

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6506267号
(P6506267)

(45) 発行日 平成31年4月24日(2019.4.24)

(24) 登録日 平成31年4月5日(2019.4.5)

(51) Int.Cl.	F 1
C07K 16/18 (2006.01)	C07K 16/18 Z NA
C12N 15/13 (2006.01)	C12N 15/13
G01N 33/577 (2006.01)	G01N 33/577 B
C12N 5/18 (2006.01)	C12N 5/18

請求項の数 14 (全 94 頁)

(21) 出願番号	特願2016-519763 (P2016-519763)
(86) (22) 出願日	平成26年10月3日(2014.10.3)
(65) 公表番号	特表2016-533170 (P2016-533170A)
(43) 公表日	平成28年10月27日(2016.10.27)
(86) 國際出願番号	PCT/US2014/059162
(87) 國際公開番号	W02015/051320
(87) 國際公開日	平成27年4月9日(2015.4.9)
審査請求日	平成29年10月3日(2017.10.3)
(31) 優先権主張番号	61/886,488
(32) 優先日	平成25年10月3日(2013.10.3)
(33) 優先権主張国	米国(US)
(31) 優先権主張番号	61/941,907
(32) 優先日	平成26年2月19日(2014.2.19)
(33) 優先権主張国	米国(US)

微生物の受託番号 ATCC PTA-120969

(73) 特許権者	515081660 バイオケア メディカル, エルエルシー アメリカ合衆国 カリフォルニア 945 20, コンコード, バイク レーン 4040
(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(74) 代理人	100181674 弁理士 飯田 貴敏
(74) 代理人	100181641 弁理士 石川 大輔
(74) 代理人	230113332 弁護士 山本 健策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】抗SOX10抗体のシステムおよび方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

SOX10タンパク質に特異的に結合するマウスモノクローナル抗体の単離された調製物であって、前記マウスモノクローナル抗体は、配列番号3からなるペプチド内のエピトープに結合し、

前記マウスモノクローナル抗体は、配列番号5のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、および配列番号4のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含み、

前記マウスモノクローナル抗体は、配列番号9、配列番号10および配列番号11のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含み、かつ

前記マウスモノクローナル抗体は、配列番号6、配列番号7および配列番号8のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、

調製物。

【請求項2】

前記マウスモノクローナル抗体が、ATCC特許寄託指定番号PTA-120969の下でAmerican Type Culture Collection(ATCC)に寄託されたハイブリドーマによって產生される、請求項1に記載のマウスモノクローナル抗体の単離された調製物。

【請求項3】

請求項2に記載のマウスモノクローナル抗体を生産するための方法であって、
SOX10を特異的に認識することができるマウスモノクローナル抗体を生産する前記

ハイブリドーマを培養するステップ、および
前記ハイブリドーマに前記マウスモノクローナル抗体を生産させるステップ
を含む方法。

【請求項 4】

前記マウスモノクローナル抗体が、配列番号 2 の核酸配列によりコードされるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、および配列番号 1 の核酸配列によりコードされるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、請求項 1 に記載のマウスモノクローナル抗体の単離された調製物。

【請求項 5】

少なくとも 2 種の抗体を含む組成物であって、前記少なくとも 2 種の抗体のうちの少な
くとも 1 つが、S O X 1 0 に特異的に結合する請求項 2 に記載の A T C C 特許寄託指定番
号 P T A - 1 2 0 9 6 9 の下で A T C C に寄託された前記ハイブリドーマによって產生さ
れる前記マウスモノクローナル抗体を含む、組成物。

【請求項 6】

一次抗体カクテルを含む、請求項 5 に記載の組成物。

【請求項 7】

前記少なくとも 2 種の抗体のうちの他の前記少なくとも 1 つが、前記マウスモノクロー
ナル抗体と異なる種に由来する、請求項 5 に記載の組成物。

【請求項 8】

前記異なる種が、ウサギ、ヤギ、ウマ、ニワトリ、ヒト、およびそれらの任意の組合せ
からなる群から選択される、請求項 7 に記載の組成物。

【請求項 9】

前記少なくとも 2 種の抗体のうちの他の前記少なくとも 1 つが、チロシナーゼ、M A R
T - 1、S 1 0 0、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択されるタンパク質に
特異的に結合する、請求項 5 に記載の組成物。

【請求項 10】

S O X 1 0 に特異的に結合する請求項 2 に記載の A T C C 特許寄託指定番号 P T A - 1
2 0 9 6 9 の下で A T C C に寄託された前記ハイブリドーマによって產生される前記マウ
スモノクローナル抗体に結合した標識をさらに含む、請求項 5 に記載の組成物。

【請求項 11】

前記標識が、放射性元素、磁性粒子、放射性同位元素、蛍光色素、酵素、毒素、シグナル、
染色、検出酵素、西洋ワサビペルオキシダーゼ (H R P)、アルカリホスファターゼ
(A P)、ベータガラクトシダーゼ、色素原、ファストレッド、3 , 3 ' - ジアミノベンジジン、
3 - アミノ - 9 - エチルカルバゾール、5 - プロモ - 4 - クロロ - 3 - インドリルリン酸、
3 , 3 ' , 5 , 5 ' - テトラメチルベンジジン、5 - プロモ - 4 - クロロ - 3 - インドリル -
- D - グルクロニド、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される、請求項 10 に記載の組成物。

【請求項 12】

生体試料について請求項 1、2、4 または 5 に記載の抗体が結合するタンパク質を検出
するための方法であって、

生体試料を前記抗体と接触させるステップ、および

前記生体試料中の前記タンパク質に結合した前記抗体の存在を検出するステップ
を含む、方法。

【請求項 13】

前記検出するステップが、免疫組織化学 (I H C)、F F P E の I H C 、凍結組織切片
の I H C 、免疫細胞化学、および E L I S A からなる群から選択される方法を含む、請求
項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記マウスモノクローナル抗体および前記他の少なくとも 1 つの抗体が、
S O X 1 0 および M A R T - 1 、

10

20

30

40

50

S O X 1 0 およびチロシナーゼ、ならびに
S O X 1 0 およびM A R T - 1 およびチロシナーゼ、
からなる群から選択されるタンパク質に特異的に結合する、請求項 5 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本出願は、2013年10月3日に出願された米国仮出願第61/886,488号および2014年2月19日に出願された米国仮出願第61/941,907号に対する優先権および利益を主張する国際PCT特許出願であり、それぞれの出願はその全体が本明細書に参考として援用される。 10

【0 0 0 2】

本発明は、新規の抗S O X 1 0 抗体、組成物、カクテル、および抗体を含むキット、ならびに抗体を使用するための方法に関する。

【背景技術】

【0 0 0 3】

疾患の診断に関しては、組織試料、特に生検によって得られる組織試料の顕微鏡検査が一般的な方法である。特に、特異的抗体を使用して組織試料における特定のタンパク質の発現を検出する技法である免疫組織化学(IHC)は、診断、特にがんの検出および診断のための有益なツールであり得る。 20

【0 0 0 4】

おそらく第22染色体q13に位置するS R Y関連H M G - B o x 遺伝子10は、おそらく、神経堤、末梢神経系、およびメラニン細胞の発達のために重要であり得る、ヒトにおける転写因子であるS O X 1 0 として公知のタンパク質をコードする可能性がある。S O X 1 0 は、大腸における神經、およびメラノサイトの形成に必須である可能性がある。メラノサイトは、おそらく、皮膚、眼、および毛髪に見いだされる、色素を産生する細胞である。S O X 1 0 タンパク質は、メラノサイト、乳房組織、脳神経節、後根神経節、および眼胞を含めたヒト正常組織において広範に発現し得る。S O X 1 0 は、おそらく、例えば黒色腫、乳癌、神経膠腫などの悪性腫瘍、ならびに例えばシュワン細胞腫などの良性腫瘍における重要なマーカーでもあり得る。転写因子S O X 1 0 は、乏突起膠細胞の分化の重要な決定因子のうちの1つであり得る。大多数の乏枝神経膠腫、最低限に分化した神経膠芽腫である星状細胞腫の大部分も、おそらくS O X 1 0 を発現する。 30

【0 0 0 5】

線維形成性黒色腫は、浸潤性皮膚黒色腫の稀なバリアントであり得、年間発生率はおそらく、およそ1,000,000人に2人である。この黒色腫型に独特の特徴は、深部浸潤、神経周囲浸潤の増加、局所再発、および、おそらく診断の遅延を含み得る。試験により、S O X 1 0 は、原発病変と転移性病変の両方の黒色腫についての高度に感度が高く特異的なマーカーであることが示され得る。非新生物性皮膚および良性皮膚のメラノサイトにおける発現、および良性母斑および異形成母斑における発現に基づいて、S O X 1 0 は、良性色素性皮膚病変と悪性色素性皮膚病変を区別するために有用なマーカーではない可能性がある。 40

【0 0 0 6】

線維形成性黒色腫(D M)には、おそらく組織学的類似物の類似性、さらには、おそらく免疫組織化学的染色の限定に起因する診断上の難題が存在する。1つの試験では、S O X 1 0 は、D Mに対して100%の感度が示されており、おそらく、S O X 1 0 は、紡錘細胞癌、A F X および肉腫を含めた真皮/皮下組織の全ての組織学的類似物において陰性であった。抗S 1 0 0 抗体は、一般にはD Mを染色し得るが、他の黒色腫マーカー(例えば、H M B - 4 5 およびメランA)は、おそらく陰性であることが多い。

【0 0 0 7】

伝統的に、S 1 0 0 、H M B 4 5 、M A R T - 1 (おそらくメランAとしても公知であ

10

20

30

40

50

る)、およびチロシナーゼなどの黒色腫マーカーが、黒色腫を同定するための抗体のパネルに使用されている場合がある。抗 S 1 0 0 抗体は黒色腫のスクリーナーとして使用されている場合があり、おそらく、他の黒色腫マーカーと比較してより感度の高いマーカーであり得るが、S 1 0 0 は、転移性黒色腫とその類似物の共通部位であるリンパ節と脳のどちらも染色し得るので、特異性が最適以下であるという不都合があり得る。H M B 4 5、M A R T - 1 およびチロシナーゼは、おそらく S 1 0 0 タンパク質よりも特異的であり得るが、この抗体のパネルは、線維形成性黒色腫および紡錘細胞黒色腫では陰性であり得、したがって、おそらく、感度が不十分である。

【 0 0 0 8 】

M A R T - 1 およびチロシナーゼの抗体カクテルは、転移性黒色腫の非常に感度の高いマーカーであることが示されており、おそらく、さらには、S 1 0 0 タンパク質に匹敵する(それぞれ約 9 8 % 対約 1 0 0 %)。しかし、S 1 0 0 はそれでも、線維形成性黒色腫および紡錘細胞黒色腫に対してより感度が高い可能性がある。線維形成性黒色腫および紡錘細胞黒色腫を含めた黒色腫に対する感度を有する S O X 1 0 と、おそらく、M A R T - 1 およびチロシナーゼを含めた 1 種または複数種の黒色腫マーカーを組み合わせることの潜在的な利益は、おそらく、線維形成性黒色腫または紡錘細胞黒色腫に対しては感度が高くないものであっても、不明であり得る。そのような組合せにより、黒色腫についての優れたマーカーがもたらされ得る。

【 0 0 0 9 】

S O X 1 0 は、シュワン細胞およびメラノサイトの特異化、成熟化、および維持のために極めて重要な神経堤転写因子でもあり得る。S O X 1 0 はまた、シュワン細胞腫および神経線維腫において拡散的に発現し得る。おそらく、特異性の欠如が十分に特徴付けられているにもかかわらず、S 1 0 0 は神経堤由来腫瘍の診断において病理医により常套的に使用され得る。最近の試験により、おそらく、S O X 1 0 は、シュワン細胞腫瘍およびメラニン細胞腫瘍において一貫して発現し得、おそらく、S 1 0 0 に勝る利点をもたらす、神経堤分化の信頼できるマーカーであることが示されている。

【 0 0 1 0 】

S O X 1 0 発現は、正常な乳腺における筋上皮乳房細胞において観察され得る。S O X 1 0 は、基底様、未分類三重陰性、および化生性癌の乳がん型において実証されている可能性があり、おそらく、これらの新生物が筋上皮分化を示しうるという概念を支持する。肺がんでは、支持細胞は、肺カルチノイド腫瘍のおよそ半分において見いだすことができる。S O X 1 0 抗体を使用して、おそらく、他に分類していない(N E C) 1 1 3 の肺の症例を調査した。支持細胞は、おそらく定型カルチノイド(T C) の 6 6 . 7 %、さらには、おそらく非定型カルチノイド(A C) 症例の 5 8 . 3 %において観察されている可能性があるが、高悪性度のN E Cにおいては観察されていない可能性がある。

【 0 0 1 1 】

S O X 1 0 は、おそらく、S 1 0 0 と比較した場合、神経堤起源の腫瘍に対する特異性の増大を示し得る。1つの試験では、S O X 1 0 は、非シュワン細胞腫瘍、非メラニン細胞腫瘍では、おそらく 6 6 8 症例のうち 5 症例においてのみ陽性であった可能性がある(9 9 % の特異度)が、一方 S 1 0 0 は、おそらく 6 6 8 症例のうち 5 3 症例において陽性であった可能性がある(9 1 % の特異度)。したがって、S O X 1 0 は、軟部組織腫瘍の診断に関して、S 1 0 0 の代わりに、または、おそらく S 1 0 0 と組み合わせて有用であり得る。

【 0 0 1 2 】

今まで、最も多く公開された試験では、免疫組織化学的(I H C)方法のためにヤギポリクローナル S O X 1 0 を使用した可能性がある。I H C 方法における使用に関して、モノクローナル抗体が好ましい場合があり、おそらく、さらには、マウスまたはウサギ抗体が好ましい場合があるので、ポリクローナルヤギ抗体は一般には好ましくない場合がある。特に、臨床的診断において使用する I H C 方法に関しては、モノクローナル抗体が好ましく、おそらく、さらには、マウスまたはウサギ抗体が好ましい場合がある。紡錘細胞

10

20

30

40

50

黒色腫および線維形成性黒色腫を他の腫瘍およびその類似物と区別するためのマーカーの明白な必要性があり得、おそらく、現在までの広範囲にわたる試みでは、そのようなマーカーはもたらされていない可能性がある。SOX10モノクローナル抗体は、おそらく、臨床の現場において、診断に関して高度に有益であると思われる。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0013】

したがって、がん診断において使用するための、感度が高く、さらには、特異的な抗SOX10抗体が明白に必要とされている。本発明の実施形態は、高度に感度が高い可能性があり、さらには、高度に特異的である可能性がある、抗SOX10マウスモノクローナル抗体 [クローンBC34] を提供する。本発明の実施例は、これだけに限定されないが、黒色腫、紡錘細胞黒色腫、線維形成性黒色腫、母斑、シュワン細胞腫、乳がん、横紋筋肉腫、平滑筋肉腫などを含めたある特定のがんにおいてSOX10タンパク質が存在するか存在しないかを検出し得るマウスモノクローナル抗SOX10抗体を提供する。本発明の実施例は、他の正常組織、良性組織および悪性組織に対して、黒色腫に対する優れた感度(約105/109、約9%)、おそらく、さらには、優れた特異性が実証されている可能性がある。公知のウサギポリクローナル(RP)抗SOX10抗体と比較して、マウスモノクローナル抗SOX10 BC34は、一般には、モノクローナル抗体の利点をもたらすとともに、よりきれいな染色パターンを伴い、おそらく、より少ないアーチファクトを伴い、おそらく、多くのカルチノイドの染色は伴わず、より高い感度、および、おそらく、より高い特異性が実証されている可能性がある。BC34はまた、RP抗SOX10抗体によっては染色されている可能性があるいくつかの検体を染色しない可能性があり、おそらく、これにより、代替物に勝るBC34の優れた特異性が示される。したがって、診断のために、代替抗SOX10抗体を含めた代替抗体と比較して、BC34などのモノクローナル抗SOX10抗体が好ましい場合がある。

【0014】

抗SOX10抗体の開発は、原発性がん、さらには、転移性がん、特に黒色腫、紡錘細胞黒色腫、線維形成性黒色腫、母斑、シュワン細胞腫、乳がん、横紋筋肉腫、平滑筋肉腫などの診断に役立ち得る。おそらく、例えばRP抗SOX10抗体を含めた代替抗SOX10抗体と比較して、同等または優れた染色感度、および、おそらく、さらには、優れた染色特異性を有するマウスモノクローナル抗SOX10抗体 [BC34] などの抗SOX10抗体が本発明で提供されている。

【0015】

本発明の一般的な実施形態は、SOX10を認識するためのモノクローナル抗体、それらを調製するための方法、免疫組織化学における使用などを含み得る。複数の実施形態では、抗SOX10抗体クローンBC34などの抗SOX10抗体クローンは、BALB/cマウスを、ヒトSOX10タンパク質のアミノ酸147~253のサブセットに対応する1種または複数種のタンパク質を用いて免疫することによって得ることができる。SOX10タンパク質を、BALB/cマウスに、アジュバントと共に、腹腔内注射によって、おそらく、約3週間おきに約5回、注射することができる。SOX10に対する免疫反応性は、組換えSOX10タンパク質に対する直接ELISAによって評価することができる。細胞融合によってハイブリドーマを開発するために、最も高い力値を有するマウスを選択することができる。ヒト組織におけるSOX10に対する最良の反応性が実証されるハイブリドーマクローンを選択することができ、BC34としてデザインすることができる。BC34クローンをアイソタイプについて試験することができ、マウスIgG1として同定することができる。BC34抗体は、ハイブリドーマ細胞の大規模組織培養によって、およびBALB/cマウスの腹水によって産生させることができる。上清および抗体腹水を採取することができ、抗体をプロテインAアフィニティカラムによって精製することができる。BC34は、ELISA、ウエスタンプロットティング、さらには、ヒト組織により、ヒトSOX10タンパク質に対する特異的な反応性を実証し得る。

10

20

30

40

50

【0016】

マウスモノクローナル抗SOX10抗体BC34などの抗SOX10抗体は、組織試料のSOX10の検出に関して、おそらく、現在公知のSOX10に対する抗体に勝る、いくつかの有意であるが予想外の利点を伴い、有用であり得る。生体試料を試験することができ、それらとして、これだけに限定されないが、皮膚組織、肺組織、膀胱組織、乳房組織、前立腺組織、正常組織、新生物組織、膀胱組織、腎組織、卵巣組織、甲状腺組織、子宮内膜組織、腎組織、扁桃組織、脾臓組織、結腸組織、リンパ節組織、新生物膜組織、胃組織、前立腺組織、肺組織、乳房組織などを挙げることができる。従来の免疫組織化学手順において使用した場合、マウス抗SOX10抗体BC34などの抗SOX10抗体により、公知の抗SOX10抗体の感度と同様の、または、おそらくそれよりも優れた感度でSOX10の核染色がもたらされ得、それにより、有意な改善がもたらされ得る。さらに、BC34などの抗SOX10抗体は、おそらく、他の公知の抗SOX10抗体と比較して特異性の増大を示し得、これにより、有意な改善がもたらされ得る。モノクローナル供給源に由来することの可能性のある利点に加えて、BC34などの抗SOX10抗体は、他の公知の抗SOX10抗体と比較して、よりきれいな染色をもたらし、より少ないアーチファクト、およびより高い細胞型特異性が伴い、例えば、おそらく、カルチノイドは染色されない。BC34などの抗SOX10抗体を用いると、試料の分析を簡易化することができ、腫瘍細胞におけるSOX10発現を容易に同定可能にすことができる、これにより、他のやり方では診断するのが難しい、不明瞭である、または、さらには、不可能であり得る症例の診断が可能になる。

10

20

本発明の実施形態において、例えば以下の項目が提供される。

(項目1)

SOX10タンパク質に特異的に結合する抗体の単離された調製物であって、前記抗体が、ペプチド配列番号3内のエピトープに結合する、調製物。

(項目2)

SOX10タンパク質に特異的に結合する抗体の単離された調製物であって、前記抗体が、配列番号3からなるペプチドを免疫原として使用して生成したものである、調製物。

(項目3)

ペプチド配列番号3内のエピトープに特異的に結合する抗体の単離された調製物。

(項目4)

前記抗体がモノクローナルである、項目1、2、または3に記載の抗体の単離された調製物。

(項目5)

前記抗体がポリクローナルである、項目1、2、または3に記載の抗体の単離された調製物。

(項目6)

ATCC特許寄託指定番号PTA-120969の下でAmerican Type Culture Collection(ATCC)に寄託されたハイブリドーマによって産生される抗体またはその断片。

30

(項目7)

ATCC特許寄託指定番号PTA-120969の下でAmerican Type Culture Collection(ATCC)に寄託されているハイブリドーマ細胞。

(項目8)

前記ハイブリドーマ細胞によって産生される抗体またはその断片をさらに含む、項目7に記載のハイブリドーマ細胞。

(項目9)

項目1、2、3、または6に記載のモノクローナル抗体を産生するための方法であって、

SOX10を特異的に認識することが可能なモノクローナル抗体を産生する前記ハイブ

40

50

リドーマを培養するステップと、

該ハイブリドーマに該モノクローナル抗体を産生させるステップと
を含む方法。

(項目10)

配列番号1または配列番号2の核酸配列によりコードされるアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む抗体またはその断片。

(項目11)

配列番号4または配列番号5のアミノ酸配列のポリペプチドを含む抗体またはその断片。

(項目12)

配列番号2の核酸配列によりコードされるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、および配列番号1の核酸配列によりコードされるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、抗SOX10抗体またはその断片。

(項目13)

配列番号5のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、および配列番号4のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、抗SOX10抗体またはその断片。

(項目14)

配列番号1または配列番号2の核酸配列によりコードされるアミノ酸配列と少なくとも約70%同一であるアミノ酸配列を含む抗体。

(項目15)

配列番号1または配列番号2と少なくとも約70%同一である核酸配列を含む、単離および精製された核酸配列。

(項目16)

配列番号4または配列番号5のアミノ酸配列と少なくとも約70%同一であるアミノ酸配列を含む抗体。

(項目17)

前記配列番号1または配列番号2と少なくとも約70%同一であることが、配列番号1および配列番号2と少なくとも約70%同一であることを含む、項目14または15に記載の配列。

(項目18)

前記配列番号4または配列番号5と少なくとも約70%同一であることが、配列番号4および配列番号5と少なくとも約70%同一であることを含む、項目16に記載の配列。

(項目19)

前記少なくとも約70%同一であることが、少なくとも約71%、少なくとも約72%、少なくとも約73%、少なくとも約74%、少なくとも約75%、少なくとも約76%、少なくとも約77%、少なくとも約78%、少なくとも約79%、少なくとも約80%、少なくとも約81%、少なくとも約82%、少なくとも約83%、少なくとも約84%、少なくとも約85%、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、および少なくとも約99%からなる群から選択される百分率を含む、項目17に記載の配列。

(項目20)

前記少なくとも約70%同一であることが、少なくとも約71%、少なくとも約72%、少なくとも約73%、少なくとも約74%、少なくとも約75%、少なくとも約76%、少なくとも約77%、少なくとも約78%、少なくとも約79%、少なくとも約80%、少なくとも約81%、少なくとも約82%、少なくとも約83%、少なくとも約84%、少なくとも約85%、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%。

10

20

30

40

50

、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、および少なくとも約 9 9 %からなる群から選択される百分率を含む、項目 1 8 に記載の配列。

(項目 2 1)

配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 1 0、配列番号 1 1、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択されるアミノ酸配列のポリペプチドを含む抗体またはその断片。

(項目 2 2)

配列番号 9、配列番号 1 0、配列番号 1 1、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、抗 S O X 1 0 抗体またはその断片。

10

(項目 2 3)

配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、抗 S O X 1 0 抗体またはその断片。

(項目 2 4)

配列番号 9、配列番号 1 0、配列番号 1 1、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含み、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、抗 S O X 1 0 抗体またはその断片。

(項目 2 5)

配列番号 4 または配列番号 5 のアミノ酸配列と少なくとも約 2 % 同一であるアミノ酸配列を含む抗体。

20

(項目 2 6)

前記配列番号 4 または配列番号 5 と少なくとも約 2 % 同一であることが、配列番号 4 および配列番号 5 と少なくとも約 2 % 同一であることを含む、項目 2 5 に記載の配列。

(項目 2 7)

前記少なくとも約 2 % 同一であることが、少なくとも約 2 . 7 %、少なくとも約 3 %、少なくとも約 4 %、少なくとも約 5 %、少なくとも約 5 . 7 %、少なくとも約 6 %、少なくとも約 7 %、少なくとも約 8 %、少なくとも約 8 . 1 %、少なくとも約 9 %、少なくとも約 1 0 %、少なくとも約 1 0 . 8 %、少なくとも約 1 1 %、少なくとも約 1 1 . 4 %、少なくとも約 1 1 . 7 %、少なくとも約 1 2 %、少なくとも約 1 3 %、少なくとも約 1 3 . 9 %、少なくとも約 1 4 %、少なくとも約 1 5 %、少なくとも約 1 6 %、少なくとも約 1 7 %、少なくとも約 1 7 . 1 %、少なくとも約 1 7 . 2 %、少なくとも約 1 8 %、少なくとも約 1 9 %、少なくとも約 1 9 . 6 %、少なくとも約 1 9 . 8 %、少なくとも約 2 0 %、少なくとも約 2 1 %、少なくとも約 2 2 %、少なくとも約 2 3 %、少なくとも約 2 4 %、少なくとも約 2 5 %、少なくとも約 2 5 . 4 %、少なくとも約 2 6 %、少なくとも約 3 0 %；約 2 % から約 7 0 %、約 2 %、約 2 . 7 %、約 3 %、約 4 %、約 5 %、約 5 . 7 %、約 6 %、約 7 %、約 8 %、約 8 . 1 %、約 9 %、約 1 0 %、約 1 0 . 8 %、約 1 1 %、約 1 1 . 4 %、約 1 1 . 7 %、約 1 2 %、約 1 3 %、約 1 3 . 9 %、約 1 4 %、約 1 5 %、約 1 6 %、約 1 7 %、約 1 7 . 1 %、約 1 7 . 2 %、約 1 8 %、約 1 9 %、約 1 9 . 6 %、約 1 9 . 8 %、約 2 0 %、約 2 1 %、約 2 2 %、約 2 3 %、約 2 4 %、約 2 5 %、約 2 5 . 4 %、約 2 6 %、および約 3 0 % の間からなる群から選択される百分率を含む、項目 2 6 に記載の配列。

30

(項目 2 8)

配列番号 3 の残基を含むアミノ酸配列を有する少なくとも 1 つのポリペプチドに特異的に結合する抗体またはその断片。

40

(項目 2 9)

少なくとも 1 つが少なくとも S O X 1 0 に特異的に結合する少なくとも 2 種の抗体またはその断片を含む組成物。

(項目 3 0)

少なくとも S O X 1 0 に特異的に結合する前記少なくとも 2 種の抗体またはその断片の

50

うちの前記少なくとも 1 つが、 S O X 1 0 [B C 3 4] 抗体またはその断片を含む、項目 2 9 に記載の組成物。

(項目 3 1)

少なくとも S O X 1 0 に特異的に結合する前記少なくとも 2 種の抗体またはその断片のうちの前記少なくとも 1 つが、 S O X 1 0 に特異的に結合し、染色される細胞が約 5 % より多いという陽性指示カットオフ値を有する、前記少なくとも 2 種の抗体またはその断片のうちの前記少なくとも 1 つを含む、項目 2 9 に記載の組成物。

(項目 3 2)

S O X 1 0 に特異的に結合する前記少なくとも 2 種の抗体またはその断片のうちの前記少なくとも 1 つが、 S O X 1 0 に特異的に結合し、

10

- 染色される細胞が約 2 % より多い；
- 染色される細胞が約 3 % より多い；
- 染色される細胞が約 4 % より多い；
- 染色される細胞が約 5 % より多い；
- 染色される細胞が約 6 % より多い；
- 染色される細胞が約 7 % より多い；
- 染色される細胞が約 8 % より多い；
- 染色される細胞が約 9 % より多い；および
- 染色される細胞が約 10 % より多い

からなる群から選択される陽性指示カットオフ値を有する前記少なくとも 2 種の抗体またはその断片のうちの少なくとも 1 つを含む、項目 2 9 に記載の組成物。

20

(項目 3 3)

前記少なくとも 2 種の抗体またはその断片のうちの前記少なくとも 1 つが、配列番号 2 の核酸配列によりコードされるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、および配列番号 1 の核酸配列によりコードされるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、項目 2 9 に記載の組成物。

(項目 3 4)

前記少なくとも 2 種の抗体またはその断片のうちの前記少なくとも 1 つが、配列番号 5 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、および配列番号 4 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、項目 2 9 に記載の組成物。

30

(項目 3 5)

前記少なくとも 2 種の抗体またはその断片のうちの前記少なくとも 1 つが、配列番号 6 、配列番号 7 、配列番号 8 、配列番号 9 、配列番号 10 、配列番号 11 、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択されるアミノ酸配列のポリペプチドを含む、項目 2 9 に記載の組成物。

(項目 3 6)

前記少なくとも 2 種の抗体またはその断片のうちの前記少なくとも 1 つが、配列番号 2 の核酸配列によりコードされるアミノ酸配列の少なくとも約 70 % と同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、および配列番号 1 の核酸配列によりコードされるアミノ酸配列の少なくとも約 70 % であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、項目 2 9 に記載の組成物。

40

(項目 3 7)

前記少なくとも約 70 % 同一であることが、少なくとも約 71 % 、少なくとも約 72 % 、少なくとも約 73 % 、少なくとも約 74 % 、少なくとも約 75 % 、少なくとも約 76 % 、少なくとも約 77 % 、少なくとも約 78 % 、少なくとも約 79 % 、少なくとも約 80 % 、少なくとも約 81 % 、少なくとも約 82 % 、少なくとも約 83 % 、少なくとも約 84 % 、少なくとも約 85 % 、少なくとも約 86 % 、少なくとも約 87 % 、少なくとも約 88 % 、少なくとも約 89 % 、少なくとも約 90 % 、少なくとも約 91 % 、少なくとも約 92 % 、少なくとも約 93 % 、少なくとも約 94 % 、少なくとも約 95 % 、少なくとも約 96 % 、少なくとも約 97 % 、少なくとも約 98 % 、および少なくとも約 99 % からなる群から

50

選択される百分率を含む、項目 3 6 に記載の組成物。

(項目 3 8)

前記少なくとも 2 種の抗体またはその断片のうちの前記少なくとも 1 つが、配列番号 9 、配列番号 10 、配列番号 11 、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；ならびに配列番号 6 、配列番号 7 、配列番号 8 、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、項目 2 9 に記載の組成物。

(項目 3 9)

前記少なくとも 2 種の抗体またはその断片のうちの前記少なくとも 1 つが、配列番号 3 のアミノ酸配列を有する少なくとも 1 つのポリペプチドに特異的に結合する、項目 2 9 に記載の組成物。

10

(項目 4 0)

前記少なくとも 2 種の抗体またはその断片のうちの前記少なくとも 1 つが、配列番号 3 の残基と少なくとも約 70 % 同一であるアミノ酸配列を有する少なくとも 1 つのポリペプチドに特異的に結合する、項目 2 9 に記載の組成物。

(項目 4 1)

前記少なくとも約 70 % 同一であることが、少なくとも約 71 % 、少なくとも約 72 % 、少なくとも約 73 % 、少なくとも約 74 % 、少なくとも約 75 % 、少なくとも約 76 % 、少なくとも約 77 % 、少なくとも約 78 % 、少なくとも約 79 % 、少なくとも約 80 % 、少なくとも約 81 % 、少なくとも約 82 % 、少なくとも約 83 % 、少なくとも約 84 % 、少なくとも約 85 % 、少なくとも約 86 % 、少なくとも約 87 % 、少なくとも約 88 % 、少なくとも約 89 % 、少なくとも約 90 % 、少なくとも約 91 % 、少なくとも約 92 % 、少なくとも約 93 % 、少なくとも約 94 % 、少なくとも約 95 % 、少なくとも約 96 % 、少なくとも約 97 % 、少なくとも約 98 % 、および少なくとも約 99 % からなる群から選択される百分率を含む、項目 4 0 に記載の組成物。

20

(項目 4 2)

前記少なくとも 2 種の抗体またはその断片のうちの前記少なくとも 1 つが、 A T C C 特許寄託指定番号 P T A - 1 2 0 9 6 9 の下で American Type Culture Collection (ATCC) に寄託されたハイブリドーマによって產生される抗体またはその断片を含む、項目 2 9 に記載の組成物。

30

(項目 4 3)

一次抗体カクテルを含む、項目 2 9 に記載の組成物。

(項目 4 4)

前記少なくとも 2 種の抗体またはその断片が、少なくとも 2 つの異なる種に由来する、項目 3 0 に記載の組成物。

(項目 4 5)

前記少なくとも 2 つの異なる種が、マウス、ウサギ、ヤギ、ウマ、ニワトリ、ヒト、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される、項目 4 4 に記載の組成物。

40

(項目 4 6)

前記少なくとも 2 種の抗体またはその断片が、二重染色手順を含む、項目 2 9 に記載の組成物。

(項目 4 7)

前記少なくとも 2 種の抗体またはその断片が、異なる可視化の結果をもたらすことが可能である、項目 2 9 に記載の組成物。

(項目 4 8)

前記可視化の結果が、呈色の結果を含む、項目 4 7 に記載の組成物。

(項目 4 9)

前記少なくとも 2 種の抗体またはその断片のうちの他の前記少なくとも 1 つが、チロシナーゼ、 M A R T - 1 、 S 1 0 0 、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択されるタンパク質に特異的に結合する、項目 2 9 に記載の組成物。

