

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-526916

(P2017-526916A)

(43) 公表日 平成29年9月14日 (2017.9.14)

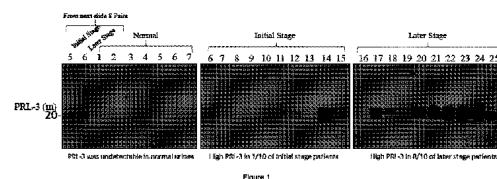
(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/574 A	4 B 0 6 3
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	4 C 0 8 5
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 2 1	4 H 0 4 5
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	
C 0 7 K 16/32 (2006.01)	C 0 7 K 16/32	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 62 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2017-507713 (P2017-507713)	(71) 出願人	503231882
(86) (22) 出願日	平成27年8月13日 (2015.8.13)		エージェンシー フォー サイエンス, テ
(85) 翻訳文提出日	平成29年4月6日 (2017.4.6)		クノロジー アンド リサーチ
(86) 国際出願番号	PCT/SG2015/050259		シンガポール国, 1 3 8 6 3 2 シンガポ
(87) 国際公開番号	W02016/024918		ール, フージョノポリス ウェイ 1, コ
(87) 国際公開日	平成28年2月18日 (2016.2.18)		ネクシス ノース タワー #20-10
(31) 優先権主張番号	10201404895X	(74) 代理人	100140109
(32) 優先日	平成26年8月13日 (2014.8.13)		弁理士 小野 新次郎
(33) 優先権主張国	シンガポール (SG)	(74) 代理人	100118902
			弁理士 山本 修
		(74) 代理人	100106208
			弁理士 宮前 徹
		(74) 代理人	100120112
			弁理士 中西 基晴
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 癌の診断

(57) 【要約】

本明細書に提供するデータは、腫瘍または癌の細胞内で見られるバイオマーカーがまた、患者尿内でもまた適切なレベルで存在し、検出が可能でありうることを示す。診断、患者選択および治療の方法を、キットおよびデバイスとともに提供する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

患者が癌を有するか否かを決定する方法であって、患者由来の体液試料において癌タンパク質の存在または非存在を決定する工程を含み、試料中の癌タンパク質の存在が、患者が癌を有する指標である、前記方法。

【請求項 2】

癌タンパク質が細胞内タンパク質、例えば P R L 3、P R L 1、V H Z、c - m y c、H - r a s、A K T - 1、p 5 3、R a c 1、F A K、R u n x 1、エストロゲン受容体 (E R)、P T E N、b - アクチンまたは G A P D H、好ましくは P R L 3 である、請求項 1 の方法。

10

【請求項 3】

患者由来の体液試料が尿試料である、請求項 1 の方法。

【請求項 4】

癌タンパク質が細胞外癌タンパク質、例えば H e r 2、N - カドヘリン、P D G F 受容体 (アルファ)、F L T - 3 または p - E G F R である、請求項 1 の方法。

【請求項 5】

試料中の癌タンパク質レベルを定量化する工程をさらに含む、先行する請求項のいずれか一項の方法。

【請求項 6】

癌が初期または早期の癌である、先行する請求項のいずれか一項の方法。

20

【請求項 7】

癌が膀胱癌、肺癌、乳癌、胃癌、鼻咽頭癌または前立腺癌より選択される、先行する請求項のいずれか一項の方法。

【請求項 8】

癌タンパク質が可溶性癌タンパク質である、先行する請求項のいずれか一項の方法。

【請求項 9】

患者が癌を有するか否かを決定する方法であって、患者由来の体液試料から得たエクソソームを含有する試料において、癌タンパク質の存在または非存在を決定する工程を含み、試料はエクソソームに関して濃縮され、そして／または実質的にエクソソームのみを含有し、好ましくは試料が尿であるかまたは尿に由来する、前記方法。

