療組成物の投与を包含する。また本発明は、哺乳動物対象における膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌の臨床スクリーニング、診断及び予後のための、特定の治療に最も応答しそうな患者を同定ための、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌の療法の結果をモニタリングするための、薬剤スクリーニング及び薬剤開発のための、方法並びに組成物を提供する。

10

【0102】

一態様において、本発明は、癌などの疾患、特に膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌の治療、スクリーニング、検出及び／又は診断における使用のための、エフリンA型受容体10に特異的結合し得る作用物質若しくはその断片、又はエフリンA型受容体10をコードする核酸にハイブリダイズし得るハイブリダイズ剤、エフリンA型受容体10の活性を検出し得る作用物質を提供する。

20

【0103】

本発明の別の態様は、エフリンA型受容体10に特異的結合し得る親和性試薬若しくはその断片であり、例えば、検出可能な標識を含むか若しくはそれに抱合化されている、又は細胞傷害性部分などの治療的部分を含むか若しくはそれに抱合化されている親和性試薬である。親和性試薬は、例えば、抗体であり得る。

【0104】

本発明の別の態様は、エフリンA型受容体10に特異的結合し得る親和性試薬若しくはその断片の治療上有効量を含む医薬組成物である。

30

【0105】

別の態様において、本発明は、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌の治療又は予防のために、エフリンA型受容体10ポリペプチド又はその1以上の断片若しくは誘導体の使用を提供する。

【0106】

また本発明は、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌の治療又は予防のための医薬品の製造における、エフリンA型受容体10ポリペプチド、その1以上の断片若しくは誘導体の使用を提供する。

【0107】

一態様において、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌の治療又は予防のために、エフリンA型受容体10ポリペプチド、その1以上の断片若しくは誘導体、又はその1以上の断片若しくは誘導体の治療上有効量を投与することを含む、治療方法が提供される。

40

【0108】

本発明は、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌の治療若しくは予防の方法、又は膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌に対し対象にワクチン接種する方法であって、エフリンA型受容体10ポリペプチド及び／又はその1以上の抗原性若しくは免疫原性断片の有効量を対象に投与するステップを含む前記方法をさらに提供する。

【0109】

50

哺乳動物対象は、ヒト以外の哺乳動物でもよいが、好ましくはヒト、より好ましくはヒトの成人、すなわち少なくとも21歳（より好ましくは、少なくとも35歳、少なくとも50歳、少なくとも60歳、少なくとも70歳又は少なくとも80歳）のヒト対象である。

【0110】

一態様において、対象において免疫応答を誘発し得る組成物であって、エフリンA型受容体10ポリペプチド及び／又はその1以上の抗原性若しくは免疫原性断片、並びに1以上の適切な補助剤（適切な補助剤は後に記載する）を含む、前記組成物が提供される。

【0111】

免疫応答を誘発し得る組成物は、例えば、エフリンA型受容体10ポリペプチド又はその誘導体及び／又はその1以上の抗原性若しくは免疫原性断片を含むワクチンとして提供できる。

10

【0112】

開示の明確化のために、及び限定を目的とせずに、本発明は、膀胱、胸部、結腸直腸、頭頸部、腎臓、肺又は脾臓組織の分析に関して記載されている。しかしながら、当業者に公知であるように、後に記載する分析及び技術は、他のタイプの患者試料に適用でき、該試料には体液（例えば、血液、尿又は唾液）、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは脾癌のリスクを有する患者からの組織試料（例えば、膀胱、胸部、結腸直腸、頭頸部、腎臓、肺又は脾臓などの生検）又はそのホモジエネートを含む。本発明の方法及び組成物は、生存対象のスクリーニング、診断及び予後に特に適するが、例えば、同疾患を発生するリスクのある家族メンバーを同定するために、対象の死後診断用に使用することもできる。

20

【0113】

（エフリンA型受容体10）

本発明の一態様では、相対的及び絶対的定量化（iTRAQ）のための等圧タグ（isobaric tag）又は他の適切な方法を使用して、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは脾癌のスクリーニング若しくは診断用に本発明のタンパク質の発現を測定するために、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは脾癌の患者の予後を測定するために、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは脾癌の療法の有効性をモニターするために、又は薬剤開発のために、対象、好ましくは生存対象由來の乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは脾癌の組織試料を分析する。

30

【0114】

本明細書中で使用する用語「本発明のタンパク質」又は「エフリンA型受容体10」とは、図1に記載するタンパク質又はその断片をいう。本タンパク質は、本明細書中に記載されている様々な方法により検出でき、実験的には結腸直腸癌、腎癌及び肺癌の組織試料のiTRAQ分析によるものを含む。これらの配列のタンパク質誘導体は、本明細書中に記載するものと同じ目的に有用であり得る。

【0115】

このタンパク質は、好ましい技術（膜タンパク質抽出物のiTRAQ及びトリプシン消化）の方法及び装置により、結腸直腸癌、腎癌及び肺癌患者からの結腸直腸癌、腎癌及び肺癌の組織試料の膜タンパク質抽出物において同定された。ペプチド配列は、SWISS-PROT及びtrEMBLデータベース（www.expasy.comで利用できる、スイスバイオインフォマティクス研究所（SIB）及びヨーロッパバイオインフォマティクス研究所（EBI）の管理下にある）及び下記のエントリ：Q5JZY3と比較され、エフリンA型受容体10が同定された。このタンパク質をコードするヌクレオチド配列は、アクセッション番号NM_001099439で見出され、これは引用により本明細書に明示的に組み込まれる。該ヌクレオチド配列は、図2において見出される。

40

【0116】

SWISS-PROTによれば、エフリンA型受容体10は、主に精巣において発現される。それは、エフリン-Aファミリーメンバーの受容体であり、EFNA3、EFNA4及びEFNA5に結合する。エフリンA型受容体10は、Eph受容体タンパク質チロシンキナーゼファミリーのメンバーで

50

ある。そのキナーゼドメインは、固有のキナーゼ活性を有しないエフリンA型に最も密接に似ているが、別のキナーゼ活性型Eph受容体タンパク質チロシンキナーゼタンパク質と二量体結合し、活性複合体を形成する。

【0117】

エフリンA型受容体10は、膀胱癌、乳癌、頭頸部癌及び肺癌において発現することも示される。免疫組織化学実験（実施例2を参照されたい）は、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌及び肺癌に強い染色を示した。したがって、エフリンA型受容体10の検出は、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは肺癌の診断用マークとして有用である。いくつかの実施態様において、エフリンA型受容体10の検出は、膀胱癌、乳癌、頭頸部癌及び肺癌の診断用マークとして有用である。

10

【0118】

本発明のタンパク質は、断片、特にエピトープ含有断片、例えばその抗原性若しくは免疫原性断片及びその誘導体として有用である。抗原性若しくは免疫原性断片を含むエピトープ含有断片は、典型的には、長さ12アミノ酸以上、例えば20アミノ酸以上、例えば50又は100アミノ酸以上である。断片は、完全なタンパク質の長さの95%以上、例えば90%以上、例えば完全なタンパク質の長さの75%又は50%又は25%又は10%以上であってよい。

【0119】

あるいは、本明細書中において使用され又は言及されるタンパク質/ポリペプチドは、本願明細書に具体的に列挙/記載したもの、又はそれに80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98若しくは99%同一若しくは類似のものに限定され得る。

20

【0120】

抗原性若しくは免疫原性断片などのエピトープ含有断片は、患者において関連する免疫応答を誘発できる。本発明のタンパク質をコードするDNAは、その断片、例えばその免疫原性断片などの本発明のタンパク質のDNAをコードする断片としても有用である。本発明のタンパク質をコードする核酸（例えばDNA）の断片は、完全なコード領域の長さの95%以上、例えば90%以上、例えば完全なコード領域の長さの75%又は50%又は25%又は10%以上であってよい。核酸（例えばDNA）の断片は、36ヌクレオチド以上、例えば60ヌクレオチド以上、例えば150又は300ヌクレオチド以上の長さであってよい。

【0121】

本発明のタンパク質の誘導体は、1以上（1～20例えば15アミノ酸、又はタンパク質の全長に基づくアミノ酸の数に対して最高で10%又は5%又は1%などの最高で20%）の削除、挿入又は置換がなされた配列上の異型を含む。置換は、典型的には、保存的置換であり得る。誘導体は、典型的には、それらが誘導されるタンパク質と同じ生物学的機能を基本的に有する。誘導体は、典型的には、それらが誘導されるタンパク質に同等に抗原性であるか又は免疫原性である。誘導体は、典型的には、それらが誘導されるタンパク質のうち、リガンド結合活性若しくは活性受容体複合体形成能力のいずれか、又は好ましくはその両方を有する。

30

【0122】

タンパク質の誘導体には、例えば精製中に処理される、カルボキシメチル化された、カルボキシアミド化された、アセチル化されたタンパク質などの化学的に処理されたタンパク質を含む。

40

【0123】

下記の表1a～1dは、それぞれ結腸直腸癌、腎癌、非小細胞肺癌及び小細胞肺癌患者由来の結腸直腸、腎臓及び肺の組織試料の膜タンパク質抽出物の質量分析により検出されたエフリンA型受容体10の異なる発生を明示する。第1列は試料番号を提供し、第2列は該試料についてのiTRAQ実験番号を提供し、かつ最後の列は質量分析により得られた配列の一覧及びその対応する配列番号を提供する。

【0124】

【表4】

表1a - 結腸直腸癌

試料番号	実験番号	同定されたトリプシン配列[配列番号]
試料1	実験1	FSQIHSILSKMVQDPEPPK [3], HEGQLVAGQLMGLLPGLASAMK [4], SPLVLR [6]
試料2	実験1	LEGVVTR [5]

【表5】

表1b - 腎癌

試料番号	実験番号	同定されたトリプシン配列[配列番号]
試料1	実験1	SPLVLR [6]

【表6】

表1c - 非小細胞肺癌

試料番号	実験番号	同定されたトリプシン配列[配列番号]
試料1	実験1	SPLVLR [6]

10

20

【表7】

表1d - 小細胞肺癌

試料番号	実験番号	同定されたトリプシン配列[配列番号]
試料1	実験1	EIGPLSR [2]

30

40

50

【0125】

エフリンA型受容体10について、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌及び脾癌を有しない対象由来の組織を分析することで得られた検出レベルに対して相対的な、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは脾癌を有する対象由来の組織を分析することで得られた検出レベルは、使用される具体的な分析プロトコル及び検出技術に依存する。したがって、本発明は、各研究室が、診断技術において従来のように、使用に際しての分析プロトコル及び検出技術に従い、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌及び脾癌を有しない対象における参照範囲を確立することを意図する。好ましくは、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは脾癌を有することが既知の対象からの少なくとも1つの陽性対照の組織試料、又は乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌及び脾癌でないことが既知の対象からの少なくとも1つの陰性対照の組織試料（より好ましくは、陽性及び陰性の対照試料の両方）は、分析される試験試料の各バッチに含まれる。

【0126】

エフリンA型受容体10は、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは脾癌の検出、予後、診断又はモニタリングのために、又は薬剤開発のために、使用できる。本発明の一実施態様において、対象（例えば、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは脾癌を有することが疑われる対象）からの組織は、エフリンA型受容体10の検出についてiTRAQにより分析される。膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは脾癌を有しない対象由来の組織、又は予め決定された参照範囲に対して相対的な、前記対象由来の組織におけるエフリンA型受容体10の量の増加は、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌及び脾癌の存在を示す。

50

【0127】

表1に示される配列は、本発明の任意の関連する態様で使用できる。

【0128】

エフリンA型受容体10の異型、断片、エピトープ含有断片、免疫原性断片又は抗原性断片に関して：

- 結腸直腸癌用途について、本発明の一態様において、これらは、表1aの3番目の列にトリプシン配列として同定される配列を含み；
- 腎癌用途について、本発明の一態様において、これらは、表1bの3番目の列にトリプシン配列として同定される配列を含み；
- 非小細胞肺癌用途について、本発明の一態様において、これらは、表1cの3番目の列にトリプシン配列として同定される配列を含み；
- 小細胞肺癌用途について、本発明の一態様において、これらは、表1dの3番目の列にトリプシン配列として同定される配列を含む。

10

【0129】

本明細書中で使用するように、エフリンA型受容体10は、実質的に混入タンパク質がない調製物、すなわち、存在するタンパク質総量の10%未満（好ましくは5%未満、より好ましくは1%未満）がタンパク質混入している調製物が存在する場合、「単離」されている。混入タンパク質は、質量スペクトル分析によって決定されるとおり、単離されたエフリンA型受容体10の配列と著しく異なるアミノ酸配列を有するタンパク質である。本明細書中で使用する「著しく異なる」配列は、本明細書の実施例1に記載されている参照プロトコルに従って実行される質量スペクトル分析によってエフリンA型受容体10から分割される混入タンパク質を認めるものである。

20

【0130】

従って、一態様において、本発明は、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは肺癌の治療のための医薬組成物であって、治療上有効量のエフリンA型受容体10ポリペプチド（特に上記に定義したもの）又はその免疫原性断片及び補助剤を含む、前記医薬組成物を提供する。

20

【0131】

エフリンA型受容体10は、当業者に公知の方法によりアッセイでき、該方法には、本明細書に記載する好ましい技術、キナーゼアッセイ、酵素アッセイ、結合アッセイ、及び他の機能的アッセイ、イムノアッセイ及びウエスタンプロットティングを含むがこれらに限定されない。一実施態様において、エフリンA型受容体10は、相対的及び絶対的定量化（iTRAQ）のための等圧タグを使用して分析される。

30

【0132】

あるいは、エフリンA型受容体10は、イムノアッセイで検出できる。一実施態様において、イムノアッセイは、エフリンA型受容体10が存在する場合に結合（例えば免疫特異的結合）が起こり得る条件下で、試験される対象由来の試料を、抗エフリンA型受容体10抗体（又は他の親和性試薬）と接触させること、及び前記作用物質による結合（例えば免疫特異的結合）の量を検出又は測定することにより、実施される。エフリンA型受容体10結合剤は、本明細書に教示される方法及び技術によって製造できる。

40

【0133】

エフリンA型受容体10は、その断片、例えばそのエピトープ含有（例えば、免疫原性又は抗原性）断片の検出特性により、検出できる。断片は、少なくとも10、より典型的には少なくとも20アミノ酸、例えば少なくとも50又は100アミノ酸、例えば少なくとも200又は500アミノ酸、例えば少なくとも800又は1000のアミノ酸の長さを有することができる。

【0134】

一実施態様において、組織切片における親和性試薬（例えば抗体）の結合は、異常なエフリンA型受容体10局在、又はエフリンA型受容体10の異常なレベルを検出するために、使用できる。特定の実施態様において、エフリンA型受容体10に対する抗体（又は他の親和性試薬）は、エフリンA型受容体10のレベルについて患者組織（例えば、膀胱、胸部、結

50

腸直腸、頭頸部、腎臓、肺又は脾臓組織)をアッセイするために使用でき、該アッセイにおける異常なレベルのエフリンA型受容体10は、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは脾癌の指標である。本明細書中で使用する「異常なレベル」とは、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは脾癌を有しない対象におけるレベル、又は参照レベルと比較して増加したレベルを意味する。

【0135】

ウェスタンプロット、ラジオイムノアッセイ、ELISA(酵素結合免疫吸着測定法)、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降素反応、ゲル拡散沈降素反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、補体結合アッセイ、免疫放射線測定法、蛍光イムノアッセイ及びタンパク質Aイムノアッセイなどの技術を使用する競合的及び非競合的アッセイ系を含むがこれに限定されない、任意の適切なイムノアッセイを使用することができる。
10

【0136】

例えば、エフリンA型受容体10は、二段階サンドイッチアッセイによって、流体試料(例えば、血液、尿又は唾液)にて検出できる。第一段階において、捕捉試薬(例えば、抗エフリンA型受容体10抗体又は他の親和性試薬)を使用して、エフリンA型受容体10を捕捉する。捕捉試薬は、任意に、固相上に固定できる。第二段階において、直接又は間接的に標識された検出試薬を使用して、捕捉されたエフリンA型受容体10を検出する。一つの実施態様において、検出試薬は、レクチンである。エフリンA型受容体10と同じコアタンパク質を有する他のアイソフォーム、又は該抗体により認識される抗原決定基を共有する他のタンパク質に対してよりもエフリンA型受容体10に優先的に結合するこの目的のために、任意のレクチンを使用できる。好ましい実施態様において、選ばれたレクチンは、エフリンA型受容体10と同じコアタンパク質を有する前記他のアイソフォーム、又は該親和性試薬により認識される抗原決定基を共有する前記他のタンパク質に対してよりも、少なくとも2倍大きな親和性、より好ましくは少なくとも5倍大きな親和性、さらにより好ましくは少なくとも10倍大きな親和性で、エフリンA型受容体10を結合する。本記載に基づき、エフリンA型受容体10を検出することに適しているレクチンは、公知技術の方法によって容易に同定でき、例えば、Gabius H-J及びGabius S(編), 1993, 「レクチン及び糖鎖生物学(Lectins and Glycobiology)」の158-174頁におけるSumarらによる「疾患関連糖形態の指標としてのレクチン(Lectins as Indicators of Disease-Associated Glycoforms)」の158~159頁の表Iに列挙されている1以上のレクチン(引用によりその全てが本明細書に組み込まれる)を試験できる。代替的実施態様において、検出試薬は抗体(又は他の親和性試薬)であり、例えば特に他の翻訳後修飾を(例えば免疫特異的に)検出する抗体、例えばリン酸化されたアミノ酸に免疫特異的に結合する抗体である。この種の抗体の例には、ホスホチロシンに結合する抗体(BD Transduction Laboratories社、カタログ番号:P11230-050/P11230-150; P11120; P38820; P39020)、ホスホセリン(Zymed Laboratories社、South San Francisco, CA, カタログ番号61-8100)に結合する抗体、及びホスホスレオニンに結合する抗体(Zymed Laboratories社、South San Francisco, CA, カタログ番号71-8200, 13-9200)に結合する抗体を含む。
20

【0137】

必要に応じて、相補配列を含み、エフリンA型受容体10、関連する遺伝子、又は関連する核酸配列若しくはサブ配列をコードする遺伝子もハイブリダイゼーションアッセイに使用できる。エフリンA型受容体10をコードするヌクレオチド、又は少なくとも8ヌクレオチド、好ましくは少なくとも12ヌクレオチド及び最も好ましくは少なくとも15ヌクレオチドを含むそのサブ配列は、ハイブリダイゼーションプローブとして使用できる。エフリンA型受容体10をコードする遺伝子の異所性発現に関連する状態、障害若しくは疾患状態の検出、予後、診断若しくはモニタリングのために、又は膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは脾癌で示唆的徵候又は症状を有する対象の鑑別診断のために、ハイブリダイゼーションアッセイを使用できる。具体的には、この種のハイブリダイゼーションアッセイは、核酸を含んでいる対象の試料を、エフリンA型受容体10をコードするDNA
30

若しくはRNAにハイブリダイズし得る核酸プローブと、ハイブリダイゼーションが起こり得る状態下で接触させること、及びその結果生じたハイブリダイゼーションの全てを検出若しくは測定すること、を含む方法により実施できる。

【0138】

それゆえ、エフリンA型受容体10をコードする核酸（例えばDNA、又はより好適にはRNA）は、例えば、エフリンA型受容体10をコードする核酸を検出し得るハイブリダイズ剤を使用して検出できる。

【0139】

そのような典型的な方法には、以下を含む：

- (a) エフリンA型受容体10をコードするヌクレオチド配列に相補的な10以上の連続ヌクレオチドを含む1以上のオリゴヌクレオチドプローブを、対象由来の生体試料から得られるRNAと、又はRNAからコピーしたcDNAと接触させることであって、存在する場合、該プローブの該ヌクレオチド配列へのハイブリダイゼーションができる状態下で起こる、前記接触工程；
- (b) 該プローブと該ヌクレオチド配列との間におけるハイブリダイゼーションが存在する場合に検出する工程；及び、
- (c) 工程(b)において検出される場合、該ハイブリダイゼーションを、対照試料において検出されるハイブリダイゼーションと、又は予め決定された参照範囲と比較する工程；を含む。

【0140】

また本発明は、抗エフリンA型受容体10抗体（又は他の親和性試薬）を含む診断用キットを提供する。加えて、このようなキットは、以下の1つ以上を任意に含んでいてもよい：(1)診断、予後、治療的モニタリング又は任意の組合せについての抗エフリンA型受容体10親和性試薬を使用するための当該適用の取扱説明書；(2)親和性試薬に対する標識化結合パートナー；(3)抗エフリンA型受容体10親和性試薬が固定されている固相（試薬ストリップなど）；及び(4)診断、予後若しくは治療的使用又は任意のそれらの組み合わせのための規制認可を示す標識又は挿入物。該親和性試薬に標識された結合パートナーがない場合、抗エフリンA型受容体10親和性試薬自体を、検出可能なマーカー、例えば化学発光部分、酵素部分、蛍光部分、放射性部分で標識できる。

【0141】

また本発明は、エフリンA型受容体10をコードする核酸、好適にはRNAにハイブリダイズし得る核酸プローブを含むキットを提供する。特定の実施態様において、キットは、1以上の容器に、適切な反応条件下で、例えばポリメラーゼ連鎖反応（例えば、Innisらの文献、1990、「PCRプロトコル（PCR Protocols）」、Academic Press社、San Diego、CAを参照されたい）、Q レプリカーゼのリガーゼ連鎖反応（EP 320,308を参照）使用、周期的プローブ反応又は公知技術の他の方法により、エフリンA型受容体10をコードする核酸の少なくとも一部の増幅を開始することができる一対のプライマー（例えば、各々、6~30ヌクレオチド、より好ましくは10~30ヌクレオチド及びさらにより好ましくは10~20ヌクレオチドのサイズ範囲）を含む。

【0142】

キットは、任意に、例えば標準又は対照として、予め定められた量のエフリンA型受容体10又はエフリンA型受容体10をコードする核酸をさらに含むことができる。

【0143】

（臨床研究における使用）

本発明の診断法及び組成物は、例えば、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは肺癌の療法用薬剤を評価するための臨床研究をモニタリングする際に助力できる。一実施態様において、候補分子は、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは肺癌を有する対象のエフリンA型受容体10レベルを、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌及び肺癌を有しない対象において見出されるレベルに回復させるそれらの能力について、又は治療された対象におけるエフリンA型受容体10レベルを

10

20

30

40

50

非膀胱癌、非乳癌、非結腸直腸癌、非頭頸部癌、非腎癌、非肺癌若しくは非膵癌の値に若しくはその近傍に保持するそれらの能力について、試験される。

【0144】

別の実施態様において、本発明の方法及び組成物は、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌を有する個人を同定するための臨床研究の候補をスクリーニングするために使用する。その後、そのような個人は、研究から除外でき、又は治療若しくは分析について別々のコホートに置くことができる。

【0145】

(本発明のタンパク質及び対応する核酸の生産)

1つの態様において、本発明は、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌を治療又は予防する方法であって、そのような治療又は予防を必要とする対象に、治療上有効量のエフリンA型受容体10をコードする核酸又はその1以上の断片若しくは誘導体を、例えばワクチンの形態で投与することを含む、前記方法を提供する。

【0146】

別の態様において、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌を治療又は予防する方法であって、そのような治療又は予防を必要とする対象に、エフリンA型受容体10の機能若しくは発現を阻害する核酸の治療上有効量を投与することを含む、前記方法を提供する。

【0147】

本発明の方法(及び/又は本明細書に開示される他のDNA態様)は、例えば、該核酸がエフリンA型受容体10アンチセンス核酸若しくはリボザイムである方法を含み得る。

【0148】

従って、本発明は、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌を治療又は予防するための薬剤の製造における、エフリンA型受容体10をコードする核酸又はその1以上の断片若しくは誘導体の使用を含む。

【0149】

膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌を治療又は予防するための医薬の製造における、エフリンA型受容体10の機能又は発現を阻害する核酸の使用も提供される。

【0150】

本発明に使用されるDNAは、開始物質として市販mRNAを使用するcDNAライブラリからcDNA断片としての単離により得ることができ、そのヌクレオチド配列を決定及び同定することができる。すなわち、具体的には、クローニングは、Oharaらの方法(DNA Research 第4巻、53-59(1997))に従って調製されるcDNAライブラリからランダムに単離される。次に、ハイブリダイゼーションを介し、複製されたクローニング(これは繰り返し現れる)を取り除いた後、インビトロ転写及び翻訳を実行する。50kDa以上の産物が確認されたクローニングの両方の末端ヌクレオチド配列を決定する。

【0151】

さらに、公知の遺伝子のデータベースは、このようにして得られた末端ヌクレオチド配列を問合わせとして使用して、相同性について検索する。

【0152】

上記スクリーニング方法に加え、cDNAの5'及び3'末端配列をヒトゲノム配列に関連づける。それから、未知の長鎖遺伝子を該配列間の領域で確認し、該cDNAの全長を分析する。このようにして、既知の遺伝子に依存する従来のクローニング方法によって得られることができない未知の遺伝子を体系的にクローニング化できる。

【0153】

さらに、本発明のDNAを含んでいるヒト由来遺伝子の領域の全ては、短い断片又は得られた配列において起こる人為的誤りを防ぐのに充分な注意を払いながら、RACEなどのPCR法を使用して調製することもできる。上述の通り、本発明のDNAを有するクローニングを得ることができる。

10

20

30

40

50

【0154】

本発明のDNAをクローニングするための別の手段において、本発明の一部のポリペプチドの適切なヌクレオチド配列を有する合成DNAプライマーを調製した後、適切なライプラリを使用するPCR法により増幅させる。あるいは、選択は、適切なベクターに組み込まれ、本発明のポリペプチドの領域の一部若しくは全部をコードするDNA断片又は合成DNAで標識されたDNAを用いる、本発明のDNAのハイブリダイゼーションにより実施できる。ハイブリダイゼーションは、例えば、分子生物学の最新プロトコル (Current Protocols in Molecular Biology) (Frederick M. Ausubelら編, 1987) に記載される方法により実施できる。本発明のDNAは、それらが上記の本発明のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む限り、いかなるDNAであってもよい。このようなDNAは、cDNAライプラリから同定及び単離されたcDNAであってよく、膀胱、胸部、結腸直腸、頭頸部、腎臓、肺又は脾臓の組織に由来するようなものであってもよい。この種のDNAは、合成DNA等であってもよい。ライプラリ構築物に使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミド等のいずれかであってよい。さらに、上記の細胞及び/又は組織から調製される総RNA画分又はmRNA画分の使用により、増幅は、直接的な逆転写共役ポリメラーゼ連鎖反応（以下、「RT-PCR法」と略記される）により実施できる。

10

【0155】

エフリンA型受容体10のアミノ酸配列に実質的に同一であるアミノ酸配列からなる上記ポリペプチドをコードするDNA、又は該アミノ酸配列の一部を構成している1以上のアミノ酸の削除、置換若しくは追加によるエフリンA型受容体10のアミノ酸配列に由来するアミノ酸配列からなる上記ポリペプチドをコードするDNAは、例えば、当業者に公知の突然変異生成法、遺伝子相同組換え法、プライマー伸長法及びPCR法の適切な組合せにより、容易に生産できる。加えて、現時点で、ポリペプチドに実質的に同等な生物活性をもたらす可能的方法は、ポリペプチドを構成しているアミノ酸間での相同アミノ酸（例えば、極性及び無極性アミノ酸、疎水性及び親水性アミノ酸、正荷電及び負荷電アミノ酸、並びに芳香族アミノ酸）の置換である。さらに、実質的に同等な生物活性を維持するために、本発明のポリペプチドに含まれる機能的ドメイン内のアミノ酸は、好ましくは保存される。

20

【0156】

さらにまた、本発明のDNAの例には、エフリンA型受容体10のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含むDNA、及び該DNAにストリンジェントな状態下でハイブリダイズし、かつエフリンA型受容体10のアミノ酸配列からなるポリペプチドの機能に同等な生物活性（機能）を有するポリペプチド（タンパク質）をコードするDNAを含む。このような条件下で、エフリンA型受容体10のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含むDNAにハイブリダイズし得るこの種のDNAの例は、DNAの全ヌクレオチド配列にある程度、例えば、およそ80%以上、より好ましくはおよそ90%以上、及びより好ましくはおよそ95%以上の全体平均相同性を有するヌクレオチド配列を含むDNAである。ハイブリダイゼーションは、分子生物学における最新プロトコル (Current Protocols in Molecular Biology) (Frederick M. Ausubelら編, 1987) に記載される方法などの当業者に公知の方法、又はそれに準じる方法により実施できる。ここで、「ストリンジェントな条件」は、例えば、およそ 1^*SSC 、 0.1% SDS及び37、よりストリンジェントな条件とは 0.5^*SSC 、 0.1% SDS及び42、又はよりさらにストリンジェントな条件とはおよそ 0.2^*SSC 、 0.1% SDS及び65である。よりストリンジェントなハイブリダイゼーション条件を用いると、プローブ配列に高い相同性を有するDNAの単離が予想できる。SSC、SDS及び温度条件の上記組合せは、説明目的のために与えられる。上記に類似するストリンジェンシーは、ハイブリダイゼーションストリンジェンシーの決定のための上記因子又は他の因子（例えば、ハイブリダイゼーションのためのプローブ濃度、プローブ長及び反応時間）の適切な組合せを使用して、当業者により達成できる。

30

【0157】

本発明のクローン化DNAは、目的に応じて、直接使用でき、又は必要に応じて制限酵素での消化又はリンクマーの追加の後に使用できる。DNAは、5'末端側の翻訳開始コドンとし

40

50

てATGを有することができ、3'末端側の翻訳終止コドンとして、TAA、TGA又はTAGを有することができる。これらの翻訳開始及び翻訳終止コドンは、適切な合成DNAアダプタを使用して追加することもできる。

【0158】

本発明の方法/使用において、エフリンA型受容体10は、例えば、エフリンA型受容体10ポリペプチドが少なくともある程度まで精製されたものなどの単離された形態で提供できる。エフリンA型受容体10ポリペプチドは、実質的に純粋な形態で、すなわち実質的範囲で他のタンパク質を含まない形態で、提供できる。エフリンA型受容体10ポリペプチドは、組換え法を使用して生産でき、合成的に生産でき、又はこれらの方の組合せによって生産することもできる。エフリンA型受容体10は、当業者に公知の任意の方法によつても容易に調製でき、それには、本発明のDNAを含んでいる発現ベクター又は本発明のDNAを含んでいる遺伝子を生産すること、該発現ベクターを使用して形質転換された形質転換体を培養すること、本発明のポリペプチド又は該ポリペプチドを含んでいる組換えタンパク質を生成し蓄積すること、及びその後に該結果を回収することを含む。

10

【0159】

組換えエフリンA型受容体10ポリペプチドは、発現系を含む遺伝子操作された宿主細胞から周知技術の方法により生産できる。したがつて、本発明は、エフリンA型受容体10ポリペプチド又は核酸を含む発現系に、この種の発現系によつて遺伝子操作された宿主細胞に、及び組換え技術によるエフリンA型受容体10ポリペプチドの生産にも関する。組換えエフリンA型受容体10ポリペプチド生産のために、宿主細胞は、核酸のためにその発現系又は部分を組み込むために遺伝子操作できる。この種の組み込みは、公知技術の方法、例えば、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAD-デキストラン媒介型トランスフェクション、トランスペクション、マイクロインジェクション、カチオン脂質媒介型トランスフェクション、エレクトロポーレーション、形質導入、切屑負荷(scrape loading)、バレット導入又は感染を使用して実施できる(例えばDavisらの文献、分子生物学における基本的方法(Basic Methods in Molecular Biology), 1986、並びにSambrookらの文献、分子クローニング:研究室マニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual), 第2版, Cold Spring Harbour laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY, 1989を参照されたい)。

