

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6312700号  
(P6312700)

(45) 発行日 平成30年4月18日 (2018. 4. 18)

(24) 登録日 平成30年3月30日 (2018. 3. 30)

(51) Int. Cl.

F I

G O 1 N 33/68 (2006. 01)

G O 1 N 33/68 Z N A

G O 1 N 33/53 (2006. 01)

G O 1 N 33/53 D

C 1 2 Q 1/02 (2006. 01)

C 1 2 Q 1/02

A 6 1 K 45/00 (2006. 01)

A 6 1 K 45/00

A 6 1 P 15/00 (2006. 01)

A 6 1 P 15/00

請求項の数 4 (全 42 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-548368 (P2015-548368)  
 (86) (22) 出願日 平成25年12月11日 (2013. 12. 11)  
 (65) 公表番号 特表2016-508219 (P2016-508219A)  
 (43) 公表日 平成28年3月17日 (2016. 3. 17)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2013/076179  
 (87) 国際公開番号 W02014/095508  
 (87) 国際公開日 平成26年6月26日 (2014. 6. 26)  
 審査請求日 平成28年12月8日 (2016. 12. 8)  
 (31) 優先権主張番号 12198437.1  
 (32) 優先日 平成24年12月20日 (2012. 12. 20)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)  
 (31) 優先権主張番号 61/739, 812  
 (32) 優先日 平成24年12月20日 (2012. 12. 20)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 508178490  
 アトラス・アンティボディー・アクチボ  
 ラゲット  
 Atlas Antibodies AB  
 スウェーデン、エスエー・106 91ス  
 トックホルム、アルバナヴァ・ユニヴェル  
 シテーツセントルム  
 (74) 代理人 100081422  
 弁理士 田中 光雄  
 (74) 代理人 100084146  
 弁理士 山崎 宏  
 (74) 代理人 100122301  
 弁理士 富田 憲史

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 膀胱癌中のPODXL

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

膀胱癌の予後マーカーとしてのPODXLタンパク質のex vivo使用。

【請求項 2】

PODXLタンパク質と選択的に相互作用することができる親和性リガンドの膀胱癌予後診断物質としてのex vivo使用であって、該親和性リガンドが、抗体、またはFab断片、Fv断片、および1本鎖Fv (scFv)断片からなる群から選ばれる抗体断片である、使用。

【請求項 3】

該親和性リガンドが、配列番号1のアミノ酸配列からなるペプチドと選択的に相互作用することができる、請求項2記載の使用。

【請求項 4】

該親和性リガンドが、配列番号8、13、または14のアミノ酸配列からなるペプチドと選択的に相互作用することができる、請求項2記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は、膀胱癌の分野、特に、その予後と治療に関する。さらに、本開示は、予後の確定または治療予測に有用な手段に関する。

【背景技術】

【0002】

## 癌

癌は、最も一般的な疾患の1つであり、西洋諸国における死亡の主要原因である。一般に、発生率はほとんどの形の癌で年齢とともに増加する。一般健康状態の増進によりヒト個体群は長生きし続けているので、癌は個体数の増加に悪影響を及ぼしうる。環境因子(食事、喫煙、UV照射など)や遺伝因子(「癌遺伝子」の生殖細胞系突然変異、例えばp53、APC、BRCA1、XPなど)と癌の発現リスクを関連付ける知識体系は増加しているが最も一般的な癌種の原因はまだ多くが不明である。

### 【0003】

癌は、実質的に細胞疾患であり、正味の細胞増殖と反社会的挙動を伴う形質転換細胞ポピュレーションと定義されているが、癌の定義は、細胞生物学的観点から全く満足いくものではない。悪性形質転換は、不可逆的遺伝子変化に基づく悪性表現型への遷移を表す。正式に証明されていないが、悪性形質転換が1個の細胞で生じ、次いで発現する腫瘍はそれに由来すると考えられる(「癌のクローン性」定説)。発癌は、癌が発生するプロセスであり、一般的に、最終的に悪性腫瘍の増殖をもたらす複数の事象を含むと認められている。この多段階プロセスには、種々の律速段階、例えば突然変異の付加と、おそらく前癌増殖期後に癌の形成をもたらすエピジェネティックな事象が含まれる。段階的变化は、細胞分裂、非社会的挙動、および細胞死を決定する不可欠な調節経路のエラー(突然変異)の蓄積を含む。これらの変化はそれぞれ、周囲細胞と比較して選択的ダーウィンの増殖優位性をもたらし、腫瘍細胞ポピュレーションの正味の増殖をもたらすかもしれない。悪性腫瘍は、かならずしも形質転換腫瘍細胞それ自身だけでなく支持基質として働く周辺の正常細胞からなる。この補充癌基質は、結合組織、血管、および種々の他の正常細胞、例えば炎症性細胞からなり、協力して形質転換腫瘍細胞に持続的腫瘍増殖に必要なシグナルを供給するように作用する。

### 【0004】

最も一般的な形の癌は体細胞に生じ、主として上皮起源、例えば前立腺、乳腺、結腸、尿管上皮、および皮膚であり、次いで造血系由来の癌、例えば白血病およびリンパ腫、神経外胚葉由来の癌、例えば悪性神経膠腫、および軟部組織腫瘍、例えば肉腫がある。

### 【0005】

#### 癌の診断と予後

癌が疑われる生検試料の顕微鏡的評価は依然として癌診断のゴールドスタンダードである。確定診断を得るには、腫瘍組織をホルマリンで固定し、組織処理し、次いでパラフィン包埋する。得られたパラフィンブロックから組織切片を作製し、組織化学的方法(すなわちヘマトキシリン-エオジン染色)と免疫組織化学(IHC)的方法の両方を用いて染色することができる。次いで、外科的標本を肉眼および顕微鏡分析を含む病理学的技術にて評価する。この分析は、しばしば具体的診断をもたらす、すなわち腫瘍の種類を分類し、腫瘍の悪性度を等級づけする基礎となる。

### 【0006】

悪性腫瘍は、各癌種に特異的な分類スキームに従って数期に分類することができる。固形腫瘍の最も一般的な分類方法は腫瘍・リンパ節・転移(TNM)分類である。T期は、原発腫瘍の限局性の広がり、すなわち、どの程度まで腫瘍が侵襲しており、周辺組織内に増殖しているかを表し、N期、およびM期は癌がどの程度転移しているかを表し、N期は腫瘍がリンパ節に広がり、M期は他の遠位器官で腫瘍が増殖していることを示す。早期はT0-1、N0、M0を含み、リンパ節陰性の腫瘍の限局を表す。より進行した期はT2-4、N0、M0を含み、より広範な増殖を伴う限局性腫瘍を表し、T1-4、N1-3、M1では腫瘍の遠位器官への転移がみられる。腫瘍の病期分類は、しばしば外科学的、放射線学的、および組織病理学的分析を含む数種の実験に基づく。病期分類に加え、ほとんどの腫瘍種で悪性度を階層化する分類法もある。分類は、腫瘍組織試料の形態学的評価に依存し、特定腫瘍にみられる顕微鏡的特徴に基づく。これら悪性度分類は、腫瘍細胞の分化、増殖、および異形の程度に基づくことがある。一般に用いられている評価の例には、前立腺癌のGleason分類や乳癌のNottingham Histological Grade(NHG)分類が含まれる。

## 【 0 0 0 7 】

正確な病期分類と悪性度分類は、しばしば正しい診断に重要であり、予後を予測する手段となりうる。特定腫瘍の診断および予後情報は、特定癌患者の正確な治療戦略を決定する際に考慮される。腫瘍のさらなる情報を得るための一般的に用いられる方法は、組織切片の組織化学染色に加え、免疫組織化学染色がある。IHCは、特異抗体を用いて組織や細胞のタンパク質発現パターンの検出を可能にする。臨床診断におけるIHCの使用は、組織化学染色した腫瘍組織切片で評価する組織構造と細胞形態に関する情報に加え、種々の細胞ポピュレーションで免疫応答性の検出を可能にする。IHCは、原発腫瘍の病期分類や悪性度分類を含む正確な診断の支援と起源不明の転移の診断に関与しうる。今日の臨床診療で最も一般的に用いる抗体には以下の細胞種「特異的」タンパク質、例えばPSA（前立腺）、MelanA（メラニン細胞）、およびサイログロブリン（甲状腺）に対する抗体、および中間径フィラメント（上皮、間葉、グリア）、分化(CD)抗原のクラスター（造血、リンパ系細胞の細分類）、および悪性度のマーカー、例えばKi67（増殖）、p53（通常、突然変異した腫瘍抑制遺伝子）、およびHER-2（成長因子レセプター）を認識する抗体が含まれる。IHCの他に、突然変異分析のための遺伝子増幅の検出および遺伝子シーケンシングのためのin situハイブリダイゼーションの使用は癌診断において発展中の技術である。さらに、転写物、タンパク質、または代謝物の全体的分析は関連情報をもたらす。しかしながら、これら分析のほとんどは、まだ基礎研究中であり、臨床医学で使用するためにさらに評価し、標準化する必要がある。

10

## 【 0 0 0 8 】

20

## 膀胱癌

世界中で膀胱癌は、9番目に最も一般的な癌である。膀胱癌は、女性より男性でより一般的であり、年間で合計約336000の新症例のうち約260000例が男性、約76000例が女性である。発生率は国や癌の種類で様々である。先進工業国では最も一般的な膀胱癌は尿路上皮癌（症例の約90%）である。開発途上国では扁平上皮癌が最も一般的であるが、このタイプは、西洋諸国では膀胱癌の数パーセントを占めるのみである。尿路上皮癌の全世界の発生率は、すべての新たな癌の約3.3%であり、年間ほぼ150000人がこの疾患で死亡している。膀胱癌が発現するリスクは年齢と共に増加し、診断次の年齢中央値は男性と女性合わせて70歳である。

## 【 0 0 0 9 】

30

今日解っている膀胱癌の最大のリスクは、タバコの使用、特に葉巻の喫煙である。他のリスク因子には、石炭燃料由来の排煙と電離放射線が含まれる。該疾患に関与する遺伝因子はまだわかっていない。

## 【 0 0 1 0 】

## 膀胱癌診断

膀胱癌を早期検出するための患者のスクリーニングは、今日一般的には推奨されていない。BTA-StatおよびNMP22などの数マーカーが尿スクリーニングで用いるためにFDAにより承認されているが、これらが充分信頼できるか証明されていない。尿中の血液が膀胱癌の一般的な最初の症状であるが、常にみられるわけではない。他の症状は、恥骨全域の疼痛、頻尿および頻繁なひりつく痛み、または通常の膀胱感染と同様の症状でありうる。患者が膀胱癌を示唆する症状を有する場合は、CT尿路撮影を行う。CT尿路撮影後、フレキシブルチューブを尿道から膀胱に導入して膀胱鏡検査を行う。該チューブは、カメラと疑われる病変から組織を除去する用具を有する。腫瘍組織がみられたら、すべてのわずかな腫瘍を除去するために膀胱切除を行い、いわゆるマッピング法で複数の生検試料を粘膜から得ることもできる。悪性度1の腫瘍の細胞学的診断は困難なことがあり、診断精度は今日これらの症例で約50%だけである。交絡因子には例えば炎症が含まれよう。

40

## 【 0 0 1 1 】

## 膀胱癌の治療

腫瘍の早期検出と外科的切除は、治療の成功にきわめて重要かもしれない。表面の腫瘍は外科的に除去するかまたは「削り落とす」ことができるが、侵襲性の腫瘍はより完全な

50

外科手術が必要かもしれず、今日の標準的アプローチは化学療法を伴うかまたは伴わない、完全膀胱切除/膀胱除去である。膀胱癌は、典型的には局所リンパ節に転移するが、肺、皮膚、肝臓、および骨への遠位転移もまれではない。

#### 【 0 0 1 2 】

診断時に膀胱の経尿道切除(TUR-B)を通常実施するが、それ自体は非侵襲性膀胱癌の根治治療であるかもしれない。しかしながら、再発のリスクが高い症例では、患者は、注入治療として化学療法、またはカルメット・ゲラン桿菌(BCG)を受けることができる。多病巣腫瘍のまたは頻繁に再発する症例では、長期間にわたる膀胱内注入を考慮することがある。

#### 【 0 0 1 3 】

膀胱のin situ癌は現在BCG注入で治療される。腫瘍が治療に反応しない場合は、膀胱のすべてまたは部分を除去する膀胱切除を行うことができる。

#### 【 0 0 1 4 】

T2～T4a期の筋肉侵襲性膀胱癌は、現在、完全膀胱切除および小骨盤のリンパ節切除により治療される。ネオアジュバントまたはアジュバント化学療法は、悪性腫瘍にも考慮することができる。スウェーデンの最新のプロトコールでは膀胱切除後のアジュバント化学療法は対照臨床試験に登録された患者にのみ推奨される。手術できない患者では放射線療法を場合により化学療法と組み合わせて行うことができる。

#### 【 0 0 1 5 】

予後および治療予測因子

予後情報は腫瘍の悪性度から得ることができる。尿路上皮腫瘍を、WHO標準に従って5悪性度に分ける：パピローマ、LMP（低悪性度）および癌悪性度1～3。この悪性度分類は、組織学的基準と細胞形態に基づく。悪性度1では腫瘍細胞はよく分化し、主として組織的に増殖し、悪性度2では腫瘍細胞は中等度に分化し、主として非組織的構造を有し、悪性度3では腫瘍細胞はほとんど分化していない。

#### 【 0 0 1 6 】

尿路上皮腫瘍をTNM病期分類に従って分類する。TISはin situの腫瘍(または癌)を表す。膀胱のin situ癌は、以下の3つの異なる形で生じる平らな低分化腫瘍(悪性度3)である：

原発性：他の腫瘍増殖が存在しないTIS；

二次性：外側増殖性腫瘍治療後の追跡調査中に発見されたTIS；

併発性：他の腫瘍増殖を伴うTIS。

#### 【 0 0 1 7 】

Ta期は非侵襲性腫瘍であり、T1期では腫瘍は基底膜(上皮結合組織)を侵襲している。T2期では腫瘍は筋肉を侵襲し、T3期では腫瘍は膀胱周囲組織を侵襲し、およびT4期では腫瘍は他の器官を侵襲する。

#### 【 0 0 1 8 】

約70%の膀胱癌が完全な表面腫瘍であるかまたは基底膜まで侵襲しているのみである(Ta期またはT1)。これら腫瘍の局所的再発は一般的(再発率50～70%)であり、再発を早期に検出するため、通常、患者を定期的に膀胱鏡検査して追跡する必要がある。これは、患者に大きな不快感を与える費用のかかる方法である。この表面腫瘍は、より急速に進行する形にはほとんど進行しないが、約10～15%の症例でそのように進行する。これら腫瘍のうち、以下の3つのリスク群がEuropean Association of Urology (EAU)により示唆されている：

低リスク腫瘍：LMPである腫瘍、悪性度1のTa期腫瘍、またはサイズ3cm以下の腫瘍；

中リスク腫瘍：悪性度1または2およびサイズ3cm以上のTa期腫瘍；および

高リスク腫瘍：悪性度3のTa期腫瘍、T1期の腫瘍、またはTis腫瘍。

#### 【 0 0 1 9 】

高リスク腫瘍はより急速に進行する形に進行する傾向が増し、高リスク腫瘍の患者は、低または中リスク腫瘍の患者より短い間隔でモニターする必要があるだろう。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 2 0 】

最も低悪性度の腫瘍、TaおよびT1は、比較的好ましい結果であり、最近の5年生存率がそれぞれ90および75%である。より侵襲性の腫瘍は、予後がそれより悪く、5年生存率はT2期が約60%、T3期が35%である。転移性腫瘍(N1~4および/またはM1)は最も予後が悪い。

## 【 0 0 2 1 】

シスプラチンベースの化学療法は、進行膀胱癌に有効であることが示され、反応率は単剤治療で約30%、他の薬剤との併用治療で50%以上である。しかしながら、長期生存は、今のところ低く、5年間まで生存した患者はわずか10~15%であり、数種の分子マーカーが治療反応の予測に価値があることが解っている。

10

## 【 0 0 2 2 】

Fradet et al. (Journal of Cellular Biochemistry, Supplement 161 : 85-92 (1992)) およびWO 98/12564は、膀胱癌で種々の抗原とその役割を開示している。該抗原の1つは、癌胎児性抗原 (CEA) のファミリーの一部であるgp200表面抗原19A211である。「gp200」は、分子量200kDの糖タンパク質であることを示す。しかしながら、gp200表面抗原19A211は、過去にgp200と呼ばれることがあった抗原PODXLとは同じでも関連もない。

## 【 発明の概要 】

## 【 発明が解決しようとする課題 】

## 【 0 0 2 3 】

(要約)

