

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6720208号  
(P6720208)

(45) 発行日 令和2年7月8日(2020.7.8)

(24) 登録日 令和2年6月19日(2020.6.19)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N 15/13	(2006.01)	C 12 N 15/13	Z N A
C 07 K 16/28	(2006.01)	C 07 K 16/28	
C 12 P 21/08	(2006.01)	C 12 P 21/08	
C 12 N 5/10	(2006.01)	C 12 N 5/10	
G 01 N 33/48	(2006.01)	G 01 N 33/48	P

請求項の数 18 (全 26 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-554283 (P2017-554283)  
 (86) (22) 出願日 平成28年4月13日 (2016.4.13)  
 (65) 公表番号 特表2018-515071 (P2018-515071A)  
 (43) 公表日 平成30年6月14日 (2018.6.14)  
 (86) 國際出願番号 PCT/EP2016/058135  
 (87) 國際公開番号 WO2016/166169  
 (87) 國際公開日 平成28年10月20日 (2016.10.20)  
 審査請求日 平成31年1月25日 (2019.1.25)  
 (31) 優先権主張番号 62/149,239  
 (32) 優先日 平成27年4月17日 (2015.4.17)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
 米国(US)

(73) 特許権者 516357063  
 スプリング バイオサイエンス コーポレーション  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94588, プレザントン, ハシエンダ ライブ 4300  
 (74) 代理人 110002077  
 園田・小林特許業務法人  
 (72) 発明者 コウト, フエルナンド ホセ レベロ  
 ド  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94588, プレザントン, オーク クリック ドライブ 7814

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 C 4. 4 A を検出するための抗体、組成物、及び免疫組織化学法

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

配列番号 17 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域の配列、及び配列番号 18 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域の配列を含む、モノクローナル C 4. 4 a 抗体。

## 【請求項 2】

配列番号 23 の重鎖 C D R 1 配列、配列番号 25 の重鎖 C D R 2 配列、配列番号 27 の重鎖 C D R 3 配列、配列番号 31 の軽鎖 C D R 1 配列、配列番号 33 の軽鎖 C D R 2 配列、及び配列番号 35 の軽鎖 C D R 3 配列を含む、モノクローナル C 4. 4 a 抗体。

## 【請求項 3】

クローン S 4 2 H 9 L 5 から成る群より選択される、モノクローナル抗 C 4. 4 a 抗体 10  
。

## 【請求項 4】

配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、少なくとも 20 アミノ酸長のそれらの断片、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、若しくは配列番号 4 と少なくとも 90 % 同一であるペプチド、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、若しくは配列番号 4 の断片と少なくとも 90 % 同一であるペプチド、又はそれらの組合せを含む免疫原で宿主を免疫化することに由来する、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載のモノクローナル C 4. 4 a 抗体。

## 【請求項 5】

宿主がウサギ宿主である、請求項 4 に記載の抗体。

## 【請求項 6】

宿主発現系において生成される、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の抗体。

## 【請求項 7】

請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の C 4 . 4 a 抗体をコードする、cDNA。

## 【請求項 8】

請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の抗体を発現させる、宿主細胞発現系。

## 【請求項 9】

宿主細胞が HEK293 細胞である、請求項 8 に記載の宿主細胞発現系。

## 【請求項 10】

請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の C 4 . 4 a 抗体で標識され、任意選択的にホルマリン固定パラフィン包埋組織試料である、標識化組織試料。 10

## 【請求項 11】

請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の C 4 . 4 a 抗体を含む、C 4 . 4 a を検出するためのキット。

## 【請求項 12】

C 4 . 4 a 抗体を可視化するための検出系を更に含む、請求項 11 に記載のキット。

## 【請求項 13】

検出系が発色検出系又は蛍光検出系を含む、請求項 12 に記載のキット。

## 【請求項 14】

C 4 . 4 a を検出する方法であって、

20

a . 試料を請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の C 4 . 4 a 抗体と接触させること；及び

b . 抗体を可視化することを含み；

C 4 . 4 a 抗体の検出が、C 4 . 4 a の存在を示す、方法。

## 【請求項 15】

抗体を可視化する工程が、抗体を発色検出系又は蛍光検出系と接触させることを含む、請求項 14 に記載の方法。

## 【請求項 16】

配列番号 1 、配列番号 2 、配列番号 3 、配列番号 4 、少なくとも 20 アミノ酸長のそれらの断片を含むペプチド、配列番号 1 、配列番号 2 、配列番号 3 、若しくは配列番号 4 と少なくとも 90 % 同一であるペプチド、配列番号 1 、配列番号 2 、配列番号 3 、若しくは配列番号 4 の断片と少なくとも 90 % 同一であるペプチド、又はそれらの組合せで動物を免疫化することを含む、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の C 4 . 4 a 抗体を生成する方法。 30

## 【請求項 17】

C 4 . 4 a 関連腫瘍を診断するためのキットであって、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載のモノクローナル C 4 . 4 a 抗体を含み、請求項 14 又は 15 に記載の方法により C 4 . 4 a が検出され、C 4 . 4 a の検出が C 4 . 4 a 関連腫瘍を示す、キット。

## 【請求項 18】

請求項 14 又は 15 に記載の方法により得られる、C 4 . 4 a 抗体で標識された標識化組織試料。 40

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、免疫組織化学分析及び試薬、より具体的には、腫瘍関連抗原 C 4 . 4 a に関する抗体及び使用方法、例えば診断用途に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

C 4 . 4 a はウロキナーゼ受容体のタンパク質ホモログである。これは、ウロキナーゼ受容体 (uPAR) と類似の構造を有し、uPAR として Ly - 6 ファミリーに属する G 50

P I (グリコシル-ホスファチジルイノシトール)結合タンパク質である。Ly-6 ファミリー分子の多くが単一ドメインから成るのに対し、uPAR は三の高システインドメインから成る。C4.4A は、GPI 結合部位中の細胞膜に結合する膜タンパク質であり、二の高システインドメイン及びシステイン欠損第三ドメインから成る。C4.4A は、1989 年に転移性ラット臍臓がん細胞株から単離され、そのヒトホモログは 2001 年に単離された (Hansen et al., 2005, Thrombosis and Haemostasis, 93(4):A33, XP009145645)。C4.4a はまた、例えば肺がん、食道がん、頸がん、皮膚がん、結腸がん、尿路上皮がん等における腫瘍関連抗原であるとも考えられている。

#### 【0003】

複数のポリクローナル C4.4a 抗体が以前に生成されている（例えば Clonetech のカタログ番号 28073；Novus のカタログ番号 NBP2-32598；LifeSpan Biosciences のカタログ番号 LS-A9857、A9856、及び LS-C186776）。しかしながら、これらの抗体は、免疫組織化学 (IHC) 分析において良好に機能しない。本発明の出願時点で、出願人は、モノクローナル C4.4a 抗体、例えば IHC 分析及び / 又は診断目的に適合したモノクローナル C4.4a 抗体を生成することができた他のグループを認識していない。モノクローナル抗体を生成する一般的な方法の一つは、マウスハイブリドーマ技術を使用することである。しかしながら、ハイブリドーマが生産性を失うか、又はハイブリドーマ細胞が変化して抗体の変化（及び抗体の有効性）を生じることは珍しいことである。そして、ヒト C4.4a とそのウサギ対応物との間の高い配列類似性は、uPAR 様ドメインに 1 又は uPAR 様ドメイン 2 を対象とする抗 C4.4a 抗体を生成するのが困難になる。

#### 【0004】

米国特許公開第 2012/0321619 号は、C4.4a 抗体を対象とする。本発明をいかなる理論又はメカニズムにも限定することは望まないが、米国特許公開第 2012/0321619 号の C4.4a 抗体は、細胞株における C4.4a 検出目的のため及び in vitro 分析における他の目的のために使用され、これらの抗体は、例えば診断目的のためのホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織試料で良好に機能しない。Hansen et al. (Biochem J, 2004, 380:845-857) は C4.4a 抗体を開示するが、これらの抗体はポリクローナル抗体である。

#### 【発明の概要】

#### 【0005】

本発明の出願時点で、出願人は、C4.4a 抗体、例えば、IHC 分析、例えば、FFPE 組織試料における IHC 分析に適合したモノクローナル C4.4a 抗体を発見することはできなかった。本発明は、モノクローナル C4.4a 抗体、本明細書で開示されるモノクローナル C4.4a 抗体を使用して C4.4a を検出する方法、及び本明細書で開示されるモノクローナル C4.4a 抗体を使用して C4.4a 関連がんを検出するための方法を特徴とする。本発明のモノクローナル C4.4a 抗体は、FFPE 組織試料において C4.4a を検出するのに使用されうる。

#### 【0006】

例えば、本発明は、C4.4a に特異的な単離された抗体（例えばモノクローナル抗体）であって、C4.4a の特定の配列又は領域、例えば本明細書で開示される C4.4a エピトープ（例えば uPAR 様ドメイン 1 内のエピトープ、uPAR 様ドメイン 2 内のエピトープ等）に特異的に結合する抗体を特徴とする。いくつかの実施態様において、抗体は本明細書で開示されるクローニング S42H9L5 又はクローニング S20H1L1 を含む。本発明はまた、モノクローナル C4.4a 抗体又は C4.4a 結合断片であって、クローニング S42H9L5 及びクローニング S20H1L1 から成る群より選択される抗体と同一のエピトープ特異性を有する抗体又は結合断片も特徴とする。

#### 【0007】

いくつかの実施態様において、本発明の C4.4a 抗体は、配列番号 17、配列番号 18、配列番号 19、配列番号 20、それらの断片、配列番号 17、配列番号 18、配列番

10

20

30

40

50

号19、若しくは配列番号20と少なくとも60%同一であるペプチド、配列番号17、配列番号18、配列番号19、若しくは配列番号20の断片と少なくとも60%同一であるペプチド、又はそれらの組合せを含む。

【0008】

本発明はまた、本発明によるC4.4a抗体を発現させる宿主細胞発現系も特徴とする。本発明はまた、標識化組織試料（標識されたFFPE組織試料）であって、本発明によるC4.4a抗体で標識された組織試料も特徴とする。

【0009】

本発明はまた、本発明によるC4.4a抗体を含むキットも特徴とする。C4.4a抗体は免疫組織化学に適合しうる。いくつかの実施態様において、キットは、C4.4a抗体を可視化するための検出系（例えば、発色系、蛍光系、その他適切な系）を更に含む。キットは、他の適切な試薬、例えばC4.4a抗体を対象とする二次抗体、バッファー等を更に含んでもよい。

【0010】

本発明はまた、C4.4aを検出する方法（例えば、自動化法、手作業用による方法）も特徴とする。いくつかの実施態様において、方法は、試料、試料を本発明によるC4.4a抗体を接触させること、及び（例えば、検出系、例えば発色系、蛍光系、他の適切な系を介して）抗体を可視化することを提供する。抗体の検出は、C4.4aの存在を示してもよい。