20

【0160】

宿主細胞として、例えば、エシェリキア属、ストレプトコッカス属、スタフィロコッカス属、ストレプトマイセス属の細菌、バチルス属の細菌、酵母、アスペルギルス細胞、昆虫細胞、昆虫、及び動物細胞が使用される。本明細書に使用されるエシェリキア属の細菌の具体例には、大腸菌K12及びDH1(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., Vol. 60, 160 (1968))、JM103(Nucleic Acids Research, Vol. 9, 309 (1981))、JA221(Journal of Molecular Biology, Vol. 120, 517 (1978))、及びHB101(Journal of Molecular Biology, Vol. 41, 459 (1969))を含む。バチルス属の細菌としては、例えば、枯草菌M1114(Gen. e, Vol. 24, 255 (1983))及び207-21(Journal of Biochemistry, Vol. 95, 87 (1984))が使用される。酵母としては、(例えば、出芽酵母(Saccharomyces cerevisiae) AH22、AH22R-、NA87-11A、DKD-5D及び20B-12、分裂酵母(Schizosaccharomyces pombe) NCYC1913及びNCYC2036、並びにピキア・パストリス(Pichia pastoris)が使用される。昆虫細胞としては、例えば、ショウジョウバエS2及びスピドブテラSf9細胞が使用される。動物細胞としては、例えば、COS-7及びベロサル細胞、CHOチャイニーズハムスター細胞(以下、CHO細胞と略記される)、dhfr遺伝子欠損CHO細胞、マウスL細胞、マウスAtT-20細胞、マウス骨髄腫細胞、ラットGH3細胞、ヒトFL細胞、COS、HeLa、C127、3T3、HEK 293、BHK及びボーズメラノーマ細胞が使用される。

40

【0161】

無細胞翻訳システムも、組換えポリペプチドを生産するために使用できる(例えば、ウサギ網状赤血球溶解物、小麦麦芽溶解物、Roche Diagnostics 社製SP6/T7インビトロT&T及びRTS 100大腸菌HY転写及び翻訳キット(英国、ルイス)、並びにPromega UK 製TNTク

50

イック共役転写/翻訳キット(英国、サウサンプトン)。)。

【 0 1 6 2 】

発現ベクターは、公知技術の方法に従って生産できる。例えば、ベクターは、(1)本発明のDNAを含んでいるDNA断片又は本発明のDNAを含んでいる遺伝子を切り取ること、及び(2)適切な発現ベクターにおいてプロモータの下流にDNA断片を連結すること、により生産できる。広範囲の発現系を使用でき、例えば、染色体、エピソーム及びウイルスから派生した系、例えば大腸菌(例えばpBR322、pBR325、pUC18及びpUC118)に由来するプラスミド、枯草菌(例えばpUB110、pTP5及びpC194)に由来するプラスミド、バクテリオファージ由来の系、トランスポゾン由来の系、酵母エピソーム由来の系(例えばpSH19及びpSH15)、挿入因子由来の系、酵母染色体要素由来の系、バキュロウイルス、パポバウイルス、例えばSV40、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルス及びレトロウイルスなどのウイルス由来の系、並びにこれらの組合せ、例えばプラスミド由来の系及びバクテリオファージ(ファージなど)遺伝因子、例えばコスミド及びファージミドなどであるがこれらに限定されない。発現系は、発現を生じさせるのみならず発現を制御する制御領域を含み得る。遺伝子発現のために使用される宿主に適切な限り、本発明において使用されるプロモータは、いかなるプロモータでもあってもよい。例えば、宿主が大腸菌である場合、trpプロモータ、lacプロモータ、recAプロモータ、pLプロモータ、lppプロモータなどが好ましい。宿主が枯草菌である場合、SP01プロモータ、SP02プロモータ、penPプロモータなどが好ましい。宿主が酵母である場合、PH05プロモータ、PGKプロモータ、GAPプロモータ、ADHプロモータなどが好ましい。動物細胞を宿主として使用する場合、この事例における使用のためのプロモータの例にはSRaプロモータ、SV40プロモータ、LTRプロモータ、CMVプロモータ及びHSV-TKプロモータを含む。通常、宿主においてポリペプチドを産生する核酸を維持し、増殖させ又は発現することができる、任意の系又はベクターを使用できる。

10

20

30

30

40

【 0 1 6 3 】

適切な核酸配列は、上掲のSambrookらの文献に記載されるものなどの任意の様々な周知かつルーチンの技術により、発現系に挿入できる。適切な分泌シグナルは、小胞体内腔、細胞膜周辺腔又は細胞外環境への翻訳タンパク質の分泌を可能にするために、エフリンA型受容体10ポリペプチドに組み込むことができる。これらのシグナルはエフリンA型受容体10ポリペプチドに内在性であってよく、又はシグナルは異種性シグナルでもよい。宿主細胞の形質転換は、公知技術の方法に従って実施できる。例えば、以下の文書を参照することができる: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., Vol. 69, 2110 (1972); Gene, Vol. 17, 107 (1982); Molecular & General Genetics, Vol. 168, 111 (1979); Methods in Enzymology, Vol. 194, 182-187 (1991); Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), Vol. 75, 1929 (1978); Cell Technology, 別冊8, 「新規細胞技術、実験プロトコル(New Cell Technology, Experimental Protocol.)」263-267 (1995)(Shujunsha発行);及びVirology, Vol. 52, 456 (1973). そのように、本発明のDNAを含む発現ベクター又は本発明のDNAを含む遺伝子で形質転換して得られた形質転換体は、公知技術の方法に従って培養できる。例えば、宿主がエシェリキア属の細菌である場合、該細菌は通常、およそ15 ~ 43 でおよそ3 ~ 24時間培養する。必要に応じて、通気又は振動も追加できる。宿主がバチルス属の細菌である場合、該細菌は通常、およそ30 ~ 40 でおよそ6 ~ 24時間培養する。必要に応じて、通気又は振動も追加できる。宿主が酵母である形質転換体を培養する場合、培養は通常、pHがおよそ5~8であるように調整した培地を使用して、およそ20 ~ 35 でおよそ24 ~ 72時間実施する。必要に応じて、通気又は振動も追加できる。宿主が動物細胞である形質転換体を培養する場合、該細胞は通常、pHがおよそ6~8であるように調整した培地を使用して、およそ30 ~ 40 でおよそ15 ~ 60時間培養する。必要に応じて、通気又は振動も追加できる。

40

【 0 1 6 4 】

エフリンA型受容体10ポリペプチドが細胞ベースのスクリーニング分析アッセイ用に発現される場合、該ポリペプチドは細胞表面に産生されることが好ましい。この場合、該細

50

胞は、スクリーニングアッセイの使用の前に回収できる。エフリンA型受容体10ポリペプチドが培地に分泌される場合、該培地は前記ポリペプチドを単離するために回収できる。細胞内で産生される場合、該細胞は、エフリンA型受容体10ポリペプチドが回収される前に、最初に溶解しなければならない。

【0165】

エフリンA型受容体10ポリペプチドは、組換え細胞培養物から、又はその他の生物学的供給源から、硫酸アンモニウム若しくはエタノール沈殿、酸抽出、陰イオン若しくは陽イオン交換クロマトグラフィ、ホスホセルロースクロマトグラフィ、親和性クロマトグラフィ、疎水性相互作用クロマトグラフィ、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィ、分子篩クロマトグラフィ、遠心分離法、電気泳動方法及びレクチンクロマトグラフィを含む周知の方法により、回収及び精製できる。一実施態様において、これらの方法の組合せが使用される。別の実施態様において、高速液体クロマトグラフィが使用される。さらなる実施態様において、エフリンA型受容体10ポリペプチドに特異的に結合する抗体は、前記ポリペプチドのエフリンA型受容体10ポリペプチドを含む試料を減少させるか又は前記ポリペプチドを精製するために使用することができる。

10

【0166】

培養生成物から本発明のポリペプチド又はタンパク質を分離して精製するために、例えば、培養後に、微生物本体又は細胞を公知の方法により回収し、それらを適切な緩衝液に懸濁し、該微生物本体又は細胞を、例えば、超音波、リゾチームオリゴマー凍結融解で破壊し、それからその結果物を遠心単離又は濾過に供し、その後該タンパク質の粗抽出物を得ることができる。該緩衝液は、尿素若しくは塩酸グアニジンなどのタンパク質変性剤、又はTriton X-100(商標)などの界面活性剤も含み得る。タンパク質が培養液に分泌される場合、微生物本体又は細胞及び上清は、培養の完了後に公知の方法によって分離され、該上清は回収される。このようにして得られた培養上清又は抽出物に含まれるタンパク質は、公知の分離及び精製法の適切な組合せにより、精製できる。本発明のこのようにして得られたポリペプチド(タンパク質)は、公知の方法又はこれに準じる方法によって、塩に変換できる。逆に、本発明のポリペプチド(タンパク質)が塩の形態で得られる場合、それは公知の方法又はこれに準じる方法によって、遊離タンパク質又はペプチド又は他の塩に変換できる。さらに、トリプシン又はキモトリプシンなどの適切なタンパク質修飾酵素は、精製の前又は後に組換えによって產生されたタンパク質への作用をもたらし、そのような修飾は適宜追加することができ、又はポリペプチドは部分的に除去できる。本発明のポリペプチド(タンパク質)又はその塩の存在は、さまざまな結合アッセイ、特異的抗体を使用する酵素イムノアッセイなどで測定できる。

20

【0167】

ポリペプチドが単離及び/又は精製の間に変性する場合、エフリンA型受容体10ポリペプチドの天然の又は活性な立体構造を再生するリフォールディングのための当該技術分野で周知の技術を使用できる。本発明の文脈において、エフリンA型受容体10ポリペプチドは、血液試料又は組織試料、例えば膀胱、胸部、結腸直腸、頭頸部、腎臓、肺若しくは脾臓組織試料などであるがこれらに限定されない、任意の供給源からの生体試料から得ることができる。

30

【0168】

エフリンA型受容体10ポリペプチドは、「成熟タンパク質」の形態であり得るか、又は融合タンパク質などのより大きなタンパク質の一部であり得る。分泌若しくはリーダー配列、プレ-、プロ-又はプレプロ-タンパク質配列を含む追加的アミノ酸配列、又は親和性タグ、例えば複数のヒスチジン残基、FLAGタグ、HAタグ又はmycタグ(これらに限定されない)などの精製を助ける配列を含むことは、しばしば有益である。

40

【0169】

エフリンA型受容体10は、例えば、ヘモフィルス・インフルエンザBからのタンパク質Dとして知られる表在性タンパク質、NS1などのインフルエンザウイルスからの非構造タンパク質、B型肝炎からのS抗原、又はそのC末端などのLYTAとして公知のタンパク質などの

50

異種融合パートナーと融合させることができる。

【0170】

組換え生産の間に安定性を提供できる追加的配列を使用することもできる。この種の配列は、追加的配列又はその一部として切断可能配列を組み込むことにより、必要に応じて、任意に取り除くことができる。従って、エフリンA型受容体10ポリペプチドは、他のポリペプチド又はタンパク質（例えば、グルタチオンS-トランスフェラーゼ及びプロテインA）を含む他の部分に融合できる。この種の融合タンパク質は、適切なプロテアーゼを使用して切断でき、それから各タンパク質分けることができる。この種の追加的配列及び親和性タグは周知技術である。上記に加え、所望であれば、エンハンサ、スプライシングシグナル、polyA付加シグナル、選択マーカー及びSV40複製起点などの当該技術分野で公知の特性を発現ベクターに追加することができる。10

【0171】

（エフリンA型受容体10に対する親和性試薬の生産）

公知技術によれば、3種類の主要な免疫親和性試薬、すなわちモノクローナル抗体、ファージ発現抗体、並びにアフィボディ、ドメイン抗体（dAb）、ナノボディ、ユニボディ、DARPin、アンチカリン、デュオカリン、アビマー又はバーサボディなどのより小さな抗体由来分子がある。一般に抗体の使用が記載される本発明の適用において、他の親和性試薬（例えば、アフィボディ、ドメイン抗体、ナノボディ、ユニボディ、DARPin、アンチカリン、デュオカリン、アビマー又はバーサボディ）を使用できる。この種の物質は、エフリンA型受容体10に免疫特異的に結合し得るということができる。適切である場合、用語「親和性試薬」は、リガンド、レクチン、ストレプトアビジン、抗体模倣体及び合成結合剤を含むがこれらに限定されない免疫親和性試薬並びにエフリンA型受容体10に特異的結合し得る他の物質を含むものとする。20

【0172】

（エフリンA型受容体10に対する抗体の生産）

本発明のエフリンA型受容体10によると、エフリンA型受容体10類似体、エフリンA型受容体10関連タンパク質、又は上述のいずれかの断片若しくは誘導体を免疫原として使用し、当該免疫原に免疫特異的に結合する抗体を生産することができる。このような免疫原は、先に記載した方法を含む任意の都合のよい手段によって単離できる。本明細書で使用する用語「抗体」とは、抗原又はエピトープを免疫特異的に結合し得る、免疫グロブリン遺伝子又はその断片に由来し、それらに倣って産生され、又はそれらにより実質的にコードされる、ペプチド又はポリペプチドをいう。例えば、Fundamental Immunology, 第3版, W.E. Paul編, Raven Press, N.Y. (1993); Wilsonの文献 (1994) J. Immunol. Methods 17 5:267-273; Yarmushの文献 (1992) J. Biochem. Biophys. Methods 25:85-97を参照されたい。用語抗体には、抗原結合部分、すなわち、抗原を結合する能力を保持する「抗原結合部位」（例えば、断片、サブ配列、相補性決定領域（CDR））を含み、(i) Fabフラグメント、すなわちVL、VH、CL及びCH1ドメインからなる一価断片；(ii) F(ab')2断片、すなわちヒンジ領域でジスルフィド結合により連結された2個のFab断片を含む二価断片；(iii) VH及びCH1ドメインからなるFd断片；(iv) 抗体の1本の腕のVL及びVHドメインからなるFv断片；(v) VHドメインからなるdAb断片(Wardらの文献, (1989) Nature, 341:544-546)；及び、(vi) 単離された相補性決定領域(CDR)；を含む。单鎖抗体も、用語「抗体」を参照することにより含まれる。本発明の抗体には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、二重特異性抗体、ヒト化抗体若しくはキメラ抗体、单鎖抗体、Fab断片及びF(ab')2断片、Fab発現ライブリによって産生される断片、抗イディオタイプ（抗Id）抗体、並びに上記いずれかのエピトープ結合断片を含むが、これらに限定されない。本発明の免疫グロブリン分子は、免疫グロブリン分子の任意のクラス（例えばIgG、IgE、IgM、IgD及びIgA）又はサブクラスであり得る。30

【0173】

用語「特異的に結合」（又は「免疫特異的に結合」）は、抗体がその意図する標的に結合することを示すことを意図するものではない。むしろ、抗体は、その意図する標的に40

対する親和性が、非標的分子に対するその親和性と比較した場合に、典型的には約5倍を上回る場合に、「特異的に結合する」。好適には、望ましくない物質、特に健常な人又は動物の天然存在型タンパク質又は組織との有意な交差反応又は交差結合がない。抗体の親和性は、非標的分子に対するその親和性よりも、例えば、少なくとも約5倍、例えば10倍、例えば25倍、特に50倍、及び特に100倍以上、標的分子に対して大きな親和性である。いくつかの実施態様において、抗体又は他の結合剤と抗原との間の特異的結合は、少なくとも $10^6 M^{-1}$ の結合親和性を意味する。抗体は、例えば、少なくとも約 $10^7 M^{-1}$ 、例えば約 $10^8 M^{-1}$ ～約 $10^9 M^{-1}$ 、約 $10^9 M^{-1}$ ～約 $10^{10} M^{-1}$ 、又は約 $10^{10} M^{-1}$ ～約 $10^{11} M^{-1}$ の親和性で結合し得る。

【0174】

10

親和性は $K_d = k_{off}/k_{on}$ として算出される (k_{off} は解離速度定数であり、 k_{on} は会合速度定数であり、 K_d は平衡定数である。)。親和性は、さまざまな濃度 (c) で標識化リガンドの画分結合 (r) を測定することによって、平衡で決定できる。データは、スキヤッチャード式を使用してグラフ化される : $r/c = K(n-r)$:

式中

r = 平衡時の結合したリガンドのモル数 / 受容体のモル数 ;

c = 平衡時の遊離リガンド濃度 ;

K = 平衡会合定数 ; 及び、

n = 受容体分子1個あたりのリガンド結合部位の数。

図式解法により、 r/c をY軸にプロットし、対して r をX軸にプロットし、こうしてスキヤッチャードプロットを作製する。親和性は、その線の負の傾斜である。 K_{off} は、結合した標識化リガンドを標識されていない過剰のリガンドと競合させることにより測定できる(例えば、米国特許第6,316,409号を参照されたい)。その標的分子に対する標的剤の親和性は、例えば、少なくとも約 1×10^{-6} モル/リットル、例えば少なくとも約 1×10^{-7} モル/リットル、例えば少なくとも約 1×10^{-8} モル/リットル、特に少なくとも約 1×10^{-9} モル/リットル、及び特に少なくとも約 1×10^{-10} モル/リットルである。スキヤッチャード分析による抗体親和性測定は、当技術分野において周知である。例えば、van Erpらの文献、J. Immunoassay 12: 425-43, 1991; Nelson及びGriswoldの文献、Comput. Methods Programs Biomed. 27: 65-8, 1988を参照されたい。

20

【0175】

30

一実施態様において、エフリンA型受容体10をコードする遺伝子の遺伝子産物を認識する抗体は、公然利用可能である。別の実施態様において、当該技術分野で公知の方法は、エフリンA型受容体10、エフリンA型受容体10類似体、エフリンA型受容体10関連ポリペプチド、又は前述のいずれかの断片若しくは誘導体を認識する抗体を生産するために使用される。当業者は、例えば、研究室マニュアル (A Laboratory Manual), Ed Harlow及びDavid Lane編, Cold Spring Harbor Laboratory (1988), Cold Spring Harbor, N.Yに記載されるような多くの手段が抗体生産に利用可能であることを認識するであろう。当業者はまた、抗体を模倣する結合断片又はFab断片も様々な手段により遺伝情報から調製することもできることを認めるであろう(抗体工学:実践的アプローチ (Antibody Engineering: A Practical Approach (Borrebaeck, C編), 1995, Oxford University Press, Oxford; J. Immunol. 149, 3914-3920 (1992))。

40

【0176】

本発明の一実施態様において、エフリンA型受容体10の特定のドメインに対する抗体が生産される。特定の実施態様において、エフリンA型受容体10の親水性断片が、抗体生産のための免疫原として使用される。

【0177】

抗体生産において、所望の抗体のスクリーニングは、当該技術分野において公知の技術、例えばELISA(酵素結合免疫吸着アッセイ)によって、達成できる。例えば、エフリンA型受容体10の特定のドメインを認識する抗体を選択するために、そのようなドメインを含むエフリンA型受容体10断片に結合する生成物について生産されたハイブリドーマをアッセ

50

イできる。第1のエフリンA型受容体10相同体を特異的に結合するが、第2のエフリンA型受容体10相同体には特異的に結合しない（又はこれに結合性が低い）抗体の選択のために、第1のエフリンA型受容体10相同体への陽結合、及び第2のエフリンA型受容体10相同体への結合の欠如（又は結合の減少）に基づき、選択できる。同様に、エフリンA型受容体10を特異的に結合するが、同タンパク質の異なるアイソフォーム（エフリンA型受容体10と同じコアペプチドを有する異なるグリコフォームなど）に特異的に結合しない（又は結合性が低い）抗体の選択のために、エフリンA型受容体10への陽結合、及び異なるアイソフォーム（例えば異なるグリコフォーム）への結合の欠如（又は結合の減少）に基づき、選択できる。従って、本発明は、エフリンA型受容体10の異なるアイソフォーム（例えばグリコフォーム）に対するよりも、エフリンA型受容体10に対してより大きな親和性（例えば少なくとも2倍、例えば少なくとも5倍、特に少なくとも10倍大きな親和性）で結合する抗体（モノクローナル抗体など）を提供する。

【0178】

本発明の方法で使用できるポリクローナル抗体は、免疫動物の血清から誘導される抗体分子の異種集団である。非分画免疫血清を使用することもできる。当該技術分野で周知のさまざまな手順は、エフリンA型受容体10、エフリンA型受容体10の断片、エフリンA型受容体10関連ポリペプチド、又はエフリンA型受容体10関連ポリペプチドの断片に対するポリクローナル抗体の生産のために使用可能である。例えば、1つの方法は、関心対象ポリペプチドを精製すること、又は、例えば周知技術の固相ペプチド合成法を使用して、関心対象ポリペプチドを合成することである。例えば、タンパク質精製の手引き（Guide to Protein Purification），Murray P. Deutcher編，Meth. Enzymol. Vol 182 (1990)；固相ペプチド合成（Solid Phase Peptide Synthesis），Greg B. Fields編，Meth. Enzymol. Vol 289 (1997)；Kiso らの文献，Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 38:1192-99, 1990; Mostafavi らの文献，Biomed. Pept. Proteins Nucleic Acids 1:255-60, 1995; Fujiwara らの文献，Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 44:1326-31, 1996を参照されたい。選択されたポリペプチドはそれから、ウサギ、マウス、ラットなどを含むがこれらに限定されない様々な宿主動物に注入免疫し、ポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体を產生するために使用することができる。エフリンA型受容体10がゲル電気泳動により精製される場合、エフリンA型受容体10はポリアクリルアミドゲルからの抽出を伴い又は伴わずに、免疫のために使用できる。完全又は不完全フロイントアジュvant、水酸化アルミニウムなどのミネラルゲル、リゾレシチンなどの表面活性物質、ブルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油乳剤、キーホールリンペットヘモシアニン、ジニトロフェノール、及びBCG（カルメット ゲラン桿菌）又はコリネバクテリウム・バルバムなどのアジュvantを含むがこれらに限定されない様々なアジュvant（すなわち免疫賦活剤）を、宿主種に応じて、免疫学的反応を強化するために使用することができる。さらなる補助剤も、当該技術分野で周知である。

【0179】

エフリンA型受容体10、エフリンA型受容体10の断片、エフリンA型受容体10関連ポリペプチド、又はエフリンA型受容体10関連ポリペプチドの断片に指示されたモノクローナル抗体（mAbs）の生産のために、培養で持続細胞株による抗体分子の生産を提供する任意の技術を使用できる。例えば、ハイブリドーマ技術は、Kohler及びMilstein (1975, Nature 256:495-497)によりはじめて開発され、同様にトリオーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術（Kozbor らの文献，1983, Immunology Today 4:72）及びEBV-ハイブリドーマ技術（Cole らの文献，1985, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy）において、Alan R. Liss社，77-96頁)がヒトモノクローナル抗体を生産するために開発された。このような抗体は、IgG、IgM、IgE、IgA、IgD及びそのいずれかのサブクラスを含む、任意の免疫グロブリンのクラスのものであり得る。本発明のmAbsを生産するハイブリドーマは、インビトロ又はインビボで培養してもよい。本発明の更なる実施態様において、モノクローナル抗体は、公知の技術を利用して無菌動物において产生できる(PCT/US90/02545 (引用により本明細書に組み込まれる))。

10

20

30

40

50

【0180】

モノクローナル抗体には、ヒトモノクローナル抗体及びキメラモノクローナル抗体(例えば、ヒト-マウスキメラ)を含むが、これらに限定されない。キメラ抗体は、異なる部分が異なる種由来である分子、例えばヒト免疫グロブリン定常領域及びマウスマウント由来の可変領域を有する分子である。(例えば、Cabillyらの米国特許第4,816,567号;及び、Bossらの米国特許第4,816,397号を参照されたく、これらは引用によりその全てが本明細書に組み込まれる。)。ヒト化抗体は、非ヒト種由来の1以上の相補性決定領域(CDR)、及びヒト免疫グロブリン分子由来のフレームワーク領域を有する、非ヒト種由来の抗体分子である。(例えば、Queenの米国特許第5,585,089号を参照されたく、これは、その全体が引用により本明細書に組み込まれる。)。

10

【0181】

キメラ及びヒト化モノクローナル抗体は、例えば国際公開番号WO 87/02671; 欧州特許出願第184,187号; 欧州特許出願第171,496号; 欧州特許出願第173,494号; 国際公開番号W 086/01533; 米国特許第4,816,567号; 欧州特許出願第125,023号; Betterらの文献, 1988, Science 240:1041-1043; Liuらの文献, 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443; Liuらの文献, 1987, J. Immunol. 139:3521-3526; Sunらの文献, 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218; Nishimuraらの文献, 1987, Canc. Res. 47:999-1005; Woodらの文献, 1985, Nature 314:446-449; 及び、Shawらの文献, 1988, J. Natl. Cancer Inst. 80:1 553-1559; Morrisonの文献, 1985, Science 229:1202-1207; Oiらの文献, 1986, Bio/Techniques 4:214; 米国特許第5,225,539号; Jonesらの文献, 1986, Nature 321:552-525; Verhoevenらの文献(1988) Science 239:1534; Verhoevenらの文献、(1988) Science 239:1534; 及び、Beidlerらの文献, 1988, J. Immunol. 141:4053-4060; に記載される方法を使用する公知技術の組換えDNA技術によって生産することができる。

20

【0182】

完全ヒト抗体は、ヒト対象の治療的な処置のために特に望ましい。この種の抗体は、内在性免疫グロブリン重鎖及び軽鎖遺伝子を発現できないが、ヒト重鎖及び軽鎖遺伝子を発現できるトランスジェニックマウスを使用して、生産することができる。トランスジェニックマウスは、選択された抗原、例えばエフリンA型受容体10の全体又は一部を用いて通常の様式で免疫を受けた。抗原に指示されたモノクローナル抗体は、従来のハイブリドーマ技術を使用して得ることができる。トランスジェニックマウスにより収容されているヒト免疫グロブリン導入遺伝子は、B細胞分化の間に再編成し、その後クラススイッ칭及び体細胞突然変異を受ける。従って、このような技術を使用して、治療的に有用なIgG、IgA、IgM及びIgE抗体を生産できる。ヒト抗体を生産するこの技術の概要については、Lönnberg及びHuszarの文献(1995, Int. Rev. Immunol. 13:65-93)を参照されたい。ヒト抗体及びヒトモノクローナル抗体を生産するためのこの技術、並びにこのような抗体を生産するためのプロトコルの詳細な考察については、以下を参照されたい: 例えば、米国特許第5,625,126号; 米国特許第5,633,425号; 米国特許第5,569,825号; 米国特許第5,661,016号; 及び、米国特許第5,545,806号。加えて、Abgenix社(Freemont, CA)及びGenpharm(San Jose, CA)などの会社は、先に記載したものと類似の技術を使用して、選択された抗原に指示されたヒト抗体を提供するのに関与し得る。

30

【0183】

選択されたエピトープを認識する完全ヒト抗体は、「ガイドセレクション」と呼ばれる技術を使用して生産できる。この方法において、選択された非ヒトモノクローナル抗体(例えばマウス抗体)は、同エピトープを認識する完全ヒト抗体の選択を導くために使用される。(Jespersらの文献(1994) Bio/technology 12:899-903)。

40

【0184】

本発明の抗体は、選択された標的への結合について、ポリペプチドのライブラリを生産して選別するファージディスプレイ技術の使用により生産することもできる。例えば、Cwirlaらの文献, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 6378-82, 1990; Devlinらの文献, Science 249, 404-6, 1990, Scott及びSmithの文献, Science 249, 386-88, 1990; 及び、Lad

50

nerらの文献、米国特許第5,571,698号を参照されたい。ファージディスプレイ法の基本的概念は、スクリーニングされるポリペプチドをコードしているDNAとそのポリペプチドとの間の物理的関連付けの確立である。この物理的関連付けは、該ポリペプチドをコードしているファージゲノムを封入しているキャプシドの一部としてポリペプチドを提示する、ファージ粒子により提供される。ポリペプチドとその遺伝物質との間の物理的関連付けの確立は、異なるポリペプチドを有する非常に多数のファージの同時大量スクリーニングを可能にする。標的への親和性を有するポリペプチドを提示するファージは該標的に結合し、これらのファージは、該標的への親和性スクリーニングにより濃縮される。これらのファージにより提示されるポリペプチドの同一性は、それらの各ゲノムにより決定できる。これら的方法を使用して、所望の標的に結合親和性を有すると同定されたポリペプチドは、それから従来的な手段により大量に合成できる。例えば、米国特許番号第6,057,098号を参照されたく、全ての表、図面及び特許請求の範囲を含むその全てが引用により本明細書に組み込まれる。特に、この種のファージは、レパートリ又は組合せの抗体ライブラリ(例えばヒト又はマウス)から発現される抗原結合ドメインを提示するために利用できる。関心対象の抗原を結合する抗原結合ドメインを発現しているファージは、抗原、例えば、標識化抗原、又は固体表面若しくはビーズに結合若しくは捕獲された抗原を使用して、選択又は同定できる。これらの方法で使用するファージは、典型的には、ファージ遺伝子III又は遺伝子VIIIタンパク質のいずれかに組換え的に融合されたFab、Fv又はジスルフィド安定化Fv抗体ドメインを伴ってファージから発現されたfd及びM13結合ドメインを含む、線維状ファージである。本発明の抗体を作るために使用することができるファージディスプレイ法は、以下に開示されるものを含む:Brinkmanらの文献、J. Immunol. Methods 182:41-50 (1995);Amesらの文献、J. Immunol. Methods 184:177-186 (1995);Kettleboroughらの文献、Eur. J. Immunol. 24:952-958 (1994);Persicらの文献、Gene 187:9-18 (1997);Burtonらの文献、Advances in Immunology 57:191-280 (1994);国際出願番号PCT/GB91/01134;国際公開番号WO 90/02809;WO 91/10737;WO 92/01047;WO 92/18619;WO 93/11236;WO 95/15982;WO 95/20401;及び、米国特許第5,698,426号;第5,223,409号;第5,403,484号;第5,580,717号;第5,427,908号;第5,750,753号;第5,821,047号;第5,571,698号;第5,427,908号;第5,516,637号;第5,780,225号;第5,658,727号;第5,733,743号及び第5,969,108号(それぞれ、その全体が引用により本明細書に組み込まれる)。

【0185】

上記文献に記載されているように、ファージ選択の後、該ファージ由来の抗体コード領域は、ヒト抗体を含む抗体全体又は任意のその他の所望の抗原結合断片を生産するために単離して使用することができ、及び例えば以下に詳細に記載するような哺乳動物細胞、昆虫細胞、植物細胞、酵母及び細菌を含む任意の所望の宿主において発現させることができる。例えば、Fab、Fab'及び $F(ab')_2$ 断片を組換え的に生産する技術は、国際公開番号WO 92/22324; Mullinaxらの文献、BioTechniques 12(6):864-869 (1992);及びSawaiらの文献、AJRI 34:26-34 (1995);及びBetterらの文献、Science 240: 1041-1043 (1988)(前記文献は引用によりその全てが組み込まれる)において開示されるものなどの、公知技術の方法を使用して利用することもできる。

【0186】

単鎖Fvs及び抗体を生産するために使用することができる技術の例には、米国特許4,946,778及び5,258,498; Hustonらの文献、Methods in Enzymology 203:46-88 (1991); Shuらの文献 PNAS 90:7995-7999 (1993);及びSkerraらの文献、Science 240:1038-1040 (1988)に記載されているものを含む。