30

【請求項 10】

癌タンパク質が試料中のエクソソーム内に存在する、先行する請求項のいずれか一項の方法。

【請求項 11】

抗癌療法に関して患者を選択する方法であって、患者由来の体液試料において、または体液から得られる試料において、癌タンパク質の存在を検出し、そして存在すると決定された癌タンパク質に基づいて治療を選択する工程を含み、体液が好ましくは尿である、前記方法。

【請求項 12】

1 またはそれより多い抗・癌タンパク質抗体を含む、側方流動デバイス。

40

【請求項 13】

体液試料における癌タンパク質を検出するためのキットであって、場合によって請求項 12 の側方流動デバイスを含む、前記キット。

【請求項 14】

患者において膀胱癌を診断する方法であって、患者由来の尿試料からエクソソームを単離し、そしてエクソソーム中の癌タンパク質の存在を決定する工程を含み、エクソソーム中の癌タンパク質の存在が、患者が膀胱癌を有する指標である、前記方法。

【請求項 15】

患者において癌の治療に使用するための抗癌療法抗体であって、患者が、患者由来の体液試料において癌タンパク質の存在を決定する工程を含む方法によって、治療に関して選

50

択されている、前記療法抗体。

【請求項 16】

癌タンパク質が P R L 3 である、先行する請求項のいずれか一項記載の方法、キットまたは側方流動デバイス。

【請求項 17】

請求項 1 ～ 10 のいずれか一項記載の方法によって選択される患者を治療する工程を含む、治療法。

【請求項 18】

患者に抗癌療法を投与する工程を含む、請求項 17 記載の治療法。

【請求項 19】

抗癌療法が抗体療法である、請求項 11、15 または 18 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 20】

抗体療法が抗 P R L 3 抗体療法である、請求項 19 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、細胞生物学、分子生物学および生化学の分野に関する。本発明はまた、医学の分野にも関する。特に、本発明は、疾患、特に癌の診断に関する。

【背景技術】

【0002】

癌は、過去 20 年間、徹底した研究の対象であった。しかし、癌転移に関与する根底にある原因はほとんど理解されず、そして大部分のタイプの癌予防はいまだに限定されている。

【0003】

抗体に基づく療法は、癌治療に有効であることが証明されている；が、このアプローチは伝統的に、癌細胞によって発現される細胞外タンパク質または分泌タンパク質に限定されてきた。したがって、多くの潜在的な癌または腫瘍マーカーおよび癌抗原が文献において同定されてきており、そして抗体療法がこれらのうちのいくつかに対して開発されてきている。

【0004】

例えば、周知の癌療法、ハーセプチン（トラスツズマブ）は、H E R 2 陽性癌細胞を殺すことが可能なモノクローナル抗体である。ハーセプチンは、癌細胞上の H E R 2 （ヒト上皮増殖因子受容体 2）抗原に結合する。同様に、ベバシズマブ（アバスチン^{T M}）は、新規血管形成に関与する増殖因子の 1 つである血管内皮増殖因子（V E G F）に対してターゲティングされたモノクローナル抗体である。血管形成を阻害することによって、ベバシズマブは、腫瘍が生存するために必要な酸素および栄養を受け取るために、血液の一定の供給を腫瘍細胞が受け入れることを妨げる。

【0005】

しかし、異なる癌に対する抗体療法剤の適用可能性は普遍的ではない。抗体療法剤の一般的な使用を妨げてきた限界の 1 つは、抗体分子のサイズが大きく、そしてその結果、形質膜または細胞膜を横断不能であることである。修飾しない場合、抗体（モノクローナル抗体を含む）は、一般的に、宿主細胞の表面または外部に位置する癌抗原をターゲティングするために適しているのみである。上の例において、H E R 2 受容体は細胞表面上に位置し、そしてしたがって、ハーセプチンによる抗体結合に対してアクセス可能である。同様に、V E G F は血流に分泌され、そしてベバシズマブによって結合可能である。

【0006】

大部分の発癌タンパク質は細胞内タンパク質（例えば細胞内ホスファターゼ、細胞内キナーゼ、転写因子等）であり、そして抗体療法のアプローチによっては十分には探究されないままであった。抗体は細胞膜に浸透するには大きすぎるという見方が長い間なされてきており、このことが細胞内タンパク質をターゲティングする際に抗体療法技術が用いら