【0011】

本発明はまた、C4.4a抗体（例えば本発明によるC4.4a抗体）を生成する方法も特徴とする。いくつかの実施態様において、方法は、本明細書に記載されるような免疫原を使用して、抗体で宿主動物を免疫化することを含む。

【0012】

本発明はまた、C4.4a関連腫瘍（例えば、肺腫瘍、頸部腫瘍、皮膚癌、食道腫瘍、及び扁平上皮の分化を伴う主要）を診断する方法であって、本発明の方法によってC4.4aを検出することを含む方法も特徴とする。C4.4aの検出は、C4.4a関連腫瘍を示してもよい。

【0013】

本発明はまた、本発明によるC4.4a抗体で標識された、標識化組織試料（FFPE試料）も特徴とする。試料は本発明による方法によって得てもよい。

【0014】

本発明はまた、C4.4aを検出するための閉鎖系、例えば本発明による方法の実行に適合した閉鎖自動化系、例えば自動化免疫組織化学分析も特徴とする。

【0015】

本発明はまた、本発明による方法がプログラムされた染色機械も特徴とする。

【0016】

本明細書に記載される任意の特徴又は特徴の組み合わせは、そのような組み合わせのいずれかに含まれる特徴が、文脈、本明細書、及び当業者の知識から明らかとなるように、相互に矛盾しない限りにおいて、本発明の範囲に含まれる。本発明の更なる利点及び態様は、以下の詳細な説明及び特許請求の範囲から明らかとなる。

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1A】クローンS42H9L5を使用したマウス異種移植片組織（S C C - T 9、H 2 9 3 - T 3、及びM C F - 7 モデル）のC4.4a免疫組織化学の結果を示す。D I S C O V E R Y X T プラットフォームプロトコール：S T D C C 1、室温（R T）で16分間の抗ヒトC4.4a抗体（1：400）、標準C h r o m o M a p D A B 検出。マウス異種移植片におけるC4.4Aの発現：S C C - T 9 - 強（+++）；H 2 9 3 - T 3 - 中（++）；M C F - 7 - 弱（+）；P C 3 - 負（-）。I H C 試験にクローンS42H9L5が使用される場合、マウス異種移植片S C C - T 9、H 2 9 3 - T 3、M C

10

20

30

40

50

F - 7、及びP C 3 ) の染色強度は、C 4 . 4 A の発現レベルに合致する。

【図1B】クローンS 2 0 H 1 L 1を用いるが図1Aと同様のマウス異種移植片組織 ( S C C - T 9 、 H 2 9 3 - T 3 、 及び M C F - 7 モデル ) の C 4 . 4 a 免疫組織化学の結果を示す。クローンS 2 0 H 1 L 1は、クローンS 4 2 H 9 L 5 よりも弱いC 4 . 4 aへの結合 ( マウス異種移植片における染色強度がより弱い ) を示す。

【図2A】クローンS 4 2 H 9 L 5 を使用した、様々なヒト組織 ( 扁平上皮癌、皮膚、頸部、及び食道 ) の C 4 . 4 a 免疫組織化学の結果を示す。ベンチマーク X T プラットフォームプロトコール : S T D C C 1 、 R T での抗ヒト C 4 . 4 a 抗体 ( 1 : 4 0 0 ) 、 u l t r a V i e w D a b D e t e c t i o n 。 強力な膜染色は、クローンS 4 2 H 9 L 5 が使用される場合、ヒト皮膚扁平上皮癌、皮膚、頸部、及び食道において見られない 10 。

【図2B】クローンS 2 0 H 1 L 1 を使用するが、図2Aと同様の様々なヒト組織 ( 扁平上皮癌、皮膚、頸部、及び食道 ) の C 4 . 4 a 免疫組織化学の結果を示す。クローンS 2 0 H 1 L 1 が使用される場合、ヒト皮膚扁平上皮癌、皮膚、頸部、及び食道において強力な膜染色がみられる。

#### 【発明を実施するための形態】

##### 【0018】

###### 用語

特に説明がない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語及び科学用語は、本開示が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるものと同一の意味を持つ。単数形の「ある ( a 、 a n ) 」及び「該 ( t h e ) 」は、文脈が明らかに他を示さない限りは複数の指示対象を含む。同様に、「又は ( o r ) 」という単語も、文脈が明らかに他を示さない限りは「及び」を含むことが意図される。「含む ( c o m p r i s i n g ) 」は「含む ( i n c l u d i n g ) 」を意味する。よって、「A又はBを含む ( c o m p r i s i n g A o r B ) 」は、「Aを含む ( i n c l u d i n g A ) 」か、又は「Bを含む ( i n c l u d i n g B ) 」か、又は「A及びBを含む ( i n c l u d i n g A a n d B ) 」を意味する。

##### 【0019】

本開示の実施態様の実施及び / 又は試験のための適切な方法並びに材料は後述する。このような方法及び材料は例示であり、限定することを意図するものではない。本明細書に記載のものと類似又は同等の他の方法及び材料も使用することができる。例えば、本開示に関する技術分野でよく知られている従来の方法は、様々な一般的な参考文献及びより詳細な参考文献、例えばSambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3d ed., Cold Spring Harbor Press, 2001; Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates, 1992 (and Supplements to 2000); Ausubel et al., Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, 4th ed., Wiley & Sons, 1999; Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990; 及び Harlow and Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999に記載されており、これらの開示は、参照によりそれらの全文が本明細書に援用される。 30 40

##### 【0020】

本明細書で言及するすべての刊行物、特許出願、特許、及び他の参考文献は、参照によりその全体がすべての目的のために援用される。対立が生じた場合には、用語の説明を含む本明細書が支配する。

##### 【0021】

本明細書に記載のものと類似又は同等の方法及び材料は、本開示の技術を実施又は試験するのに使用されうるが、適切な方法及び材料を下記に記載する。材料、方法、及び例は、単なる例示であって、限定を意図するものではない。

## 【0022】

本開示の様々な実施態様の検討を容易にするために、以下の特定の用語の説明が提供される。

## 【0023】

抗体：少なくとも軽鎖又は重鎖免疫グロブリン可変領域を含み、抗原のエピトープ（H E R 2 タンパク質又はE R タンパク質等）を特異的に結合するポリペプチド。抗体は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、又は抗体の断片を含む。抗体は、検出可能な標識、例えば酵素、ハプテン、又はフルオロフォアと結合され、そうでなければ標識されうる。

## 【0024】

バッファー：バッファー溶液は、生物学又は化学系のための正しいp H レベルを維持するのに一般的に使用される。本明細書で開示される多くの例示的な実施態様は、バッファー溶液の使用を含む。バッファーに存在してもよい代表的なバッファー剤又は塩は、トリス、トリシン、HEPES、MOPS、TAPS、ビシン、TAPSO、TES、PIPES、カコジル酸塩、SSC、MES、KCl、NaCl、酢酸カリウム、NH4 - アセテート、カリウム グルタメート、NH4Cl、硫酸アンモニウム、MgCl2、酢酸マグネシウム等を含むが、これらに限定されない。一般的に使用されるバッファー溶液の一つは、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）である。別の一般的に使用されるバッファー溶液は、ビオチンリガーゼ反応バッファー（0.1M KCl、5.5mM MgCl2、50mM トリス・HC1（pH = 8.0）、0.05% Brij-35、0.1mM デチオスレイトール（DTT）、3mM ATP、及び60μM ビオチン）である。バッファー剤の量は、約5から150mM、例えば約10から100mM、例えば約20から50mM等の範囲であってもよいが、バッファー薬剤はこれらの範囲に限定されない。いくつかの実施態様において、バッファー剤は、（例えば室温で）約5.0から約9.5、例えば6.0から8.0、例えば6.5から7.5等の範囲のp Hを提供するのを助ける。バッファー媒体に存在してもよいその他薬剤は、キレート剤、例えばEDTA、EGTA等を含む。

## 【0025】

接触させること：二つ以上の部分の結合を可能にする配置、特に、例えば固体及び/又は液体の両形態での直接的物理的結合（例えば、スライドに付着させた生体試料などの生体試料が本明細書に開示の組成物を含む溶液などの組成物と接触するような配置）。

## 【0026】

検出可能な標識：試料中の標的（例えばタンパク質又は核酸）の存在及び/又は量を示すシグナル（可視的、電気的、又はその他シグナル）を生成しうる分子又は材料。特異的な結合分子（例えば抗体又は核酸プローブ）にコンジュゲートすると、検出可能な標識は、特異的な結合分子が向かう標的の位置を突き止め、且つ/又は定量化するのに使用されうる。検出可能な標識は、直接又は間接的に検出することができ、複数の異なる検出可能な標識は、組み合わせて又は複数の標識を検出するのに使用されうる。例えば、ある標的に特異的な抗体にコンジュゲートした第一の検出可能な標識、例えばハプテンは、第一の検出可能な標識に特異的に結合する分子にコンジュゲートしている第二の検出可能な標識の使用によって、間接的に検出されうる。加えて、個別に検出されうる複数の検出可能な標識は、異なる標的に特異的に結合する異なる特異的な結合分子にコンジュゲートされ得、单一試料中の複数の標的の検出を提供できる多重アッセイを提供することができる。

## 【0027】

検出可能な標識は、発色、蛍光、リン光、及び/又は発光性分子、（例えば、無色の物質を着色物質に変換するか又はその逆によって、あるいは沈殿物を生成するか又は試料の濁度を上昇させることによって）一の物質を別の物質に変換して検出可能なシグナルを提供する触媒（例えば酵素）、追加の検出可能な標識化抗体コンジュゲートを使用し、抗体-ハプテン結合相互作用によって検出できるハプテン、並びに常磁性及び磁気性分子又は物質を含む。検出可能な標識の特定の例は、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アル

10

20

30

40

50

カリホスファターゼ、酸性ホスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、B - ガラクトシダーゼ又はB - グルクロニダーゼ等の酵素、フルオレセイン、発光団、クマリン、BODI PY染料、レゾルフィン、及びローダミン等のフルオロフォア（蛍光分子の多くの追加例は、The Handbook - A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, Molecular Probes, Eugene, ORにおいて見出すことができる）、量子ドット等のナノ粒子（それぞれ参照により本明細書に全文が援用される米国特許第6815064号、同第6682596号及び同第6649138号）；金属キレート、例えばGd<sup>3+</sup>のような放射性又は常磁性金属イオンのDOTA及びDPTAキレート、並びにリポソーム、例えば捕捉された蛍光分子を含有するリポソームを含む。検出可能な標識が酵素を含む場合、色原体等の検出可能な基質、蛍光性化合物又は発光性化合物を該酵素と組み合わせて使用し、検出可能なシグナルを生成する（多種多様な該化合物は、例えばLife Technologies, Carlsbad, CAから市販されている）。