【0187】

本発明は、当該技術分野において公知の方法により作製できる二重特異性抗体の使用をさらに提供する。完全長二重特異性抗体の従来的生産は、2つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖対の同時発現であって、該2つの鎖が異なる特異性を有する、前記同時発現に基づいている(Milsteinらの文献、1983、Nature, 305 : 537-539)。免疫グロブリン重鎖及び軽鎖のランダムな分類のため、これらのハイブリドーマ(クアドローマ)は、10の異なる抗体分子の

10

20

30

30

40

50

潜在的混合物を生じ、そのうちの1つのみが的確な二重特異性構造を有する。通常、親和性クロマトグラフィー工程によってなされる的確な分子の精製は、むしろ扱いにくく、産物収率は低い。同様の手法は、1993年5月13日に公開されたWO93/08829、及びTrauneckerらの文献、1991、EMBO J. 10 : 3655-3659に開示されている。

【0188】

異なるアプローチ及びより好ましいアプローチに従って、所望の結合特異性をもつ抗体可変ドメイン(抗体-抗原結合部位)を免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合させる。該融合は、好ましくは、ヒンジ、CH2及びCH3領域の少なくとも一部を含む免疫グロブリン重鎖定常ドメインを伴う。該融合のうちの少なくとも1つに存在する軽鎖結合に必要な部位を含む、第1の重鎖定常部(CH1)を有することが好ましい。免疫グロブリン重鎖融合物、及び所望の場合、免疫グロブリン軽鎖をコードするDNAを別々の発現ベクターに挿入し、適切な宿主生物に同時トランスフェクトする。これは、該構築に使用した不均等な比率の3つのポリペプチド鎖が最適収量を提供する実施態様において、3つのポリペプチド断片の相互の比率を調節する際に優れた柔軟性を提供する。しかし、同等の比率の少なくとも2つのポリペプチド鎖の発現により高収率を生じる場合、又は該比率が具体的意義を有しない場合、2つ又は3つ全てのポリペプチド鎖のコード配列を発現ベクターに挿入することができる。

10

【0189】

このアプローチの具体的実施態様において、二重特異性抗体は、一方の腕における第1の結合特異性を有するハイブリッド免疫グロブリン重鎖、及び他方の腕における(第2の結合特性を提供する)免疫グロブリン重鎖-軽鎖対から構成される。二重特異性分子の半分のみに免疫グロブリン軽鎖が存在することが、容易な単離方法を提供するので、この非対称構造は、望まれない免疫グロブリン鎖状結合からの所望の二重特異性化合物の単離を促進することがわかった。このアプローチは、1994年3月3日に公開されたWO 94/04690において開示されている。二重特異性抗体の生産に関するさらなる詳細については、例えば、Sureshらの文献、Methods in Enzymology, 1986 121 : 210を参照されたい。

20

【0190】

本発明は、抗エフリンA型受容体10免疫グロブリン分子の機能的に活性な断片、誘導体又は類似体を提供する。機能的に活性とは、断片、誘導体又は類似体が、該断片、誘導体又は類似体が誘導される抗体により認識されるのと同じ抗原を認識する抗-抗-イディオタイプ抗体(すなわち、三次抗体)を誘発できることを意味する。具体的には、特定の実施態様において、免疫グロブリン分子のイディオタイプの抗原性は、フレームワーク及び具体的に該抗原を認識するCDR配列に対するC末端であるCDR配列の削除により強化できる。いずれのCDR配列が該抗原を結合するかについて決定するために、該CDR配列を含む合成ペプチドを、公知技術の任意の結合実験方法による該抗原を用いる結合アッセイに使用できる。

30

【0191】

本発明は、 $F(ab')_2$ 断片及びFab断片などであるがこれらに限定されない抗体断片を提供する。特異的なエピトープを認識する抗体断片は、公知の技術によって生産できる。 $F(ab')_2$ 断片は、可変領域、軽鎖定常領域及び重鎖のCH1ドメインから構成され、該抗体分子のペプシン消化によって生産される。Fab断片は、 $F(ab')_2$ 断片のジスルフィド架橋を還元することにより生産される。また、本発明は、本発明の抗体の重鎖と軽鎖との二量体、又はFvs若しくは单鎖抗体(SCA)などの任意のその最小断片(例えば、米国特許第4,946,778号; Birdの文献, 1988, Science 242:423-42; Hustonらの文献, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; 及び、Wardらの文献, 1989, Nature 334:544-54に記載されるようなもの)、又は本発明の抗体と同じ特異性をもつ任意の他の分子も提供する。单鎖抗体は、アミノ酸架橋を介してFv領域の重鎖及び軽鎖断片を連結することにより形成され、一本鎖ポリペプチドを生じる。大腸菌(E. coli)における機能的なFv断片の集成のための技術を使用してもよい(Skerra らの文献, 1988, Science, 242 : 1038-1041)。

40

【0192】

50

その他の実施態様において、本発明は、本発明の免疫グロブリンの融合タンパク質(又はその機能的に活性な断片)、例えば、該免疫グロブリンがN末端又はC末端にて共有結合(例えば、ペプチド結合)を介してその免疫グロブリンでない別のタンパク質のアミノ酸配列(又はその一部、好ましくは該タンパク質の少なくとも10、20又は50アミノ酸部分)に融合されている融合タンパク質を提供する。好ましくは、免疫グロブリン又はその断片は、定常ドメインのN末端にて他のタンパク質に共有結合で連結されている。上記のように、このような融合タンパク質は、精製を容易にし、インビボでの半減期を増大し、及び免疫系に対する上皮閑門を越えた抗原の送達を増強し得る。

【0193】

本発明の免疫グロブリンは、この種の共有結合が免疫特異的結合を損なわない限り、すなわち、任意の型の分子の共有結合によって修飾される類似体及び誘導体を含む。例えば、限定目的ではないが、免疫グロブリンの誘導体及び類似体には、例えばグリコシル化、アセチル化、ペグ化、ホスフィリレーション(phosphylation)、アミド化、公知の保護/保護基による誘導体化、タンパク質開裂、細胞リガンドに対する結合又は他のタンパク質、その他によりさらに修飾されたものを含む。特定の化学裂開、アセチル化、ホルミル化などを含むが、これらに限定されない数多くの化学修飾のいずれかを、周知の技術により実施できる。加えて、類似体又は誘導体は、1以上の非古典的アミノ酸を含むことができる。

【0194】

前述の抗体は、エフリンA型受容体10の局在及び活性に関して、公知技術の方法で、例えば、タンパク質を画像化するために、適切な生理的試料においてそのレベルを測定するために、診断法などにおいて、使用できる。

【0195】

(エフリンA型受容体10に対するアフィボディの生産)

アフィボディ分子は、ブドウ球菌プロテインAのIgG-結合ドメインの1つに由来する、58アミノ酸残基に基づく親和性タンパク質の新規なクラスを表す。三重螺旋束ドメインは、コンビナトリアルファージミドライブラリの構築に対する足場として使用され、これからファージディスプレイ技術を使用して、所望の分子を標的化するアフィボディバリアントを選択し得る(Nord K, Gunnarsson E, Ringdahl J, Stahl S, Uhlen M, Nygren PAの文献、「ヘリカル細菌受容体ドメインのコンビナトリアルライブラリから選択された結合タンパク質(Binding proteins selected from combinatorial libraries of an -helical bacterial receptor domain)」, Nat Biotechnol 1997; 15:772-7. Ronmark J, Gronlund H, Uhlen M, Nygren PAの文献、「プロテインAのコンビナトリアル工学からのヒト免疫グロブリンA(IgA)特異的リガンド(Human immunoglobulin A (IgA)-specific ligands from combinatorial engineering of protein A)」, Eur J Biochem 2002;269:2647-55)。その低分子量(6kDa)と組み合わせたアフィボディ分子の単純で堅固な構造は、広範囲の用途、例えば検出試薬として(Ronmark J, Hansson M, Nguyen T, らの文献「大腸菌において產生されるアフィボディ-Fcキメラの構築及び特徴づけ(Construction and characterization of Affibody-Fc chimeras produced in Escherichia coli)」, J Immunol Methods 2002;261:199-211)、及び受容体相互作用を阻害するために(Sandstrom K, Xu Z, Forsberg G, Nygren PAの文献、「コンビナトリアルタンパク質工学により開発されたCD28結合アフィボディリガンドによるCD28-CD80共刺激シグナルの阻害(Inhibition of the CD28-CD80 co-stimulation signal by a CD28-binding Affibody ligand developed by combinatorial protein engineering)」, Protein Eng 2003; 16:691-7)、該分子を適切とさせる。アフィボディ及びその生産方法のさらなる詳細は、引用によりその全てが本明細書に組み込まれる米国特許第5831012号を参照することにより得ることができる。

【0196】

また、標識化アフィボディーは、アイソフォームの存在量を決定するためのイメージング用途に有用であり得る。

10

20

30

40

50

【0197】

(エフリンA型受容体10に対するドメイン抗体の生産)

本明細書における抗体への言及は、ドメイン抗体への言及を包含する。ドメイン抗体(dAb)は、抗体の最も小さな機能的結合単位であり、ヒト抗体の重(VH)鎖又は軽(VL)鎖の可変領域に対応する。ドメイン抗体は、およそ13kDaの分子量を有する。ドマンティス(Domantis)は、完全ヒトV_H及びV_LdAbの一連の大きくかつ高度に機能的なライブラリを開発し(各ライブラリにおいて10,000,000,000超の異なる配列)、これらのライブラリを使用して治療標的に特異的であるdAbを選択する。多くの従来抗体とは対照的に、ドメイン抗体は、細菌、酵母及び哺乳動物細胞系において良好に発現する。ドメイン抗体及びその生産方法のさらなる詳細は、以下を参照することによって得ることができる:米国特許6,291,158;6,582,915;6,593,081;6,172,197;6,696,245;米国出願番号2004/0110941;欧州特許出願第1433846号、並びに欧州特許第0368684号及び第0616640号;WO05/035572、WO04/101790、WO04/081026、WO04/058821、WO04/003019及びWO03/002609(これらのそれぞれは、その全体が本明細書に引用により組み込まれる)。

10

【0198】

(エフリンA型受容体10に対するナノボディの生産)

ナノボディは、抗体由来の治療的タンパク質であり、天然に存在する重鎖抗体の固有の構造及び機能特性を含む。これらの重鎖抗体は、1つの可変ドメイン(VHH)及び2つの定常ドメイン(C_H2及びC_H3)を含む。重要なことに、クローニングされかつ単離されたVHHドメインは、元の重鎖抗体の全抗原結合能を保持する完全に安定なポリペプチドである。ナノボディは、ヒト抗体のVH領域と高い相同性を有し、活性の損失を全く伴わずにさらにヒト化できる。重要なことに、ナノボディは低免疫原性能を有し、これは靈長類研究において、ナノボディリード化合物を用いて確認された。

20

【0199】

ナノボディは、従来型抗体の利点を、小分子薬の重要な特徴と組み合わせる。従来の抗体の様に、ナノボディは、高い標的特異性、それらの標的に対する高親和性、及び低い固有毒性を示す。しかしながら、小分子薬の様に、それらは、酵素を阻害でき、受容体間隙に容易に到達できる。さらにまた、ナノボディは極めて安定で、注入以外の手段により投与でき(例えば、引用によりその全てが本明細書に組み込まれるWO 04/041867を参照されたい)、生産が容易である。ナノボディの他の利点には、それらの小型の結果として一般的でないか又は隠れたエピトープを認識すること、それら特有の三次元構造に起因する高親和性及び選択性によりタンパク質標的の腔若しくは活性部位に結合すること、薬剤様柔軟性、半減期の合目的化、並びに発見の容易性及び迅速性を含む。

30

【0200】

ナノボディは、1つの遺伝子によってコードされ、ほとんど全ての原核及び真核生物宿主、例えば大腸菌(例えば、引用によりその全てが本明細書に組み込まれるUS 6,765,087を参照されたい)、カビ(例えば、アスペルギルス又はトリコデルマ)、及び酵母(例えば、サッカロマイセス、クルイベロマイセス(Kluyveromyces)、ハンセンユラ(Hansenula)又はピキア)(例えば、引用によりその全てが本明細書に組み込まれるUS 6,838,254を参照されたい)において効率的に生産される。生産過程は計測可能であり、数キログラム量のナノボディを生産した。ナノボディは、従来の抗体と比較して優れた安定性を発揮するので、それらは長期貯蔵寿命、使用準備済溶液として製剤できる。

40

【0201】

ナノクローニング法(例えば、引用によりその全てが本明細書に組み込まれるWO 06/079372を参照されたい)は、B細胞の自動化ハイスループット選択に基づき、所望の標的に対してナノボディを生成する特許取得済みの方法である。

【0202】

(エフリンA型受容体10に対するユニボディの生産)

ユニボディの生産は、別の抗体断片技術である。しかしながら、これは、IgG4抗体のヒンジ領域の除去に基づくものである。ヒンジ領域の削除は、従来のIgG4抗体の基本的には半

50

分のサイズであり、かつIgG4抗体の二価結合領域よりもむしろ一価結合領域を有する分子を生じる。IgG4抗体が不活性で、それゆえ免疫系と相互作用しないことも周知であり、これは免疫応答が望ましくない場合における疾患の治療に有利であり得、この効果はユニボディに受け継がれている。例えば、ユニボディは、それらが結合した細胞を阻害又は抑制するが、殺さないということに機能し得る。加えて、癌細胞に結合しているユニボディは、該癌細胞が増殖することを刺激しない。さらに、ユニボディは従来型IgG4抗体の約半分のサイズであるので、それらは潜在的に有利な効率でより大きな固体腫瘍により良好な分布を示すことができる。ユニボディは、全IgG4抗体と同等の速度で身体から排出され、それらの抗原に対し全抗体と同等の親和性で結合できる。ユニボディの詳細は、引用によりその全てが本明細書に組み込まれる特許WO2007/059782を参照することにより得ることができる。

10

【0203】

(エフリンA型受容体10に対するDARPinの生産)

DARPin(設計されたアンキリンリピートタンパク質(Designed Ankyrin Repeat Proteins))は、抗体模倣体DRP(設計されたリピートタンパク質(Designed Repeat Protein))技術の1つの例であり、非抗体ポリペプチドの結合能力を利用するため開発された。アンキリン又はロイシンリッチリピートタンパク質などのリピートタンパク質は普遍的な結合分子であり、抗体と異なった様式で、細胞内及び細胞外で生じる。それらの固有のモジュラー構造は、構造単位(繰り返し)を反復することを特徴とし、それらは共に積み重なり、可変的及びモジュラー標的結合表面を提示する長いリピートドメインを形成する。このモジュラリティに基づき、高度に多様化された結合特異性を有するポリペプチドのコンビナトリアルライブラリを作製できる。この戦略には、可変表面残基を提示する自家和合性リピートのコンセンサス設計及びリピートドメインへのそれらのランダムなアセンブリを含む。

20

【0204】

DARPinは、細菌発現系において非常に高収率で生産でき、それらは公知の最も安定なタンパク質に属する。ヒト受容体、サイトカイン、キナーゼ、ヒトプロテアーゼ、ウイルス及び膜タンパク質を含む広範囲の標的タンパク質に対し高度に特異的で高親和性なDARPinが選択された。一桁代のナノモル～ピコモル範囲に親和性を有するDARPinを得ることができる。

30

【0205】

DARPinは、ELISA、サンドイッチELISA、フローサイトメトリー分析(FACS)、免疫組織化学(IHC)、チップ適用、親和性精製又はウエスタンプロット法を含む、広範囲の用途に使用される。DARPinは、例えば、緑色蛍光タンパク質(GFP)に融合した細胞内マーカータンパク質として、細胞内区画内で非常に活性であることも判明した。DARPinはさらに、pM範囲のIC50でウイルス侵入を阻害するために使用された。DARPinは、タンパク質-タンパク質相互作用を遮断するために理想的であるのみならず、酵素も阻害する。プロテアーゼ、キナーゼ及び輸送体は、ほぼアロステリック阻害様式で、成功的に阻害された。腫瘍上の非常に速くかつ特異的な富化並びに血液比率に対する腫瘍の高度な優位性は、DARPinがインビオ診断又は治療的アプローチに非常に適するようにさせる。

40

【0206】

DARPin及び他のDRP技術に関する追加的情報は、米国特許出願公開番号第2004/0132028号及び国際特許出願公開番号WO 02/20565に見出すことができ、この両方は引用によりそれらの全てが本明細書に組み込まれる。

【0207】

(エフリンA型受容体10に対するアンチカリンの生産)

アンチカリンはさらなる抗体模倣技術であるが、この場合における結合特異性は、ヒト組織及び体液において自然にかつ豊富に発現される低分子量ファミリーのタンパク質である、リポカリンに由来する。リポカリンは、化学的に感応性又は不溶な化合物の生理学的輸送及び貯蔵に関連して、インビオでのある範囲の機能を実行するために進化してきた

50

。リポカリンは、該タンパク質の一方の末端で4つのループを支持する、高度に保存された バレルを含む、堅固な固有の構造を有する。これらのループは、結合ポケットへの入口、及び個々のリポカリンの間の結合特異性におけるバリエーションの主因である該分子のこの部分における高次構造的な差異を形成する。

【 0 2 0 8 】

保存された -シートフレームワークにより支持される超可変ループの全体構造は免疫グロブリンを暗示し、リポカリンは、サイズに関してかなり抗体と異なり、これは1つの免疫グロブリンドメインよりわずかに大きい160～180アミノ酸の1つのポリペプチド鎖からなる。

【 0 2 0 9 】

リポカリンはクローン化され、それらのループはアンチカリンを作成するために操作に供される。構造的に多様なアンチカリンのライブラリが作製されており、アンチカリンディスプレイは結合機能の選択及びスクリーニングを可能にし、それに続けて原核系又は真核生物系のさらなる分析のための可溶タンパク質の発現及び生産がなされる。研究は、アンチカリンが実質的に任意のヒト標的タンパク質に特異的であるように開発できることを成功的に実証し、それらは単離でき、ナノモル以上の範囲の結合親和性を得ることができる。

10

【 0 2 1 0 】

アンチカリンは、二重標的化タンパク質、いわゆるデュオカリンとして形式化することもできる。デュオカリンは、標準製造プロセスを使用して、1つの容易に生成された単量体タンパク質における2つの別々の治療標的を結合するとともに、その2つの結合ドメインの構造方向にかかわらず標的特異性及び親和性を保持する。

20

【 0 2 1 1 】

1つの分子を介する複数の標的の調節は、1つより多くの原因因子を含むことが公知の疾患において、特に有利である。さらに、デュオカリンなどの二価又は多価の結合様式は、疾患において細胞表面分子を標的化すること、シグナル伝達経路においてアゴニスト的效果を媒介すること、又は細胞表面受容体の結合及びクラスタリングを介する強化された内部移行効果を誘導することにおいて、顕著な潜在性を有する。さらにまた、デュオカリンの高度に固有な安定性は単量体アンチカリンに匹敵し、柔軟な製剤及びデュオカリンの送達能を提供する。

30

【 0 2 1 2 】

アンチカリンに関する追加的情報は、米国特許第7,250,297号及び国際特許出願公開番号WO 99/16873において見出すことができ、その両方は引用によりそれらの全てが本明細書に組み込まれる。

【 0 2 1 3 】

(エフリンA型受容体10に対するアビマーの生産)

アビマーは、インビトロエキソンシャフリング及びファージディスプレイによりヒト細胞外受容体の大きなファミリーから進化し、これは結合特性及び阻害特性を有するマルチドメインタンパク質を生じる。複数の独立する結合ドメインを連結することは、結合能力を生み出すことが示されており、従来の單一エピトープ結合タンパク質と比較して親和性及び特異性の向上をもたらす。他の可能性のある利点には、大腸菌における複数標的特異的分子の単純かつ効果的な生産、改良耐熱性及びプロテアーゼに対する抵抗性を含む。ナノモル未満の親和性を有するアビマーは、様々な標的に対して得られている。

40

【 0 2 1 4 】

アビマーに関する追加的情報は、米国特許出願公開番号2006/0286603、2006/0234299、2006/0223114、2006/0177831、2006/0008844、2005/0221384、2005/0164301、2005/0089932、2005/0053973、2005/0048512、2004/0175756において見出すことができ、これらの全ては引用によりその全てが本明細書に組み込まれる。

【 0 2 1 5 】

(エフリンA型受容体10に対するバーサボディの生産)

50

バーサボディは、15%超のシステインを有する3~5kDaの小さいタンパク質であり、これは高いジスルフィド密度足場を形成し、典型的なタンパク質が有する疎水性核を置換する。疎水性核を含み、少数のジスルフィドを有する多数の疎水性アミノ酸の置換は、より小さく、より親水性で（より少ない凝集及び非特異的結合）、プロテアーゼ及び熱に対しより抵抗性であり、かつより低密度のT細胞エピトープを有するタンパク質を生じる。なぜなら、MHC提示に大部分寄与する残基は疎水性であるからである。これら4つの特性の全ては免疫原性に影響を及ぼすことが周知であり、併せることで、それらは免疫原性に大きな減少を引き起こすと予測される。

【0216】

バーサボディについてのインスピレーションは、ヒル、ヘビ、クモ、サソリ、カタツムリ及びアネモネによって產生される自然の注射可能なバイオ医薬品から生じ、これらは予想外に低い免疫原性を示すことが公知である。サイズ、疎水性、タンパク質分解性抗原プロセシング、及びエピトープ密度を設計し、スクリーニングすることにより選択された天然のタンパク質ファミリーで開始することは、天然の注射可能なタンパク質の平均をはるかに下回るレベルに最小化する。

【0217】

バーサボディの構造を与えられた場合、これらの抗体模倣体は、多価性、複特異性、半減期機構の多様性、組織標的化モジュール、及び抗体Fc領域の不在を含む、多用な様式を提供する。さらにまた、バーサボディは大腸菌において高収率で生産され、それらの親水性及び小型のため、バーサボディは高度に可溶性であり、高濃度で製剤化できる。バーサボディは、例外的に、熱安定性（それらは沸騰できる）であり、長期の貯蔵寿命を提供する。

【0218】

バーサボディに関する追加的情報は、引用によりその全てが本明細書に組み込まれる米国特許出願公開番号第2007/0191272号において見出すことができる。

【0219】

（親和性試薬の発現）

（抗体の発現）

本発明の抗体は、抗体合成についての任意の公知技術の方法、特に、化学合成によって、又は組換え発現によって生産でき、好ましくは組換え発現技術によって生産される。

【0220】

抗体又はその断片、誘導体若しくは類似体の組換え発現は、該抗体をコードする核酸の構築を必要とする。抗体ヌクレオチド配列が公知である場合、抗体をコードする核酸は、化学的に合成されたオリゴヌクレオチドから集成してもよく（例えば、Kutmeierらの文献，1994，*BioTechniques*，17：242に記載されているように）、これは、簡単にいうと、抗体をコードする配列の部分を含む重複するオリゴヌクレオチドの合成、これらのオリゴヌクレオチドのアニーリング及びライゲーション、次いでPCRによる連結されたオリゴヌクレオチドの増幅を含む。

【0221】

あるいは、抗体をコードする核酸は、該抗体をクローニングすることによって得ることができる。特定の抗体をコードする核酸を含むクローンが利用できないが、該抗体分子の配列が公知の場合、該抗体をコードする核酸は、適切な供給源（例えば、抗体cDNAライブラリ、又は該抗体を発現している任意の組織又は細胞から生産されるcDNAライブラリ）から、該配列の3'及び5'末端にハイブリダイズできる合成プライマーを使用するPCR増幅、又は特定の遺伝子配列に特異的なオリゴヌクレオチドプローブを使用するクローニングによって、得ることができる。

【0222】

特定の抗原を特異的に認識する抗体分子（又は、このような抗体をコードする核酸をクローニングするためのcDNAライブラリーのための供与源）が利用できない場合、特定の抗原に特異的な種の抗体は、当該技術分野において公知の任意の方法によって、例えばウサ

10

20

30

40

50

ギなどの動物を免疫して、ポリクローナル抗体を生産することによって、又は好ましくはモノクローナル抗体を生産することによって、生産してもよい。あるいは、少なくとも抗体のFab部分をコードするクローンは、特異抗原を結合するFab断片のクローン用のFab発現ライプラリをスクリーニングすることによって（例えばHuseらの文献，1989，*Science* 246:1275-1281に記載されるように）、又は抗体ライプラリをスクリーニングすることによって（例えば、Clacksonらの文献，1991，*Nature* 352:624；Haneらの文献，1997 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:4937を参照されたい）、得ることができる。

【0223】

いったん、少なくとも抗体分子の可変ドメインをコードする核酸が得られたら、それを、該抗体分子の定常領域をコードするヌクレオチド配列を含むベクターに導入できる（例えば、国際公開番号WO 86/05807；国際公開番号WO 89/01036；及び、米国特許第5,122,464号を参照されたい）。完全な抗体分子の発現を可能にする核酸との同時発現のための完全な軽鎖又は重鎖を含むベクターも利用できる。それから、該抗体をコードする核酸を使用して、スルフヒドリル(sulphydryl)基を含まないアミノ酸残基と鎖内ジスルフィド結合に関与している1以上の可変領域システイン残基を置換（又は欠失）するのに必要なヌクレオチド置換又は欠失を導入することができる。このような修飾は、ヌクレオチド配列における特定の突然変異又は欠失の導入のための当該技術分野において公知の任意の方法、例えば化学的突然変異誘発、インピトロ部位特異的突然変異誘発(Hutchinsonらの文献，1978，*J. Biol. Chem.* 253: 6551)、PCTに基づく方法などであるがこれらに限定されない方法で実行できる。

10

【0224】

加えて、適切な生物活性のヒト抗体分子由来遺伝子と共に適切な抗原特異性のマウス抗体分子由来遺伝子をスプライシングすることによる、「キメラ抗体」の生産のために開発された技術(Morrisonらの文献，1984，*Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:851-855；Neubergerらの文献，1984，*Nature* 312:604-608；Takedaらの文献，1985，*Nature* 314:452-454)を使用できる。上記のように、キメラ抗体は、異なる部分が異なる動物の種に由来する分子、例えば、マウスmAb及びヒト抗体定常領域に由来する可変領域を有する、例えばヒト化抗体などの分子である。

20

【0225】

いったん、本発明の抗体分子をコードする核酸が得られたら、該抗体分子の生産のためのベクターは、当該技術分野において周知の技術を使用する組換えDNA技術によって生産できる。従って、該抗体分子の配列を含む核酸を発現することにより本発明のタンパク質を生産するための方法が本明細書に記載される。当業者に周知の方法を使用して、抗体分子コード配列並びに適切な転写及び翻訳制御シグナルを含む発現ベクターを構築できる。これらの方法には、例えば、インピトロ組換えDNA技術、合成技術、及びインピボ遺伝子組換えを含む。例えば、Sambrookらの文献(1990，「分子クローニング：研究室マニュアル(Molecular Cloning, A Laboratory Manual)」，第2版，Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)及びAusubelらの文献(編，1998，「分子生物学の最新プロトコル(Current Protocols in Molecular Biology)」，John Wiley & Sons, NY)に記載される技術を参照されたい。

30

【0226】

発現ベクターを従来技術によって宿主細胞に移し、次いで該トランスフェクト細胞を従来技術によって培養し、本発明の抗体を生産する。

40

【0227】

本発明の組換え抗体を発現するために使用される宿主細胞は、大腸菌などの細菌細胞、又は好ましくは特に組換え抗体分子全体の発現のための真核細胞のいずれであってもよい。チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO)などの哺乳動物細胞は、ヒトサイトメガロウイルス由来の主要中初期遺伝子プロモータエレメントなどのベクターと併せて、抗体の有効な発現系である(Foeckingらの文献，1986，*Gene* 45: 101；Cockettらの文献，1990，*Bio/Technology* 8:2)。

50

【0228】

種々の宿主-発現ベクター系を、本発明の抗体分子を発現させるために利用してもよい。このような宿主-発現系は、関心対象のコード配列を生産し、その後に精製され得る媒体を表すのみならず、適切な配列をコードするヌクレオチドで形質転換されたか、又はトランسفェクトされた場合、本発明の抗体分子をインサイチュウで発現し得る細胞も表し得る。これらには、以下を含むが、これらに限定されない：抗体コード配列を含む組換えバクテリオファージDNA、プラスミドDNA若しくはコスミドDNA発現ベクターで形質転換された細菌(例えば、大腸菌、枯草菌)などの微生物；抗体コード配列を含む組換え酵母発現ベクターで形質転換された酵母(例えば、サッカロマイセス、ピキア)；抗体コード配列を含む組換えウイルス発現ベクター(例えば、バキュロウイルス)を感染させた昆虫細胞系；組換えウイルス発現ベクターで感染させた植物細胞系(例えば、カリフラワー・モザイクウイルス、CaMV；タバコモザイクウイルス、TMV)、又は抗体コード配列を含む組換えプラスミド発現ベクター(例えば、Tiプラスミド)で形質転換された植物細胞系；又は、哺乳動物細胞のゲノムに由来する(例えば、メタロチオネインプロモータ)若しくは哺乳動物ウイルスに由来するプロモータ(例えば、アデノウイルス後期プロモータ、ワクシニアウイルス7.5Kプロモータ)を含む組換え発現構築物を収容している哺乳動物細胞系(例えば、CO-S、CHO、BHK、293、3T3細胞)。

10

【0229】

細菌系では、発現される抗体分子について意図される用途に応じて、多数の発現ベクターを都合よく選択してもよい。例えば、大量のこのようなタンパク質が生産される場合、抗体分子を含む医薬組成物の生産のために、容易に精製される融合タンパク質産物の高レベルの発現を指示するベクターが望ましくあり得る。そのようなベクターには、以下のものを含むがこれらに限定されない：抗体コード領域がインフレームでlacZコード領域を有するベクターにそれぞれ連結され、それゆえ融合タンパク質が生産され得る、大腸菌発現ベクター-pUR278(Rutherらの文献、1983、EMBO J. 2:1791)；pINベクター(Inouye及びInouyeの文献、1985、Nucleic Acids Res. 13:3101-3109)；Van Heeke及びSchusterの文献、1989、J. Biol. Chem. 24:5503-5509)；など。pGEXベクターを使用して、グルタチオンS-トランسفエラーゼ(GST)との融合タンパク質として外来ポリペプチドを発現させててもよい。一般に、このような融合タンパク質は可溶性であり、マトリクスグルタチオン-アガロースビーズへの吸着及び結合、続く遊離グルタチオンの存在下における溶出により、溶解した細胞から容易に精製できる。pGEXベクターは、クローン化された標的遺伝子産物がGST部分から放出できるように、トロンビン又はXa因子プロテアーゼ切断部位を含むように設計する。

20

【0230】

昆虫系では、外来遺伝子を発現するためのベクターとして、オートグラファ・カリフォルニカ(Autographa californica)核多角体病ウイルス(AcNPV)を使用する。ウイルスは、ヨトウガ(Spodoptera frugiperda)細胞において増殖する。抗体コード配列は、ウイルスの非必須領域(例えば、ポリヘドリン遺伝子)に個々にクローン化でき、AcNPVプロモーター(例えば、ポリヘドリンプロモーター)の制御下に置いててもよい。哺乳動物宿主細胞において、多くのウイルスに基づく発現系(例えば、アデノウイルス発現系)を利用できる。