本発明の目的は、膀胱癌の予後および治療の改善をもたらすことである。

下記は、本発明が提供する種々の特徴と組み合わせのそのある局面を示すために記載した本開示の態様の非限定的な項目に分けたリストである。

## 【 課題を解決するための手段 】

## 【 0 0 2 4 】

1. 膀胱癌を有する哺乳類対象が第1群または第2群のいずれに属すかを決定する方法であって、第2群の対象の予後が第1群の対象の予後より悪く、以下の工程を含む方法：

a) 対象から以前に得た試料の少なくとも部分中のPODXLの量を評価し、評価した量に対応する試料値を決定し、

b) 該試料値と予め決定した基準値を比較し；

該試料値が該基準値より高い場合は、

c1) 該対象が第2群に属すと結論し；

該試料値が該基準値より低いか同等の場合は、

c2) 該対象が第1群に属すと結論する。

## 【 0 0 2 5 】

2. 以下の工程を含む、膀胱癌を有する哺乳類対象の予後を決定する方法：

a) 対象から以前に得た試料の少なくとも部分中のPODXLの量を評価し、評価した量に対応する試料値を決定し、

b) 該試料値を基準予後と関連する基準値と比較し；

該試料値が該基準値より高い場合は、

c1) 該対象の予後が該基準予後より悪いと結論し；または

該試料値が該基準値より低いか同等の場合は、

c2) 該対象の予後が該基準予後より良いかまたは同等であると結論する。

## 【 0 0 2 6 】

3. 該予後が、生存、例えば、全生存、無進行生存、または疾患特異的生存の可能性である1または2項記載の方法。

## 【 0 0 2 7 】

4. 生存の可能性が5年、10年、または15年生存の可能性である3項記載の方法。

## 【 0 0 2 8 】

5. 以下の工程を含む、膀胱癌を有する対象が膀胱癌治療計画を必要としないか否かを

50

決定する方法：

- a) 対象から以前に得た試料の少なくとも部分中のPODXLの量を評価し、評価した量に対応する試料値を決定し、
- b) 該試料値と予め決定した基準値を比較し；  
該試料値が該基準値より低いか同等の場合は、
- c) 該対象は膀胱癌治療計画を必要としないと結論する。

【 0 0 2 9 】

6．以下の工程を含む、膀胱癌を有する対象の非治療戦略的方法：

- a) 対象から以前に得た試料の少なくとも部分中のPODXLの量を評価し、評価した量に対応する試料値を決定し、
- b) 該試料値と予め決定した基準値を比較し；  
該試料値が該基準値より低いか同等の場合は、
- c) 該対象を膀胱癌治療計画で治療することを止める。

10

【 0 0 3 0 】

7．以下の工程を含む、膀胱癌を有する対象の治療方法：

- a) 対象から以前に得た試料の少なくとも部分中のPODXLの量を評価し、評価した量に対応する試料値を決定し、
- b) 該試料値と予め決定した基準値を比較し；  
該試料値が該基準値より高い場合は、
- c) 該対象を第1治療計画で治療し；  
該試料値が該基準値より低いか同等の場合は、
- d) 該対象を第2治療計画で治療する、  
ここで、該第1治療計画は該第2治療計画より広範である。

20

【 0 0 3 1 】

8．膀胱癌がTaまたはT1期である先の項のいずれかに記載の方法。

【 0 0 3 2 】

9．膀胱癌が侵襲性である1～7項のいずれかに記載の方法。

【 0 0 3 3 】

10．膀胱癌がT2期である9項記載の方法。

【 0 0 3 4 】

11．膀胱癌が悪性度1または2である先の請求項のいずれかに記載の方法。

【 0 0 3 5 】

12．膀胱癌が悪性度3である1～10項のいずれかに記載の方法。

【 0 0 3 6 】

13．膀胱癌が悪性度1～2aである1～10項のいずれかに記載の方法。

【 0 0 3 7 】

14．膀胱癌が悪性度2b～4である1～10項のいずれかに記載の方法。

【 0 0 3 8 】

15．以下の工程を含む、TaまたはT1期の膀胱癌を有する対象が化学療法、カルメット・گران桿菌(BCG)治療、および一次膀胱切除からなる群から選ばれる治療を必要とするか否かを決定する方法：

40

- a) 対象から以前に得た試料の少なくとも部分中のPODXLの量を評価し、評価した量に対応する試料値を決定し、
- b) 該試料値と予め決定した基準値を比較し；  
該試料値が該基準値より高い場合は、
- c) 該対象は該治療を必要とすると結論する。

【 0 0 3 9 】

16．以下の工程を含む、侵襲性膀胱癌を有する対象が化学療法、生物学的治療、および/または放射線療法を必要とするか否かを決定する方法：

- a) 対象から以前に得た試料の少なくとも部分中のPODXLの量を評価し、評価した量に対

50

応する試料値を決定し、

b) 該試料値と予め決定した基準値を比較し；

該試料値が該基準値より高い場合は、

該対象が化学療法、生物学的治療、および/または放射線療法を必要とすると結論する。

【 0 0 4 0 】

17．化学療法がアジュバントである16項に記載の方法。

【 0 0 4 1 】

18．化学療法がネオアジュバントである16項に記載の方法。

【 0 0 4 2 】

19．対象が完全膀胱切除を受けている17項記載の方法。

10

【 0 0 4 3 】

20．以下の工程を含むTaまたはT1期の膀胱癌を有する対象の治療方法：

a) 対象から以前に得た試料の少なくとも部分中のPODXLの量を評価し、評価した量に対応する試料値を決定し、

b) 該試料値と予め決定した基準値を比較し；

該試料値が該基準値より高い場合は、

c) 対象を化学療法、カルメット・ゲラン桿菌(BCG)治療、および一次膀胱切除からなる群から選ばれる治療で治療する。

【 0 0 4 4 】

21．以下の工程を含む侵襲性膀胱癌を有する対象の治療方法：

20

a) 対象から以前に得た試料の少なくとも部分中のPODXLの量を評価し、評価した量に対応する試料値を決定し、

b) 該試料値と予め決定した基準値を比較し；

該試料値が該基準値より高い場合は、

c) 化学療法、生物学的治療、および/または放射線療法を提供する。

【 0 0 4 5 】

22．化学療法がアジュバントである21項記載の方法。

【 0 0 4 6 】

23．化学療法がネオアジュバントである21項記載の方法。

【 0 0 4 7 】

24．対象が完全膀胱切除を受けている22項記載の方法。

30

【 0 0 4 8 】

25．該試料が対象由来の腫瘍細胞を含む先の項のいずれかに記載の方法。

【 0 0 4 9 】

26．該試料が膀胱腫瘍組織試料である先の項のいずれかに記載の方法。

【 0 0 5 0 】

27．該試料が尿試料である1～25項のいずれかに記載の方法。

【 0 0 5 1 】

28．工程a)の評価が該試料の腫瘍細胞の膜および/または細胞質に限定される先の請求項のいずれかに記載の方法。

40

【 0 0 5 2 】

29．工程a)の評価が該試料の腫瘍細胞の膜に限定される先の項のいずれかに記載の方法。

【 0 0 5 3 】

30．工程a)の評価が該試料の腫瘍出芽細胞に限定される先の項のいずれかに記載の方法。

【 0 0 5 4 】

31．膀胱癌が尿路上皮癌である先の項のいずれかに記載の方法。

【 0 0 5 5 】

32．該対象がヒトである先の項のいずれかに記載の方法。

50

## 【 0 0 5 6 】

33. 該基準値が基準試料中の予め決定した量のPODXLタンパク質に対応する値である先の項のいずれかに記載の方法。

## 【 0 0 5 7 】

34. 工程a)の試料値が、試料の腫瘍細胞中の検出可能な膜PODXLタンパク質発現に対応する1、または試料の腫瘍細胞中に検出可能な膜PODXLタンパク質がないことに対応する0として決定される先の項のいずれかに記載の方法。

## 【 0 0 5 8 】

35. 工程b)の基準値が腫瘍細胞中に検出可能な膜PODXLタンパク質がない基準試料に対応する先の項のいずれかに記載の方法。

10

## 【 0 0 5 9 】

36. 工程b)の基準値が0である先の項のいずれかに記載の方法。

## 【 0 0 6 0 】

37. PODXLタンパク質のアミノ酸配列が以下から選ばれる配列を含む先の項のいずれかに記載の方法：

i) 配列番号1；および

ii) 配列番号1と少なくとも85%同一な配列。

## 【 0 0 6 1 】

38. PODXLタンパク質のアミノ酸配列が以下から選ばれる配列を含むかまたはからなる先の項のいずれかに記載の方法：

20

i) 配列番号2または3；および

ii) 配列番号2または3と少なくとも85%同一な配列。

## 【 0 0 6 2 】

39. 工程a)が以下のものを含む先の項のいずれかに記載の方法：

a1) 工程a)の該試料に、評価するPODXLタンパク質との選択的相互作用を可能にする定量可能な親和性リガンドを適用し、

該適用が、該親和性リガンドと試料中に存在するPODXLタンパク質との結合を可能にする条件下で行われ、

a11) 該試料と結合した親和性リガンドを定量し、該量を評価する。

## 【 0 0 6 3 】

30

40. 工程a)が以下のものを含む1～38項のいずれかに記載の方法：

a1) 該試料または工程a)に、定量するPODXLタンパク質との選択的相互作用を可能にする定量可能な親和性リガンドを適用し、

該適用が、該親和性リガンドと試料中に存在するPODXLタンパク質との結合を可能にする条件下で行われ；

a2) 非結合親和性リガンドを除去し；

a3) 試料と結合している親和性リガンドを定量して該量を評価する。

## 【 0 0 6 4 】

41. 該定量可能な親和性リガンドが、抗体、その断片、およびその誘導体からなる群から選ばれる39または40項記載の方法。

40

## 【 0 0 6 5 】

42. 該定量可能な親和性リガンドが、アミノ酸配列が配列番号1の配列からなるペプチドで動物を免疫する工程を含むプロセスにより得ることができる41項記載の方法。

## 【 0 0 6 6 】

43. 該定量可能な親和性リガンドがオリゴヌクレオチド分子である39または40項に記載の方法。

## 【 0 0 6 7 】

44. 該定量可能な親和性リガンドが以下からなる群から選ばれる足場由来のタンパク質リガンドである39または40項に記載の方法：ブドウ球菌プロテインA、およびそのドメイン、リボカリン、アンキリン反復ドメイン、セルロース結合ドメイン、ガンマ結晶、緑色

50



蛍光タンパク質、ヒト細胞傷害性Tリンパ球関連抗原4、プロテアーゼ阻害剤、PDZドメイン、ペプチドアダプター、ブドウ球菌ヌクレアーゼ、テンダミスタット、フィブロネクチンタイプIIIドメイン、およびジンクフィンガー。

【0068】

45. 該定量可能な親和性リガンドが、アミノ酸配列が配列番号1の配列からなるペプチドと選択的に相互作用することができる39～44項のいずれかに記載の方法。

【0069】

46. 該定量可能な親和性リガンドが、アミノ酸配列が配列番号8、13、または14の配列からなるペプチドと選択的に相互作用することができる39～45項のいずれかに記載の方法。

10

【0070】

47. 該定量可能な親和性リガンドが、以下からなる群から選ばれる標識を含む39～46項のいずれかに記載の方法：蛍光色素および金属、発色団染料、化学発光化合物、および生物発光タンパク質、酵素、放射性同位体、粒子、および量子ドット。

【0071】

48. 該定量可能な親和性リガンドが該定量可能な親和性リガンドを認識することができる第2親和性リガンドを用いて検出される39～47項のいずれかに記載の方法。

【0072】

49. 該定量可能な親和性リガンドを認識することができる該第2親和性リガンドが以下からなる群から選ばれる標識を含む48項記載の方法：蛍光色素および金属、発色団染料、化学発光化合物、および生物発光タンパク質、酵素、放射性同位体、粒子、および量子ドット。

20

【0073】

50. 膀胱癌の予後マーカーとしてのPODXLタンパク質のex vivo使用。

【0074】

51. 該タンパク質が膀胱癌を有する対象由来の試料で提供される50項記載の使用。

【0075】

52. 該試料が膀胱癌組織試料である51項記載の使用。

【0076】

53. 該マーカーが膀胱癌の比較的予後不良のマーカーである50～52項のいずれかに記載の使用。

30

【0077】

54. 膀胱癌予後診断物質を選択または精製するためのPODXLタンパク質またはその抗原的活性断片のex vivo使用。

【0078】

55. 膀胱癌予後診断物質を製造するためのPODXLタンパク質またはその抗原的活性断片の使用。

【0079】

56. 該予後診断物質がPODXLタンパク質またはその抗原的活性断片と選択的に相互作用することができる親和性リガンドである54または55項記載の使用。

40

【0080】

57. PODXLタンパク質のアミノ酸配列が以下から選ばれる配列を含む50～56項のいずれかに記載の使用：

i) 配列番号1；および

ii) 配列番号1と少なくとも85%同一な配列。

【0081】

58. PODXLタンパク質のアミノ酸配列が以下から選ばれる配列を含むかまたはからなる50～56項のいずれかに記載の使用：

i) 配列番号2または3；および

ii) 配列番号2または3と少なくとも85%同一な配列。

50

## 【 0 0 8 2 】

59．該断片が50アミノ酸残基またはそれ以下からなり、配列番号8、13、または14のアミノ酸配列を含む54～56項のいずれかに記載の抗原的活性断片の使用。

## 【 0 0 8 3 】

60．該断片が25アミノ酸残基またはそれ以下、例えば20アミノ酸またはそれ以下からなる59項記載の使用。

## 【 0 0 8 4 】

61．PODXLタンパク質と選択的に相互作用することができる親和性リガンドの膀胱癌予後診断物質としてのex vivo使用。

## 【 0 0 8 5 】

62．親和性リガンドが、アミノ酸配列が配列番号1の配列からなるペプチドで動物を免疫する工程を含むプロセスにより得ることができる61項記載の使用。

## 【 0 0 8 6 】

63．親和性リガンドが、アミノ酸配列が配列番号8、13、または14からなるペプチドで動物を免疫する工程を含むプロセスにより得ることができる61項記載の使用。

## 【 0 0 8 7 】

64．親和性リガンドが、配列番号1のアミノ酸配列からなるペプチドと選択的に相互作用することができる61項記載の使用。

## 【 0 0 8 8 】

65．親和性リガンドが、配列番号8、13、または14のアミノ酸配列からなるペプチドと選択的に相互作用することができる61項記載の使用。

## 【 0 0 8 9 】

66．親和性リガンドが、抗体、その断片、およびその誘導体からなる群から選ばれる61～65項のいずれかに記載の使用。

## 【 0 0 9 0 】

67．抗体断片がFab断片、Fv断片、および1本鎖Fv断片 (scFv) からなる群から選ばれる66項記載の使用。

## 【 0 0 9 1 】

68．抗体がモノクローナルまたはポリクローナル抗体である66項記載の使用。

## 【図面の簡単な説明】

## 【 0 0 9 2 】

【図1】コホートIのすべての患者、すなわち尿路上皮癌と診断された103対象の全生存 (OS) に対する膜PODXL発現の影響。患者をPODXL発現に基づいて2群に分けた。実線は、膜PODXLを発現しない腫瘍を有する患者を表し、点線は、膜PODXLを発現する腫瘍を有する患者を表す。

【図2】コホートIの患者の全生存(OS)に対するPODXL発現の影響を示す。患者をPODXL発現に基づいて2群に分けた。実線は、膜PODXLを発現しない腫瘍を有する患者を表し、点線は、膜PODXLを発現する腫瘍を有する患者を表す。図2Aは、悪性度1または2の尿路上皮癌と診断された患者すなわち49対象を示す。図2Bは、悪性度3の尿路上皮癌と診断された患者、すなわち53対象を示す。

【図3】コホートIの患者の全生存(OS)に対するPODXL発現の影響を示す。患者をPODXL発現に基づいて2群に分けた。実線は、膜PODXLを発現しない腫瘍を有する患者を表し、点線は、膜PODXLを発現する腫瘍を有する患者を表す。図3Aは、T1期の尿路上皮癌と診断された患者、すなわち24対象を示す。図3Bは、T2期の尿路上皮癌と診断された患者、すなわち34対象を示す。

【図4】コホートIIのすべての患者、すなわち尿路上皮癌と診断された343対象の5年全生存(OS)に対する膜PODXL発現の影響を示す。患者をPODXL発現に基づいて2群に分けた。実線は、膜PODXLを発現しない腫瘍を有する患者を表し、点線は、膜PODXLを発現する腫瘍を有する患者を表す。

【図5】コホートIIの患者の5年全生存(OS)に対する膜PODXL発現の影響を示す。患者をPO

10

20

30

40

50

DXL発現に基づいて2群に分けた。実線は、膜PODXLを発現しない腫瘍を有する患者を表し、点線は、膜PODXLを発現する腫瘍を有する患者を表す。図5Aは、低悪性度(1~2A)の尿路上皮癌と診断された患者、すなわち82対象を示す。図5Bは、高悪性度(2B~4)の尿路上皮癌と診断された患者、すなわち261対象を示す。

【図6】TaまたはT1期の尿路上皮癌と診断されたコホートIIの患者、すなわち230対象の5年全生存(OS)に対する膜PODXL発現の影響を示す。患者をPODXL発現に基づいて2群に分けた。実線は、膜PODXLを発現しない腫瘍を有する患者を表し、点線は、膜PODXLを発現する腫瘍を有する患者を表す。

【図7】コホートIIの患者の疾患特異的生存(DSS)に対するPODXL発現の影響を示す。患者をPODXL発現に基づいて2群に分けた。実線は、膜PODXLを発現しない腫瘍を有する患者を表し、点線は、膜PODXLを発現する腫瘍を有する患者を表す。図7Aは、無再発生存を示し、図7Bは無疾患生存を示す。