#### 【0028】

あるいは、酵素を金属組織学的検出スキームにおいて使用することができる。いくつかの例において、金属組織検出法は、水溶性金属イオン及び酵素のレドックス不活性な基質と組み合わせて、アルカリホスファターゼなどの酵素を使用することを含む。該基質は、酵素によりレドックス活性剤に変換され、該レドックス活性剤は金属イオンを還元し、それにより検出可能な沈殿物が形成される（例えば、参照により全文が本明細書に援用される米国特許第7642064号；同第7632652を参照のこと）その他の例において、金属組織検出法は、やはり検出可能な沈殿物を形成するために、水溶性金属イオン、酸化剤、及び還元剤と併せてオキシドレダクターゼ酵素を使用することも含む（例えば、参照によりその全文が本明細書に援用される米国特許第6670113号を参照のこと）。ハプテンは、抗体により結合されうる小分子である。例示的なハプテンは、ジニトロフェニル（DNP）、ビオチン、ジゴキシゲニン（DIG）、及びフルオレセインを含む。追加のハプテンは、オキサゾール、ピラゾール、チアゾール、ニトロアリール、ベンゾフラン、トリペルペン（tripерпe））、尿素、チオウレア、ロテノイド、クマリン及びシクロリグナンハプテン、例えば、参照によりその全文が本明細書に援用される米国特許第7695929号に記載されるものを含む。

#### 【0029】

ハプテン：ハプテンは、抗体と特異的に結合できるが、典型的には担体分子との組み合いでなければ免疫原性となることが実質的に不可能な分子、典型的には小分子である。多くのハプテンはよく知られており、分析手順、例えばジニトロフェニル、ビオチン、ジゴキシゲニン、フルオレセイン、ローダミン、又はそれらの組合せに頻繁に使用される。複数の異なるハプテンは、ポリマー担体と結合してもよい。更に、化合物、例えばハプテンは、リンカー、例えばNHS - PEGリンカーを使用して別の分子に結合されうる。

#### 【0030】

免疫複合体：抗体の可溶型抗原への結合は免疫複合体を形成する。免疫複合体の形成は、当業者に知られる従来の方法、例えば、免疫組織化学、免疫沈降法、フローサイトメトリー、免疫蛍光顕微鏡使用法、ELISA、免疫プロット法（例えばウェスタンプロット）、次回共鳴画像法、CTスキャン、X線及びアフィニティクロマトグラフィーを通じて検出されうる。選択された抗体の免疫学的結合特性は、当該技術分野でよく知られる方法を使用して定量化されてもよい。

#### 【0031】

免疫組織化学（IHC）：抗原の特定の結合剤、例えば抗体との相互作用を検出することにより、試料中の抗原の存在又は分配を決定する方法。試料は、抗体 - 抗原結合を許可する条件下で抗体と接触する。抗体 - 抗原結合は、抗体とコンジュゲートされた検出可能な標識の手段により（直接検出）、又は、一次抗体と特異的に結合する二次抗体とコンジュゲートされた検出可能な標識の手段により（例えば間接検出）により検出されうる。

#### 【0032】

多重化、-ed、-ing：本発明の実施態様は、複数の異なるコンジュゲートを使用

10

20

30

40

50

して、試料中の複数の標的を実質的に同時に、又は連続的に、所望通りに検出することを可能にする。マルチプレックスは、核酸一般、DNA、RNA、ペプチド、タンパク質を個々にまたすべての組合せで同定及び／又は定量化することを含みうる。マルチプレックスはまた、その解剖学的文脈での細胞内のニ又はそれ以上の遺伝子、メッセンジャー、及びタンパク質を検出することも含みうる。

#### 【0033】

プローブ：検出可能な標識又はレポーター分子を検討した単離された核酸（例えば単離された合成オリゴヌクレオチド）。典型的な標識は、放射性同位体、酵素基質、補助因子、リガンド、化学発光又は蛍光性薬剤、ハプテン（DNAを含むがこれに限定されない）、及び酵素を含む。標識化及び様々な目的に適した標識の選択におけるガイダンスの方法は、例えばSambrook et al. (In Molecular Cloning: A Laboratory Manual, CSHL, New York, 1989)及びAusubel et al. (In Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publ. Assoc. and Wiley-Intersciences, 1992)に記載されており、これらの開示は参照によりその全文が本明細書に援用される。

#### 【0034】

プローブは、所望の特異性を提供するのに選択されてもよく、標的核酸の少なくとも15、20、25、30、35、40、45、50以上のヌクレオチドを含んでもよい。特定の例において、プローブは、標的核酸の少なくとも100、250、500、600、1000以上のヌクレオチドを含みうる。いくつかの例において、プローブは、標的核酸、例えばHER2ゲノム核酸の非隣接部分からのヌクレオチドのセグメントを含む。

#### 【0035】

試料：用語「試料」は、標的が存在し得る任意の液体、半固体又は固体物質（又は材料）を指す。特に、試料は、生物学的試料又は生体物質から得られた試料であり得る。例示的な生物学的試料は、組織試料及び／又は例えば動物対象、例えばヒト対象から得る細胞学的試料を含む。他の例において、生物学的試料は、生体液、例えば血液、血漿、血清、尿、胆汁、腹水、唾液、脳脊髄液、水性若しくは硝子様液、又はあらゆる体分泌、漏出液、滲出液（例えば、膿瘍又は感染若しくは炎症の他の部位より得られる液体）、又は関節（通常の関節若しくは疾患の影響を受ける関節）より得られる液体でありうる。生物学的試料はまた、あらゆる器官又は組織より得られる試料（生検又は剖検試料、例えば腫瘍生検を含む）でもあり、あるいは細胞（一次細胞又は培養細胞）又はあらゆる細胞、組織若しくは器官により左右される媒体を含むこともできる。

#### 【0036】

特異的結合：この用語は、定義された標的を優先的に結合する薬剤の結合（例えば、特定のタンパク質若しくは抗原に対する抗体又は特定の核酸配列に対する核酸プローブ）を指す。標的タンパク質に関して、「特異的に結合する」とは、抗体又は他のリガンドの特定のポリペプチドとの全体的又は部分的な優先的結合を指す。「特異的に結合する」とは、標的核酸について言及する場合、核酸プローブの特異的な核酸との全体的又は部分的な優先結合を指す。

#### 【0037】

特異的結合剤は、実質的に特定の標的のみに結合する。少量の非特異的相互作用は、特異的結合剤と非標的タンパク質又は核酸との間に生じてもよい。抗原特異的結合に対する抗体は、典型的に、非標的タンパク質と比較して、標的タンパク質に対する結合した抗体又は他のリガンドの量の2倍超、例えば5倍超、10倍超、又は100倍超の増加（単位時間当たり）をもたらす。イムノアッセイフォーマットは、特定のタンパク質と特異的に反応する抗体（例えばHER2タンパク質又はERタンパク質を特異的に結合する抗体）を選択するのに使用されうる。イムノアッセイフォーマット及び条件の記載については、Harlow & Lane, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publications, New York (1988)を参照のこと。

#### 【0038】

核酸プローブの標的核酸分子との特異的結合は、非標的核酸と比較して、典型的に、標

10

20

30

40

50

的核酸に対する結合した核酸プローブの量の2倍超、例えば5倍超、10倍超、又は100倍超の増加をもたらす。様々なISH条件は、特定の核酸配列を特異的に結合する核酸プローブ(例えばHER2特異的プローブ又は染色体17セントロメアプローブ)を選択するのに適している。

【0039】

対象：ヒト又は非ヒト哺乳動物(例えば獣医学的対象)等の任意の多細胞性脊椎生物。

【0040】

ここで、図1及び2に関して、本発明は、C4.4aを対象とする抗体、本明細書で開示される抗体を使用してC4.4aを検出する方法(例えば免疫組織化学)、及び本明細書で開示されるC4.4a抗体を使用してC4.4a関連がんを検出するための方法を特徴とする。本発明はまた、本発明で開示されるあらゆるペプチドをコードするあらゆるcDNA配列も含む。

10

【0041】

参照のために、C4.4aの配列を以下に示す(抗原UniProt番号O95274)(配列番号1)。

10	20	30	40	50	
MDPARKAGAQ	AMIWTAGWLL	LLLLRGGAQAA	LECYSCVQKA	DDGCSPNKM	
60	70	80	90	100	
TVKCAPGVDV	CTEAVGAVET	IHGQFSLAVR	GCGSGLPGKN	DRGLDLHG	20
110	120	130	140	150	
AFIQLQQCAQ	DRCNAKLNLT	SRALDPAGNE	SAYPPNGVEC	YSCVGLSREA	
160	170	180	190	200	
CQGTSPVVVS	CYNASDHVYK	GCFDGNVTLT	AANVTVSLPV	RGCVQDEFCT	
210	220	230	240	250	
RDGVTGPGFT	LSGSCCQGSR	CNSDLRNKTY	FSPRIPLVR	LPPPEPTTVA	
260	270	280	290	300	30
STTSVTTSTS	APVRPTSTTK	PMPAPTSQTP	RQGVEHEASR	DEEPRLTGGA	
310	320	330	340		
AGHQDRSN	QYPAKGGPQQ	PHNKGCVAPT	AGLAALLLAV	AAGVLL	

【0042】

免疫原

ニュージーランド白色ウサギを、完全フロイドアジュvantで乳化させた組換えタンパク質(以下のエピトープ配列及び説明を参照のこと)で免疫化し、これに不完全フロイントアジュvantで乳化させた一連の追加免疫用量の免疫原が続いた。

配列	説明
S 4 2 H 9 L 5	免疫原としてのアミノ酸 31-308 (配列番号 2、以下を参照のこと) シグナルペプチド (シグナルペプチドはアミノ酸 1-30 である) が免疫原として使用された後のドメイン u PAR 様ドメイン 1 (アミノ酸 31-116) (配列番号 3、以下を参照のこと) 及び u PAR 様ドメイン 2 (アミノ酸 139-224) (配列番号 4、以下を参照のこと) に関して組換えタンパク質を使用する ELISA 試験は、このクローンが u PAR 様ドメイン 2 (配列番号 4、以下を参照のこと) に結合することを示した。
S 2 0 H 1 L 1	免疫原としてのアミノ酸 31-308 (配列番号 2) シグナルペプチド (アミノ酸 1-30) 後のドメイン u PAR 様ドメイン 1 (アミノ酸 31-116) (配列番号 3、以下を参照のこと) 及び u PAR 様ドメイン 2 (アミノ酸 139-224) (配列番号 4、以下を参照のこと) に関して組換えタンパク質を使用する ELISA 試験は、このクローンが u PAR 様ドメイン 1 (配列番号 3、以下を参照のこと) に結合することを示した。