30

【0231】

上記のように、挿入された配列の発現を調節し、又は望まれる特定の様式で遺伝子産物を修飾及び加工された宿主細胞株を選択できる。タンパク質産物のこのような修飾(例えば、グリコシル化)及びプロセシング(例えば、切断)は、タンパク質の機能に重要であり得る。

40

【0232】

組換え抗体の長期多収生産のためには、安定な発現が好ましい。例えば、安定的に関心対象の抗体を発現する細胞系は、該細胞を該抗体のヌクレオチド配列及び選択可能な(例えばネオマイシン又はハイグロマイシン)ヌクレオチド配列を含む発現ベクターでトラン

50

スフェクトすること、及び該選択可能マーカーの発現について選択することにより、生産される。このような操作された細胞株は、抗体分子と直接的に又は間接的に相互作用する化合物のスクリーニング及び評価に特に有用であり得る。

【0233】

抗体分子の発現レベルは、ベクター増幅によって増加できる（再調査のためには、Bebington及びHentschelの文献、「DNAクローニングにおける哺乳動物細胞中のクローン化遺伝子の発現についての遺伝子増幅に基づくベクターの使用 (The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning)」，第3版 (Academic Press, New York, 1987を参照されたい）。抗体を発現するベクター系においてマーカーが増幅可能である場合、宿主細胞の培養に存在する阻害剤のレベルを高めることは、該マーカー遺伝子のコピー数を増加させる。増幅された領域は抗体遺伝子と関係しているので、抗体の生産も増加する (Crouseらの文献, 1983, Mol. Cell. Biol. 3:257)。

10

【0234】

宿主細胞は、本発明の2つの発現ベクター、すなわち重鎖由来ポリペプチドをコードする第1のベクター、及び軽鎖由来ポリペプチドをコードする第2のベクターを用いて同時トランسفェクトしてもよい。該2つのベクターは、同等の重鎖及び軽鎖ポリペプチドの発現を可能にする、同一の選択可能なマーカーを含んでいてもよい。あるいは、両方の重鎖及び軽鎖ポリペプチドをコードする1つのベクターを使用してもよい。このような状況において、有毒な遊離重鎖過剰を避けるために、軽鎖を重鎖の前に置くべきである (Proudfoot, 1986, Nature 322:52; Kohler, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2197)。重鎖及び軽鎖のコード配列には、cDNA又はゲノムDNAを含んでいてもよい。

20

【0235】

いったん本発明の抗体分子が組換え発現されたならば、それを、抗体分子の精製のための当該技術分野において公知の任意の方法、例えば、クロマトグラフィー(例えば、イオノ交換クロマトグラフィー、プロテインA若しくは特異抗原などを用いる親和性クロマトグラフィー、及びサイズカラムクロマトグラフィー)、遠心単離、差動的溶解度により、又はタンパク質の精製のための他の任意の標準的技術により、精製できる。

30

【0236】

あるいは、任意の融合タンパク質は、発現される融合タンパク質に対して特異的な抗体を利用することによって、容易に精製できる。例えば、Janknechtらの文献により記載されている系は、ヒト細胞株において発現される非変性融合タンパク質の手早い精製をする (Janknechtらの文献, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8972-897)。この系では、遺伝子のオープンリーディングフレームが6ヒスチジン残基からなるアミノ末端タグに翻訳可能的に融合されるように、関心対象遺伝子をワクシニア組換えプラスミドにサブクローニングする。タグは、該融合タンパク質に対するマトリクス結合ドメインとして有用である。組換えワクシニアウイルスを感染させた細胞からの抽出物をNi²⁺ニトリロ酢酸-アガロースカラムに添加し、ヒスチジンタグを付けたタンパク質を、イミダゾール含有緩衝液で選択的に溶出させる。

40

【0237】

次いで、これらの方針により生産された抗体を、関心対象の精製ポリペプチドとの親和性及び特異性について最初にスクリーニングし、必要であれば、該抗体の親和性及び特異性の結果を、結合から除外されることが望まれるポリペプチドと比較することによって、選択してもよい。スクリーニング手順には、マイクロタイヤプレートの別々のウェルにおける精製ポリペプチドの固定化を含むことができる。次いで、可能性のある抗体又は抗体群を含む溶液をそれぞれのマイクロタイヤのウェルに入れ、約30分間～2時間インキュベートする。それからマイクロタイヤのウェルを洗浄し、標識化二次抗体（例えば、產生抗体がマウス抗体である場合、アルカリホスファターゼに抱合化された抗マウス抗体）をウェルに添加し、約30分間インキュベートし、その後洗浄する。基質をウェルに添加し、固定されたポリペプチドに対する抗体が存在する場合、呈色反応がみられる。

50

【0238】

次いで、こうして同定された抗体を、選択したアッセイデザインにおいて親和性及び特異性についてさらに分析してもよい。標的タンパク質に関する免疫アッセイの開発において、精製した標的タンパク質は、選択された抗体を使用する免疫アッセイの感受性及び特異性を判断するための標準としての役割を果たす。様々な抗体の結合親和性は異なり得るので、特定の抗体対（例えば、サンドイッチアッセイにおいて）が立体配置的になどで互いに妨げることがあり得、抗体のアッセイ性能は、抗体の絶対親和性及び特異性よりも重要な基準であり得る。

【0239】

当業者であれば、多くのアプローチは、抗体又は結合断片を生産すること、種々のポリペプチドに対する親和性及び特異性についてスクリーニング及び選択することに採用できるが、これらのアプローチが本発明の範囲を変更しないことを認識するであろう。

10

【0240】

治療的用途に関し、抗体(特に、モノクローナル抗体)は、好適には、ヒト又はヒト化動物(例えば、マウス)抗体であってもよい。動物抗体は、免疫原としてヒトタンパク質(例えばエフリンA型受容体10)を使用し、動物において産生することができる。ヒト化は、典型的には、これにより同定されるCDRをヒトフレームワーク領域に移植することを含む。通常、鎖の高次構造を最適化するために、いくつかのその後のレトロ突然変異が必要とされる。このような方法は、当業者に公知である。

20

【0241】

(アフィボディの発現)

アフィボディの構築は、他で記載されており(Ronnmark J, Gronlund H, Uhlen, M., Nygren P.Aの文献、「プロテインAのコンビナトリアル工学からのヒト免疫グロブリンA(IgA)特異リガンド(Human immunoglobulin A (IgA)-specific ligands from combinatorial engineering of protein A)」, 2002, Eur. J. Biochem. 269, 2647-2655)、アフィボディファージディスプレイライブラリの構築を含む(Nord, K., Nilsson, J., Nilsson, B., Uhlen, M.及びNygren, P.Aの文献、「 α -ヘリカル細菌受容体ドメインのコンビナトリアルライブラリ(A combinatorial library of an α -helical bacterial receptor domain)」, 1995, Protein Eng. 8, 601-608。Nord, K., Gunnarsson, E., Ringdahl, J., Stahl, S., Uhlen, M.及びNygren, P.Aの文献、「 α -ヘリカル細菌受容体ドメインのコンビナトリアルライブラリから選択された結合タンパク質(Binding proteins selected from combinatorial libraries of an α -helical bacterial receptor domain)」, 1997, Nat. Biotechnol. 15, 772-777)。

30

【0242】

バイオセンサ結合研究を使用して最適なアフィボディバリアントを調査するためのバイオセンサ分析は、他にも記載されている(Ronnmark J, Gronlund H, Uhlen, M., Nygren P.Aの文献、「プロテインAのコンビナトリアル工学からのヒト免疫グロブリンA(IgA)特異リガンド(Human immunoglobulin A (IgA)-specific ligands from combinatorial engineering of protein A)」, 2002, Eur. J. Biochem. 269, 2647-2655)。

40

【0243】

(親和性試薬修飾)

具体的実施態様において、抗体又はその断片などの抗エフリンA型受容体10親和性試薬は、診断部分(検出可能な標識など)又は治療的部分に抱合化される。抗体は、診断のために、又は所与の治療計画の有効性を決定するために、使用できる。検出は、抗体を検出可能な物質(標識)に連結することによって促進できる。検出可能な物質の例には、種々の酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、生物発光物質、放射性核種、ポジトロン放射金属(ポジトロン放出断層撮影における使用のため)、及び非放射性常磁性金属イオンを含む。一般に、本発明に従った診断法として使用するために抗体に抱合化できる金属イオンについては米国特許第4,741,900号を参照されたい。適切な酵素には、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ガラクトシダーゼ又はアセチルコリンエステ

50

ラーゼを含み；適切な補欠分子族には、ストレプトアビジン、アビジン及びビオチンを含み；適切な蛍光物質には、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリド及びフィコエリトリンを含み；適切な発光物質には、ルミノールを含み；適切な生物発光物質には、ルシフェラーゼ、ルシフェリン及びエクオリンを含み；及び、適切な放射性核種には、¹²⁵I、¹³¹I、¹¹¹In及び⁹⁹Tcを含む。⁶⁸Gaも利用できる。

【0244】

抗エフリンA型受容体10抗体若しくはその断片並びに他の親和性試薬は、所与の生物学的反応を修飾するために治療剤又は薬部分に抱合化できる。親和性試薬が抱合化できる例示的な治療剤は、細胞傷害性部分である。治療剤又は薬剤部分は、古典的な化学治療剤に限定されるものとして解釈されるべきではない。例えば、薬物部分は、所望の生物活性を有するタンパク質又はポリペプチドであってもよい。このようなタンパク質には、例えば、以下を含んでいてもよい：アブリン、リシンA、シュードモナス外毒素、又はジフテリア毒素などの毒素；腫瘍壊死因子、IL-1、IL-2、IL-6、GM-CSF、G-CSF、神経成長因子、血小板由来成長因子、組織プラスミノーゲン活性化因子、血栓薬又は抗血管新生薬、例えばアンギオスタチン又はエンドスタチンなどのタンパク質；又は、リンホカイン、インターロイキン-1(IL-1)、インターロイキン-2(IL-2)、インターロイキン-6(IL-6)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、神経成長因子(NGF)又は他の成長因子などの生物学的反応修飾物質。

10

【0245】

この種の治療的部分を抗体に抱合化するための技術は周知であり、例えば以下を参照されたい：Arnonらの文献、「モノクローナル抗体及び癌治療(Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy)」中「癌治療における薬剤の免疫標的化のためのモノクローナル抗体(Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy)」，Reisfeldらの文献(編)，243-56頁(Alan R. Liss社1985)；Hellstromらの文献、「制御薬剤送達(Controlled Drug Delivery)」中「薬剤送達用抗体(Antibodies For Drug Delivery)」(第2版)，Robinsonらの文献(編)，623-53頁(Marcel Dekker社1987)；Thorpeの文献、「モノクローナル抗体'84：生物学的及び臨床的用途(Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications)」中「癌治療における細胞傷害剤の抗体担体：総説(Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review)」，Pincheraらの文献(編)，475-506頁(1985)；「癌検出及び治療のためのモノクローナル抗体(Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy)」中「癌治療における放射標識抗体の治療的使用の解析、結果及び将来的展望(Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy)」，Baldwinらの文献(編)，303-16頁(Academic Press 1985)、及びThorpeらの文献、「抗体-毒素抱合体の調製及び細胞毒性特性(The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates)」，Immunol. Rev., 62:119-58 (1982)。

20

30

【0246】

あるいは、Segalにより米国特許第4,676,980号に記載されたように、抗体を第2の抗体に抱合化し、抗体ヘテロ抱合体を形態することができる。

40

【0247】

抗体は抱合化された治療的部分の有無にかかわらず、単独で、又は細胞傷害性因子及び/若しくはサイトカインと組合せて投与される治療剤として使用できる。

【0248】

本発明は、抗体に指示された細胞媒介性細胞毒性(ADCC)を誘導する、完全ヒト又はヒト化抗体も提供する。完全ヒト抗体は、該タンパク質配列が天然に存在するヒト免疫グロブリン配列によってコードされており、単離された抗体産生ヒトBリンパ球、又は、染色体領域をコードするマウス免疫グロブリンがオルソログ的なヒト配列により置換されたマウスのトランスジェニックマウスBリンパ球のいずれかに由来する。後者の型のトランスジェニック抗体には、HuMab(Medarex社、CA)及びXenomouse(Abgenix社、CA)を含むが

50

これらに限定されない。ヒト化抗体は、適切な抗原特異性の非ヒト抗体分子の定常領域が、適切なエフェクター機能を有するヒト抗体の、好ましくはIgGサブタイプの定常領域により置換される抗体である (Morrisonらの文献, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. 81:851-855; Neubergerらの文献, 1984, Nature 312:604-608; Takedaらの文献, 1985, Nature 314:452-454)。適切なエフェクター機能にはADCCを含み、これは、完全ヒト抗体又はヒト化抗体が癌細胞の表面上の標的に結合した場合、通常の免疫系の一部であるリンパ球の細胞殺生特性のスイッチを入れることによる、天然のプロセスである。これらの活性なリンパ球、いわゆるナチュラルキラー (NK) 細胞は、抗体が結合する生細胞を破壊するために、細胞傷害プロセスを使用する。ADCC活性は、抗原特異的抗体及び免疫適格の生存ヒト対象から抽出した末梢血単核細胞の存在下、ユーロピウム(Eu3+)標識された生細胞からのEu 3+の放出を測定することにより検出及び定量化できる。ADCCプロセスは、Janeway Jr. C. A. らの文献, Immunobiology, 第5版, 2001, Garland Publishing, ISBN 0-8153-3642-X; Pier G.B. らの文献, Immunology, Infection, and Immunity, 2004, p246-5; Albanell J. らの文献, Advances in Experimental Medicine and Biology, 2003, 532:p2153-68、及びWeng, W.-K. らの文献, Journal of Clinical Oncology, 2003, 21:p 3940-3947に詳細に記載されている。ADCCの検出及び定量化のための適切な方法は、Blombergらの文献, Journal of Immunological Methods. 1986, 86:p225-9; Blombergらの文献, Journal of Immunological Methods. 1986, 21;92:p117-23、並びにPatel及びBoydの文献, Journal of Immunological Methods. 1995, 184:p29-38に見出すことができる。

10

20

30

40

50

【0249】

ADCCは、典型的には、NK細胞の活性化を含み、NK細胞の表面上のFc受容体によって、抗体で被覆した細胞の認識に依存している。Fc受容体は、標的細胞の表面に特異的に結合した、IgGなどの抗体のFc (結晶質) 部分を認識する。NK細胞の活性化を誘発するFc受容体は、CD16又はFc RIIIaと呼ばれている。いったんFc RIIIa受容体がIgG Fcに結合すると、NK細胞はIFN-などのサイトカイン、並びに標的細胞に入り、アポトーシスを誘発することによって細胞死を促進するパーカーフォリン及びグランザイムを含む細胞傷害性顆粒を放出する。

【0250】

抗体による抗体依存性細胞傷害活性 (ADCC) の誘導は、抗体定常領域 (Fc) と、免疫系の細胞の表面に存在する様々な受容体との間の相互作用を変える修飾により強化できる。この種の修飾は、哺乳動物細胞において天然若しくは組換え合成の間、抗体のFcに通常添加される複雑なオリゴ糖鎖における 1,6結合フコース部分の減少又は欠如を含む。好ましい実施態様において、抗体又はその断片などの非フコシル化抗エフリンA型受容体10親和性試薬は、ADCC反応を誘導するそれらの能力を強化するために生産される。

【0251】

Fcのオリゴ糖類における 1,6結合フコース部分を低減又は切除するための技術はよく確立されている。1つの例において、組換え抗体は、1,6結合のフコースを、N結合二分岐複雑型Fcオリゴ糖の最も内側のN-アセチルグルコサミンに加えるその能力に欠損した細胞株において、合成される。この種の細胞株には、低レベルの 1,6-フコシル基転移酵素遺伝子 (FUT8) を発現するラットハイブリドーマYB2/0を含むがこれに限定されるものではない。好ましくは、抗体は、FUT8遺伝子の両方のコピーの欠失により、1,6結合フコシル部分を複雑なオリゴ糖鎖に加えることができない細胞株において、合成される。この種の細胞株には、FUT8-/- CHO/DG44細胞株を含むが、これに限定されるものではない。部分的にフコシル化された若しくは非フコシル化された抗体及び親和性試薬を合成する技術は、Shinkawaらの文献, J. Biol. Chem. 278:3466-34735 (2003); Yamane-Ohnukiらの文献, Biotechnology and Bioengineering 87: 614-22 (2004) 並びにWO00/61739 A1、WO 2/31140 A1及びWO03/085107 A1に記載されている。第2の例において、組換え抗体のフコシル化は、二分したN-アセチルグルコサミンを運搬する複雑なN結合オリゴ糖の生産を最大にするレベルで糖タンパク質修飾グリコシルトランスフェラーゼを過剰発現させるように遺伝子操作した細胞株の合成によって、低減されるか又は廃止される。例えば、該抗体

は、酵素N-アセチルグルコサミン転移酵素III(GnT III)を発現している、チャイニーズハムスター卵巣細胞株において合成される。好適な糖タンパク質修飾グリコシル転移酵素で安定的にトランスフェクトされた細胞株、及びこれらの細胞を使用する抗体の合成法はWO 9954342に開示されている。

【0252】

非フコシル化抗体又は親和性試薬は、単独で、又は細胞傷害性因子及び/若しくはサイトカインと組合せて投与される治療薬として使用することができる。

【0253】

さらなる修飾において、抗体Fcのアミノ酸配列は、リガンド親和性に影響を及ぼすことなく、ADCC活性化を強化する方法で変更される。そのような修飾の例は、Lazarらの論文、Proceedings of the National Academy of Sciences 2006, 103: p4005-4010; WO 03074679、及びWO 2007039818に記載されている。これらの例において、239位のセリンのアスパラギン酸へ、及び332位のグルタミン酸のイソロイシンへなどの抗体Fc内のアミノ酸の置換は、Fc受容体への抗体の結合親和性を変更し、ADCC活性化の増大をもたらした。

10

【0254】

アミノ酸置換に起因した増強されたADCC活性化を伴う抗体試薬は、単独で、又は細胞傷害性因子及び/若しくはサイトカインと組合せて投与される治療薬として使用することができる。

【0255】

(膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌又は膵癌の診断)

20

本発明によれば、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌を有することが疑われるか又は有することが既知の対象から得られた膀胱、胸部、結腸直腸、頭頸部、腎臓、肺若しくは膵臓組織、血清、血漿又は尿の試験試料を診断又はモニタリングのために使用できる。一実施態様において、対照試料(膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌でない対象から)又は予め決定された基準範囲に比較しての試験試料におけるエフリンA型受容体10の存在量の変化は、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌の存在を示す。別の実施態様において、対照試料又は予め決定された基準範囲に比較しての試験試料におけるエフリンA型受容体10の相対的存在量は、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌のサブタイプを示す(例えば、扁平上皮細胞膀胱癌；炎症性乳癌；家族性又は散発性結腸直腸癌；鼻咽頭癌；移行性細胞腎癌；扁平上皮細胞肺癌又は膵臓の内分泌腫瘍)。さらに別の実施態様において、対照試料又は予め決定された基準範囲に比較しての試験試料におけるエフリンA型受容体10の相対的存在量は、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌(例えば転移についての可能性)の程度又は重篤性を示す。上述した方法のいずれかにおいて、エフリンA型受容体10の検出は、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌についての1以上の追加的なバイオマーカーの検出と任意に組み合わせができる。本明細書に記載する好ましい技術、キナーゼアッセイ、エフリンA型受容体10を検出し及び/又は視覚化する免疫アッセイ(例えば、ウエスタンプロット、免疫沈降に続く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、免疫組織化学、その他)を含むがこれらに限定されない任意の適切な方法を利用して、エフリンA型受容体10のレベルを測定できる。さらなる態様において、対照試料又は予め決定された基準範囲に比較しての試験試料におけるエフリンA型受容体10をコードするmRNAの存在量の変化は、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌の存在を示す。任意の適切なハイブリダイゼーションアッセイ法を使用して、エフリンA型受容体10をコードするmRNAを検出し及び/又は視覚化することによりエフリンA型受容体10発現を検出ができる(例えば、ノーザンアッセイ、ドットプロット、インサイチュウハイブリダイゼーション、その他)。

30

【0256】

本発明の別の一実施例において、エフリンA型受容体10に特異的に結合する標識化抗体(又は他の親和性試薬)、その誘導体及び類似体は、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部

40

50

癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌を検出し、診断し又はモニタリングするための診断目的に使用できる。例えば、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌は、動物において、例えば哺乳動物、及び特にヒトにおいて検出できる。

【0257】

(スクリーニングアッセイ)

本発明は、エフリンA型受容体10に結合し、又はエフリンA型受容体10の発現若しくは活性に刺激効果若しくは阻害効果を有する作用物質（例えば、候補化合物又は試験化合物）を同定する方法を提供する。また本発明は、エフリンA型受容体10関連ポリペプチド若しくはエフリンA型受容体10融合タンパク質に結合するか、又はエフリンA型受容体10関連ポリペプチド若しくはエフリンA型受容体10融合タンパク質の発現若しくは活性に刺激効果若しくは阻害効果を有する作用物質、候補化合物又は試験化合物を同定する方法を提供する。作用物質、候補化合物又は試験化合物の例には、核酸（例えば、DNA及びRNA）、炭水化物、脂質、タンパク質、ペプチド、ペプチド模倣体、小分子及び他の薬物を含むが、これらに限定されない。作用物質は、以下のものを含む、公知技術のコンビナトリアルライプラリ法における多数のアプローチのいずれかを使用して得ることができる：生物学的ライプラリ；空間的にアドレス指定可能な並列固相又は溶液相ライプラリ；逆重畠を必要とする合成ライプラリ法；「1ビーズ1化合物」ライプラリ法；及び、親和性クロマトグラフィー選択を使用する合成ライプラリ法。生物学的ライプラリアプローチはペプチドライプラリに限られる一方で、その他の4つのアプローチは、化合物のペプチド、非ペプチドオリゴマー又は小分子ライプラリに適用できる（Lamの文献、1997、Anticancer Drug Des. 12:145；米国特許第5,738,996号；及び、米国特許第5,807,683号。それぞれその全体が引用により本明細書に組み込まれる）。

10

20

30

30

【0258】

分子ライプラリの合成についての方法の例は、当該技術分野において、例えば以下に見いだすことができる：DeWittらの文献、1993、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6909；Erbらの文献、1994、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:11422；Zuckermannらの文献、1994、J. Med. Chem. 37:2678；Choらの文献、1993、Science 261:1303；Carrellらの文献、1994、Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33:2059；Carrellらの文献、1994、Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33:2061；及び、Galloらの文献、1994、J. Med. Chem. 37:1233。これらのそれぞれは引用によりその全てが本明細書に組み込まれる。

40

【0259】

化合物のライプラリは、以下に存在し得る：例えば溶液中で（例えば、Houghtenの文献、1992、Bio/Techniques, 13:412-421）、又はビーズ上（Lamの文献、1991、Nature 354:82-84）、チップ（Fodorの文献、1993、Nature, 364:555-556）、細菌（米国特許第5,223,409号）、胞子（特許番号5,571,698；5,403,484；及び5,223,409）、プラスミド（Cullらの文献、1992、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:1865-1869）若しくはファージ（Scott 及び Smithの文献、1990 Science, 249:386-390；Devlinの文献、1990, Science 249:404-406；Cwirkaらの文献、1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6378-6382；及びFeliciの文献、1991, J. Mol. Biol. 222:301-310）に存在し、これらのそれぞれは引用によりその全てが本明細書に組み込まれる。

40

【0260】

一実施態様において、エフリンA型受容体10、エフリンA型受容体10断片（例えば機能的に活性な断片）、エフリンA型受容体10関連ポリペプチド、エフリンA型受容体10関連ポリペプチドの断片、又はエフリンA型受容体10融合タンパク質と相互作用する（すなわち、結合する）作用物質は、細胞に基づくアッセイ系で同定される。この実施態様によれば、エフリンA型受容体10、エフリンA型受容体10の断片、エフリンA型受容体10関連ポリペプチド、エフリンA型受容体10関連ポリペプチドの断片、又はエフリンA型受容体10融合タンパク質を発現している細胞を候補化合物又は对照化合物と接触させ、エフリンA型受容体10と相互作用する候補化合物の能力を測定する。所望の場合、このアッセイを使用して、複数の候補化合物（例えば、ライプラリ）をスクリーニングできる。該細胞は、例えば原核

50

生物起源(例えば、大腸菌)又は真核生物起源(例えば、酵母又は哺乳動物)であり得る。さらに、細胞は、エフリンA型受容体10、エフリンA型受容体10の断片、エフリンA型受容体10関連ポリペプチド、エフリンA型受容体10関連ポリペプチドの断片若しくはエフリンA型受容体10融合タンパク質を内因的に発現できるか、又はエフリンA型受容体10、エフリンA型受容体10の断片、エフリンA型受容体10関連ポリペプチド、エフリンA型受容体10関連ポリペプチドの断片若しくはエフリンA型受容体10融合タンパク質を発現するように遺伝子操作できる。特定の場合において、エフリンA型受容体10、エフリンA型受容体10の断片、エフリンA型受容体10関連ポリペプチド、エフリンA型受容体10関連ポリペプチドの断片若しくはエフリンA型受容体10融合タンパク質、又は候補化合物は、例えば、放射性標識(例えは³²P、³⁵S及び¹²⁵I)又は蛍光標識(例えはフルオレッセインイソチオシアネート、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、o-フタルアルデヒド又はフルオレサミン)で標識し、エフリンA型受容体10と候補化合物との間の相互作用の検出を可能にする。エフリンA型受容体10、エフリンA型受容体10の断片、エフリンA型受容体10関連ポリペプチド、エフリンA型受容体10関連ポリペプチドの断片若しくはエフリンA型受容体10融合タンパク質により直接的に又は間接的に相互作用する候補化合物の能力は、当業者に公知の方法で測定できる。例えば、候補化合物とエフリンA型受容体10、エフリンA型受容体10関連ポリペプチド、エフリンA型受容体10関連ポリペプチドの断片若しくはエフリンA型受容体10融合タンパク質との間の相互作用は、フローサイトメトリー、シンチレーションアッセイ、免疫沈降又はウェスタンプロット分析で測定できる。

【0261】

10

20

30

40

50

別の実施態様において、エフリンA型受容体10、エフリンA型受容体10断片(例えは、機能的に活性な断片)、エフリンA型受容体10関連ポリペプチド、エフリンA型受容体10関連ポリペプチドの断片若しくはエフリンA型受容体10融合タンパク質と相互作用する(すなわち、結合する)作用物質は、無細胞アッセイ系で同定される。この実施態様によれば、エフリンA型受容体10若しくはその断片の天然又は組換えポリペプチド、エフリンA型受容体10関連ポリペプチド若しくはその断片の天然又は組換えポリペプチド、エフリンA型受容体10融合タンパク質若しくはその断片を候補化合物又は対照化合物と接触させ、エフリンA型受容体10、又はエフリンA型受容体10関連ポリペプチド、又はエフリンA型受容体10融合タンパク質と相互作用する候補化合物の能力を測定する。所望の場合、このアッセイ法を使用して、複数の候補化合物(例えは、ライプラリ)を選別できる。好ましくは、エフリンA型受容体10、エフリンA型受容体10断片、エフリンA型受容体10関連ポリペプチド、エフリンA型受容体10関連ポリペプチドの断片若しくはエフリンA型受容体10融合タンパク質は、はじめに、例えはエフリンA型受容体10、エフリンA型受容体10断片、エフリンA型受容体10関連ポリペプチド、エフリンA型受容体10関連ポリペプチドの断片若しくはエフリンA型受容体10融合タンパク質を、これらを特異的に認識し結合する固定された抗体(又は他の親和性試薬)と接触させることにより、又はエフリンA型受容体10、エフリンA型受容体10断片、エフリンA型受容体10関連ポリペプチド、エフリンA型受容体10関連ポリペプチドの断片若しくはエフリンA型受容体10融合タンパク質の精製調製物をタンパク質を結合するように設計された表面と接触させることにより、固定される。エフリンA型受容体10、エフリンA型受容体10断片、エフリンA型受容体10関連ポリペプチド、エフリンA型受容体10関連ポリペプチドの断片若しくはエフリンA型受容体10融合タンパク質は、部分的に若しくは完全に精製でき(例えは部分的に又は完全に他のポリペプチドがない)、又は細胞溶解物の一部であり得る。さらに、エフリンA型受容体10、エフリンA型受容体10断片、エフリンA型受容体10関連ポリペプチド又はエフリンA型受容体10関連ポリペプチドの断片は、エフリンA型受容体10若しくはその生物学的活性部分、又はエフリンA型受容体10関連ポリペプチド、及びグルタチオンSトランスフェラーゼなどのドメインを含む融合タンパク質であり得る。あるいは、エフリンA型受容体10、エフリンA型受容体10断片、エフリンA型受容体10関連ポリペプチド、エフリンA型受容体10関連ポリペプチドの断片若しくはエフリンA型受容体10融合タンパク質は、当業者に周知の技術を使用してビオチン化できる(例えはビオチン化キット、Pierce Chemicals; Rockford, IL)。エフリンA型受容

体10、エフリンA型受容体10断片、エフリンA型受容体10関連ポリペプチド、エフリンA型受容体10関連ポリペプチドの断片若しくはエフリンA型受容体10融合タンパク質と相互作用する候補化合物の能力は、当業者に公知の方法で測定できる。

【0262】

別の実施態様において、細胞に基づくアッセイ系を使用して、エフリンA型受容体10の產生若しくは分解の原因であり、又はエフリンA型受容体10の翻訳後修飾の原因である酵素などのタンパク質又はその生物学的活性部分に結合し又はその活性を調節する作用物質を同定する。一次選別において、複数の化合物（例えばライプラリ）を、天然に又は組換え的に以下を発現する細胞と接触させる：(i)エフリンA型受容体10、エフリンA型受容体10アイソフォーム、エフリンA型受容体10相同体、エフリンA型受容体10関連ポリペプチド、エフリンA型受容体10融合タンパク質又は前述のいずれかの生物学的に活性な断片；及び、(ii)エフリンA型受容体10、エフリンA型受容体10アイソフォーム、エフリンA型受容体10相同体、エフリンA型受容体10関連ポリペプチド、エフリンA型受容体10融合タンパク質のプロセシングの原因であるタンパク質、又はエフリンA型受容体10、エフリンA型受容体10アイソフォーム、エフリンA型受容体10相同体、エフリンA型受容体10関連ポリペプチド、エフリンA型受容体10融合タンパク質若しくは断片の產生、分解又は翻訳後修飾を調節する化合物を同定するための断片。必要に応じて、一次選別において同定された化合物をそれから、天然に又は組換え的にエフリンA型受容体10を発現する細胞に対する二次選別においてアッセイできる。エフリンA型受容体10、アイソフォーム、相同体、エフリンA型受容体10関連ポリペプチド又はエフリンA型受容体10融合タンパク質の產生、分解又は翻訳後修飾を調節する候補化合物の能力は、フローサイトメトリー、シンチレーションアッセイ、免疫沈降及びウェスタンプロット分析を含むがこれらに限定されない、当業者に公知の方法で測定できる。