10

20

30

40

50

れるのを妨げてきた。

【0007】

本発明者らは、以前、3つの異なる抗体が、それぞれ、3つの細胞内タンパク質：癌関連ホスファターゼであるPRL-3（肝再生ホスファターゼ3）；一般的なレポーターであるEGFP（増進緑色蛍光タンパク質）；およびポリオーマウイルス・ミドルT癌タンパク質であるmT（ポリオーマウイルス・ミドルT）をターゲティングしうることを示した（WO2011/065923）。PRL-3細胞内ホスファターゼ（酵素）のみがヒト癌転移と関連づけられており（Sahara, Science 294; 1343 (2001) およびWangら, Cancer cell 18; 52-63 (2010) を参照されたい）、その他の2つの細胞内タンパク質（EGFPおよびミドルT）は、抗体が細胞内タンパク質をターゲティング可能であるという一般的な現象を解明するために用いられた。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】WO2011/065923

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】Sahara, Science 294; 1343 (2001)

【非特許文献2】Wangら, Cancer cell 18; 52-63 (2010)

20

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者らは、正常な制御のものに比較して、癌患者の尿試料または尿エクソソームにおいて、いくつかの癌タンパク質が優先的に存在することを見出した。本研究において、本発明者らは、いくつかの細胞内および細胞外タンパク質：PRL-3、PRL-1、VHZ、myc、ras、アクチン、GAPDH、p53、N-カドヘリン、Her2、EGFR、FLT、エストロゲン受容体、PDGF、PDGF-αを試験した。ウェスタンブロットで分析を行った。数百の癌尿試料を調べ、これらには膀胱癌、肺癌、リンパ腫、前立腺癌、乳癌、胃癌、鼻咽頭癌および上咽頭癌（NPC）が含まれ、そしてこれらを対照正常尿試料と比較した。尿中のこれらの癌タンパク質のレベルは、癌病期、例えば膀胱癌の初期およびより後期の病期と関連する。これらの発見によって、多様な免疫学的アッセイを用いて尿癌タンパク質の存在を決定することによる、単純な癌試験が提供される。本発明者らのデータは、体液（血液、尿、唾液等）内を長距離移動するエクソソームを通じて、細胞内癌タンパク質が慣用的でなく分泌されうること示す。本明細書に開示するのは、診断、癌病期決定、癌療法、および抗癌療法の監視のために癌タンパク質の存在を検出するための尿試験である。

30

【0011】

本明細書で提供するデータは、驚くべきことに、腫瘍または癌の細胞内で見出されるバイオマーカーが、患者尿内に、検出を可能にするために適したレベルで存在しうることを示す。さらに、本発明者らは、驚くべきことに、癌発展の非常に初期の段階で、尿中で特定の癌タンパク質が検出可能であることを見出した。検出および診断を可能にするために十分な量の癌タンパク質が、これらの初期段階で、腫瘍から遠く離れた患者尿中に存在することは驚くべきことである。

40

【0012】

本発明者らは、多数のタイプのヒト癌尿の62%において、そしてPRL3+腫瘍所持マウス由来の癌尿の100%において、分泌PRL3癌タンパク質を見出した（しかしPRL3-腫瘍所持マウスでは見出されなかった）。尿PRL3レベルは、抗PRL3抗体での有効な治療の後に有意に減少した。尿PRL3は、したがって、癌における抗PRL

50

3 抗体療法の療法反応を監視するための新規診断および代理バイオマーカーとして提唱される。

【0013】

尿などの体液試料の使用は、癌がアクセス不能である場合には特に好適でありうる。

本発明は、個体が癌を有するか否か決定するための方法であって、個体由来の体液試料における癌タンパク質の存在または非存在を決定する工程を含む、前記方法を提供する。癌タンパク質の存在は、個体が癌を有する指標でありうる。いくつかの場合において、癌タンパク質の量を定量化する。試料中に存在する癌タンパク質の量は、個体が癌を有する指標でありうる。例えば、より高いレベルの癌タンパク質は、癌の存在の指標でありうる。癌タンパク質の量は、癌の病期、例えば初期、中期または後期の指標でありうる。該方法は、エクソソーム癌タンパク質の検出を含みうる。すなわち、エクソソーム内のまたはエクソソームに付着した、体液内の癌タンパク質の検出である。