## 【0043】

上記のように使用される免疫原は、C 4 . 4 a : L E C Y S C V Q K A D D G C S P N  
K M K T V K C A P G V D V C T E A V G A V E T I H G Q F S L A V R G C G S G L P  
G K N D R G L D L H G L L A F I Q L Q Q C A Q D R C N A K L N L T S R A L D P A  
G N E S A Y P P N G V E C Y S C V G L S R E A C Q G T S P P V V S C Y N A S D H  
V Y K G C F D G N V T L T A A N V T V S L P V R G C V Q D E F C T R D G V T G P  
G F T L S G S C C Q G S R C N S D L R N K T Y F S P R I P P L V R L P P E P T  
T V A S T T S V T T S T S A P V R P T S T T K P M P A P T S Q T P R Q G V E H E  
A S R D E E P R L T G G A A G H Q D R S N (配列番号 2) のアミノ酸 31 - 308 に相当する。

## 【0044】

参考のため、u PAR 様ドメイン 1 は、アミノ酸 31 - 116 : L E C Y S C V Q K A  
D D G C S P N K M K T V K C A P G V D V C T E A V G A V E T I H G Q F S L A V R  
G C G S G L P G K N D R G L D L H G L L A F I Q L Q Q C A Q D R C N A K (配列番号 3)

に相当する。

## 【0045】

参考のため、u PAR 様ドメイン 2 は、アミノ酸 139 - 224 : E C Y S C V G L S  
R E A C Q G T S P P V V S C Y N A S D H V Y K G C F D G N V T L T A A N V T V S  
L P V R G C V Q D E F C T R D G V T G P G F T L S G S C C Q G S R C N S D (配列番号 4) に相当する。

## 【0046】

本発明は、本明細書で開示される免疫原配列に限定されない。例えば、いくつかの実施態様において、免疫原は、配列番号 2 の断片、例えば u PAR 様ドメイン 1 (配列番号 3) の全部若しくは一部、u PAR 様ドメイン 2 (配列番号 4) の全部若しくは一部等の断片を含む。断片は、任意の適切な長さ、例えば 270 - 277 アミノ酸、260 - 277 アミノ酸、250 - 277 アミノ酸、240 - 277 アミノ酸、230 - 277 アミノ酸、220 - 277 アミノ酸、210 - 277 アミノ酸、200 - 277 アミノ酸、190 - 277 アミノ酸、180 - 277 アミノ酸、170 - 277 アミノ酸、160 - 277 アミノ酸、150 - 277 アミノ酸、140 - 277 アミノ酸、130 - 277 アミノ酸、120 - 277 アミノ酸、110 - 277 アミノ酸、100 - 277 アミノ酸、90 - 277 アミノ酸、80 - 277 アミノ酸、70 - 277 アミノ酸、60 - 277 アミノ酸

10

20

30

40

50

、50-277アミノ酸、40-277アミノ酸等であってもよい。いくつかの実施態様において、免疫原は、配列番号2と少なくとも60%同一（例えば少なくとも65%同一、少なくとも70%同一、少なくとも75%同一、少なくとも80%同一、少なくとも85%同一、少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一等）である配列を含む。その他の免疫原ペプチド、例えば配列番号の断片の非制限的な例を以下に示す。

配列番号	アミノ酸長	免疫原配列
5	260	LECYSCVQKADDGCSPNKMKTVKCAPGVDVCT EAVGAVETIHGQFSLAVRGCGSGLPGKNDRGL DLHGLLAFIQLQQCAQDRCNAKLNLTSRALDP AGNESAYPPNGVECYSCVGLSREACQGTSPPV VSCYNASDHVYKGCFDGNVTLTAANVTVSLPV RGCVQDEFCTRDGVTGPGFTLSGSQGSRCN SDLRNKTYFSPRI PPLVRLPPPEPTTVASTTS VTTSTSAPVRPTSTTKPMPAPTSQTPRQGV EASR
6	250	CVQKADDGCSPNKMKTVKCAPGVDVCTEA VETIHGQFSLAVRGCGSGLPGKNDRGLDLHGL LAFIQLQQCAQDRCNAKLNLTSRALDPAGNES AYPPNGVECYSCVGLSREACQGTSPPV VSCYNASDHVYKGCFDGNVTLTAANVTVSLPV RGCVQDEFCTRDGVTGPGFTLSGSQGSRCN SDLRNKTYFSPRI PPLVRLPPPEPTTVASTTS SAPVRPTSTTKPMPAPTSQTPRQGV EASR
7	245	LECYSCVQKADDGCSPNKMKTVKCAPGVDVCT EAVGAVETIHGQFSLAVRGCGSGLPGKNDRGL DLHGLLAFIQLQQCAQDRCNAKLNLTSRALDP AGNESAYPPNGVECYSCVGLSREACQGTSPPV VSCYNASDHVYKGCFDGNVTLTAANVTVSLPV RGCVQDEFCTRDGVTGPGFTLSGSQGSRCN SDLRNKTYFSPRI PPLVRLPPPEPTTVASTTS VTTSTSAPVRPTSTTKPMPAP
8	200	LECYSCVQKADDGCSPNKMKTVKCAPGVDVCT EAVGAVETIHGQFSLAVRGCGSGLPGKNDRGL DLHGLLAFIQLQQCAQDRCNAKLNLTSRALDP AGNESAYPPNGVECYSCVGLSREACQGTSPPV VSCYNASDHVYKGCFDGNVTLTAANVTVSLPV RGCVQDEFCTRDGVTGPGFTLSGSQGSRCN SDLRNKTY
9	190	CVQKADDGCSPNKMKTVKCAPGVDVCTEA VETIHGQFSLAVRGCGSGLPGKNDRGLDLHGL LAFIQLQQCAQDRCNAKLNLTSRALDPAGNES AYPPNGVECYSCVGLSREACQGTSPPV VSCYNASDHVYKGCFDGNVTLTAANVTVSLPV RGCVQDEFCTRDGVTGPGFTLSGSQGSRCN SDLRNKTY
10	180	TVKCAPGVDVCTEAVGAVETIHGQFSLAVRG CGSGLPGKNDRGLDLHGLAFIQLQQCAQDRCN AKLNLTTSRALDPAGNESAYPPNGVECYSCVGL SREACQGTSPPV VSCYNASDHVYKGCFDGNVTLTAANVTVSLPV RGCVQDEFCTRDGVTGPGFTLSGSQGSRCN SDLRNKTY
11	165	TVKCAPGVDVCTEAVGAVETIHGQFSLAVRG CGSGLPGKNDRGLDLHGLAFIQLQQCAQDRCN

配列番号	アミノ酸長	免疫原配列
		AKLNLTSLALDPAGNESAYPPNGVECYSCVGL SREACQGTSPPVVSCYNASDHVYKGCFDGNVT LTAANVTVSLPVRGCVQDEFCTRDGVTGPGFT LSGSC
12	140	LECYSCVQKADDGCSPNKMKTVKCAPGVDVCT EAVGAVETIHGQFSLAVRGCGSGLPGKNDRGL DLHGLLAFIQLQQCAQDRCNAKLNLTSRALDP AGNESAYPPNGVECYSCVGLSREACQGTSPPV VSCYNASDHVYK
13	125	PNKMKTVKCAPGVDVCTEAVGAVETIHGQFSL AVRGCGSGLPGKNDRGLDLHGLLAIFIQLQQCA QDRCNAKLNLTSRALDPAGNESAYPPNGVECY SCVGLSREACQGTSPPVVSCYNASDHVYK
14	120	LECYSCVQKADDGCSPNKMKTVKCAPGVDVCT EAVGAVETIHGQFSLAVRGCGSGLPGKNDRGL DLHGLLAFIQLQQCAQDRCNAKLNLTSRALDP AGNESAYPPNGVECYSCVGLSREA
15	110	CTEAVGAVETIHGQFSLAVRGCGSGLPGKNDR GLDLHGLLAIFIQLQQCAQDRCNAKLNLTSRAL DPAGNESAYPPNGVECYSCVGLSREACQGTSP PVVSCYNASDHVYK
16	100	CVQKADDGCSPNKMKTVKCAPGVDVCTEAVGA VETIHGQFSLAVRGCGSGLPGKNDRGLDLHGL LAIFIQLQQCAQDRCNAKLNLTSRALDPAGNES AYPP

## 【0047】

本発明は、配列番号2、その断片、又は配列番号2と少なくとも60%の同一性を有する配列を含む免疫原に限定されない。例えば、いくつかの実施態様において、免疫原は、完全長C4.4aの断片(配列番号1)、例えばアミノ酸1-330、アミノ酸1-310、アミノ酸1-308、アミノ酸1-300、アミノ酸1-280、アミノ酸1-250、アミノ酸10-330、アミノ酸10-310、アミノ酸10-308、アミノ酸10-300、アミノ酸10-280、アミノ酸10-250、アミノ酸20-330、アミノ酸20-310、アミノ酸20-308、アミノ酸20-300、アミノ酸20-280、アミノ酸20-250、アミノ酸30-330、アミノ酸30-310、アミノ酸30-308、アミノ酸30-300、アミノ酸30-280、アミノ酸30-250等を含む。配列番号1の断片は、あらゆる適切な長さ、例えば330-345アミノ酸、300-345アミノ酸、280-345アミノ酸、250-345アミノ酸、200-345アミノ酸、150-345アミノ酸、100-345アミノ酸、50-345アミノ酸、30-345アミノ酸等であってもよい。いくつかの実施態様において、免疫原は、配列番号1と少なくとも60%同一、65%同一、70%同一、75%同一、80%同一、85%同一、90%同一、95%同一、98%同一、99%同一等の配列を含む。

## 【0048】

本発明のC4.4a抗体は、本明細書に記載される方法(例えば上を参照のこと)に従って得られてもよいが、C4.4a抗体は、そのような方法に限定されず、あらゆる他の適切な手段により作製されてもよい。

## 【0049】

## C4.4a抗体配列及び構成

先に説明したように、本発明はC4.4aを対象とする抗体、例えばモノクローナルC4.4a抗体を特徴とする。二のC4.4抗体クローン: S42H9L5及びS20H1L1(以下、それぞれ「S42」及び「S20」とも称する)の可変領域配列の非制限的な例を以下に示す。いくつかの実施態様において、本発明のC4.4a抗体は、以下の配