50

(項目 5 0)

前記少なくとも 2 種の抗体またはその断片のうちの他の前記少なくとも 1 つが、チロシナーゼ抗体、M A R T - 1 抗体、チロシナーゼ抗体 [T 3 1 1]、M A R T - 1 抗体 [M 2 - 7 C 1 0]、M A R T - 1 抗体 [M 2 - 9 E 3]、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される、項目 2 9 に記載の組成物。

(項目 5 1)

黒色腫検出、母斑検出、乳がん検出、横紋筋肉腫検出、平滑筋肉腫検出、シュワン細胞腫検出、線維形成性黒色腫検出、紡錘細胞黒色腫検出、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される検出組成物を含む、項目 2 9 に記載の組成物。

(項目 5 2)

前記抗体またはその断片が、A m e r i c a n T y p e C u l t u r e C o l l e c t i o n に A T C C 特許寄託指定番号 P T A - 1 2 0 9 6 9 の下で寄託されているハイブリドーマ細胞によって產生される、項目 1 0 、 1 1 、 1 2 、 2 8 、または 2 9 に記載の抗体。

(項目 5 3)

モノクローナル抗体を含む、項目 1 0 、 1 1 、 1 2 、 1 3 、 1 4 、 1 5 、 1 6 、 2 1 、 2 2 、 2 3 、 2 5 、または 2 6 に記載の抗体。

(項目 5 4)

前記モノクローナル抗体が、染色される細胞が 1 % より多いという陽性指示カットオフ値を有する、項目 5 3 に記載の抗体。

(項目 5 5)

前記陽性指示カットオフ値が、

- 染色される細胞が約 2 % より多い；
- 染色される細胞が約 3 % より多い；
- 染色される細胞が約 4 % より多い；
- 染色される細胞が約 5 % より多い；
- 染色される細胞が約 6 % より多い；
- 染色される細胞が約 7 % より多い；
- 染色される細胞が約 8 % より多い；
- 染色される細胞が約 9 % より多い；および
- 染色される細胞が約 1 0 % より多い

からなる群から選択される、項目 5 4 に記載の抗体。

(項目 5 6)

前記モノクローナル抗体が、マウスモノクローナル抗体、ウサギモノクローナル抗体、ヤギモノクローナル抗体、ウマモノクローナル抗体、ニワトリモノクローナル抗体、ヒト化モノクローナル抗体、キメラ抗体、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される、項目 5 3 に記載の抗体。

(項目 5 7)

ポリクローナル抗体を含む、項目 1 0 、 1 1 、 1 2 、 1 3 、 1 4 、 1 5 、 1 6 、 2 1 、 2 2 、 2 3 、 2 5 、または 2 6 に記載の抗体。

(項目 5 8)

前記ポリクローナル抗体が、ウサギポリクローナル抗体、マウスポリクローナル抗体、ヤギポリクローナル抗体、ウマポリクローナル抗体、ニワトリポリクローナル抗体、ヒト化ポリクローナル抗体、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される、項目 5 7 に記載の抗体。

(項目 5 9)

単離された抗体を含む、項目 1 0 、 1 1 、 1 2 、 1 3 、 1 4 、 1 5 、 1 6 、 2 1 、 2 2 、 2 3 、 2 5 、または 2 6 に記載の抗体。

(項目 6 0)

前記その断片が、その抗原結合性断片を含む、項目 1 0 、 1 1 、 1 2 、 1 3 、 1 4 、 1

10

20

30

40

50

5、16、21、22、23、25、または26に記載の抗体。

(項目61)

前記抗体またはその断片に結合した標識をさらに含む、項目10、11、12、13、14、15、16、21、22、23、25、または26に記載の抗体。

(項目62)

標識とコンジュゲートした項目10、11、12、13、14、15、16、21、22、23、25、または26に記載の抗体またはその断片を含むがん診断剤。

(項目63)

前記標識が、放射性元素、磁性粒子、放射性同位元素、蛍光色素、酵素、毒素、シグナル、染色、検出酵素、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)、アルカリホスファターゼ(AP)、ベータガラクトシダーゼ、色素原、ファストレッド、3,3'-ジアミノベンジジン、3-アミノ-9-エチルカルバゾール、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルリン酸、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- -D-グルクロニド、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される、項目61に記載の抗体。

10

(項目64)

前記標識が、放射性元素、磁性粒子、放射性同位元素、蛍光色素、酵素、毒素、シグナル、染色、検出酵素、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)、アルカリホスファターゼ(AP)、ベータガラクトシダーゼ、色素原、ファストレッド、3,3'-ジアミノベンジジン、3-アミノ-9-エチルカルバゾール、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルリン酸、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- -D-グルクロニド、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される、項目62に記載の抗体。

20

(項目65)

- 項目1、2、3、6、10、11、12、13、14、16、21、22、28、または29に記載の抗体またはその断片と、

- 抗原に結合する際の該抗体または該その断片の抗体検出要素とを含む、診断または予後診断用検査キット。

(項目66)

項目65に記載のキットを使用して生体試料中のSOX10を検出するための方法であつて、

30

- 生体試料を前記抗体またはその断片と接触させるステップと、

- 前記抗体検出要素を使用して、該生体試料における該抗体または該その断片と抗原との結合を検出するステップと

を含む方法。

(項目67)

前記抗体または前記その断片が、SOX10に特異的に結合する、項目6、7、10、11、12、13、または14に記載の抗体。

(項目68)

がんを検出するための、項目1、2、3、6、10、11、12、13、14、16、21、22、28、または29に記載の抗体またはその断片あるいは組成物の使用。

40

(項目69)

がんを診断または予後診断するための、項目1、2、3、6、10、11、12、13、14、16、21、22、28、または29に記載の抗体またはその断片あるいは組成物の使用。

(項目70)

がんの治療の転帰を予測するための、項目1、2、3、6、10、11、12、13、14、16、21、22、28、または29に記載の抗体またはその断片あるいは組成物の使用。

(項目71)

50

がんの治療の有効性を評価するための、項目 1、2、3、6、10、11、12、13、14、16、21、22、28、または 29 に記載の抗体またはその断片あるいは組成物の使用。

(項目 72)

がんの再発を予測するための、項目 1、2、3、6、10、11、12、13、14、16、21、22、28、または 29 に記載の抗体またはその断片あるいは組成物の使用。

(項目 73)

前記抗体またはその断片または組成物の前記使用を、自動染色デバイスで実施する、項目 68 に記載の抗体またはその断片あるいは組成物。

10

(項目 74)

前記検出を手動で行う、項目 68 に記載の抗体またはその断片あるいは組成物。

(項目 75)

前記検出を自動で行う、項目 68 に記載の抗体またはその断片あるいは組成物。

(項目 76)

前記検出を画像解析によって行う、項目 68 に記載の抗体またはその断片あるいは組成物。

(項目 77)

生体試料中の、項目 1、2、3、6、10、11、12、13、14、16、21、22、28、または 29 に記載の抗体またはその断片が結合するタンパク質を検出するための方法であって、生体試料を前記抗体またはその断片と接触させるステップと、該生体試料における該タンパク質に結合した該抗体またはその断片の存在を検出するステップとを含む方法。

20

(項目 78)

前記生体試料が、肺組織、膀胱組織、乳房組織、および前立腺組織を含む、項目 77 に記載の方法。

(項目 79)

前記生体試料が、正常組織、新生物組織、膀胱組織、腎組織、卵巣組織、甲状腺組織、子宮内膜組織、腎組織、扁桃組織、脾臓組織、結腸組織、リンパ節組織、新生物臍組織、胃組織、前立腺組織、肺組織および乳房組織からなる群から選択される、項目 77 に記載の方法。

30

(項目 80)

前記タンパク質に結合した前記抗体またはその断片の前記存在を検出する前記ステップを自動染色デバイスで実施する、項目 77 に記載の方法。

(項目 81)

前記タンパク質に結合した前記抗体またはその断片の前記存在を検出する前記ステップを手動で行う、項目 77 に記載の方法。

(項目 82)

前記タンパク質に結合した前記抗体またはその断片の前記存在を検出する前記ステップを自動で行う、項目 77 に記載の方法。

40

(項目 83)

前記タンパク質に結合した前記抗体またはその断片の前記存在を検出する前記ステップを画像解析によって行う、項目 77 に記載の方法。

(項目 84)

検出する前記ステップが、免疫組織化学 (IHC)、FFPE の IHC、凍結組織切片の IHC、免疫細胞化学、および E L I S A からなる群から選択される方法を含む、項目 77 に記載の方法。

(項目 85)

生体試料中の少なくとも 2 種の異なるタンパク質を検出するための方法であって、該生体試料を、少なくとも 1 つが少なくとも S O X 10 に特異的に結合する少なくと

50

も 2 種の抗体またはその断片を含む組成物と接触させて、抗原抗体複合体を形成させるス
テップと、

- 該抗原抗体複合体を検出するステップと
を含む方法。

(項目 8 6)

前記少なくとも 2 種の抗体またはその断片が、少なくとも 1 つの第 1 の一次抗体と少な
くとも 1 つの第 2 の一次抗体とを含む、項目 8 5 に記載の方法。

(項目 8 7)

前記少なくとも 2 種の抗体またはその断片のうちの前記少なくとも 1 つが、配列番号 2
の核酸配列によりコードされるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、および配列番号 1 の核
酸配列によりコードされるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、項目 8 5 に記載の方
法。

10

(項目 8 8)

前記少なくとも 2 種の抗体またはその断片のうちの前記少なくとも 1 つが、配列番号 5
のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、および配列番号 4 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領
域を含む、項目 8 5 に記載の方法。

(項目 8 9)

前記少なくとも 2 種の抗体またはその断片のうちの前記少なくとも 1 つが、配列番号 9
、配列番号 10 、配列番号 11 、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される
アミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；ならびに配列番号 6 、配列番号 7 、配列番号 8 、およ
びそれらの任意の組合せからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含
む、項目 8 5 に記載の方法。

20

(項目 9 0)

前記少なくとも 2 種の抗体またはその断片のうちの前記少なくとも 1 つが、配列番号 2
の核酸配列によりコードされるアミノ酸配列の少なくとも約 70 % と同一であるアミノ酸
配列を含む軽鎖可変領域、および配列番号 1 の核酸配列によりコードされるアミノ酸配列
の少なくとも約 70 % であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、項目 8 5 に記載の
方法。

(項目 9 1)

前記少なくとも約 70 % 同一であることが、少なくとも約 71 % 、少なくとも約 72 %
、少なくとも約 73 % 、少なくとも約 74 % 、少なくとも約 75 % 、少なくとも約 76 %
、少なくとも約 77 % 、少なくとも約 78 % 、少なくとも約 79 % 、少なくとも約 80 %
、少なくとも約 81 % 、少なくとも約 82 % 、少なくとも約 83 % 、少なくとも約 84 %
、少なくとも約 85 % 、少なくとも約 86 % 、少なくとも約 87 % 、少なくとも約 88 %
、少なくとも約 89 % 、少なくとも約 90 % 、少なくとも約 91 % 、少なくとも約 92 %
、少なくとも約 93 % 、少なくとも約 94 % 、少なくとも約 95 % 、少なくとも約 96 %
、少なくとも約 97 % 、少なくとも約 98 % 、および少なくとも約 99 % からなる群から
選択される百分率を含む、項目 9 0 に記載の方法。

30

(項目 9 2)

前記少なくとも 2 種の抗体またはその断片のうちの前記少なくとも 1 つが、配列番号 5
のアミノ酸配列の少なくとも約 2 % と同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、およ
び配列番号 5 のアミノ酸配列の少なくとも約 2 % であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領
域を含む、項目 8 5 に記載の方法。

40

(項目 9 3)

前記少なくとも約 70 % 同一であることが、少なくとも約 2 . 7 % 、少なくとも約 3 %
、少なくとも約 4 % 、少なくとも約 5 % 、少なくとも約 5 . 7 % 、少なくとも約 6 % 、少
なくとも約 7 % 、少なくとも約 8 % 、少なくとも約 8 . 1 % 、少なくとも約 9 % 、少
なくとも約 10 % 、少なくとも約 10 . 8 % 、少なくとも約 11 % 、少なくとも約 11 . 4 %
、少なくとも約 11 . 7 % 、少なくとも約 12 % 、少なくとも約 13 % 、少なくとも約 1
3 . 9 % 、少なくとも約 14 % 、少なくとも約 15 % 、少なくとも約 16 % 、少なくとも

50

約 17 %、少なくとも約 17 . 1 %、少なくとも約 17 . 2 %、少なくとも約 18 %、少なくとも約 19 %、少なくとも約 19 . 6 %、少なくとも約 19 . 8 %、少なくとも約 20 %、少なくとも約 21 %、少なくとも約 22 %、少なくとも約 23 %、少なくとも約 24 %、少なくとも約 25 %、少なくとも約 25 . 4 %、少なくとも約 26 %、少なくとも約 30 %；約 2 % から約 70 %、約 2 %、約 2 . 7 %、約 3 %、約 4 %、約 5 %、約 5 . 7 %、約 6 %、約 7 %、約 8 %、約 8 . 1 %、約 9 %、約 10 %、約 10 . 8 %、約 11 %、約 11 . 4 %、約 11 . 7 %、約 12 %、約 13 %、約 13 . 9 %、約 14 %、約 15 %、約 16 %、約 17 %、約 17 . 1 %、約 17 . 2 %、約 18 %、約 19 %、約 19 . 6 %、約 19 . 8 %、約 20 %、約 21 %、約 22 %、約 23 %、約 24 %、約 25 %、約 25 . 4 %、約 26 %、および約 30 % の間からなる群から選択される百分率を含む、項目 92 に記載の方法。

(項目 94)

前記少なくとも 2 種の抗体またはその断片のうちの前記少なくとも 1 つが、配列番号 3 の残基を含むアミノ酸配列を有する少なくとも 1 つのポリペプチドに特異的に結合する、項目 85 に記載の方法。

(項目 95)

前記少なくとも 2 種の抗体またはその断片のうちの前記少なくとも 1 つが、配列番号 3 からなる群から選択される残基と少なくとも約 70 % 同一であるアミノ酸配列を有する少なくとも 1 つのポリペプチドに特異的に結合する、項目 85 に記載の方法。

(項目 96)

前記少なくとも約 70 % 同一であることが、少なくとも約 71 %、少なくとも約 72 %、少なくとも約 73 %、少なくとも約 74 %、少なくとも約 75 %、少なくとも約 76 %、少なくとも約 77 %、少なくとも約 78 %、少なくとも約 79 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 81 %、少なくとも約 82 %、少なくとも約 83 %、少なくとも約 84 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 86 %、少なくとも約 87 %、少なくとも約 88 %、少なくとも約 89 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 91 %、少なくとも約 92 %、少なくとも約 93 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、および少なくとも約 99 % からなる群から選択される百分率を含む、項目 95 に記載の方法。

(項目 97)

前記少なくとも 2 種の抗体またはその断片のうちの前記少なくとも 1 つが、A T C C 特許寄託指定番号 P T A - 1 2 0 9 6 9 の下で American Type Culture Collection (ATCC) に寄託されたハイブリドーマによって產生される抗体またはその断片を含む、項目 85 に記載の方法。

(項目 98)

前記組成物が、一次抗体カクテルを含む、項目 85 に記載の方法。

(項目 99)

前記少なくとも 2 種の抗体またはその断片が、少なくとも 2 つの異なる種に由来する、項目 85 に記載の方法。

(項目 100)

前記少なくとも 2 つの異なる種が、マウス、ウサギ、ヤギ、ウマ、ニワトリ、ヒト、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される、項目 100 に記載の方法。

(項目 101)

前記生体試料を二重染色するステップをさらに含む、項目 85 に記載の方法。

(項目 102)

異なる可視化の結果をもたらすステップをさらに含む、項目 85 に記載の方法。

(項目 103)

前記可視化の結果が、呈色の結果を含む、項目 102 に記載の方法。

(項目 104)

少なくとも 2 種の抗体またはその断片のそれぞれが、チロシナーゼ、M A R T - 1 、S

10

20

30

40

50

100、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択されるタンパク質に特異的に結合する、項目85に記載の方法。

(項目105)

前記少なくとも2種の抗体またはその断片のうちの他の前記少なくとも1つが、チロシナーゼ抗体、MART-1抗体、チロシナーゼ抗体[T311]、MART-1抗体[M2-7C10]、MART-1抗体[M2-9E3]、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される、項目85に記載の方法。

(項目106)

前記抗原抗体複合体を検出する前記ステップが、前記試料における少なくとも2種の抗原抗体複合体の形成を検出するステップを含み、第1の前記抗体が、SOX10に特異的に結合し、第2の前記抗体が、チロシナーゼ、MART-1、S100、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される抗原に特異的に結合する、項目85に記載の方法。

10

(項目107)

動物またはヒトにおけるSOX10タンパク質を検出するためのイムノアッセイ法であって、

- 試験される動物またはヒトから組織を得るステップと、
- 該組織中に該タンパク質が存在する場合に該抗体またはその断片がSOX10タンパク質に結合するような量および条件下で、該組織を、項目1、2、3、6、10、11、12、13、14、16、21、22、28、または29に記載の抗体またはその断片と接觸させるステップと、
- 結合した該抗体の存在を検出するステップとを含むイムノアッセイ法。

20

(項目108)

前記組織を固定または凍結するステップをさらに含む、項目107に記載の、動物またはヒトにおけるSOX10タンパク質を検出するためのイムノアッセイ法。

(項目109)

前記固定または凍結した組織を処理してエピトープをSOX10に暴露するステップをさらに含む、項目108に記載の、動物またはヒトにおけるSOX10タンパク質を検出するためのイムノアッセイ法。

30

(項目110)

免疫組織化学(IHC)、FFPEのIHC、凍結組織切片のIHC、免疫細胞化学、およびELISAからなる群から選択される方法を用いて前記動物またはヒトにおける前記SOX10タンパク質を検出するステップをさらに含む、項目107に記載の、SOX10タンパク質を検出するためのイムノアッセイ法。

(項目111)

SOX10タンパク質に特異的に結合する抗体の単離された調製物であって、該抗体が、配列番号3(SOX10タンパク質の残基196～211)からなる群から選択されるエピトープに結合する、調製物。

(項目112)

40

前記生体試料が、皮膚組織を含む、項目77に記載の方法。

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】図1は、胸壁の黒色腫の症例を染色した抗SOX10抗体BC34(褐色)の例のカラー版を示す(10×拡大率)。

【図2】図2は、頭皮の黒色腫の症例を染色した抗SOX10抗体BC34(褐色)の例のカラー版を示す(20×拡大率)。

【図3】図3は、肩の黒色腫(10×拡大率)の症例を染色した抗SOX10抗体BC34(褐色)の例のカラー版を示す。染色の低減、または、おそらくおよび染色の非存在がこの試料において観察され得る。

50

【図4】図4は、リンパ節における転移性黒色腫の症例を染色した抗SOX10抗体BC34(褐色)の例のカラー版を示す(20×拡大率)。

【図5】図5は、気球細胞黒色腫の症例を染色した抗SOX10抗体BC34(赤色)の例のカラー版を示す(10×拡大率)。

【図6】図6は、類上皮細胞黒色腫の症例を染色した抗SOX10抗体BC34(赤色)の例のカラー版を示す(10×拡大率)。

【図7】図7は、末梢神経腫瘍の症例を染色した抗SOX10抗体BC34(褐色)の例のカラー版を示す(20×拡大率)。

【図8】図8は、血管周囲黒色腫の症例を染色した抗SOX10抗体BC34(赤色)の例のカラー版を示す(10×拡大率)。

【図9】図9は、血管周囲黒色腫の症例を染色した抗SOX10抗体BC34(赤色)の例のカラー版を示す(20×拡大率)。

【図10】図10は、ラブドトイド黒色腫の症例を染色した抗SOX10抗体BC34(赤色)の例のカラー版を示す(10×拡大率)。

【図11】図11は、肉腫様黒色腫の症例を染色した抗SOX10抗体BC34(赤色)の例のカラー版を示す(10×拡大率)。

【図12】図12は、形質細胞様黒色腫の症例を染色した抗SOX10抗体BC34(赤色)の例のカラー版を示す(10×拡大率)。

【図13】図13は、皮膚の複合母斑の症例を染色した抗SOX10抗体BC34(褐色)の例のカラー版を示す(20×拡大率)。

【図14】図14は、頬の真皮内母斑の症例を染色した抗SOX10抗体BC34(褐色)の例のカラー版を示す(20×拡大率)。

【図15】図15は、皮膚の境界母斑の症例を染色した抗SOX10抗体BC34(褐色)の例のカラー版を示す(20×拡大率)。

【図16】図16は、シュワン細胞腫の症例を染色した抗SOX10抗体BC34(褐色)の例のカラー版を示す(10×拡大率)。

【図17】図17は、正常な結腸における銀親和性細胞を染色した抗SOX10抗体BC34(褐色)の例のカラー版を示す(20×拡大率)。

【図18】図18は、正常な脳神経細胞を染色した抗SOX10抗体BC34(褐色)の例のカラー版を示す(20×拡大率)。

【図19】図19は、正常な乳腺における筋上皮細胞を染色した抗SOX10抗体BC34(褐色)の例のカラー版を示す(20×拡大率)。

【図20】図20は、正常な皮膚を染色した抗SOX10抗体BC34(褐色)の例のカラー版を示す(20×拃大率)。

【図21】図21は、正常な唾液腺を染色した抗SOX10抗体BC34(褐色)の例のカラー版を示す(20×拡大率)。

【図22】図22は、乳房組織、おそらく、乳がんを染色した抗SOX10抗体BC34(褐色)の例のカラー版を示す。

【図23】図23は、図22と同じ乳房検体を染色したRP抗SOX10抗体(褐色)の例のカラー版を示す。染色は、図22においてBC34を用いて観察されたものよりも染まり方が強くない可能性がある。

【図24】図24は、肺組織、おそらく、肺腺癌を染色した抗SOX10抗体BC34(褐色)の例のカラー版を示す。染色は、特に図25と比較して、低減する、または、おそらく、存在しない可能性がある。

【図25】図25は、図24と同じ肺検体を染色したRP抗SOX10抗体(褐色)の例のカラー版を示す。SOX10に関して予測される核染色とは対照的に、この試料では細胞質染色が観察され得る。

【図26】図26は、黒色腫を染色した抗SOX10抗体BC34(褐色)の例のカラー版を示す。染色は、おそらく、図27において観察されたものよりも染まり方が強い可能性がある。

10

20

30

40

50

【図27】図27は、図26と同じ黒色腫検体を染色したR P抗S O X 1 0抗体(褐色)の例のカラー版を示す。染色は、図26においてB C 3 4を用いて観察されたものよりも染まり方が強くない可能性がある。

【図28】図28は、黒色腫を染色した抗S O X 1 0抗体B C 3 4(褐色)の例のカラー版を示す。染色は、おそらく、図29において観察されたものよりも染まり方が強い可能性がある。

【図29】図29は、図28と同じ乳房検体を染色したR P抗S O X 1 0抗体(褐色)の例のカラー版を示す。染色は、図28においてB C 3 4を用いて観察されたものと比較して低減する、または、おそらく、存在しない可能性がある。

【図30】図30は、黒色腫を染色した抗S O X 1 0抗体B C 3 4(褐色)の例のカラー版を示す。染色は、おそらく、図31において観察されたものよりも染まり方が強い可能性がある。10

【図31】図31は、図30と同じ乳房検体を染色したR P抗S O X 1 0抗体(褐色)の例のカラー版を示す。染色は、図30においてB C 3 4を用いて観察されたものと比較して低減する、または、おそらく、存在しない可能性がある。

【図32】図32は、正常な膀胱を染色した抗S O X 1 0抗体B C 3 4(褐色)の例のカラー版を示す。染色は、特に図33と比較して、低減する、または、おそらく、存在しない可能性がある。

【図33】図33は、図32と同じ膀胱検体を染色したR P抗S O X 1 0抗体(褐色)の例のカラー版を示す。S O X 1 0に関して予測される核染色とは対照的に、この試料では細胞質染色が観察され得る。20

【図34】図34は、腸カルチノイドを染色した抗S O X 1 0抗体B C 3 4(褐色)の例のカラー版を示す(20×拡大率)。

【図35】図35は、胞巣状横紋筋肉腫(alveolus rhabdomyosarcoma)の症例を染色した抗S O X 1 0抗体B C 3 4(褐色)の例のカラー版を示す(20×拡大率)。

【図36】図36は、星状細胞腫の症例を染色した抗S O X 1 0抗体B C 3 4(褐色)の例のカラー版を示す(10×拡大率)。

【図37】図37は、乳がんの症例を染色した抗S O X 1 0抗体B C 3 4(褐色)の例のカラー版を示す(20×拡大率)。30

【図38】図38は、中間グレードII平滑筋肉腫の症例を染色した抗S O X 1 0抗体B C 3 4(褐色)の例のカラー版を示す(10×拡大率)。

【図39】図39は、線維形成性黒色腫の症例を染色した抗S O X 1 0抗体B C 3 4(褐色)の例のカラー版を示す(10×拡大率)。

【図40】図40は、線維形成性黒色腫の症例を染色した抗S O X 1 0抗体B C 3 4(褐色)の例のカラー版を示す(20×拡大率)。

【図41】図41は、良性シュワン細胞腫の症例を染色した抗S O X 1 0抗体B C 3 4(褐色)の例のカラー版を示す(10×拡大率)。

【図42】図42は、紡錘細胞黒色腫の症例を染色した抗S O X 1 0抗体B C 3 4(褐色)の例のカラー版を示す(20×拡大率)。40

【図43】図43は、紡錘細胞黒色腫の症例を染色した抗S O X 1 0抗体B C 3 4(褐色)の例のカラー版を示す(10×拡大率)。

【図44】図44は、紡錘細胞黒色腫の症例を染色した抗S O X 1 0抗体B C 3 4(褐色)の例のカラー版を示す(20×拡大率)。

【図45】図45は、黒色腫の症例を染色したチロシナーゼ+M A R T - 1の抗体カクテル(赤色)の例のカラー版を示す。

【図46】図46は、図45に示されているのと同じ黒色腫の症例を染色したS O X 1 0[B C 3 4](赤色)の例のカラー版を示す。

【図47】図47は、黒色腫の症例を染色したS O X 1 0+チロシナーゼ+M A R T - 1の抗体カクテル(赤色)の第1の例のカラー版を示す。50

【図48】図48は、黒色腫の症例を染色したSOX10 + チロシナーゼ + MART-1の抗体カクテル（赤色）の第2の例のカラー版を示す。

【図49】図49は、黒色腫の症例を染色したBC34（赤色）の例のカラー版を示す。

【図50】図50は、チロシナーゼ + MART-1のカクテルを用いて染色した図49に示されているのと同じ黒色腫の症例（赤色）のカラー版を示す。おそらく、着色したメラノサイトが観察され得るにもかかわらず、染色が低減しているまたは染色が存在しない可能性がある。

【図51】図51は、黒色腫の症例を染色したチロシナーゼ + MART-1のカクテル（赤色）の例のカラー版を示す。

【図52】図52は、BC34を用いて染色した、図51に示されているのと同じ黒色腫の症例（赤色）のカラー版を示す。おそらく、染色が低減しているまたは染色が存在しない可能性がある。
10

【図53】図53は、黒色腫の症例を染色したSOX10 [BC34] + チロシナーゼ + MART-1（赤色）の例のカラー版を示す。

【図54】図54は、S100を用いて染色した、図49に示されているのと同じ黒色腫の症例（赤色）のカラー版を示す。おそらく、染色が低減しているまたは染色が存在しない可能性がある。

【図55】図55は、SOX10 [BC34] + チロシナーゼ + MART-1の抗体カクテルを用いて染色したリンパ節の例（赤色）のカラー版を示す。おそらく、染色が低減しているまたは染色が存在しない可能性がある。
20

【図56】図56は、SOX10 [BC34] + チロシナーゼ + MART-1の抗体カクテルを用いて染色した脳の例（赤色）のカラー版を示す。おそらく、染色が低減しているまたは染色が存在しない可能性がある。

【図57】図57は、SOX10 [BC34] + チロシナーゼ + MART-1の抗体カクテルを用いて染色した骨髄の例（赤色）のカラー版を示す。おそらく、染色が低減しているまたは染色が存在しない可能性がある。

【図58】図58は、図55に示されているのと同じリンパ節の症例においてS100を用いて染色した例（赤色）のカラー版を示す。

【図59】図59は、図56に示されているのと同じ脳の症例においてS100を用いて染色した例（赤色）のカラー版を示す。
30

【図60】図60は、図57に示されているのと同じ骨髄の症例においてS100を用いて染色した例（赤色）のカラー版を示す。

【図61】図61は、本発明の種々の実施形態によるキットの要約の概略図の例を示す。

【図62】図62は、本発明の種々の実施形態によるイムノアッセイ法の要約の概略図の例を示す。

【図63】図63は、胸壁の黒色腫の症例を染色した抗SOX10抗体BC34の例の白黒版を示す（10×拡大率）。

【図64】図64は、頭皮の黒色腫の症例を染色した抗SOX10抗体BC34の例の白黒版を示す（20×拡大率）。

【図65】図65は、肩の黒色腫の症例を染色した抗SOX10抗体BC34の例の白黒版を示す（10×拡大率）。染色の低減、または、おそらくおよび染色の非存在がこの試料において観察され得る。
40

【図66】図66は、リンパ節における転移性黒色腫の症例を染色した抗SOX10抗体BC34の例の白黒版を示す（20×拡大率）。

【図67】図67は、気球細胞黒色腫の症例を染色した抗SOX10抗体BC34の例の白黒版を示す（10×拡大率）。

【図68】図68は、類上皮細胞黒色腫の症例を染色した抗SOX10抗体BC34の例の白黒版を示す（10×拡大率）。

【図69】図69は、末梢神経腫瘍の症例を染色した抗SOX10抗体BC34の例の白黒版を示す（20×拡大率）。

10

20

30

40

50

【図70】図70は、血管周囲黒色腫の症例を染色した抗SOX10抗体BC34の例の白黒版を示す(10×拡大率)。

【図71】図71は、血管周囲黒色腫の症例を染色した抗SOX10抗体BC34の例の白黒版を示す(20×拡大率)。

【図72】図72は、ラブドイド黒色腫の症例を染色した抗SOX10抗体BC34の例の白黒版を示す(10×拡大率)。

【図73】図73は、肉腫様黒色腫の症例を染色した抗SOX10抗体BC34の例の白黒版を示す(10×拡大率)。

【図74】図74は、形質細胞様黒色腫の症例を染色した抗SOX10抗体BC34の例の白黒版を示す(10×拡大率)。 10

【図75】図75は、皮膚の複合母斑の症例を染色した抗SOX10抗体BC34の例の白黒版を示す(20×拡大率)。

【図76】図76は、頬の真皮内母斑の症例を染色した抗SOX10抗体BC34の例の白黒版を示す(20×拡大率)。

【図77】図77は、皮膚の境界母斑の症例を染色した抗SOX10抗体BC34の例の白黒版を示す(20×拡大率)。

【図78】図78は、シュワン細胞腫の症例を染色した抗SOX10抗体BC34の例の白黒版を示す(10×拡大率)。

【図79】図79は、正常な結腸における銀親和性細胞を染色した抗SOX10抗体BC34の例の白黒版を示す(20×拡大率)。 20

【図80】図80は、正常な脳神経細胞を染色した抗SOX10抗体BC34の例の白黒版を示す(20×拡大率)。

【図81】図81は、正常な乳腺における筋上皮細胞を染色した抗SOX10抗体BC34の例の白黒版を示す(20×拡大率)。

【図82】図82は、正常な皮膚を染色した抗SOX10抗体BC34の例の白黒版を示す(20×拡大率)。

【図83】図83は、正常な唾液腺を染色した抗SOX10抗体BC34の例の白黒版を示す(20×拡大率)。

【図84】図84は、乳房組織、おそらく、乳がんを染色した抗SOX10抗体BC34の例の白黒版を示す。 30

【図85】図85は、図84と同じ乳房検体を染色したRP抗SOX10抗体の例の白黒版を示す。染色は、図84においてBC34を用いて観察されたものよりも染まり方が強くない可能性がある。

【図86】図86は、肺組織、おそらく、肺腺癌を染色した抗SOX10抗体BC34の例の白黒版を示す。染色は、特に図87と比較して、低減する、または、おそらく、存在しない可能性がある。

【図87】図87は、図86と同じ肺検体を染色したRP抗SOX10抗体の例の白黒版を示す。SOX10に関して予測される核染色とは対照的に、この試料では細胞質染色が観察され得る。

【図88】図88は、黒色腫を染色した抗SOX10抗体BC34の例の白黒版を示す。染色は、おそらく、図89において観察されたものよりも染まり方が強い可能性がある。 40

【図89】図89は、図88と同じ黒色腫検体を染色したRP抗SOX10抗体の例の白黒版を示す。染色は、図88においてBC34を用いて観察されたものよりも染まり方が強くない可能性がある。

【図90】図90は、黒色腫を染色した抗SOX10抗体BC34の例の白黒版を示す。染色は、おそらく、図91において観察されたものよりも染まり方が強い可能性がある。

【図91】図91は、図90と同じ乳房検体を染色したRP抗SOX10抗体の例の白黒版を示す。染色は、図90においてBC34を用いて観察されたものと比較して低減する、または、おそらく、存在しない可能性がある。