10

【0014】

本明細書に開示する方法を用いて、療法治療に対する患者の反応を監視することも可能である。例えば、尿中の癌タンパク質の存在またはレベルを、療法治療を投与する前および後に決定することも可能である。療法治療は、化学療法、放射線療法または他の療法治療であることも可能である。癌タンパク質のレベルの減少は、療法が抗癌効果を有することの指標でありうる。

【0015】

本明細書に開示する方法を用いて、抗癌療法で治療する患者を選択するか、またはこうした治療に適した患者を決定することも可能である。いくつかの場合、本明細書開示の方法は、本明細書開示の方法による治療に適していると決定された患者の治療に関する。こうした方法において使用するための剤もまた開示される。

20

【0016】

本発明の方法で有用な体液試料には、尿、唾液、血液または血漿、あるいは母乳を含む任意の他の体液が含まれる。好ましくは、体液は尿である。

癌タンパク質は試料中のエクソソームに存在することも可能であるし、または可溶性であることも可能である。該方法は、試料からのエクソソームの単離、およびエクソソーム中の癌タンパク質の存在または非存在の決定を含むことも可能である。該方法は、個体から単離した試料に比較して、エクソソームを濃縮する工程を含むことも可能である。エクソソームを溶解するかまたは破裂させるなど、エクソソーム内容物を放出させるように、エクソソーム試料を処理してもよいしまたは処理しなくてもよい。体液試料からあらかじめ単離されたエクソソーム試料に対して、該方法を実行してもよい。特に、試料中のエクソソームにおける癌タンパク質の存在は、患者が膀胱癌を有することの指標でありうる。いくつかの場合、癌タンパク質は可溶性であり、例えば可溶性PRL3である。可溶性癌タンパク質は試料中のエクソソームに会合していなくても、またはエクソソーム中に存在していなくてもよい。

30

【0017】

癌タンパク質の存在または非存在は、イムノアッセイ、例えばELISAまたはウェスタンブロットに基づく方法を含むことも可能である。該方法は、抗体またはアプタマーの使用を含むことも可能である。抗体は、癌タンパク質に特異的に結合可能な任意の抗体であることも可能である。抗体は、モノクローナルまたはポリクローナルであることも可能であり、ヒト、ウサギまたはマウス抗体であることも可能であり、あるいは任意の適切な哺乳動物由来であってもよく、あるいは細胞培養において産生されてもよい。抗体はヒト化またはキメラであることも可能である。抗体は、Liら(Clin. Canc. Res. (2005) 11:2195-204)に論じられるような抗体223または318であることも可能である。抗体は、通常、細胞内、例えば形質膜、細胞質または核内に提示される癌タンパク質の領域に結合可能である。いくつかの場合、抗体は、癌タンパク質の細胞外部分、例えば細胞表面上に通常提示される癌タンパク質の部分に結合しない。

40

【0018】

50

本明細書開示の方法において有用な癌タンパク質は、非癌組織に比較した際、癌において上方制御されるかまたは過剰発現される。いくつかの場合、癌タンパク質は、非癌組織で発現されるタンパク質に比較した際、突然変異を所持する。本明細書に論じるような癌タンパク質は細胞内または細胞外であることも可能である。つまり、その発現は、実質的に細胞内、例えば核、細胞質中、または細胞膜の内側、または実質的に細胞の外側、例えば細胞表面上である。好ましくは、癌タンパク質は細胞内癌タンパク質である。