10

20

30

40

50

列(配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20)のうちの一又は複数を含む。

クローン	鎖	配列
S42H9L5	重 (配列番号17)	METGLRWLLLAVALKGVQCQSLEESGGLVVPDETTLTCTVSGFSLNTVAIS WVRQAPGKGLEWIGFIHPTVNTYYARWAKGRFTISRASSTVDLKVTSLTFED AATYFCVRGNAHYDIWGPGLTVSLGQPKAPSVPFLAPCCGDTPSSTVTLGC LVKGYLPEPVTVWNSGTLTNGVRTFPS
	軽 (配列番号18)	MDTRAPTAQLLGLLLWLPGARCAFELTQTPSLVSAAVGGTVTISCQSSQSVYS DNYLAWYQQKPGQRPKLLIYKASDLASGVPSRFKGSGSGTEFTLTISDLECAD AATYYCQSYYGVSSDSNAFGGGTEVVVKGDPVAPTVLIFPPSADLVATGTVTI VCVANKYFPDVTWTWEV
S20H1L1	重 (配列番号19)	METGLRWLLLAVALKGVQCQELEESGGGLVPGGTLTLTCTASGFSLISTYY ICWVRQAPGKGLEWIGCIPLSHSVWYANWVNGRFSISKTSSTTVTLKMASLT DADTATYFCGRGSSGWGVDSKLWGPGLTVSSGQPKAPSVPFLAPCCGDTPS STVTLGCLVKGYLPEPVTVWNSGTLTNGVRTFPS
	軽 (配列番号20)	MDTRAPTAQLLGLLLWLPGAPFAAVLTQTPSPVSASVGGTVTINCQSSPSVAS GYLSWFQQKPGQPKLLIYRASTLVSGVPSRFKGSGSGTHFTLTISDVQCDDA ATYYCAGAYSSRSDDTFGGGTEVVVKGDPVAPTVLIFPPAADQVATGTVTI VANKYFPDVTWTWEV

## 【0050】

参照のため、可変重鎖及び軽鎖配列のCDR及びFR領域は、以下でハイライトされる。  
。

## クローンS42重鎖

鎖	配列
シグナルペプチド (配列番号21)	METGLRWLLLAVALKGVQC
FR1 (配列番号22)	QSLEESGGLVVPDETTLTCTVSGFSLN
CDR1 (配列番号23)	TVAIS
FR2 (配列番号24)	WVRQAPGKGLEWIG
CDR2 (配列番号25)	FIHPTVNTYYARWAKG
FR3 (配列番号26)	RFTISRASSTVDLKVTSLTFEDAATYFCVR
CDR3 (配列番号27)	GNAHYDI
FR4 (配列番号28)	WGPGLTVSL

## クローンS 4 2 軽鎖

鎖	配列
シグナルペプチド (配列番号 2 9 )	MDTRAPTQLGLLLLWLPGARC
F R 1 (配列番号 3 0 )	AFELTQTPSLVSAAVGGTVTISC
C D R 1 (配列番号 3 1 )	QSSQSVYSDNYLA
F R 2 (配列番号 3 2 )	WYQQKPGQRPKLLIY
C D R 2 (配列番号 3 3 )	KASDLAS
F R 3 (配列番号 3 4 )	GVPSRFKGSGSGTEFTLTISDLECADAATYYC
C D R 3 (配列番号 3 5 )	QSYYGVSSDSNA
F R 4 (配列番号 3 6 )	FGGGTEVVVK

10

20

## クローンS 2 0 重鎖

鎖	配列
シグナルペプチド (配列番号 3 7 )	METGLRWLLLAVVLKGVQC
F R 1 (配列番号 3 8 )	QEQLLESGGGLVKPGGTLTLTCTASGFSLI
C D R 1 (配列番号 3 9 )	STYYIC
F R 2 (配列番号 4 0 )	WVRQAPGKGLEWIG
C D R 2 (配列番号 4 1 )	CIPLSHSVSWYANWVNG
F R 3 (配列番号 4 2 )	RFSISKTSSTVTLKMASLTDADTATYFCGR
C D R 3 (配列番号 4 3 )	GSSGKGVDLSK
F R 4 (配列番号 4 4 )	WGPGLTVVSS

30

40

## クローンS 20 軽鎖

鎖	配列
シグナルペプチド (配列番号45)	MDTRAPTQLLGLLLWLPGAPFA
F R 1 (配列番号46)	AVLTQTPSPVSASVGGTVTINC
C D R 1 (配列番号47)	QSSPSVASGYLS
F R 2 (配列番号48)	WFQQKPGQPPKLLIY
C D R 2 (配列番号49)	RASTLVS
F R 3 (配列番号50)	GVPSRFKGSGSGTHFTLTISDVQCDDAATYYC
C D R 3 (配列番号51)	AGAYSSRSDDT
F R 4 (配列番号52)	FGGGTEVVVK

## 【0051】

本発明の抗体は、上記の配列（例えば配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20）を含むと限定されない。例えば、いくつかの実施態様において、C4.4a抗体は、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、それらの断片、又は配列番号17、配列番号18、配列番号19、若しくは配列番号20と少なくとも60%同一（例えば少なくとも65%同一、少なくとも70%同一、少なくとも75%同一、少なくとも80%同一、少なくとも85%同一、少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一等）のペプチドを含む。いくつかの実施態様において、断片は、20-60アミノ酸、40-80アミノ酸、60-100アミノ酸、80-120アミノ酸、100-140アミノ酸、120-160アミノ酸、140-180アミノ酸、160-186アミノ酸、160-190アミノ酸、170-193アミノ酸等である。いくつかの実施態様において、C4.4a抗体は、配列番号17、配列番号18、配列番号19、若しくは配列番号20のうちの一の断片（例えば20-60アミノ酸、40-80アミノ酸、60-100アミノ酸、80-120アミノ酸、100-140アミノ酸、120-160アミノ酸、140-180アミノ酸、160-186アミノ酸、160-190アミノ酸、170-193アミノ酸等）と少なくとも60%同一（例えば少なくとも65%同一、少なくとも70%同一、少なくとも75%同一、少なくとも80%同一、少なくとも85%同一、少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一等）のペプチドを含む。

## 【0052】

いくつかの実施態様において、C4.4a抗体は、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、それらの断片（20-60アミノ酸、40-80アミノ酸、60-100アミノ酸、80-120アミノ酸、100-140アミノ酸、120-160アミノ酸、140-180アミノ酸、160-186アミノ酸、160-190アミノ酸、170-193アミノ酸等）、配列番号17、配列番号18、配列番号19、若しくは配列番号20と少なくとも60%同一（例えば少なくとも65%同一、少なくとも70%同一、少なくとも75%同一、少なくとも80%同一、少なくとも85%同一、少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一等）のペプチドを含む。

10

20

30

40

50

も 90 % 同一、少なくとも 95 % 同一、少なくとも 98 % 同一、少なくとも 99 % 同一等) であるペプチド、及び / 又は配列番号 17、配列番号 18、配列番号 19、若しくは配列番号 20 のうちの一の断片 (例えば 20 - 60 アミノ酸、40 - 80 アミノ酸、60 - 100 アミノ酸、80 - 120 アミノ酸、100 - 140 アミノ酸、120 - 160 アミノ酸、140 - 180 アミノ酸、160 - 186 アミノ酸、160 - 190 アミノ酸、170 - 193 アミノ酸等) と少なくとも 60 % 同一 (例えば少なくとも 65 % 同一、少なくとも 70 % 同一、少なくとも 75 % 同一、少なくとも 80 % 同一、少なくとも 85 % 同一、少なくとも 90 % 同一、少なくとも 95 % 同一、少なくとも 98 % 同一、少なくとも 99 % 同一等) であるペプチドのいずれかに由来する二以上 (例えば 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 等) のペプチドを含む組換えタンパク質を含んでもよい。例 10 えば、C4.4a 抗体は、それぞれ上のリスト (配列番号 17、配列番号 18、配列番号 19、配列番号 20、それらの断片 (20 - 60 アミノ酸、40 - 80 アミノ酸、60 - 100 アミノ酸、80 - 120 アミノ酸、100 - 140 アミノ酸、120 - 160 アミノ酸、140 - 180 アミノ酸、160 - 186 アミノ酸、160 - 190 アミノ酸、170 - 193 アミノ酸等)、配列番号 17、配列番号 18、配列番号 19、若しくは配列番号 20 と少なくとも 60 % 同一 (例えば少なくとも 65 % 同一、少なくとも 70 % 同一、少なくとも 75 % 同一、少なくとも 80 % 同一、少なくとも 85 % 同一、少なくとも 90 % 同一、少なくとも 95 % 同一、少なくとも 98 % 同一、少なくとも 99 % 同一等) であるペプチド、及び又は配列番号 17、配列番号 18、配列番号 19、若しくは配列番号 20 のうちの一の断片 (例えば 20 - 60 アミノ酸、40 - 80 アミノ酸、60 - 100 アミノ酸、80 - 120 アミノ酸、100 - 140 アミノ酸、120 - 160 アミノ酸、140 - 180 アミノ酸、160 - 186 アミノ酸、160 - 190 アミノ酸、170 - 193 アミノ酸等) と少なくとも 60 % 同一 (例えば少なくとも 65 % 同一、少なくとも 70 % 同一、少なくとも 75 % 同一、少なくとも 80 % 同一、少なくとも 85 % 同一、少なくとも 90 % 同一、少なくとも 95 % 同一、少なくとも 98 % 同一、少なくとも 99 % 同一等) であるペプチド) より選択される第一のペプチド切片及び第二のペプチド切片を含んでもよい。いくつかの実施態様において、第一のペプチド切片と第二のペプチド切片は近接する。いくつかの実施態様において、第一のペプチド切片と第二のペプチド切片は、一又は複数の追加のアミノ酸 (例えばリンカー) により分離される。一例として、C4.4a 抗体は、配列番号 17 のアミノ酸 1 - 110 に相当する第一のペプチド切片と、配 30 列番号 18 のアミノ酸 20 - 140 に相当する、場合によってはリンカー (例えばリンカー、例えば 1 のアミノ酸、2 のアミノ酸、3 のアミノ酸、4 のアミノ酸、5 のアミノ酸、6 のアミノ酸、8 - 10 のアミノ酸、10 - 20 のアミノ酸、20 超のアミノ酸等を有するリンカー) によって分離される別のペプチド切片を含んでもよい。また、いくつかの実施態様において、前記第一のペプチド切片は、前記第二のペプチド切片の下流であってもよい。

### 【0053】

配列番号 17、配列番号 18、配列番号 19、又は配列番号 20 と少なくとも 60 % 同一である配列の非制限的な例を以下に示す。本発明は、これらの配列又は元の配列と比較して以下の配列において変化する特定のアミノ酸に決して限定されない。注記: 「X」はあらゆる適切なアミノ酸置換を指す。 40