10

20

30

40

【0263】

別の実施態様において、エフリンA型受容体10、エフリンA型受容体10断片、エフリンA型受容体10関連ポリペプチド、エフリンA型受容体10関連ポリペプチドの断片若しくはエフリンA型受容体10融合タンパク質に競合的に相互作用する（すなわち、結合する）作用物質を競合結合アッセイで同定する。この実施態様によれば、エフリンA型受容体10、エフリンA型受容体10断片、エフリンA型受容体10関連ポリペプチド、エフリンA型受容体10関連ポリペプチドの断片若しくはエフリンA型受容体10融合タンパク質を発現している細胞を、候補化合物、又はエフリンA型受容体10、エフリンA型受容体10断片、エフリンA型受容体10関連ポリペプチド、エフリンA型受容体10関連ポリペプチドの断片若しくはエフリンA型受容体10融合タンパク質と相互作用することが公知の化合物と接触させ；それから、エフリンA型受容体10、エフリンA型受容体10断片、エフリンA型受容体10関連ポリペプチド、エフリンA型受容体10関連ポリペプチドの断片若しくはエフリンA型受容体10融合タンパク質に優先的に相互作用する候補化合物の能力を測定する。あるいは、エフリンA型受容体10、エフリンA型受容体10断片、エフリンA型受容体10関連ポリペプチド又はエフリンA型受容体10関連ポリペプチドの断片に優先的に相互作用する（すなわち、結合する）作用物質は、無細胞アッセイ系において、エフリンA型受容体10、エフリンA型受容体10断片、エフリンA型受容体10関連ポリペプチド、エフリンA型受容体10関連ポリペプチドの断片、若しくはエフリンA型受容体10融合タンパク質を、候補化合物、又はエフリンA型受容体10、エフリンA型受容体10関連ポリペプチド若しくはエフリンA型受容体10融合タンパク質と相互作用することが公知の化合物と接触させることにより同定される。上記のように、エフリンA型受容体10、エフリンA型受容体10断片、エフリンA型受容体10関連ポリペプチド、エフリンA型受容体10関連ポリペプチドの断片若しくはエフリンA型受容体10融合タンパク質と相互作用する候補化合物の能力は、当業者に公知の方法で測定できる。これらの細胞に基づくアッセイ、又は無細胞アッセイのいずれかを使用して、複数の候補化合物（例えば、ライプラリ）を選別できる。

40

【0264】

別の実施態様において、エフリンA型受容体10又はエフリンA型受容体10関連ポリペプチ

50

ドの発現又は活性を調節する（すなわち、上方制御するか又は下方制御する）作用物質は、エフリンA型受容体10又はエフリンA型受容体10関連ポリペプチドを発現している細胞（例えば原核起源又は真核生物起源の細胞）を候補化合物又は対照化合物（例えばリン酸緩衝食塩水（PBS））と接触させること、及び、エフリンA型受容体10、エフリンA型受容体10関連ポリペプチド、又はエフリンA型受容体10融合タンパク質、エフリンA型受容体10をコードするmRNA、又はエフリンA型受容体10関連ポリペプチドをコードするmRNAの発現を測定することにより同定される。候補化合物の存在下におけるエフリンA型受容体10、エフリンA型受容体10関連ポリペプチド、エフリンA型受容体10をコードするmRNA又はエフリンA型受容体10関連ポリペプチドをコードするmRNAの発現レベルは、候補化合物の不在下における（例えば対照化合物の存在下における）エフリンA型受容体10、エフリンA型受容体10関連ポリペプチド、エフリンA型受容体10をコードするmRNA又はエフリンA型受容体10関連ポリペプチドをコードするmRNAの発現レベルと比較される。候補化合物はそれから、この比較に基づいて、エフリンA型受容体10、又はエフリンA型受容体10関連ポリペプチドの発現のモジュレータとして同定できる。例えば、エフリンA型受容体10又はmRNAの発現が、その不在下よりも候補化合物の存在下で著しく多い場合、該候補化合物はエフリンA型受容体10又はmRNAの発現の刺激剤として同定される。

あるいは、エフリンA型受容体10又はmRNAの発現が、その不在下よりも候補化合物の存在下で著しく少ない場合、該候補化合物はエフリンA型受容体10又はmRNAの発現の阻害剤として同定される。エフリンA型受容体10又はそれをコードするmRNAの発現レベルは、当業者に公知の方法により測定できる。例えば、mRNA発現は、ノーザンプロット分析又はRT-PCRにより評価することができ、タンパク質レベルは、ウエスタンプロット分析により評価できる。

【0265】

別の実施態様において、エフリンA型受容体10又はエフリンA型受容体10関連ポリペプチドの活性を調節する作用物質は、エフリンA型受容体10若しくはエフリンA型受容体10関連ポリペプチドを含む調製物、又はエフリンA型受容体10若しくはエフリンA型受容体10関連ポリペプチドを発現する細胞（例えば原核又は真核生物細胞）を、試験化合物若しくは対照化合物と接触させること、及び、エフリンA型受容体10又はエフリンA型受容体10関連ポリペプチドの活性を調節する（例えば、刺激又は阻害する）試験化合物の能力を測定することにより、同定される。エフリンA型受容体10又はエフリンA型受容体10関連ポリペプチドの活性は、エフリンA型受容体10若しくはエフリンA型受容体10関連ポリペプチドの細胞シグナル伝達経路の誘導（例えば、細胞内Ca²⁺、ジアシルグリセロール、IP3、その他）を検出すること、適切な基質における標的の触媒若しくは酵素活性を検出すること、レポーター遺伝子（例えば、エフリンA型受容体10又はエフリンA型受容体10関連ポリペプチドに応答性があり、かつ検出可能なマーカー（例えばルシフェラーゼ）をコードする核酸に機能的に連結された、制御エレメント）の誘導を検出すること、又は、細胞応答、例えば細胞分化若しくは細胞増殖を検出することにより、評価できる。本記載に基づき、当業者に公知の技術が、これらの活性を測定するために使用できる（例えば、米国特許第5,401,639号（引用により本明細書に組み込まれる）を参照されたい）。候補化合物はそれから、対照化合物に対する該候補化合物の効果を比較することにより、エフリンA型受容体10又はエフリンA型受容体10関連ポリペプチドの活性のモジュレータとして同定できる。適切な対照化合物には、リン酸緩衝食塩水（PBS）及び通常の食塩水（NS）を含む。

【0266】

別の実施態様において、エフリンA型受容体10又はエフリンA型受容体10関連ポリペプチドの発現、活性、又は発現及び活性の両方を調節する（すなわち、上方制御するか又は下方制御する）作用物質を動物モデルにおいて同定する。適切な動物の例には、マウス、ラット、ウサギ、サル、モルモット、イヌ及びネコを含むが、これらに限定されない。好ましくは、使用する動物は、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは肺癌のモデルを表す（例えば、UCRU-BL-12, UCRU-BL-13及びUCRU-BL-14などの膀胱癌細胞系の異種移植片, Russellらの文献 Cancer Res. 1986 Apr;46(4 Pt 2):2035-40; ヌードマウ

10

20

30

40

50

ス若しくはSCIDマウスにおけるMCF-7及びMCF10AT (Millerらの文献, J Natl Cancer Inst. 1993;85:1725-1732)などの乳癌細胞系の異種移植片(Ozzello L, Sordat M., Eur J Cancer. 1980; 16:553-559); エストロゲン欠乏SCIDマウスにおけるMDA-MB-345などのヒト結腸直腸癌細胞系の異種移植片, Ecclesらの文献 1994 Cell Biophysics 24/25, 279; FaDu 及びHNX-OEなどの頭頸部癌細胞系の異種移植片; 免疫欠損マウスにおけるLABAZ1などの腎臓細胞癌細胞系の異種移植片, Zismanらの文献 Cancer Research 63, 4952-4959, August 15, 2003; ヌードマウスにおける、A549及びH460などの非小細胞肺癌細胞系の異種移植片、及びNCI-H345などの小細胞肺癌細胞系の異種移植片、又はMIA PaCa-2などの膵癌細胞系の異種移植片, Marincolaらの文献, J Surg Res 1989 Dec;47(6):520-9)。これらのモデルにおいて呈される病理は膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌のものと類似しているので、これらはエフリンA型受容体10のレベルを調節する試験化合物に利用できる。この実施態様により、試験化合物又は対照化合物を適切な動物に投与し(例えば、経口的に、直腸に、又は非経口的に、例えば腹膜内に又は静注で)、エフリンA型受容体10又はエフリンA型受容体10関連ポリペプチドの発現、活性、又は発現及び活性の両方における効果を測定する。エフリンA型受容体10又はエフリンA型受容体10関連ポリペプチドの発現における変化は、先に概要を示した方法で評価できる。

10

【0267】

さらに別の実施態様において、エフリンA型受容体10又はエフリンA型受容体10関連ポリペプチドは、エフリンA型受容体10又はエフリンA型受容体10関連ポリペプチドに結合する又は相互作用する他のタンパク質を同定するためのツーハイブリッドアッセイ又はスリーハイブリッドアッセイにおける「ベイトタンパク質」として使用される(例えば、米国特許第5,283,317号; Zervosらの文献 (1993) Cell 72:223-232; Maduraらの文献(1993) J. Biol. Chem. 268:12046-12054; Bartelらの文献(1993) Bio/Techniques 14:920-924; Iwabuchiらの文献(1993) Oncogene 8:1693-1696; 及び、国際公開番号WO 94/10300を参照されたい)。当業者に認識されているように、このような結合タンパク質は、例えば、エフリンA型受容体10を含むシグナリング経路の上流又は下流の要素として、エフリンA型受容体10によりシグナルの伝播に関与する可能性もある。

20

【0268】

本発明は、先に記載したスクリーニングアッセイ法により同定される新規作用物質、及び本明細書に記載したような治療についてのその使用をさらに提供する。加えて、本発明はまた、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌の治療用医薬の製造における、エフリンA型受容体10と相互作用するか又はその活性を調節する作用物質の使用を提供する。

30

【0269】

(エフリンA型受容体10の治療的使用)

本発明は、治療的化合物の投与による様々な疾患及び障害の治療又は予防を提供する。

このような化合物には、以下を含むが、これらに限定されるものではない: エフリンA型受容体10、エフリンA型受容体10類似体、エフリンA型受容体10関連ポリペプチド及びその誘導体(断片を含む); 前述のものに対する抗体(又は他の親和性試薬); エフリンA型受容体10、エフリンA型受容体10類似体、エフリンA型受容体10関連ポリペプチド及びその断片をコードする核酸; エフリンA型受容体10又はエフリンA型受容体10関連ポリペプチドをコードする遺伝子に対するアンチセンス核酸; 及び、エフリンA型受容体10又はエフリンA型受容体10関連ポリペプチドをコードする遺伝子のモジュレータ(例えばアゴニスト及びアンタゴニスト)。本発明の重要な特徴は、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌に関するエフリンA型受容体10をコードする遺伝子の同定である。膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌は、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌を有する対象の血清若しくは組織におけるエフリンA型受容体10の機能又は発現を減少させる治療的化合物の投与により治療でき(例えば、症状を改善するか又は発症若しくは進行を遅延させる)又は予防できる。

40

【0270】

50

一実施態様において、それぞれエフリンA型受容体10に特異的に結合する1以上の抗体（又は他の親和性試薬）を、単独で、又は1以上の追加的な治療的化合物若しくは治療と組み合わせて投与する。

【0271】

抗体（又は他の親和性試薬）などの生物学的生成物は、例えば、それが投与される対象に対し同種（allogeneic）である。一実施態様において、ヒトのエフリンA型受容体10若しくはヒトのエフリンA型受容体10関連ポリペプチド、ヒトのエフリンA型受容体10若しくはヒトのエフリンA型受容体10関連ポリペプチドをコードする核酸、又はヒトのエフリンA型受容体10若しくはヒトのエフリンA型受容体10関連ポリペプチドに対する抗体（又は他の親和性試薬）を、治療法（例えば、症状を改善するか又は発症若しくは進行を遅延させる）又は予防のためにヒト対象に投与する。

10

【0272】

理論により制限されることなく、エフリンA型受容体10に特異的に結合する抗体（又は他の親和性試薬）の治療的活性は、抗体依存性細胞傷害（ADCC）の現象を介して達成できることが想到される（例えば、Janeway Jr. C.A. らの文献、Immunobiology, 第5版, 2001, Garland Publishing, ISBN 0-8153-3642-X; Pier G.B. らの文献、Immunology, Infection, and Immunity, 2004, p246-5; Albanell J. らの文献、Advances in Experimental Medicine and Biology, 2003, 532:p2153-68 及び、Weng, W.-K. らの文献、Journal of Clinical Oncology, 2003, 21:p 3940-3947を参照されたい）。

20

【0273】

（膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは脾癌の治療及び予防）

膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは脾癌は、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは脾癌を有することが疑われるか若しくは有することが既知の対象への、又は膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは脾癌を発生する危険性のある対象への、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは脾癌でない対象の組織と比較して膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは脾癌を有する対象の組織に示差的に存在するエフリンA型受容体10のレベル又は活性（すなわち、機能）を調節する（増加又は減少させる）化合物の投与により、治療又は予防される。一実施態様において、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは脾癌は、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは脾癌を有することが疑われるか若しくは有することが既知の対象への、又は膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは脾癌を発生する危険性のある対象への、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは脾癌を有する対象の組織において減少したエフリンA型受容体10のレベル又は活性（すなわち、機能）を上方制御する（すなわち增加させる）化合物を投与することにより、治療又は予防される。このような化合物の例には、エフリンA型受容体10のアンチセンスオリゴヌクレオチド又はリボザイム、エフリンA型受容体10に対して指示された抗体（又は他の親和性試薬）、及びエフリンA型受容体10の酵素活性を阻害する化合物を含むがこれらに限定されない。他の有用な化合物、例えばエフリンA型受容体10のアンタゴニスト及びエフリンA型受容体10の小分子アンタゴニストは、インピトロアッセイを使用して同定できる。

30

【0274】

膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは脾癌はまた、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは脾癌を有することが疑われるか若しくは有することが既知の対象への、又は膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは脾癌を発生する危険性のある対象への、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは脾癌を有する対象の組織において増加したエフリンA型受容体10のレベル又は活性（すなわち、機能）を下方制御する化合物の投与により、治療又は予防される。このような化合物の例には以下を含むが、これらに限定されない：エフリンA型受容体10、エフリンA型受容体10の断片及びエフリンA型受容体10関連ポリペプチド；（例えば遺伝子療法における使用のための）エフリンA型受容体10、エフリンA型受容体10の断片及びエ

40

50

フリンA型受容体10関連ポリペプチドをコードする核酸；及び、酵素活性を有するエフリンA型受容体10又はエフリンA型受容体10関連ポリペプチドのための、酵素活性を調節することが公知の化合物又は分子。使用できる他の化合物、例えばエフリンA型受容体10のアゴニストは、インビトロアッセイを使用して同定できる。

【0275】

別の実施態様において、治療又は予防は、個々の対象の必要に合わせて調製する。従つて、特定の実施態様において、エフリンA型受容体10のレベル又は機能を促進する化合物は、エフリンA型受容体10のレベル若しくは機能がないか、又は対照若しくは正常の基準範囲に比較して減少している膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは肺癌を有することが疑われるか若しくは有することが既知の対象に、治療的に若しくは予防的に投与される。さらなる実施態様において、エフリンA型受容体10のレベル又は機能を促進する化合物は、エフリンA型受容体10のレベル若しくは機能が対照若しくは基準範囲に比較して増加している膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは肺癌を有することが疑われるか若しくは有することが既知の対象に、治療的に若しくは予防的に投与される。さらなる実施態様において、エフリンA型受容体10のレベル又は機能を減少させる化合物は、エフリンA型受容体10のレベル若しくは機能が対照若しくは基準範囲に比較して増加している膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは肺癌を有することが疑われるか若しくは有することが既知の対象に、治療的に若しくは予防的に投与される。さらなる実施態様において、エフリンA型受容体10のレベル又は機能を減少させる化合物は、エフリンA型受容体10のレベル若しくは機能が対照若しくは基準範囲に比較して減少している膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは肺癌を有することが疑われるか若しくは有することが既知の対象に、治療的に若しくは予防的に投与される。そのような化合物の投与によるエフリンA型受容体10の機能又はレベルにおける変化は、例えば、試料（例えば、血液又は尿）を得ることにより、及びエフリンA型受容体10のインビトロレベル若しくは活性、又はエフリンA型受容体10をコードするmRNAのレベル、又は上述の任意の組合せをアッセイすることにより、容易に検出できる。このようなアッセイは、本明細書に記載するように、本化合物の投与前及び後に実施できる。

【0276】

本発明の化合物には、エフリンA型受容体10プロファイルを正常な方へ回復させる任意の化合物、例えば小さな有機分子、タンパク質、ペプチド、抗体（又は他の親和性試薬）、核酸などを含むが、これらに限定されるものではない。本発明の化合物は、任意の他の化学療法薬と組み合わせて与えることができる。

【0277】

(ワクチン療法)

本発明の別の態様は、エフリンA型受容体10若しくはそのエピトープ含有断片、又はエフリンA型受容体10をコードする核酸若しくはその断片を、任意に免疫賦活剤と共に含む、免疫原性組成物、好適にはワクチン組成物である。

【0278】

また、このような組成物を対象に投与することを含む免疫応答を上げる方法、並びに、このような組成物の治療上有効量をその必要のある対象に投与することを含む膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは肺癌の治療方法又は予防方法、及び膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは肺癌を予防又は治療することにおける使用のためのこのような組成物を提供する。

【0279】

従つて、エフリンA型受容体10は、抗原性物質として有用であり得、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは肺癌の治療又は予防のためのワクチンの製造に使用できる。このような物質は、「抗原性」及び／又は「免疫原性」であり得る。通常、「抗原性」は、タンパク質が抗体（又は他の親和性試薬）を上げるために使用できるか、又は実際に対象若しくは実験動物における抗体反応を誘導できることを意味する。「免疫

10

20

30

40

50

原性」は、タンパク質が対象又は実験動物において保護免疫応答を誘発できることを意味する。従って、後者の場合、該タンパク質は、抗体反応を引き起こし得るのみならず、さらに抗体に基づかない免疫応答をも引き起こし得る。また、「免疫原性」は、該タンパク質がインビトロ設定（例えばT細胞増殖アッセイ）における免疫様反応を誘発できるか否かも含む。適切な免疫応答の生成は、1以上のアジュバントの存在及び／又は抗原の適切な提示を必要とし得る。

【0280】

当業者は、エフリンA型受容体10の相同体又は誘導体も抗原性/免疫原性物質としての使用が見出されることを認識する。従って、例えば、1以上の付加、削除、置換等を含むタンパク質は、本発明に含まれる。加えて、1つのアミノ酸を別の類似の「型」に置き換えることが可能であり得る。例えば、1つの疎水性アミノ酸を別のものに置き換える。アミノ酸配列を比較するために、CLUSTALプログラムなどのプログラムを使用できる。このプログラムはアミノ酸配列を比較し、適切な様にいずれかの配列にスペースを挿入することにより最適整列を見出す。最適整列についてのアミノ酸同一性又は類似性（アミノ酸型の同一性及び保存）を算出することができる。BLASTxのようなプログラムは、類似配列で最も長いストレッチを整列配置し、値を適合するように割り当てる。このようにしていくつかの類似領域が見出される比較を得ることが可能であり、その各々は異なるスコアを有する。両方のタイプの分析が、本発明において考察される。両方の型の分析は、本発明において、考察する。

10

【0281】

相同体及び誘導体の場合、本明細書に記載するタンパク質との同一性の程度は、該相同体又は誘導体がその抗原性及び／又は免疫原性を保持すべきであることよりも重要ではない。しかしながら、好適には、本明細書に記載するタンパク質又はポリペプチドとの少なくとも60%の類似性を有する（上記のような）相同体又は誘導体、例えば、少なくとも80%の類似性などの少なくとも70%の類似性を有する相同体又は誘導体を提供する。特に、少なくとも90%又は95%の類似性さえも有する相同体又は誘導体が提供される。好適には、相同体又は誘導体は本明細書に記載したタンパク質又はポリペプチドと少なくとも60%の配列同一性を有し、例えば、相同体又は誘導体は少なくとも80%の同一性などの少なくとも70%の同一性を有する。特に、相同体又は誘導体は、少なくとも90%又は95%の同一性さえ有する。

20

【0282】

代わりのアプローチにおいて、相同体又は誘導体は、例えば所望のタンパク質又はポリペプチドに効果的にタグを付けることによって精製がより容易になる部分を組み込んだ融合タンパク質であり得る。それは「タグ」を除去するのに必要であり得、又はそれは融合タンパク質 자체が有用であるのに充分な抗原性を保持する場合でもあり得る。

30

【0283】

エピトープ領域、すなわちタンパク質又はポリペプチドの抗原性又は免疫原性の原因となるその領域を同定するために抗原性タンパク質又はポリペプチドを選別することが可能であることは周知である。当業者に周知の方法は、抗原性について断片及び／又は相同体及び／又は誘導体を試験するのに使用できる。従って、本発明の断片は、1以上のこのようなエピトープ領域を含むべきであるか又はこれらの抗原性/免疫原性特性を保持するためにこのような領域に十分に類似すべきである。従って、本発明による断片について、それらは本明細書に記載するタンパク質又はポリペプチド、相同体若しくは誘導体の特定の部分に100%同一であり得るので、同一性の程度はおそらく無関係である。重要な問題は、再度、該断片は、それが由来するタンパク質の抗原性/免疫原性特性を保持するということである。

40

【0284】

相同体、誘導体及び断片にとって重要なことは、これらが、その由来するタンパク質又はポリペプチドの抗原性/免疫原性の少なくとも1の程度を有することである。従って、追加的な本発明の態様において、エフリンA型受容体10の抗原性若しくは免疫原性断片、又

50

はその相同体若しくは誘導体を提供する。

【0285】

エフリンA型受容体10又はその抗原性断片は、精製された若しくは単離された調製物として、単独で提供できる。これらは、本発明の1以上の他のタンパク質又はその抗原性断片との混合物の一部として提供できる。従って、さらなる態様において、本発明は、エフリンA型受容体10及び/又はその1以上の抗原性断片を含む抗原組成物を提供する。このような組成物は、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは肺癌の検出又は診断に使用できる。

【0286】

本発明によるワクチン組成物は、予防的又は治療的なワクチン組成物のいずれでもよい。
。

【0287】

本発明のワクチン組成物は、1以上のアジュバント（免疫賦活剤）を含み得る。周知技術の例には、水酸化アルミニウムなどの無機ゲル類、及び不完全フロイントアジュバントなどの油中水乳剤を含む。他の有用なアジュバントは、当業者に周知である。

【0288】

癌の治療のためにワクチン組成物に使用される適切なアジュバントには、以下を含む：3De-Oアシル化モノホスホリル脂質A（3D-MPL又は単にMPLとして公知。W092/116556を参照されたい）、サポニン、例えばQS21又はQS7、及び例えばW095/26204にて開示されるCpG含有分子などのTLR4アゴニスト。

20

【0289】

使用されるアジュバントは、構成要素、例えばMPL及びQS21又はMPL、QS21及びCpG含有部分の組合せでもよい。

【0290】

アジュバントは、水中油乳剤又はリポソーム製剤として製剤化できる。

【0291】

このような調製物は、他のビヒクルを含み得る。

【0292】

別の実施態様において、エフリンA型受容体10又はエフリンA型受容体10のペプチド断片をコードするヌクレオチド配列に相補的な10以上の連続するヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドの調製物を、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは肺癌の治療のためのワクチンとして使用する。このような調製物は、アジュバント又は他のビヒクルを含み得る。

30

【0293】

（膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは肺癌を治療するためのエフリンA型受容体10の阻害）

本発明の一実施態様において、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは肺癌は、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは肺癌でない対象の組織と比較して、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは肺癌を有する対象の組織において上昇するエフリンA型受容体10のレベル及び/又は機能をアンタゴナイズする（阻害する）化合物の投与により治療されるか又は予防される。

40

【0294】

この目的のために有用な化合物には、抗エフリンA型受容体10抗体（又は他の親和性試薬、並びにその結合領域を含んでいる断片及び誘導体）、エフリンA型受容体10のアンチセンス又はリボザイム核酸、及び相同組換えによる内因性エフリンA型受容体10機能を「ノックアウト」するのに使用される非機能的エフリンA型受容体10をコードする核酸を含むがこれらに限定されない（例えば、Capecchiの文献、1989、Science 244:1288-1292を参照されたい）。エフリンA型受容体10の機能を阻害する他の化合物は、公知のインピトロアッセイ、例えば別のタンパク質又は結合パートナーへのエフリンA型受容体10の結合を阻害する、又はエフリンA型受容体10の公知の機能を阻害する試験化合物の能力につい

50

てのアッセイの使用により、同定できる。

【0295】

このような阻害は、例えば、インピトロで又は細胞培養でアッセイできるが、遺伝的アッセイを利用することができる。本明細書に記載する好ましい技術を使用して、化合物の投与の前後でエフリンA型受容体10のレベルを検出することもできる。適切なインピトロ又はインビオアッセイは、以下により詳細に記載するように、具体的化合物の効果、及びその投与が罹患組織の治療を示すか否かを測定するのに利用される。

【0296】

特定の実施態様において、エフリンA型受容体10の機能（活性）を阻害する化合物は、本発明による治療を受けていない膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは肺癌を有する対象の血清若しくは組織と比較して、エフリンA型受容体10の血清若しくは組織レベル又は機能的活性の増加（例えば、正常レベル又は所望のレベルよりも高い）が検出される対象に治療的又は予防的に投与され、又は膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは肺癌でない対象において見出されるレベル若しくは活性又は予め決定された基準範囲をもたらすように、治療的又は予防的に投与される。先に概説したように、当該技術分野における標準的方法を利用して、エフリンA型受容体10のレベル又は機能における増加を測定できる。エフリンA型受容体10の適切な阻害因子組成物には、例えば、小分子、すなわち1000ダルトン以下の分子を含み得る。このような小分子は、本明細書に記載するスクリーニング法により同定できる。

10

【0297】

（治療的又は予防的化合物についてのアッセイ）

本発明は、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは肺癌の治療又は予防のための化合物の有効性を同定又は検証するために、薬剤開発における使用のためのアッセイも提供する。

20

【0298】

従って、エフリンA型受容体10の活性を調節する化合物のスクリーニングの方法が提供され、該方法には以下を含む：(a)エフリンA型受容体10又はその生物学的活性部分を候補化合物と接触させること；及び(b)エフリンA型受容体10の活性がそれにより調節されているか否かを測定すること。このようなプロセスは、(a) エフリンA型受容体10又はその生物学的活性部分を試料中の候補化合物と接触させること；及び、(b)前記候補化合物を接触させた後の前記試料中のエフリンA型受容体10又はその生物学的活性部分の活性を、前記候補化合物を接触させる前の前記試料中のエフリンA型受容体10又はその生物学的活性部分の活性と、又は基準レベルの活性と比較すること；を含み得る。

30

【0299】

スクリーニングの方法は、エフリンA型受容体10の活性を阻害する化合物のスクリーニングの方法であり得る。

【0300】

エフリンA型受容体10又はその生物学的活性部分は、例えば細胞上に又は細胞により発現され得る。エフリンA型受容体10又はその生物学的活性部分は、例えばそれを発現する細胞から単離できる。エフリンA型受容体10又はその生物学的活性部分は、例えば固相上に固定できる。

40

【0301】

エフリンA型受容体10又はエフリンA型受容体10をコードする核酸の発現を調節する化合物のスクリーニングの方法も提供され、該方法には以下を含む：(a)エフリンA型受容体10又はエフリンA型受容体10をコードする核酸を発現している細胞を候補化合物と接触させること；及び、(b) エフリンA型受容体10又はエフリンA型受容体10をコードする核酸の発現がそれにより調節されているか否かを測定すること。このようなプロセスは、(a)エフリンA型受容体10又はエフリンA型受容体10をコードする核酸を発現している細胞を試料中の候補化合物と接触させること；及び、(b)前記候補化合物を接触させた後の前記試料中のエフリンA型受容体10又はエフリンA型受容体10をコードする核酸の発現を、前記候補化

50

合物を接触させる前の前記試料中のエフリンA型受容体10又はエフリンA型受容体10をコードする核酸の発現と、又は基準レベルの発現と比較すること；を含み得る。

【0302】

本方法は、エフリンA型受容体10又はエフリンA型受容体10をコードする核酸の発現を阻害する化合物のスクリーニング方法であり得る。

【0303】

本発明の他の態様は、以下を含む：上述したスクリーニング法により入手できる化合物、エフリンA型受容体10又はエフリンA型受容体10をコードする核酸の活性又は発現を調節する化合物、例えばエフリンA型受容体10又はエフリンA型受容体10をコードする核酸の活性又は発現を阻害する化合物。

10

【0304】

このような化合物は、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは肺癌を治療又は予防することにおける使用のために提供される。このような化合物の治療上有効量をその必要のある対象に投与することを含む、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは肺癌を治療又は予防する方法も提供される。

【0305】

試験化合物は、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは肺癌でない対象において見出されるレベルに対して膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは肺癌を有する対象におけるエフリンA型受容体10のレベルを回復させる、又は膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは肺癌でない対象において見出されるレベルに対して膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは肺癌を有する対象におけるエフリンA型受容体10のレベルを回復させることができる、又は膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは肺癌の実験動物モデルにおいて同様の変化をもたらす、それらの能力についてアッセイできる。膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは肺癌でない対象において見出されるレベルに対して膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは肺癌を有する対象におけるエフリンA型受容体10のレベルを回復させることができ、又は膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは肺癌の実験動物モデルにおいて同様の変化をもたらすことができる化合物を、さらなる創薬のリード化合物として使用でき、又は治療的に使用できる。エフリンA型受容体10の発現は、本明細書に記載する好ましい技術、免疫アッセイ、ゲル電気泳動とそれに続く視覚化、エフリンA型受容体10の活性の検出、又は本明細書に教示されるか若しくは当業者に公知の他の任意の方法によってアッセイできる。このような分析は、臨床モニタリングにおいて、又は薬剤開発において、候補薬物を選別するために使用でき、ここで、エフリンA型受容体10の存在量は臨床疾患の代理マーカーとして扱うことができる。

20

【0306】

様々な特定の実施態様において、インビトロアッセイを、対象の障害に関する細胞型の代表的な細胞により実施して、化合物がこのような細胞型に所望の影響を有するか否か測定することができる。

30

【0307】

療法に使用するための化合物は、ヒトでの試験前に、ラット、マウス、ニワトリ、ウシ、サル、ウサギなど含むが、これらに限定されない適切な動物モデル系で試験できる。インビトロ試験については、ヒトに対する投与の前に、当該技術分野において公知の任意の動物モデル系を使用できる。膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは肺癌の動物モデルの例には、以下を含むがこれらに限定されない：UCRU-BL-12, UCRU-BL-13及びUCRU-BL-14などの膀胱癌細胞系の異種移植片, Russellらの文献 Cancer Res. 1986 Apr;46(4 Pt 2):2035-40; ヌードマウス若しくはSCIDマウスにおけるMCF-7及びMCF10AT (Millerらの文献, J Natl Cancer Inst. 1993;85:1725-1732)などの乳癌細胞系の異種移植片(Ozzello L, Sordat M., Eur J Cancer. 1980; 16:553-559); エストロゲン欠乏SCIDマウスにおけるMDA-MB-345などのヒト結腸直腸癌細胞系の異種移植片, Ecclesらの文献 1994 Cell Biophysics 24/25, 279; FaDu及びHNX-OEなどの頭頸部癌細胞系の異種移植片; 免疫欠損マウスにおけるLABAZ1などの腎臓細胞癌細胞系の異種移植片, Zismanらの文献 Cancer Research 63, 4952-4959, August 15, 2003; ヌードマウスにおける、A549及びH460など