10

#### 【0093】

(詳細な説明)

本開示の第1の局面として、以下の工程を含む、膀胱癌を有する哺乳類対象が第1または第2群に属するか否かを決定する方法であって、第2群の対象の予後が第1群の対象の予後より悪い方法を提供する：

a)対象から以前に得た試料の少なくとも部分中のPODXLの量を評価し、評価した量に対応する試料値を決定し、

b)該試料値と予め決定した基準値を比較し；

20

該試料値が該基準値より高い場合は、

c1)該対象が第2群に属すと結論し；

該試料値が該基準値より低いまたは同等である場合は、

c2)該対象が第1群に属すと結論する。

#### 【0094】

膀胱癌の病期の指標としてのPODXLレベルに基づく本発明は多くの利点がある。当業者に周知のように、予後は種々の理由で重要である。しばしば、膀胱癌対象の予後は、癌の悪性度を反映する。一般的に、膀胱癌の悪性度の同定は、医師が適切な治療戦略を選択する助けとなるので極めて重要である。PODXLの発現レベルは、例えば癌の特定の悪性形の同定に用いることができる。そのような場合には、通常考慮されるものより広範囲の治療を適用することができる。例えば、該対象は、PODXLレベルが癌が悪性であることを示す場合は通常避ける痛みを伴うかまたは別の意味で不快な治療を受けるかもしれない。

30

#### 【0095】

また、進行期の膀胱癌を有する対象の場合は、本開示の方法が提供するさらなる予後情報は、生存延長を期待して積極的治療を適用するか、または残された時間、対象を苦痛から解放する苦痛緩和治療を続けるかを決定する指針となりうる。低PODXLレベル(例えば膜発現の欠如)では先の選択肢が選ばれるだろうし、高PODXLおよび高PODXLレベル(例えば膜発現)では後の選択肢が選ばれるだろう。

#### 【0096】

さらに、PODXLタンパク質は、ある発現レベルがある疾患進行パターンと関連するマーカーとして、例えば予測や予後診断を行うかまたは治療計画を選択するパネルにおいて大きな可能性を有する。

40

#### 【0097】

第1の局面の方法では、膀胱癌対象が第1群または第2群のいずれに属するかを決定する(ここで、第2群の対象の予後が一般に第1群の対象の予後より悪い)。膀胱癌対象の2群への分割は、対象由来の試料値を基準値と比較することにより決定する。種々の基準値を用いて、一般的に比較的長期間生存する対象と一般的に比較的短期間生存する対象を区別することができる。したがって、該基準値は、各群のサイズの決定要因であり、基準値が高いと第2群の対象が少なく、被験対象が第2群に属す可能性が低くなる。試料値が増加すると一般的に予後が悪くなるので、場合により特に予後が悪い対象を同定するために比較的

50

高い基準値を選ぶことがある。本開示が示すように当業者は不当な負担なしに相対的基準値を選択することができる。

【0098】

第1群と第2群は、被験対象と同じかまたは同様の悪性度、病期、および/またはタイプの膀胱癌を有する対象のみからなりうる。

【0099】

第1群と第2群が被験対象と同じ病期の膀胱癌を有する対象のみからなる場合は、予後は病期非依存性予後である。病期非依存性予後は従来の病期分類から利用可能な情報を超える情報をもたらすので特に興味深い。

【0100】

1群と第2群が被験対象と同じ悪性度の膀胱癌を有する対象のみからなる場合は、予後は悪性度非依存性予後である。悪性度非依存性予後は、従来の悪性度分類から利用可能な情報を超える情報をもたらすので特に興味深い。

【0101】

さらに、該群は、同じかまたは同様の年齢、人種、性別、遺伝的特徴、および/または医学的状态または病歴を有する対象のみからなりうる。したがって、医師は、該第1の局面の方法を用いて下記行為に関して十分な情報に基づく判断をするのを助ける膀胱癌対象の予後に関するさらなる情報を得ることができる。

【0102】

被験対象の予後は、基準予後と比較して決定することもできる。したがって、第1の局面の第1の構成として、以下の工程を含む膀胱癌を有する哺乳類対象の予後を決定する方法を提供する：

c) 対象から先に得た試料の少なくとも部分中のPODXLの量を評価し、評価した量に対応する試料値を決定し；

d) 該試料値を基準予後と関連する基準値と比較し；

該試料値が該基準値より高い場合は、

c1) 該対象の予後が該基準予後より悪いと結論し、または

該試料値が該基準値より低いまたは同じ場合は、

c2) 該対象の予後が該基準予後より良いまたは同じであると結論する。

しかしながら、同じ概念で密接に関連しカバーされるc1)およびc2)は、2つの別の結論をもたらす。

【0103】

同様に、第1の局面の第2の構成として、以下の工程を含む膀胱癌を有する哺乳類対象の予後が基準予後より悪いまたは同等かを決定する方法を提供する：

a) 対象から以前に得た試料の少なくとも部分中のPODXLの量を評価し、評価した量に対応する試料値を決定し、

b) 該試料値を基準予後と関連する基準値と比較し；

該試料値が該基準値より高い場合は、

c1) 該対象の予後が該基準予後より悪いと結論する。

【0104】

本開示の発明概念は、ある治療計画を止める決定する根拠にもなるかもしれない。

例えば、低PODXLレベルを示す対象の予後は、一般的に添付の図面に示すように高PODXLレベルを示す対象の予後よりよい。本開示が示すように、医師は、PODXLレベルが低い場合はより積極的な治療計画を促さず、積極的でない治療計画で充分であると結論するかもしれない。したがって、非侵襲性癌(TaまたはT1)の場合、医師は、関連腫瘍組織試料が膜PODXL発現を欠くことが分かれば、化学療法、カルメット・ゲラン桿菌(BCG)治療、および/または一次膀胱切除を止めるかもしれない。さらに、医師は、侵襲性癌の場合に関連腫瘍組織試料が膜PODXL発現を欠くことが分かれば、化学療法および/または放射線療法を止めるかもしれない。

【0105】

したがって、第1の局面の第3の構成として、以下の工程を含む、膀胱癌を有する対象が膀胱癌の治療計画を必要としないか否かを決定する方法を提供する：

- a) 対象から以前に得た試料の少なくとも部分中のPODXLの量を評価し、評価した量に対応する試料値を決定し、
- b) 該試料値と予め決定した基準値を比較し；  
該試料値が該基準値より低いか同等の場合は、
- c) 該対象は膀胱癌治療計画を必要としないと結論する。

【0106】

さらに、第1の局面の第4の構成として、以下の工程を含む、膀胱癌を有する対象に対する非治療戦略的方法を提供する：

- a) 対象から以前に得た試料の少なくとも部分中のPODXLの量を評価し、評価した量に対応する試料値を決定し、
- b) 該試料値と予め決定した基準値を比較し；  
該試料値が該基準値より低いか同等の場合は、
- c) 該対象の膀胱癌治療計画による治療を止める。

【0107】

例えば、第4の構成の工程c)は、工程a)～b)の終了から少なくとも1週間、例えば、工程a)～b)の終了から少なくとも1カ月間、例えば、工程a)～b)の終了から少なくとも3カ月間、例えば、工程a)～b)の終了から少なくとも6カ月間、例えば、工程a)～b)の終了から少なくとも1年間、例えば、工程a)～b)の終了から少なくとも2年間、治療計画を止めることがある。あるいはまた、工程c)を止めるとは、次回該方法を行うまでかまたは膀胱癌の再発まで治療を止めることでありうる。

【0108】

本開示の治療計画は、外科手術、例えば完全膀胱切除を含むかまたはからなることがある。さらに、本開示の治療計画は、アジュバントおよび/またはネオアジュバント療法でありうる。そのような治療計画は、例えば化学療法および/またはカルメット・ゲラン桿菌(BCG)の投与を含むかまたはからなることがある。

【0109】

さらに、該治療計画は、生物学的療法、例えば、インターロイキン2、ソラフェニブ、スニチニブ、またはラパチニブの適用を含みうる。生物学的治療は化学療法と組み合わせることができる。該治療計画は、放射線療法を含むかまたはからなることもある。化学療法および/または生物学的療法は、放射線療法の前または後に行うことがある。

【0110】

第1の局面の別の構成として、以下の工程を含む膀胱癌を有する哺乳類対象の予後を確定する方法を提供する：

- a) 対象由来の試料の少なくとも部分中に存在するPODXLタンパク質の量を評価し、評価した量に対応する試料値を決定し、
- b) 工程a)の試料値を対象の予後と関連づける。

【0111】

別の構成の態様において、該試料は先に得た試料でありうる。

別の構成の工程b)の関連づけるとは、生存データと得られた試料値を関連づけて対象の予後を確定するあらゆる方法をいう。

【0112】

本開示の文脈において、「予後を確定する」とは、特定の予後または予後間隔を確定することをいう。

本開示では、種々の予後に対応する異なるPODXL値(試料値)が示される。典型的には、高試料値は低試料値より予後不良と関連がある。

【0113】

第1の態様の該構成の「基準予後」は、例えば、対象の関連個体群の試験により得られた先に確定した予後に基づくかもしれない。そのような基準個体群は、被験対象の年齢、

10

20

30

40

50

性別、人種、膀胱癌の病期、悪性度、および/またはタイプ、および/または医学的状态と病歴が一致するように選ぶことができる。さらに、予後は、全体的個体群の背景リスク、統計的予後/リスク、または対象の試験に基づく仮定に適合させることができる。そのような試験は、対象の年齢、性別、人種、膀胱癌の病期、膀胱癌のタイプ、および/または医学的状态と病歴も含みうる。したがって、医師は、例えば基準予後を、対象の膀胱癌の病歴、タイプ、悪性度、および/または腫瘍の病期、腫瘍の形態、腫瘍の位置、転移の存在と広がり、および/またはさらなる癌の特徴と適合させる。

【0114】

一般的には、膀胱癌を有する患者に適した治療戦略を決定するには、治療を担当する医師は、種々のパラメーター、例えば、免疫組織化学的評価の結果、患者の年齢、腫瘍のタイプ、期、および悪性度、全身状態、および病歴、例えば、膀胱癌の病歴を考慮するかもしれない。該決定を導くために、医師は、該第1の局面に従ってPODXL試験を実施するかまたはPODXL試験を実施するよう指示することができる。さらに、医師は、他の者、例えば研究員に工程a)と所望により工程b)を実施させ、工程c)と所望によりb)を自ら実施することができる。

10

【0115】

本開示の発明的概念は、種々の治療計画を適用する根拠も形成しうる。

【0116】

例えば、高PODXLレベルを示す対象の予後は、添付の図面に示すように、一般的に低PODXLタンパク質レベルを示す対象より悪い。したがって、医師は、高PODXLタンパク質対象の予後が悪くある種の治療計画は適さないと考えるかもしれない。したがって、本開示は、先の治療が不十分な群に的確な治療を提供することができる。

20

【0117】

本開示の第2の局面の第1の構成として、以下の工程を含む膀胱癌を有する対象の治療方法を提供する：

a) 対象から以前に得た試料の少なくとも部分中のPODXLの量を評価し、評価した量に対応する試料値を決定し、

b) 該試料値と予め決定した基準値を比較し；

該試料値が該基準値より高い場合は、

c) 該対象を第1治療計画で治療し；

該試料値が該基準値より低いかまたは等しい場合は、

d) 該対象を第2治療計画で治療する；

ここで、該第1治療計画は該第2治療計画より広範囲である。

30

【0118】

当業者は、ある治療計画が別の治療よりより包括的である場合を理解する。例えば、該第1治療は、TUR-B、BCG、膀胱切除、化学療法、および放射線療法からなる群からの2またはそれ以上の組み合わせでありうるが、第2治療は、同じ群から1つのみ（例えばTUR-Bのみ）である。in situで癌と特に関連がある別の例では、該第1治療は第1期間中膀胱内注入であり、第2治療は、第1期間より短い第2期間中膀胱内注入である。膀胱内注入は通常BCG治療である。さらに別の例では、該第1治療は膀胱切除およびネオアジュバント、またはアジュバント治療であり、該第2治療は膀胱切除のみである。

40

【0119】

非侵襲性膀胱癌を有する対象群では、腫瘍が早期であるにもかかわらずより積極的な第1選択治療または一次膀胱切除を受けるべき対象を同定することが特に重要である。したがって、本開示の第2の局面の第2の構成として、以下の工程を含む、TaまたはT1期の膀胱癌を有する対象の治療方法を提供する：

a) 対象から以前に得た試料の少なくとも部分中のPODXLの量を評価し、評価した量に対応する試料値を決定し、

b) 該試料値と予め決定した基準値を比較し；

該試料値が該基準値より高い場合は、

50

c) 該対象を化学療法、カルメット・ゲラン桿菌 (BCG) 治療、および一次膀胱切除からなる群から選ばれる治療で治療する。

【 0 1 2 0 】

工程c) の治療は、該群中に2またはそれ以上の治療を含みうる。

【 0 1 2 1 】

該第2の局面の第2の構成のある態様では、該方法は以下のさらなる工程を含みうる：

d) および該試料値が該基準値より低いか同等の場合は、該対象を該治療で治療するのを止める。

【 0 1 2 2 】

該癌がTa期である場合は、該治療は、好ましくは化学療法またはBCGである。そのような場合に、PODXLレベルが低い（すなわち、腫瘍細胞の膜にみられない）ときはTUR-Bが唯一の治療でありうる。

該癌がT1期である場合は、該治療は、好ましくは、場合により化学療法またはBCGと組み合わせた膀胱切除である。

【 0 1 2 3 】

侵襲性膀胱癌を有する対象群では、通常行う膀胱切除に加えて、ネオアジュバントまたはアジュバント治療を行うべき対象を同定することが特に重要である。本開示の第2の局面の第3の構成として、以下の工程を含む、侵襲性膀胱癌を有する対象の治療方法を提供する：

a) 対象から以前に得た試料の少なくとも部分中のPODXLの量を評価し、評価した量に対応する試料値を決定し、

b) 該試料値と予め決定した基準値を比較し；

該試料値が該基準値より高い場合は、

c) 化学療法、生物学的治療、および放射線療法からなる群から選ばれる治療を適用する。ある態様では、工程c) の治療は化学療法である。

工程c) の治療は、別の態様において化学療法と放射線療法の両方を含みうる。

【 0 1 2 4 】

該第2の局面の第3の構成のある態様では、該方法は以下のさらなる工程を含みうる：

e) および該試料値が該基準値より低いか同等の場合は、該対象を該治療で治療するのを止める。

上記のごとく、該第2の局面の第3の構成の対象は、通常、化学療法または放射線療法の前または後に完全膀胱切除を受ける。工程c) の化学療法および/または放射線療法はアジュバントまたはネオアジュバントでありうる。

【 0 1 2 5 】

該第2の局面に従って該治療を担当する医師は、他の誰か（例えば研究者）を工程a) および所望により工程b) を行うよう指定し、工程c) および所望によりb) を自分自身で行うことがある。

さらに、工程a) およびb) の結果は、第2の局面の治療方法を開始する時に手元にあるかもしれない。

【 0 1 2 6 】

また、治療方法は、意思決定と治療に限定されるかもしれない。したがって、該第2の局面の第4の構成として、以下を含む膀胱癌を有する対象の治療方法を提供する：

）対象由来の試料中のPODXLレベルに対応する試料値を基準値と比較し、

該試料値が該基準値より高い場合は、

）該対象に膀胱癌治療計画で治療する。

対象由来試料中のPODXLレベルに対応する試料値を得る多くの方法が本開示中に記載されている。 ） の膀胱癌治療計画は上記のごとく選ぶことができる。

【 0 1 2 7 】

さらに、当業者は、上記局面の方法の有用性は、該タンパク質が関連遺伝子によってコードされ、関連する発現パターンを示すかぎり、該対象中に存在するPODXLタンパク質の

10

20

30

40

50

あらゆる特定の変異体の定量に限定されないことを認識すべきである。

【0128】

非限定的例として、PODXLタンパク質は以下から選ばれる配列を含みうる：

i) 配列番号1；および

ii) 配列番号1と少なくとも85%同一な配列。

ある態様では、上記ii)の配列は、配列番号1と少なくとも90%同一、少なくとも91%同一、少なくとも92%同一、少なくとも93%同一、少なくとも94%同一、少なくとも95%同一、少なくとも96%同一、少なくとも97%同一、少なくとも98%同一、または少なくとも99%同一である。

【0129】

別の非限定的例として、PODXLタンパク質は下記配列を含むかまたはからなることがある：

i) 配列番号2または3；および

ii) 配列番号2と少なくとも85%同一な配列。

配列番号2および3は、PODXLタンパク質の2つのスプライス変異体である。配列番号1は、各スプライス変異体の細胞外領域に共通の部分領域である。

【0130】

ある態様において、上記ii)の配列は、配列番号2または3と少なくとも90%同一、少なくとも91%同一、少なくとも92%同一、少なくとも93%同一、少なくとも94%同一、少なくとも95%同一、少なくとも96%同一、少なくとも97%同一、少なくとも98%同一、または少なくとも99%同一である。