配列番号	説明	配列(注記:Xはあらゆる適切なアミノ酸置換を指す。)
6 1	配列番号17と少なくとも90%同一の配列	MXTGLRWLLLXVLGVQCQSLEXSGGRLXXPDETLXLTCTVSGFSLNTVAISXVRQXPGKGLEWIGFIHPTVNTYYARWXKGRTISRASSTTVXLKVTSLTFEDAA
6 2	配列番号18と少なくとも80%同一の配列	TYFCVRGNXHYDIWXPGLTVSXGQPKAPSVFPLXPCCXDTPSSTVTLXCLVXXYLPEPVTVWNSXTLTNGVRTFPSMXTRAPTXQXLGLLXLWXPXARCXFELTQTPLSLSXAVGXTVTIS
6 3	配列番号19と少なくとも95%同一の配列	SCQSXQSVYXNYLAXYQQKPKXQRPKXLIYKXSXLSXXPSRFKXSGSXTXFTLTISDLECADAXTYXCQSYYGVSXDSNAFXGGTEVXKGDPVXPTVLIFPXSXXLVTGTVXIVCVXNKYFPDVTVXWXXMETGLRWLLLXVLGVQCQEXLEXSGGLVKPGGLTLTCTASXFSLISTYYICWVRQAPGKGLEWIGCIPLSHSVWYXNWVNGRFSISKTSSTXVTLKMASLTDA
6 4	配列番号20と少なくとも70%同一の配列	DTATYFCXRGSSGWGVDSKLWGPGLTVXSGQPKAPSVFPLXPCCGDTPSSTVTLGCLVKGYLPEPVTVWNSGTLTNGVRTFPSMXTRAXTQLLGLXXXWLPXAPXAAXLTQTXSPVXAXVXXTVXINXQSSPVASGYLSXFQKPKXQPPXLIYRXXTLXSGXPSRFKGXXSGTHFTLTISDVQXXXXATYYXXXXYSSRXDXTXGXXTEVXXKGDPXXPTXLIFPPAXDQVATGXVTIXCVAXKYFPXVXTWXX

## 【0054】

先述の通り、本発明は、本明細書で開示されるあらゆるペプチドをコードするcDNA、即ち前述の抗体配列のいずれか(又は本発明によるあらゆる抗体配列)をコードするcDNAを含む。

## 【0055】

## エピトープ領域

C4.4a抗体は、C4.4aの特定の配列又は領域、即ちC4.4aエピトープを特異的に結合する。抗体が結合しうるエピトープを含有する配列又は領域の非制限的な例は、uPAR様ドメイン1(例えば配列番号3、配列番号53)、uPAR様ドメイン2(例えば配列番号4、配列番号57)、それらの断片(例えば5-10アミノ酸、10-20アミノ酸、10-30アミノ酸、10-40アミノ酸、20-40アミノ酸、20-50アミノ酸、30-50アミノ酸、30-60アミノ酸、30-70アミノ酸、40-70アミノ酸、40-80アミノ酸、50-80アミノ酸、50-90アミノ酸、60-90アミノ酸、50-100アミノ酸、60-100アミノ酸等)、uPAR様ドメイン1(例えば配列番号3、配列番号53)又はuPAR様ドメイン2(例えば配列番号4、配列番号57)と少なくとも60%同一(例えば少なくとも65%同一、少なくとも70%同一、少なくとも75%同一、少なくとも80%同一、少なくとも85%同一、少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一等)であるペプチド、uPAR様ドメイン1又はuPAR様ドメイン2の断片と少なくとも60%同一であるペプチド等を含む。uPAR様ドメイン1は、C4.4aのアミノ酸31-116に限定されない。例えば、いくつかの実施態様において、uPAR様ドメイン1は、C4.4aのアミノ酸33-126(配列番号53)、アミノ酸32-116、アミノ酸31-126、アミノ酸31-125、アミノ酸31-124、アミノ酸31-123、アミノ酸31-122、アミノ酸31-121、アミノ酸31-120、アミノ酸31-119、アミノ酸31-118、アミノ酸31-118、アミノ酸31-117、アミノ酸31-115、アミノ酸31-114、アミノ酸31-113、アミノ酸31-112、アミノ酸31-111、アミノ酸31-110、アミノ酸32-110、アミノ酸32-112、アミノ酸32-114、アミノ酸32-118、アミノ酸32-119、アミノ酸32-120、アミノ酸33-128、アミノ酸31-127、アミノ酸34-119、アミノ酸36-122等を含む。uPAR様ドメイン2は、C4.4aのアミノ酸139-224に限定されない。例えば、いくつかの実施態様において、uPAR様ドメイン2は、C4.4aのアミノ酸140-222(配列番号53)、アミノ酸139-215、アミノ酸139-216、アミノ酸139-217、アミノ酸139-218

、アミノ酸 139-219、アミノ酸 139-220、アミノ酸 139-222、アミノ酸 139-223、アミノ酸 139-225、アミノ酸 139-226、アミノ酸 139-227、アミノ酸 138-215、アミノ酸 138-216、アミノ酸 138-217、アミノ酸 138-218、アミノ酸 138-219、アミノ酸 138-220、アミノ酸 138-222、アミノ酸 138-223、アミノ酸 138-225、アミノ酸 138-226、アミノ酸 138-227、アミノ酸 140-215、アミノ酸 140-216、アミノ酸 140-217、アミノ酸 140-218、アミノ酸 140-219、アミノ酸 140-220、アミノ酸 140-223、アミノ酸 140-224、アミノ酸 140-225、アミノ酸 140-226、アミノ酸 140-227 等を含む。

## 【0056】

10

更に、エピトープは uPAR 様ドメイン内の領域に限定されない。いくつかの実施態様において、uPAR 様ドメインの周りのアミノ酸はエピトープの一部であってもよい。

## 【0057】

C4.4a 抗体が結合してもよいエピトープを含有する領域の非制限的な例を以下に示す。

配列番号	アミノ酸長	エピトープ配列
3	8 6	LECYSCVKADDGCSPNKMKTVKCAPGVDVCTEAVGAVETIHGQFSLAVRGCG SGLPGKNDRGLDLHGLLAFIQLQQCAQDRCNAK (C4.4a のアミノ酸 31-116)
5 3	9 4	CYSCVQKADDGCSPNKMKTVKCAPGVDVCTEAVGAVETIHGQFSLAVRGCGSG LPGKNDRGLDLHGLLAFIQLQQCAQDRCNAKLNLTSLALDP (C4.4a のアミノ酸 33-126)
5 4	5 5	PNKMKTVKCAPGVDVCTEAVGAVETIHGQFSLAVRGCGSGLPGKNDRGLDLHG LL (C4.4a のアミノ酸 46-100)
5 5	4 7	KTVKCAPGVDVCTEAVGAVETIHGQFSLAVRGCGSGLPGKNDRGLDL (C4.4a のアミノ酸 50-96)
5 6	9 7	YSCVQKADDGCSPNKMKTVKCAPGVDVCTEAVGAVETIHGQFSLAVRGCGSGL PGKNDRGLDLHGLLAFIQLQQCAQDRCNAKLNLTSLALDPAGNE (C4.4a のアミノ酸 34-130)
4	8 6	ECYSCVGLSREACQGTSPVVSCYNASDHVYKGFCDGNVTLTAANVTSLPVR GCVQDEFCTRDTGVTGPGFTLGSGCCQGSRCNSD (C4.4a のアミノ酸 139-224)
5 7	8 3	CYSCVGLSREACQGTSPVVSCYNASDHVYKGFCDGNVTLTAANVTSLPVRG CVQDEFCTRDTGVTGPGFTLGSGCCQGSRCN (C4.4a のアミノ酸 140-222)
5 8	8 4	ECYSCVGLSREACQGTSPVVSCYNASDHVYKGFCDGNVTLTAANVTSLPVR GCVQDEFCTRDTGVTGPGFTLGSGCCQGSRCN (C4.4a のアミノ酸 139-222)
5 9	7 1	CYSCVGLSREACQGTSPVVSCYNASDHVYKGFCDGNVTLTAANVTSLPVRG CVQDEFCTRDTGVTGPGFT (C4.4a のアミノ酸 140-210)
6 0	7 3	LSREACQGTSPVVSCYNASDHVYKGFCDGNVTLTAANVTSLPVRGCVQDEF CTRDTGVTGPGFTLGSGCCQG (C4.4a のアミノ酸 146-218)

20

30

40

## 【0058】

いくつかの実施態様において、エピトープを含有する領域は、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5 3、配列番号 5 4、配列番号 5 5、配列番号 5 6、配列番号 5 7、配列番号 5 8、配列番号 5 9、配列番号 6 0、それらの断片（例えば 5-10 アミノ酸、10-20 アミノ酸、10-30 アミノ酸、10-40 アミノ酸、20-40 アミノ酸、20-50 アミノ酸、30-50 アミノ酸、30-60 アミノ酸、30-70 アミノ酸、40-70 アミノ酸、40-80 アミノ酸、50-80 アミノ酸、50-85 アミノ酸、60-85 アミノ酸等）、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5 3、配列番号 5 4、配列番号 5 5

50

、配列番号 5 6 、配列番号 5 7 、配列番号 5 8 、配列番号 5 9 、若しくは配列番号 6 0 と少なくとも 6 0 % 同一（例えば少なくとも 6 5 % 同一、少なくとも 7 0 % 同一、少なくとも 7 5 % 同一、少なくとも 8 0 % 同一、少なくとも 8 5 % 同一、少なくとも 9 0 % 同一、少なくとも 9 5 % 同一、少なくとも 9 8 % 同一、少なくとも 9 9 % 同一等）であるペプチド、配列番号 3 、配列番号 4 、配列番号 5 3 、配列番号 5 4 、配列番号 5 5 、配列番号 5 6 、配列番号 5 7 、配列番号 5 8 、配列番号 5 9 、若しくは配列番号 6 0 の断片（例えば 5 - 1 0 アミノ酸、1 0 - 2 0 アミノ酸、1 0 - 3 0 アミノ酸、1 0 - 4 0 アミノ酸、2 0 - 4 0 アミノ酸、2 0 - 5 0 アミノ酸、3 0 - 5 0 アミノ酸、3 0 - 6 0 アミノ酸、3 0 - 7 0 アミノ酸、4 0 - 7 0 アミノ酸、4 0 - 8 0 アミノ酸、5 0 - 8 0 アミノ酸、5 0 - 8 5 アミノ酸、6 0 - 8 5 アミノ酸等）と少なくとも 6 0 % 同一（例えば少なくとも 6 5 % 同一、少なくとも 7 0 % 同一、少なくとも 7 5 % 同一、少なくとも 8 0 % 同一、少なくとも 8 5 % 同一、少なくとも 9 0 % 同一、少なくとも 9 5 % 同一、少なくとも 9 8 % 同一、少なくとも 9 9 % 同一等）であるペプチド、又はそれらの組合せを含む。  
10