40

50

の非小細胞肺癌細胞系の異種移植片、及びNCI-H345などの小細胞肺癌細胞系の異種移植片、又はMIA PaCa-2などの膵癌細胞系の異種移植片、Marincolaらの文献、J Surg Res 1989 Dec;47(6):520-9)。これらのモデルにおいて呈される病理は膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌のそれと類似しているので、上記のものは、エフリンA型受容体10のレベルを調節する試験化合物に利用することができる。また、本開示に基づき、トランスジェニック動物がエフリンA型受容体10をコードする遺伝子又は遺伝子群の「ノックアウト」変異を有して産生され得ることは、当業者にとって明らかである。遺伝子の「ノックアウト」変異は、変異された遺伝子を発現させなくするか、又は異常形態で若しくは低レベルで発現させる突然変異であり、その結果、該遺伝子産物に関連する活性がほとんど又は完全になくなる。トランスジェニック動物は、例えば、哺乳動物、例えばマウスである。

10

【0308】

一実施態様において、エフリンA型受容体10の発現を調節する試験化合物は、非ヒト動物（例えばマウス、ラット、サル、ウサギ及びモルモット）において、好ましくはエフリンA型受容体10を発現する膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌についての非ヒト動物モデルにおいて同定される。この実施態様により、試験化合物又は対照化合物を動物に投与し、エフリンA型受容体10の発現における試験化合物の影響を測定する。エフリンA型受容体10の発現を変える試験化合物は、試験化合物で処置した動物若しくは動物群におけるエフリンA型受容体10（又はそれをコードするmRNA）のレベルを、対照化合物で処置した動物若しくは動物群におけるエフリンA型受容体10又はmRNAのレベルと比較することにより、同定できる。当業者に公知の技術、例えばインサイチュウハイブリダイゼーションを使用して、mRNA及びタンパク質レベルを測定することができる。動物は、試験化合物の効果をアッセイするために犠牲にすることができ、又は犠牲にしなくてもよい。

20

【0309】

別の実施態様において、エフリンA型受容体10又はその生物学的活性部分の活性を調節する試験化合物は、エフリンA型受容体10を発現する、非ヒト動物（例えばマウス、ラット、サル、ウサギ及びモルモット）、好ましくは膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌についての非ヒト動物モデルにおいて同定される。この実施態様により、試験化合物又は対照化合物を動物に投与し、エフリンA型受容体10の活性における試験化合物の影響を測定する。エフリンA型受容体10の活性を変える試験化合物は、対照化合物で処置した動物、及び試験化合物で処置した動物をアッセイすることにより同定できる。エフリンA型受容体10の活性は、エフリンA型受容体10の細胞セカンドメッセンジャー（例えば細胞内Ca²⁺、ジアシルグリセロール、IP3、その他）の誘導を検出すること、エフリンA型受容体10若しくはその結合パートナーの触媒活性又は酵素活性を検出すること、リポーター遺伝子（例えば、ルシフェラーゼ又は緑色蛍光タンパク質などの検出可能なマーカーをコードする核酸を機能的に連結したエフリンA型受容体10応答性制御エレメント）の誘導を検出すること、又は細胞応答（例えば細胞分化又は細胞増殖）を検出すことにより評価できる。当業者に公知の技術は、エフリンA型受容体10の活性の変化を検出するために利用できる（例えば、米国特許第5,401,639号（引用により本明細書に組み込まれる）を参照されたい）。

30

【0310】

さらに別の実施態様において、エフリンA型受容体10のレベル又は発現を調節する試験化合物は、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌を有するヒト対象において、特に重篤な膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌を有するヒト対象において同定される。この実施態様により、試験化合物又は対照化合物をヒト対象に投与し、エフリンA型受容体10の発現における試験化合物の影響を、生体試料（例えば、血清、血漿又は尿）中のエフリンA型受容体10又はこれをコードするmRNAを分析することにより測定する。エフリンA型受容体10の発現を変える試験化合物は、対照化合物で処置した対象又は対象群におけるエフリンA型受容体10又はそれをコードするm

40

50

RNAのレベルを、試験化合物で処置した対象又は対象群におけるエフリンA型受容体10又はそれをコードするmRNAのレベルと比較することにより、同定できる。あるいは、エフリンA型受容体10の発現の変化は、試験化合物の投与前又は後の対象又は対象群におけるエフリンA型受容体10又はそれをコードするmRNAのレベルを比較することにより同定できる。当業者に公知の技術を使用して、生体試料を得、mRNA又はタンパク質発現を解析することができる。例えば、本明細書に記載する好ましい技術は、エフリンA型受容体10のレベルの変化を評価するために使用できる。

【0311】

別の実施態様において、エフリンA型受容体10の活性を調節する試験化合物は、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌を有するヒト対象（特に重篤な膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌を有するヒト対象）で同定される。この実施態様において、試験化合物又は対照化合物をヒト対象に投与し、エフリンA型受容体10の活性における試験化合物の影響を測定する。エフリンA型受容体10の活性を変える試験化合物は、対照化合物で処置した対象からの試料を、試験化合物で処置した対象からの生体試料と比較することにより同定できる。あるいは、エフリンA型受容体10の活性の変化は、試験化合物の投与前又は後の対象又は対象群におけるエフリンA型受容体10の活性を比較することにより同定できる。エフリンA型受容体10の活性は、生体試料（例えば、血清、血漿又は尿）における、エフリンA型受容体10の細胞シグナル伝達経路（例えば細胞内Ca²⁺、ジアシルグリセロール、IP3、その他）、エフリンA型受容体10若しくはその結合パートナーの触媒活性若しくは酵素活性、又は細胞応答、例えば、細胞分化若しくは細胞増殖の誘導を検出することにより評価できる。当業者に公知の技術を使用して、エフリンA型受容体10のセカンドメッセンジャーの誘導における変化、又は細胞応答の変化を検出することができる。例えば、RT-PCRを使用して、細胞セカンドメッセンジャーの誘導における変化を検出できる。

10

20

30

40

【0312】

別の実施態様において、対照対象（例えば膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌でないヒト）において検出されたレベルに対し、エフリンA型受容体10のレベル又は発現を変化させる試験化合物は、さらなる試験使用又は治療的使用のために選択される。別の実施態様において、対照対象（例えば膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌でないヒト）において見出される活性に対し、エフリンA型受容体10の活性を変化させる試験化合物は、さらなる試験使用又は治療的使用のために選択される。

【0313】

別の実施態様において、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌に関連する1以上の症状の重篤性を減少させる試験化合物は、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌を有するヒト対象、特に重篤な膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌の1以上の症状における試験化合物の影響を測定する。1以上の症候を減少させる試験化合物は、対照化合物で処置した対象を試験化合物で処置した対象と比較することにより同定できる。膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌に精通している医師に公知の技術を使用して、試験化合物が膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌に関連する1以上の症状を減少させるか否かを測定できる。例えば、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌を有する対象において腫瘍量を減少させる試験化合物は、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌を有する対象のために有益である。

【0314】

別の実施態様において、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌を有するヒトにおいて膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌に関連する1以上の症状の重篤性を減少させる試験化合物は、さらなる試験使用又は治療

50

的の使用のために選択される。

【0315】

(治療的及び予防的組成物及びこれらの使用)

本発明は、本発明の化合物の有効量を対象に投与することを含む、治療(及び予防)の方法を提供する。特定の態様において、本化合物は、実質的に精製されている(例えば、その作用を制限するか又は望ましくない副作用をもたらす物質を実質的に含まない)。対象は、例えば、ウシ、ブタ、ウマ、ニワトリ、ネコ、イヌなどを含むがこれらに限定されない動物であり、例えばヒトなどの哺乳動物である。特定の実施態様において、非ヒト哺乳動物が対象である。

【0316】

本化合物が核酸を含むときに利用できる製剤及び投与方法は、先に記載しており；さらなる適切な製剤及び投与経路を以下に記載してある。

【0317】

例えば、リポソーム内のカプセル化、微小粒子、マイクロカプセル、本化合物を発現できる組換え細胞、受容体媒介型エンドサイトーシス(例えばWu及びWuの文献, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432を参照されたい)、レトロウイルス又はその他のベクターの一部としての核酸の構築などの種々の送達系が公知であり、本発明の化合物を投与するために使用できる。導入の方法は、経腸的又は非経口的であることができ、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下、鼻腔内、硬膜外及び経口経路を含むが、これらに限定されない。本化合物は、任意の好都合な経路により、例えば注入又は大量瞬時投与により、上皮性又は粘膜皮膚の裏打ち(例えば、口腔粘膜、直腸及び腸管粘膜など)を介した吸収により投与でき、他の生体活性物質と共に投与してもよい。

加えて、脳室内及び髄腔内注射を含む任意の適切な経路により、本発明の医薬組成物を中枢神経系に導入することが望ましい可能性があり；例えば、脳室内注入は、例えばオマヤレザバー(Ommaya reservoir)などの貯蔵部に取り付けられた脳室内カテーテルにより容易化し得る。また、例えば吸入器又は噴霧器の使用により、及びエアロゾル化剤での処方により、肺投与も利用できる。

【0318】

本発明の一態様において、本発明で利用される核酸は、例えば粒子媒介型表皮性送達を利用して真皮に送達できる。

【0319】

特定の実施態様において、治療を必要とする領域に局所的に本発明の医薬組成物を投与することが望ましい場合があり；これは、例えば、限定するものではないが、外科手術の間の局部的な注入、局所適用、例えば注射によって、カテーテルによって、又はインプラントによって達成してもよく、前記インプラントは、サイラスティック(sialastic)膜などの膜を含む多孔性、非多孔性若しくはゲル状物質又は線維である。一実施態様において、投与は、膀胱組織、胸部組織、結腸直腸組織、頭頸部組織、腎組織、肺組織若しくは脾組織への直接注入によるものであり得、又は悪性腫瘍組織若しくは新生生物組織若しくは前新生生物組織の部位(又は前者の部位)での直接注入によるものであり得る。

【0320】

別の実施態様において、本化合物は、小胞、特にリポソームで送達できる(Langerの文献, 1990, Science 249:1527-1533; Treatらの文献、「感染性疾患及び癌の治療法におけるリポソーム(Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer)」中, Lopez Berestein及びFidler(編), Liss, New York, pp. 353-365 (1989); Lopez Beresteinの文献, 同書, pp. 317-327; 同書を一般に参照されたい)。

【0321】

さらに別の実施態様において、本化合物は、徐放系で送達できる。一実施態様において、ポンプを使用できる(Langerの文献, 上掲; Seftonの文献, 1987, CRC Crit. Ref. Biom. Eng. 14:201; Buchwaldらの文献, 1980, Surgery 88:507; Saudekらの文献, 1989, N. Engl. J. Med. 321:574を参照されたい)。別の実施態様において、ポリマー物質を使

10

20

30

40

50

用できる（「徐放の医学的適用（Medical Applications of Controlled Release）」，Langer及びWise（編），CRC Pres.，Boca Raton，Florida（1974）；「制御薬剤生体利用能、薬剤生産設計及び性能（Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance）」，Smolen及びBall（編），Wiley，New York（1984）；Ranger及びPeppas，J.の文献，1983，Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61を参照されたく；また、Levyらの文献，1985，Science 228:190；Duringらの文献，1989，Ann. Neurol. 25:351；Howardらの文献，1989，J. Neurosurg. 71:105も参照されたい）。さらに別の実施態様において、徐放系は治療標的、すなわち膀胱、胸部、結腸直腸、頭頸部、腎臓、肺若しくは脾臓の近傍に置くことができ、それゆえ、全身用量の一部のみが必要とされる（例えばGoodsonの文献，「徐放の医学的適用（Medical Applications of Controlled Release）」中，上掲，vol. 2, pp. 115-138（1984）を参照されたい）。10

【0322】

他の徐放系は、Langerによる総説（1990，Science 249:1527-1533）にて議論されている。。

【0323】

本発明の化合物がタンパク質をコードする核酸である特定の実施態様において、該核酸は、適切な核酸発現ベクターの一部としてそれを構築し、それが細胞内になるように投与することにより、例えばレトロウイルスベクターの使用により（米国特許第4,980,286号を参照）、又は直接注入により、又は微粒子照射の使用により（例えば遺伝子銃；Biolistic, Dupont）、又は脂質若しくは細胞表面受容体若しくはトランスフェクト試薬での被覆により、又は核内に入ることが公知のホメオボックス様ペプチドに関連付けてそれを投与すること（Joliotらの文献，1991，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868）などにより、インビボで投与して、そのコードタンパク質の発現を促進できる。あるいは、核酸は、細胞内に導入し、相同組換えにより発現のために宿主細胞DNA内に組み込むことができる。20

【0324】

また、本発明は、医薬組成物を提供する。このような組成物は、治療上有効量の化合物及び医薬として許容し得る担体を含む。特定の実施態様において、用語「医薬として許容し得る」は、動物及びより具体的にはヒトにおける使用について、連邦政府若しくは州政府の規制当局により承認されているか、又は米国薬局方若しくは他の一般的に認められている薬局方に収載されていることを意味する。用語「担体」とは、治療薬と共に投与される希釈剤、アジュバント、賦形剤又はビヒクルをいう。このような医薬担体は、水及び油等の滅菌液であり得、ピーナッツ油、大豆油、鉱油、ゴマ油等の石油、動物、植物又は合成起源のものを含む。水は、医薬組成物を静脈内投与するときに好ましい担体である。特に注射用溶液については、生理食塩水並びに水性デキストロース溶液及びグリセロール溶液も液体担体として利用できる。適切な医薬賦形剤には、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、コメ、小麦粉、チョーク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、脱脂粉乳、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノールなどを含む。組成物には、所望の場合、微量の湿潤剤若しくは乳化剤又はpH緩衝剤も含み得る。これらの組成物は、液剤、懸濁剤、乳剤、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、徐放性製剤などの形態をとることができる。組成物は、坐薬として、トリグリセリドなどの従来型の結合剤及び担体と共に製剤化できる。経口製剤には、医薬品等級のマンニトール、乳糖、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウム、その他のなどの標準的担体を含み得る。適切な医薬担体の例は、E.W. Martinによる「レミントンの薬学（Remington's Pharmaceutical Sciences）」に記載されている。このような組成物には、治療的有効量の本化合物を、好ましくは精製した形態で、対象への投与に適した形態を提供するのに適切な量の担体と共に含む。製剤化は、投与様式に合わせるべきである。30

【0325】

例えば、1以上の抗体が利用される実施態様において、本組成物は、ヒトへの静脈内投

40
50

与に適合化された医薬組成物としてルーチン手順に従い製剤化される。典型的には、静脈内投与用組成物は、無菌の等張性水性緩衝液中の溶液である。必要な場合、本組成物は、溶解剤、及び注射部位における疼痛を緩和するリドカインなどの局所麻酔薬も含み得る。一般に、該成分は、別々に、又は単位剤形、例えば活性剤の量を示すアンプル若しくはサッシェなどの密封封止容器内に乾燥凍結乾燥粉末として若しくは水を含まない濃縮物として混合され、供給される。本組成物を輸液により投与する場合、無菌医薬品等級の水又は生理食塩水を含有する輸液ボトルで供給できる。本組成物が注射により投与される場合、該成分が投与前に混合できるように、注射用滅菌水又は生理食塩水のアンプルを提供できる。

【0326】

10

本発明の化合物は、中性又は塩形態として製剤化できる。医薬として許容し得る塩には、塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸などに由来するものなどの遊離アミノ基と形成されたもの、及びナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、水酸化第2鉄、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどの遊離カルボキシル基と形成されたものを含む。

【0327】

膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは肺癌の治療に効果的である本発明の化合物の量は、標準的な臨床技術により測定できる。加えて、最適な用量範囲を同定するのを補助するために、インビトロアッセイ法を任意に使用できる。また、製剤に利用される正確な用量は、投与経路及び疾患又は障害の重症度に依存し、従事者の判断及び各対象の状況に従って決定されるべきである。しかし、静脈内投与に適切な用量範囲は、一般に、体重1キログラムあたり約20～500 μgの活性化合物である。鼻腔内投与に適切な用量範囲は、一般に、約0.01pg / kg体重～1mg/kg体重である。有効用量は、インビトロ又は動物モデル試験系に由来する用量反応曲線から推定できる。

20

【0328】

坐薬は、一般に、0.5重量%～10重量%の範囲の活性成分を含み、経口製剤は、好ましくは10%～95%の活性成分を含む。

【0329】

30

また、本発明は、本発明の医薬組成物の1以上の成分を充填した1以上の容器を含む医薬パック又はキットも提供する。このような容器には、医薬製品又は生物学的製品の製造、使用又は販売を規制する政府当局により規定された形態での通知を任意に伴うことができ、この通知は(a)ヒト投与についての製造、使用又は販売の当該機関による承認、(b)使用の方向性、又はその両方を反映する。

【0330】

従って、キットが本発明で利用される抗体を含むという態様において、例えば、抗体は、投与又は使用の前の再構成のために凍結乾燥できる。キットが癌などの療法/治療における使用のための場合、抗体は等張水溶液により再構成できこれは、任意にキットで提供できる。一態様において、キットは、本発明で使用される免疫原性ポリペプチドなどのポリペプチドを含むことができ、これは例えば凍結乾燥できる。後者のキットは、免疫原性ポリペプチドを再構成するためのアジュバントをさらに含むことができる。

40

【0331】

また本発明は、本明細書に記載する組成物、例えば対象において免疫応答を誘発するための医薬組成物及び/又はワクチン組成物にも拡張する。

【0332】

(イメージング技術によるエフリンA型受容体10の存在量の測定)

イメージング技術によるエフリンA型受容体10の存在量の測定の利点は、このような方法が非侵襲性であり（試薬を投与する必要があり得ることは別として）、該対象から試料を抽出する必要がないことであり得る。

【0333】

50

適切なイメージング技術には、ポジトロン放出断層撮影(PET)及び単光子放出コンピュ

ー夕断層撮影(SPECT)を含む。このような技術を使用するエフリンA型受容体10の視覚化は、適切な標識、例えば¹⁸F、¹¹C又は¹²³Iなどの放射性トレーサの取り込み及び結合を必要とする(例えばNeuroRx - The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics (2005) 2(2), 348-360、及び該技術のさらなる詳細について上掲361-371頁を参照されたい)。放射性トレーサ又は他の標識は、好適に標識された特定のリガンドの対象への投与により(例えば注入により)、エフリンA型受容体10に組み込むことができる。あるいは、これらは、(例えば注入により)対象に投与できるエフリンA型受容体10に特異的な結合親和性試薬(例えば抗体)に組み込むことができる。イメージングについてのアフィボディの使用に関する考察については、例えばOrlova A, Magnusson M, Eriksson TL, Nilsson M, Larsson B, Hoiden-Guthenberg I, Widstrom C, Carlsson J, Tolmachev V, Stahl S, Nilsson FYの論文、「ピコモル親和性HER2結合アフィボディ分子を使用する腫瘍イメージング(Tumor imaging using a picomolar affinity HER2 binding Affibody molecule)」, Cancer Res. 2006 Apr 15;66(8):4339-48を参照されたい。
10

【0334】

(免疫組織化学を使用する膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは脾癌の診断及び治療)

免疫組織化学は優れた検出技術であり、それゆえ、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは脾癌の診断及び治療に非常に有用であり得る。免疫組織化学は、蛍光色素、酵素、放射性元素又はコロイド金などのマーカーにより視覚化される抗原-抗体相互作用を介する特異試薬として、エフリンA型受容体10に特異的に結合する標識化抗体(又は他の親和性試薬)、その誘導体及び類似体の使用により、組織切片におけるエフリンA型受容体10抗原の局在を介して、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは脾癌を検出し、診断し又はモニタリングするために使用できる。

【0335】

モノクローナル抗体技術の発達は、ヒト新生物の最新の正確な顕微鏡診断における免疫組織化学の立場を保証する際にきわめて重要であった。免疫組織化学による拡散した腫瘍の形質転換細胞の同定は、癌浸潤及び転移、並びに悪性度増加に対する腫瘍細胞関連免疫表現型の進化のより鮮明な画像を可能にする。将来の抗新生物治療アプローチには、個々の患者の腫瘍性疾患に伴う特定の免疫表現型的パターンに特異的な様々な個別的免疫治療を含み得る。さらなる考察については、例えばBodey Bの論文、「新生物の診断及び治療における免疫組織化学の意義(The significance of immunohistochemistry in the diagnosis and therapy of neoplasms)」, Expert Opin Biol Ther. 2002 Apr;2(4):371-93を参照されたい。
30

【0336】

本発明は、以下の番号をつけられたパラグラフを参照することで理解することもできる:

1. 対象において、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは脾癌を検出、診断及び/又はスクリーニングし、若しくはこれらの進行をモニタリングする方法、又は抗膀胱癌、抗乳癌、抗結腸直腸癌、抗頭頸部癌、抗腎癌、抗肺癌若しくは抗脾癌の薬剤若しくは療法の効果をモニタリングする方法であって、前記対象における、エフリンA型受容体10若しくはその1以上の断片の存在若しくはレベル、又はエフリンA型受容体10をコードする核酸の存在若しくはレベル、又はエフリンA型受容体10の活性の存在若しくはレベルを検出することを含む、又は該レベルの変化を検出することを含む、前記方法。
40

【0337】

2. 候補対象における膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは脾癌を検出、診断及び/又はスクリーニングする方法であって、前記候補対象におけるエフリンA型受容体10若しくはその1以上の断片の存在、又はエフリンA型受容体10をコードする核酸の存在、又はエフリンA型受容体10の活性の存在を検出することを含み、ここで(a)健常対象のレベルと比較しての該候補対象における、エフリンA型受容体10若しくはその1以上の断片のレベルの上昇、若しくはエフリンA型受容体10をコードする核酸のレベルの上
50

昇の存在、又はエフリンA型受容体10の活性レベルの上昇の存在、又は(b)健常対象において対応する検出不可能なレベルと比較しての該候補対象における、エフリンA型受容体10若しくはその1以上の断片の検出可能なレベル、若しくはエフリンA型受容体10をコードする核酸の検出可能なレベルの存在、又はエフリンA型受容体10活性の検出可能なレベルの存在のいずれかが、前記対象における膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは肺癌の存在を示す、前記方法。

【0338】

3. 対象において、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは肺癌の進行をモニタリングする方法、又は抗膀胱癌、抗乳癌、抗結腸直腸癌、抗頭頸部癌、抗腎癌、抗肺癌若しくは抗肺癌の薬剤若しくは療法の効果をモニタリングする方法であって、第1の時点及びその後の時点での前記候補対象におけるエフリンA型受容体10若しくはその1以上の断片の存在、若しくはエフリンA型受容体10をコードする核酸の存在、若しくはエフリンA型受容体10の活性の存在、前記第1の時点での該対象におけるレベルと比較してその後の時点での該対象におけるエフリンA型受容体10若しくはその1以上の断片のレベルの上昇若しくは低下、若しくはエフリンA型受容体10をコードする核酸のレベルの上昇若しくは低下の存在、又はエフリンA型受容体10の活性のレベルの上昇若しくは低下の存在を検出することを含み、これが前記対象における、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは肺癌の進行若しくは退行を示し、又は抗膀胱癌、抗乳癌、抗結腸直腸癌、抗頭頸部癌、抗腎癌、抗肺癌若しくは抗肺癌の薬剤若しくは療法の効果若しくは非効果を示す、前記方法。

10

20

30

50

【0339】

4. 前記エフリンA型受容体10若しくはその1以上の断片の存在、若しくはエフリンA型受容体10をコードする核酸の存在、若しくはエフリンA型受容体10の活性の存在が、前記対象から得られる生体試料の分析により検出される、パラグラフ1~3のいずれかに記載の方法。

【0340】

5. 前記対象から分析のために前記試料を得る工程を含む、パラグラフ4記載の方法。

【0341】

6. 前記試料が、膀胱、胸部、結腸直腸、頭頸部、腎臓、肺又は肺臓組織の試料である、パラグラフ4又はパラグラフ5記載の方法。

【0342】

7. エフリンA型受容体10若しくはその1以上の断片の存在、又はエフリンA型受容体10をコードする核酸の存在、又はエフリンA型受容体10の活性の存在が、定量的に検出される、パラグラフ1~6のいずれかに記載の方法。

【0343】

8. エフリンA型受容体10若しくはその1以上の断片の存在、又はエフリンA型受容体10をコードする核酸の存在、又はエフリンA型受容体10の活性の存在が、イメージング技術の使用を含む手段によって定量的に検出される、パラグラフ7記載の方法。

【0344】

9. エフリンA型受容体10若しくはその1以上の断片の存在、又はエフリンA型受容体10をコードする核酸の存在、又はエフリンA型受容体10の活性の存在を測定し、これにより膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは肺癌の細胞を限局化するための、組織切片における免疫組織化学の使用を含む、パラグラフ1~7のいずれかに記載の方法。

【0345】

10. エフリンA型受容体10若しくはその1以上の断片の存在、又はエフリンA型受容体10をコードする核酸の存在、又はエフリンA型受容体10の活性の存在が、インサイチュウ分析により検出される、パラグラフ1~3のいずれかに記載の方法。

【0346】

11. エフリンA型受容体10又はその1以上のエピトープ含有断片の存在が検出される、パラグラフ1~10のいずれかに記載の方法。

【 0 3 4 7 】

12. エフリンA型受容体10又はその1以上の断片の存在が、エフリンA型受容体10又はその1以上の断片に特異的結合し得る親和性試薬を使用して検出される、パラグラフ11記載の方法。

【 0 3 4 8 】

13. 前記親和性試薬が抗体である、パラグラフ12記載の方法。

【 0 3 4 9 】

14. エフリンA型受容体10をコードする核酸が検出される、パラグラフ1~10のいずれかに記載の方法。

【 0 3 5 0 】

15. エフリンA型受容体10をコードする核酸が、エフリンA型受容体10をコードする核酸にハイブリダイズし得るハイブリダイズ剤を使用して検出される、パラグラフ14記載の方法。

10

【 0 3 5 1 】

16. エフリンA型受容体10の活性が検出される、パラグラフ1~10のいずれかに記載の方法。

【 0 3 5 2 】

17. 対象において、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは脾癌を検出、診断及び／又はスクリーニングし、若しくはこれらの進行をモニタリングする方法、又は抗膀胱癌、抗乳癌、抗結腸直腸癌、抗頭頸部癌、抗腎癌、抗肺癌若しくは抗脾癌の薬剤若しくは療法の効果をモニタリングする方法であって、前記対象における、エフリンA型受容体10若しくはその1以上のエピトープ含有断片に免疫特異的に結合し得る抗体の存在若しくはレベルを検出することを含み、又はそのレベルの変化を検出することを含む、前記方法。

20

【 0 3 5 3 】

18. 対象において、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは脾癌を検出、診断及び／又はスクリーニングする方法であって、前記対象において、エフリンA型受容体10若しくはその1以上のエピトープ含有断片に免疫特異的に結合し得る抗体の存在を検出することを含み、ここで(a)健常対象のレベルと比較しての前記対象におけるエフリンA型受容体10若しくはその1以上のエピトープ含有断片に免疫特異的に結合し得る抗体のレベルの上昇の存在、又は(b)健常対象において対応する検出不可能なレベルと比較しての前記対象におけるエフリンA型受容体10若しくはその1以上のエピトープ含有断片に免疫特異的に結合し得る抗体の検出可能なレベルの存在のいずれかが、前記対象における膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは脾癌の存在を示す、前記方法。

30

【 0 3 5 4 】

19. 対象において、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは脾癌の進行をモニタリングする方法、又は抗膀胱癌、抗乳癌、抗結腸直腸癌、抗頭頸部癌、抗腎癌、抗肺癌若しくは抗脾癌の薬剤若しくは療法の効果をモニタリングする方法であって、第1の時点及びその後の時点での前記対象におけるエフリンA型受容体10若しくはその1以上のエピトープ含有断片に免疫特異的に結合し得る抗体の存在、前記第1の時点での前記対象におけるレベルと比較してその後の時点での前記対象におけるエフリンA型受容体10若しくはその1以上のエピトープ含有断片に免疫特異的に結合し得る抗体のレベルの上昇若しくは低下の存在を検出することを含み、これが前記対象における、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは脾癌の進行若しくは退行を示し、又は抗膀胱癌、抗乳癌、抗結腸直腸癌、抗頭頸部癌、抗腎癌、抗肺癌若しくは抗脾癌の薬剤若しくは療法の効果若しくは非効果を示す、前記方法。

40

【 0 3 5 5 】

20. エフリンA型受容体10若しくはその1以上のエピトープ含有断片に免疫特異的に結合し得る抗体の存在が、前記対象から得られる生体試料の分析により検出される、パラグラフ

50

17～19のいずれかに記載の方法。

【0356】

21．前記対象からの分析のために前記試料を得る工程を含む、パラグラフ20記載の方法。

【0357】

22．前記試料が、膀胱、胸部、結腸直腸、頭頸部、腎臓、肺又は脾臓組織の試料である、パラグラフ20又はパラグラフ21記載の方法。

【0358】

23．膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは脾癌を有する候補対象において検出され得るレベルが、健常対象におけるレベルより2倍以上高い、パラグラフ1～22のいずれかに記載の方法。

10

【0359】

24．疾患をスクリーニングし、検出し、及び／又は診断することにおける使用のための、エフリンA型受容体10若しくはその断片に特異的に結合し得る作用物質、又はエフリンA型受容体10をコードする核酸にハイブリダイズし得るハイブリダイズ剤、又はエフリンA型受容体10の活性を検出し得る作用物質。

【0360】

25．前記疾患が癌である、パラグラフ24記載の作用物質。

【0361】

26．前記癌が、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌又は脾癌である、パラグラフ25記載の作用物質。

20

【0362】

27．疾患をスクリーニングし、検出し、及び／又は診断することにおける使用のための、エフリンA型受容体10又はその断片。

【0363】

28．前記疾患が癌である、パラグラフ27記載のエフリンA型受容体10又はその断片。

【0364】

29．前記癌が、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌又は脾癌である、パラグラフ28記載のエフリンA型受容体10又はその断片。

【0365】

30．エフリンA型受容体10若しくはその断片に特異的結合し得る親和性試薬。

30

【0366】

31．検出可能な標識を含む又は検出可能な標識に抱合化されている、パラグラフ30記載の親和性試薬。

【0367】

32．治療的部分を含む又は治療的部分に抱合化されている、パラグラフ30記載の親和性試薬。

【0368】

33．前記治療的部分が細胞傷害性部分である、パラグラフ32記載の親和性試薬。

【0369】

34．抗体である、パラグラフ30～33のいずれかに記載の親和性試薬。

40

【0370】

35．モノクローナル抗体である、パラグラフ34記載の抗体。

【0371】

36．ヒト補体の存在下で、エフリンA型受容体10抗原発現細胞に対し細胞傷害性を有する、パラグラフ35記載のモノクローナル抗体。

【0372】

37．ヒト免疫エフェクター細胞の存在下で、エフリンA型受容体10抗原発現細胞に対し細胞傷害性を有する、パラグラフ35記載のモノクローナル抗体。

【0373】

38．エフリンA型受容体10をコードする核酸にハイブリダイズし得るハイブリダイズ剤。

50

【0374】

39. 検出可能な標識を含む、又は検出可能な標識に抱合化されている、パラグラフ38記載のハイブリダイズ剤。

【0375】

40. パラグラフ30～39のいずれかに記載の1以上の親和性試薬及び／又はハイブリダイズ剤を、パラグラフ1～16及び23のいずれかに記載の方法におけるそれらの使用のための取扱説明書と共に含む、キット。