【0131】

本開示の文脈で用いる用語「%同一」は、以下のごとく計算する。クエリー配列をCLUSTAL Wアルゴリズムを用いて標的配列とアラインメントする(Thompson, J.D., Higgins, D.G., およびGibson, T.J., Nucleic Acids Research, 22: 4673-4680 (1994))。各位置のアミノ酸残基を比較し、標的配列中の同一の対応を有するクエリー配列中の位置のパーセンテージを%同一で表す。また、標的配列は比較する位置の番号の数を決定する。したがって、本開示の文脈において、標的配列より短いクエリー配列は、標的配列と100%同一ではありえない。例えば、85アミノ酸のクエリー配列は、100アミノ酸の標的配列と多くとも85%同一でありうる。

【0132】

本開示の方法の工程a)に関して、PODXLの量の増加は、典型的には試料値の増加をもたらす、その逆はない。しかしながら、ある態様において、評価した量は、予め決定した数の別の試料値のいずれかに対応しうる。そのような態様において、第1の量と第2の増加した量は、同じ試料値に対応しうる。いずれにせよPODXLタンパク質の量の増加は、本開示の文脈において試料値の減少をもたらさないだろう。

【0133】

しかしながら、不都合でも同等に、評価した量は、工程b)およびc)間の定量が逆転する場合は試料値と反比例するかもしれない。例えば、用語「試料値が基準値より高い場合は」が「試料値が基準値より低い場合は」で置き換えられる場合は、工程b)およびc)間の定量が逆転する。

【0134】

本開示の文脈において、「予後」は、疾患およびその治療の経過または結果の予測を表す。例えば、予後は、特に、疾患から回復および生存する可能性の決定、および対象の期待生存時間の予測も表しうる。予後は、未来の期間、例えば3年間、5年間、10年間、または他のあらゆる期間の対象の生存可能性を確定することを伴うことがある。予後は、さらに単一の値または種々の値により表されるかもしれない。

【0135】

さらに、本開示の方法の文脈において、「先に得られた」は、該方法を行う前に得られたことを表す。したがって、対象から先に得られた試料を方法に用いる場合は、該方法は

10

20

30

40

50



対象由来の試料を得ることを含まず、試料は該方法とは別の工程で対象から先に得られた。治療方法を除く本開示の方法および使用は、特記しない限り、完全にex vivoで行うことを示しうる。さらに、本開示の文脈において、「膀胱癌を有する哺乳類対象」は、原発膀胱腫瘍を有する哺乳類対象または原発膀胱腫瘍が除去された哺乳類対象を表す（ここで、腫瘍の除去はあらゆる適切なタイプの外科手術または療法により腫瘍を除去することを表す）。本開示の方法および使用の局面において、「膀胱癌を有する哺乳類対象」は、哺乳類対象が、該方法の使用または実施時点で膀胱癌を有すると疑われ、膀胱癌診断が後で確定した場合も含む。

【0136】

さらに、本開示の文脈において、「予め決定した基準値」は、予後または対象に適した治療戦略の意思決定または結論づけに適することがわかった予め決定した値を表す。

10

【0137】

また、本開示の文脈において、基準予後と「関連がある」基準値は、実験データおよび/または臨床的に関連する前提に基づく対応する基準予後に割り当てられる基準値を表す。例えば、該基準値は、対象の関連群の平均PODXL値であり、該基準予後は同じ群の平均生存でありうる。さらに、該基準値は、基準値を示す対象群の予後データから直接得られる基準予後に割り当てられる必要はない。基準予後は、例えば、基準値またはそれ以下の値を示す対象の予後に対応しうる。すなわち、基準値が0~2の尺度で1であれば、基準予後は0または1の値を示す対象の予後でありうる。したがって、基準予後は利用可能なデータの性質にも適応しうる。さらに上記のごとく、基準予後はさらに他のパラメーターにも適合しうる。

20

【0138】

上記局面の方法の工程a)は、試料の少なくとも部分中に存在するPODXLの量を評価し、該量に対応する試料値を決定することを含む。「該試料の少なくとも部分」は、予後を確認し、または適切な治療について結論づけるための試料の関連部分を表す。当業者は、該方法を実施するときに存在する環境下で関連する部分を理解する。例えば、細胞を含む試料を評価する場合は、当業者は試料の腫瘍細胞のみまたは腫瘍細胞の核のみを考慮することができる。

【0139】

さらに、工程a)で量を評価し、該量に対応する試料値を決定する。したがって、PODXLの量の正確な測定は試料値を得るのに必要ではない。例えば、PODXLの量は、作製し染色した組織試料の肉眼検査により評価することができ、次いで試料値を評価量に基づいて、例えば高いまたは低いと分類することができる。

30

【0140】

本開示の化学療法は、例えば、エピルピシン、ゲムシタピン、および/またはマイトマイシンの適用でありうる。化学療法の他の例は、白金を用いた治療、例えば、カルボプラチン、パラプラチン、オキサリプラチン、サトラプラチン、ピコプラチン、またはシスプラチンの適用である。適用可能な化学療法剤のさらなる他の例は、ドセタキセル、メトトレキセート、ビンブラスチン、ドキソルピシン、マイトマイシンC、チオテパ、バルブピシン、およびビンフルニンである。

40

【0141】

シスプラチンは、メトトレキセート、ビンブラスチン、および/またはドキソルピシンと組み合わせて適用することができる。これら薬剤のすべての組み合わせ（MVACということがある）は、通常、種々の副作用を伴うにも関わらず（予後不良の）進行疾患の症例に適用されることがある。シスプラチンは、ゲムシタピンと組み合わせて適用することもできる。ゲムシタピンは、特に対象がシスプラチンを許容しない場合にカルボプラチンと組み合わせて適用することもできる。

【0142】

対象が早期膀胱癌と診断された場合、治療を担当する医師は膀胱切除を適用するか否かを決定することが困難かもしれない。図6に示すように、比較的予後不良の早期膀胱癌対

50

象群は本開示の方法で同定することができ、そのような予後不良の対象は、癌が早期であっても膀胱切除が適切と考えられるかもしれない。すなわち、本発明の方法は、早期膀胱癌（例えばTNM TaまたはT1期の癌）の対象と特に関連があるかもしれない。

【0143】

さらに、医師は、侵襲性膀胱癌を有する対象（例えば、T2期の膀胱癌）に化学療法を適用するか否かを決定するのが困難なことがある。そのような場合、高PODXL値は医師に化学療法の適用を助言し、低PODXL値は医師にそのような治療を止めることを助言するかもしれない。したがって、PODXL高T2N0膀胱癌対象は、該期の癌を有する対象が通常そのような治療を受けないにも関わらずネオアジュバント化学療法を受けるかもしれない。従って、本開示のある態様において、膀胱癌はT2期である（図3Bも参照のこと）。

10

【0144】

PODXLレベルの予後との関連性は、低悪性度、例えば悪性度1~2(図2A参照)または悪性度1~2a(図5A参照)の膀胱癌で特に強調される。しかしながら、PODXLレベルも高悪性度、例えば悪性度3(図2B参照)または悪性度2B~3(図5B参照)の癌の生存と有意な関連がある。

【0145】

本開示の態様では、予後は生存の可能性であり、「生存」を測定する種々の方法がある。本開示の生存は、例えば全生存(図1~6参照)、無進行生存(図7A参照)、または疾患特異的生存(図7B参照)でありうる。無再発生存でもありうる。さらに、「生存」は、種々の期間、例えば5、10、または15年間にわたり測定されることがある。したがって、生存は5年、10年、または15年生存でありうる。当業者は、基準予後を用いる場合は対象の予後と同じタイプであることを理解する。

20

【0146】

上記局面の方法の態様では、試料は体液試料でありうる。例えば、体液試料は、血液、血漿、血清、脳脊髄液、尿、リンパ、精液、および滲出液からなる群から選ぶことができる。あるいはまた、該試料は細胞試料または排泄物試料でありうる。

【0147】

PODXLタンパク質レベルは、好ましくは細胞で測定する。したがって、体液、細胞試料、または排泄物試料は、例えば腫瘍細胞などの細胞を含みうる。

【0148】

上記局面の方法のさらなる態様では、試料は、組織試料、例えば膀胱組織試料、例えば膀胱腫瘍組織試料（例えば生検由来の）、または外科手術またはTUR-Bで除去した標本でありうる。したがって、膀胱の経尿道切除を実施した後に試料を得、本発明の方法を実施することができる。

30

【0149】

本発明者らは、侵襲性腫瘍表面の腫瘍細胞のサブセットにおけるPODXL発現が予後の確定または治療の選択と特に関連しうること気づいた。腫瘍細胞のそのようなサブセットを「腫瘍出芽細胞」ということがある。例えば、Prall and Hase et al. (Prall F: Tumor budding in colorectal carcinoma. Histopathology 2007, 50(1): 151-162、およびHase K et al: Prognostic value of tumor "budding" in patients with colorectal cancer. Dis Colon Rectum 1993, 36(7): 627-635)参照のこと。したがって、工程a)の評価は該試料の腫瘍出芽細胞に限定されるかもしれない。

40

【0150】

さらに、本発明者らは、PODXLタンパク質の膜または細胞質、特に膜での発現が予後の決定または治療の選択と関連があることに気づいた。したがって、工程a)の評価は、該試料の腫瘍細胞などの細胞の細胞質および/または膜に限定されるかもしれない。

【0151】

したがって、組織試料を試験する場合は、腫瘍細胞、例えば腫瘍出芽細胞の膜のみが考慮されるかもしれない。

【0152】

下記実施例中の組織試料は、ヒトの男性と女性由来であり、本発明者らは、PODXLタン

50

パク質の予後との関連性が対象の性別と無関係であることをみいだした。したがって、上記局面の方法の対象はヒトであり得、さらに上記局面の方法の対象は男性または女性でありうる。

【0153】

上記局面に従って該方法を実施する場合は、工程a)においてPODXLタンパク質が試料中に存在するか否かを確定すればよいので0を基準値として用いるのが好都合かもしれない。図面は、膜発現のみを考慮する場合、0の値は、予後が著しく異なる2つのサブグループを確定するための実用的カットオフ値であることを示す。

【0154】

したがって、上記局面の方法の態様において、工程a)の試料値は、試料中の腫瘍細胞の膜の検出可能なPODXLタンパク質に対応する1、または試料中の腫瘍細胞の膜の検出不能なPODXLタンパク質に対応する0でありうる。したがって、そのような態様において、該試料の評価はデジタルであり、PODXLタンパク質は存在するかまたは存在しないのいずれかと考えられる。本開示の文脈において、「検出不能なPODXLタンパク質」は、通常の実験環境で工程a)を行う人や装置により検出可能でないほどに小さいPODXLタンパク質の量を表す。「通常の実験環境」は、当業者が本開示の方法を行うために適切と考える実験的方法および技術を表す。

【0155】

基準値より高いPODXLタンパク質の試料値、または該試料値が得られる対象は、本明細書において「PODXLタンパク質が高い」ということがある。さらに、基準値より低いまたは同等のPODXLタンパク質の試料値、または該試料値が得られる対象は、本明細書において「PODXLタンパク質が低い」ということがある。

【0156】

本開示の文脈において、用語「試料値」および「基準値」は、広義に解釈すべきである。これらの値を得るためのPODXLの定量は、自動的方法、試料の肉眼検査や顕微鏡検査に基づくスコアリングシステム、またはその組み合わせにより行うことができる。しかしながら、当業者、例えば組織病理学の分野の当業者は、例えばPODXLタンパク質発現のために調製し染色した組織スライドの検査により試料値および/または基準値を決定することもできる。

【0157】

したがって、試料値が基準値より高いとの決定は、試料組織スライドがより濃く染まり、および/または基準組織スライドより染色細胞分画が大きいことを肉眼検査や顕微鏡検査で決定することができる。該試料値は、文字的基準（例えば言葉で記載した基準値）または基準写真により得られた基準と比較することもできる。したがって、試料値および/または基準値は、場合により当業者が検査や比較により予想する心的値（mental value）でありうる。

【0158】

例えば、当業者は、試料をPODXLタンパク質が高いかまたは低いと分類することができ、試料を、先に検査した基準試料より多くのPODXLタンパク質を含む場合は高いと分類し、少ないかまたは同等のものを含む場合は低いと分類する。試料および必要に応じて基準試料を例えばPODXLタンパク質選択的な抗体を含む染色溶液で染色することによりそのような評価を助けることができる。

【0159】

本開示の方法の工程の1またはそれ以上を装置を用いて実施することができる。例えば、工程a)および所望により工程b)を自動分析装置を用いて実施することができ、そのような装置は免疫組織化学分析に適合したプラットフォームに基づきうる。例として、該対象由来の1またはそれ以上の腫瘍組織試料を手作業で免疫組織化学分析用に調製し、次いで自動分析装置にロードして工程a)の試料値を得、所望により工程b)の基準値との比較も行う。次に、分析を行うオペレーター、分析を指示する医師、または装置それ自体が工程c)の結論をだすことができる。したがって、工程c)の結論をだすのに適したソフトウェアを

10

20

30

40

50

該装置で実行することができる。

【0160】

対象から得られる試料値との比較に用いるための、膀胱癌対象の予後の確定または治療の意思決定に適切な基準値を種々の方法で得ることができる。本開示の知見に基づいて、当業者は過度な負担なしに本開示の方法を実施するための適切な基準値を得ることができる。

【0161】

上記局面の方法を実施する者は、例えば望む情報と該基準値を適合させることができる。例えば、該基準値を最も重要な予後情報、例えば第1の局面の第1群と第2群の生存における最大の差に対応するPODXLタンパク質高生存曲線とPODXLタンパク質低生存曲線の最大の分離(図面参照)を得るために適合させることができる。あるいはまた、該基準値は、特に予後不良の対象群を選び出すように選ぶことができる。

【0162】

上記局面の方法の態様において、該基準値は、該方法の対象の健康組織、例えば健康膀胱組織、または間質組織中のPODXLタンパク質の発現量に対応しうる。別の例として、該基準値は、別の同等の対象由来の正常組織の標準試料を用いて測定したPODXLタンパク質の発現量により得ることができる。別の例として、該基準値は、腫瘍細胞を含む基準試料、例えば膀胱腫瘍組織などの腫瘍組織の基準試料において測定されたPODXLタンパク質の発現量により得ることができる。基準試料のタンパク質発現量は好ましくは予め確定することができる。

【0163】

さらに、該基準値は、例えば、PODXLタンパク質の予め決定または制御された量を発現する癌細胞株などの細胞株を含む基準試料において測定されたPODXLタンパク質発現量により得ることができる。当業者は、例えばRhodes et al. (2006) The biomedical scientist, p 515-520の記載に基づいてそのような細胞株を得る方法を理解する。

【0164】

したがって、該基準値は、予め決定した量のPODXLタンパク質を発現する細胞を含む基準試料中の測定されたPODXLタンパク質の量により提供されうる。したがって、本開示の方法の態様において、該基準値は、基準試料中のPODXLタンパク質の発現量に対応する予め決定した値でありうる。

【0165】

しかしながら、基準試料中のPODXLタンパク質の量は、該基準値に直接対応する必要はない(これはさらに下記で考察する)。該基準試料は、種々の基準値を評価する方法を実施する者を助けるPODXLタンパク質の量も提供しうる。したがって、基準試料は、「陽性」基準値および/または「陰性」基準値を提供することにより該基準値の心象を与える助けとなりうる。例えば、腫瘍細胞の膜にPODXL発現陽性のある基準試料(陽性基準)と腫瘍細胞にPODXL発現を欠く別の基準試料(陰性基準)が提供されうる。ここで、後者の基準試料は実際の基準値も提供しうる。

【0166】

試料、例えば対象から先に得られた試料または基準試料中のPODXLタンパク質を定量するためのある代替法は、あるレベルにわたりPODXLタンパク質発現を示す試料中の細胞分画を測定することである。該分画は、例えば、全細胞のPODXLタンパク質発現を考慮する「細胞分画」；細胞の細胞質のみのPODXLタンパク質発現を考慮する「細胞質分画」；または細胞の膜のみのPODXLタンパク質発現を考慮する「膜分画」でありうる。細胞分画、細胞質分画、または膜分画は、例えば関連細胞ポピュレーションの<1%、1~50%、>50%免疫反応細胞と分類することができる。「膜分画」は、膜の陽性染色を示す試料中の関連細胞のパーセンテージに対応し、膜の明確な免疫反応性を陽性とみなし、膜の免疫反応性なしを陰性とみなす。病理学の分野の当業者は、該方法を実施する際に該条件下で関連するいずれの細胞が存在するかを理解し、その一般的知識と本開示の開示に基づいて細胞分画、細胞質分画、または膜分画を決定することができる。該関連細胞は、例えば侵襲領

域の腫瘍細胞でありうる。

【0167】

試料、例えば対象から先に得られた試料または基準試料中のPODXLタンパク質を定量するための別の代替法は、該試料の全体的染色強度を測定することである。該強度は、例えば、全細胞のPODXLタンパク質発現を考慮する「細胞強度」；細胞の細胞質のみのPODXLタンパク質発現を考慮する「細胞質強度」；または細胞の膜のみのPODXLタンパク質発現を考慮する「膜強度」でありうる。膜強度測定の結果は、以下のごとく分類することができる：なし（欠如）＝該試料の関連細胞の膜における全体的免疫反応性なし、弱＝該試料の関連細胞の膜における全体的免疫反応性がわずか、中等度＝該試料の関連細胞の膜における全体的免疫反応性が中等度、または強＝該試料の関連細胞の膜における全体的免疫反応性が明確で強い。当業者は、該条件下で関連するいずれの細胞が存在するかを理解し、その一般的知識と本開示の開示に基づいて細胞強度、細胞質強度、または膜強度を決定することができる。該関連細胞は、例えば侵襲領域の腫瘍細胞でありうる。