## 【 0 0 5 9 】

いくつかの実施態様において、抗体は、C 4 . 4 a グリコシル化部位、例えばアミノ酸 1 1 8 、1 6 3 、1 7 6 、1 8 3 、若しくは 3 2 6 を含み、且つ／又はエピトープはそれを含む。

## 【 0 0 6 0 】

本発明は、クローン S 4 2 及びクローン S 2 0 に限定されない。本発明はまた、C 4 . 4 a 抗体（例えばモノクローナル抗体）又は C 4 . 4 a 結合断片であって、クローン S 4 2 H 9 L 5 及びクローン S 2 0 H 1 L 1 から成る群より選択される抗体と同一のエピトープ特異性を有する C 4 . 4 a 抗体又は結合断片も特徴とする。例えば、C 4 . 4 a 抗体は S 4 2 及び／又は S 2 0 とは異なる配列を有してもよいが、C 4 . 4 a 抗体は、S 4 2 及び／又は S 2 0 のエピトープと同一又は類似する特異性を有してもよい。  
20

## 【 0 0 6 1 】

先述の通り、本明細書で開示される C 4 . 4 a 抗体は、C 4 . 4 a タンパク質（例えば、先述のような免疫原）又は関連するペプチドで宿主を免疫化することにより生成されてもよい。宿主は、マウス、ラット、ウサギを含んでもよいが、これらに限定されない。いくつかの実施態様において、宿主モデルは、マウスモデル、ラットモデル、ウサギモデル（例えばニュージーランド白色ウサギ）、ロバ、ヒツジであるが、これらの例に限定されない。いくつかの実施態様において、組換え C 4 . 4 a 抗体は、宿主細胞発現系を使用することにより生成されてもよい。宿主細胞発現系の例は、H E K 2 9 3 細胞又はそれらの誘導体、哺乳動物細胞（例えば C H O 、H E L A 、S P 2 0 等）、昆虫細胞、酵母（例えば P . パストリス）、植物細胞（例えばタバコ）、原核生物系（例えば大腸菌）等を含むがこれらに限定されない。本発明は、本明細書で開示される発現系に限定されない。  
30

## 【 0 0 6 2 】

本発明はまた、標識化組織試料（ホルマリン固定パラフィン包埋試料）であって、本発明による C 4 . 4 a 抗体で標識された組織試料も特徴とする。試料は本発明による方法によって得てもよい。

## 【 0 0 6 3 】

本発明はまた、例えば C 4 . 4 a 抗体が免疫組織化学に適合しているホルマリン固定パラフィン包埋試料での使用のための、本発明による C 4 . 4 a 抗体を含むキット、例えば免疫組織化学のためのキットも特徴とする。I H C のためのキットは当業者には周知である。いくつかの実施態様において、キットは、C 4 . 4 a 抗体を可視化するための検出系（例えば、発色系、蛍光系、その他適切な系）を含む。いくつかの実施態様において、キットは、他の適切な試薬、例えば C 4 . 4 a 抗体を対象とする二次抗体、バッファー等を含んでもよい。  
40

## 【 0 0 6 4 】

いくつかの実施態様において、抗体は、免疫組織化学（I H C ）分析における使用に適合している。いくつかの実施態様において、抗体は、I H C 分析以外の分析、例えばウェ  
50

スタンプロット又はその他抗体関連用途における使用に適合している。

【0065】

先述の通り、本発明はまた、本明細書で開示される抗体を使用してC4.4aを検出する方法、及び本明細書で開示される抗体を使用してC4.4a関連がんを検出するための方法を特徴とする。

【0066】

本発明はまた、C4.4aを検出する方法（例えば、自動化法、手作業用による方法）も特徴とする。いくつかの実施態様において、方法は、試料、試料を本発明によるC4.4a抗体を接触させること、及び（例えば、検出系、例えば発色系、蛍光系、他の適切な系を介して）抗体を可視化することを提供する。抗体の検出は、C4.4aの存在を示してもよい。

10

【0067】

本発明はまた、C4.4a関連腫瘍（例えば肺腫瘍、頸部腫瘍、皮膚癌、食道腫瘍）を診断する方法も特徴とする。方法は、本発明の方法によるC4.4aの検出を含んでもよい。C4.4aの検出は、C4.4a関連腫瘍を示してもよい。

【0068】

本発明はまた、本発明による方法がプログラムされた染色機械も特徴とする。例えば、染色機械は、自動化免疫組織化学法を実行するための構成要素を含む。染色機械は、本発明の方法が実行されることを可能にするプログラムを含んでもよい。本発明はまた、C4.4aを検出するための閉鎖系、例えば本発明による方法の実行に適合した閉鎖自動化系も特徴とする。

20

【0069】

コンピュータは、典型的には周知の構成要素、例えばプロセッサ、操作システム、システムメモリ、メモリ貯蔵装置、入力出力制御装置、入力出力装置、及びディスプレイ装置を含む。また、コンピュータには多くの可能な構成及び構成要素があってもよく、それらはキャッシュメモリ、データバックアップ装置、及びその他多くの装置を含んでもよいとも、当業者に理解される。入力装置の例は、キーボード、カーソル制御装置（例えばマウス）、マイク、スキャナ等を含む。出力装置の例は、ディスプレイ装置（例えばモニタ又はプロジェクタ）、スピーカー、プリンタ、ネットワークカード等を含む。ディスプレイ装置は、視覚的情報を提供するディスプレイ装置を含んでもよく、この情報は、ピクセルのアレイとして論理的に及び/又は物理的に組織されてもよい。入力および出力インターフェイスを提供するための様々な周知の又は将来のソフトウェアプログラムのいずれかを含んでもよいインターフェイス制御装置もまた含まれてもよい。例えば、インターフェイスは、ユーザに一又は複数のグラフ表示を提供する、一般的に「グラフィカルユーザインターフェイス」と称される（しばしばGUIと称される）ものを含んでもよい。インターフェイスは、典型的には、選択の手段又は当業者に周知の入力を使用して、ユーザ入力を受け入れることが可能である。インターフェイスはタッチスクリーニング装置であってもよい。同一の又は異なる実施態様において、コンピュータのアプリケーションは、「コマンドラインインターフェイス」と称される（しばしばCLIと称される）ものを含むインターフェイスを利用してよい。CLIは典型的にはアプリケーションとユーザとの間の相互作用に基づくテキストを提供する。典型的には、コマンドラインインターフェイスは、ディスプレイ装置を通したテキストのラインとして、出力を提示し、入力を受信する。例えば、いくつかの実装は、「シェル」と称されるもの、例えば当業者に知られているUnix Shell又はMicrosoft.NETフレームワークのようなオブジェクト指向型プログラミングアーキテクチャを利用するMicrosoft Windows Powershellを含んでもよい。

30

【0070】

当業者は、インターフェイスが一又は複数のGUI、CLI又はそれらの組合せを含んでもよいことを認識する。プロセッサは、市販されているプロセッサ、例えばIntel Corporationにより製造されるCeleron、Core、若しくはPen

40

50

t i u m プロセッサ、 Sun Microsystems により製造される S P A R C プロセッサ、 AMD 社により製造される A t h l o n 、 S e m p r o n 、 P h e n o m 、若しくは O p t e r o n プロセッサを含んでもよく、又は、市販されている又はこれから市販される他のプロセッサのうちの一つであってもよい。プロセッサのいくつかの実施態様は、マルチコアプロセッサと称されるものを含んでもよく、且つ / 又は単一若しくはマルチコア構成における並列処理技術を利用することが可能であってもよい。例えば、マルチコアアーキテクチャは、典型的には二以上のプロセッサ「実行コア」を含む。本例において、各実行コアは、複数スレッドの並列実行を可能にする独立したプロセッサとして実行し得る。加えて、プロセッサは、一般的に 32 若しくは 64 ビットアーキテクチャと称されるもの、又は現在周知の若しくは将来的に開発されうる他のアーキテクチャ構成において構成されうることを、当業者は認識する。 10

#### 【 0 0 7 1 】

プロセッサは、典型的には、例えば Microsoft Corporation の W i n d o w s 型オペレーティングシステム； A p p l e C o m p u t e r 社の M a c O S X オペレーティングシステム；多くのベンダー若しくはオープンソースと称されるところにより市販されている U n i x 若しくは L i n u x 型オペレーティングシステム；別の又は将来的なオペレーティングシステム；又はそれらのいくつかの組合せであってもよいオペレーティングシステムを実行する。オペレーティングシステムは、周知の方法でファームウェア及びハードウェアとインターフェイスし、プロセッサが様々なプログラム言語で書かれうる様々なコンピュータプログラムの機能を調整し実行することを容易にする。オペレーティングシステムは、典型的にはプロセッサと連携して、コンピュータの他の構成要素の機能を調整し、実行する。オペレーティングシステムはまた、すべて周知の技術に従って、スケジューリング、入力 - 出力コントロール、ファイル及びデータ管理、並びに通信制御並びに関連サービスも提供する。 20

#### 【 0 0 7 2 】

システムメモリは、所望の情報を記憶するのに使用され、コンピュータによりアクセスされうる様々な周知の又は将来のメモリ記憶装置のうちのいずれかであってもよい。コンピュータ読み取り可能メモリ媒体は情報、例えばコンピュータ読み取り可能命令、データ構造、プログラムモジュール、又は他のデータの記憶のためのあらゆる方法又は技術に実装される、揮発性及び非揮発性、着脱式及び非着脱式媒体を含んでもよい。例としては、一般的に市販されているランダムアクセスメモリ ( R A M ) 、読み取り専用メモリ ( R O M ) 、電気的消却・プログラム可能型読み取り専用メモリ ( E E P R O M ) 、デジタル多用途ディスク ( D V D ) 、磁気媒体、例えば常駐ハードディスク若しくはテープ、光学媒体、例えば読み取り及び書き込みコンパクトディスク、又は他のメモリ記憶装置を含む。メモリ記憶装置は、コンパクトディスクドライブ、テープドライブ、着脱式ハードディスクドライブ、 U S B 若しくはフラッシュドライブ、又はディスクケットドライブを含む、様々な周知の若しくは将来の装置のいずれかを含んでもよい。そのようなタイプのメモリ記憶装置は、典型的には、プログラム記憶媒体、例えば、それぞれコンパクトディスク、磁気テープ、着脱式ハードディスク、 U S B 若しくはフラッシュドライブ、又はフロッピーディスクケットから読み取り、且つ / 又はそれに書き込む。これらのプログラム記憶媒体又は現在使用されている若しくはのちに開発されうるその他のうちのいずれかは、コンピュータプログラム製品と考えられうる。理解されるように、これらのプログラム記憶媒体は、典型的には、コンピュータソフトウェアプログラム及び / 又はデータを記憶する。コンピュータ制御論理とも呼ばれるコンピュータソフトウェアプログラムは、システムメモリ及び / 又はメモリ記憶装置と共に使用されるプログラム記憶装置に記憶される。いくつかの実施態様において、コンピュータ使用可能媒体の中に記憶される制御論理（プログラムコードを含むコンピュータソフトウェアプログラム）を有するコンピュータ使用可能媒体を含むコンピュータプログラム製品が記載される。制御論理は、プロセッサによって実行されると、プロセッサに本明細書で説明される機能を実行させる。その他の実施態様において、いくつかの機能は、例えばハードウェアステートマシンを使用してハードウェアにおいて主に実装さ 30 40 50