【図92】図92は、黒色腫を染色した抗SOX10抗体BC34の例の白黒版を示す。 50

染色は、おそらく、図93において観察されたものよりも染まり方が強い可能性がある。
【図93】図93は、図92と同じ乳房検体を染色したRP抗SOX10抗体の例の白黒版を示す。染色は、図92においてBC34を用いて観察されたものと比較して低減する、または、おそらく、存在しない可能性がある。

【図94】図94は、正常な膀胱を染色した抗SOX10抗体BC34の例の白黒版を示す。染色は、特に図95と比較して、低減する、または、おそらく、存在しない可能性がある。

【図95】図95は、図94と同じ膀胱検体を染色したRP抗SOX10抗体の例の白黒版を示す。SOX10に関して予測される核染色とは対照的に、この試料では細胞質染色が観察され得る。

【図96】図96は、腸カルチノイドを染色した抗SOX10抗体BC34の例の白黒版を示す(20×拡大率)。

【図97】図97は、胞巣状横紋筋肉腫の症例を染色した抗SOX10抗体BC34の例の白黒版を示す(20×拡大率)。

【図98】図98は、星状細胞腫の症例を染色した抗SOX10抗体BC34の例の白黒版を示す(10×拡大率)。

【図99】図99は、乳がんの症例を染色した抗SOX10抗体BC34の例の白黒版を示す(20×拡大率)。

【図100】図100は、中間グレードII平滑筋肉腫の症例を染色した抗SOX10抗体BC34の例の白黒版を示す(10×拡大率)。

【図101】図101は、線維形成性黒色腫の症例を染色した抗SOX10抗体BC34の例の白黒版を示す(10×拡大率)。

【図102】図102は、線維形成性黒色腫の症例を染色した抗SOX10抗体BC34の例の白黒版を示す(20×拡大率)。

【図103】図103は、良性シュワン細胞腫の症例を染色した抗SOX10抗体BC34の例の白黒版を示す(10×拡大率)。

【図104】図104は、紡錘細胞黒色腫の症例を染色した抗SOX10抗体BC34の例の白黒版を示す(20×拡大率)。

【図105】図105は、紡錘細胞黒色腫の症例を染色した抗SOX10抗体BC34の例の白黒版を示す(10×拡大率)。

【図106】図106は、紡錘細胞黒色腫の症例を染色した抗SOX10抗体BC34の例の白黒版を示す(20×拡大率)。

【図107】図107は、黒色腫の症例を染色したチロシナーゼ+MART-1の抗体カクテルの例の白黒版を示す。

【図108】図108は、図39Aに示されているのと同じ黒色腫の症例を染色したSOX10[BC34]の例の白黒版を示す。

【図109】図109は、黒色腫の症例を染色したSOX10+チロシナーゼ+MART-1の抗体カクテルの第1の例の白黒版を示す。

【図110】図110は、黒色腫の症例を染色したSOX10+チロシナーゼ+MART-1の抗体カクテルの第2の例の白黒版を示す。

【図111】図111は、黒色腫の症例を染色したBC34の例の白黒版を示す。

【図112】図112は、チロシナーゼ+MART-1のカクテルを用いて染色した図111に示されているのと同じ黒色腫の症例の白黒版を示す。おそらく、着色したメラノサイトが観察され得るにもかかわらず、染色が低減しているまたは染色が存在しない可能性がある。

【図113】図113は、黒色腫の症例を染色したチロシナーゼ+MART-1のカクテルの例の白黒版を示す。

【図114】図114は、BC34を用いて染色した、図113に示されているのと同じ黒色腫の症例の白黒版を示す。おそらく、染色が低減しているまたは染色が存在しない可能性がある。

10

20

30

40

50

【図115】図115は、黒色腫の症例を染色したSOX10 [BC34] +チロシナーゼ+MART-1の例の白黒版を示す。

【図116】図116は、S100を用いて染色した、図40Aに示されているのと同じ黒色腫の症例の白黒版を示す。おそらく、染色が低減しているまたは染色が存在しない可能性がある。

【図117】図117は、SOX10 [BC34] +チロシナーゼ+MART-1の抗体カクテルを用いて染色したリンパ節の例の白黒版を示す。おそらく、染色が低減しているまたは染色が存在しない可能性がある。

【図118】図118は、SOX10 [BC34] +チロシナーゼ+MART-1の抗体カクテルを用いて染色した脳の例の白黒版を示す。おそらく、染色が低減しているまたは染色が存在しない可能性がある。
10

【図119】図119は、SOX10 [BC34] +チロシナーゼ+MART-1の抗体カクテルを用いて染色した骨髄の例の白黒版を示す。おそらく、染色が低減しているまたは染色が存在しない可能性がある。

【図120】図120は、図117に示されているのと同じリンパ節の症例においてS100を用いて染色した例の白黒版を示す。

【図121】図121は、図118に示されているのと同じ脳の症例においてS100を用いて染色した例の白黒版を示す。

【図122】図122は、図119に示されているのと同じ骨髄の症例においてS100を用いて染色した例の白黒版を示す。
20

【図123】図123は、SOX10のウエスタンプロットを示す。

【図124】図124は、正常な皮膚、10×におけるSOX10を示す。

【図125】図125は、正常な乳房、10×におけるSOX10を示す。

【図126】図126は、正常な唾液腺、10×におけるSOX10を示す。

【図127】図127は、末梢神経、10×におけるSOX10を示す。

【図128】図128は、小脳、20×におけるSOX10を示す。

【図129】図129は、大脳におけるSOX10を示す。

【図130】図130は、メラニン色素染色された黒色腫、10×におけるSOX10を示す。
20

【図131】図131は、皮膚黒色腫、2×におけるSOX10を示す。

【図132】図132は、リンパ節における転移性黒色腫におけるSOX10を示す。

【図133】図133は、リンパ節における転移性黒色腫、20×におけるSOX10を示す。
30

【図134】図134は、紡錘細胞黒色腫、10×におけるSOX10を示す。

【図135】図135は、線維形成性黒色腫、20×におけるSOX10を示す。

【図136】図136は、in situにおける線維形成性黒色腫の構成成分、20×におけるSOX10を示す。
40

【図137】図137は、肉腫様黒色腫、20×におけるSOX10を示す。

【図138】図138は、シュワン細胞腫、10×におけるSOX10発現を示す。

【図139】図139は、良性母斑、20×におけるSOX10発現を示す。
40

【図140】図140は、侵襲性腺管癌（乳房）20×におけるSOX10発現を示す。

【図141】図141は、DCIS周囲の筋上皮細胞（乳房）、10×におけるSOX10発現を示す。
50

【図142】図142は、星状細胞腫、20×におけるSOX10発現を示す。

【図143】図143は、腸カルチノイド、支持細胞、10×におけるSOX10発現を示す。

【発明を実施するための形態】

【0018】

前記の論述から理解され得る通り、本発明は、異なるやり方で組み合わせができる種々の態様を含む。以下の説明は、要素を列挙するために提供され、本発明の実施形態

のいくつかを記載するものである。これらの要素は、最初の実施形態と共に列挙されているが、これらを任意の様式および任意の数で組み合わせて、さらなる実施形態を創出することができる事が理解されるべきである。多様に記載されている実施例および好ましい実施形態は、本発明を明確に記載されている系、技法、および適用だけに限定するものと解釈されるべきではない。さらに、本記載は、全ての種々の実施形態、系、技法、方法、デバイス、および適用の説明および請求項を、任意の数の開示される要素と共に、各要素単独と共に、および同様に本出願または任意のその後の出願における全ての要素の任意のかつ全ての種々の入れ替えおよび組合せと共に、支持し、包含するものと理解されるべきである。

【0019】

10

本発明の実施形態は、SOX10に特異的に結合し、いくつかの型のがんに対する診断におけるSOX10の検出のために使用することができるモノクローナル抗体およびその方法を提供し得る。モノクローナル抗体は、抗体断片、マウスモノクローナル抗体、ウサギモノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化モノクローナル抗体、ヒトモノクローナル抗体、検出可能なシグナルまたは染色で標識された抗体、毒素で標識された抗体などであってよい。モノクローナル抗体は、1つの宿主種に由来する可変領域と異なる種に由来する定常領域、おそらく、SOX10に結合することが知られているマウスモノクローナル抗体に由来する可変領域とウサギIgG抗体に由来する定常領域で構成されるキメラ抗体であってよい。本発明の系および方法は、SOX10に結合することが可能なモノクローナル抗体またはその抗原結合性部分に関し得る。

20

【0020】

マウスモノクローナル抗体は、免疫組織化学手順における一次抗体としての使用を含め、特異的な分析物を同定するためのイムノアッセイ法において一般に使用され得る。目的のタンパク質標的に特異的なマウスモノクローナル抗体は、一般に知られている手順を使用して産生させることができる。一般に、マウスを目的の抗原（例えば、所望の標的のペプチド断片または全長のタンパク質標的）に曝露させることにより免疫応答が誘導され得、その免疫応答では、マウスが、抗原に結合する多数の抗体を生成し、その抗体のそれぞれは、特定のB細胞によって産生され得る。これらのB細胞をマウス脾臓から単離することができ、産生された抗体を、IHCにおける一次抗体としてのそれらの適合性について評価することができる。最適な抗体を選択した後、関連するB細胞を、公知の手順を使用して腫瘍細胞と融合させることができ、おそらく、それにより、際限なく複製し、所望の抗体を継続的に産生することができる新しい細胞株であるハイブリドーマがもたらされる。

30

【0021】

ある特定の実施形態では、いくつかの理由でポリクローナル抗体よりもモノクローナル抗体が好ましい場合がある。特に、モノクローナル抗体は、単一のB細胞由来であり得、したがって、単一のエピトープを認識することが可能であり、おそらく、それにより、より高い特異性がもたらされる。モノクローナル抗体は、細胞培養において都合よく、かつ再現性よく生成することもでき、おそらく、それにより、所望の抗体の一定した供給がもたらされる。当然、他の実施形態では、ポリクローナル抗体を利用することができる。

40

【0022】

マウスモノクローナル抗SOX10抗体BC34などの抗SOX10抗体は、これらの一般的な手順を使用して産生させることができ、免疫組織化学により、種々の正常組織および新生物組織に対する感度および特異性について、おそらく、特に以前より公知のRP抗SOX10抗体と比較して、評価することができる。

【0023】

SOX10タンパク質の発現の例：アミノ酸配列147～253由来のSOX10組換えタンパク質をクローニングし、E.coliにより発現させることができる。簡単に述べると、SOX10 cDNAをクローニングし、精製することができる。SOX10 cDNAを制限酵素によって消化し、pET30a-GSTベクターにライゲーションす

50

ることができる。B L 2 1 細胞を当該構築物で形質転換することができる。正確なサイズの組換えタンパク質を発現するコロニーを選択し、配列決定することができる。さらなるスケールアップ産生を、約 0 . 5 m M の I P T G を含有する L B 培地中で E . c o l i を培養することによって実施することができる。最終的な S O X 1 0 組換えタンパク質を精製し、S D S - P A G E によって分析することができる。

【 0 0 2 4 】

宿主免疫の例：雌 B A L B / c (約 6 週齢～約 8 週齢) マウスを、マウス当たり約 1 0 0 μ g の完全フロイントアジュvant 中ヒト S O X 1 0 タンパク質を用いて腹腔内 (i . p .) 免疫することができる。約 3 週間後、マウスを、マウス当たりさらに約 1 0 0 μ g の不完全フロイントアジュvant 中ヒト S O X 1 0 を用いて、さらに約 4 回、約 3 週間おきに追加刺激することができる。マウスの尾部から採血することができ、血清を採取し、後の酵素連続免疫吸着検定法 (E L I S A) による抗体価の分析のために約 - 2 0 で保管することができる。

【 0 0 2 5 】

ハイブリドーマの例：S O X 1 0 に対する抗体を產生するハイブリドーマは、S O X 1 0 で免疫した B A L B / c マウスの脾細胞から標準の技法によって生成することができる。例えば、S O X 1 0 で免疫したマウス由來の脾細胞を、P 3 - X 6 3 - A g 8 . 6 5 3 骨髄腫細胞 (S P 2 / 0 B a l b / c 骨髄腫細胞に由来する非分泌性骨髄腫) と、約 4 : 1 の比で約 5 0 % ポリエチレングリコールと一緒にインキュベートすることによって融合することができる。インキュベートした後、細胞を、おそらく、約 3 0 0 \times g で約 1 0 分にわたって遠心分離し、P B S 約 2 5 m l 中で洗浄し、再度遠心分離することによってペレット化することができ、細胞ペレットを、約 2 0 % ウシ胎児血清を含有する新鮮なダルベッコ培地 (H y c l o n e 、 L o g a n 、 U t a h) 約 1 0 0 m l に再懸濁することができる。約 1 0 0 μ l の一定分量を 1 0 個の 9 6 ウェルマイクロタイープレート (C o r n i n g 、 L o w e l l 、 M A) の各ウェルに添加することができる。約 2 4 時間後、約 1 0 0 μ l 約 1 M のヒポキサンチン (H T) 、約 4 m M のアミノブテリンおよび約 1 6 0 m M のチミジン (H A T) を補充した D M E M 培地を各マイクロタイーウェルに添加することができる。培地を、おそらく、約 4 日後に完全培地 (おそらく、H A T および H T を含有する) と交換することができる。その後の約 1 0 日にわたり、培地を除去し、H A T および H T の添加を減らした、または、おそらく、さらには、H A T および H T を添加していない新鮮な培地と交換することができる。ハイブリドーマの上清を、S O X 1 0 に対する抗体反応性について E L I S A によってスクリーニングすることができ、次いで、ハイブリドーマクローンを選択し、おそらく、限界希釈により 2 回クローニングすることによって安定化することができる。

【 0 0 2 6 】

抗ヒト S O X 1 0 ハイブリドーマクローン B C 3 4 と称されるハイブリドーマ細胞は、これによって参照により本明細書に組み込まれる「 B u d a p e s t R e s t r i c t e d C e r t i f i c a t e o f D e p o s i t 」という表題の 以下 に示されている通り、2 0 1 4 年 2 月 1 1 日に、M a n a s s a s 、V i r g i n i a にある A m e r i c a n T y p e C u l t u r e C o l l e c t i o n (A T C C) P a t e n t D e p o s i t o r y に寄託され、A T C C 特許寄託指定番号 P T A - 1 2 0 9 6 9 を受けている。本発明の実施形態は、A T C C に寄託されたハイブリドーマによって產生される抗体またはその断片を提供し得、さらには、S O X 1 0 を特異的に認識するが可能なモノクローナル抗体を產生するハイブリドーマ細胞を培養し、さらには、ハイブリドーマにモノクローナル抗体を產生させることによってモノクローナル抗体を產生するための方法も含み得る。

【化1】



寄託に関するブダペスト機密証明書
特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関する
ブダペスト条約
国際様式
規則7.3に基づく原寄託についての受託証
および規則10.2に基づく生存に関する証明書

アメリカン タイプ カルチャーコレクション (ATCC®) は、特許出願の出願に関連して、貴殿の種子／株(strain)／系統(strain) の寄託物を受領した。以下の情報は、特許庁の要件を満たすために提供される。

ウェイミン チ
 バイオケア メディカル, インコーポレーテッド
 4040 パイク レーン
 コンコード、カルフォルニア 94520

10

20

寄託者：バイオケア メディカル, インコーポレーテッド

ATCC®による種子／株の受領日：2014年2月11日

寄託者の参照：マウスハイブリドーマ

株： 抗ヒトS0X10、クローンBC34

量： 25バイアル

ATCC名称：PTA-120969

ATCC®は、以下の点を理解する：

30

1. これらの種子／株の寄託は、明示または默示を問わず、ATCC®に特許を侵害する許可を与えるものではない。また、他者へのこれらの種子／株の分譲は、明示または默示を問わず、他者に特許を侵害する許可を与えるものではない。

2. 特許の有効期間中に寄託物が死滅するか、もしくは破壊された場合には、生存能力のある材料でそれを置き換えるのは、貴殿の責任である。寄託期間にわたって分譲に十分な量を供給するのもまた貴殿の責任である。ATCC®はこの材料を、30年間、または最新の寄託物請求後5年間のいずれか長い方にわたり分譲し、維持する。米国および多くの他の国々がブダペスト条約に加盟している。

米国特許の発行の前に、ATCC®は、寄託者または関連する特許庁によって指示される場合を除き、一回限りの手数料を考慮して、これらの種子／株、またはそれらもしくはそれらの寄託物に関するいかなる情報も頒布しないことに同意する。関連する特許の発行の後、我々はこの種子／株を分譲する責任があり、それらはいかなる制限もなしで、公衆への分譲のために利用可能となる。寄託の日から30年間にわたり、本種子／株の請求があれば、貴殿にこれを通知する。

40

【化2】



上記寄託物を2014年2月24日に試験した。その当日に、本種子/株は生存能力があった。

国際寄託当局：アメリカン タイプ カルチャー コレクション (ATCC®)，
アメリカ合衆国 バージニア、マナサス

10

ATCC® 代表責任者の署名：

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Michelle Harrington".

ロッシェル ハリントン

2014年2月27日
日付

cc: ニコール レスー
Ref: 文書または事件番号: Biocare-SOX10-Prov2

20

30

40

Doc ID:20127
改定：2
発効日：2009年11月25日

【0027】

E L I S A : S O X 1 0 に対する宿主抗血清免疫応答は、E L I S A によって測定することができる。例えば、リン酸緩衝食塩水 (P B S) 中 S O X 1 0 溶液 (約 1 μ g / m l) を使用して、約 9 6 ウェル平底ポリスチレンプレートをコーティングすることができる。次いで、プレートを、約 1 % ウシ血清アルブミン (B S A) - P B S を用いてブロッキングすることができる。希釈した免疫血清またはハイブリドーマの上清のいずれかを添加

50

し、約37℃で約1時間インキュベートすることができる。プレートをPBSで洗浄した後、プレートをヤギ抗マウス-HRP試薬(Jackson Labs)と一緒にインキュベートすることができる。インキュベーションは、約37℃で約30分にわたって行うことができる。ABTS基質を添加して色を生じさせることができ、約405nmにおける吸光度(A405)をマイクロタイタープレートリーダーで測定することができる。

【0028】

モノクローナル抗体のアイソタイプ：BC34モノクローナル抗体などの抗SOX10抗体を、マウスマノクローナル抗体アイソタイピングキット(Invitrogen、carlsbad CA)を使用してアイソタイピングすることができる。例えば、マウスマノクローナル抗体[BC34]細胞由来の上清約100μlを、ヤギ抗マウスIgG1、IgG2A、IgG2B、IgG3、IgM、およびIgAをコーティングしたプレートに添加することができる。約30分インキュベートした後、プレートをPBSで約3回洗浄することができ、それをヤギ抗マウスIg-HRP試薬と一緒にインキュベートすることができる。ABTS基質を添加して色を生じさせ、約405nmにおける吸光度(A405)をマイクロタイタープレートリーダーで測定することができる。BC34クローンをアイソタイプについて試験することができ、マウスIgG1/カッパとして同定することができる。

【0029】

抗体産生および精製：クローンBC34由来の選択されたハイブリドーマ細胞を、約10%FBSを補充したDME M培地または任意の無血清培地で培養することができる。培養上清をプロテインAアフィニティーカラムによってさらに精製することができる。また、ハイブリドーマ細胞をプリスタンで初回刺激したBALB/cマウスに注射して抗体腹水を生じさせることができる。抗体腹水をプロテインAアフィニティーカラムによってさらに精製することができる。IgGの濃度を、マウスIgGに対する吸光係数、約280nmにおいて約1.4を使用して分光光度的に測定することができる。IgGの純度をSDS-PAGEによって決定することができる。

【0030】

ウエスタンプロッティング：精製されたモノクローナル抗体[BC34]をウエスタンプロッティングによって特徴づけることができる。全長SOX10をトランスフェクトした細胞溶解物(Origene、Rockville、MD)を、Tris-グリシン緩衝液を用いた約4%～約12%SDS-PAGEを使用したタンパク質ゲル電気泳動に供することができ、Tris-グリシン緩衝液中ニトロセルロースフィルターに転写することができる。プロット上のタンパク質を、BC34抗体をプロッキング緩衝液でプロッキングした後、室温で約60分インキュベートし、おそらく、その後、ペルオキシダーゼとコンジュゲートしたヤギ抗マウス免疫グロブリンと一緒にインキュベートすることによって可視化することができる。プロットを、TMB色素原を使用して検出することができる。

【0031】

VH配列およびVL配列の決定：全RNAを、ハイブリドーマからQiagen kit(USA、Gaithersburg、MD)を製造者の説明書の通り使用して抽出することができる。ハイブリドーマ細胞由来の全RNAを、6μMのランダムなプライマーミックス(New England Biolabs Ipswich、MA)、0.5mMの各ヌクレオチドdNTP Mix(Life Technologies、Grand Island、NY)、5mMのDTT(Invitrogen)、40UのRNase OUT(商標)Recombinant RNase Inhibitor、および200UのSuperscript III逆転写酵素(Life Technologies、Grand Island、NY)を含有する最終体積20μlで逆転写した。逆転写(RT)反応を、42℃で5分、25℃で10分、50℃で60分および94℃で5分、実施した。マウスIgHおよびIgK可変領域を、それぞれ独立に、鑄型としてcDNA 1μlから出発する2ラウンドのネステッドPCRによって増幅した。全てのP

10

20

30

40

50

C R 反応を、200 nMの各プライマーまたは全プライマーミックス(表1)、300 μ Mの各dNTP(Life Technologies, Grand Island, NY)およびTaq DNAポリメラーゼ(Life Technologies, Grand Island, NY)0.1 u lを含有する総体積20 μ lで実施した。PCRの第1ラウンドを94で15分、その後、94で30秒、56(Igh)または50(Igk)で30秒、72で55秒の30サイクル、および72で10分の最終的なインキュベーションで実施した。ネステッド第2ラウンドPCRを、精製していない第1ラウンドPCR産物1 μ lを用い、94で15分、その後、94で30秒、60(Igh)または45(Igk)で30秒、72で45秒を30サイクル、および72で10分の最終的なインキュベーションで実施した。PCR産物を2%アガロースゲルで分析し、切り出し、QIAquick PCR Purification Kit(QIAGEN, Valencia, CA)を使用して精製した。精製されたPCR産物をTOPO TA Cloning System(Life Technologies, Grand Island, NY)によってクローニングした。8つのコロニーをランダムに選択し、M13フォワードプライマーおよびリバースプライマーを用いたコロニーPCRによってスクリーニングした。PCR産物を、QIAquick PCR Purification Kit(QIAGEN, Valencia, CA)を使用して精製し、T3プロモーター配列決定プライマーおよび分析を使用して配列決定した。IMGT(International Immuno-Genetics)/V-QUESTデータベースを適用してVH配列およびVL配列を解析し、相補性決定領域(CDR)を決定した(表2)。(http://www.imgt.org/IMGT_vquest/share/textes/)

【表1】

表1

プライマーナンバー	5'-3'配列
Igh、第1のPCR	
5' MsVHE	GGGAATTCTGAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGG
3' C γ 1外側	GGAAGGTGTGCACACCGCTGGAC
3' C γ 2c外側	GGAAGGTGTGCACACCACTGGAC
3' C γ 2b外側	GGAAGGTGTGCACACTGCTGGAC
3' C γ 3外側	AGACTGTGCGCACACCGCTGGAC
	10
Igh、第2のPCR	
5' MsVHE	GGGAATTCTGAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGG
3' C γ 1内側	GCT CAG GGA AAT AGC CCT TGA C
3' C γ 2c内側	GCT CAG GGA AAT AAC CCT TGA C
3' C γ 2b内側	ACT CAG GGA AGT AGC CCT TGA C
3' C γ 3内側	GCT CAG GGA AGT AGC CTT TGA C
Igk、第1のPCR	
5' L-V κ _3	TGC TGC TGC TCT GGG TTC CAG
5' L-V κ _4	ATT WTC AGC TTC CTG CTA ATC
5' L-V κ _5	TTT TGC TTT TCT GGA TTY CAG
5' L-V κ _6	TCG TGT TKC TST GGT TGT CTG
5' L-V κ _6,8,9	ATG GAA TCA CAG RCY CWG GT
5' L-V κ _14	TCT TGT TGC TCT GGT TYC CAG
5' L-V κ _19	CAG TTC CTG GGG CTC TTG TTG TTC
5' L-V κ _20	CTC ACT AGC TCT TCT CCT C
3' mC κ	GAT GGT GGG AAG ATG GAT ACA GTT
Igk、第2のPCR	
5' mVカツバ	GAYATTGTGMTSACMCARWCTMCA
3' P-mJK01	CGT TTG ATT TCC AGC TTG GTG
3' P-mJK02	CGT TTT ATT TCC AGC TTG GTC
3' P-mJK03	CGT TTT ATT TCC AAC TTT GTC
3' P-mJK04	CGT TTC AGC TCC AGC TTG GTC

【表2】

表2

VH, CDR1: GFSLSTFLIG	配列番号6
VH, CDR2: IWWNDNK	配列番号7
VH, CDR3: VRMAGIGGTDAMDY	配列番号8
VL, CDR1: EIVEYYGTNL	配列番号9
VL, CDR2: AAS	配列番号10
VL, CDR3: QQSRAKVPWT	配列番号11

【0032】

B C 3 4 可変ドメインについて配列決定して、配列番号3として特定される S O X 1 0 50

エピトープ Q G G T A A I Q A H Y K S A H に結合する本明細書に記載のモノクローナル抗体の軽鎖可変領域、および / または重鎖可変領域の C D R のうちの 1 つまたは複数のアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む単離されたポリヌクレオチドをもたらした。重鎖の可変領域の配列は配列番号 1 として特定され、軽鎖の可変領域の配列は配列番号 2 として特定される。重鎖の可変領域のアミノ酸配列は配列番号 4 として特定され、軽鎖の可変領域のアミノ酸配列は配列番号 5 として特定される。抗体またはその断片は、配列番号 1 および / または配列番号 2 の核酸配列によりコードされるアミノ酸配列を含み得るポリペプチドを含み得る。抗体またはその断片は、配列番号 4 および / または配列番号 5 のアミノ酸配列のポリペプチドを含み得る。抗体またはその断片は、配列番号 2 の核酸配列によりコードされるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含み得、さらには、配列番号 1 の核酸配列によりコードされるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含み得る。抗体またはその断片は、配列番号 5 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含み得、さらには、配列番号 4 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含み得る。抗体またはその断片は、配列番号 3 のアミノ酸配列からなる少なくとも 1 つのポリペプチドに特異的に結合し得る。本明細書で言及されている通り、その断片は、その抗原結合性断片を含み得る。

【 0 0 3 3 】

複数の実施形態では、抗体またはその断片、または、さらには、単離および精製された核酸配列は、配列番号 1 および / もしくは配列番号 2 の核酸配列によりコードされるアミノ酸配列ならびに / または配列番号 3 のアミノ酸配列と少なくとも約 70 % 同一のアミノ酸配列を有し得る。複数の実施形態では、抗体またはその断片は、配列番号 4 および / もしくは配列番号 5 のアミノ酸配列ならびに / または配列番号 3 のアミノ酸配列と少なくとも約 70 % 同一のアミノ酸配列を有し得る。抗体またはその断片は、配列番号 3 の残基と少なくとも約 70 % 同一であるアミノ酸配列を有する少なくとも 1 つのポリペプチドに特異的に結合し得る。他の百分率としては、これだけに限定されないが、少なくとも約 71 %、少なくとも約 72 %、少なくとも約 73 %、少なくとも約 74 %、少なくとも約 75 %、少なくとも約 76 %、少なくとも約 77 %、少なくとも約 78 %、少なくとも約 79 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 81 %、少なくとも約 82 %、少なくとも約 83 %、少なくとも約 84 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 86 %、少なくとも約 87 %、少なくとも約 88 %、少なくとも約 89 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 91 %、少なくとも約 92 %、少なくとも約 93 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、および、おそらく、さらには、少なくとも約 99 %、約 70 %、約 71 %、約 72 %、約 73 %、約 74 %、約 75 %、約 76 %、約 77 %、約 78 %、約 79 %、約 80 %、約 81 %、約 82 %、約 83 %、約 84 %、約 85 %、約 86 %、約 87 %、約 88 %、約 89 %、約 90 %、約 91 %、約 92 %、約 93 %、約 94 %、約 95 %、約 96 %、約 97 %、約 98 %、約 99 %などを挙げることができる。

【 0 0 3 4 】

他の実施形態では、抗体またはその断片は、配列番号 6、7、8、9、10、および / または 11 のアミノ酸配列およびそれらの任意の組合せからなるポリペプチドを含み得る。抗体またはその断片は、配列番号 9、10、および / または 11 のアミノ酸配列またはそれらの任意の組合せを有する軽鎖可変領域を含み得、さらには、配列番号 6、7、および / または 8 のアミノ酸配列またはそれらの任意の組合せを有する重鎖可変領域を含み得る。

【 0 0 3 5 】

表 2 および配列番号 6 ~ 11 について、抗体またはその断片は、おそらく、配列番号 4 および / または配列番号 5 のアミノ酸配列と少なくとも約 2 % から少なくとも約 26 % まで同一のアミノ酸配列を有し得る。他の百分率としては、これだけに限定されないが、少なくとも約 2 %、少なくとも約 2 . 7 %、少なくとも約 3 %、少なくとも約 4 %、少なくとも約 5 %、少なくとも約 5 . 7 %、少なくとも約 6 %、少なくとも約 7 %、少なくとも約 8 %、少なくとも約 8 . 1 %、少なくとも約 9 %、少なくとも約 10 %、少なくとも約 10 %

10

20

30

40

50

10 . 8 %、少なくとも約 11 %、少なくとも約 11 . 4 %、少なくとも約 11 . 7 %、少なくとも約 12 %、少なくとも約 13 %、少なくとも約 13 . 9 %、少なくとも約 14 %、少なくとも約 15 %、少なくとも約 16 %、少なくとも約 17 %、少なくとも約 17 . 1 %、少なくとも約 17 . 2 %、少なくとも約 18 %、少なくとも約 19 %、少なくとも約 19 . 6 %、少なくとも約 19 . 8 %、少なくとも約 20 %、少なくとも約 21 %、少なくとも約 22 %、少なくとも約 23 %、少なくとも約 24 %、少なくとも約 25 %、少なくとも約 25 . 4 %、少なくとも約 26 %、少なくとも約 30 %；約 2 %から約 70 %、約 2 %、約 2 . 7 %、約 3 %、約 4 %、約 5 %、約 5 . 7 %、約 6 %、約 7 %、約 8 %、約 8 . 1 %、約 9 %、約 10 %、約 10 . 8 %、約 11 %、約 11 . 4 %、約 11 . 7 %、約 12 %、約 13 %、約 13 . 9 %、約 14 %、約 15 %、約 16 %、約 17 %、約 17 . 1 %、約 17 . 2 %、約 18 %、約 19 %、約 19 . 6 %、約 19 . 8 %、約 20 %、約 21 %、約 22 %、約 23 %、約 24 %、約 25 %、約 25 . 4 %、約 26 %、約 30 %の間などを挙げることができる。
10

【0036】

マウス抗 SOX10 [BC34] 結合性配列のエピトープマッピング：BC34などの抗SOX10抗体によって認識されるSOX10のペプチド配列を決定するために、おそらく、2種のアッセイ：直接ELISA、さらには、ドットプロットを使用してエピトープマッピングを行うことができる。ELISAアッセイでは、抗SOX10 [BC34] 抗体の感度および特異性を、抗体価を約1:500および約1:1000で測定することによって決定することができる。ヒトSOX10タンパク質配列のおそらく147アミノ酸から253アミノ酸を包含する、それぞれ長さ約15アミノ酸の重複するペプチドを使用して、結合するBC34の配列を決定することができる。
20

【0037】

BC34に対するエピトープは、SOX10の残基196～211アミノ酸、配列番号3として特定されるQGGTAAIQAHYKSAHに含まれることが示された。マウスモノクローナルSOX10抗体に対するエピトープ、またはその一部は、マウス以外の種（例えば、ウサギ、ヤギ、ウマ、ニワトリなど）における産生を含めた、新しいモノクローナル抗体の産生のための有用な抗原であり得る。当然、ポリクローナル抗体は、SOX10タンパク質の残基196～211に関する配列番号3内のエピトープに特異的に結合し得る。
30

【0038】

直接ELISAプロトコールに関しては、まず、プレートを、SOX10ペプチド約100μlをコーティング緩衝液（pH約9.5）中約5μg/mLで用いて約4で一晩コーティングし、その後、約200μl/ウェル、室温で約1時間ブロッキング（約3%BSA）することができる。プレートを、別々に約100ng/mLの精製したSOX10抗体および約200ng/mLの精製したSOX10抗体と一緒に、ELISA-プレート振とう機において約室温で約1時間インキュベートすることができる。次いで、プレートを、おそらく、PBST（約300μl/ウェル）で5回洗浄し、その後、ヤギ抗マウスIgG-HRPをプレートに添加し、プレート振とう機において約1時間インキュベートすることができる。次いで、プレートをPBST（約300μl/ウェル）で洗浄し、プロットして乾燥させ、TMBを約100μl/ウェルで添加し、振とう機において約5分展開することができ、さらには、その後に、停止液（約50μl/ウェル）を添加することができる。約450nmにおける吸光度を、ELISAプレートリーダーで、おそらく、製造者の推奨に従って測定することができる。
40

【0039】

ドットプロットアッセイに関しては、ニトロセルロースメンブレンを、約1mg/mLの濃度のペプチド約1μlを用い、ペプチド当たり4連でプロットすることができる。このメンブレンを、完全に乾燥し得るまで室温で約1時間インキュベートすることができる。メンブレンを、TBST（例えば、約50mMのTris、約0.5MのNaCl、約0.05%Tween-20、pH約7.4）中約3%BSAを用いて室温で約1時間ブ
50