10

【0168】

本発明者らは、PODXLタンパク質の膜発現が予後の確定と特に関連があることをみいだした。

したがって、上記局面の方法の態様において、該基準値は、膜分画、膜強度、またはその組み合わせでありうる。したがって、該試料値は、膜分画、膜強度、またはその組み合わせでありうる。

【0169】

20

例えば、該基準値は膜強度なしまたは弱でありうる。また、該基準値は、膜分画が25%またはそれ以下、例えば20%またはそれ以下、例えば15%またはそれ以下、例えば10%またはそれ以下、例えば5%またはそれ以下、例えば2%またはそれ以下、例えば1%またはそれ以下、例えば0%でありうる。ある態様において、該試料値は以下のごとく分類される：

陰性(0)；

任意の割合の細胞が弱い細胞質陽性(1)；

任意の割合の細胞が中程度の細胞質陽性(2)；

1～50%の細胞が明確な膜陽性(3)；または

>50%の細胞が明確な膜陽性(4)。

30

そのような態様では、2が適切な表基準値でありうるが、これは膜の陽性発現を示す対象がPODXLが高いと考えられることを意味する。

【0170】

当業者は、分画および強度の種々の組み合わせまたは関数、または他の値を本開示の枠組み内の基準値として用いることができることを理解する。したがって、該基準値は、2およびおそらくそれ以上の分類を含むかもしれない。一般的に、該基準値の選択は、染色方法、例えば用いる抗PODXL抗体、および染色試薬に依存しうる。

【0171】

本開示にしたがって、病理学者などの当業者は、分画、例えば、細胞分画、細胞質分画、または膜分画、または強度、例えば、細胞強度、細胞質強度、または膜強度を得る評価の実施方法を理解する。例えば、当業者は、ある分画または強度の出現を実証するために予め決定した量のPODXLタンパク質を含む基準試料を用いることができる。しかしながら、基準試料は、実際の基準値をもたらすために用いるだけでなく、該基準値に対応する量より高い量のPODXLタンパク質を有する試料の例をもたらすためにも用いることができる。例として組織化学染色、例えば免疫組織化学染色では、当業者は、高量のPODXLタンパク質を有するかまたは膜PODXL発現を示す染色試料の出現を実証するために基準試料を用いることができる。したがって、そのような基準試料は陽性試料である。したがって、当業者は、低量のPODXLタンパク質を有する試料の出現、例えば該基準値に対応する量のPODXLタンパク質を有する試料の出現を評価することができる。換言すれば、当業者は、標準試料より低いPODXLタンパク質の量に対応する基準値の心象をもたらすために標準試料を

40

50

用いることができる。あるいはまたもしくは補足として、そのような評価において、当業者は、該試料の出現を実証するために低量のPODXLタンパク質を有するか検出可能なPODXLタンパク質を欠く別の基準試料を例えば「陰性基準」として用いることができる。

【0172】

例えば、1%の膜分画を基準値として用いる場合は、以下の2つの基準試料を用いる：検出可能なPODXLタンパク質のない第1基準試料；および基準値より高い少なくとも50%の膜分画に対応する量のPODXLタンパク質を有する第2標準試料。

【0173】

したがって、該評価において、当業者は、高量のPODXLタンパク質を有する試料の出現を実証するために基準試料を用いることができる。そのような基準試料は、高量のPODXLタンパク質を発現する組織を含む試料、例えばPODXLタンパク質の予め確定した高発現を有する膀胱腫瘍組織を含む試料でありうる。

10

【0174】

上記のように、調節された量のPODXLタンパク質を発現する細胞株を基準、特に陽性基準として用いることができる。

1またはそれ以上の写真を「基準試料」とすることもできる。例えば、そのような写真は、ある一定の膜強度および/または分画を示すある一定の条件である一定の抗体で染色した腫瘍組織スライドの例を示すかもしれない。「基準試料」に関する上記記載は写真に準用する。

【0175】

20

ある態様において、上記局面の方法の工程a)は、以下を含みうる：

対象から生物物質を得、該試料を得るために生物試料の関連部分を切除または選択し、所望により工程a)の評価を促進するため試料を固相上に配置する。したがって、工程a)は、例として以下を含む：該対象の膀胱由来の組織物質を得、所望によりパラフィンまたはホルマリン中に組織物質を固定し、組織物質を組織処理して該試料を構成する切片を得、所望により該試料を顕微鏡検査用の透明スライド、例えばガラススライド上にマウントする。

【0176】

上記局面の方法の態様において、PODXLタンパク質は、PODXLタンパク質と選択的に相互作用することができる検出可能および/または定量可能な親和性リガンドを試料に適用して検出および/または定量することができる。親和性リガンドの適用は、該親和性リガンドが試料中のPODXLタンパク質と結合するのを可能にする条件下で行う。

30

【0177】

より詳細には、上記局面の方法のある態様の工程a)は以下を含む：

a1) 評価するPODXLタンパク質との選択的相互作用を可能にする定量可能な親和性リガンドを試料に適用し、ここで、該適用は、該親和性リガンドと該試料中に存在するPODXLタンパク質との結合を可能にする条件下で行う；

a2) 非結合親和性リガンドを除去し；そして

a3) 該試料と結合したままの親和性リガンドを定量して該量を評価する。

【0178】

40

「該試料と結合したままの親和性リガンド」は、工程a2)で除去されなかった親和性リガンド、例えば該試料と結合した親和性リガンドを表す。ここで、該結合は、例えば抗体と抗原の相互作用でありうる。

【0179】

しかしながら、a2)の非結合親和性リガンドの除去、例えば洗浄は、必ずしも必要ではない。したがって、上記局面の方法のある態様において、工程a)は以下を含みうる：

a1) 評価するPODXLタンパク質との選択的相互作用を可能にする定量可能な親和性リガンドを試料に適用し、ここで、該適用は、該親和性リガンドと該試料中に存在するPODXLタンパク質との結合を可能にする条件下で行う；

a11) 該試料と結合した親和性を定量して該量を評価する。

50

## 【0180】

本開示の文脈において、例えば親和性リガンドとその標的または抗原との「特異的」または「選択的」相互作用は、該相互作用が特異的と非特異的、選択的と非選択的相互作用の区別が意味を持つようになることを意味する。2つのタンパク質間の相互作用は解離定数により測定されることがある。解離定数は、2分子間の結合強度（または親和性）を説明する。典型的には、抗体とその抗原間の解離定数は $10^{-7} \sim 10^{-11}$ Mである。しかしながら、高特異性/選択性は必ずしも高親和性を必要としない。低親和性（モル範囲で）の分子は、その対応物に関して、はるかに高親和性の分子と同様に選択的/特異的であることが示された。本開示については、特異的または選択的相互作用は、特定の方法を用いて、生物試料、例えば組織試料または天然または処理生物液体の液体試料中に他のタンパク質が存在する所定の条件下で特異タンパク質、標的タンパク質の存在および/または量を決定することができる。言い換えると、特異性または選択性は、関連タンパク質を区別する能力である。例えば、抗体の特異性または選択性は、それぞれタンパク質アレイセットアップ、サスペンションビーズアレイ、および多重競合アッセイを用いて決定することができる（例えば、WO2011/051288の実施例、セクション2を参照のこと）。特性および選択性の決定法は、Nilsson P et al. (2005) Proteomics 5 : 4327-4337にも記載されている。

10

## 【0181】

適切な親和性リガンドを選択または製造し、検出および/または定量用の適切なフォーマットおよび条件を選択することは当業者の能力内と考えられる。それにも関わらず、有用でありうる親和性リガンドの例、検出および/または同定用のフォーマットおよび条件の例を例示のために以下に示す。

20

## 【0182】

したがって、本開示の態様において、親和性リガンドは、抗体、その断片、およびその誘導体からなる群から選ばれうる。したがって、親和性リガンドは、免疫グロブリン足場に基づくかもしれない。抗体およびその断片または誘導体は通常、単離される。また、それらは精製された抗原でありうる。抗体には、ネズミ、ウサギ、人を含むあらゆる起源のモノクローナルおよびポリクローナル抗体、および異なる種由来の配列を含むキメラ抗体、例えば部分的ヒト化抗体、例えば部分的ヒト化マウス抗体が含まれる。ポリクローナル抗体は、動物を選択した抗原で免疫することにより製造する。特異性が限定されたモノクローナル抗体は、KoehlerおよびMilstein (Koehler GおよびMilstein C (1976) Eur. J. Immunol. 6 : 511-519)が開発したハイブリドーマ技術を用いて製造することができる。本開示の抗体断片および誘導体は、それらがその抗体の断片または誘導体である抗体と同じ抗原（例えば、PODXLタンパク質）と選択的に相互作用することができる。抗体断片および誘導体は以下のものを含む：完全免疫グロブリンタンパク質の重鎖第1定常ドメイン(CH1)、軽鎖の定常ドメイン(CL)、重鎖の可変ドメイン(VH)、および軽鎖の可変ドメイン(VL)からなるFab断片；2つの可変抗体ドメインVHおよびVLからなるFv断片(Skerra AおよびPlueckthun A (1988) Science 240 : 1038-1041)；フレキシブルペプチドリンカーにより一緒に結合した2つのVHおよびVLドメインからなる1本鎖Fv断片(scFv)(Bird REおよびWalker BW (1991) Trends Biotechnol. 9 : 132-137)；Bence Jonesダイマー(Stevens FJ et al. (1991) Biochemistry 30 : 6803-6805)；ラクダ重鎖ダイマー(Hamers-Casterman C et al. (1993) Nature 363 : 446-448)、および単一可変ドメイン(Cai XおよびGaren A (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93 : 6280-6285；Masat L et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91 : 893-896)、および単一ドメイン足場、例えばテングザメ由来の新抗原レセプター(NAR)(Dooley H et al. (2003) Mol. Immunol. 40 : 25-33)、および可変重ドメインに基づくミニボディ(Skerra AおよびPlueckthun A (1988) Science 240 : 1038-1041)。

30

40

## 【0183】

配列番号1は、免疫用に設計され、例えば、E. coliにおいて十分な発現を保証するために貫膜領域を欠き、あらゆるシグナルペプチドを欠くように設計された（それらは成熟タンパク質では切断されるためである）。したがって、本開示の抗体またはその断片または

50

誘導体は、例えば、アミノ酸配列が配列番号1の配列を含む、好ましくはからなるタンパク質で動物、例えばウサギを免疫する工程を含む方法により得ることができるものでありうる。あるいはまた、配列番号8のアミノ酸配列を有するペプチドをこの目的に用いることができる。別の代替物は、配列番号13または配列番号14のアミノ酸配列を有するペプチドである。例えば、免疫方法は、Freundの完全アジュバント中の該タンパク質またはペプチドで一次免疫することを含みうる。また、該免疫方法は、さらに、Freundの不完全アジュバント中の該タンパク質またはペプチドで2~6週間間隔で少なくとも2回ブーストすることを含みうる。該標的に対する抗体、または断片、またはその誘導体の製造方法は当該分野で知られている。

#### 【0184】

本開示の文脈において、「抗原精製抗体」は、その自身の抗原でアフィニティ精製し、他の抗血清タンパク質および非特異抗体からそのような抗原精製抗体を分離したポリクローナル抗体の1つまたはポピュレーションである。このアフィニティ精製は、その抗原と選択的に結合する抗体を生じる。本開示の場合において、ポリクローナル抗血清は、標的タンパク質に選択的な抗原精製抗体を得るための2工程イムノアフィニティベースのプロトコルにより精製される。抗原断片の一般的アフィニティタグに対する抗体を、固定化タグタンパク質を捕捉剤として用いる一次除去工程にて除去する。該第1除去工程後、血清を、該抗原を捕捉剤に用いる第2アフィニティカラムに流し、該抗原に特異的な抗体を豊富化する (Nilsson P et al. (2005) *Proteomics* 5 : 4327-4337も参照のこと)。

#### 【0185】

ポリクローナルおよびモノクローナル抗体ならびにそれらの断片および誘導体は、上記方法の局面に従ったPODXLタンパク質の検出および/または定量などの選択的生体分子認識を必要とする適用における親和性リガンドの伝統的選択を表す。しかしながら、当業者は、選択的結合リガンドの高スループット生成と低コスト製造システムの需要が増していることにより、新たな生体分子ダイバーシティ技術がここ10年間で開発された。これは、生体分子認識適用において結合リガンドとして等しく有用であることが分かっており、免疫グロブリンと共にまたはその代わりに用いることができる免疫グロブリンおよび非免疫グロブリン起源の新しいタイプの親和性リガンドの生成を可能にした。親和性リガンドの選択に必要な生体分子ダイバーシティは複数の考えられる足場分子の一つの組み合わせ操作により生成することができ、次いで、特異的および/または選択的亲和性リガンドを適切な選択プラットフォームを用いて選択する。該足場分子は、免疫グロブリンタンパク質起源 (Bradbury AR、およびMarks JD (2004) *J. Immunol. Meths.* 290 : 29-49)、非免疫グロブリンタンパク質起源 (Nygren P、およびSkerra A (2004) *J. Immunol. Meths.* 290 : 3-28)、またはオリゴヌクレオチド起源 (Gold L et al. (1995) *Annu. Rev. Biochem.* 64 : 763-797) でありうる。

#### 【0186】

多数の非免疫グロブリンタンパク質足場が新規結合タンパク質の開発において支持構造として用いられた。本開示に従って用いるためのPODXLタンパク質に対する親和性リガンドを生成するのに有用なそのような構造の非限定的例には以下のものがある：ブドウ球菌プロテインAおよびそのドメインおよび該ドメインの誘導体、例えば、プロテインZ (Nord K et al. (1997) *Nat. Biotechnol.* 15 : 772-777) ; リポカリン (Beste G et al. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 : 1898-1903) ; アンキリン反復ドメイン (Binz HK et al. (2003) *J. Mol. Biol.* 332 : 489-503) ; セルロース結合ドメイン (CBD) (Smith G P et al. (1998) *J. Mol. Biol.* 277 : 317-332 ; Lehtio J et al. (2000) *Proteins* 41 : 316-322) ; 結晶 (Fiedler U、およびRudolph R、WO01/04144) ; 緑色蛍光タンパク質 (GFP) (Peelle B et al. (2001) *Chem. Biol.* 8 : 521-534) ; ヒト細胞傷害性Tリンパ球関連抗原4 (CTLA-4) (Hufton SE et al. (2000) *FEBS Lett.* 475 : 225-231 ; Irving RA et al. (2001) *J. Immunol. Meth.* 248 : 31-45) ; プロテアーゼ阻害剤、例えばKnottinタンパク質 (Wentzel A et al. (2001) *J. Bacteriol.* 183 : 7273-7284 ; Baggio R et al. (2002) *J. Mol. Recognit.* 15 : 126-134)、およびKunitzドメイン (Roberts BL et al. (199

10

20

30

40

50



2) Gene 121 : 9-15 ; Dennis MS、および Lazarus RA (1994) J. Biol. Chem. 269 : 22137-22144) ; PDZドメイン (Schneider S et al. (1999) Nat. Biotechnol. 17 : 170-175) ; ペプチドアプタマー、例えばチオレドキシン (Lu Z et al. (1995) Biotechnology 13 : 366-372 ; Klevenz B et al. (2002) Cell. Mol. Life Sci. 59 : 1993-1998) ; ブドウ球菌スクレアーゼ (Norman TC et al. (1999) Science 285 : 591-595) ; テンダミスタット (McConnell SJ、および Hoess RH (1995) J. Mol. Biol. 250 : 460-479 ; Li R et al. (2003) タンパク質 Eng. 16 : 65-72) ; フィブロネクチンタイプIIIドメインに基づくトリネクチン (Koide A et al. (1998) J. Mol. Biol. 284 : 1141-1151 ; Xu L et al. (2002) Chem. Biol. 9 : 933-942) ; およびジンクフィンガー (Bianchi E et al. (1995) J. Mol. Biol. 247 : 154-160 ; Klug A (1999) J. Mol. Biol. 293 : 215-218 ; Segal DJ et al. (2003) Biochemistry 42 : 2137-2148)。

10

## 【 0 1 8 7 】

非免疫グロブリンタンパク質足場の上記例には、新規結合特異性を生成するのに用いる単一無作為化ループを示す足場タンパク質、該タンパク質表面から突き出る側鎖が新規結合特異性を生成するために無作為化される固定二次構造を有するタンパク質足場、および新規結合特異性を生成するために用いる非隣接超可変ループ領域を示す足場が含まれる。

## 【 0 1 8 8 】

非免疫グロブリンタンパク質に加えて、オリゴヌクレオチドも親和性リガンドとして用いることができる。アプタマーまたはデコイと呼ばれる1本鎖核酸は、明確な三次元構造にホールドし、その標的と高親和性および特異的に結合する。(Ellington ADおよび Szostak JW (1990) Nature 346 : 818-822 ; Brody ENおよび Gold L (2000) J. Biotechnol. 74 : 5-13 ; Mayer Gおよび Jenne A (2004) BioDrugs 18 : 351-359)。該オリゴヌクレオチドリガンドは、RNAまたはDNAのいずれかであることができ、広範囲の標的分子クラスと結合することができる。