【0019】

本明細書記載の好ましい方法において、癌タンパク質は、PRL3、PRL1、VHZ、c-myc、Her2、AKT1、p53、Rac1、FAK、Runx1、エストロゲン受容体(ER)、PTEN、b-アクチンまたはGAPDHより選択される。p53は突然変異体p53であることも可能である。例えば、p53タンパク質は、72位のアルギニン残基の代わりにプロリン残基を有することも可能である。好ましくは、癌タンパク質はPRL3、PRL1またはVHZである。いくつかの場合、癌タンパク質は、非癌組織に見られる形に比較して突然変異しているGAPDHまたはb-アクチンの形である。いくつかの場合、1より多い癌タンパク質の存在または非存在を決定する。癌タンパク質は、Her2、N-カドヘリン、PDGF受容体(アルファ)、FLT3またはp-EGFRであることも可能である。

【0020】

本明細書開示の方法によって検出可能な癌には、胃癌、膀胱癌、肺癌、乳癌、胃癌、鼻咽頭癌、前立腺癌(例えば前立腺腺癌または前立腺肥大、特に前立腺肥大)が含まれる。癌は、試料供給源から離れている可能性もある。癌は、アクセスする、例えば試料採取するかまたは生検することが困難であり、そして/または観血性であるものである可能性もある。

【0021】

いくつかの場合、該方法は、試料中の癌タンパク質レベルが、癌を持たない個体から得られる試料のレベルよりも高いかまたは低いか決定する工程を含む。いくつかの場合、非癌個体に比較してより高いレベルの癌タンパク質は、個体が癌を有する指標である。いくつかの場合、発現レベルは、癌の病期の指標である。高レベルの発現は、個体が後期の、または進行した癌を有することの指標でありうる。

【0022】

個体は、好ましくはヒト個体であり、そして検出する癌タンパク質は、好ましくはヒト癌タンパク質である。

いくつかの場合、癌タンパク質は、Her2、N-カドヘリン、PDGF受容体(アルファ)、FLT3またはp-EGFRではない。いくつかの場合、癌は膀胱癌ではない。

【0023】

いくつかの場合、本発明の方法は、個体における癌の病期を決定する工程を含む。すなわち、試料中の特定の癌タンパク質の存在または非存在は、癌が、初期、中期、または後期であることの指標でありうる。特定の癌タンパク質の存在または非存在は、癌が転移性であるかまたは転移性になるであろうことの指標でありうる。いくつかの場合、癌タンパク質の量は、癌の病期の指標である。

【0024】

該方法は、個体由来の試料中のバイオマーカーのレベルを、非癌個体に関して得た試料中のバイオマーカーのレベルに比較する比較工程を含むことも可能である。レベルを、非癌個体由来の試料(例えば対照試料)に直接比較してもよいし、あるいは1またはそれより多い参照値のデータベースと比較してもよい。

【0025】

当該技術分野に知られる任意の適切な方法によって、個体から体液試料を得ることも可能である。試料は、本明細書開示の方法を開始する前に得られていてもよいし、またはその方法の一部として得られてもよい。体液は、その中にエクソソームが存在する液である

10

20

30

40

50

ことも可能である。該方法は、可溶性癌タンパク質などの、試料中の癌タンパク質の検出を含むことも可能である。該方法は、試料からのエクソソームの単離、または試料内のエクソソームの濃縮、およびエクソソーム中の癌タンパク質の検出を含むことも可能である。

【0026】

試料由来のエクソソームを単離するための方法が当該技術分野に知られる。例えば、EXOQUICK-TCTM プロセスは、エクソソームを含有する固形沈殿物を形成するために遠心分離する前に、試料を沈殿溶液中でインキュベーションする、商業的に入手可能な技術である。エクソソームを単離するかまたは濃縮するための他の方法には、超遠心が含まれる。

10

【0027】

エクソソームは細胞由来小胞である。これらは30～100nmの直径を有しうる。これらは膜結合性であり、そして形質膜から放出される。エクソソームは、miRNAおよびタンパク質を含む、多様な分子構成要素を含有する。エクソソームへの臨床的関心は増加してきており、特に、診断、予後診断および療法における使用に関心が持たれる。エクソソームは、尿、血液、血清、唾液および母乳を含む多様な生物学的液体中に同定されてきている。