【0376】

41. 前記親和性試薬及び／又はハイブリダイズ剤の結合を検出して報告できる試薬をさらに含む、パラグラフ40記載のキット。 10

【0377】

42. パラグラフ17～23のいずれかに記載の方法におけるそれらの使用のための取扱説明書と共に、エフリンA型受容体10及び／又はその1以上の断片を含む、キット。

【0378】

43. パラグラフ1～16及び23のいずれかに記載の方法におけるそれらの使用のための取扱説明書と共に、エフリンA型受容体10の活性を検出できる1以上の作用物質を含む、キット。
。

【0379】

44. エフリンA型受容体10若しくはその断片に特異的結合し得る親和性試薬の治療上有効量、及び医薬として許容し得る希釈剤若しくは担体を含む、医薬組成物。 20

【0380】

45. パラグラフ30～39のいずれかに記載した1以上の親和性試薬若しくはハイブリダイズ剤、及び医薬として許容し得る希釈剤若しくは担体を含む、医薬組成物。

【0381】

46. エフリンA型受容体10若しくはそのエピトープ含有断片、又はエフリンA型受容体10若しくはその断片をコードする核酸を、任意に免疫賦活剤と共に含む、免疫原性組成物。

【0382】

47. エフリンA型受容体10若しくはそのエピトープ含有断片、又はエフリンA型受容体10若しくはそのエピトープ含有断片をコードする核酸を、任意に免疫賦活剤と共に含む、ワクチン組成物。 30

【0383】

48. パラグラフ46記載の組成物を対象に投与することを含む、免疫応答賦活法。

【0384】

49. 膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌を治療又は予防する方法であって、パラグラフ44～47のいずれかに記載の組成物の治療上有効量を、その必要のある対象に投与することを含む、前記方法。

【0385】

50. 膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌を予防又は治療するのに使用するための、パラグラフ44～47のいずれかに記載の組成物。

【0386】

51. エフリンA型受容体10の活性を調節する化合物のスクリーニング方法であって：(a) エフリンA型受容体10若しくはその生物学的活性部分を候補化合物と接触させること；及び(b) エフリンA型受容体10の活性がこれにより調節されるかどうかを測定すること；を含む、前記方法。 40

【0387】

52. 前記活性がキナーゼ活性である、パラグラフ51記載の方法。

【0388】

53. (a) 試料において、エフリンA型受容体10若しくはその生物学的活性部分を、候補化合物と接触させること；及び(b) 前記候補化合物との接触後の前記試料におけるエフリンA型受容体10若しくはその生物学的活性部分の活性を、前記候補化合物との接触前の前記試

料におけるエフリンA型受容体10又はその生物学的活性部分の活性と、又は参照レベルの活性と比較すること；を含む、パラグラフ51又は52記載の方法。

【0389】

54. エフリンA型受容体10の活性を阻害する化合物のスクリーニングの方法である、パラグラフ51～53のいずれかに記載の方法。

【0390】

55. エフリンA型受容体10又はその生物学的活性部分が、細胞上に、又は細胞により発現される、パラグラフ51～54のいずれかに記載の方法。

【0391】

56. エフリンA型受容体10又はその生物学的活性部分が、それを発現する細胞から単離される、パラグラフ51～54のいずれかに記載の方法。 10

【0392】

57. エフリンA型受容体10又はその生物学的活性部分が、固相上に固定されている、パラグラフ56記載の方法。

【0393】

58. エフリンA型受容体10又はエフリンA型受容体10をコードする核酸の発現を調節する化合物のスクリーニング方法であって：(a)エフリンA型受容体10又はエフリンA型受容体10をコードする核酸を発現している細胞を候補化合物と接触させること；及び(b)エフリンA型受容体10又はエフリンA型受容体10をコードする核酸の発現がこれにより調節されるかどうかを測定すること；を含む、前記方法。 20

【0394】

59. (a) 試料において、エフリンA型受容体10を発現する細胞、若しくはエフリンA型受容体10をコードする核酸を、候補化合物と接触させること；及び(b)前記候補化合物との接触後の前記試料におけるエフリンA型受容体10若しくはエフリンA型受容体10をコードする核酸の発現を、前記候補化合物との接触前の前記試料におけるエフリンA型受容体10又はエフリンA型受容体10をコードする核酸の発現と、又は参照レベルの発現と比較すること；を含む、パラグラフ58記載の方法。

【0395】

60. エフリンA型受容体10又はエフリンA型受容体10をコードする核酸の発現を阻害する化合物のスクリーニングの方法である、パラグラフ58又はパラグラフ59記載の方法。 30

【0396】

61. パラグラフ51～60のいずれかに記載の方法により得られる化合物。

【0397】

62. エフリンA型受容体10又はエフリンA型受容体10をコードする核酸の活性又は発現を調節する化合物。

【0398】

63. エフリンA型受容体10又はエフリンA型受容体10をコードする核酸の活性又は発現を阻害する、パラグラフ62記載の化合物。

【0399】

64. 勝胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌を治療又は予防するのに使用するための、パラグラフ58～63のいずれかに記載の化合物。 40

【0400】

65. 勝胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌若しくは膵癌を治療又は予防する方法であって、パラグラフ58～63のいずれかに記載の化合物の治療上有効量を、その必要のある対象に投与することを含む、前記方法。

【0401】

本発明の各態様の好適な特徴は、必要な変更を加えた他の態様の各々に関して同様である。本明細書に記載の從来技術文献は、法律により許される最大範囲で組み込まれる。

【実施例】

【0402】

10

20

30

40

50

(実施例1)：結腸直腸癌、腎癌又は肺癌の血液及び組織試料において発現する膜タンパク質の同定

以下の参照プロトコルを使用し、結腸直腸癌、腎癌及び肺癌組織から抽出した膜タンパク質、並びに正常な隣接する結腸直腸組織試料、腎臓組織試料及び肺組織試料を消化し、絶対及び相対定量用アイソトープタグ化試薬 (iTRAQ; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) で標識し、タンデム型質量分析器でペプチド配列を決定した。

【0403】

(1.1 材料及び方法)

1.1.1 - 原形質膜分画

結腸直腸癌、腎癌若しくは肺癌、又は正常な隣接する結腸直腸組織、腎臓組織及び肺組織から回収した細胞を溶解し、1000Gでの遠心分離に供した。上清を取り、それから該上清を3000Gで遠心分離した。もう一度、上清を取り、それから該上清を100,000Gで遠心分離した。

【0404】

結果として生じたペレットを回収し、15-60%スクロース勾配に置いた。

ウェスタンプロットを使用して細胞内マーカーを同定し、原形質膜増量画分をプールした。

プールされた溶液は、それから直接、iTRAQにより分析した（下記1.1.2節を参照）。

【0405】

1.1.2 - iTRAQ方法論

結腸直腸癌、腎癌若しくは肺癌、及び正常な隣接する結腸直腸組織、腎臓組織及び肺組織からの膜タンパク質ペレットを、緩衝液の添加により試料緩衝液 (0.5% SDS 中2~4 μg / μl) に可溶化し、それから95°で3分間加熱した。

【0406】

各タンパク質溶液の量を50 μgにし、150 μlの0.5M重炭酸トリエチルアンモニウム (TEAB) 溶液を添加した。各試料に、3 μlの50mMのトリス-(2-カルボキシエチル)ホスフィンを加え、該混合物を60°で1時間インキュベートした。イソプロパノール中1 μlのシステイン保護試薬、200mMのメチルメタンチオスルホナート (MMTS) をそれから添加した。室温で10分間のインキュベーション後、15 μlの1 μg/ μlトリプシンを各試料に添加し、それに続けて37°で一晩インキュベーションした。

【0407】

消化試料を真空下で乾燥させ、30 μlの0.5M TEAB溶液で再構成した。70 μlのエタノールを4つのiTRAQ試薬 (114/115/116/117) の各々に添加し、1つの試薬を分析される該4試料のそれぞれに添加し（2つの結腸直腸癌、腎癌若しくは肺癌試料、及び2つの対応する正常な隣接する組織試料）、室温で1時間放置した。各試料に添加した具体的試薬を記録した。4つの標識化試料を混合し、ボルテックスした。

【0408】

該混合試料は、真空下で乾燥まで減少させ、C18スピンカラム上に供することにより脱塩し、水性溶媒で洗浄し、それから70%アセトニトリルで溶出した。試料画分は再び乾燥まで減少させ、それからイオン交換分画前に、40 μlの溶媒A (97.9水、2%アセトニトリル、0.1%ギ酸) に再溶解させた。

【0409】

1.1.3 - 標識化ペプチドの分画及び分析

該試料は、Agilent 1200クロマトグラフ (Agilent, Santa Clara, CA, USA) を使用する、強力な陽イオン交換クロマトグラフィにより分画した。試料は、20分にわたり0-100mM酢酸ナトリウム、及びその後10分にわたり1Mまでの20 μl/分の勾配を使用して、Agilent Zorbax Bio-SCXIIカラム (3.5 μm; 50 × 0.8mm) から溶出した。1分の画分は、30分のランにわたって回収した。

【0410】

各画分は、Zorbax 300SB-C18装備Agilent 1200クロマトグラフ (150mm × 75 μm) 及びAgil

10

20

30

40

50

lent 6510四重極-飛行時間型装置(Agilent, Santa Clara, CA, USA)を使用し、液体クロマトグラフィ/質量分析により分析された。ペプチドは、60分でアセトニトリルが15%から45%まで増加する300nL/分の勾配で、溶出された。データは強度閾値を上回る最高3つの前駆体イオンが選択されるような自動MS/MSモードで得られ、製品イオンスペクトルを蓄積して標識化ペプチドの配列決定を促進した。Spectrum Millソフトウェア(Agilent, Santa Clara, CA, USA)を使用して、生データを加工し、ピークリストを作成した。

【0411】

1.1.4 - 標識化ペプチドのアミノ酸配列分析

部分的なアミノ酸配列決定及びエフリンA型受容体10の同定について、SEQUENT検索プログラムを使用して、解釈されてないトリプシンペプチドのタンデム型の質量スペクトルを検索した(Engらの文献, 1994, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 5:976-989)。データベースによる同定のための基準には以下を含んだ：トリプシンの切断特異性；データベースから返されたペプチドにおける一組のa、b及びyイオンの検出、並びにメチルメタンチオスルホナートでの修飾による全てのシステイン残基での質量の増加、及び遊離アミン(N末端及びリジン)へのiTRAQ標識の付加による質量の増加。データは、IPI Human v3.23 (www.ebi.ac.uk/IPI/IPIhuman.html) で検索した。

【0412】

1.1.5 - 結腸直腸癌、腎癌又は肺癌関連タンパク質の識別

エフリンA型受容体10を同定するプロセスは、天然に存在するヒトタンパク質の上記質量分析により実験的に得られたペプチド配列を使用して、公開されているヒトゲノム配列におけるコード化工キソンを同定し、組織化する。

【0413】

ヒトゲノムの化学的配列を規定することにおける最近の劇的な進歩により、この莫大な課題が完遂間近になった(Venter, J.C. らの文献 (2001). 「ヒトゲノムの配列 (The sequence of the human genome.)」 Science 16: 1304-51; 国際ヒトゲノム配列コンソーシアムの文献(2001). 「ヒトゲノムの一次配列及び解析 (Initial sequencing and analysis of the human genome)」 Nature 409: 860-921)。この配列情報は、我々が、分子進化、比較ゲノム学、病理メカニズム及び分子医薬を含む多くの生物学的プロセスを理解する上で、実質的な衝撃を有することにはおよそ疑いがない。ヒトゲノムの配列に固有の完全な医学的価値が実現されるためには、ゲノムが「組織化」され、注釈付けされる必要がある。これは、少なくとも以下の3つのことを意味する：(i)ゲノムの個々の部分の配列の集合を、それぞれの染色体のコヒーレント(coherent)で連続的な配列に構築すること；(ii)遺伝子を含むそれぞれの染色体のそれらの領域の明白な同定；(iii)遺伝子の微細構造並びにそのmRNA及びタンパク質産物の特性の決定。「遺伝子」の定義はますます複雑な問題である一方で(H Pearsonの文献:「遺伝子とは何か? (What is a gene?)」 Nature (2006) 24: 399 - 401)、創薬及び薬剤開発にとっての当座の興味は、機能的な発現タンパク質をコードするこれらの遺伝子のカタログである。これらの遺伝子のサブセットは、全てとまではいかないまでもほとんどの病態の分子基盤に関与する。従って、医薬産業にとって重要かつ当面の目標は、ヒトゲノムにおいてそのような全ての遺伝子を同定し、それらの微細構造を説明することである。

【0414】

(OGAP(登録商標)データベースを形成するための、ペプチド質量、ペプチドの特徴、EST及び公共領域ゲノム配列データの加工及び組み込み)

個別の遺伝学的単位(エキソン、転写物及び遺伝子)を以下の一連の工程を使用して同定した：

【0415】

1. Ensembl及び様々な遺伝子予測プログラムから入手可能な遺伝子同定を組み合わせることによりヒトゲノムに位置づけられたトリプシンペプチドを含む「仮想トランスクリプトーム」を生成する。これには、遺伝子同定のSNPデータ(dbSNPから)及び全ての選択的スプライシングも組み込む。また、公知の混入物を仮想トランスクリプトームに追加した。

10

20

30

40

50

【0416】

2. OGeS質量分析データベースにおける全てのタンデムスペクトルを、仮想トランスクリプトームにおける1つに対して位置づけることができるペプチドを产生するように解釈する。一連の自動化されたスペクトル解釈アルゴリズムを使用してペプチド同定がなされた。

【0417】

3. OGeS質量分析データベースにおいて全ての質量がマッチしたペプチドのセットは、典型的には20ppmという質量分析器の質量精度に基づいた寛容性を使用して、タンデムペプチドによりヒットした転写物由来の全てのペプチドを検索することにより、作製される。

【0418】

4. 全てのタンデムペプチド及び質量マッチペプチドを、「タンパク質クラスター」の形態で組合せる。これは、配列を共通のペプチドヒットに基づいてクラスターへとグループ化する再帰的プロセスを使用してなされる。生物学的配列は、これらが1以上のタンデムペプチド又は質量マッチペプチドを共有する場合に、同じクラスターに属するとみなす。

【0419】

5. 誤って同定したペプチドを除外するための一次フィルタリングの後、生じたクラスターをヒトゲノムにおいて位置づける。

【0420】

6. 次いで、タンパク質クラスター内のペプチドのそれらの近接度及び同時観察を使用して、タンパク質クラスターを予備的遺伝子境界を規定する領域に集約させる。近接度は、同じ染色体の同じ鎖上の80,000スクレオチド内に存在するペプチドとして定義する。クラスター観察スコアリング及びゲノムに対する複数マッピングに基づいた種々の排除則を使用して出力結果を洗練する。結果として生じる「確認された遺伝子」は、各クラスタにおける質量分析により観測されたペプチド及び質量の最良を占めるものである。また、遺伝子の公称座標がこの段階の出力である。

【0421】

7. それぞれの確認された遺伝子の転写物の最良のセットを、タンパク質クラスター、ペプチド、EST、候補エキソン及び元のタンパク質スポットの分子量から作製する。

【0422】

8. 同定された各転写物を、観測されたペプチドを提供する試料に関連づけた。

【0423】

9. データを考察し、マイニングするためのアプリケーションの使用。工程1~8の結果は、それぞれが多数のエキソン及び1以上の転写物からなる遺伝子を含むデータベースであった。アプリケーションは、この統合したゲノム/プロテオームデータを示して、検索するために記載した。Ensemblにより同じGolden経路座標系に位置づけられた任意の特徴(OMIM疾患座、InterProなど)は、位置及び微細構造の一致により、これらの遺伝子に相互参照できた。

【0424】

(結果)

本プロセスを使用して、タンパク質コード遺伝子及びそれらのエキソンを同定するためのおよそ1,000,000ペプチド配列を生成し、B細胞非ホジキンリンパ腫における501遺伝子、膀胱癌における506遺伝子、乳癌における4,713遺伝子、バーキットリンパ腫における766遺伝子、子宮頸癌における1,371遺伝子、結腸直腸癌における949遺伝子、肝臓細胞癌における1,782遺伝子、慢性リンパ性白血病における2,424遺伝子、腎癌における1,004遺伝子、肺癌における978遺伝子、黒色腫における1,764遺伝子、卵巣癌における1,033遺伝子、膵癌における2,961遺伝子及び前立腺癌における3,307遺伝子を含む、67の異なる組織及び56の疾患にわたる18083遺伝子についてのタンパク質配列の同定を生じ、結腸直腸癌、腎癌及び肺癌試料から単離及び同定されたエフリンA型受容体10により本明細書において実証された。OGAP(登録商標)データベースにおける配列と実験的に決定された配列との比較に続き、エフリンA型受容体10は、予後及び診断特性の指標である、結腸直腸癌、腎

10

20

30

40

50

癌及び肺癌への高度な特異性を示した。

【0425】

1.2 結果

これらの実験は、本明細書にさらに記載されているように、エフリンA型受容体10を同定した。全長のエフリンA型受容体10は、結腸直腸癌、腎癌及び肺癌試料の原形質膜において検出された。iTRAQ分析は、癌試料におけるエフリンA型受容体10のレベルが、マッチした正常隣接組織試料において高いことを示した。

【0426】

タンパク質インデックスをエフリンA型受容体10について算出した。各遺伝子について、タンパク質インデックスは質量分析データを使用して、各疾患にスコアを割り当て、これは世界的データベースに関連する。タンパク質インデックスはそれから、癌の徴候における高いスコア、並びに正常及び他の疾患における低い/ごくわずかなスコアを用いて、癌特異的遺伝子を同定することができる。該インデックスは、56の疾患から質量分析を介して配列決定された1,000,000までのペプチドを含む。各遺伝子について、これは、各疾患及び細胞内位置についてスコアを生じる。

【0427】

エフリンA型受容体10についてのタンパク質インデックスは、結腸直腸癌の原形質膜において高く、腎癌の原形質膜において中程度であり、及び肺癌の原形質膜において高く、並びに正常の原形質膜では非常に低い。エフリンA型受容体10は、他のいかなる疾患においても検出されなかった。これは、エフリンA型受容体10が潜在的に結腸直腸癌、腎癌及び肺癌の良好なマーカーであることを示す。

【0428】

(実施例2)：エフリンA型受容体10に対する抗体を使用する免疫組織化学

以下の参照プロトコルを使用して、免疫組織化学は、エフリンA型受容体10に対するマウスモノクローナル抗体を使用し、FFPE腫瘍及び正常組織において実施した。エフリンA型受容体10(配列番号1により定義される)に対する抗体は、Biositeで開発された。

【0429】

(2.1 材料及び方法)

抗マウスEnVisionプラスキット(K4006)はDAKO(CA, US)製であった。

EX-De-WaxはBioGenex(CA, USA)製であった。

組織切片及びアレイは、Biomax(MD, USA)製であった。

【0430】

2.1.1 - 脱パラフィン化及び脱水

スライドは、緩衝液なしで水浴の50mlファルコンにおいて、60°で2時間加熱した。各ファルコンは、1つのスライド、又は2つのスライドであって互いに固着することを防ぐためにそれらの間に長いゲルローディングチップを有する前記2つのスライドを有した。スライドは、黒いスライドラックにおいて5分間EZ-DeWaxで脱パラフィン化し、それから1mlのピペットを使用して同じDeWax溶液でよくリーンスし、その後、洗瓶から水で洗浄した。スライドを水で満たされたコブリンドジャー(coplin jar)内に置き；水を2回交換した。

【0431】

2.1.2 - 抗原回復

水を、抗原回復溶液、すなわち、1×クエン酸塩緩衝液、pH 6(DAKO)に交換した。抗原は、水浴法により回復した。抗原回復溶液中のプラスチック製コブリンドジャーにおけるスライドを、それから、60°～90°に加熱された水浴に入れた。スライドを90°で20分間インキュベートし、20分間室温でクールダウンさせた。スライドはPBS-3T(0.5L PBS + 3滴のTween-20)で1×5分洗浄し、PBS中に置いた。

【0432】

2.1.3. - 染色

抗原回復後、スライドは、シャンドン(Shandon)カバーブレート系で包埋した。スライドとプラスチックカバーブレートとの間の気泡の捕獲は、カバーブレートをPBSで満た

10

20

30

40

50

されたコプリンジャーに入れ、組織切片を有するスライドをカバーブレートに穩やかに摺動させることにより、予防した。スライドをコプリンジャーから引き抜くと同時に、それをカバーブレートと共にきつく保った。組み立てたスライドをラックに入れ、PBSを漏斗内及びスライドとカバーブレートとの間に捕捉し、通り抜けさせた。スライドは、 $2 \times 2\text{ml}$ のPBS-3T（又は $4 \times 1\text{ml}$ ）、 $1 \times 2\text{ml}$ のPBSで洗浄し、全てのPBSがスライドからなくなり、かつ実質的にPBSが漏斗内からなくなるまで待機した。

【0433】

内在性ペルオキシド遮断は、EnVision+キットで供給される溶液を使用して実施した。スライドあたり1~4滴のペルオキシド溶液を使用し；インキュベーション時間は、5分であった。スライドを水でリヌスし、その後 2ml のPBS-3Tで1回及び 2ml のPBSで2回リヌスし；新しい部の洗浄緩衝液を加える前に、実質的に液体が漏斗に残らなくなるまで待機することは重要であった。10

【0434】

一次抗体は、抗体希釈試薬（DAKO）で希釈した。最適な希釈は、1:30（抗体ストック 0.75mg/ml ）であることが決定された。 $200\mu\text{l}$ までの希釈一次抗体を各スライドに適用し、室温で45分間インキュベートした。スライドは、 $2 \times 2\text{ml}$ （又は $4 \times 1\text{ml}$ ）PBS-3T、その後 $1 \times 2\text{ml}$ PBSで洗浄した。

【0435】

抗マウスペルオキシダーゼポリマーをスライドあたり 2×2 滴適用し、室温で35分間インキュベートした。スライドは、上記のように洗浄した。20

【0436】

DAB基質は、希釈緩衝液で作製し；2滴の基質を含む 2ml は、10スライドのために十分であった。DAB試薬を一度に2、3滴適用することによってスライドに適用し、10分間静置した。スライドは、 $1 \times 2\text{ ml}$ （又は $2 \times 1\text{ml}$ ）PBS-3Tで、及び $1 \times 2\text{ml}$ （又は $2 \times 1\text{ml}$ ）PBSで洗浄した。

【0437】

ヘマトキシリン（DAKO）を適用した； 1ml は10スライドのために十分であり、スライドは室温で1分間インキュベートした。シャンドンカバーブレート系の漏斗を 2ml の水で満たし、通り抜けさせた。スライドが過剰のヘマトキシリンに透明である場合、該系を分解し、組織切片及び／又はアレイを洗瓶からの水にて洗浄し、黒いスライドラックに入れた。組織は、EZ-DeWaxにおいて5分間、その後95%エタノールにおいて2~5分間インキュベートすることにより、脱水した。30

【0438】

スライドは、室温のベンチ上で乾燥させたままにし、それから包埋溶媒で包埋し、カバーガラスでカバーした。

【0439】

2.2 結果

Biositeにより製造された抗体OG0036Z1ZM01731を使用する免疫組織化学解析は、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、非小細胞肺癌及び膵癌における腫瘍細胞の特異的染色を示した。40

【0440】

下記の表2は、20の最も一般的な型の癌（20事例/型）及び正常対照（5つの事例/型）からの500の組織核を含む、高密度アレイの結果を示す。癌細胞においてエフリンA型受容体10の染色の上昇は、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、腎癌、非小細胞肺癌及び膵癌においてみられた。

【0441】

【表8】

表2—組織マイクロアレイ (Biomax、US) 上でスコア化したエフリンA型受容体10。
正常組織での複数の器官の癌組織アレイ (ー=染色なし；+ =弱い染色；++=中程度の染色；+++ =強い染色)。

組織	腫瘍(%)			合計+
	+	++	+++	
腎臓	10	40	40	90
頭頸部	11	11	50	72
膀胱	5	10	50	65
結腸直腸	5	14	33	52
非小細胞 肺	16	16	36	68
脾臓	65	20	10	95
胸部	11	23	9	43
皮膚	0	4	33	37
甲状腺	20	20	20	60
卵巣	18	6	12	35
子宮	30	25	5	60
リンパ節	0	30	0	30
肝臓	35	0	0	35
精巣	35	0	0	35
後腹膜	20	0	0	20
腹部	4	0	0	4
骨	0	0	0	0
大脳	0	0	0	0
脂肪組織	0	0	0	0
線維組織	0	0	0	0
腸	0	0	0	0
腸間膜	0	0	0	0
前立腺	0	0	0	0
脾臓	0	0	0	0

10

20

30

【0442】

特許及び特許出願を含む本出願において言及する全ての引用文献は、言及によりその可能な最大限の範囲で本明細書に組み込まれる。

【0443】

本明細書及び添付する特許請求の範囲を通じて、文脈が別途要求しない限り、用語「含む(comprise)」並びに「含む(comprises)」及び「含む(comprising)」などの変形体は、述べられた整数、ステップ、整数の群又はステップの群を包含するだけではなく、任意の他の整数、ステップ、整数の群又はステップの群を除外しないことを意味すると解する。

【0444】

本発明の実施態様は本明細書に記載されており、これは特定の要素を含む。また、本発明は同じ要素から成っているか又は基本的に成っている個別的な実施態様にまで拡張し、逆もまた同じである。

【0445】

任意の次なる出願に関し、この記載及び請求項が部分を形成する出願は、優先権の基礎として使用できる。このような次なる出願の請求項は、本明細書に記載されている任意の特徴又は特徴の組合せに関し得る。それらは、物クレーム、組成物クレーム、プロセスクリーム又は使用クレームの形態をとることができ、例示目的であって限定ではないが、以下の請求項を含み得る。

【0446】

40

【表9】

配列表

配列	配列番号
METCAGPHPLRLFLCRMQLCLALLGPWRPGTAEEVILLDKAS QAELGWTALPSNGWEEISGVDEHDRPIRTYQVCNVLEPNQDNW LQTGWISRGRGQRIFVELQFTLRDCSSIPGAAGTCKETFNVYYLE TEADLGRGRPRLGGSRPRKIDTIAADESFTQGDLGERKMKLNT VREIGPLSRRGFHLAFQDVGACVALSVRVYYKQCRAVRLA TFPATAAESAFSTLVEVAGTCVAHSEGEPGSPPRMHCGADGEW LVPVGRCSCSAGFQERGDFCEACPPGFYKVSPRRLCSPCPEHS RALENASTFCVCQDSYARSPTDPPSASCTRPPSAPRDLQYSLRS PLVLRLRWLPPADSGGRSDVTYSLLCLRCGREGPAGACEPCGPR VAFLPRQAGLRERAATLLHLRPGARYTVRVAALNGVSGPAAA GTTYAQVTVSTGPGAPWEEGEIRRDRVEPQSVSLSWREPIPAGA PGANDTEYEIRYYEKQSEQAYSMVKTGAPTVTVTNLPATRY VFQIRAASPGPSWEAQSFNPSIEVQTLGEAASGSRDQSPAIVTV VTISALLVLGSVMSVLAIWRRPCSYGKGGDAHDEEELYFHF VPTRRTFLDQSCGDLLQAVHLFAKELDAKSVTLERSLGGGRFG ELCCGCLQLPGRQELLVAVHMLRDSASDSQRLGFLAEALTGQ FDHSHIVRLEGVVTRGSTLMIVTEYMSHGALDGFLRRHEGQLV AGQLMGLLPGLASAMKYLSEMGYVHRGLAARHVLVSSDLVCK ISGFGRGPRDRSEAVYTTMSGRSPALWAAPETLQFGHFSSASDV WSFGIIMWEVMAFGERPYWDMMSGQDVIKAVEDGFRLLPPRNCP NLLHRLMLDCWQKDGERPRFSQIHISILSKMVQDPEPPKALT CPRPPTPLADRAFSTFPSFGSGAWLEALDLCRYKDSFAAAGYG SLEAVAEMTAQDLVSLGISLAEHREALLSGISALQARVLQLQQ GVQV	1
EIGPLSR	2
FSQIHSILSKMVQDPEPPK	3
HEGQLVAGQLMGLLPGLASAMK	4
LEGVVTR	5
SPLVLR	6

10

20

30

【 図 1 - 1 】

【 図 1 - 2 】

OGTA298 (配列番号 1)

ペプチド供給源: iTRAQ 結腸直腸癌

METCAGPHPLBLICRMOLCLALLGPWRRGG

PIRTYQCVNLEONQNNLWPGWISRQRQ LVEFLETLRDCSSIPGAETCTKENNFWVLYTELEAD
RGRPLSPRSKPTIADTAEDESTQGCLERMLNTKEVEIGLQHRLAQDVGAVLVSRYV
YKQCARTVGLATPAATAEASFSLTVEWAGTCVHSAGEPGRSPPHRMCGADEWL
ERDFCCEAPCKVYSPVRPLCEPSHEAHLSENASTNEAFCVQDSYARSPDTPSASC
LSYLSPRILIAVPLADPSGGSRDVYTSLLCERGCPAGCEPCPGRVFLARERAPATL
LRGPYRTRVLAALWNGSPAAAAGTYAVTSTCPGWPGEWEDEIRVREPOVPSLWSRREPIT
GANEDEYTYLHVEQSYASMVTKATPTVNLKPATRVPYFQIRAGPMSGEASNPSTEVOTL
GEASGSRDOQSPVATVTTISALLVLSVGSMSLAIWRPRCSYGGDHADEELEYFHVKUTPR
DPGSCQGDLQAHVIAFEKDALSVLTERSLLGGRPFELCCGGGLPGRQNLVVAHMRSADSOSQLR
FLAEALTQGQFDHSWHLBLLVVEGTGTMSTIMTEYMSHQAUGDFLRL
YLSMEEVYHRLANHLLVSSDLSVKLSSGFRGRDRSEAVYTMSGRSLPAWAPEPFGHFSSA
WPSGFIIMEWMAFGERPYMDQKVADWFGRPLPERNCNLHLLMRCLQKDQPKPERP
SILSMAOPPEPPCALTHPLPFLADEFRASTPSFGSVGSAWLEALDLCRYKUDSFASAAYGGSLEA
MTADMQLSGLIWHARRHEALLSIGALRQLOGGQV

實驗マウチネブチド

FSQIHSILSKMVQDPEPPK [3]
HEGQLVAGQLMGLLPGLASAMK [
LEGVTR [5]
SPLVLR [6]
~~LEGVTR~~
FSQIHSILSKMVQDPEPPK [3]
HEGQLVAGQLMGLLPGLASAMK [