ロッキングすることができ、次いで、マウス抗SOX10抗体[BC34]を約200ng/mlでRT、約1時間にわたってTBS-Tに添加することができる。次いで、メンブレンをオービタルシェーカー内、TBS-T中で約3回(各約10分)洗浄し、その後、二次抗体ヤギ抗マウスIgG1-APと一緒に室温で約1時間、TBS-T中でインキュベートすることができる。メンブレンを、おそらく、ロッカーにおいて、TBS-T中で約3回(各約10分)洗浄することができる。結合を、Western Glowing Chemiluminescent検出試薬を添加し、フィルムに曝露することによって検出することができる。

【0040】

抗SOX10 BC34を用いたIHC方法：マウスモノクローナル抗SOX10抗体 BC34などの抗SOX10抗体を使用した免疫組織化学を、ホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)組織試料に対して、以下の非限定的な例によって一般に例示される通り、当業者に一般に公知の手順を使用して実施することができる(例えば、ステップ間にトリス緩衝生理食塩水、pH約7.6を用いた洗浄)：

【0041】

1) ホルマリン固定パラフィン包埋組織の切片(約5μm)を、おそらく、ポリリシンでコーティングした市販の顕微鏡スライドに乗せることができる。

【0042】

2) 切片を脱パラフィンすることができ(キシレンまたはキシレン置換を使用して)、おそらく、一連のアルコール/水溶液によって再水和することができ、おそらく、その後、内在性ペルオキシダーゼを、おそらく、約3%過酸化水素溶液を用いてブロッキングすることができる。

【0043】

3) 試料を、圧力鍋(Diva、Decloaking Chamber; Biocare Medical)中でクエン酸緩衝液を使用した熱誘導性抗原回復に供することができ、約30秒にわたって約125まで加熱することができる。[当業者に公知の他の抗原回復方法(例えば、蒸し器、電子レンジ、酵素など)も許容され得る]。組織を約10分にわたって冷まし、次いで、脱イオン水ですすぐことができる。

【0044】

4) タンパク質ブロッキング溶液(Background Punisher; Biocare Medical)を約10分にわたって組織に適用することができる。

【0045】

5) SOX10抗体BC34を、ウシ血清アルブミンを担体タンパク質として伴うトリス-緩衝溶液(pH約6.2)中に約30分にわたって適用することができる。SOX10抗体BC34を、おそらく、1:10,000に希釈することができる。

【0046】

6) おそらく、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)とコンジュゲートした二次抗体(MACH 2 Mouse HRP-Polymer Detection; Biocare Medical)を用いたSOX10抗体の検出を、ヤギ抗マウスHRPコンジュゲートを約30分にわたって適用することによって実現することができる。別の例では、おそらく、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)とコンジュゲートした二次抗体(MACH 4 Universal HRP-Polymer Detection; Biocare Medical)を用いたSOX10抗体の検出を二段階で実現することができる。最初にウサギ抗マウスIgG抗体を約10分にわたって適用した後、ヤギ抗ウサギHRPコンジュゲートと一緒に約10分インキュベートすることができる。

【0047】

7) おそらく、最終的な検出ステップでは、おそらく、約0.02%過酸化水素(Betazoid DAB; Biocare Medical)を含有する緩衝液中3,3'-ジアミノベンジジン(DAB)を適用することができる。HRP媒介性機構によるDABの酸化により、褐色の発色性産物が沈殿し得、おそらく、それにより、SOX10発現

10

20

30

40

50

の部位を同定することが可能になる。

【0048】

8) スライドを、簡単に述べると、おそらく、改変マイヤーへマトキシリンで対比染色することができる。

【0049】

アルカリホスファターゼ検出およびファストレッド色素原を使用した、抗SOX10 BC34を用いたIHC方法：同様に、BC34を使用したIHCを、アルカリホスファターゼ(AP)とコンジュゲートした二次抗体およびファストレッド色素原を使用して、上記の通り実施することができる。例えば、おそらく、APとコンジュゲートした二次抗体(MACH2 Mouse AP-Polymer Detection, Biocare Medical)を用いたSOX10抗体の検出は、ヤギ抗マウスAPコンジュゲートを約30分にわたって適用することによって実現することができる。おそらく、最終的な検出ステップでは、緩衝液(Vulcan Fast Red, Biocare Medical)中ナフトールリン酸塩(例えば、ナフトールリン酸AS-TR)およびジアゾニウム塩(例えば、ファストレッドKL)を適用することができる。アルカリホスファターゼによるリン酸の切断、その後の、生じたナフトールとジアゾニウム塩の反応により、赤色の発色性産物が沈殿し得、おそらく、それにより、SOX10発現の部位を同定することが可能になる。10

【0050】

SOX10抗体BC34、チロシナーゼ抗体T311、およびMART-1抗体M2-7C10およびM2-9E3を用いたIHC方法：IHCを、おそらく、SOX10[BC34]、チロシナーゼ抗体[T311]、および、おそらく、さらには、MART-1抗体[M2-7C10]および[M2-9E3]で構成される一次抗体カクテルを使用して上記の通り実施することができる。各抗体の検出を、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)とコンジュゲートした二次抗体(MACH4 Universal HRP-Polymer Detection, Biocare Medical)を用いて、おそらく、二段階で実現することができる。ウサギ抗マウスIgG抗体の約10分にわたる最初の適用の後、ヤギ抗ウサギHRPコンジュゲートと一緒に約10分インキュベートし、その後、DABを用いて可視化することができる。20

【0051】

マウスモノクローナル抗SOX10抗体BC34を用いたIHC染色の結果：上記のプロトコールを使用して、種々の正常組織および新生物組織を、BC34を使用し、いくつかの場合には、RP抗SOX10抗体を使用した染色パターンと比較して、SOX10発現について評価した。全ての抗体を、当業者に周知の方法を使用して力価(例えば、濃度)について最適化した。例えば、おそらく、バックグラウンド染色を最小化またはさらには排除しながら染色強度が最大になるように、種々の抗体価を評価した。各抗体について、おそらく最小のバックグラウンド染色で最大の染色強度をもたらした力価を使用した。30

【0052】

BC34を用いた染色は、図1～3および図63～65に示されている種々の黒色腫の症例において観察され得る。実際、リンパ節に転移する黒色腫もBC34によって同定することができる(図4および66)。いくつかの場合、特にメラノサイトの内在性色素が存在し得る黒色腫の症例では、赤色色素原を用いた染色が有利であり得る。BC34は、気球細胞黒色腫(図5および67)、類上皮細胞黒色腫(図6および68)、血管周囲黒色腫(図8～9および70～71)、ラブドトイド黒色腫(図10および72)、肉腫様黒色腫(図11および73)、および形質細胞様黒色腫(図12および74)の症例を染色し得る。40

【0053】

BC34を用いた染色は、末梢神経腫瘍(図7および69)、ならびに母斑の症例(図13～15および図75～77)においても観察され得る。シュワン細胞腫もBC34で染色され得る(図16および78)。50

【0054】

正常組織では、正常な結腸における銀親和性細胞、正常な脳神経細胞、乳腺、正常な皮膚、および正常な唾液腺の筋上皮細胞は、BC34で染色され得る（図17～21および図79～83）。

【0055】

BC34を用いた染色は、特に、BC34がより高い感度、または、おそらく、染色強度の増大を示す症例、ならびにBC34が、おそらく、より特異的である症例において、RP抗SOX10抗体を用いた染色よりも優れている可能性がある。例えば、BC34は、乳がんの症例（図22および84）において、RP抗SOX10抗体（図23および85）と比較して、より染まり方が強い染色を示し得る。

10

【0056】

肺腺癌では、BC34は、RP抗SOX10抗体と比較して改善された特異性を実証し得る。例えば、BC34を用いた染色は、RP抗SOX10抗体が細胞質染色を生じる症例では低減する、または、おそらく存在しない可能性があり（図24および86）、これは、SOX10発現（図25および87）とは一致しないと思われる。

【0057】

黒色腫の症例でも、BC34を用いて、同じ検体に対するRP抗SOX10抗体の染色と比較してより染まり方が強い染色が実証され得（図26、28、30、88、90、および92）、そこで、RP抗SOX10抗体を使用すると、染色は低減する、または、おそらく、さらには、存在しない可能性がある（図27、29、31、89、91、93）。

20

【0058】

正常な膀胱では、BC34は、RP抗SOX10抗体と比較して改善された特異性を実証し得る。例えば、RP抗SOX10抗体により細胞質染色が生じる症例では、BC34を用いた染色は、低減する、または、おそらく存在しない可能性があり（図32および94）、これは、SOX10発現とは一致しないと思われる（図33および95）。

【0059】

BC34は、おそらく、腸カルチノイド（図34および96）、胞巣状横紋筋肉腫（図35および97）、星状細胞腫（図36および98）、乳がん（図37および99）、平滑筋肉腫（図38および100）を含めた他の新生物組織も染色し得る。BC34は、良性シュワン細胞腫（図41および103）も染色し得る。

30

【0060】

BC34での染色は、線維形成性黒色腫（図33～34）および紡錘細胞黒色腫（図42～44および図104～106）においても観察され得る。

【0061】

黒色腫は、チロシナーゼ+MART-1のカクテルを含めたチロシナーゼおよびMART-1によっても染色され得る（図45および107）。BC34は、同じ黒色腫の症例も染色し得る（図46および108）。SOX10[BC34]+チロシナーゼ+MART-1のカクテルは、黒色腫（図47、48、109、110）を染色し得、おそらく、S100単独、またはチロシナーゼ+MART-1単独よりも感度が高い（表4）。図48および110に示されているものなどの症例では、SOX10およびチロシナーゼ+MART-1は、SOX10の核染色およびチロシナーゼ+MART-1の細胞質染色によって同定することができる腫瘍の異なる領域を染色し得る。腫瘍における示差的染色は、おそらく、腫瘍における2つ以上のクローンの存在を示し得る。

40

【0062】

いくつかの黒色腫の症例は、BC34で染色され得るが（図49および111）、おそらく、チロシナーゼ+MART-1では染色されない（図50および112）。他の黒色腫の症例は、チロシナーゼ+MART-1で染色され得るが（図51および113）、おそらく、BC34では染色されない（図52および114）。

【0063】

50

S O X 1 0 [B C 3 4] + チロシナーゼ + M A R T - 1 のカクテルは、おそらく、S 1 0 0 では染色されない黒色腫の症例を染色し得る（図 5 3、5 4、1 1 5 および 1 1 6）。このように、S O X 1 0 [B C 3 4] + チロシナーゼ + M A R T - 1 のカクテルは、S 1 0 0 よりも感度が高い可能性がある。

【 0 0 6 4 】

S O X 1 0 [B C 3 4] + チロシナーゼ + M A R T - 1 のカクテルは、特異性も S 1 0 0 より高い可能性がある。S O X 1 0 [B C 3 4] + チロシナーゼ + M A R T - 1 は、リンパ節、脳、または骨髄を染色しない（図 5 5 ~ 5 7 および図 1 1 7 ~ 1 1 9）。S 1 0 0 の 1 つ不都合は、正常なリンパ節、脳、および骨髄を含めた、黒色腫以外の組織において染色が観察されることである（図 5 8 ~ 6 0 および図 1 2 0 ~ 1 2 2）。リンパ節、脳および骨髄は、黒色腫転移の共通部位であり得る。これらの正常組織における S 1 0 0 の染色により、特に、病理医が小さな転移の同定を試みる場合に、診断が難しくなり得る、または、おそらく、さらには、不正確な診断がもたらされる。10

【 0 0 6 5 】

抗 S O X 1 0 抗体 [B C 3 4] を、種々の正常組織および新生物組織に対する I H C によって評価した。一般には、染色される腫瘍細胞が 約 5 % であるというカットオフを、症例を S O X 1 0 について「陽性」と決定するための基準として使用し、逆に、染色される腫瘍細胞が < 約 5 % であることを、症例を「陰性」と決定するための基準として使用した。20

【 0 0 6 6 】

正常組織 (n = 3 4) では、B C 3 4 により、皮膚メラノサイト、乳腺および唾液腺の筋上皮細胞、末梢神経、および脳が染色された（表 3）。同様に、B C 3 4 により、消化管全体を通して銀親和性細胞も染色された。B C 3 4 により、黒色腫の 2 0 0 / 2 1 9 (9 1 . 3 %) が染色された（表 4）。特に、紡錘細胞黒色腫および線維形成性黒色腫の 2 3 / 2 4 (9 5 . 8 %) が S O X 1 0 について陽性であった。さらに、シュワン細胞腫および母斑についての染色は 1 0 0 % であった。

【 0 0 6 7 】

試験した新生物 (n = 5 8 7) では、S O X 1 0 は、浸潤性乳管がんの 1 8 / 1 0 9 (1 6 . 5 %) で発現し、肺、結腸、前立腺、膀胱、腎臓、肝臓、食道、卵巣、甲状腺、副腎、および精巣セミノーマを含めた他の癌腫 (n = 4 2 6) のいずれにおいても発現しなかった（表 5）。S O X 1 0 は、横紋筋肉腫 (r h a b d o m y o s a r o c o m a) の 2 / 2 1 、平滑筋肉腫の 1 / 2 1 、および C N S 神経膠腫の 3 5 % において陽性であった。消化管におけるカルチノイド腫瘍および肺におけるカルチノイド腫瘍は、支持細胞が染色された以外は全て陰性であった。30

【 0 0 6 8 】

黒色腫では、S O X 1 0 、チロシナーゼおよびM A R T - 1 のカクテルは、S O X 1 0 単独、S 1 0 0 単独、または、さらには、チロシナーゼ + M A R T - 1 のカクテルよりも感度が高い可能性がある（表 6）。チロシナーゼおよびM A R T - 1 の染色は細胞質染色であり得（図 3 9 A）、S O X 1 0 の染色は核染色であり得る（図 4 6 および 1 0 8）。S O X 1 0 + チロシナーゼ + M A R T - 1 のカクテルでは、核染色 (S O X 1 0) と細胞質染色 (M A R T - 1 およびチロシナーゼ) の組合せが示され得る（図 4 7、4 8、1 0 9、1 1 0）。いくつかの場合には、S O X 1 0 は陽性であり得、チロシナーゼ + M A R T - 1 は陰性であり得る（図 4 9、5 0、1 1 1、および 1 1 2）、または逆もまた同じである（図 5 1、5 2、1 1 3、および 1 1 4）。S O X 1 0 + チロシナーゼ + M A R T - 1 のカクテルは、S 1 0 0 が陰性である症例において陽性であり得る（図 5 3、5 4、1 1 5、1 1 6）。1 つの症例では、おそらく、S 1 0 0 について陽性であり、S O X 1 0 + チロシナーゼ + M A R T - 1 について陰性であることが見いだされた。S O X 1 0 [B C 3 4] はまた、リンパ節、脳および骨髄においても陰性であり得るが（図 5 5 ~ 5 7 および図 1 1 7 ~ 1 1 9）、一方、S 1 0 0 は、これらの組織を染色し得る（図 5 8 ~ 6 0 および図 1 2 0 ~ 1 2 2）。4050

【表3】

表3:正常組織型(n=34)

器官	SOX10 (+)	器官	SOX10 (+)
大脳	+	胃*	-
小脳	+	小腸*	-
副腎	-	結腸*	-
卵巣	-	肝臓	-
脾臓*	-	唾液腺	+
甲状腺	-	腎臓	-
副甲状腺*	-	前立腺	-
睾丸	-	子宮	-
骨	-	子宮頸部	-
脾臓	-	横紋筋	-
扁桃	-	皮膚	+
胸腺	-	神経(末梢)	+
骨髄	-	肺	-
肺	-	喉頭	-
心臓	-	膀胱	-
食道	-	胎盤	-
下垂体	-	中皮	-

*消化管全体を通しての少数の銀親和性細胞および/または少数/低密度の神経内分泌型細胞がSOX10について染色された。

【表4】

表4:黒色腫

黑色腫	症例	SOX10 (+)	% (+)
黒色腫(皮膚)	109	105	96
転移性黒色腫	86	72	83.7
紡錘細胞黒色腫	9	9	100
線維形成性黒色腫	13	12	92.3
線維形成性/紡錘細胞混合特徴	2	2	100
類上皮細胞黒色腫	2	2	100
肉腫様黒色腫	2	2	100
形質細胞様黒色腫	2	2	100
気球細胞黒色腫	2	2	100
ラブドイド黒色腫	1	1	100
シュワン細胞腫(神経鞘腫)	28	28	100
母斑	20	20	100

【表5】

表5:種々の新生物組織(n=587)

がん	症例数	SOX10 +	% (+)
肺	178	0	0
結腸	24	0	0
乳房	109	18	16.5
前立腺	13	0	0
膀胱	48	0	0
腎臓	15	0	0
肝臓	57	0	0
食道	10	0	0
セミノーマ	17	0	0
卵巣	12	0	0
副腎	10	0	0
甲状腺(乳頭)	4	0	0
平滑筋肉腫	21	2	9.5
横紋筋肉腫	21	1	4.8
脳	29*	51	57
膵臓	14	0	14
リンパ腫	5	0	0
カルチノイド	8	0**	0
子宮頸部	11	0	0

*SOX10は、主に星状細胞腫において(24/39)、ならびに神経膠芽腫、髓芽腫、および悪性上衣腫の限られた症例において発現されていた。**($\leq 1\%$)

10

20

30

【表6】

表6:SOX10、S100、チロシナーゼ+MART-1、およびチロシナーゼ+MART-1+SOX10

の比較

抗体または抗体カクテル	黒色腫 陽性症例/全症例 (%陽性)
S100	60/80 (75%)
SOX10	64/80 (80%)
チロシナーゼ+MART-1	71/80 (89%)
SOX10+チロシナーゼ+MART-1	73/80 (91%)

40

【0069】

これらの実施例により、B C 3 4 の利点が実証され、おそらく、B C 3 4 が、公知の抗体と比較して、場合によってバックグラウンドまたは望ましくない細胞質染色が少ない、よりきれいな染色パターンをもたらす優れた感度または特異性を含めた、いくつかの有利な点を有することが示される。

【0070】

本発明の一部の実施形態では、マウスモノクローナル抗 S O X 1 0 抗体 B C 3 4 などの抗 S O X 1 0 抗体は、上記のプロトコールおよび当業者に公知の他の方法の多くの変形における使用に適し得る。B C 3 4 を用いて染色した検体は、恒久的なマウンティング培地

50

およびカバーガラスを使用して保管することができる。抗体 B C 3 4 は、自動染色計器において標準のプロトコールを使用して使用することもできる。当業者に一般に知られている多くの代替的な検出方法（例えば、蛍光）、検出酵素（例えば、アルカリホスファターゼ（A P）、ベータガラクトシダーゼなど）、および、おそらく、さらには、色素原（例えば、3 - アミノ - 9 - エチルカルバゾール、5 - プロモ - 4 - クロロ - 3 - インドリルリン酸、3 , 3' , 5 , 5' - テトラメチルベンジジン、5 - プロモ - 4 - クロロ - 3 - インドリル - - D - グルクロニドなど）の使用を構想することもできる。

【 0 0 7 1 】

マウスモノクローナル抗 S O X 1 0 抗体 B C 3 4 などの抗 S O X 1 0 抗体のエピトープ、またはその一部は、当業者には理解される通り、マウス以外の種（例えば、ウサギ、ヤギ、ウマ、ニワトリなど）における産生を含めた、新しいモノクローナル抗体の産生のために有用な抗原であり得る。実際、B C 3 4 の特定のエピトープは、その有利な性質に寄与する特徴のうちの 1 つであり得る。 10

【 0 0 7 2 】

ホルマリン固定パラフィン包埋組織の免疫組織化学における B C 3 4 などの抗 S O X 1 0 抗体の使用は本明細書に記載され得、他のイムノアッセイにおけるその有用性は、容易に構想することができ、本出願に包含されるものとする。特に、F F P E の I H C において使用される同じ試薬の多くを凍結組織切片の I H C においても使用することができることは周知であり得る。B C 3 4 などの抗 S O X 1 0 抗体は、E L I S A を含めた他のイムノアッセイにおいても、おそらく、一般に公知の方法を使用して、有用であり得る。 20

【 0 0 7 3 】

おそらく、I H C に関連する本発明の別の態様では、抗 S O X 1 0 抗体をカクテルの一部として 1 種または複数種の追加的な一次抗体と併せて使用して、「二重染色」手順（多重染色または、さらには、マルチプレックスとしても記載される）を実施することができる。そのような「二重染色」手順は、一般に当技術分野で周知であり得るが、特定の診断への適用のための一次抗体の最良の組合せは公知でない場合がある。

【 0 0 7 4 】

この方法では、マウスモノクローナル抗 S O X 1 0 抗体 B C 3 4 などの抗 S O X 1 0 抗体を、おそらく、検体への同時適用に適した単一の一次抗体カクテル中に 1 種または複数種の抗体と組み合わせることができる。抗体は、マウス宿主またはウサギ宿主などに由来するものであってよい。抗体はモノクローナルであってもポリクローナルであってもよい。複数の実施形態では、抗体カクテルを二重染色 I H C 手順において使用して、組織検体中に標的タンパク質抗原が存在するか存在しないかを同定することが可能な、2 つまたはそれより多くの色を呈した染色を生じさせることができる。例えば、抗体カクテルがマウス抗体およびウサギ抗体で構成され得る複数の実施形態では、検出系は、西洋ワサビペルオキシダーゼ（H R P）とコンジュゲートした抗マウス抗体を含み得、おそらく、さらには、アルカリホスファターゼ（A P）とコンジュゲートした抗ウサギ抗体を使用して、2 色染色を生じさせることができる。3 , 3' - ジアミノベンジジン（D A B）を使用して褐色染色を生じさせることができ、これは、おそらく、H R P によって容易になり、また、これにより、検体における、結合したマウス抗体が存在するか存在しないか、および／またはその場所を同定することができ、ファストレッドを使用して、鮮やかな赤紫色／赤色染色を生じさせることができ、これは、おそらく、A P によって容易になり、また、これにより、検体における、ウサギ抗体が存在するか存在しないか、および／またはその場所を同定することができる。他の実施形態では、検出系は、A P とコンジュゲートした抗マウス抗体およびH R P とコンジュゲートした抗ウサギ抗体を含み得、おそらく、ファストレッドおよびD A B を色素原として使用することができる場合に、これを使用して、赤色に染色されたマウス抗体および褐色に染色されたウサギ抗体が存在するか存在しないか、および／またはその場所を同定することができる 2 色染色を生じさせることができる。一部の実施形態では、H R P とコンジュゲートした抗マウス抗体、および、おそらく、A P とコンジュゲートした抗ウサギ抗体を、単一溶液中のカクテルとして検体に適用するこ 40 50

ともでき、別々の逐次的なステップで適用することもできる。

【0075】

抗体 - 酵素コンジュゲートを含む抗マウス抗体または抗ウサギ抗体は、これだけに限定されないが、マウス、ウサギ、ニワトリ、ウマ、ラット、ヤギ、ヒツジなどを含めた異なる宿主種に由来するものであってよい。一次抗体は、これだけに限定されないが、マウス、ウサギ、ニワトリ、ウマ、ラット、ヤギ、ヒツジなどを含めた種々の宿主種に由来するものであってよい。複数の実施形態では、抗体は、抗体 - 酵素コンジュゲートを含んでよく、一次抗体は、2つの異なる宿主種から得ることができる。DABおよび／またはファストレッド以外の色素原も同様に使用することができる。

【0076】

これだけに限定されないが、3種以上の抗体の使用、マウスおよびウサギ以外の種の使用、他の色素原および検出系、異なる順序の検出ステップ、および、おそらく、さらには、3色またはそれより多くをもたらす改変（変性ステップを必要とする場合がある）を含めた、二重染色法に対する多数の代替法が可能である。

【0077】

一部の実施形態では、一次抗体カクテルに対して単色染色を使用することができる。一実施例では、一次抗体カクテルが全て同じ宿主種に由来する抗体で構成される場合、単一の検出系を使用して、抗体の全ての存在について単色で染色することができる。各抗体が存在するか存在しないかを細胞の局在化に基づいて決定することができる、または、おそらく、そのような決定は必要なく、各抗体が存在するか存在しないかを同定せずに染色を有効に解釈することができる。例えば、マウスモノクローナル抗SOX10抗体BC34をマウスモノクローナル抗MART1と一次抗体カクテル中に組み合わせ、抗マウスコンジュゲートHRP検出および可視化のための褐色染色を生じるDABを用いたIHC手順において使用することができる。別の態様では、異なる宿主種由来の2種またはそれより多くの抗体で構成される一次抗体カクテルを同様に使用して単色染色を生じさせることができる。例えば、マウスモノクローナル抗SOX10 BC34をウサギポリクローナル抗S100抗体と組み合わせ、抗マウスコンジュゲートHRPおよび抗ウサギコンジュゲートHRP、ならびに可視化のための褐色染色を生じるDABを用いたIHC手順において使用することができる。

【0078】

IHC手順のある特定のステップは、おそらく、当業者に公知の試薬のカクテルを使用することによって、逐次的にまたは同時に実施することができる。例えば、一次抗体カクテルに記載されている抗体を1種または複数種の抗体の逐次的なステップに二者択一的に適用することができる。同様に、検出試薬は、試薬カクテルとして同時に適用することもでき、別々の試薬を逐次的なステップで適用することもできる。

【0079】

多重染色手順における使用のために、マウスモノクローナル抗SOX10抗体BC34などの抗SOX10抗体と一次抗体カクテル中に組み合わせると診断に関して有用であり得る抗体としては以下が挙げられる。

【表A】

抗体の組合せおよび (宿主種)	可能性のある染色パターン (細胞局在、染色の色*)	可能性のある診断上の有用性
SOX10[BC34] (マウス) S100(ウサギ)	SOX10(核、褐色) S100(細胞質および核、赤色)	SOX10染色は黒色腫において観察され得る; S100染色は黒色腫において観察され得る

10

20

30

40

50

【0080】

*列挙されている各染色の色は、おそらく、H R Pとコンジュゲートした抗マウス抗体、さらには、おそらく、A Pとコンジュゲートした抗ウサギ抗体を、おそらく、さらには、マウス抗体について褐色染色をもたらし得、ウサギ抗体について赤色染色をもたらし得る色素原としてD A Bおよびファストレッドと一緒に含み得る検出系の結果であり得る。あるいは、検出系は、おそらく、A Pとコンジュゲートした抗マウス抗体、さらには、おそらく、H R Pとコンジュゲートした抗ウサギ抗体を、おそらく、さらには、マウス抗体について赤色染色をもたらし得、ウサギ抗体について褐色染色をもたらし得る色素原としてD A Bおよびファストレッドと一緒に含み得る。他の検出系または色素原を使用して他の色の組合せを得ることができ、全て本開示に包含されるものとする。

10

【0081】

一部の実施形態では、試薬を、さらには、おそらく、同じ宿主種由来の抗体を使用する場合に、二重染色が生じるように逐次的に適用することができる。例えば、マウスモノクローナルB C 3 4を適用し、その後、おそらく、抗マウス - H R P 検出およびD A B 色素原ステップを続けることができる。変性ステップ後、おそらく、酸性溶液を使用して、第2のマウスモノクローナル抗体、おそらく、マウスモノクローナル抗ネスチン抗体またはマウスモノクローナル抗M A R T 1抗体を適用し、その後、おそらく、抗マウス - A P 検出およびファストレッド色素原ステップを続けて、2色染色を生じさせることができる。

【0082】

一部の実施形態では、同じ宿主種に由来する抗体のカクテルを使用し、単色染色をもたらすことができる。例えば、マウスモノクローナルS O X 1 0 [B C 3 4]、マウスモノクローナルチロシナーゼ [T 3 1 1]、およびマウスモノクローナルM A R T - 1 [M 2 - 7 C 1 0] および [M 2 - 9 E 3] のカクテルを適用し、抗マウス - H R P およびD A B、または、おそらく、抗マウス - A P およびファストレッドによって検出することができる。他の実施形態は、S O X 1 0 およびチロシナーゼ、または、おそらく、S O X 1 0 およびM A R T - 1 の抗体カクテルを含み得る。マウスモノクローナルS O X 1 0を、おそらく、さらには、二重染色手順において、上記の組合せのいずれかのチロシナーゼまたはM A R T - 1のウサギポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体と組み合わせることもできる。S O X 1 0 、チロシナーゼおよび / またはM A R T - 1の抗体カクテルは、おそらくS 1 0 0 を含めた黒色腫の他の潜在的なマーカーよりも優れている可能性がある。S O X 1 0 、チロシナーゼおよびM A R T - 1は、黒色腫においてS 1 0 0 よりも感度が高い可能性があり、これは、おそらく、S O X 1 0 は線維形成性黒色腫および紡錘細胞黒色腫を染色し得、S 1 0 0 はこれらの型を染色し得ないからである。S O X 1 0 、チロシナーゼおよびM A R T - 1は、S 1 0 0 のように黒色腫転移の共通部位である脳、リンパ節または骨髄を染色し得ないので、特異性もS 1 0 0 より高い可能性があり、これにより、おそらく、これらの部位における微小転移の同定に役立つ。ある特定の実施形態では、実施例において使用した以外のクローン (B C 3 4 以外のS O X 1 0 の他のクローンを含む) が適切であり得、おそらく、交換することができる、または、おそらく、さらには、実施例において使用したクローンよりも優れている。

20

【0083】

多くの実施形態では、当業者に公知の通り、サイトケラチンマーカーに結合する抗体を異なる組合せで、いくつかの場合には、互換的に使用することができる。例えば、C K 5 は、おそらく、C K 5 / 6 またはC K 5 / 1 4 と交換することができる。同様に、H M W C K (高分子量サイトケラチン) は、C K 5 / 6 またはC K 5 / 1 4 と互換的に使用することができる。

30

【0084】

多くの場合、診断は、細胞診または生検由来の限られた組織試料に対して実施されることも多く、組織をさらなる分子試験のために保存することが重要であり得る。したがって、消費する組織は最小限であるが、最適な特異度および / または感度をもたらす効率的な

40

50

診断手法が好ましい場合がある。おそらく、抗体カクテルを使用することによって、または、多分、改善された感度または特異度の特徴によって、検体由来の組織の消費を最小限にしながら有用な診断情報をもたらす方法が好ましい場合がある。

【0085】

マウスモノクローナル抗SOX10抗体BC34などの抗SOX10抗体は、SOX10の検出に特異的であり得、ヒト組織試料においていくつかの型のがんを診断するための免疫組織化学的手順において有用であり得る。特に、BC34などの抗SOX10抗体は、これだけに限定されないが、より高い感度、より染まり方が強い染色、より高い特異性、および、おそらく、バックグラウンド染色が少ないよりきれいな染色、ならびに、おそらく、カルチノイドの染色の欠如、および、おそらく、肺腺癌の染色の欠如を含めた、RP抗SOX10抗体に勝る利点を有し得る。10

【0086】

本発明の実施形態は、イムノアッセイ法の一例として、図62において概略的に示されている通り、試験される動物またはヒトから組織を得ること(6)、前記組織を固定または凍結すること(7)、前記固定または凍結した組織を処理してエピトープをSOX10に暴露すること(8)、前記処理した組織と抗体またはその断片を、前記組織内にSOX10タンパク質が存在する場合に抗体またはその断片がSOX10タンパク質に結合するように、本明細書で論述した量および条件下で接触させること(9)、ならびに、おそらく、さらには、前記結合した抗体の存在を検出すること(10)を提供し得る。20

【0087】

図61は、抗体、その断片、その一部を組成物として、または、さらには、カクテルとして、おそらく、さらには、ハイブリドーマからもたらされるものとして提供し得るキット(5)、生体試料(2)と接触させて、検出器(4)で検出することができる少なくとも1種の抗体・抗原複合体(3)を形成することができる抗体(1)などを含めた本発明の種々の実施形態の要約の概略図を示す。20

【0088】

本発明は、複数の実施形態において、抗体またはその断片(本明細書で論述されている通り)を、おそらく、抗原に結合した際の抗体またはその断片の抗体検出要素と共に含み得る、診断用、または、さらには、予後診断用の検査キットを提供し得る。これは、生体試料を抗体またはその断片と接触させ、さらには、おそらく、抗体検出要素を使用して、生体試料中のタンパク質または抗原と結合した抗体またはその断片の結合、または、さらには、その存在を検出するための方法を提供し得る。実施形態は、哺乳動物またはヒトにおけるSOX10タンパク質を、おそらく、検査される動物またはヒトから組織を得、組織と抗体またはその断片を、組織内にSOX10タンパク質が存在する場合に抗体またはその断片がSOX10タンパク質に結合し得るように、本明細書で提示されている種々の実施形態に従って、おそらく、量および条件下で接触させ、さらには、結合した抗体の存在を検出することによって検出するためのイムノアッセイ法を提供し得る。生体試料は、おそらく、使用される抗体、または、さらには、カクテルに応じて、これだけに限定されないが、血液、尿、尿路上皮組織、移行細胞組織、膀胱組織、正常組織、新生物組織、腎組織、卵巣組織、甲状腺組織、子宮内膜組織、腎組織、扁桃組織、脾臓組織、結腸組織、リンパ節組織、新生物肺組織、胃組織、前立腺組織、肺組織、乳房組織などを含んでよい。30

【0089】

例えばSOX10、SOX10抗体、BC34などの用語の使用は、当業者には理解される通り、必要に応じて、抗SOX10抗体などに関し得ることに留意する。抗体カクテルの構成成分は、「+」で示される場合があり(例えば、「MART-1+チロシナーゼ」で、MART-1およびチロシナーゼ抗体のカクテルが特定される)、また、いくつかの場合には、抗体試薬は、同じ標的に対する2種以上の抗体クローンを含み得る(例えば、MART-1は、2種の抗MART-1マウスモノクローナル抗体、クローンM2-7C10およびクローンM2-9E3を含み得る)ことに留意する。40