20

## 【 0 1 8 9 】

上記足場構造のいずれかの変異体のプールから望む親和性リガンドを選択するために、多くの選択プラットフォームが最適な標的タンパク質に対する特異的新規リガンドを単離するのに利用可能である。選択プラットフォームには、限定されるものではないが以下のものが含まれる：ファージディスプレイ (Smith GP (1985) Science 228 : 1315-1317)、リボソームディスプレイ (Hanes Jおよび Plueckthun A (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94 : 4937-4942)、酵母2ハイブリッド系 (Fields Sおよび Song O (1989) Nature 340 : 245-246)、酵母ディスプレイ (Gai SAおよび Wittrup KD (2007) Curr Opin Struct Biol 17 : 467-473)、mRNAディスプレイ (Roberts RWおよび Szostak JW (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94 : 12297-12302)、細菌ディスプレイ (Daugherty PS (2007) Curr Opin Struct Biol 17 : 474-480、Kronqvist N et al. (2008) Protein Eng Des Sel 1-9、Harvey BR et al. (2004) PNAS 101(25) : 913-9198)、マイクロビーズディスプレイ (Nord O et al. (2003) J Biotechnol 106 : 1-13、W001/05808)、SELEX (System Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) (Tuerk Cおよび Gold L (1990) Science 249 : 505-510)、およびタンパク質断片相補性試験(PCA) (Remy Iおよび Michnick SW (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96 : 5394-5399)。

30

40

## 【 0 1 9 0 】

したがって、本開示の態様において、該親和性リガンドは、上記タンパク質足場のいずれか由来の非免疫グロブリン親和性リガンドまたはオリゴヌクレオチド分子でありうる。

PODXLタンパク質断片 配列番号1は、他のヒトタンパク質との相対性が低いユニークな配列からなり、生成したアフィニティ試薬の交差反応性を最小限にするように設計された。したがって、本開示の態様において、該親和性リガンドは、配列番号1の配列からなるポリペプチドと選択的に相互作用することができるかもしれない。

## 【 0 1 9 1 】

「配列番号1の配列からなるポリペプチドと選択的に相互作用することができる親和性リガンド」は、配列番号1断片とPODXLタンパク質の別の非重複部分からなる断片を区別す

50

ることができる。

#### 【0192】

9エピトープ領域(配列番号4~12)が配列番号1内に同定された。したがって、本開示の態様において、該親和性リガンドは、20アミノ酸またはそれ以下、例えば15アミノ酸またはそれ以下からなる配列番号4~12から選ばれるアミノ酸配列を含むポリペプチドと選択的に相互作用することができるかもしれない。配列番号4~9が好ましい。配列番号8と結合するモノクローナル抗体は、他の抗体に比べてPODXLタンパク質発現の免疫組織化学的評価に特に有益であることが示された。したがって、本開示の態様において、該親和性リガンドは、50アミノ酸またはそれ以下、例えば25アミノ酸またはそれ以下、例えば20アミノ酸またはそれ以下、例えば15アミノ酸またはそれ以下からなる、配列番号8のアミノ酸配列を含むポリペプチドと選択的に相互作用することができるかもしれない。

10

#### 【0193】

PODXLタンパク質と選択的に相互作用することができる親和性リガンドの検出および/または定量は、生物学的相互作用に基づくアッセイにおいて結合試薬を検出および/または同定するための当業者に知られたあらゆる方法で達成することができる。したがって、上記のあらゆる親和性リガンドを用いてPODXLタンパク質の存在を定量的および/または定性的に検出する。これらの「一次」親和性リガンドは、それ自身を種々のマーカーで標識するか、または検出、可視化、および/または定量を可能にする二次標識親和性リガンドにより順に検出することができる。これは、当業者に知られた複数の技術のいずれか1つまたはそれ以上を用い、PODXLタンパク質と相互作用することができる親和性リガンドまたはあらゆる二次親和性リガンドと結合させることができる複数の標識のいずれか1つまたはそれ以上を用いて達成することができ、それ自体いかなる過度な実験も伴わない。

20

#### 【0194】

一次および/または二次親和性リガンドと結合することができる標識の非限定的例には、蛍光色素または金属(例えば、フルオレセイン、ローダミン、フィコエリスリン、フルオレスカミン)、発色団染料(例えばロドプシン)、化学発光化合物(例えばルミナル、イミダゾール)、生物発光タンパク質(例えばルシフェリン、ルシフェラーゼ)、およびハプテン(例えばビオチン)が含まれる。種々の他の有用な蛍光体および発色団はStryer L (1968) Science 162: 526-533、およびBrand L、およびGohlke JR (1972) Annu. Rev. Biochem. 41: 843-868に記載されている。親和性リガンドは、酵素(例えば、ホースラディッシュスーパーオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ラクタマーゼ)、放射性同位体(例えば、<sup>3</sup>H、<sup>14</sup>C、<sup>32</sup>P、<sup>35</sup>S、または<sup>125</sup>I)、および粒子(例えば金)で標識することもできる。本開示の文脈において、「粒子」は、分子の標識に適した金属粒子などの粒子を表す。さらに、親和性リガンドを蛍光半導体ナノ結晶(量子ドット)で標識することもできる。該量子ドットは、優れた量子収量を有し、有機蛍光体に比べてより光安定性であり、より簡単に検出される(Chan et al. (2002) Curr Opin Biotech. 13: 40-46)。種々のタイプの標識を、種々の化学、例えばアミン反応またはチオール反応を用いて親和性リガンドと結合させることができる。しかしながら、アミンおよびチオール以外の反応基、例えばアルデヒド、カルボン酸、およびグルタミンを用いることができる。

30

#### 【0195】

上記方法の局面は、種々の知られたフォーマットおよびセットアップのいずれかに利用することができる、その非限定的例を以下に記載する。

40

病歴に基づいたセットアップにおいて、そのPODXLタンパク質標的と結合した標識親和性リガンドの検出、局在場所、および/または同定には、可視化技術、例えば光学顕微鏡検査または免疫蛍光顕微鏡検査が含まれる。他の方法は、フローサイトメトリーまたはルミノメトリーによる検出を含みうる。

#### 【0196】

対象から除去された生物試料、例えば腫瘍組織試料をPODXLタンパク質の検出および/または定量に用いることができる。生物試料は先に得た試料でありうる。ある方法に先に得た試料を用いる場合は、該方法の工程はヒトまたは動物体では行われぬ。該親和性リガ

50

ンドをPODXLタンパク質の検出および/または定量用の生物試料に適用することができる。この手順は、PODXLタンパク質の検出を可能にするだけでなく、さらにその発現の分布と相対レベルを示しうる。したがって、膜タンパク質発現は、細胞質または核のタンパク質発現と区別することができる。

#### 【0197】

親和性リガンド上の標識の可視化方法には、限定されるものではないが、蛍光定量、ルミノメトリー、および/または酵素技術が含まれる。蛍光標識を特定波長の光に暴露し、次いで特定波長領域の放射光を検出および/または定量することにより蛍光を検出および/または定量する。発光標識親和性リガンドの存在を、化学反応時に生じた発光により検出および/または定量することができる。酵素反応の検出は、化学反応で生じた試料の色変化による。当業者は、種々の異なるプロトコルを適切な検出および/または定量のために修飾することができることが分かっている。

10

#### 【0198】

上記局面の方法の態様において、生物試料を、固相支持体または担体、例えばニトロセルロース、またはそれに適用した生物試料に存在するPODXLタンパク質を固定することができるあらゆる他の固体支持マトリックス上に固定することができる。本発明に有用なあらゆる知られた固相支持マトリックスには、ガラス、炭化水素（例えばセファロース）、ナイロン、プラスチック、ウール、ポリスチレン、ポリエテン（polyethene）、ポリプロピレン、デキストラン、アミラーゼ、フィルム、樹脂、セルロース、ポリアクリルアミド、アガロース、アルミナ、斑糲岩、および磁鉄鉱が含まれる。生物試料の固定後、PODXLタンパク質に特異的な一次親和性リガンドを例えば下記実施例に記載のごとく適用することができる。一次親和性リガンドをそれ自体標識しない場合は、該支持マトリックスを1またはそれ以上の当該分野で知られた適切な緩衝液で洗浄し、次いで二次標識親和性リガンドに暴露し、緩衝液でもう一度洗浄して非結合親和性リガンドを除去することができる。次に、選択的親和性リガンドを常套的方法により検出および/または定量することができる。親和性リガンドに対する結合特性は固相支持体によって異なりうるが、当業者は、ルーチンの実験により各決定のための有効で最適なアッセイ条件を決定することができるはずである。

20

#### 【0199】

したがって、上記局面の方法の態様において、a1)またはa1)の該定量可能な親和性リガンドは、該定量可能な親和性リガンドを認識することができる二次親和性リガンドを用いて検出することができる。したがって、a3)またはa11)の定量は、該定量可能な親和性リガンドに対する親和性を有する二次親和性リガンドにより実施することができる。例として、二次親和性リガンドは、抗体、またはその断片または誘導体でありうる。

30

#### 【0200】

例として、PODXLタンパク質のある利用可能な検出および/または定量法は、親和性リガンドを、後で酵素免疫測定法（例えばEIAまたはELISA）で検出および/または定量することができる酵素と結合させることによる。そのような技術はよく確立されており、その実現は当業者にいかなる過度な困難ももたらさない。そのような方法において、生物試料を、固体物質、またはPODXLタンパク質に対する親和性リガンドに結合した固体物質と接触させ、次いで酵素標識二次親和性リガンドで検出および/または定量する。この後、適切な基質を適切な緩衝液中で酵素標識と反応させて化学部分を生成し、例えば分光光度計、蛍光光度計、ルミノメーターを用いるか、または視覚的手段により検出および/または定量する。

40

#### 【0201】

上記のように一次およびあらゆる二次親和性リガンドを、検出および/または同定を可能にする放射性同位体で標識することができる。本開示の適切な放射標識の非限定的例は、 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、または $^{125}\text{I}$ である。標識親和性リガンドの比活性は、該放射標識の半減期、同位体純度、およびどのように該標識が親和性リガンド内に組み込まれるかに依存する。親和性リガンドは、好ましくはよく知られた技術を用いて標識される(Wensel

50

TGおよびMeares CF (1983) : Radioimmunoimaging and Radioimmunotherapy (Burchiel SW およびRhodes BA編) Elsevier、New York、pp 185-196)。このように放射標識した親和性リガンドを用いてin vivoまたはex vivoで放射活性を検出することによりPODXLタンパク質を可視化することができる。in vivoおよびex vivoで検出するための、例えばガンカメラ、磁気共鳴分光法、または放射断層撮影機能を用いる放射核スキャンニング、ガンマ/ベータカウンター、シンチレーションカウンター、およびX線撮影法はex vivoでも用いる。

#### 【 0 2 0 2 】

本開示の方法を実施するためにキットを用いることができる。したがって、膀胱癌対象の治療法を選択し、または予後を確定するための、以下のものを含むキットを提供する：

- a)PODXLタンパク質と選択的に相互作用することができる定量可能な親和性リガンド；
- b)a)の該定量可能な親和性リガンドの量を定量するのに必要な試薬。

第3の局面のキットの種々の成分は、本開示の方法の局面に関連して上記のごとく選択および特定することができる。

#### 【 0 2 0 3 】

したがって、本開示のキットは、PODXLに対する親和性リガンド、および各標的タンパク質と特異的および/または選択的に結合した後に特異的および/または選択的親和性リガンドを定量するのを助ける他の手段を含む。例えば、該キットは、標的タンパク質と親和性リガンドにより形成された複合体を検出および/または定量するための二次親和性リガンドを含むことができる。該キットは、キットを容易に効率よく用いることができるようにする親和性リガンド以外の種々の補助剤も含みうる。補助剤の例には、免疫試薬キットに一般的に用いられる以下のものが含まれる：キットの凍結乾燥タンパク質成分を溶解または再構成するための溶媒、洗浄用緩衝液、酵素を標識として用いる場合は酵素活性を測定するための基質、パラフィンまたはホルマリン固定組織試料を用いる場合は抗原への接近可能性を促進する標的回収溶液、反応阻止剤などの物質、例えばバックグラウンド染色を減少させるための内因性酵素ブロック溶液、および/または染色対比を増加させる対比染色溶液。

#### 【 0 2 0 4 】

キットの局面の態様において、親和性リガンドは方法の局面と関連して上記のように選択することができる。

上記知見に従って、本発明者らはPODXLタンパク質またはその断片の種々の用途をみいだした。

したがって、本開示の第3の局面として、膀胱癌の予防マーカーとしてのPODXLタンパク質の使用を提供する。

同様に、膀胱癌を有する哺乳類対象に対する比較的予後不良のマーカーとしてのPODXLタンパク質の使用を提供する。

本開示の文脈において、「予後マーカー」は、その存在が予後を示す何らかの物質を表す。したがって、該マーカーはバイオマーカー、例えばヒトタンパク質でありうる。

#### 【 0 2 0 5 】

第3の局面の態様において、PODXLタンパク質は、膀胱癌を有する対象由来の膀胱腫瘍組織試料などの生物試料で提供されうる。

#### 【 0 2 0 6 】

本開示の第4の局面として、膀胱癌を有する哺乳類対象の予後を確定するための予後診断物質の製造、選択、または精製のためのPODXLタンパク質またはその抗原的活性断片の使用を提供する。該使用はex vivoでありうる。

本開示の文脈において、「予後診断物質」は、予後、例えば膀胱癌を有する哺乳類対象の予後の確定に有益な少なくとも1の特性を有する物質を表す。例えば、予後診断物質は、予後マーカーと選択的に相互作用することができるかもしれない。

#### 【 0 2 0 7 】

したがって、予後診断物質は、PODXLタンパク質またはその抗原的活性断片と選択的に

10

20

30

40

50

相互作用することができる親和性リガンドでありうる。そのような親和性リガンドの例は、方法の局面に関連して上記で論じている。

【0208】

本開示の記載に基づいて、当業者は、予後診断物質の製造、選択、または精製におけるPODXLタンパク質または断片の使用方法を理解する。例えば、該使用は、PODXLタンパク質が固定されている固体支持体を用いるアフィニティ精製を含みうる。該固体支持体は、例えばカラムに配置することができる。さらに、該使用は、ポリペプチドが固定されている固体支持体を用いてPODXLタンパク質に特異的な親和性リガンドを選択することを含みうる。そのような固体支持体は、ウェルプレート（例えば96ウェルプレート）、磁性ビーズ、アガロースビーズ、またはセファロースビーズでありうる。さらに、該使用は、デキストランマトリックスを用いるなどの可溶性マトリックスを用いる親和性リガンドの分析、またはBiacore（登録商標）装置などの表面プラズモン共鳴装置の使用を含み得る（ここで、該分析は、例えば多くの潜在的親和性リガンドの固定PODXLタンパク質に対する親和性をモニターすることを含みうる）。

10

【0209】

また、予後診断物質を製造するためのPODXLタンパク質またはその抗原的活性断片は動物の免疫に用いることができる。

【0210】

そのような使用は、以下の工程を含む方法に関しうる：

- i)PODXLタンパク質またはその抗原的に活性な断片を抗原に用いて動物を免疫し；
- ii)免疫動物から予後診断物質を含む血清を得、所望により
- iii)該血清から予後診断物質を単離する。

20

【0211】

あるいはまた、第1工程後の工程は以下でありうる：

- ii')免疫動物から予後診断物質をコードするDNAを含む細胞を得、
- iii')該細胞をミエローマ細胞と融合して少なくとも1のクローンを得、
- iv')該クローンが発現した予後診断物質を得る。

第3または第4の局面の態様において、PODXLタンパク質(またはその断片)のアミノ酸配列は、以下から選ばれる配列を含むかまたはからなりうる：

- i)配列番号1；および
- ii)配列番号1と少なくとも85%同一な配列。

30

【0212】

ある態様において、ii)の配列は、配列番号1と少なくとも90%同一、少なくとも91%同一、少なくとも92%同一、少なくとも93%同一、少なくとも94%同一、少なくとも95%同一、少なくとも96%同一、少なくとも97%同一、少なくとも98%同一、または少なくとも99%同一である。

【0213】

さらに、第3または第4の局面の態様において、PODXLタンパク質のアミノ酸配列は、以下から選ばれる配列を含むかまたはからなりうる：

- i)配列番号2または3；および
- ii)配列番号2または3と少なくとも85%同一な配列。

40

【0214】

ある態様において、ii)の配列は、配列番号2または3と少なくとも90%同一、少なくとも91%同一、少なくとも92%同一、少なくとも93%同一、少なくとも94%同一、少なくとも95%同一、少なくとも96%同一、少なくとも97%同一、少なくとも98%同一、または少なくとも99%同一である。

【0215】

配列番号1の種々の抗原性サブ領域が同定されている。したがって、本開示の態様において、「抗原的に活性な断片」は、25アミノ酸またはそれ以下からなる、配列番号4~12から選ばれるアミノ酸配列を含みうる。さらなる態様において、「抗原的に活性な断片」

50

は、20アミノ酸またはそれ以下、例えば15アミノ酸またはそれ以下からなりうる。配列番号8が上記のごとく好ましい。下記の実施例の4および5項に示すように配列番号13および14も好ましい。