第二編 計算方法

METCAGPHPLRLFLCRMOLLLAAGWGRPGTAEEVILDSKASQARELGTWATLPNSNGWEISVGDEHDP
PIRTYCVNVLNPQDNLWQTGWSIRGQRORI FVEPQLTQLRPTVPGAACTKETFNNVYLTLEADLG
RGRPLGLRSRRPLKDTIAADESFQDGLERMLKMLNTEVTPGIP1-SRGRLPQDFQVGDVALVSVRY
QKRCRATVGRALATEVPAASAFSTLVEGATCVASeGESEPGSPPMHCAGDSEWLWVPGRCSCSAGOF
ERFGDCAPCAGPEVYKSPERLPCSPCEHNEALENSTAEFCVQDOSYARSTPDSPLCATSRPQBDLQ
YSLRS **SPVPLHL**LWPADSGRRSDTVYLLCRLCGRGEGFAPACCEPGCPVRFLPQAGLRLERAATTLLH
TTRVPRYTAALANGVSFGRAAAGTTAVYOTVSTGPGAWECEGIRDRVDEPOVLSWLRPTVPGAP
GANEOTYERLYKEPSQASYMKVTPATVTVNHLKPATRVFIRRAA5GWSMEOAEEVYIYFVQ
GEAASGSQSPASVTVTIVSALLVGSVMSLVAI RPTRCSYCKGGDADDEEYLFHVPTTRFL
DPOSCGLDQAVAFKDLASLERSLGGRCFRELLGCGLQFLPGRQEVLLAHVWMLRSDASDORIG
FLAELITQZFDHSIHVRLGVGTPTGSTMTEVYEMSHAGLDGPRLRHEGQVLAQGMLLGLPLGASMA
YLSMEYVGVRHLAAGPQYPMMSQDVKIAVEFDGLRPPCRNCN1LWVLCBZLQCDWQRDPRFSQH
WSFGIIMWEMFAFQGYPMMSQDVKIAVEFDGLRPPCRNCN1LWVLCBZLQCDWQRDPRFSQH
SILSKWMDQPEPPKALTCRPPTRFLADEFRSTPFSFGSVCAWLEAIDLCLCYRKSDDAAAGGSLEAVA
ETMQLDWSLISLGEAATTCRPLLSLQALQVWLLQCGQVQV

質量マッチペアチキ SPLVR [6]
ダンシングペアチキ SPLVR [6]

【図2-1】

【 図 2 - 2 】

Figure 2

1 ggctccgggg ttatggggca ttgttcacgg ggctttcaatgg ggcggcggtt gagccggcc
 61 cggactgaca ctggctttctg cggggatccatgg agaaacctcgcc cgggtttcacac
 cggccgtcc
 121 ttatccatctg cggatgttcgg ctctgtttcg ctgttgttttttggggatccatgg
 cggccgtcc
 181 ccggccggaa atgttatccgtt ctggattccaa aagcttccca ggcggcqatgtc
 ggcttgatgtc
 241 cactggccaa tatatccgtt gagaatggca ggcggatgtca tggaaacacgg
 cgccatccatc
 301 qcacatccaa atgttgtccat ttgtccgggg ccaaccaggaa caactggctg
 cagatccatc
 361 ggataatccg tggccggggg cagccgtcatct tcgttgaaact gcaatgttccaa
 ctccgtccatc
 421 cgacggatcat ccctggggcc ggcggatccat gcaaggagac ctccaaatcc
 tactatccgtt
 481 aaacctgggg cggacttggc ctgtggccgtt cccggatctt cggccggccg
 ccccggaaaa
 541 togaatccat gggccggatcc gggatcttcc gggccggggaa ctgggggtttag
 cgccatcc
 601 agcttgcacaa agggatgtcc gggatgtcc ggcggccatcc
 cgggggttcc
 661 ttccatggactt gggccatccat ttgtgggttttccgggttccg cgttactatc
 aaggatccatc
 721 qcggccatccgtt gggggggctgg gccacgtttcc gggccatccgtt
 ggccatcc
 781 castgttggg atgtggccggaa acgttgcgttcc cggactccgg aggggggatc
 ggccatcc
 841 cggatgtccatccgttggccggcc gggccggatgt ggttggatcc ttgtggccgc
 tgcggatccatc
 901 qcggccggatccgttggccggcc ttgtccatccgtt gggccatccgtt
 tttccatccgg
 961 tggcccccgg gggcccccctt ttgtccatccgtt gggccatccgtt
 ctggatcc
 1021 ctccatccatctt ctggatgtcc cggggatccat atgggggttcc accccaccatc
 ccggccatcc
 1081 ttcttcgtccatccgttggccggcc tggggccgttcc gggccatccgtt
 atggccgtcc
 1141 ctgtgtgtgtc gggactgtcc ttgtggccggcc cggccggactt gggaggccgg
 tcggatcc
 1201 ctactatgtc gtgtgtgtcc ctggccggcc gggaggccgg gggccggcc
 tgcggatcc
 1261 ggccggccggcc tggggccgttcc ctggccggcc gggccatccgtt
 ggccatcc
 1321 ttgtccatccgttggccggcc gggccatccgtt gggccgttcc gggccggcc
 acggccgtcc
 1381 cggccggccgg gggccggccgg gggccatccgtt acggccgttcc
 acggccgtcc
 1441 ggccggccggcc gggggggatccat gggccatccgtt
 ggggccatcc
 1501 ttgtgtgtgtcc gggaggccatcc tttttccgttcc gggccatcc
 gttccatcc
 1561 tccgtatccatccgttggccggcc gggccatccgtt
 acggccgtcc
 1621 ccacatccatccgttccatccgttccatccgtt
 atccgttcc
 1681 ttccatccgttccatccgttccatccgttccatccgtt
 gttccatcc
 1741 tgggggggggg tggccatccgggg tcccaaggccat gggccatcc
 acggccgtcc
 1801 scatccatccgttccatccgttccatccgttccatccgtt
 ttggggatcc
 1861 ctatccatccgttccatccgttccatccgttccatccgtt
 ttggggatcc

ヘラチト供給源: iTRAQ 非小細胞肺癌

METCAGPHPLRLFLCRMQLCLALLLGWPWRPGTAE
PIRTYQVCNVLEPNQDNWLQTGWI3RGRGORIFV

RGRPLRGSGSPK1DIAESDFGTQHMRKLNTVEIRPGL1SLRSGHLFIAFDQVAVLVSVRV
QYKCRATRVLATPAATAESASPTLVEAVGTCVHSEGPSCPGSPPHRCGHDGENDLVPVGRCSQAGF
ERDFGDCPQHGGPKYVPSRPLCPSCBFSRALLENAESTFCVQDOSYARSPTDPPSACSTRPESPABDIO
YSLSRSPVLRWLPUDASGSWUVTYLLRLCRRGPGACAEPCGPVRWFLPQLCRAEATLH
LRPGCATYRVHALGVNGPSWAAACTTAYOVTWSTGPGPWEIGEIRRURVEPQSLSWREPIYAPAG
GANDTEYIERYKMGPSKQSYAWMVKTAGPTVTVNLLKATPVAFYRPEAQSWSGEWAESIEVQTL
GEAASGSRQDQSPAVIUTVTISLALLVGSVSLAIWHRPCSYGKGGGDHADESELYHFKVPTIRRL
DPQSGCDLQWALHJAKEDLAVSLRSLLGGRPFGLCUCGLPQRGEELVWAVHMLRSDASDSSQRLG
FLAELATGQDFHSNHV1LEVGQTRGSTLMITYEMYSHAGLDFGHRHEQQLVQAGLMLGFLGASMA
YLSEMGGYHGRHLARHVLUSSLDVCK1S6GGRGPDRSEAVYTMNSGRSLPALAAPEPTLQGHFFSSAD
WTSFGICWEMWVMAFPGRYVPSQDQKUVIAWEGDFLRPPTVNCNLLHRIIMLQCDWKDQRFBPRPSQH
XKQHNSWQDCEPFRCALTTTPTLALARSAFPTSFSGSVGAWEALDLRYKDSCFAAAGYGSLEAVA
EMTAQDVLSLISLIGAHEREALLSG1SALQARVLIQOGGQV

スルベニア
SPLVLR [6]

ペプチド供給源: iTRAQ 小細胞肺癌

METCAGPHPLRPLFCRQLMQLLALLGPRPGRGTAEVILSOKDPAHMLTAPNSWEEISUGWDHEDR
PIRTYVCONVLNEQNONLWTGMSIRGRORFVFLQELTFLRCDSSTPAGACTCTKFWNVYTHELEADTG
RGRPLRSGRSPKRDTIILADETSFGDRLERKOMLNTVEW**EZQH**LBHRGFHLAQAVGCAVLSVRVY
KQYCRATVRTRCLATPAATAEFSSTFVEWAGTCAVESEGFSPFRMHCGADGEWLVPGRCSCSAGQF
ERBGFCACPFOPFYKVSPRPLCSPRSERKSRALNASTFCVCQSDSTARSTPSASCTRPLPQVPPAQLDQ
YSLSNPLWVLLRMLPDPDGGRSUDTIVSLLCRLCRGREGFAFPCGRVRAEPLRQGLRERAATLH
LRGCRVYTVBVAEGLSFGSAAAAGTYTPTVSTGPGWAECEIRRORVQPSVLSWRLPPIVAPAGA
GANDETYIEIRYRGSQASWYMRGPAFTVITNKLKATRPIVFOIRASGPWSWEAQSFNSPEVQTL
GEAAGSSDOSPAVUTVTITLAVLNLGVSGVSVLAIANRPTRCRSYKGDDGAHDEEYLPHVTPKTRTFL
DPGSCQDLQWAVHAFAKEDLAOSVLTSLRGGRFLGCCLCCGKJLQPGRLPQEVLAHVMHLDLRSADDQSRLG
FLAELATLQDGHSHTEVUGVTRGSTIMTIVTEYMSHGLDFLGRLRHEQGLVQAGLMLGLPCLASAM
WLSMCGYVHGRHLAARVHLVSSLDDLUCKVSGCGRPDRSEAVYTTMGSRSPLAWPAETPJLQFGHFSASSD
V11SEMGYV11MEWAPEGRYVWV11LSSD11V11C11SGCGRPDRSEAVYTTMGSRSPLAWPAETPJLQFGHFSASSD
SILSKMVOFPDPEKCALTCRPPTRFLADRASTFSFGSGVWALEA0L0CYKDSFAAAGGSLEAVA
EMTADQV11SLS11G11SH11TCRPPTRFLADRASTFSFGSGVWALEA0L0CYKDSFAAAGGSLEAVA

費盤マッサヘブチ
EIGPLSR [2]
タシテムバクチ
EIGPLSR [2]

【図 2 - 2】

【 2 - 3 】

3721 agacccatcg acttcaggate tggtttctgtt gccccctcgc ctgggtgtca
cgtttaaaagg 3781 tgaggccaaa agttccgtggcc aggccggccg atqagaggcc ctgtgtgtcc
ctggggccccc 3841 attagggccat cttgtgtttttt ccattttttt actatgtggg cagaatcc
ggaaaaaaacta 3901 ttatggggaa ttaaaggccca tgttatccccc ccaggagccc aagatccgtt ctccatccgg
atgggggggg 3961 tgaaaggagc acttagaaat gggcttccccc ttccatccaa cggctgttttt
ccccccatgt 4021 acatgtggg gaaaccttggg ccataatgggg agtcaggaggc agactgggg
tcgggggggg 4081 atccaggggg aaggctggct ctgggggggg agtccttggt ctccgttcat
ggacccaaa 4141 ctccctccatc caaccctttgg ggacttttgcg gggccatccc tccatccgg
ctccgtgtcc 4201 tggggccatc acacccgggggg atggccccc ttccctgtttt gacttttt
agccatccaaa 4261 aatgggtttt tgcttgatcc accgttttttcc ttccatccaa ccggggccccc
ccggatgttt 4321 gggccatcc atgcacggc ttccatgggg tggccgggg agtcgttgtt
cttcgggggg 4381 ccacggac tgtagttttttt tgccggccccc gtacactttt tgctgttgc
tttgcgttttt 4441 ttgtttttttt tggtttttttt cggggaaaag gagacaaatgg tttaatggaa
aaatggccaaa 4501 ccggccatcc ttccatccggggccatc cgggggggggg ctttttttttt
caatgggggg 4561 ttccatccggg ccatccatccg tttccatccggggccatccgggg
cgttttttttt 4621 ttgtttttttt ggggggggggg gggccatcc ttatgtttttt agtttttttt
taatggatcc 4681 agggccatcc aggtttttttt ggggggggggg tttttttttttt
tttttttttttt 4741 ccggatggcc agggccatccgaa cttttttttttt agtttttttttt
gaggggggggg 4801 ccggatggcc agggccatccgaa cttttttttttt agtttttttttt
gaggggggggg 4861 ccggatggcc agggccatccgaa cttttttttttt agtttttttttt
gaggggggggg 4921 ccggatggcc agggccatccgaa cttttttttttt agtttttttttt
gaggggggggg 4981 ccggatggcc agggccatccgaa cttttttttttt agtttttttttt
tttttttttttt 5041 ccggatggcc atccggccccc ccacccatccg tttccatccgggg
ttccatccgggg 5101 tggtttttttt tgccatccatccatccggggccatccggggccatccgggg
ggccatccgggg 5161 ttccatccggggccatccggggccatccggggccatccggggccatccgggg
ggccatccgggg 5221 ttccatccggggccatccggggccatccggggccatccggggccatccgggg
ggccatccgggg 5281 agggccatccg cttccatccggggccatccggggccatccggggccatccgggg
ctccatccgggg 5341 ttatggggaa ttatggggaa ttatggggaa ttatggggaa
ttatggggaa 5361 tggtttttttt tgccatccggggccatccggggccatccggggccatccgggg
ttatggggaa ttatggggaa ttatggggaa ttatggggaa ttatggggaa ttatggggaa
ttatggggaa 5521 aaaaaaa

【手続補正書】

【提出日】平成22年12月22日(2010.12.22)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】 0 1 6 9

【補正方法】変更

【補正の内容】

【 0 1 6 9 】

エフリンA型受容体10は、例えば、ヘモフィルス・インフルエンザBからのタンパク質Dとして知られる表在性タンパク質、NS1などのインフルエンザウイルスからの非構造タンパク質、B型肝炎からのS抗原、又はそのC末端などのLYTA(配列番号8)として公知のタンパク質などの異種融合パートナーと融合させることができる。

【手続補正2】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】全図

【補正方法】変更

【補正の内容】

【 図 1 - 1 】

【 図 1 - 2 】

1

OGTA298 (配列番号 1)

ペプチド供給源: iTRAQ 結腸直腸癌

實驗マサチネプチ

FSQIHSILSKMVQDPEPPK [3]
HEQLVLVAGQLMGLLPGLASAMK [4]
LEGVVTR [5]
SPLVLR [6]
~~LEGVVTR~~
FSQIHSILSKMVQDPEPPK [3]
HEQLVLVAGQLMGLLPGLASAMK [4]
LEGVVTR [5]
SPLVLR [6]

ペプチド供給源: iTRAQ 腎癌

METCAGPHPLRLFLCRMQLCALLLILGPWRPGTEAEEVILLDKSASQELGWTLAPSNNWEIEGVDEHHR
PIRTYCVNQCNLEPQDNQNLWITGWSRGRQI FVEFLQFTLDRQDLSQPAAGACTKETFNNVYLYTEEDLG
RRGRPLGSRRFRKIDTIAADESTQCGDLERMKMLNTEVEREIGPLSRRGHQFHDQFVGAVLAVSRVSY
YKRCRQTRVGLATFPATAAEASFVTLVEAGTCVANTSEHEGSPRPMHCAGDWEVLPVGCRCSAQG
DFECCEAPCPGPKYVSPRPLLCSPCPKHESELALENASTFCVQDOSYARSTPDPASCTRPSPADRLQ
YSLRSR **SPFLVLR** LPLPADSGRSDVTSYLICLRCRGCPAGPACCEPCGPVAFRLAQGRLEPRAATLLH
LRGARYTVTAALNGVSPGAAATGGATTYVTPSTGSPWAGEEICRDRDVEPSQVSLSWREPIPAGAP
GANOTTYEERKQSYEQASMSYKTMGPTVTVNLKPATRYVQFIRQAASPGP3WEAQNSFPNIEVQTL
GEAASGSDSPQPAVITVHTVITISALIVLGSVMSLAIWTRPRCYSKGCDGHHADEEYLFHVKPTTRFL
DQSCDQDQIQLAWHFAKEALDKSUTLERLGGRCRGLGCCLQGLPQRRLGQHMLRHSADSQQRL
FLAELICQDQPHISHRVELEGVRGTRSTMITLEYEMSHSGLADLGRHLERHQVLAQCOLMGLPGLASMA
YLSMVEGMYHVRGLAHVLSLSDVLCK1SGFCGRDRSEAVYTTTMSGRSPALWAPEJTLQFGHFSASSD
WFSGJIMIEMEVMARFPERYWPDMQDOKVIAEWFEDGRPLPPRNCLHRLMLDCKWDQDEGRPRFSQH
SILSKVMDPPEPKMCALTTCRPPTRPLTDARAFSTPSFGSGVWLAELDLCRYKDSSAAGYGSLEAVA
ENTAQDADLHREALLSISLQAIQWVLLQQGQVOV

質量マシチベブチ
SPLVLR [6]

スルバチド

【 図 2 - 1 】

図 2 - 2】

ペプチド供給源: iTRAQ 非小細胞肺癌

METCAGPHPLRLFLCRMQLCLALLLGWPWRPGTAE

PRTIQCNVLEPQNPQWUHJWGIWSRQHQLFVEPFLTQRCS3PPIGAAGTCRKTENVYATELED
PRTRPLGKSPRSLKDTIADESTQDGLERLNRQHNTVEPTEIRGLSPLHAFQDVGACVALUSVRY
QKRCATVWGRLATPAAEASFSVLTVEAGTCVSEAGSPEPSFRMHDGEWLPVGRCSASCQF
ERDPCFACPGVFKPSRPRCPCEHSELAESTNCFVQCDSYARSTPDSPLSACRTPAQD
YLSRL**SPVLP**WALMPLGSDSSRCPCEHSELAESTNCFVQCDSYARSTPDSPLSACRTPAQD
LRGARYTVRALWALANGVSQPRRASADTYVSLICLRGREGPAGAPWEGEEIRRDRVQPSVLSWREPIAGA
GANETEYRQYKQVSEVTTISALVPLATRVYQVTPSTGPMWEGEEIRRDRVQPSVLSWREPIAGA
GEA55GSQSPQAIVVQVSEVTTISALVPLATRVYQVTPSTGPMWEGEEIRRDRVQPSVLSWREPIAGA
DPOCSDLQWHPHFAKELDALKSLETSRGGFREGLCCGGLQPLGCRQELVAVHNLRRSDASDORLQ
FLAIAITQDFPHNSHLRVEGVYPTGRTSMTIEMVYSHMAGLDFRLRHEGOLQAGMLQGLPLGASAM
VWSMFCVYHMLRHLVVSDDQSKVQFSGRGRPDRSEAVYVPLRHSRSPALRAAEPETLQFGHFSSAD
VWSMFCVYHMLRHLVVSDDQSKVQFSGRGRPDRSEAVYVPLRHSRSPALRAAEPETLQFGHFSSAD
SILSMVQKOPPELCTTCAHBLASTPFSFGSVGCAALEADLCRKYKDSFAAAGYGSLEAVA
EMTADLPSLISLCAHBLASTPFSFGSVGCAALEADLCRKYKDSFAAAGYGSLEAVA
SILSMVQKOPPELCTTCAHBLASTPFSFGSVGCAALEADLCRKYKDSFAAAGYGSLEAVA

賀新郎・マツチベブチト

SPLVLR [6]

システムペプチド
SBLWIR [6]

SPLVLR [6]

ペプチド供給源: iTRAQ 小細胞肺癌

METCAGHGRHLPLFCMCLLMLLGLPQVTPAETTCAASQKSAEQLWALPNSGNSWIEGUDV
PRIVYCNENPDNQDNUWTGTSRGRQFVLFQTLRSDSSPQGAECTKETNVLVEATEDLG
RGRPLGGSRKRPMFADTSEFDQGILKRNKVEPTVQDLSRQHNGRHRFLAQDFGAVLWSV
YQKCATRVRGLATFATAESEASVTAEVGCAVSCEASGPSPRHMGCHEJNLVPVGRCSQSAG
ERFGDCACCEACPFGVSKPRSLCPSEBENLARSENFCVQSYRSVTPDPASRCLPRTQDQ
YLSLSPRLRHLRMLWLPAQDGDSRQDUTVSYLLCRQGAGCPCPGSRVPLAQRQJLRRP
LRQGARYTRVVAALNGQVSAAMGTYVTTGSKRHTVQFQVPSLWSRPEVQGAPL
FOADEVRYEVEVNGQVSAAMGTYVTTGSKRHTVQFQVPSLWSRPEVQGAPL
GEASGSRQDOSPAIVVUTVTISALLVJLGSVMSULAINNRPCSYKGDDAHDEEEIHFHKVPTRNTFL
DPQSCGDLQVAMHFAKELOAKSVLTERSLGGRCRFLGCCGJLQPLGRQSVLWVHMLRHDASDQLRG
FLAELTQGQDFHSHTIRVLEGVTGSTMIYETVEMSHSAGLDGFREHQLGQVAGLQMLGFLGASMA
YLSMEGVYHGRLAHLVWVLSLSDVCKU1SGFGRQDPMRQFSEAYTTMMSGRSPALAAPEPTQGHRFFSAD
WFSUJGIIWEMVMAFGERPYWMSQDQVYVATMEADGRLPDRPNCNRLHMLQKQDQPKGFRPQSQH
SILSKWNSQDPEPPCALTCPTPRTFLRAFSTPFSFGSVGWAFLAEDLCRYKDSFAAAGYGSLEAVA
EMTAQDVLISL1GAEHREALLSQIISLARQW1LQLOQQGVQ

費量マッチペプチド

EIGPLSR [2]

EIGPLSR [2]

218200 (E)

【 図 2 - 1 】

【図2-2】

【図 2 - 3】

```

3721 agagccctag actcaggatc tggtttctgt gtccccctgc cttyggctga
cagttcaggaa
3781 tgaggccaaa agtcctggcc aggcggggcc atgagaggcc ctgggtctcc
ctggggccccc
3841 atgaggccct cgtgtgcatt ctttttatga acttagtgcc caggacatct
ggaaaaaaaga
3901 taaaggccca tggttatctcc ccaggagccca aagagctttt ctctccagcc
atggggaggg
3961 tgaagaggag actcaggatc gggctcttc tc当地aaacag ctgtgtctaa
cccccaatgt
4021 acaatgggg gaaactgggg ccaatgtgagg agtcaggagc agagctgagg
tcagaaaccca
4081 atccagggt aaggctggct ctggggagag agtccttggt cctggccat
gacaccacca
4141 ctccctgtta cagcccttgg ggactctaga ggcgactccc ctccaggcc
ctccgtgtct
4201 tggcactac ccaggcttcc atggagccca ctccgtctct gactttgaag
agccctggca
4261 qaatgggtt tgctgagcc accgtgggt tccctatcca caagggccccc
cgggaaatgt
4321 gggcccaatgtccagc ttccgttaggg tggcaggaaad gcagctggat
ctcagcagg
4381 ccacaggac tgatgtttt taggcccgtt gtgacacttg tctgtctgc
ttggctgtgt
4441 gtgggtgggg tggatgggg cggggaaagag gagacaaagag taaatgtaa
aaaagacaca
4501 cagccctggcc ttgggggct cagactagac caggagaaga gctcaatgtac
caagaatgtaa
4561 ttccaggca cc当地ccacag tgccctggc ccccccaggag ctccctgggt
cagtggtag
4621 gtgggtctggaa gggggagata gccatctct taatgtgtga agttgagat
taatgtgtac
4681 aggcccttc aggtggggaa gggaaatgtc ttcccttggg gtgggtggag
tttccgcag
4741 gcaatgtggc aggcctcgga caaaaggatg ccatggagag aggtatgtat
gagaaaaaaaga
4801 ccagaggccgaa ggggtgcag tgcccttttgc cagagcaccc aggggtgggg
gacatgtact
4861 ccacaggatc ctccctggctt taccctgcca gcaatgttcc ecctgtctt
ggaaatcc
4921 ccacggccccc tgccctccctg tccctgtac acctggccca gctcaatgtac
tctgggggtt
4981 ctggggagac caaatgttg ctccatccat agtcaatgggtt gggggagccccc
ccggcccaatgt
5041 gcccctccagg atccctcccttcc cccatccctc ctggggagcc tggaccagca
tcccttctgt
5101 ggtggatgttgc gcccgttccatccatc cccatccatc attccatgtca
ggccaaatgt
5161 tccctcccttcc cccatccatc tttccatgttgc cccatccatc gctgtgtgg
caggacttcg
5221 gtggccaggat tagatccatccatc cccatccatc ggtgtggatcc cccatccatc
gttgggtcc
5281 aggcctccagg ctccatccatc tttccatgttgc ggtgtggatcc cccatccatc
cctctacaga
5341 tttatattttatgttgc cccatccatc tttccatgttgc ggtgtggatcc cccatccatc
ccattacccat
5401 ggtctcgatccatccatc cccatccatc tttccatgttgc ggtgtggatcc cccatccatc
tggagatgtt
5461 tttatattttatgttgc cccatccatc tttccatgttgc ggtgtggatcc cccatccatc
aaaaaaaaaa
5521 aaaaaaa (配列番号7)

```

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2011509079000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2008/003634

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/28 G01N33/574 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K C12Q G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, EMBASE, BIOSIS, WPI Data, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>FOX B P ET AL: "Invasiveness of breast carcinoma cells and transcript profile: Eph receptors and ephrin ligands as molecular markers of potential diagnostic and prognostic application" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, vol. 318, no. 4, 11 June 2004 (2004-06-11), pages 882-892, XP004508521 ISSN: 0006-291X the whole document</p> <p>-----</p> <p>-/-</p>	<p>2-13, 23-25, 35-40, 43,44, 47, 52-54, 57-64, 66,70, 71,79</p>

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

7 July 2009

16/07/2009

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5818 Patenlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bumb, Peter

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/IB2008/003634

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>FOX B P ET AL: "Potential clinical relevance of Eph receptors and ephrin ligands expressed in prostate carcinoma cell lines" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, vol. 342, no. 4, 21 April 2006 (2006-04-21), pages 1263-1272, XP024923612 ISSN: 0006-291X [retrieved on 2006-04-21] the whole document</p> <p>-----</p>	2-13, 23-25, 35-40, 43,44, 47, 52-54, 57-64, 66,70, 71,79
X	<p>AASHEIM H C ET AL: "Characterization of a novel Eph receptor tyrosine kinase, EphA10, expressed in testis" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA - GENERAL SUBJECTS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, NL, vol. 1723, no. 1-3, 25 May 2005 (2005-05-25), pages 1-7, XP004910578 ISSN: 0304-4165 the whole document</p> <p>-----</p>	2-13, 23-25, 35-40, 43,44, 47,52-54
X	<p>APARICIO ANA ET AL: "Review of the clinical experience with 5-azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine in solid tumors" CURRENT OPINION IN INVESTIGATIONAL DRUGS, PHARMAPRESS, US, vol. 3, no. 4, 1 April 2002 (2002-04-01), pages 627-633, XP009110545 ISSN: 1472-4472 table 2</p> <p>-----</p>	38-42
T	<p>KIEWLICH DAVID ET AL: "Anti-EphA2 antibodies decrease EphA2 protein levels in murine CT26 colorectal and human MDA-231 breast tumors but do not inhibit tumor growth." NEOPLASIA (NEW YORK, N.Y.) JAN 2006, vol. 8, no. 1, January 2006 (2006-01), pages 18-30, XP002535474 ISSN: 1476-5586 the whole document</p> <p>-----</p>	1-18, 22-34, 41,42, 46-51
T	<p>WU DAN ET AL: "Prognostic value of EphA2 and EphrinA-1 in squamous cell cervical carcinoma." GYNECOLOGIC ONCOLOGY AUG 2004, vol. 94, no. 2, August 2004 (2004-08), pages 312-319, XP002535475 ISSN: 0090-8258 the whole document</p> <p>-----</p>	57-79
		-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/IB2008/003634

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*		Relevant to claim No.
A	<p>LANDEN C N ET AL: "EPHA2 AS A TARGET FOR OVARIAN CANCER THERAPY" EXPERT OPINION ON THERAPEUTIC TARGETS, ASHLEY PUBLICATIONS, LONDON, GB, vol. 9, no. 6, 1 December 2005 (2005-12-01), pages 1179-1187, XP008072982 ISSN: 1472-8222 paragraph [0004]</p> <p>-----</p>	1-18, 22-51
A	<p>WO 2007/030642 A (MEDIIMMUNE INC [US]; SEATTLE GENETICS INC [US]; KINCH MICHAEL S [US]; W) 15 March 2007 (2007-03-15) examples 10-12</p> <p>-----</p>	2-18, 22-28, 80,81
A	<p>HATANO MANABU ET AL: "Vaccination with EphA2-derived T cell-epitopes promotes immunity against both EphA2-expressing and EphA2-negative tumors" JOURNAL OF TRANSLATIONAL MEDICINE, BIOMED CENTRAL, LONDON, GB, vol. 2, no. 1, 24 November 2004 (2004-11-24), page 40, XP021018960 ISSN: 1479-5876 the whole document</p> <p>-----</p>	19-21, 52-56
A	<p>ABRAHAM SHAJI ET AL: "Expression of EphA2 and Ephrin A-1 in carcinoma of the urinary bladder." CLINICAL CANCER RESEARCH : AN OFFICIAL JOURNAL OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH 15 JAN 2006, vol. 12, no. 2, 15 January 2006 (2006-01-15), pages 353-360, XP002535476 ISSN: 1078-0432 the whole document</p> <p>-----</p>	26-28, 46,47, 57-79
P,X	<p>WO 2008/066498 A (AGENCY SCIENCE TECH & RES [SG]; ULLRICH AXEL [DE]; RUHE JENS [SG]; HAR) 5 June 2008 (2008-06-05)</p> <p>-----</p> <p>paragraphs [0204], [0257] claims 57,61,65,70</p> <p>-----</p>	2-7,9, 12,13, 23-27, 29-32, 35-40, 43,44, 46-49, 52-54, 57-72

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/IB2008/003634
--

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 2007030642	A 15-03-2007	AU 2006287416	A1	15-03-2007
		CA 2621502	A1	15-03-2007
		EP 1928912	A2	11-06-2008
		JP 2009506790	T	19-02-2009
		KR 20080080482	A	04-09-2008
WO 2008066498	A 05-06-2008	NONE		

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C 0 8 4
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 C 0 8 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 1	4 C 0 8 6
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 T	4 H 0 4 5
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
A 6 1 K 49/00 (2006.01)	A 6 1 K 49/00 A	
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	G 0 1 N 33/574 A	
G 0 1 N 33/577 (2006.01)	G 0 1 N 33/577 B	
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/50 Z	
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/15 Z	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,NO,PL,PT,RO,SE,SI,SK,T
R),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,
BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,D0,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,K
G,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT
,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 アラスダイル スタムプス

英国 オーエックス14 4アールワイ オクオン オクフォルドシレ アビングドン 86 ミ
ルトン パルク トヘ フォルム オックスフォード ビオトヘラペウトイクス エルティーディ
ー。

F ターム(参考) 2G045 AA26 BB22 CA26 CB01 CB02 CB03 CB07 CB17 CB26 DA14
DA36 DA78 FB01 FB02 FB03 FB07 FB08 FB12 FB14 FB16
GC15
4B024 AA01 AA12 BA53 BA63 CA04 DA02 EA04 FA02 GA11 HA11
4B063 QA07 QA18 QA19 QQ08 QQ13 QR33 QR59 QR80 QS05 QS36
QX07
4B064 AG27 CA19 CC24 DA01 DA14
4B065 AA01X AA57X AA90X AA90Y AB01 BA01 CA24 CA25 CA44 CA46
4C084 AA02 AA03 AA13 AA17 AA19 BA44 CA18 DC50 MA01 NA14
ZB091 ZB262
4C085 AA14 BB11 CC23 EE01 GG02 GG03 GG04 GG05 GG06 GG08
GG10 HH01 HH03 KA26 KB92 LL18
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA02 MA04 MA05 NA14 ZB26
4H045 AA11 AA30 BA10 CA41 DA50 DA76 DA86 EA28 EA50 FA74