【0090】

Tacha, David; Qi, Weiman; Bremer, Ryan; Yu Charlie; Hoang, Laura; Ra, Seong; および Robbins, Bruceによる論文「A Newly Developed Mouse Monoclonal SOX10 Antibody is a Highly Sensitive and Specific Marker for Malignant Melanoma, Including Spindle Cell and Desmoplastic Melanomas」、Biocare Medical、Concord、CA、San Diego Pathologists Medical Group、San Diego、CAは以下に収載される。

10

【0091】

新しく開発されたマウスモノクローナルSOX10抗体は、紡錘細胞黒色腫および線維形成性黒色腫を含めた悪性黒色腫についての高度に感度が高く特異的なマーカーである

Tacha, David,¹ Qi, Weiman,¹ Bremer, Ryan,
¹ Yu Charlie¹, Chu Joseph¹, Hoang, Laura,
¹ Ra, Seong,² and Robbins, Bruce.² ¹ Biocare Medical、Concord、CA、² San Diego Pathologists Medical Group, San Diego, CA

【0092】

コンテクスト - 最近の免疫組織化学的試験により、悪性黒色腫、悪性末梢神経鞘腫瘍、乳癌のサブセット、および神経膠腫におけるSOX10発現が実証された。SOX10は、線維形成性黒色腫および紡錘細胞黒色腫を検出するその能力に関して重要な臨床的有用性を有することが示されている。現在まで、大多数の刊行物では免疫組織化学的染色のために研究用(RUO)ヤギポリクローナルSOX10抗体が使用されている。

20

【0093】

目的およびデザイン - ここで、新しいマウスモノクローナルSOX10抗体[BC34]の開発について記載し、広範囲の正常組織および新生物組織におけるその免疫組織化学的染色プロファイルを、黒色腫に重点を置いて評価する。

【0094】

結果 - 正常組織では、SOX10は、皮膚メラノサイトおよびエクリン細胞、乳房筋上皮細胞および小葉上皮細胞、唾液腺筋上皮細胞、末梢神経シュワントン細胞、および中枢神経系グリア細胞において発現した。SOX10は、紡錘細胞黒色腫と線維形成性黒色腫の両方の50/51(98%)を含めた、黒色腫の238/257(92.6%)において発現した。SOX10は、母斑(20/20)およびシュワントン細胞腫(28/28)の100%で発現した。他の新生物では、SOX10は、浸潤性乳管癌の18/109(16.5%)において発現した。他の癌腫は全てSOX10について陰性であった。SOX10は、中枢神経系新生物の25/52において同定され、主に星状細胞腫22/41(53.7%)において、および検査した種々の肉腫の4/99(4.0%)において同定された。

30

【0095】

結論 - 要約すると、我々は、新しく開発されたマウスモノクローナルSOX10抗体[BC34]が、線維形成性黒色腫および紡錘細胞黒色腫を含めた悪性黒色腫に対して高度に感度が高く特異的であることを示した。

40

【0096】

Sry関連HMG-Box遺伝子10(SOX10)タンパク質は、神経堤、末梢神経系、およびメラニン細胞の発達のために重要なヒト転写因子である^{1~4}。SOX10核タンパク質は、メラノサイト、シュワントン細胞、乳腺および唾液腺の筋上皮細胞、ならびに乏突起膠細胞の細胞を含めた正常なヒト組織において広範に発現することが示されている^{1~3、5、6}。SOX10核タンパク質は、黒色腫、悪性末梢神経鞘腫瘍、および乳癌のサブセットなどの悪性腫瘍においても発現する。大多数の乏枝神経膠腫、しかし同様に

50

星状細胞腫および神経膠芽腫の大部分もSOX10を発現することが示されている³、⁵。SOX10はまた、メラニン細胞母斑、シュワン細胞腫、および神経線維腫などの良性腫瘍にも存在する^{1～3}、^{5～7}。

【0097】

SOX10は、線維形成性黒色腫(DM)および紡錘細胞黒色腫(SCM)において高頻度に発現する¹。DMおよびSCMは、通常、S-100タンパク質について陽性であるが、多くの場合、他の黒色腫マーカーを用いると陰性であるまたは限局的にのみ陽性である。DMは、臨床的にだけでなく、組織学的にも誤診を起こしやすい⁹。

【0098】

紡錘細胞黒色腫および線維形成性黒色腫をそれらの病理的類似物と区別するための適切なマーカーを見いだすための広範囲にわたる取り組みがなされてきた。メラノサイトマーカーの中で、SOX10は最も見込みがあることが示されている。現在まで、大多数の刊行物では、研究用(RUO)ヤギポリクローナルSOX10を使用した免疫組織化学的方法が使用されている¹、⁷、^{11～18}。ここで、新しいマウスモノクローナルSOX10ハイブリドーマ[BC34]の開発について記載し、正常組織および新生物組織におけるその感度および特異性を、黒色腫およびそのサブタイプに重点を置いて評価する。

【0099】

材料および方法

SOX10ハイブリドーマの生成

宿主免疫：雌BALB/c(6週間～約8週間齢)マウスを、マウス当たり100μgの完全フロイントアジュvant中ヒトSOX10組換えタンパク質を用いて腹腔内に免疫した。3週間後、マウスを、マウス当たりさらに100μgの不完全フロイントアジュvant中ヒトSOX10を用いて、さらに4回、3週間おきに追加刺激した。マウスの尾部から採血し、血清を採取し、約-20で保管した。

【0100】

ハイブリドーマ：SOX10に対する抗体を産生するハイブリドーマを、SOX10で免疫したBALB/cマウスの脾細胞から標準の技法によって生成した。SOX10で免疫したマウス由来の脾細胞をP3-X63-Ag8.653骨髄腫細胞と融合した。ハイブリドーマの上清を、SOX10に対する抗体反応性について酵素結合免疫測定法(ELISA)によってスクリーニングした。次いで、ハイブリドーマクローナーを、標的組織のホルマリン固定パラフィン包埋切片に対するそれらの特異性および特異性に基づいて選択した。

【0101】

ELISA：SOX10に対する宿主抗血清免疫応答をELISAによって測定し、マイクロタイタープレートリーダーで測定した。抗SOX10抗体[BC34]モノクローナル抗体を、マウスモノクローナル抗体アイソタイピングキット(Invitrogen、Carlsbad CA)を使用してアイソタイピングした。クローンBC34アイソタイプをマウスIgG1として同定した。クローンBC34由来の選択されたハイブリドーマ細胞を、10%ウシ胎児血清を補充した培地で培養し、ハイブリドーマ細胞をBALB/cマウスに注射して抗体腹水を生じさせた。抗体腹水をプロテインAアフィニティカラムでさらに精製した。IgGの濃度を分光光度的に測定した。

【0102】

ウエスタンプロット法によって試験した抗体交差反応性：精製されたモノクローナル抗体SOX10を、ウエスタンプロッティングによって特徴づけた。全長ヒトSOX10をトランスフェクトした細胞溶解物を、ゲル電気泳動を使用して分離した。タンパク質プロットを、SOX10抗体を室温で60分インキュベートし、その後、ペルオキシダーゼとコンジュゲートしたヤギ抗マウス免疫グロブリンと一緒にインキュベートすることによって可視化した(図123)。

【0103】

組織マイクロアレイ(TMA)：TMAを社内で構築し、かつ／またはUS Biom

10

20

30

40

50

a x (Rockville, MD) から購入した。SOX10 [BC34] を、皮膚黒色腫、転移性黒色腫、紡錘細胞黒色腫および線維形成性黒色腫、および黒色腫バリアントにおいて ($n = 257$) 、シュワン細胞腫において ($n = 28$) 、および母斑（複合、皮内および接合部）において ($n = 20$) 評価した。SOX10を特異性について試験するためには、正常組織マイクロアレイ (TMA) ($n = 34$) 、全組織切片および種々の新生物組織におけるTMA ($n = 749$) を評価した。

【0104】

免疫組織化学：ホルマリン固定パラフィン包埋した全組織および組織TMAを脱パラフィンし、水中で水和させた。次いで、スライドを過酸化水素に5分曝露し、水中で洗浄した。TMAを抗原回復溶液（改变クエン酸緩衝液、pH 6.0）に浸漬し、125度で30秒、圧力鍋（Decloaking Chamber、Biocare Medical、Concord、CA）に入れた。組織スライドを80まで冷却し、水中で洗浄した。SOX10 [BC341] を希釈し、改变トリス希釈剤、pH 6.0 中 1 : 100 で最適化し、組織を30分インキュベートし、次いで、TBS中ですすいだ。ヤギ抗マウス西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) またはアルカリホスファターゼポリマー検出 (MACH2、Biocare Medical) を組織切片に室温で30分にわたって適用した。次いで、切片をTBS中ですすぎ、切片を3,3'-ジアミノベンジジン (DAB) 中で5分、またはファストレッド色素原中で10分インキュベートした。

10

【0105】

スコアリング方法：各症例を、細胞の1%の染色が観察された場合に「陽性」とみなした。逆に、腫瘍細胞の1%未満の染色を「陰性」症例として決定した。核染色のみを陽性とみなした。

20

結果

【0106】

モノクローナル SOX10 抗体を用いた免疫組織化学的染色により、陽性組織における強力な核染色が生じ、基本的にバックグラウンド染色は伴わなかった。正常組織 ($n = 34$) では、SOX10 は、皮膚メラノサイト、エクリン腺上皮細胞および筋上皮細胞の一部、乳房筋上皮細胞ならびに小葉上皮細胞、唾液腺筋上皮細胞、末梢神経、シュワン細胞、および脳グリア細胞のサブセットにおいて発現し（図124～129）、SOX10 は、また、固有筋層の少数の間質細胞および消化管全体を通して固有層および他の種々の組織の稀な間質細胞も染色したが（染色された全細胞集団は < 1 % であった）、これらの組織内の他の細胞構成成分は全て、発現を示さず、したがって、これらの組織は陰性とスコア化された（表7）。

30

【0107】

SOX10 は、黒色腫の 238 / 257 (92.6%) において発現した（図130～133）（表8）。特に、SCMおよびDMの 50 / 51 (98%) が SOX10 について陽性であり（図134～136）、SOX10 はまた、肉腫様黒色腫も染色した（図137）。良性の症例では、SOX10 は、検査したシュワン細胞腫 (28 / 28) において（表10、図138）、および母斑 (20 / 20) において（表8、図139）陽性であった。

40

【0108】

他の新生物では（表9）、SOX10 は、浸潤性乳管癌の 18 / 109 (16.5%) において発現した（図140）。SOX10 は、非浸潤性乳管癌の周囲の筋上皮細胞を染色した（図141）。試験した他の癌腫は全て SOX10 について陰性であった。肉腫の中で、SOX10 染色は、平滑筋肉腫の 1 / 22 (4.5%) において、横紋筋肉腫において 2 / 22 (9.1%)、および悪性線維性組織球腫の 1 / 13 (7.7%) において観察され、他の肉腫全ては陰性であった。SOX10 染色は、中枢神経系新生物の 25 / 52 において、主に星状細胞腫の 22 / 41 (53.7%) において同定され（図142、表9）、限られた症例では、神経膠芽腫、および上衣腫において発現した（表9）。

【0109】

50

神経内分泌腫瘍の評価により、SOX10が、結腸、胃、小腸および付属器を含めた消化管のカルチノイド腫瘍の全てにおいて陰性であることが示された。肺および腸カルチノイド腫瘍では、少数の支持細胞がSOX10について陽性であったが、新生細胞は陰性であると思われた（図143）。

考察

【0110】

以前の試験により、SOX10が、原発病変および転移病変の両方の黒色腫についての高度に感度が高く特異的な核マーカーであることが示されている^{1、11～5}。我々の試験では、原発性皮膚黒色腫の106/110(96.4%)がSOX10で染色された。これは、SOX10核発現が黒色腫78例のうち76例(97%)において見いだされたNonakaらによる試験とよく比較される⁷。Shin Jらによる試験では、SOX10は、DMの100%で発現し、紡錘細胞癌、非定型線維黄色腫(AFX)および肉腫などの組織学的類似物の全てで陰性であった¹³。Karamchandani JRらも、種々の肉腫の症例の1/78(1.3%)のみがSOX10を発現するという匹敵する結果を示した¹⁶。我々の試験では、SOX10は、線維形成性黒色腫および紡錘細胞黒色腫の50/51(98%)において発現し、また、肉腫の種々の型の4/99(4.0%)において発現した（表8）。Nonakaらは、SOX10が悪性末梢神経鞘腫瘍(MPNST)の38/77(49%)において発現することを示した⁷。我々の試験は限定されており、MPNSTは2例のみ含み、そのどちらも陰性であった。

【0111】

DMおよびSCMは、組織学的類似物および免疫組織化学的染色の限定に起因して、病理医に対して診断上の難題をもたらし得るものである（図134～137）。S100は通常DMを染色するにもかかわらず、HMB45およびメランAなどの他の黒色腫マーカーは、ほとんどの場合陰性であることが示されている¹⁴。DMの他の組織学的類似物としては、切除前瘢痕内の紡錘線維芽細胞または組織球が挙げられる。Ramos-Herberth, FIらは、SOX10が瘢痕内のバックグラウンド線維芽細胞および組織球によって発現される可能性がS100よりも低く、したがって、SOX10がこれらの型の症例においてS100よりも優れていることを実証した¹⁵。

【0112】

S100は特異性が欠如しているにもかかわらず、病理医はなお、S100を神経堤由来腫瘍の診断に使用している。しかし、SOX10は、高度に特異的であり、黒色腫および未梢神経鞘腫瘍の鑑別診断において、非シュワン細胞腫瘍および非メラニン細胞腫瘍ではめったに発現しないことが示されている。推奨される手法は、黒色腫または未梢神経鞘腫瘍の診断にS100とSOX10の両方を含み得る¹⁶。我々の試験では、SOX10は、非メラニン細胞腫瘍の大部分で陰性であった（表9）。これらの所見により他の試験との一致が示される^{1、7}。SOX10は、基底様または三重陰性癌腫を含めた乳癌のサブセットにおいて、および化生性癌において実証されている。したがって、この所見により、これらの新生物が筋上皮分化を示し得るという概念が支持される¹⁸。我々の試験では、SOX10核染色は、正常な乳房筋上皮細胞、ならびに乳房小葉上皮細胞のサブセットにおいて発現し（図127）、また、浸潤性乳がんの16.5%において発現した。SOX10は、種々の型の脳腫瘍を染色することが示されている^{5、6}。Bannaykh SIらは、大多数の乏枝神経膠腫、ならびに星状細胞腫および神経膠芽腫の大部分がSOX10を発現することを実証し⁵、これは、我々の結果と相關した。

【0113】

悪性黒色腫(96.6%)および良性母斑およびシュワン細胞腫(100%)におけるSOX10発現という我々の発見により、十分に公開されたSOX10ヤギポリクローナル抗体を使用した他の試験との高い一致が実証された^{1、10～15、19}。RUOヤギ一次抗体の使用は研究目的では十分であり得るが、臨床の現場では一般に認められない可能性がある。ポリクローナル抗体は、ロット間の変動もよく知られており、望ましくない非特異的バックグラウンド染色が生じる可能性がある。Amr Mohamedらに

10

20

30

40

50

よる試験では、黒色腫と乳がんのどちらの顕微鏡写真においても非特異的バックグラウンド染色が観察された¹。Zhongらによる試験では、SOX10は、良性前立腺組織の細胞質においては強力に陽性であり、前立腺がん組織の細胞質においては弱く陽性であった¹⁹。我々の試験では、新しいモノクローナルSOX10抗体により、基本的にバックグラウンド染色のないきれいな核染色が生じた。

結論

【0114】

要約すると、我々は、新しく開発されたマウスモノクローナルSOX10 IHC抗体[B C 3 4]が、線維形成性バリアントおよび紡錘細胞バリアントを含めた悪性黒色腫に対して高度に感度が高く特異的であり、臨床使用に高度に適すると思われることを示した

【数1】

参考文献

1. Amr Mohamed, MD, Raul S. Gonzalez, MD, et al. SOX10 Expression in Malignant Melanoma, Carcinoma, and Normal Tissues. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2012; Ahead of Epub
2. Pusch C, Hustert E, Pfeifer D, et al. The SOX10/Sox10 gene from human and mouse: sequence, expression, and transactivation by the encoded HMG domain transcription factor. *Hum Genet.* 1998;103:115–123.
3. Mollaaghbabab R, Pavan WJ. The importance of having your SOX on: role of SOX10 in the development of neural crest-derived melanocytes and glia. *Oncogene.* 2003;22:3024–3034. 10
4. Bondurand N, Kobetz A, Pingault V, et al. Expression of the SOX10 gene during human development. *FEBS Lett.* 1998;432: 168–172.
5. Bannykh SI, Stolt CC, Kim J, Perry A, Wegner M. Oligodendroglial-specific transcriptional factor SOX10 is ubiquitously expressed in human gliomas. *J Neurooncol.* 2006 Jan;76(2):115-127
6. Britsch S, Goerich DE, Riethmacher D, et al. The transcription factor Sox10 is a key regulator of peripheral glial development. *Genes Dev.* 2001;15:66–78. 20
7. Nonaka D, Chiriboga L, Rubin BP. Sox10: a pan-schwannian and melanocytic marker. *Am J Surg Pathol.* 2008;32:1291–1298.
8. Feng Z, Wu X, Chen V, et al. Incidence and survival of desmoplastic melanoma in the United States, 1992–2007. *J Cutan Pathol* 2011;38:616–624.
9. Conley J, Lattes R, Orr W. Desmoplastic malignant melanoma. *Cancer* 1971;28:914–916.
10. Busam KJ. Desmoplastic melanoma. *Clin Lab Med.* 2011 Jun;31(2):321-330. 30
11. George E, McClain SE, Slingluff CL, et al. Subclassification of desmoplastic melanoma: pure and mixed variants have significantly different capacities for lymph node metastasis. *J Cutan Pathol* 2009;36:425–432.
12. Palla B, Su A, Binder S, Dry S. SOX10 expression distinguishes desmoplastic melanoma from its histologic mimics. *Am J Dermatopathol.* 2013 Jul;35(5):576-581.
13. Shin J, Vincent JG, Cuda JD, et al. Sox10 is expressed in primary melanocytic neoplasms of various histologies, but not in fibrohistiocytic proliferations and histiocytoses. *J Am Acad Dermatol.* 2012 Oct;67(4):717-726.
14. Palla B, Su A, Binder S, Dry S. SOX10 expression distinguishes desmoplastic melanoma from its histologic mimics. *Am J Dermatopathol.* 2013 Jul;35(5):576-581. 40
15. Ramos-Herberth FI, Karamchandani J, Kim J, et al. SOX10 immunostaining distinguishes desmoplastic

【数2】

melanoma from excision scar. *J Cutan Pathol.* 2010;37:944–952.

16. Karamchandani JR, et al. SOX10 and S100 in the diagnosis of soft-tissue neoplasms.

Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2012 Oct;20(5):445–450.

17. Tsuta K, Raso MG, Kalhor N, et al. Sox10-positive sustentacular cells in neuroendocrine carcinoma of the lung.

Histopathology. 2011 Jan;58(2):276–285.

18. Cimino-Mathews A, Subhawong AP, Elwood H, et al. Neural crest transcription factor Sox10 is preferentially expressed in triple-negative and metaplastic breast carcinomas. *Hum Pathol.* 2013 Jun;44(6):959–965.

19. Zhong WD, Qin GQ, Dai QS, et al. SOXs in human prostate cancer: implication as progression and prognosis factors. *BMC Cancer.* 2012 Jun 15;12:248.

10

【表7】

表7:正常組織(n=34)

器官	SOX10	器官	SOX10
	発現		発現
大脳	+ (グリア細胞)	胃	- (固有筋層および粘膜の稀な間質細胞)
小脳	+ (グリア細胞)	小腸	- (固有筋層および粘膜の稀な間質細胞)
副腎	-	結腸	- (固有筋層および粘膜の稀な間質細胞)
卵巢	-	肝臓	-
脾臓	-	唾液腺	+ (筋上皮細胞)
甲状腺	-	腎臓	-
副甲状腺	-	前立腺	-
睾丸	-	子宮	-
骨	-	子宮頸部	-
脾臓	-	骨格筋	-
扁桃	-	皮膚	+ (メラノサイト、エクリン筋上皮細胞、エクリン上皮細胞のサブセット)
胸腺	-	末梢神経	+ (シュワン細胞)
骨髄	-	喉頭	-
肺	- (気管支筋上皮細胞)	膀胱	-
心臓	-	胎盤	-
食道	-	中皮	-
下垂体	-		
乳房	+ (筋上皮細胞、小葉上皮細胞のサブセット)		

10

20

30

【表8】

表8:メラニン細胞病変(n=257)

40

黑色腫	症例	SOX10 (+)	% (+)
黒色腫(皮膚)	119	115	96.6
転移性黒色腫	87	73	83.9
紡錘細胞黒色腫	19	19	100
線維形成性黒色腫	29	28	96.6
線維形成性／紡錘細胞混合特徴	3	3	100
良性母斑(種々の)	20	20	100

50

【表9】

表9:種々の新生物組織(n=665)

新生物	症例数	SOX10 +	% (+)
肺癌			
腺癌	77	0	0
細気管支肺胞癌	4	0	0
扁平上皮癌	71	0	0
腺扁平上皮癌	1	0	0
大細胞癌	5	0	0
悪性中皮腫	13	0	0
結腸腺癌	24	0	0
侵襲性乳腺管癌	109	18	16.5
前立腺腺癌	13	0	0
尿路上皮癌	48	0	0
腎細胞癌(明細胞)	15	0	0
肝臓(肝細胞癌)	57	0	0
食道腺癌／扁平上皮癌	10	0	0
精巣セミノーマ	17	0	0
卵巣漿液／類内膜腺癌	12	0	0
副腎褐色細胞腫	10	0	0
甲状腺乳頭癌	4	0	0
膵臓腺癌	12	0	0
膵島細胞腫瘍	2	0	0
非ホジキンリンパ腫(B細胞およびT細胞)	8	0	0
ホジキンリンパ腫	2	0	0
低グレード神経内分泌腫瘍(カルチノイド腫瘍) (消化管および肺)	20	0	0
子宮頸部腺癌／扁平上皮癌	11	0	0
皮膚癌			
基底細胞癌	20	0	0
扁平上皮癌	20	0	0
CNS新生物			
星状細胞腫	41	22	53.7
神経膠芽腫	7	2	28.6
上衣腫	2	1	50
髓芽腫	2	0	0

略語:CSN(中枢神経系)

【表10】

表10:軟部組織腫瘍(n=127)におけるSOX10発現

軟部組織腫瘍	症例数	SOX10 +	% (+)
シュワン細胞腫(神経鞘腫)	28	28	100
平滑筋肉腫	31	2	6.5
横紋筋肉腫	22	1	4.5
線維肉腫	7	0	0
隆起性皮膚線維肉腫	9	0	0
脂肪肉腫	14	0	0
血管肉腫	1	0	0
神経線維肉腫	2	0	0
悪性線維性組織球腫	13	1	7.7

10

【0115】

前述のことから容易に理解することができる通り、本発明の基本的な概念は、様々なやり方で具体化することができる。これは、適切な抗体を実現するための抗体技法ならびにデバイスの両方を伴う。本出願では、抗体技法は、記載されている種々のデバイスによって、および利用に固有のステップとして実現されることが示されている結果の一部として開示されている。それらは、単に、意図され、記載されているデバイスを利用した自然の結果である。さらに、いくつかのデバイスが開示されているが、これらは、ある特定の方法を実現するだけのものではなく、いくつものやり方で変化させることもできることが理解されるべきである。重要なことに、前述の全てに関して、これらのファセットの全てが本開示に包含されると理解されるべきである。

20

【0116】

本出願に含まれる論述は、基本的な説明として役立つことが意図されている。読者は、特定の論述は可能性のある実施形態全てを明確に記載するものではない場合があり、多くの代替物が暗に含まれることを認識すべきである。同様に、これは、本発明の一般的な性質を完全に説明するものではない場合があり、それぞれの特徴または要素により実際にどれほど多種多様の代替的なまたは同等の要素の広範な機能が表され得るかを明確に示すものではない場合がある。さらに、これらは、暗黙のうちに本開示に含まれる。本発明がデバイス主体の用語法で記載されている場合、デバイスの各要素により、機能が暗黙のうちに実施される。記載されているデバイスに関して、装置請求項が含まれるだけでなく、方法またはプロセス請求項も、本発明および実施される要素の機能に取り組むために含まれる。説明および用語法はどちらも、後のあらゆる特許出願に含まれる特許請求の範囲を限定するものではない。

30

【0117】

本発明の核心から逸脱することなく、種々の変化がなされ得ることも理解されるべきである。そのような変化も暗黙のうちに本明細書に包含される。それらはなお本発明の範囲内に入る。示されている明示的な実施形態(複数可)を包含する広範な開示、多種多様な暗に含まれる代替的な実施形態、および広範な方法またはプロセスなどが本開示に含まれ、後のあらゆる特許出願のための特許請求の範囲を起草する際に頼りになり得る。そのような言葉の変化およびより広範かつより詳細な特許請求を、後日(例えば任意の所定の期限までなど)、または出願人がその後、本出願に基づいて特許出願を求める事象において、実現することができることが理解されるべきである。この理解と共に、読者は、本開示は、出願人の権利の範囲内に入るとみなされる広さの特許請求の範囲の基礎の審査を求めることができ、本発明の多数の態様を独立に、および系全体としてのどちらでも包含する特許が得られるようにデザインすることができる、後に提出されるあらゆる特許出願を支持するものと理解されることを認識すべきである。

40

50

【0118】

さらに、本発明の種々の要素および請求項のそれぞれも種々の様式で実現することができる。さらに、使用されるまたは暗に含まれる場合、要素は、物理的に接続されていてもいなくてもよい個々の構造ならびに複数の構造を包含すると理解されるべきである。本開示は、任意の装置実施形態のある実施形態の変形であろうと、方法またはプロセスの実施形態のある実施形態の変形であろうと、さらには、ただ単にこれらの任意の要素の変形であろうと、そのような変形のそれぞれを包含するものと理解されるべきである。特に、本開示は本発明の要素に関するので、機能または結果のみが同じだとしても、各要素に関する単語は、同等の装置用語または方法用語によって表すことができる事が理解されるべきである。そのような同等の、より広範な、またはより一般的な用語は、各要素または作用についての記載に包含されるものとみなされるべきである。そのような用語は、本発明が権利を有する暗黙のうちに広範な適用範囲を明確にすることが望ましい場合、置き換えることができる。一例として、全ての作用は、その作用を起こすための手段またはその作用を引き起こす要素として表され得ることが理解されるべきである。同様に、開示される物理的要素のそれぞれは、その物理的要素により容易になる作用に関する開示を包含するものと理解されるべきである。この最後の態様に関して、一例として、「検出」または「検出器」に関する開示は、「検出する」作用 - - 明確に論述されていようがいまいが - - の開示を包含するものと理解されるべきであり、逆に、「検出する」作用が有効に開示される場合、そのような開示は、「検出器」、さらには、「検出するための手段」の開示を包含するものと理解されるべきである。そのような変化および代替用語は、本明細書に明確に包含されるものと理解されるべきである。さらに、そのような手段のそれぞれ（そのように明確に記載されているかいないかにかかわらず）は、所与の機能を実施することが可能な全ての要素を包含すると理解されるべきであり、記載されている機能を実施する要素の全ての説明は、その機能を実施するための手段の非限定的な例として理解されるべきである。

10

20

【0119】

本特許出願において言及されるあらゆる法律、法令、規制、または規則；または本特許出願において言及される特許、刊行物、または他の参考文献は、これによって参照により組み込まれる。本出願により特許請求されるあらゆる優先事例（複数可）はこれによって追加され、これによって参照により組み込まれる。さらに、使用される各用語に関して、本出願におけるその利用が、広範に支持する解釈と相反しない限り、一般の辞書による定義が各用語に組み込まれると理解されるべきであり、Random House Webster's Unabridged Dictionary、第2版に含有されるものなどの全ての定義、代替用語およびシノニムは、これによって参照により組み込まれることが理解されるべきである。最後に、下記の一覧または本出願と共に出願される他の情報の記載に列挙されている全ての参考文献はこれによって追加され、これによって参照により組み込まれる、しかし、上記のそれぞれに関して、参照により組み込まれるそのような情報または記載がこの／これらの発明の特許取得と相反するとみなされる可能性がある限りでは、そのような記載は、明白に、本出願人（複数可）によってなされたものとはみなされない。

30

40

【表11】

I. 米国特許文献

特許番号	種類コード	発行日	引用文献の特許権者 または出願人の名称
7468425	B2	2008-12-23	Sidransky, et al.
6946256	B1	2005-09-20	McKeon, et al.