#### 【0216】

本開示の第5の局面として、PODXLタンパク質と選択的に相互作用することができる親和性リガンドを提供する。そのような親和性リガンドの種々の態様は、方法の局面に関連して上記で論じている。

#### 【0217】

本開示の第6の局面として、第4の局面の親和性リガンドの膀胱癌の予後診断物質としての使用を提供する。したがって、該親和性リガンドは膀胱癌対象の予後を確定するのに用いることができる。

10

#### 【0218】

第6の局面の構成として、膀胱癌治療を選択するための第4の局面に従った親和性リガンドの使用を提供する。そのような使用は、例えば対象から先に得た試料の少なくとも部分中のPODXLの量の決定を含むなどex vivoで行うことができる。

#### 【実施例】

#### 【0219】

##### 1. 膀胱癌TMA、コホートI

##### a) 材料と方法

このコホートは、2002年10月1日～2003年12月31日のSkane大学病院(Malmö)の病理学科で尿路上皮癌と最初に診断された、保存腫瘍試料が回収された( $n=110$ )すべての患者の逐次コホートである。該コホートは男性80人(72.7%)と女性30人(27.3%)を含み、年齢中央値は72.86 (39.25～89.87)歳であった。生命状態に対する情報は2010年12月31日までのSwedish Cause of Death Registry(スウェーデン死亡原因記録)から得た。追跡調査は診断日に開始し、死亡、海外移住、または2010年12月31日のいずれか早い時に終了した。追跡調査期間中央値は、全コホートで5.92年間(範囲0.03～8.21)、2010年12月31日に生存している患者( $n=48$ )で7.71年間(範囲7.04～8.21)であった。T期の分布は、48 (43.6%) pTa、24 (21.8%) pT1、37(33.8) pT2、および1(0.9%) pT3であった。18 (16.4%)腫瘍が悪性度I、34(30.9%)が悪性度II、および58 (52.7%)が悪性度IIIであった。この試験の許可はLund大学の倫理委員会から得た。

20

30

#### 【0220】

すべての腫瘍を組織病理学的に再評価し、有資格病理学者により2004年のWHO評点方式に従って分類した。組織マイクロアレイ(TMAs)を半自動アレイ作製装置(TMArrayer、Pathology Devices、Westminister、MD、USA)を用いて構築した。すべての腫瘍試料はデュブリケートの組織コア(1mm)であった。PODXLの免疫組織化学分析のために4 $\mu$ m TMA切片をPTリンクシステム(DAKO、Copenhagen、Denmark)を用いて自動的に前処理し、次いでAutostainer Plus (DAKO、Copenhagen、Denmark)を用い、1:250希釈したPODXLに対するポリクローナル抗体(HPA002210、Atlas Antibodies、Stockholm、Sweden)で染色した。

#### 【0221】

PODXL発現は、陰性(0)、細胞がいかなる割合でも弱細胞質陽性(1)、いかなる割合でも中等度細胞質陽性(2)、1～50%の細胞で明確な膜陽性(3)、および>50%の細胞で明確な膜陽性(4)で記録した。PODXL染色を、臨床および治療成績データに対して盲検的な2人の独立した観察者により評価した。

40

#### 【0222】

スピアマンのローおよびカイ二乗検定を、PODXL発現と臨床病理学的特性の相関の分析に適用した。カプラン・マイヤー分析、および対数順位検定を用いてPODXL発現に応じた階層における5年全生存(OS)の差を示した。Cox比例ハザードモデルを用いて年齢、性別、T期、および悪性度で調整した単変量および多変量分析両方におけるPFS、DSS、および5年OSに対する膜対非膜PODXL発現の影響を評価した。すべての検定は両側であった。p値0.05を有意とみなした。すべての統計分析をIBM SPSS Statistics version 20.0 (SPSS Inc.

50

、Chicago、IL、USA)を用いて行った。

【0223】

b) 結果

抗体最適化および染色後、PODXL発現を103/110(93,6%)症例から得た腫瘍で評価することができた。膜PODXL発現は、主に、主要な侵襲領域の腫瘍細胞のサブセットにみられ、16/103 (15,5%)の症例でみられた。Ta腫瘍に膜PODXL発現はみられなかった。

【0224】

PODXL染色と実証された臨床病理学的因子の関心の分析は、膜PODXL染色とより進行したT期および高悪性度腫瘍の強い顕著な関連を示した。

【0225】

Kaplan-Meier分析、および対数順位検定は、膜PODXLを発現した腫瘍を有する患者(スコア3~4)では腫瘍が膜にPODXLを発現しなかった患者(スコア0~2)と比べてOSが有意に低下している(対数順位  $p < 0.001$ 、図1)ことを示した。これらの関連性は、Cox単変量分析で確認され(HR = 4.56 ; 95% CI = 2.36 ~ 8.84)、年齢、性別、T期、および悪性度で調整した多変量分析においても有意であった(HR = 2.40 ; 95% CI = 1.15 ~ 5.00) (表1参照)。

【0226】

悪性度1および2の腫瘍のみを分析すると(図2A)、膜PODXLを発現した腫瘍を有する患者(スコア3~4)では腫瘍が膜にPODXLを発現しなかった患者(スコア0~2)に比べてまだOSが有意に低下した。同様の相関性が悪性度3の腫瘍でもみられた(図2B)。

【0227】

T1期の腫瘍を別個に分析すると、膜PODXLを発現するT1期の腫瘍を有する患者のOSは、膜PODXLを発現しないT1期の腫瘍を有する患者に比べて有意に低下した(図3A)。同様の傾向がT2期の腫瘍を有する患者でみられた(図3B)。

【0228】

2. 膀胱癌TMA、コホートII

a) 材料と方法

このコホートは、1984~2005年にUppsala大学病院で新たに膀胱癌と診断されたプロスペクティブコホートからの344人の患者を含む。腫瘍標本を遡及的に収集し、pTa腫瘍の主な群を115症例を含むよう減らした。外科手術日から事象または最終経過観察の日までの無進行生存(PFS)、全生存(OS)、および疾患特異的生存(DSS)を計算した。経過観察で非筋肉侵襲性腫瘍の患者を無再発、数回再発、または頻回再発に分類した。数回再発の定義は18カ月間以内に腫瘍の再発が3回未満であり、頻回再発は、同じ期間内に再発が3回またはそれ以上であった。進行は、腫瘍のより高い病期への移行と定義した。非筋肉侵襲性疾患の患者の進行までの期間の中央値は18.0カ月間であった(平均2.0~55.0)。非再発症例と非進行症例の経過観察期間はそれぞれ $\geq 4$ および $\geq 5$ 年であった。本試験の許可をUppsala大学の倫理委員会から得た。

【0229】

TMA構築および免疫組織化学分析は上記I項のコホートIに記載のごとく行った。スピアマンのrhoおよびカイ二乗検定をPODXL発現と臨床病理学的特性の相関分析に適用した。Kaplan-Meier分析および対数順位検定を用いてPODXL発現に応じた階層における無進行生存(PFS)、疾患特異的生存(DSS)、および5年全生存(OS)の差を示した。Cox比例ハザードモデルを用いて年齢、性別、T期、および悪性度で調整した単変量および多変量分析両方のPFS、DSS、および5年OSに対する膜対非膜PODXL発現の影響を評価した。すべての検定は両側であった。p値0.05を有意とみなした。すべての統計分析はIBM SPSS Statistics version 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)を用いて行った。

【0230】

b) 結果

抗体最適化および染色後、PODXL発現を343/344 (99.7%)症例から得た腫瘍で評価した。膜PODXL発現は、主に、主要な侵襲領域の腫瘍細胞のサブセットにみられ、35/343 (10,

10

20

30

40

50

2%)の症例でみられた。1つのTa 腫瘍のみが膜PODXLを発現した。

【 0 2 3 1 】

PODXL染色と実証された臨床病理学的因子の関係分析は、膜PODXL染色とより進行したT期および高悪性度腫瘍の強い有意な関連を示した。カプラン・マイヤー分析および対数順位検定は、膜PODXL発現のある腫瘍(スコア3~4)では膜PODXL発現のない腫瘍(スコア0~2)に比べて5年OSが有意に低下する(対数順位  $p < 0.001$ 、図4)ことを示した。これらの関連は、Cox単変量分析 ( $HR = 3.10$ ; 95%  $CI = 2.03 \sim 4.72$ )において確認され、年齢、性別、T期、および悪性度を調整した多変量分析において有意のままであった( $HR = 2.18$ ; 95%  $CI = 1.39 \sim 3.41$ ) (表2参照)。図5に示すように、低(図5A)および高(図5B)悪性度腫瘍を別個に分析すると、膜PODXL発現のある腫瘍の患者における膜PODXL発現のない腫瘍の患者と比べた有意な5年OSの低下(対数順位  $p < 0.001$ )がまだみられた。同様に、膜PODXL発現のある腫瘍の患者のOSは、膜PODXL発現は、図7に示すようにPFSおよびDSSの有意な低下とも関連があった(いずれも対数順位  $p < 0.001$ ) (無調整 $HR = 4.36$ ; 95%  $CI = 2.67 \sim 7.10$ 、および調整 $HR = 2.70$ ; 95%  $CI = 1.60 \sim 4.55$ ) (表2)。

10

【 0 2 3 2 】

TaおよびT1 腫瘍の患者におけるPODXL発現、24カ月間以内の疾患進行および5年OSの関連を試験した(表3)。この患者の分類における膜PODXL発現のある症例の数が低いにも関わらず、膜PODXL発現は、疾患進行リスクの増加の独立した予測因子であった(単変量  $HR = 6.19$ ; 95%  $CI = 1.42 \sim 26.98$ 、および多変量  $HR = 4.60$ ; 95%  $CI = 1.04 \sim 20.39$ )。さらに、膜PODXL発現は、疾患による死亡リスクの増加の独立した予測因子であった(単変量  $HR = 8.34$ ; 95%  $CI = 3.21 \sim 21.65$ 、および多変量  $HR = 7.16$ ; 95%  $CI = 2.72 \sim 18.81$ )。

20

【 0 2 3 3 】



【表 1】

表1. コホートIにおける臨床病理学的因子およびPODXL発現による5年以内の疾患の相対死亡リスクと全死亡数

	コホートI		
	5年以内の死亡リスク		
		単変量	多変量
	n(事象)	HR(95%CI)	HR(95%CI)
年齢			
連続	103(45)	1.05(1.02-1.08)	1.05(1.01-1.08)
性別			
女性	28(12)	1.00	1.00
男性	75(33)	0.93(0.48-1.80)	1.17(0.57-2.40)
病期			
Ta	44(6)	1.00	1.00
T1	24(16)	6.36(2.48-16.32)	3.61(1.34-9.70)
T2-4	35(23)	8.07(3.27-19.87)	5.84(2.31-14.79)
悪性度			
低	49(9)	1.00	1.00
高	54(36)	5.34(2.56-11.11)	1.60(0.56-4.57)
PODXL発現			
陰性	87(32)	1.00	1.00
陽性	16(13)	4.56(2.36-8.84)	2.47(1.26-4.86)

10

20

30

【 0 2 3 4 】

40

【表 2】

表2. コホートIIにおける臨床病理学的因子およびPODXL発現による5年以内の疾患の相対死亡リスクと全死亡数

コホートII						
	疾患の死亡リスク				5年以内の死亡リスク	
		単変量	多変量		単変量	多変量
	N (事象)	HR (95%CI)	HR (95%CI)	N (事象)	HR (95%CI)	HR (95%CI)
年齢						
連続	300 (101)	1.04 (1.02-1.07)	1.05 (1.03-1.07)	343(170)	1.06 (1.05-1.08)	1.07 (1.05-1.09)
性別						
女性	72 (28)	1.00	1.00	83 (40)	1.00	1.00
男性	228 (73)	0.80 (0.52-1.24)	1.00 (0.64-1.56)	260(130)	0.97 (0.68-1.39)	1.22 (0.85-1.76)
病期						
Ta	104 (13)	1.00	1.00	115(35)	1.00	1.00
T1	97 (25)	2.20 (1.13-4.31)	2.15 (1.10-4.22)	115(52)	1.62 (1.05-2.48)	1.57 (1.02-2.41)
T2-4	99 (63)	8.93 (4.90-16.27)	7.56 (4.09-13.97)	113(83)	4.35 (2.92-6.48)	3.88 (2.57-5.86)
悪性度						
低	75 (7)	1.00	1.00	82 (20)	1.00	1.00
高	225 (94)	5.79 (2.68-12.49)	1.53 (0.59-3.94)	261(150)	3.10 (1.94-4.95)	1.20 (0.68-2.12)
PODXL発現						
陰性	269 (80)	1.00	1.00	308(144)	1.00	1.00
陽性	31 (21)	4.36 (2.67-7.10)	2.70 (1.60-4.55)	35 (26)	3.10 (2.03-4.72)	2.18 (1.39-3.41)

【 0 2 3 5 】

【表 3】

表3. Ta-T1 腫瘍の患者の臨床病理学的因子およびPODXL発現に応じた24カ月以内の相対疾患進行リスクおよび疾患特異的生存

		24カ月以内の疾患進行リスク			疾患の死亡リスク	
		単変量	多変量		単変量	多変量
	N (事象)	HR (95%CI)	HR (95%CI)	N (事象)	HR (95%CI)	HR (95%CI)
年齢						
連続	133 (19)	1.02 (0.98-1.07)	1.01 (0.97-1.06)	201 (38)	1.03 (1.00-1.06)	1.03 (1.00-1.06)
性別						
女性	29 (2)	1.00	1.00	38 (5)	1.00	1.00
男性	104 (17)	2.51 (0.58-10.9)	2.00 (0.46-8.81)	163 (33)	1.81 (0.70-4.65)	1.38 (0.53-3.63)
病期						
Ta	68 (7)	1.00	1.00	104 (13)	1.00	1.00
T1	65 (12)	1.93 (0.76-4.91)	1.31 (0.48-3.6)	97 (25)	2.33 (1.19-4.56)	2.29 (1.16-4.5)
悪性度						
低	48 (3)	1.00	1.00	74 (7)	1.00	1.00
高	85 (16)	3.28 (0.96-11.)	2.96 (0.85-10.31)	127 (31)	3.04 (1.33-6.92)	1.59 (0.59-4.31)
PODXL発現						
非膜	130 (17)	1.00	1.00	194 (33)	1.00	1.00
膜	3 (2)	6.19 (1.42-27.0)	4.60 (1.04-20)	7(5)	8.34 (3.21-21.7)	7.16 (2.7-18.8)

## 【 0 2 3 6 】

## 3)モノクローナル抗体の生成

## a) 材料と方法

WO2011051288の実施例の1項の記載に従って得た精製断片 配列番号1をモノクローナル抗体を製造するための抗原に用いた。抗原をAbSea Biotechnology Ltd (Beijing, China) に送り、簡単には、抗原を3週間間隔でBALB/cマウス(4~6週齢、雌)に皮下注射した。抗原を初回注射用に完全Freundアジュバントと混合し、以後の注射用に不完全Freundアジュバントと混合した。融合の3日前にマウスの静脈内に抗原を最終チャレンジした。マウス非細胞とSp2/0ミエローマ細胞株を融合してハイブリドーマを作製した。ELISAを用いて種々の細胞株をスクリーニングすることにより、抗原(配列番号1)に特異的な抗体を分泌する細胞を同定し、さらに特徴づけるためにAtlas Antibodies ABに送った。ELISA、ウェスタンブロット(WB)、および免疫組織化学(IHC)で陽性の結果を示した細胞株をAbSea Biotechnology Ltdが行うサブクローニング用に選んだ。さらに、モノクローナル抗体の免疫組織化学染色パターンをUS2012219548の実施例の8~12項に記載のモノクローナル抗PODXL抗体 AMAb90667 (Atlas Antibodies, Stockholm, Sweden)(そこでは8F6で示されている)と

比較した。

【 0 2 3 7 】

b) 結果

細胞株をELISAでスクリーニングし(AbSeaで)、該抗原(配列番号1)を認識し、アフィニティタグHis-ABPを認識しないモノクローナル抗体 (mAbs)を産生する株を同定した。167細胞株がELISAで抗原 配列番号1との特異結合を示し、さらなる試験用に選ばれた。選んだクローンごとに150~300 µlの上清を回収し、アジドを加え、次いで上清をウェットアイス上Atlas Antibodies ABに送った。上清が到着したらAbSeaからの指示に従って+4で保存した。該細胞株をさらに試験し、ウエスタンブロットとIHC分析の両方で陽性の結果を示す興味深い2細胞株、クローンCL0284およびCL0285を同定した。これらのクローンをAbSea Biotechnology Ltdが行うサブクローニングと増殖用に選択した。

10

【 0 2 3 8 】

4) Bioplexを用いるエピトープマッピング

a) 合成ペプチドの製造

PODXLタンパク質(配列番号2または配列番号3)のタンパク質断片配列番号1に対応する26ビオチン化ペプチドからなるPEPライブラリーをSigma-Genosys (Sigma-Aldrich)により合成した。該ペプチドは、完全PrEST配列(配列番号1)に及ぶと共に10アミノ酸の重複を含む15アミノ酸長である。該ペプチドは、80% DMSOに最終濃度10mg/mlで溶解した。