れる。本明細書に記載される機能を実行するためのハードウェアステートマシンの実装は、当業者には明らかとなる。入力 - 出力制御装置は、人間又は機械でもよく、ローカル又はリモートでもよいユーザからの情報を受け入れ、処理するための様々な既知の装置のいずれかを含むことがある。そのような装置は、例えばモデムカード、ワイヤレスカード、ネットワークインターフェイスカード、サウンドカード、又は様々な周知の入力装置のいずれかのための又は他の種類の制御装置を含む。出力制御装置は、人間又は機械でもよく、ローカル又はリモートでもよいユーザへ情報を提示するための様々な既知のディスプレイ装置のいずれかを含むことがある。現在記載されている実施態様において、コンピュータの機能要素は、システムバスを介して互いに通信する。コンピュータのいくつかの実施形態は、ネットワーク又は他のタイプの遠隔通信を使用していくつかの機能要素と通信することができる。当業者であれば明らかであるように、ソフトウェアで実施される場合、機器制御及び / 又はデータ処理アプリケーションは、システムメモリ及び / 又はメモリ記憶装置にロードされ、それから実行されてもよい。機器制御及び / 又はデータ処理アプリケーションの全部又は一部はまた、読み専用メモリ又はメモリ記憶装置の同様の装置に属してもよく、そのような機器は、機器制御及び / 又はデータ処理アプリケーションが入力 - 出力制御装置を通じて初めてロードされることを必要としない。機器制御及び / 又はデータ処理アプリケーション、又はその一部は、プロセッサにより、周知の方法で、実行に有利であるように、システムメモリ、又はキャッシュメモリ、又は両方にロードされうることが、当業者により理解される。また、コンピュータは、一又は複数のライブラリファイル、実験データファイル、及びシステムメモリに記憶されるインターネットクライアントを含む。例えば、実験データは、一又は複数の実験若しくは分析に関連するデータ、例えば検出されたシグナル値、あるいは一又は複数の合成による配列 (SBS) 実験又は処理に関連するその他の値を含むことがある。加えて、インターネットクライアントは、ネットワークを使用してリモートサービスの別のコンピュータへのアクセスを可能にするアプリケーションを含んでもよく、例えば一般的に「ウェブブラウザ」と称されるものを含んでもよい。本例において、いくつかの一般的に利用されるウェブブラウザは、Microsoft Corporationにより利用可能なMicrosoft Internet Explorer、Mozilla社のMozilla Firefox、Apple Computer社のSafari、Google社のGoogle Chrome、又は当該技術分野で現在知られている若しくは将来開発される他のタイプのウェブブラウザを含む。また、同じ又は他の実施態様において、インターネットクライアントは、ネットワークを介してリモート情報へのアクセスを可能にする特殊ソフトウェアアプリケーション、例えば生物学的応用のためのデータ処理アプリケーションを含み、又はその要素であります。  
10  
20  
30  
30

### 【0073】

ネットワークは、当業者に周知の様々な種類のネットワークの一又は複数を含んでもよい。例えば、ネットワークは、通信に適した一般的にTCP / IPプロトコルと称されるものを利用してもよいローカル又は広範囲ネットワークを含んでもよい。ネットワークは、一般的にインターネットと称される相互接続コンピュータネットワークの世界的なシステムを含むネットワークを含んでもよく、あるいは様々なインターネットアーキテクチャを含むこともある。ネットワーク化された環境のユーザは、ハードウェア及び / 又はソフトウェアシステムへの及びそれらからの情報トラフィックを制御するために、一般的に「ファイアウォール」と称される（時にはパケットフィルタ、又はボーダープロテクションデバイスとも称される）ものを利用することを好むことを、当業者は認識する。例えば、ファイアウォールは、ハードウェア又はソフトウェア要素又はそれらのいくつかの組合せを含んでもよく、典型的には、ユーザ、例えばネットワーク管理者等により整備されるセキュリティポリシーを強化するように設計されている。  
40

### 【実施例】

### 【0074】

以下の実施例は、本発明の方法、組成物及びシステムを使用した実験の非制限的な実施

例を記載する。

【0075】

実施例1：

マウス異種移植片のIHCプロトコール：DISCOVERY XTプラットフォームを使用して、マウス異種移植片組織(SCC-T9-強；H293-T3-中；MCF-7-弱；PC3-負)にDISCOVERY XTプロトコールを使用した。簡潔には、抗原回復のためにStd CC1細胞コンディショニングを選択し、抗体希釈剤(カタログ番号251-018、Ventana)中で抗C4.4a抗体クローンSP246(S42H9L5クローン)を1:400(3μg/ml)で希釈し、一次抗体を室温で16分間インキュベートし、標準ChromomMap DAB検出を選択する。最終的に、発色基質(DAB)を使用して標的抗原を検出し、1分間のヘマトキシリン対比染色がそれに続く。図1A、図1Bを参照。

【0076】

実施例2：

ヒト組織のIHCプロトコール：Benchmark Ultraプラットフォーム(Ventana Medical System)を使用して、標準ultraview Universal DAB Detection Kitプロトコールをヒト組織(皮膚、皮膚扁平上皮癌、頸部、及び食道)に使用する。簡潔には、抗原回復のためにStd CC1細胞コンディショニングを選択し、抗体希釈剤(カタログ番号251-018、Ventana)中で抗C4.4a抗体クローンSP245(S20H1L1クローン)を1:400(3μg/ml)で希釈し、一次抗体を室温で16分間インキュベートし、標準ultraview Universal DAB Detectionプロトコールを選択する。最終的に、DABを使用して標的抗原を検出し、1分間のヘマトキシリン対比染色がそれに続く。図2A、図2Bを参照。

【0077】

本明細書において使用される用語「約」は、参考数の±10%を指す。

【0078】

略語「aa」は「アミノ酸」を意味する。

【0079】

以下の文献の開示内容の全体が参考により本明細書に援用される：国際公開第2014183119号；米国特許公開第20120295803号；同第20130066055号；国際公開第2011158883号；米国特許公開第20120321619号；EP1220919。

【0080】

本明細書に記載されるもの以外に、上記説明から当業者には本発明の種々の修正例が明らかである。このような修正例も、特許請求の範囲に含まれることが意図される。本明細書に引用される各参照文献は、内容の全体が参考により本明細書に援用される。

【0081】

本発明の好ましい実施態様が示され、記載されているが、当業者には、それらに添付の特許請求の範囲を超えない修正がなされてもよいことが容易に明らかである。したがって、本発明の範囲は、以下の特許請求の範囲によってのみ限定される。特許請求の範囲で列挙される参照番号は、例示的且つ特許事務所のレビューを容易にするためだけのものであり、決して限定的ではない。いくつかの実施態様において、この特許出願に提示される図は、角度、寸法比等を含め、縮尺通りに描かれている。いくつかの実施態様において、図は代表的であるのみであり、特許請求の範囲は図の寸法により制限されない。いくつかの実施態様において、語句「含む」を使用する本明細書に記載される発明の説明は、「から成る」として記載することのできる実施態様を含み、したがって、用語「から成る」を使用する本発明の一つは複数の実施態様を主張するためのそのような書面の説明要件が満たされる。

【0082】

10

20

30

40

50

以下の特許請求の範囲で列挙される参照番号は、本特許出願の精査を容易にするためのみのもので例示的であり、本発明の範囲を図面中の対応する参照番号を有する特定の特徴に限定するものと決して意図されていない。

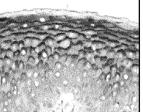
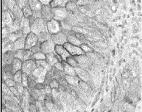
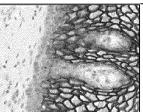
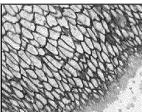
【図 1 A】

	SCC-T9 異種移植片 (+++ Ctr)	H293-T3 (++ Ctr)
S42H9L5		
	MCF-7 異種移植片 (+ Ctr)	PC3(- Ctr)
S42H9L5		

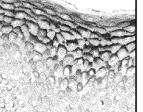
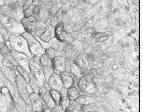
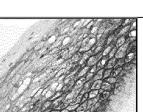
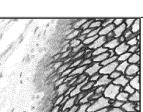
【図 1 B】

	SCC-T9 異種移植片 (+++ Ctr)	H293-T3 (++ Ctr)
S20H1L1		
	MCF-7 異種移植片 (+ Ctr)	PC3(- Ctr)
S20H1L1		

【図2A】

	皮膚	皮膚扁平上皮細胞癌
S42H9L5		
	頭部	食道
S42H9L5		

【図2B】

	皮膚	皮膚扁平上皮細胞癌
S20H1L1		
	頭部	食道
S20H1L1		

【配列表】

0006720208000001.app

---

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
G 0 1 N 33/574 (2006.01) G 0 1 N 33/574 A  
G 0 1 N 33/574 D

(72)発明者 リヤオ, チミン  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94550, リバモア, メディナ ストリート 175  
(72)発明者 チュー, イーフェイ  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 95131, サンノゼ, マックスウェル ウェイ 14  
08

審査官 松本 淳

(56)参考文献 国際公開第2011/158883 (WO, A1)  
特表2013-513369 (JP, A)  
国際公開第2013/183786 (WO, A1)  
SCHNEIDER C. et al, Abstract 2836: Development of a companion diagnostic IHC assay for  
the biomarker-driven selection of C4.4a positive patients, Cancer Research, 2014  
年, 74(19 Suppl), Abstract nr 2836  
HANSEN, L.V. et al, STRUCTURAL ANALYSIS AND TISSUE LOCALIZATION OF HUMAN C4.4A: A PROT  
EIN HOMOLOGUE OF THE UROKINASE RECEPTOR, BIOCHEMICAL JOURNAL, 英国, 2004年 6月1  
5日, VOL.380, pp.845 - 857, U R L, <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20031478>

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0  
C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0  
C 1 2 N 1 / 0 0 - 7 / 0 8  
C 1 2 P 1 / 0 0 - 4 1 / 0 0  
G 0 1 N 3 3 / 0 0 - 3 3 / 9 8  
C A p l u s / M E D L I N E / B I O S I S / E M B A S E / R E G I S T E R / W P I D S  
(S T N)  
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 )