50

【表12】

II. 外国特許文献

外国文献番号	国コード	種類コード	公開日	名称
2012154983	WO	A2	2012-11-15	Biocare Medical, LLC

10

【表13-1】

III. 非特許文献

“SOX10 expression in malignant melanoma, carcinoma, and normal tissues.” Mohamed A, Gonzalez RS, Lawson D, Wang J, Cohen C. <i>Appl Immunohistochem Mol Morphol</i> . 2012; Ahead of Epub	
“The SOX10/Sox10 gene from human and mouse: sequence, expression, and transactivation by the encoded HMG domain transcription factor.” Pusch C, Hustert E, Pfeifer D, et al. <i>Hum Genet</i> . 1998;103:115–123	
“The importance of having your SOX on: role of SOX10 in the development of neural crest-derived melanocytes and glia.” Mollaaghataba R, Pavan WJ. <i>Oncogene</i> . 2003;22:3024–3034	20
“Expression of the SOX10 gene during human development.” Bondurand N, Kobetz A, Pingault V, et al. <i>FEBS Lett</i> . 1998;432:168–172	
“Oligodendroglial-specific transcriptional factor SOX10 is ubiquitously expressed in human gliomas.” Bannykh SI, Stolt CC, Kim J, Perry A, Wegner M. <i>J Neurooncol</i> . 2006 Jan;76(2):115–27	
“The transcription factor Sox10 is a key regulator of peripheral glial development.” Britsch S, Goerich DE, Riethmacher D, et al. <i>Genes Dev</i> . 2001;15:66–78	
“Oligodendroglial-specific transcriptional factor SOX10 is ubiquitously expressed in human gliomas.” Bannykh SI, Stolt CC, Kim J, Perry A, Wegner M. <i>J Neurooncol</i> . 2006 Jan;76(2):115–27	
“Incidence and survival of desmoplastic melanoma in the United States, 1992–2007.” Feng Z, Wu X, Chen V, et al. <i>J Cutan Pathol</i> . 2011;38:616–624	30
“Desmoplastic malignant melanoma.” Conley J, Lattes R, Orr W. <i>Cancer</i> . 1971;28:914–916	
“Desmoplasia and neurotropism. Prognostic variables in patients with stage I melanoma.” Baer SC, Schultz D, Synnestvedt M, et al. <i>Cancer</i> . 1995;76:2242–2247	
“Subclassification of desmoplastic melanoma: pure and mixed variants have significantly different capacities for lymph node metastasis.” George E, McClain SE, Slingluff CL, et al. <i>J Cutan Pathol</i> . 2009;36:425–432	
“SOX10 expression distinguishes desmoplastic melanoma from its histologic mimics.” Palla B, Su A, Binder S, Dry S. <i>Am J Dermatopathol</i> . 2013 Jul;35(5):576–81	

20

30

40

【表 1 3 - 2】

“Sox10 is expressed in primary melanocytic neoplasms of various histologies, but not in fibrohistiocytic proliferations and histiocytoses.” Shin J, Vincent JG, Cuda JD, et. al. <i>J Am Acad Dermatol.</i> 2012 Oct;67(4):717-26	
“MCW melanoma cocktail for the evaluation of micrometastases in sentinel lymph nodes of cutaneous melanoma.” Shidham VB, Chang CC. <i>Expert Rev Mol Diagn.</i> 2005 May;5(3):281-90	
“Microphthalmia transcription factor in the immunohistochemical diagnosis of metastatic melanoma: comparison with four other melanoma markers.” Miettinen M, Fernandez M, Franssila K, et al. <i>Am J Surg Pathol.</i> 2001 Feb;25(2):205-11	
“Sox10: a pan-schwannian and melanocytic marker.” Nonaka D, Chiriboga L, Rubin BP. <i>Am J Surg Pathol.</i> 2008;32:1291-1298	10
“Neural crest transcription factor Sox10 is preferentially expressed in triple-negative and metaplastic breast carcinomas.” Cimino-Mathews A, Subhawong AP, Elwood H, et. al. <i>Hum Pathol.</i> 2013 Jun;44(6):959-65	
“Sox10-positive sustentacular cells in neuroendocrine carcinoma of the lung.” Tsuta K, Raso MG, Kalhor N, et. al. <i>Histopathology.</i> 2011 Jan;58(2):276-85	
“SOX10 and S100 in the diagnosis of soft-tissue neoplasms.” Karamchandani JR, Nielsen TO, van de Rijn M, West RB. <i>Appl Immunohistochem Mol Morphol.</i> 2012 Oct;20(5):445-50	
United States Provisional Application Number 61/706,312 filed September 27, 2012; entitled Systems and Methods for Anti-Uroplakin II Antibodies	
United States Nonprovisional Application Number 13/830,473 filed March 14, 2013; entitled Systems and Methods for Anti-Uroplakin III Antibodies	20
International Application Number PCT/US2013/062043m filed 09/26/2013; Entitled Anti-Uroplakin II Antibodies Systems and Methods	
Nonaka D, Chiriboga L, Rubin BP. Sox10: a pan-schwannian and melanocytic marker. <i>Am J Surg Pathol.</i> 2008;32:1291-1298	
Karamchandani JR, et. al. SOX10 and S100 in the diagnosis of soft-tissue neoplasms. <i>Appl Immunohistochem Mol Morphol.</i> 2012 Oct;20(5):445-50	
Buonaccorsi JN, Prieto VG, Torres-Cabala C, Suster S, Plaza JA. Diagnostic Utility and Comparative Immunohistochemical Analysis of MITF-1 and SOX10 to Distinguish Melanoma In Situ and Actinic Keratosis: A Clinicopathological and Immunohistochemical Study of 70 Cases. <i>Am J Dermatopathol.</i> 2013 Jun 18. [Epub ahead of print]	
Agnarsdóttir M, Sooman L, Bolander A, et. al. SOX10 expression in superficial spreading and nodular malignant melanomas. <i>Melanoma Res.</i> 2010 Dec;20(6):468-78	30
Seong I, Min HJ, Lee JH, et. al. Sox10 controls migration of B16F10 melanoma cells through multiple regulatory target genes. <i>PLoS One.</i> 2012;7(2)	
Ramos-Herberth FI, Karamchandani J, Kim J, Dadras SS. SOX10 immunostaining distinguishes desmoplastic melanoma from excision scar. <i>J Cutan Pathol.</i> 2010 Sep;37(9):944-52	
Ivanov SV, Panaccione A, Nonaka D, et. al. Diagnostic SOX10 gene signatures in salivary adenoid cystic and breast basal-like carcinomas. <i>Br J Cancer.</i> 2013 Jul 23;109(2):444-51	
United States Provisional Application Number 61/886,448 filed October 03, 2013; entitled Systems and Methods for Anti-SOX10 Antibodies	
United States Provisional Application Number 61/941,907 filed February 19, 2014; entitled Systems and Methods for Anti-SOX10 Antibodies	40
Shidham, et al., MCW melanoma cocktail for the evaluation of micrometastases in sentinel lymph nodes of cutaneous melanoma; expert Rev Mol Diagn. 2005 May; 5(3):281-90	
Miettinen M, Fernandez M, Franssila K, et al. <i>Am J Surg Pathol.</i> 2001 Feb;25(2):205-11;	

【表 1 3 - 3】

Microphthalmia transcription factor in the immunohistochemical diagnosis of metastatic melanoma:comparison with four other melanoma markers

【0120】

したがって、出願人（複数可）は、少なくとも以下に関して、請求項への支持を得、発明の記載を行うと理解されるべきである： i) 本明細書において開示および記載されている抗体デバイスのそれぞれ、 i i) 開示および記載されている関連する方法、 i i i) これらのデバイスおよび方法のそれぞれの、類似した、同等の、さらには、暗に含まれる変形、 i v) 開示および記載されている通り示される機能のそれぞれを実現する代替デザイン、 v) 開示および記載されていることの実現が暗に含まれると示される機能のそれぞれを実現する代替デザインおよび方法、 v i) 別々の独立した発明として示される各特徴、構成成分、およびステップ、 v i i) 開示される種々の系または構成成分によって増強される適用、 v i i i) そのような系または構成成分によって產生される產物、 i x) 言及される任意の特定の分野またはデバイスに今適用されると示されるまたは記載される各系、方法、および要素、 x) 実質的に上文に記載され、また付随する例のいずれかで参照される方法および装置、 x i) ステップを実施するための手段を含む、本明細書に記載の方法を実施するための装置、 x i i) 開示される要素のそれぞれの種々の組合せおよび順列、 x i i i) 提示される独立請求項または概念のひとつひとつに対する従属性としてそれが潜在的に従属する請求項または概念、および x i v) 本明細書に記載されている全ての発明。

【0121】

請求項に関しては、現在または後に審査に出されるかどうかにかかわらず、実用上の理由から、および審査の負担が増大するのを回避するために、出願人は、いつでも、最初の請求項のみ、または、おそらく最初の従属のみを伴う最初の請求項のみを提出することができることが理解されるべきである。特許庁および本出願または後の出願の潜在的な範囲に関心がある任意の第三者は、この場合、この場合の利益を特許請求する場合、または提出されるいかなる予備補正、他の補正、請求項言語、または意見書にかかわらない任意の継続において、したがって、任意の潜在的な主題のディスクレームまたは放棄が意図されていないあらゆる場合の係属全体を通してより広範な請求項が後日提出され得ることを理解すべきである。より広範な請求項が提出された場合またはその時、本出願または任意のその後の出願で提出されるあらゆる補正、請求項言語、または意見書がそのような先行技術を無効化するものとみなされる限りでは、そのような理由は、後に提示される請求項などによって排除され得る可能性があるので、任意の以前の時点で考慮された可能性のある、あらゆる関連性のある先行技術が再考される必要があり得ることが理解されるべきである。審査官、および、現存するまたは後の潜在的なカバレッジに他の点で関心がある、または潜在的なカバレッジのディスクレーマーまたは放棄が示されるあらゆる可能性が任意の時点であったかどうかを考慮する任意の人はどうちらも、本出願またはあらゆるその後の出願にそのような放棄またはディスクレーマーは意図されない、または存在しないことを認識すべきである。Hakim v. Cannon Avent Group, PLC, 479 F.3d 1313 (Fed. Cir 2007)において生じるものなどの限定などは、このまたはあらゆるその後の関連事項において明白に意図されない。さらに、支持は、1つの独立請求項または概念の下で提示される種々の従属物または他の要素のいずれかを、任意の他の独立請求項または概念の下の従属物または要素と同様に追加することを可能にするために、これだけに限定されないが、European Patent Convention Article 123(2)およびUnited States Patent Law 35 USC 132または他のそのような法律を含めた新規事項法の下で必要な程度まで存在すると理解されるべきである。本出願においてか後の出願においてかにかかわらず、任意の時点で任意の請求項を草案することにおいて、出願人は、法的に利用可能な程度に十分かつ広範なカバレッジの範囲を捕捉することが意図されていることも理解されるべきである。実質のない置換がなされる限り、出願人が、任意の特定の実施形態を文字通り包含するために実際にいかなる請求項も草案しない限り、および他の点で適用可能な限り、出願人は、単に、起こり得る全ての事態を予測することが出来ていない可能性があるので、出願人は、いかなる形でもそのようなカバレッジの放

10

20

30

40

50

棄を意図していないまたは実際に放棄しないと理解されるべきであり、当業者は、そのような代替的な実施形態を文字通り包含する請求項が草案されることを合理的に予測すべきではない。

【 0 1 2 2 】

さらに、使用された場合またはその時、移行句「含む（comprising）」の使用は、従来の請求項解釈に従って、本明細書において「開放請求項」を維持するために使用される。したがって、文脈上異なる解釈を要する場合を除き、「含む（comprise）」という用語または「含む（comprises）」もしくは「含む（comprising）」などの変形は、明示された要素もしくはステップまたは要素もしくはステップの群が包含されることを意味するが、任意の他の要素もしくはステップまたは要素もしくはステップの群が排除されることは意味しないことを意図していることが理解されるべきである。そのような用語は、出願人に法的に許容される最も広範なカバレッジがもたらされるように、それらの最も広範囲の形態で解釈されるべきである。「または任意の他の請求項」という句の使用は、例えば、別の従属請求項、別の独立請求項、前に列挙された請求項、後に列挙される請求項などの任意の他の請求項に従属する任意の請求項に対する支持をもたらすために使用される。1つの明快な例として、請求項が「請求項20または任意の他の請求項」に従属するなどの場合、その請求項は、請求項1、請求項15、または、さらには、所望であれば、請求項25（それが存在する場合）に従属するとして再度草案され得、それでも本開示の範囲内に入る。この句は、請求項内の要素の任意の組合せおよびさらには、方法、装置、プロセスなどの請求項の組合せなどのある特定の請求項の組合せのための任意の所望の適切な先行詞を組み入れることに対する支持ももたらすものであることが理解されるべきである。10

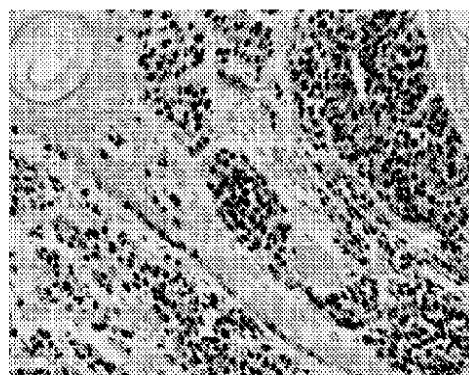
【 0 1 2 3 】

最後に、任意の時点で記載される請求項はいずれも、これによって参照により本発明の本明細書の一部として組み込まれ、出願人は、請求項のいずれかまたは全て、または任意のその要素または構成成分を支持する追加的な説明としてそのような請求項のそのような組み込まれた内容の全部または一部を使用する権利を明白に留保し、出願人はさらに、本出願による、またはその後のその継続出願、分割出願もしくは一部継続出願による保護が求められる事項を定義するため、またはそれに準じてあらゆる利益および手数料の削減を取得するため、または任意の国または条約の特許法、規則または規制に従うために必要に応じて、そのような請求項またはその任意の要素または構成成分の組み込まれた内容の任意の一部または全部を、明細書から特許請求の範囲に、またはその逆に移動させる権利を明白に留保し、参照により組み込まれるそのような内容は、任意のその後のその継続出願、分割出願もしくは一部継続出願またはそれに対する再発行もしくは延長を含めた、本出願の全係属中に残存するべきである。20