【 0 2 3 9 】

b) ビーズのカップリング

20

ニュートラビジン (Neutravidin) (Pierce、Rockford、IL)を、使用説明書に従ってカルボキシル化ビーズ(BioPlex COOH Beads、BioRad)上に固定した。10<sup>6</sup>ビーズのカップリングをフィルター膜底のマイクロタイタープレート(MultiScreen-HTS、Millipore、Billerica、MA)を用い、先に記載のごとく(Larsson et al (2009) J Immunol Methods 15 ; 34(1-2) : 20-32、Schwenk et al (2007) Mol Cell Proteomics 6(1) 125 : 32)行った。異なる26群のカラーコードIDが異なるビーズを1-エチル-3-(3-ジメチルアミノ-プロピル)カルボジイミド、およびN-ヒドロキシスクシンイミドを用いて活性化した。ニュートラビジン(250 µg/ml、50mM Hepes pH7,4中)をビーズに加え、シェーカー上で120minインキュベーションした。ビーズを最後に洗浄し、再懸濁し、微量遠心チューブに移し、PBS-BN (1x PBS、1% BSA、0,05% NaN<sub>3</sub>)中4 で保存した。ビオチン化ペプチドをPBS-BNで濃度0,1mg/mlに希釈し、50 µlの各ペプチドをカップリング反応(攪拌しながら室温で60分間実施した)に用いた。最後に、ビーズを3 x 100 µl PBS-BN緩衝液で洗浄し、さらに用いるまで4で保存した。

30

【 0 2 4 0 】

c) 結合特異性の決定

すべての26ビーズIDを含むビーズ混合物を作製し、2項に記載のごとく得た10 µlのマウス抗PODXLを30 µlのビーズ混合物と混合し、室温で60分間インキュベーションした。底がフィルターのマイクロタイタープレート(Millipore)を洗浄用に用い、各インキュベーション後にすべてのウェルを2 x 100 µl PBS-BNで洗浄した。該ビーズに25 µlのR-フィコエリスリン標識抗マウスIgG抗体(Jackson ImmunoResearch)を加え、室温で30min最後のインキュベーションを行った。測定は、Bio-Plex Manager 5.0ソフトウェアとBioplex 200 Suspension Array計測器を用いて行った。各実験ごとに1ビーズID当たり50回をカウントし、蛍光強度中央値(MFI)を個々のビーズポピュレーションに結合する抗体の測定値とした。

40

【 0 2 4 1 】

d) 結果

クローンID : CL0284およびCL0285のモノクローナル抗PODXL抗体の特異性を、合成ビオチン化ペプチドとカップリングしたビーズを用いる活性にて試験した。モノクローナル抗体 CL0284は、PrEST 配列上の1つの異なる領域に対応するペプチド13、配列 配列番号13と反応した。モノクローナル抗体 CL0285は、PrEST 配列の1つの異なる領域に対応するペ

50

プチド23、配列 配列番号14と反応した。

#### 【 0 2 4 2 】

##### 5) IHC分析用の抗体の評価

###### a) 材料と方法

上記実施例1に記載のコホートの尿路上皮癌試料の組織切片を用い、上記実施例3に記載のごとく得られたモノクローナル抗PODXL抗体 CL0284およびCL0285を評価した。参考のためUS2012219548の実施例の8～12項に記載のモノクローナル抗PODXL抗体 8F6を評価に含めた。自動免疫組織化学を先に記載のごとく実施した(Kampf C et al (2004) Clin. Proteomics 1: 285-300)。簡単には、ガラススライドを50 で一夜インキュベーションし、キシレンで脱パラフィンし(2×5min+1×1min)、次いで段階的アルコールで水和した。水和中に内因性パーオキシダーゼをH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(Merck)で阻害した。抗原回収のためスライドをクエン酸緩衝液pH6 (PTモジュール緩衝液1、100×-クエン酸緩衝液pH=6、Thermo Fisher Scientific)に浸漬し、Decloakingチャンバー(登録商標)(Biocare Medical)中125 で4min煮沸した。スライドをLab Vision Autostainer 480(登録商標)(Thermo Fisher Scientific)中に置き、室温で30分間一次抗体とインキュベーションした。次に、スライドを室温で20～30分間、一次抗体増強剤(Primary Antibody Enhancer)(Thermo Fisher Scientific)と、次いで、室温で30分間、HRPポリマー(UltraVision LP detection system、Thermo Fisher Scientific)(登録商標)とインキュベーションした。すべての工程間にスライドを洗浄用緩衝液(ThermoFisher Scientific)でリンスした。最後に、ジアミノベンジジン(Thermo Fisher Scientific)を色原体に用い、マイヤーのヘマトキシリン(Histolab)を対比染色に用いた。スライドをPertex(登録商標)(Histolab)で封入した。免疫組織化学的に染色した組織のすべての画像を顕微鏡下、手動で評価した。

#### 【 0 2 4 3 】

###### b) 結果

モノクローナル抗PODXL抗体CL0284およびCL0285の染色パターンを二人の独立した観察者によって評価し、モノクローナル抗PODXL抗体8F6の染色パターンと比較した。抗体CL0284およびCL0285は、8F6抗体と同じ染色パターンを持つことが両観察者によりみいだされ、CL0284およびCL0285の染色は、8F6抗体の染色と同様に異なることもわかった。8F6抗体は、先の比較試験において、試験した他の種々の抗体より優れていることがわかった(US 2012219548の実施例の12項参照のこと)。

#### 【 0 2 4 4 】

###### 予後の確定の非限定的例

患者の膀胱癌診断の確定後、患者由来の腫瘍組織試料を経尿道的切除術で得る。「陰性基準」を得るため、試料を、腫瘍細胞の膜に実質的にPODXLタンパク質発現がない保存膀胱癌組織材料から得る。さらに、「陽性基準」を得るため、試料を、腫瘍細胞の少なくとも50%が膜PODXL発現を示す保存膀胱腫瘍組織材料から得る。患者由来の試料材料と保存組織を緩衝ホルマリンで固定し、試料材料の薄片(4μm)を得る。あるいはまた、保存材料はこのように用意されている。

#### 【 0 2 4 5 】

免疫組織化学は上記に従って行う。各試料から1またはそれ以上の試料切片をガラススライドに固定して60 で45分間インキュベーションし、キシレンで脱パラフィンし(該試料をパラフィン処理した場合)(2 x 15 min)、次いで段階的アルコールで水和する。抗原を回収するため、スライドをTRS (Target Retrieval Solution、pH 6.0、DakoCytomation)に浸漬し、Decloaking chamber(登録商標)(Biocare Medical)中125 で4分間煮沸した。スライドをAutostainer(登録商標)(DakoCytomation)に置き、内因性パーオキシダーゼを最初にH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(DakoCytomation)で阻害した。複数の試料切片を固定する理由は結果の正確性を増すためである。

#### 【 0 2 4 6 】

PODXLサブ配列 配列番号1を標的とする抗原精製ポリクローナル抗体(HPA002210、Atlas Antibodies、Stockholm、Sweden)(1:250希釈)をスライドに加えて室温で30分間、次

10

20

30

40

50

いで標識二次抗体；例えばヤギ抗パーオキシダーゼ(ウサギまたはマウス)結合Envision(登録商標)で室温で30分間インキュベーションする。あるいはまた、一次抗体は配列番号8と選択的に相互作用することができるモノクローナル抗体でありうる。二次抗体を検出するには、ジアミノベンジジン(DakoCytomation)を色原体に用い、ハリスヘマトキシリン(Sigma-Aldrich)対比染色で対比する。全工程間でスライドを洗浄用緩衝液(DakoCytomation)でリンスする。次に、スライドをPertex(登録商標)(Histolab)封入剤で封入する。

【0247】

染色手順を検証する手段として2つのコントロール細胞株、例えばPODXLタンパク質発現細胞(陽性細胞株)のスライドと、PODXLタンパク質を発現しない細胞(陰性細胞株)のスライドを用いることができる。当業者は、例えば、Rhodes et al. (2006) The biomedical scientist, p 515-520の開示にしたがってそのような細胞株を得る方法を理解する。コントロール株スライドは、他のスライドと同じ手順で同時に染色する、すなわち、同じ一次抗体および二次抗体でインキュベーションされる。

【0248】

例えば、対象から得た腫瘍組織スライド、染色標準スライド、および所望によりコントロール細胞株のスライドを光学顕微鏡を用い倍率×20でScanScope T2自動スキャンニングシステム(Aperio Technologies)を用いてスキャンすることができる。しかしながら、このスキャンニング工程は必要ではないが、例えばスライドの作製と染色および染色したスライドの評価(下記参照)を異なる場所で異なる者が行う場合はその手順をより簡単にすることができる。

【0249】

コントロール細胞株を用いる場合は、染色手順の正当性を確認するために検査する。細胞株が許容される基準外の染色結果、例えば当業者が認識する染色アーチファクトを示す場合は、該組織試料の染色は正しくないと考えられ、全染色手順を新たなスライドで繰り返す。陽性および陰性細胞株が予期した染色パターンを示す場合は、該染色は正しいと考えられる。

【0250】

患者由来の腫瘍組織試料の染色試料スライドを手作業で肉眼検査により評価し、各スライドについてPODXLが腫瘍細胞の膜に発現しているか否かを決定する。評価と決定を行う者は、染色陽性および陰性標準スライドの肉眼検査に助けられる。

【0251】

したがって、患者が膜発現を有する群に属するかまたは膜発現を欠く群に属するかが決定される。各群の予後は図に示す二分データから読み取ることができる(例えば図6(予後良好および予後不良：それぞれ約61%および約15%))。患者が予後良好の群に属する場合は、あらゆるさらなる治療(すでに行った治療的TUR-B)を止めることを決めることができる。患者がその他の群に属する場合は、TaまたはT1患者は通常このように治療されないが、完全膀胱切除、化学療法、および/またはBCGを実施することがある。

【0252】

対象の癌が早期(すなわち、TaまたはT1)と診断された場合は、各予後を、もっぱらそのような早期癌の対象に基づく二分データから読み取ることができる(例えば図6(予後良好および予後不良：それぞれ約61%および約15%))。患者が予後良好の群に属する場合は、あらゆるさらなる治療(すでに行った治療的TUR-B)を止めることを決めることができる。患者がその他の群に属する場合は、TaまたはT1患者は通常このように治療されないが、完全膀胱切除、化学療法、および/またはBCGを実施することがある。

【0253】

限定されるものではないが本願に記載の刊行物、DNAまたはタンパク質データ項目、および特許を含むすべての引用物は本明細書の一部を構成する。

【0254】

記載した本発明が、様々に変化することは明らかであろう。そのような変化は、本発明の精神および範囲から逸脱するものではなく、当業者に明らかなようにそのようなすべての修飾は以下の特許請求の範囲の範囲内に含まれることを意図する。

【図 1】

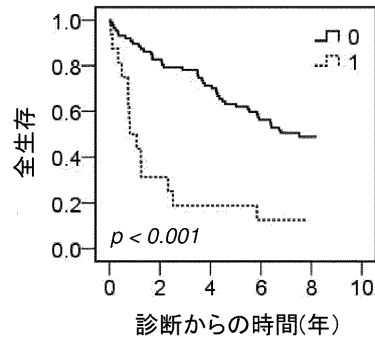


FIGURE 1

【図 2】

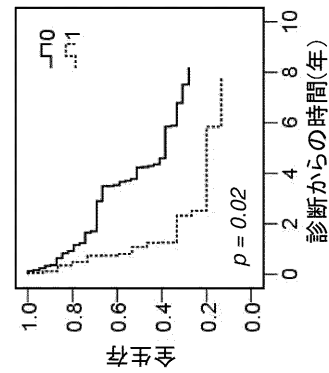


FIGURE 2B

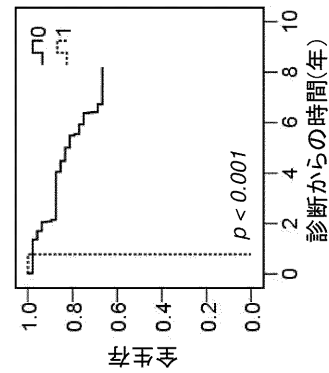


FIGURE 2A

【図 3】

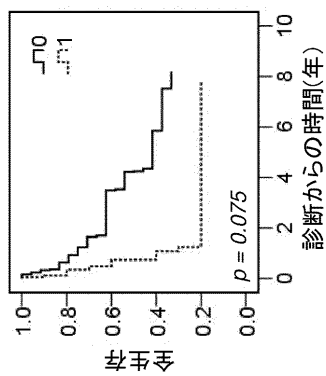


FIGURE 3B

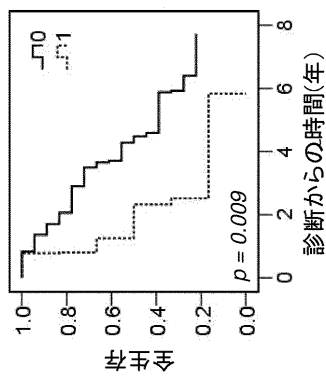


FIGURE 3A

【図 4】

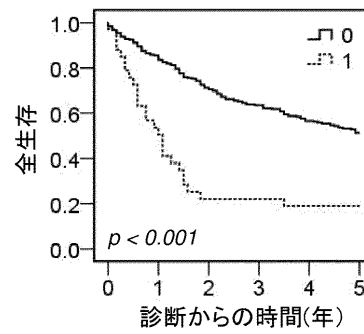


FIGURE 4

【図 5】

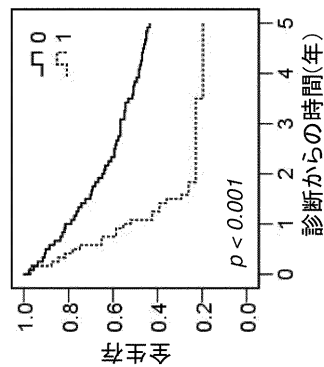


FIGURE 5B

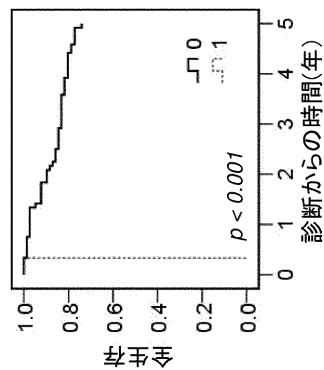


FIGURE 5A

【図 7】

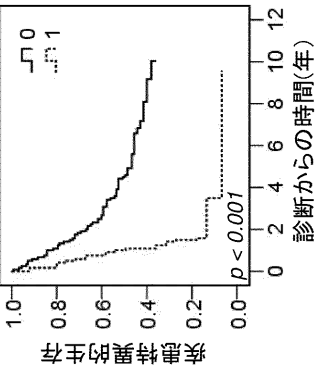


FIGURE 7B

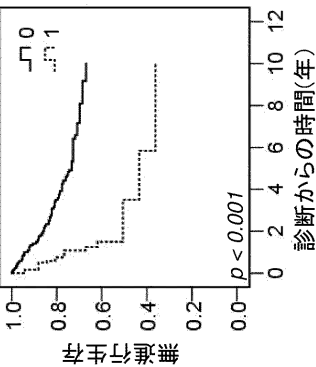


FIGURE 7A

【図 6】

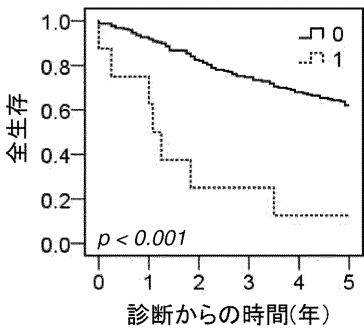


FIGURE 6



【配列表】

0006312700000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 P 35/00 (2006.01)		A 6 1 P 35/00
A 6 1 K 39/07 (2006.01)		A 6 1 K 39/07
C 0 7 K 14/705 (2006.01)		C 0 7 K 14/705
C 0 7 K 16/28 (2006.01)		C 0 7 K 16/28

(72)発明者 カリン・イルストレム  
スウェーデン、エスエー - 2 1 6 1 8 リムハムン、スカニアガータン 2 6 番

審査官 三木 隆

(56)参考文献 米国特許出願公開第 2 0 0 6 / 0 2 9 4 6 0 7 ( U S , A 1 )  
国際公開第 2 0 1 1 / 0 5 1 2 8 8 ( W O , A 1 )  
国際公開第 2 0 1 2 / 1 5 6 3 3 0 ( W O , A 1 )  
特表 2 0 0 9 - 5 2 8 8 3 8 ( J P , A )  
BMC urology , 2 0 1 4 年 5 月 1 2 日 , Vol.14 , Page.36  
Br J Cancer , 2 0 1 3 年 6 月 1 1 日 , Vol.108 No.11 , Page.2321-2328 , Electronical Publication Date: 7 May 2013

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

G 0 1 N 3 3 / 6 8  
A 6 1 K 3 9 / 0 7  
A 6 1 K 4 5 / 0 0  
A 6 1 P 1 5 / 0 0  
A 6 1 P 3 5 / 0 0  
C 1 2 Q 1 / 0 2  
G 0 1 N 3 3 / 5 3  
C 0 7 K 1 4 / 7 0 5  
C 0 7 K 1 6 / 2 8  
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )  
C A p l u s / M E D L I N E / B I O S I S ( S T N )