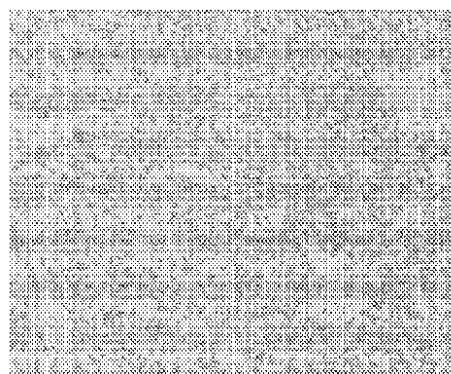
【図1】

**FIG. 1**

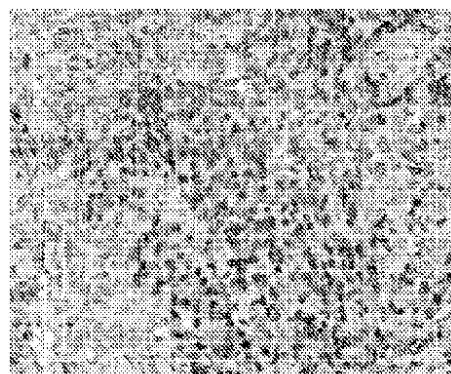
【図2】

**FIG. 2**

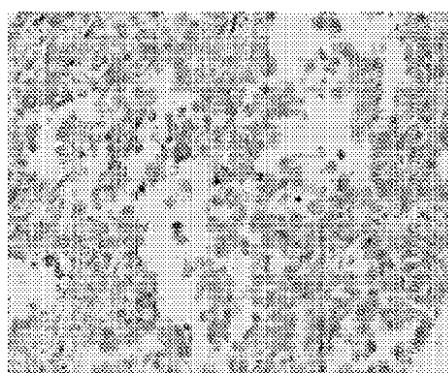
【図3】

**FIG. 3**

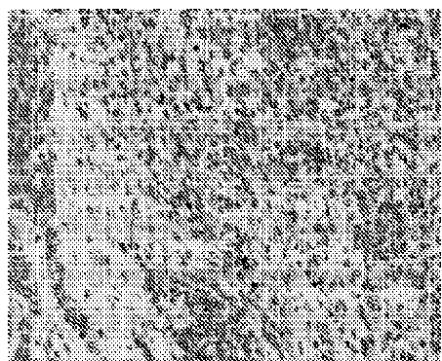
【図4】

**FIG. 4**

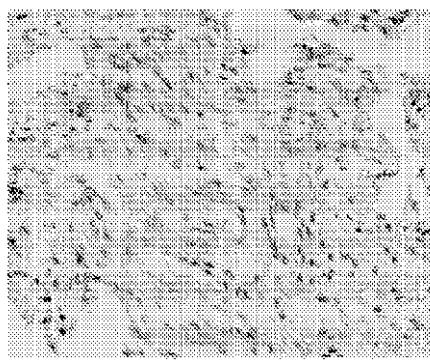
【図5】

**FIG. 5**

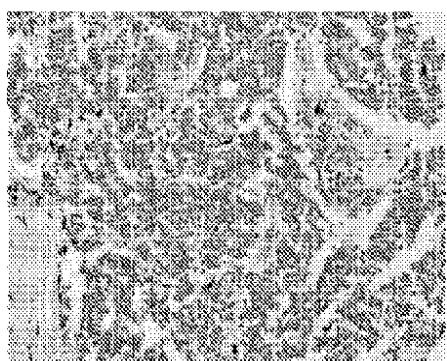
【図6】

**FIG. 6**

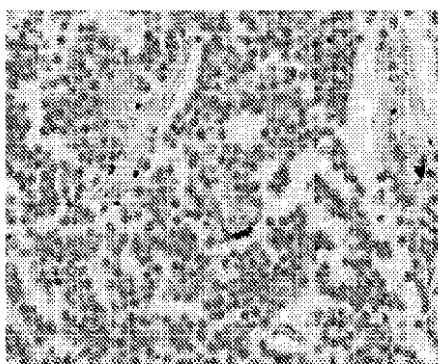
【図7】

**FIG. 7**

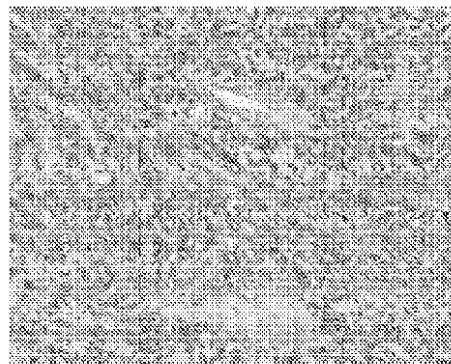
【図8】

**FIG. 8**

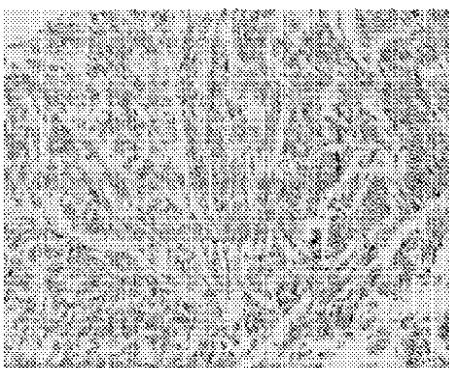
【図9】

**FIG. 9**

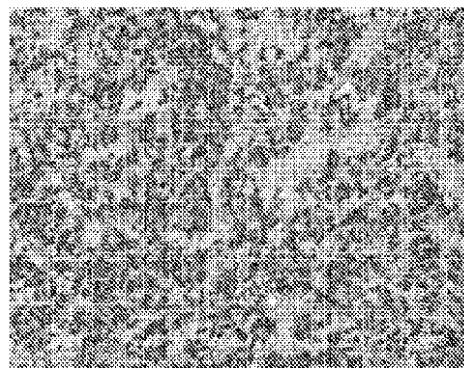
【図10】

**FIG. 10**

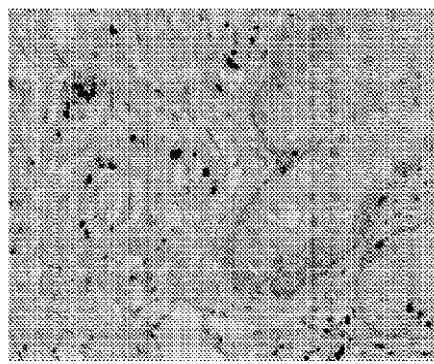
【図11】

**FIG. 11**

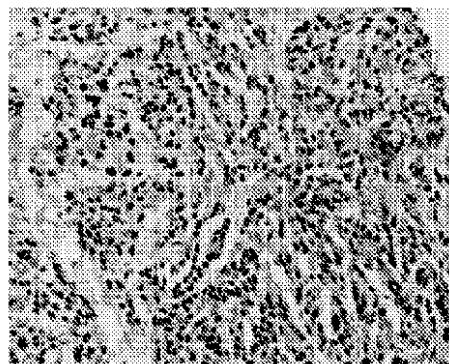
【図12】

**FIG. 12**

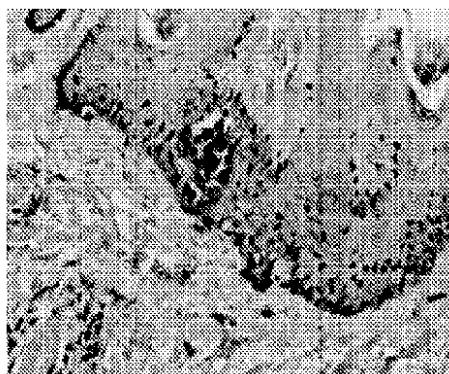
【図13】

**FIG. 13**

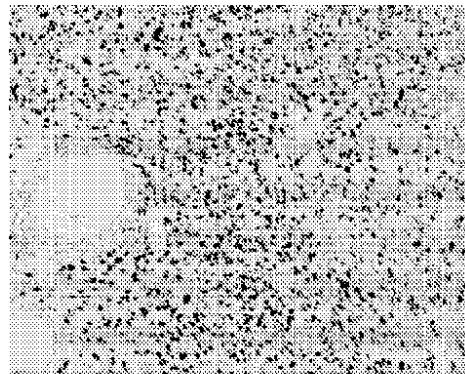
【図14】

**FIG. 14**

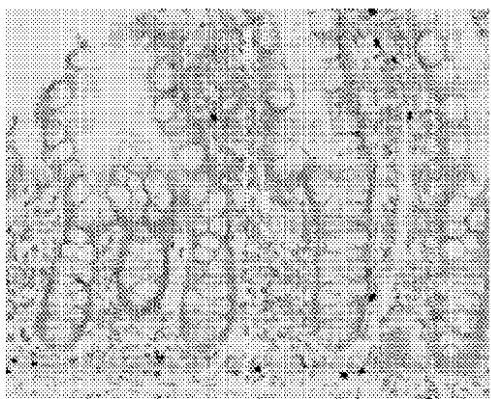
【図15】

**FIG. 15**

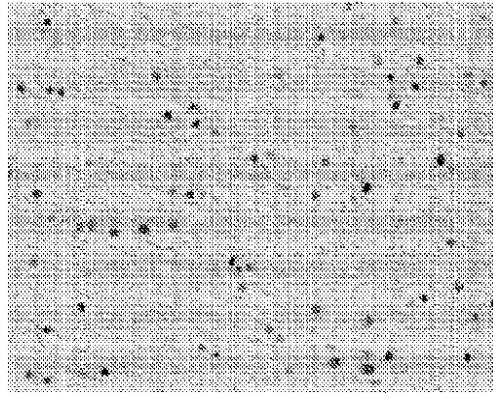
【図16】

**FIG. 16**

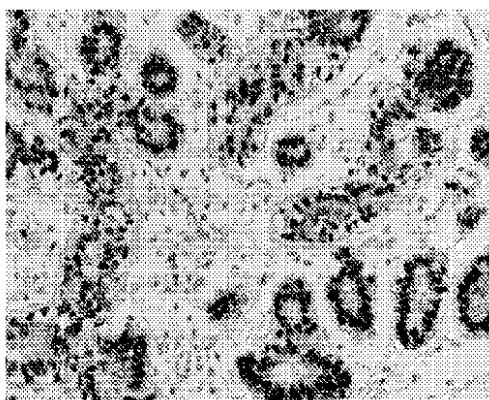
【図17】

**FIG. 17**

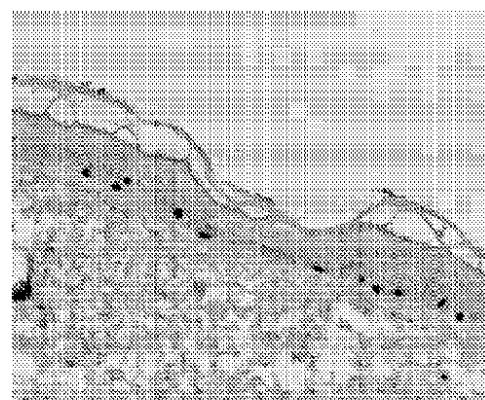
【図18】

**FIG. 18**

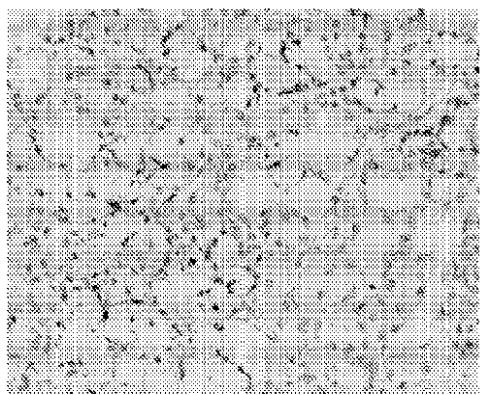
【図19】

**FIG. 19**

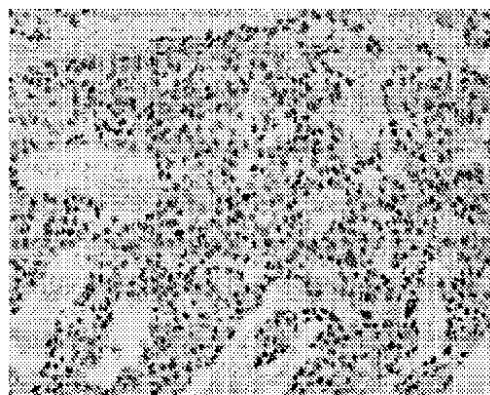
【図20】

**FIG. 20**

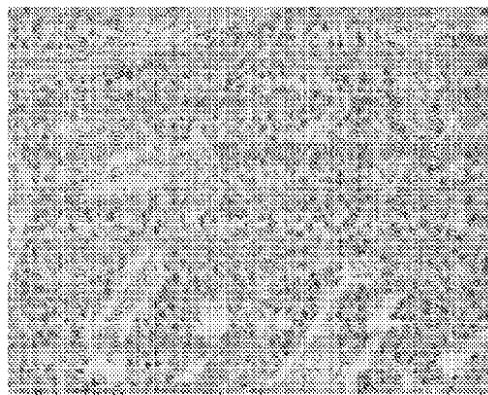
【図21】

**FIG. 21**

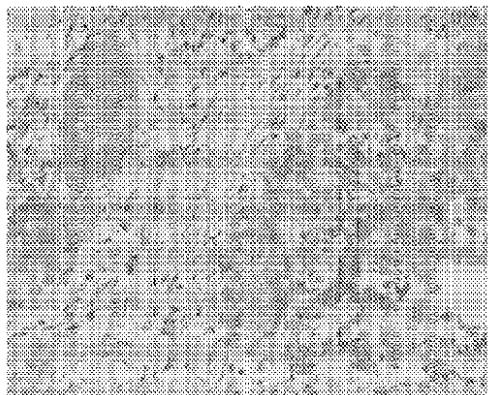
【図22】

**FIG. 22**

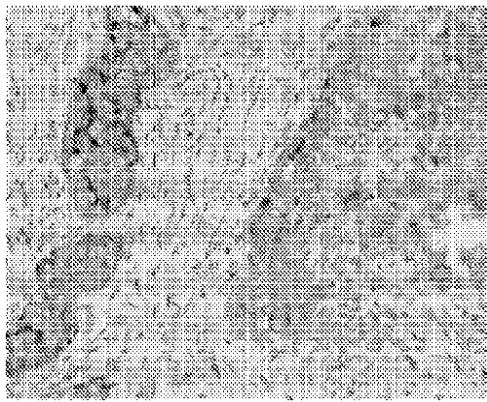
【図23】

**FIG. 23**

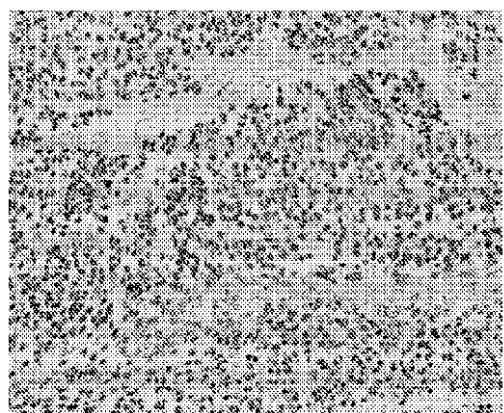
【図24】

**FIG. 24**

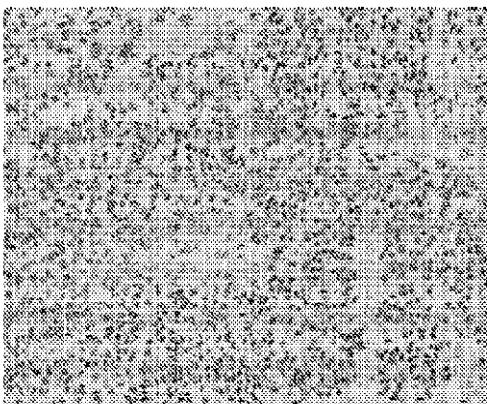
【図25】

**FIG. 25**

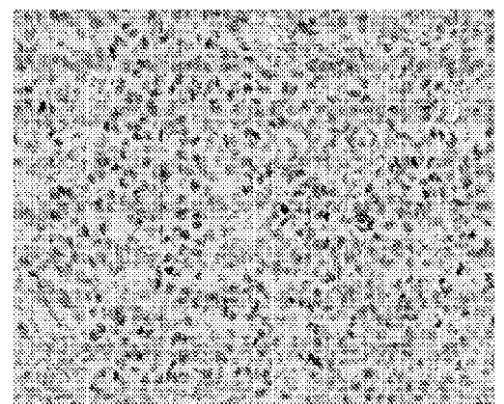
【図26】

**FIG. 26**

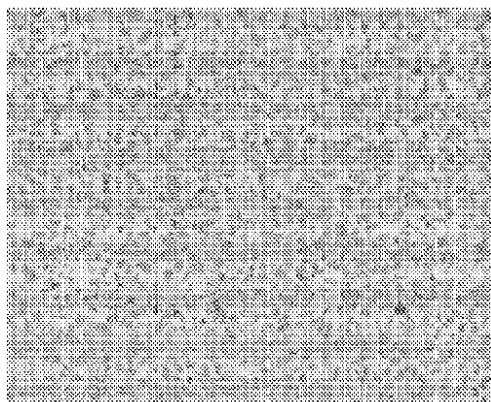
【図27】

**FIG. 27**

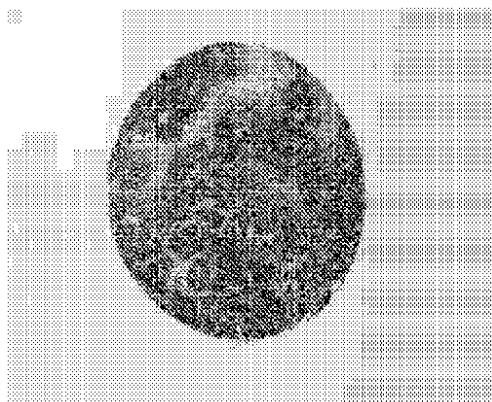
【図28】

**FIG. 28**

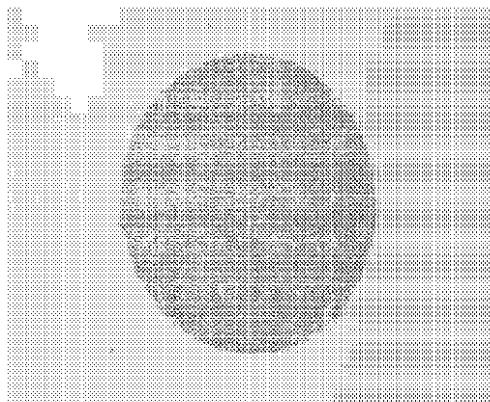
【図29】

**FIG. 29**

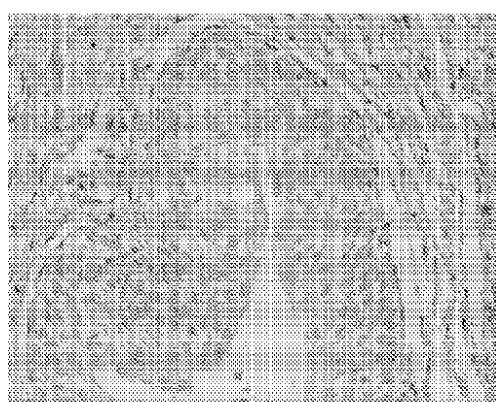
【図30】

**FIG. 30**

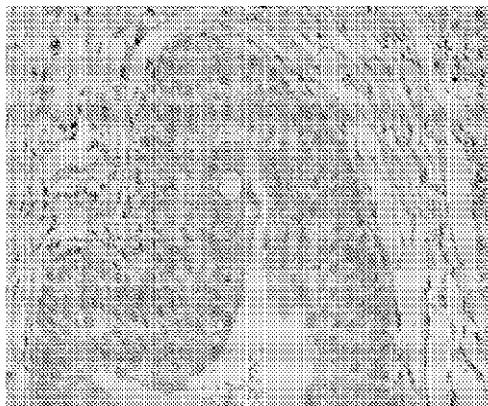
【図31】

**FIG. 31**

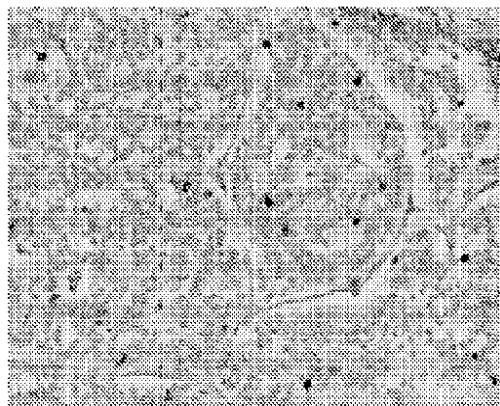
【図32】

**FIG. 32**

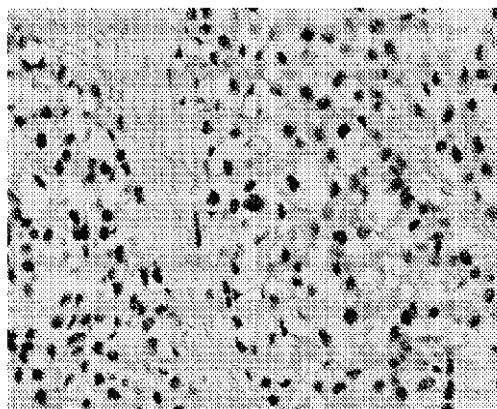
【図33】

**FIG. 33**

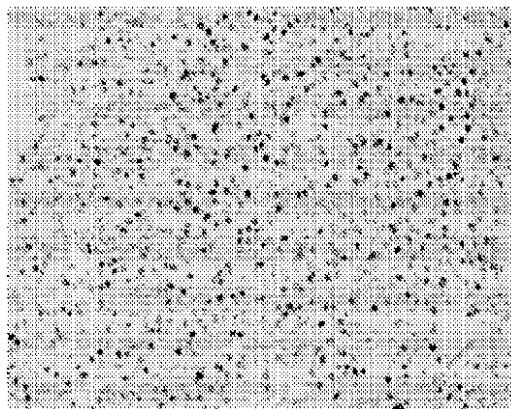
【図34】

**FIG. 34**

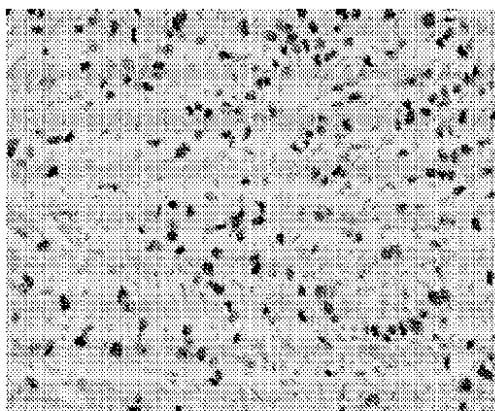
【図35】

**FIG. 35**

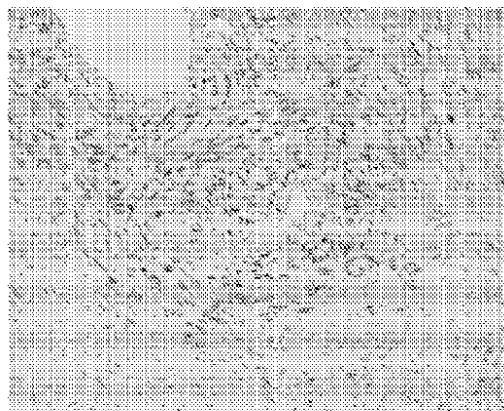
【図36】

**FIG. 36**

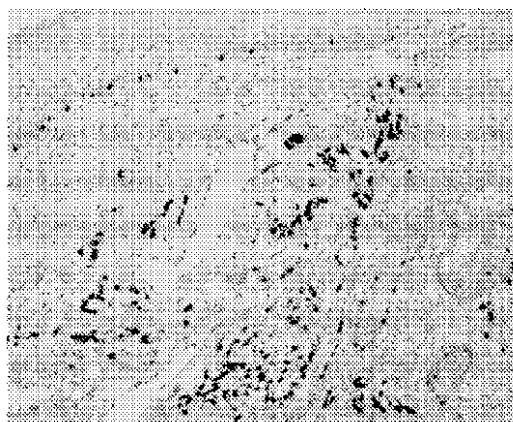
【図37】

**FIG. 37**

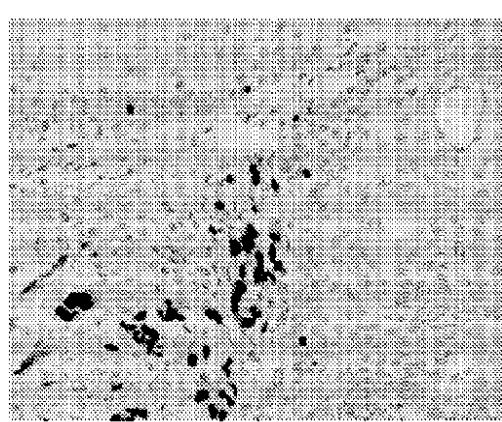
【図38】

**FIG. 38**

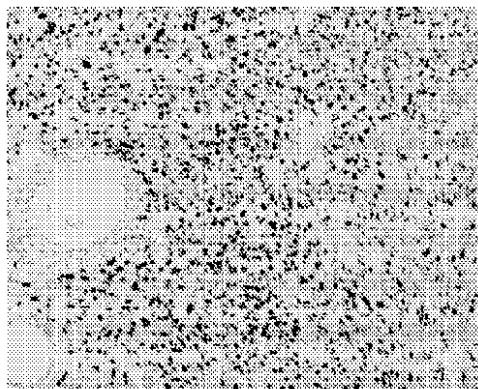
【図39】

**FIG. 39**

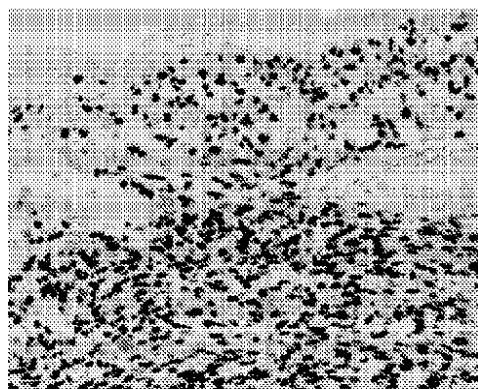
【図40】

**FIG. 40**

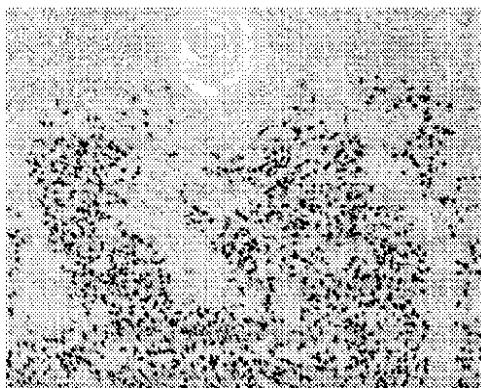
【図41】

**FIG. 41**

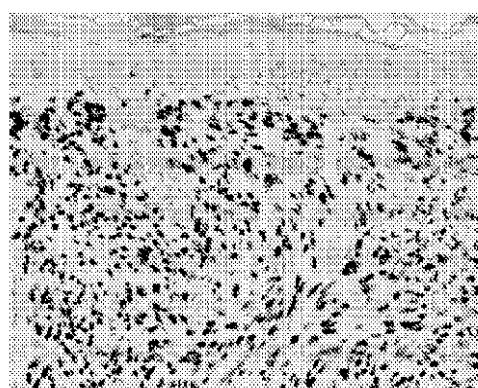
【図42】

**FIG. 42**

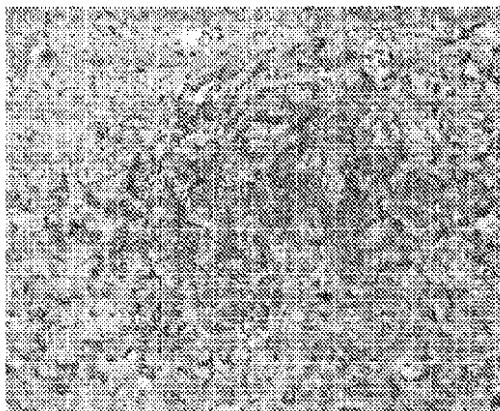
【図43】

**FIG. 43**

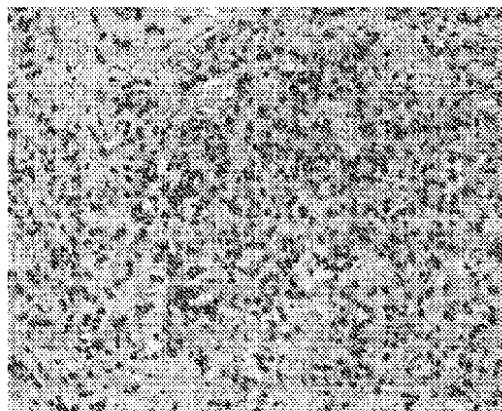
【図44】

**FIG. 44**

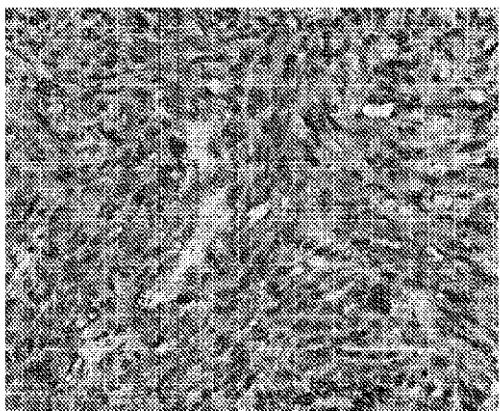
【図45】

**FIG. 45**

【図46】

**FIG. 46**

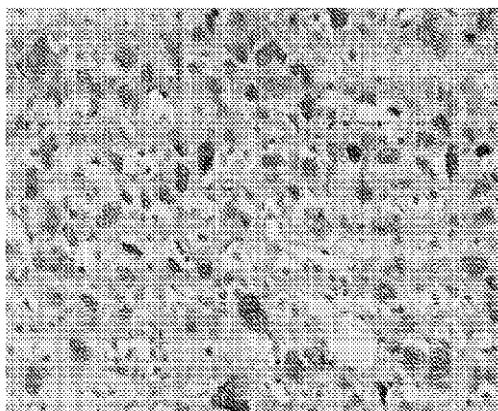
【図47】

**FIG. 47**

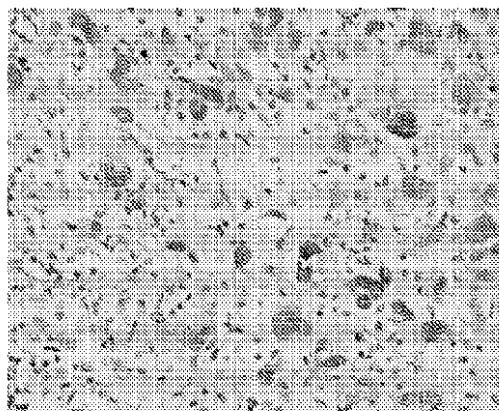
【図48】

**FIG. 48**

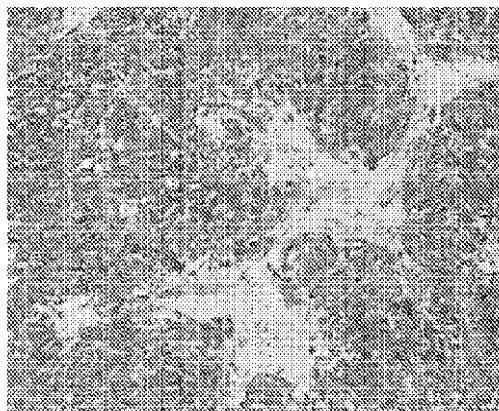
【図49】

**FIG. 49**

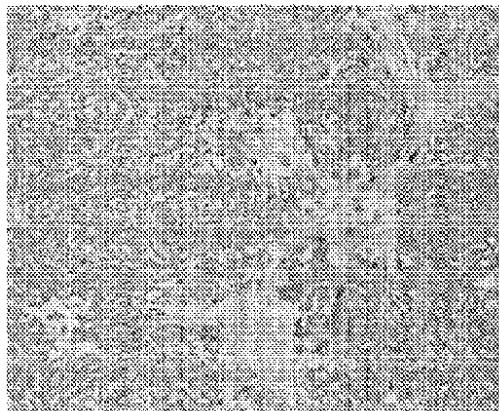
【図50】

**FIG. 50**

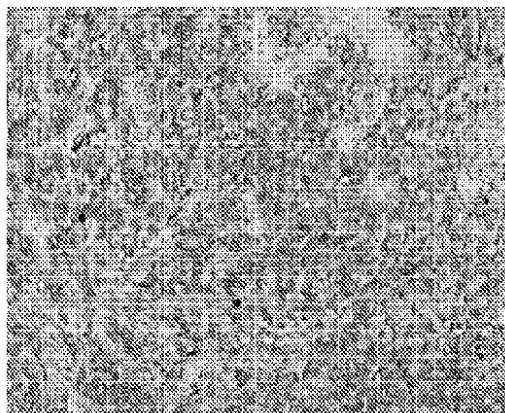
【図51】

**FIG. 51**

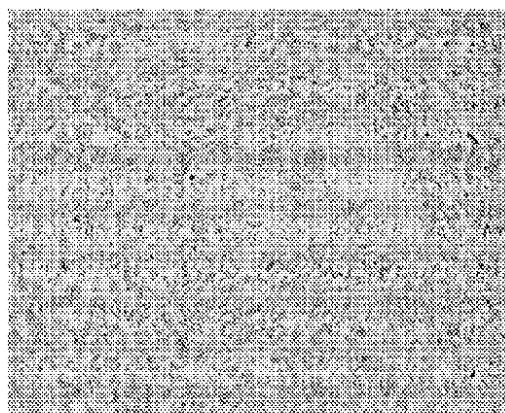
【図52】

**FIG. 52**

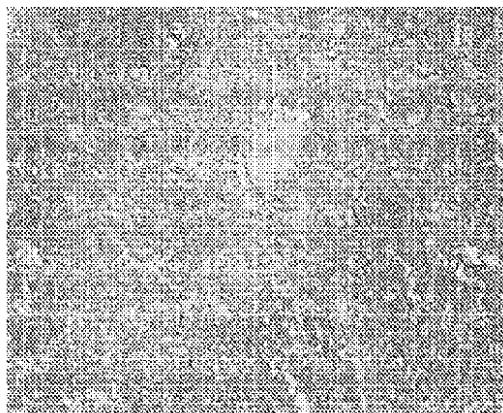
【図 5 3】

**FIG. 53**

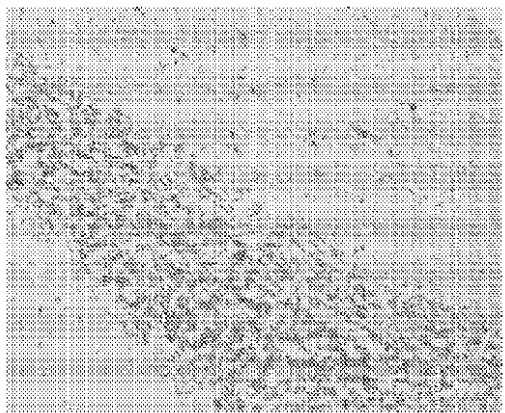
【図 5 4】

**FIG. 54**

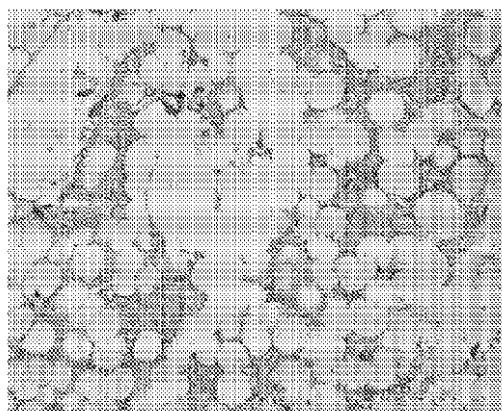
【図 5 5】

**FIG. 55**

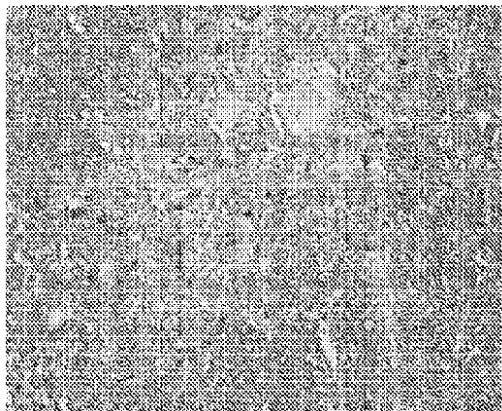
【図 5 6】

**FIG. 56**

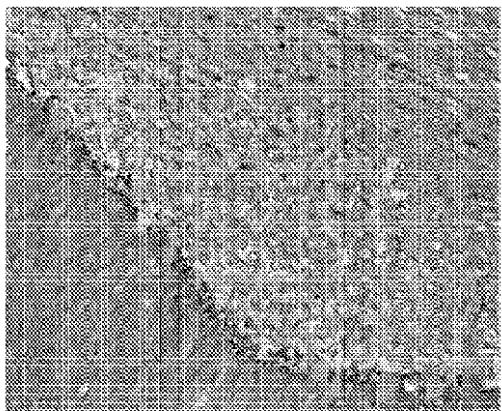
【図 5 7】

**FIG. 57**

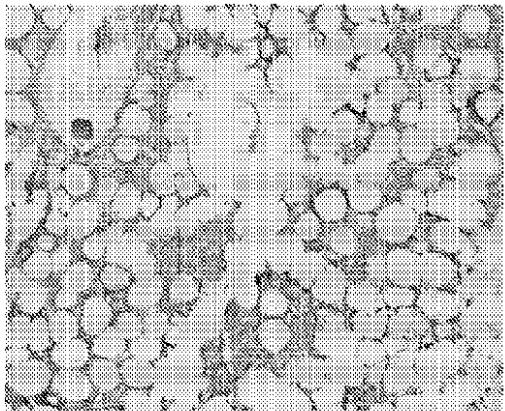
【図 5 8】

**FIG. 58**

【図 5 9】

**FIG. 59**

【図 6 0】

**FIG. 60**

【図 6 1】

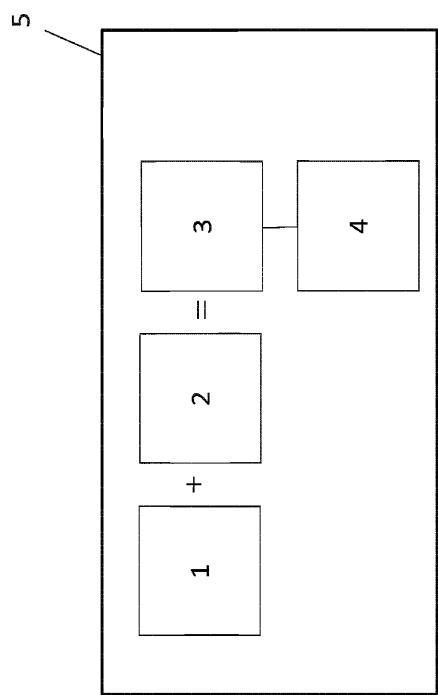


FIG. 61

【図 6 2】

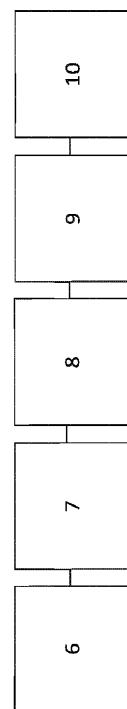


FIG. 62

【図 6 3】

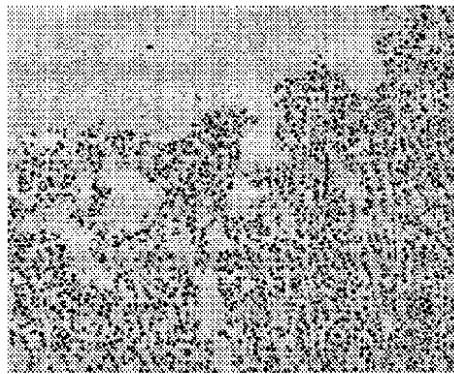


FIG. 63

【図 6 4】

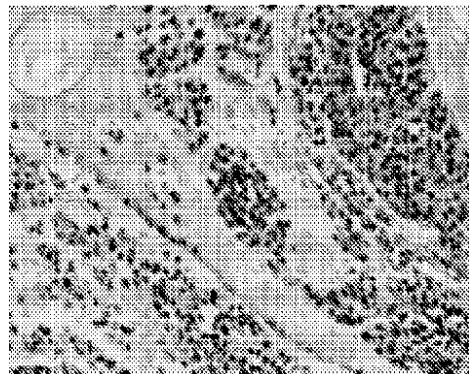
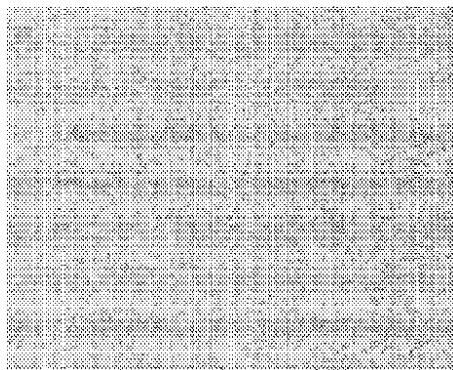
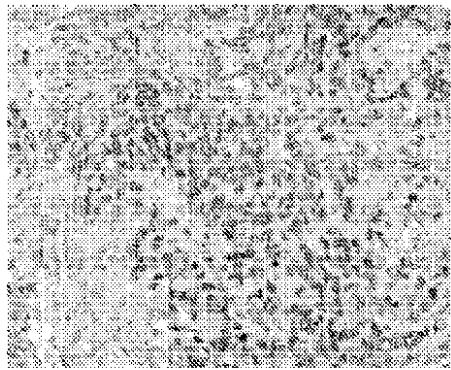


FIG. 64

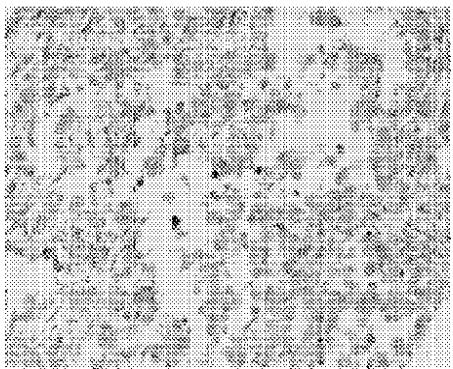
【図 6 5】

**FIG. 65**

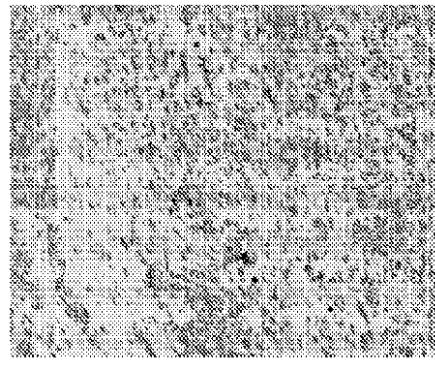
【図 6 6】

**FIG. 66**

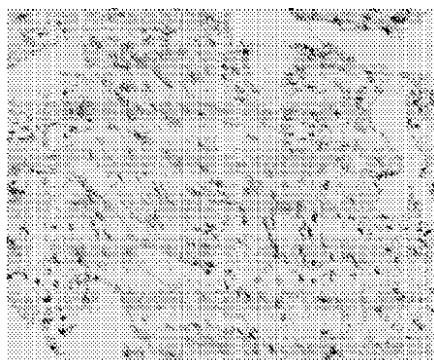
【図 6 7】

**FIG. 67**

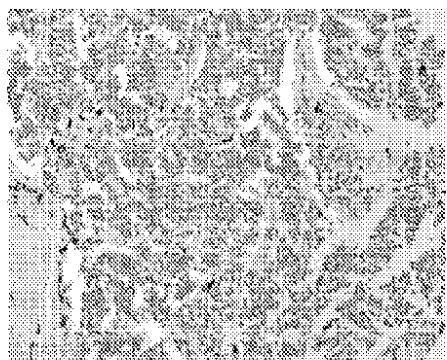
【図 6 8】

**FIG. 68**

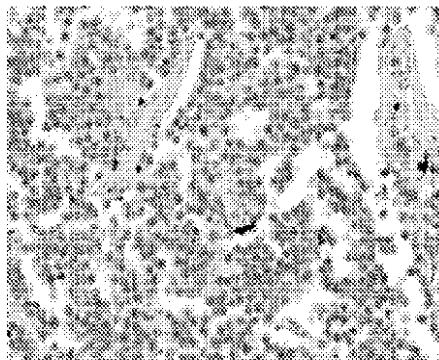
【図69】

**FIG. 69**

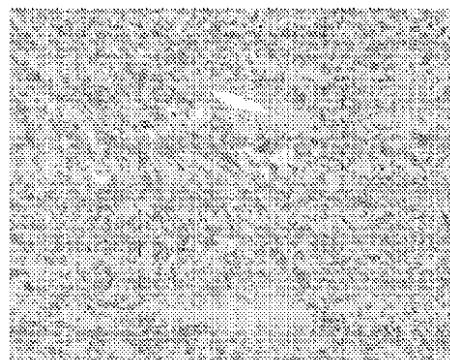
【図70】

**FIG. 70**

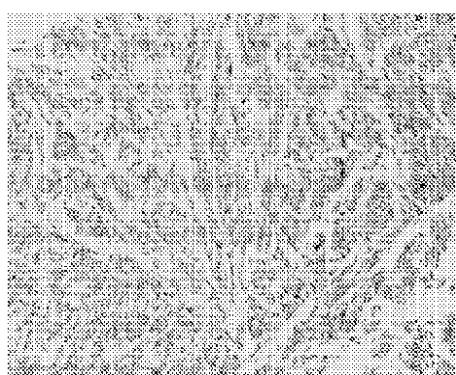
【図71】

**FIG. 71**

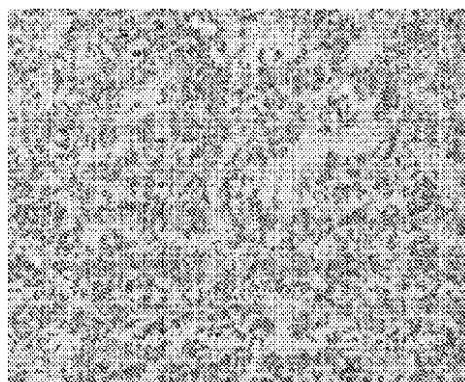
【図72】

**FIG. 72**

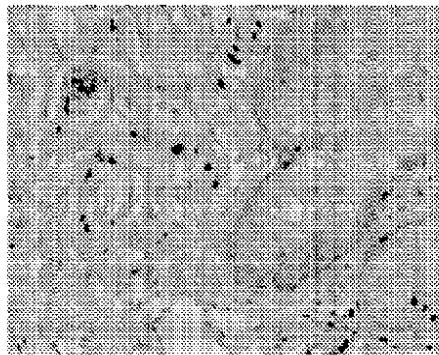
【図 7 3】

**FIG. 73**

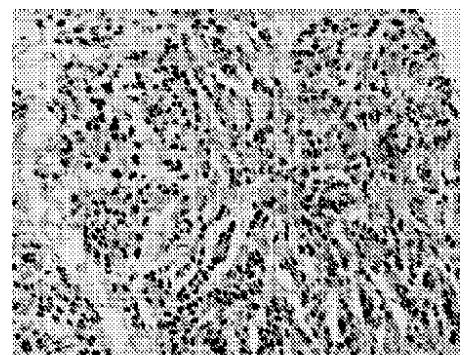
【図 7 4】

**FIG. 74**

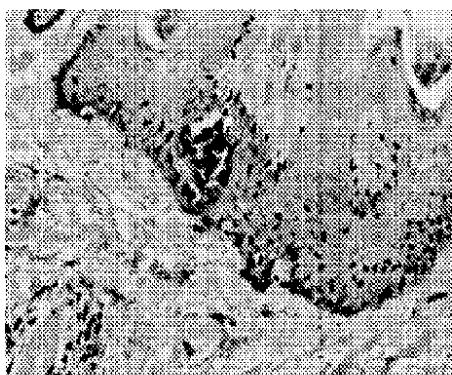
【図 7 5】

**FIG. 75**

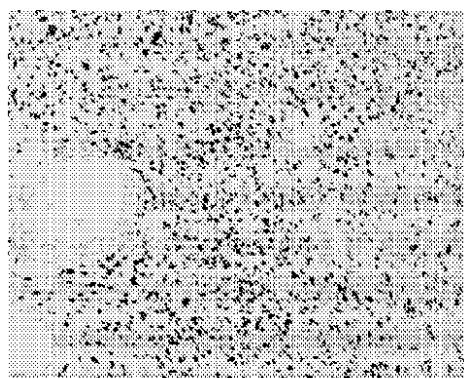
【図 7 6】

**FIG. 76**

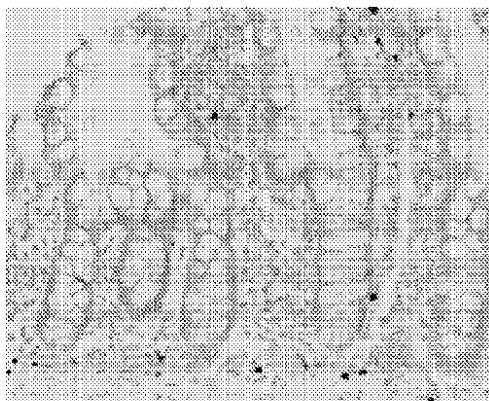
【図 77】

**FIG. 77**

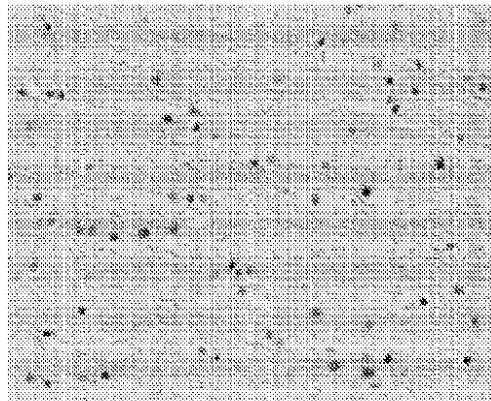
【図 78】

**FIG. 78**

【図 79】

**FIG. 79**

【図 80】

**FIG. 80**

【図 8 1】

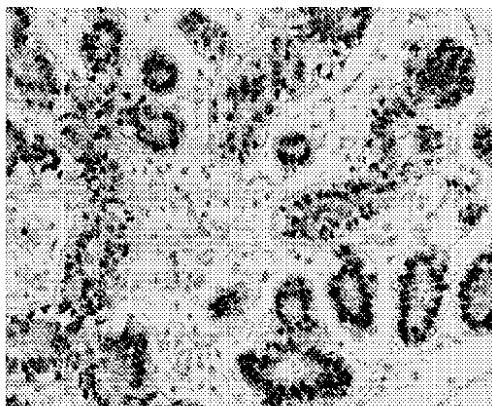


FIG. 81

【図 8 2】

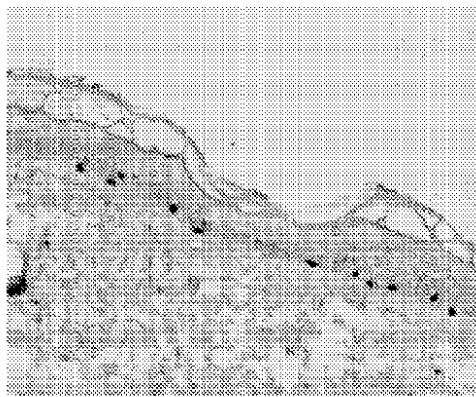


FIG. 82

【図 8 3】

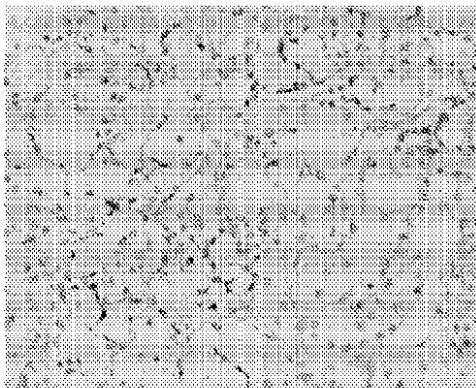


FIG. 83

【図 8 4】

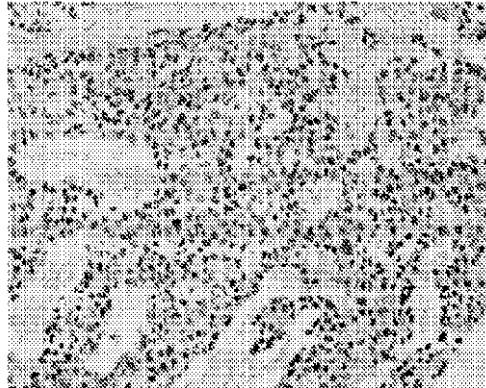
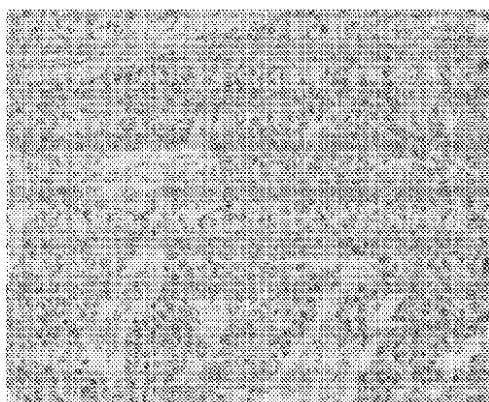
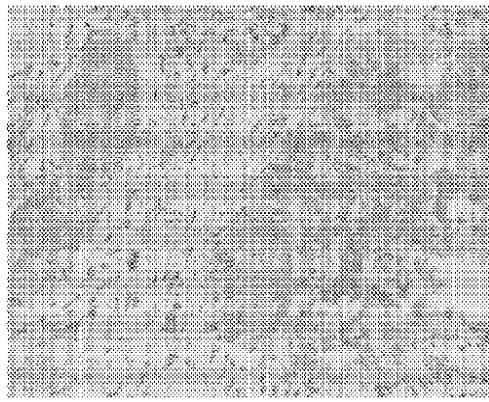


FIG. 84

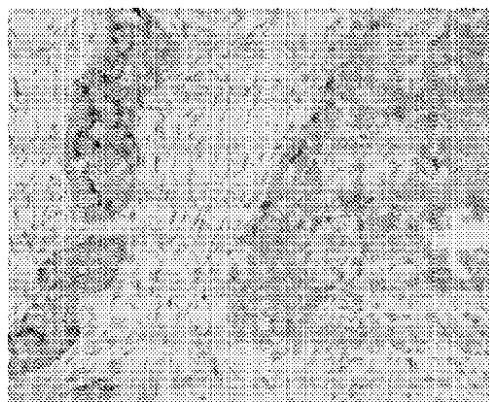
【図 8 5】

**FIG. 85**

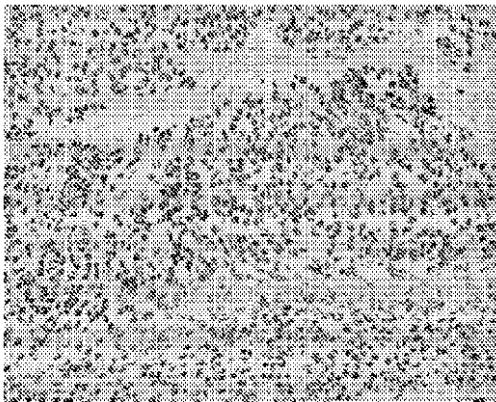
【図 8 6】

**FIG. 86**

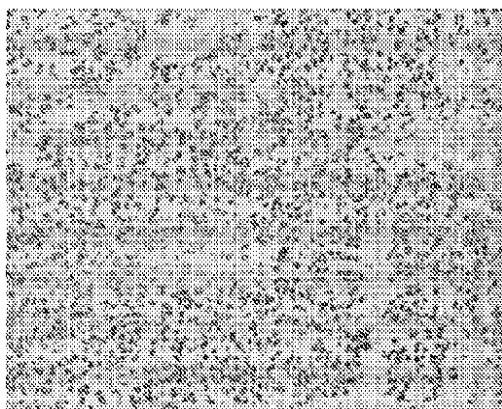
【図 8 7】

**FIG. 87**

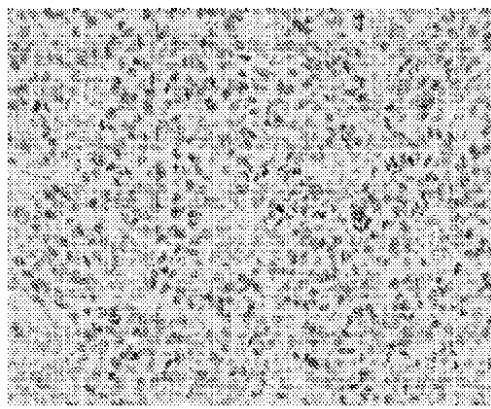
【図 8 8】

**FIG. 88**

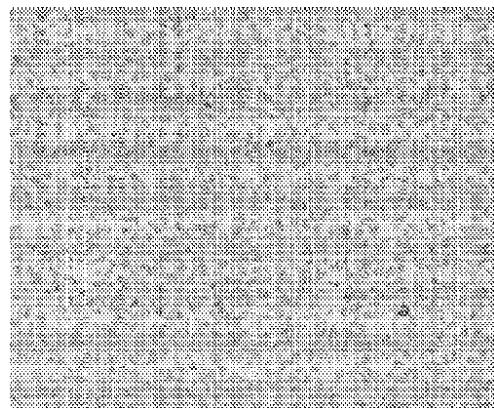
【図 89】

**FIG. 89**

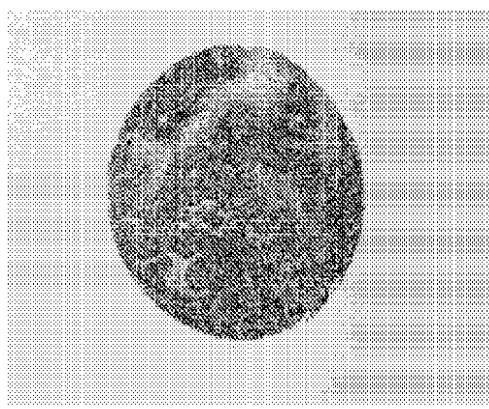
【図 90】

**FIG. 90**

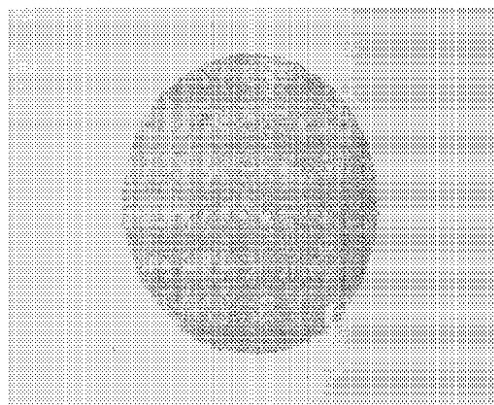
【図 91】

**FIG. 91**

【図 92】

**FIG. 92**

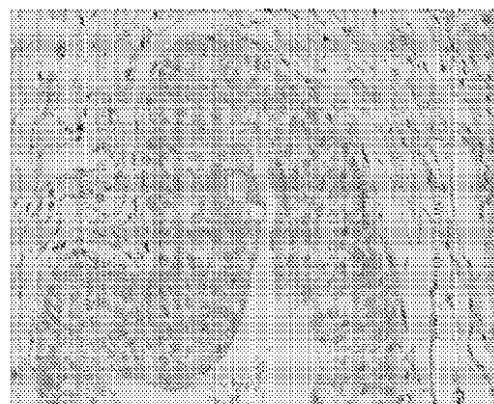
【図93】

**FIG. 93**

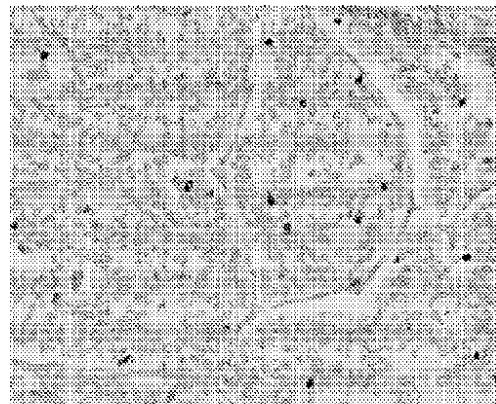
【図94】

**FIG. 94**

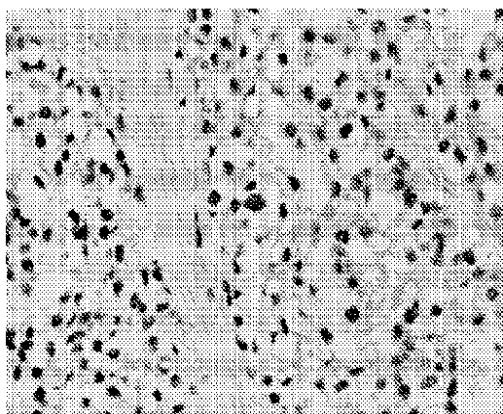
【図95】

**FIG. 95**

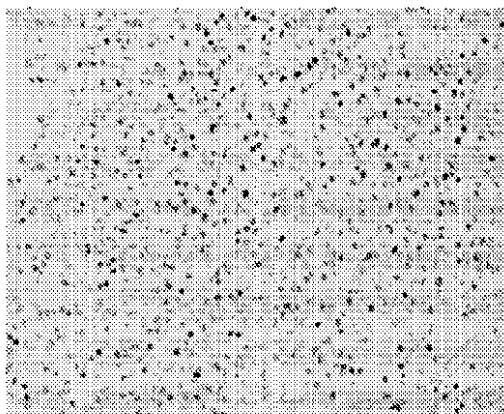
【図96】

**FIG. 96**

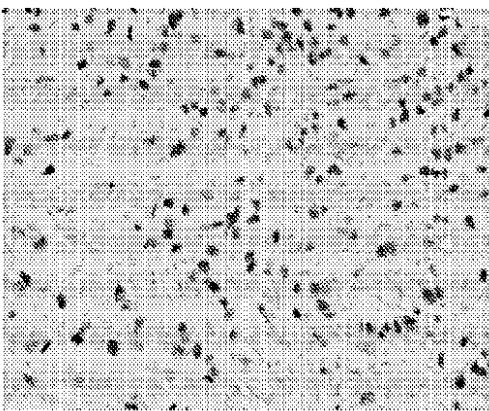
【図97】

**FIG. 97**

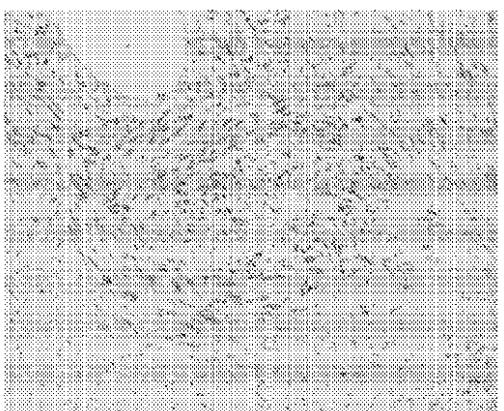
【図98】

**FIG. 98**

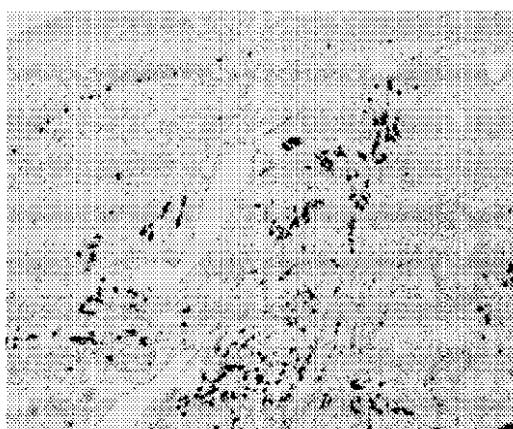
【図99】

**FIG. 99**

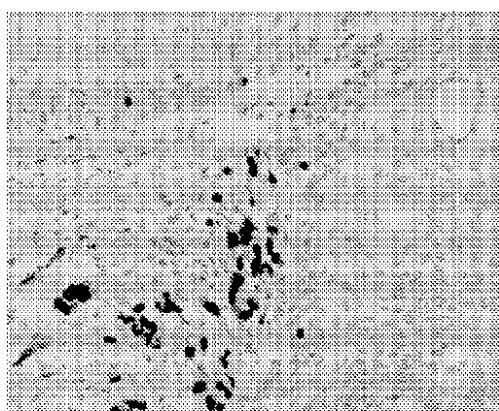
【図100】

**FIG. 100**

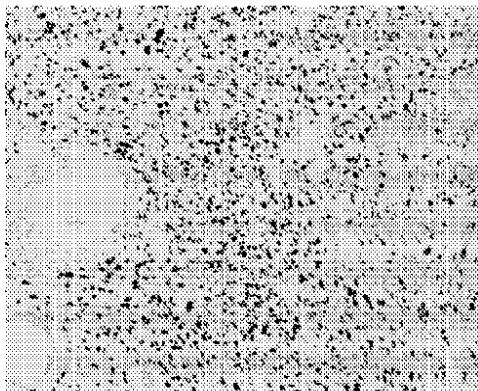
【図101】

**FIG. 101**

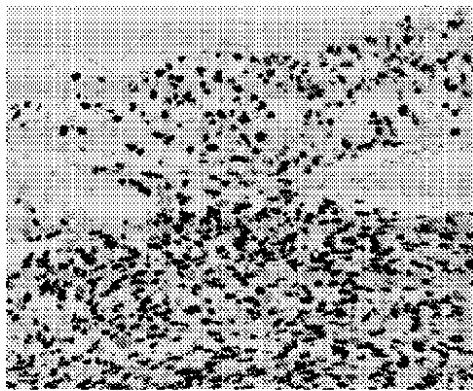
【図102】

**FIG. 102**

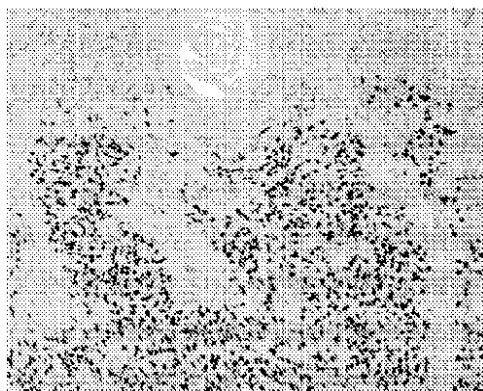
【図103】

**FIG. 103**

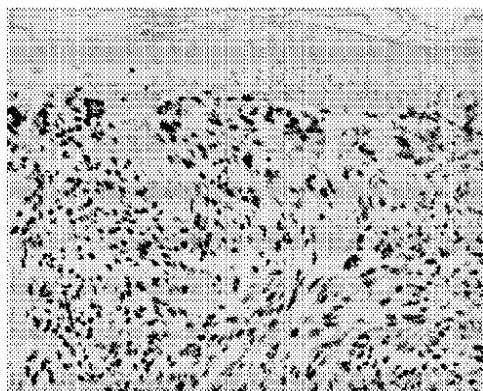
【図104】

**FIG. 104**

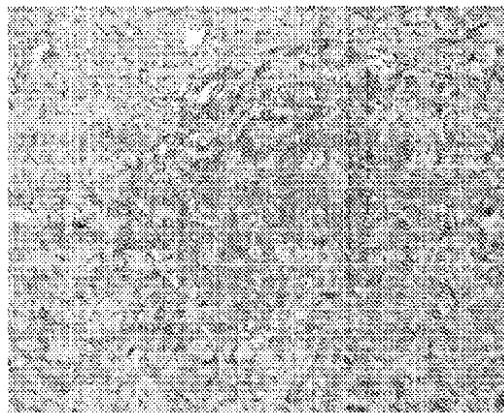
【図105】

**FIG. 105**

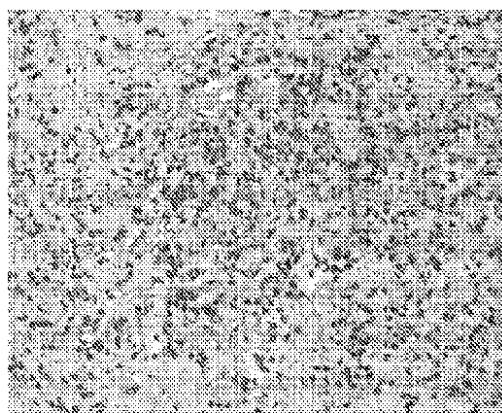
【図106】

**FIG. 106**

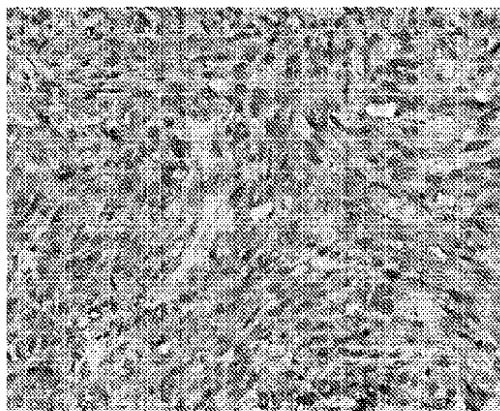
【図107】

**FIG. 107**

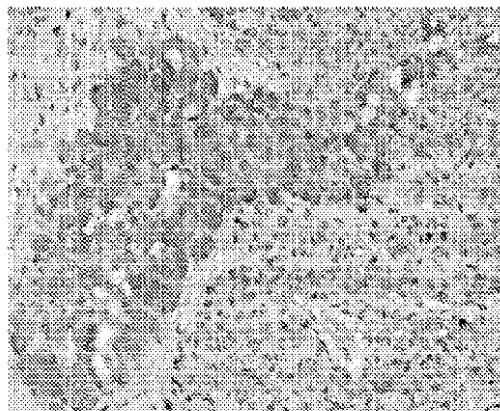
【図108】

**FIG. 108**

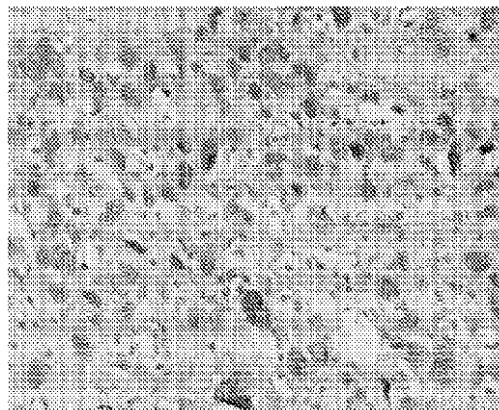
【図109】

**FIG. 109**

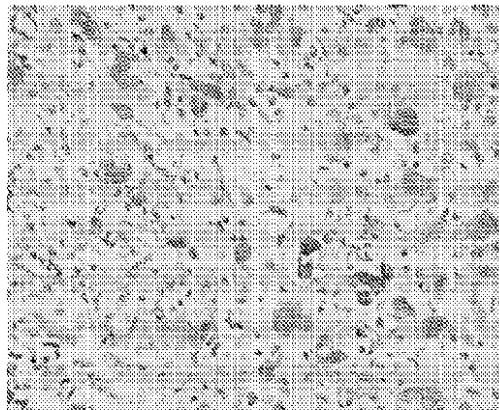
【図110】

**FIG. 110**

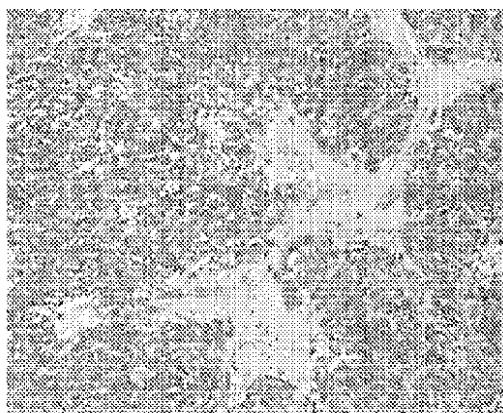
【図111】

**FIG. 111**

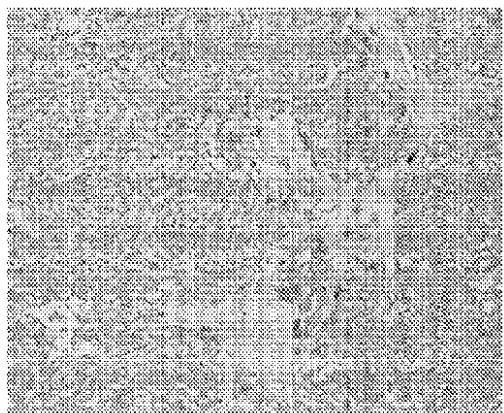
【図112】

**FIG. 112**

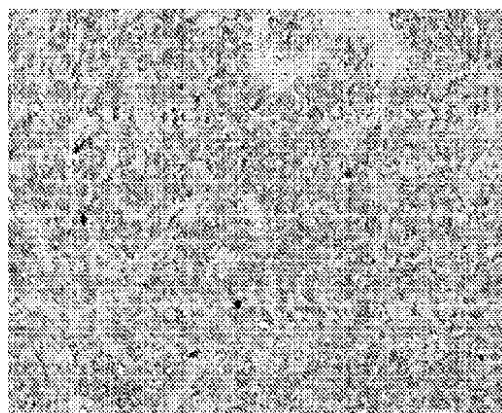
【図113】

**FIG. 113**

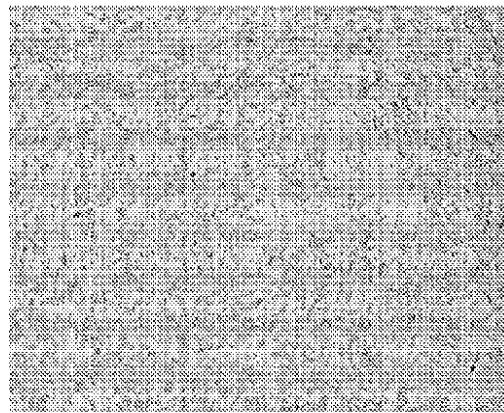
【図114】

**FIG. 114**

【図115】

**FIG. 115**

【図116】

**FIG. 116**

【図117】

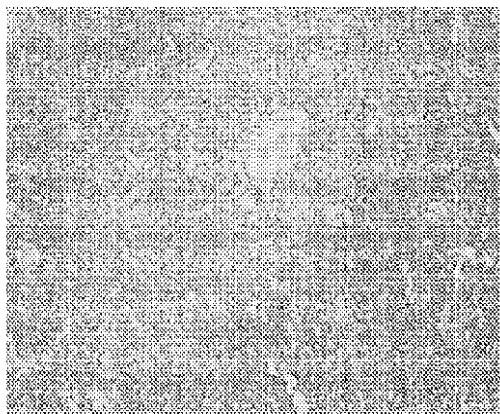


FIG. 117

【図118】

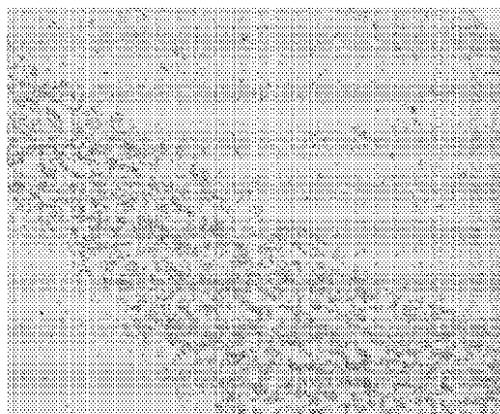


FIG. 118

【図119】

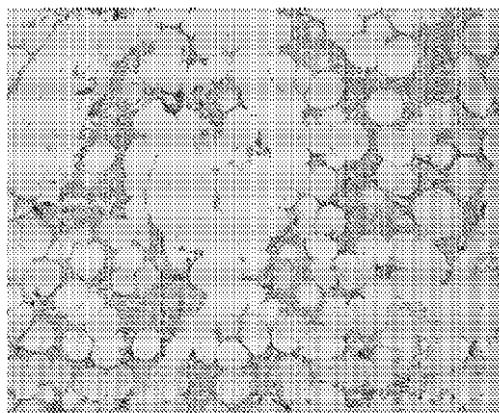


FIG. 119

【図120】

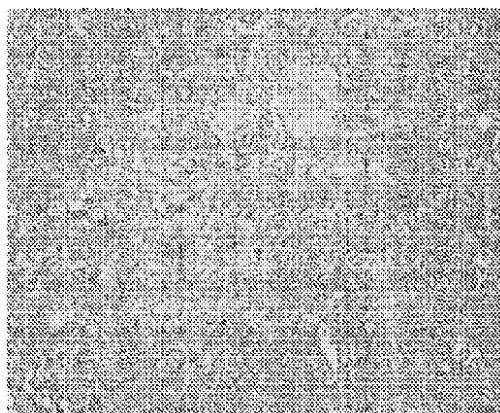
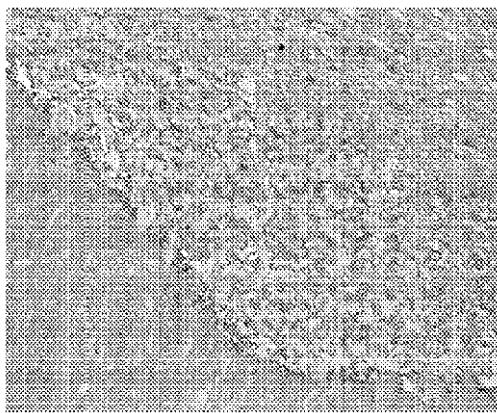
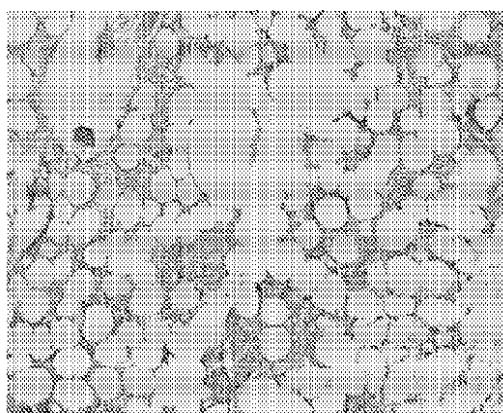


FIG. 120

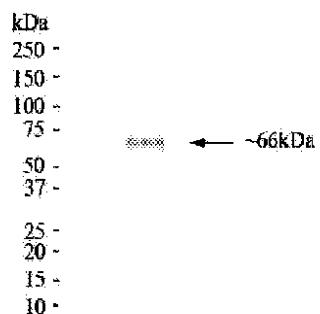
【図 1 2 1】

**FIG. 121**

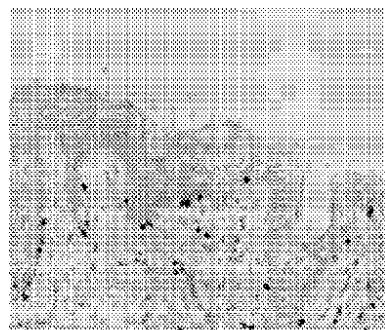
【図 1 2 2】

**FIG. 122**

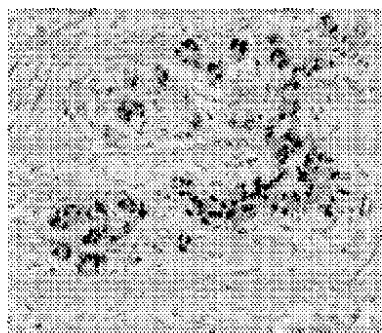
【図 1 2 3】

**FIG. 123**

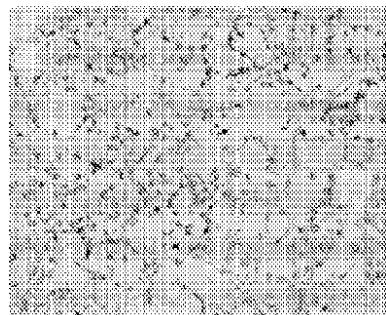
【図 1 2 4】

**FIG. 124**

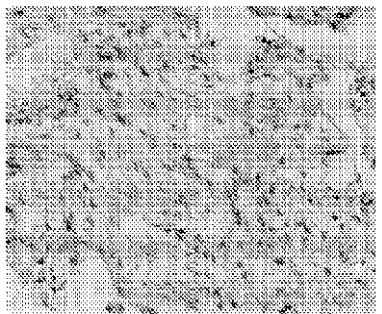
【図125】

**FIG. 125**

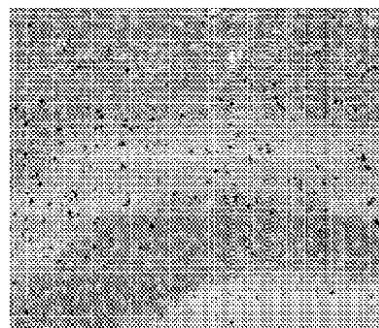
【図126】

**FIG. 126**

【図127】

**FIG. 127**

【図128】

**FIG. 128**

【図129】

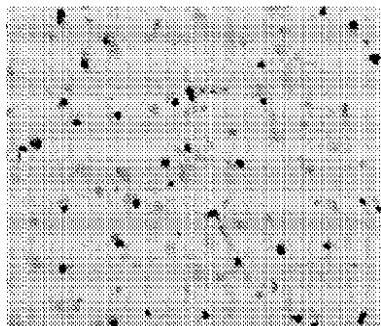


FIG. 129

【図130】

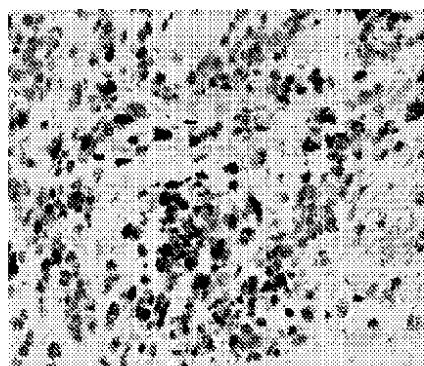


FIG. 130

【図131】



FIG. 131

【図132】

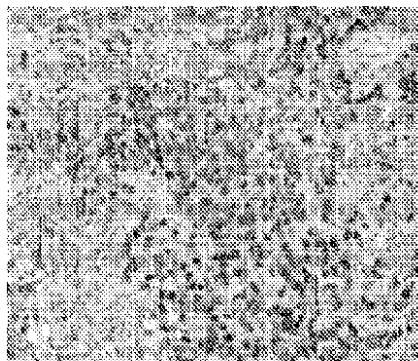


FIG. 132

【図133】

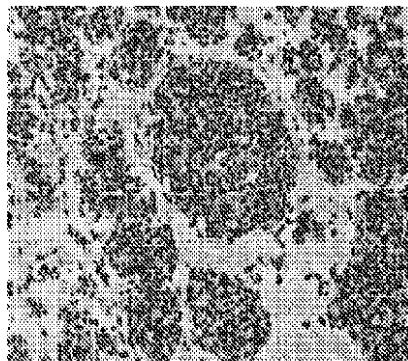


FIG. 133

【図134】

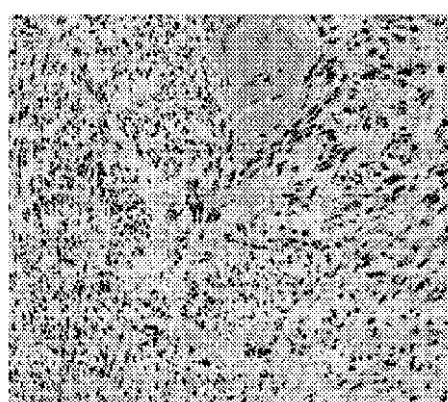


FIG. 134

【図135】

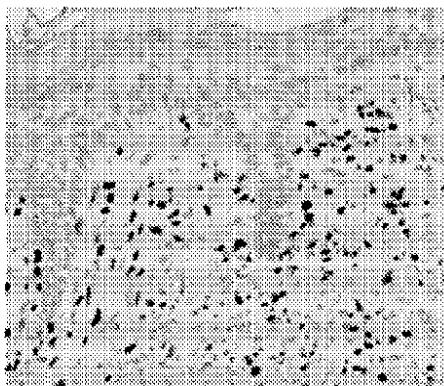


FIG. 135

【図136】

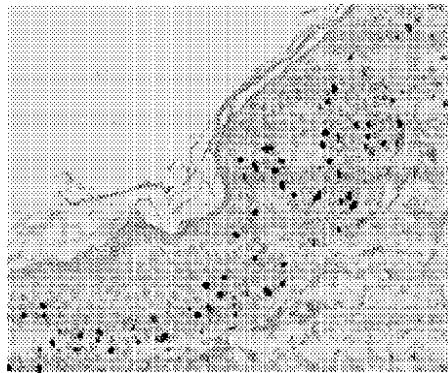


FIG. 136

【図137】

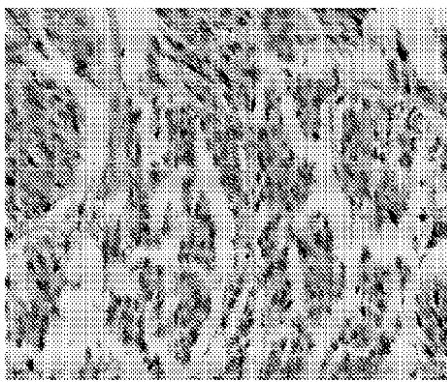


FIG. 137

【図138】

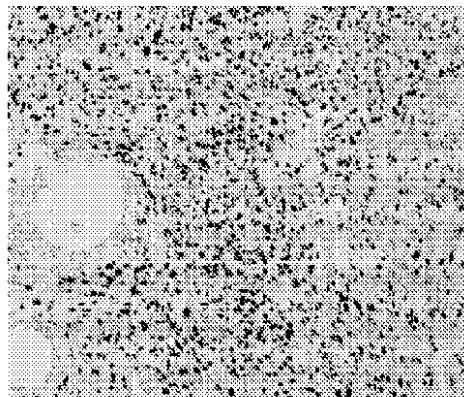


FIG. 138

【図139】

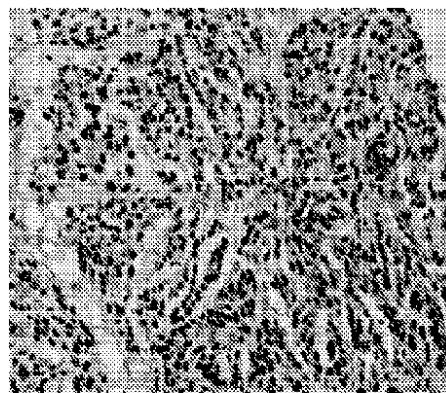


FIG. 139

【図140】

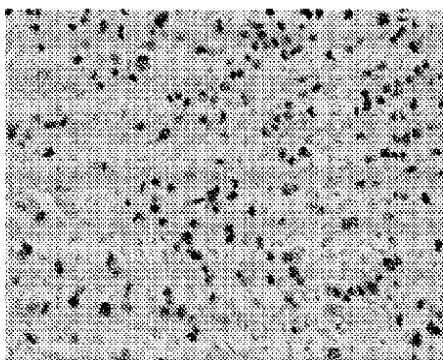
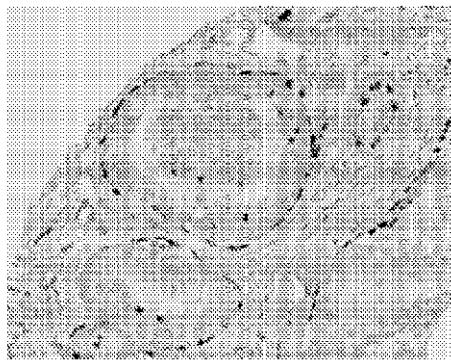
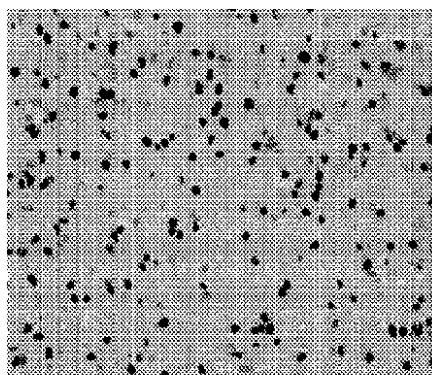


FIG. 140

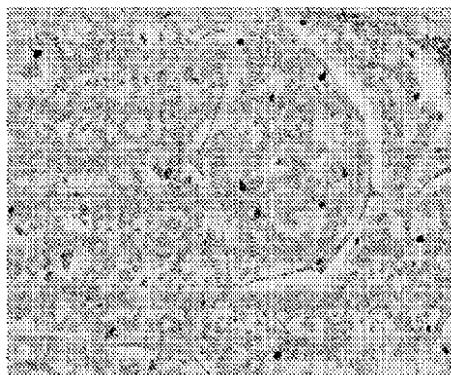
【図141】

**FIG. 141**

【図142】

**FIG. 142**

【図143】

**FIG. 143**

【配列表】

0006506267000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 タチャ , デイビッド

アメリカ合衆国 カリフォルニア 95867 , バカビル , ディアーグレン サークル 12
5

(72)発明者 チ , ウェイミン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94553 , マルティネス , ディアブロ ウエイ 437

審査官 宮岡 真衣

(56)参考文献 國際公開第2010/017070 (WO , A1)

KREITZER F. R. et al. , Am J Stem Cell , 2(2)[Epub 2013 Jun] , p.119-131

Anti-SOX10 antibody ab108408 , abcam product datasheet , [Retrieved on 2018.8.24] , Retrieved from the Internet , U R L , <<https://www.abcam.com/sox10-antibody-ab108408.html>>

OHTOMO R. et al. , Modern Pathology , 26[Epub 2013 Apr] , p.1041-1050

KANG Y. et al. , Modern Pathology , 27[Epub 2013 Aug] , p.55-61

伊藤 智雄 , 病理組織診断における免疫染色 , 顯微鏡 , Vol.48, No.1(2013 Apr) , p.33-38

組織染色用に調製済みの抗体力クテル Multiplex IHC Antibody Cocktail , フナコシ株式会社 ,
2012年 8月30日 , [Retrieved on 2018.8.24] , Webページ番号 : 4567 , Retrieved from
the Internet , U R L , <<https://www.funakoshi.co.jp/contents/4567>>

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C 07 K 16 / 18 - 16 / 46

C 12 N 5 / 18

C 12 N 15 / 13

G 01 N 33 / 53 - 33 / 577

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)

P u b M e d

C a p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S (S T N)

U n i P r o t / G e n e S e q