【0028】

本発明の方法によって単離されるエクソソームは、癌タンパク質検出前に破裂させることも可能である。本明細書開示の方法は、さらに、エクソソームマーカー、例えばCD63、あるいはエクソソームに特徴的である他のタンパク質またはRNA配列の検出を含むことも可能である。

20

【0029】

本明細書にやはり開示するのは、試料中の癌タンパク質の存在または非存在を決定するためのキットである。キットは、癌タンパク質に特異的な抗体を含むことも可能である。

本明細書にやはり提供するのは、抗・癌タンパク質抗体が結合している固体支持体である。該固体支持体は、したがって、試料中の癌タンパク質に結合するために適しており、したがって、癌タンパク質を試料から分配し、そして検出することも可能である。

【0030】

やはり本明細書に開示するのは、試料中のターゲットの存在または非存在を検出するための、側方流動試験、または側方流動免疫クロマトグラフィアッセイ（「側方流動試験」）である。試験は、家庭での試験、ポイントオブケア試験または実験室使用のために適している可能性もある。側方流動試験は、1またはそれより多い抗・癌タンパク質抗体を含有することも可能である。

30

【0031】

キットには、癌タンパク質を検出するため、そして／または支持体に結合した癌タンパク質を洗浄するため、そして／または結合した癌タンパク質を検出するため、生物学的液体を調製するための1またはそれより多い溶液が含まれていることも可能である。キットには、側方流動試験が含まれていることも可能である。

【0032】

試料中のタンパク質の検出に適した任意の方法を、本明細書記載の方法で用いることも可能である。該方法は、癌タンパク質の存在または非存在の検出を含むことも可能である。該方法は、癌タンパク質の発現レベルの定量化を含むことも可能である。

40

【0033】

いくつかの場合、癌タンパク質のレベルは、癌の病期の指標である。したがって、特定の癌タンパク質の高レベルの発現は、癌がより進行した病期、例えば後期の癌であることの指標でありうる。いくつかの場合、癌タンパク質の存在は、後期の癌であることの指標でありうる。

【0034】

本明細書で有用な方法には、ウェスタンブロットまたはドットブロットが含まれる。こ

50

うした方法は、試料を、抗体、または癌タンパク質に特異的に結合可能な他の剤に曝露することによる、特定の癌タンパク質の検出を含む。

【0035】

特に好ましい方法は、酵素連結免疫吸着アッセイ（ELISA）、例えばサンドイッチELISAを含む。ELISAは、捕捉剤を使用して、表面に癌タンパク質を特異的に結合させることを含み、そして検出剤を適用して、結合した癌タンパク質を検出する。典型的には、捕捉剤および検出剤は抗体である。検出剤は、レポーター、好ましくは酵素に連結可能である。次いで、基質を表面に適用して、そして検出剤と基質の反応を通じて、結合した癌タンパク質を検出する。

【0036】

いくつかの場合、生物学的液体、または生物学的液体から得たエクソソーム試料中に浸すことが可能な固体支持体を用いて、ELISAを行うことも可能である。固体支持体は、プレート、ディップスティックまたはビーズ、あるいは当該技術分野に知られる他の支持体であることも可能である。

【0037】

やはり本明細書に含まれるのは、体液中の癌タンパク質を検出するかまたは測定するためのキットである。キットには、側方流動試験デバイスが含まれてもよい。キットには、使用説明書が含まれてもよい。側方流動試験には、反応ゾーン、試験ゾーン、および場合によって対照ゾーンが含まれてもよい。

【0038】

癌タンパク質を検出するためのELISAに基づく方法で使用するために適した抗体には、当該技術分野に知られる任意の抗・癌タンパク質抗体が含まれる。PRL3を検出するため、抗体は、Liらに開示されるようなモノクローナル抗体223または318、あるいはウサギ#1992または#1993由来のポリクローナル抗体血清であることも可能である。任意の組み合わせの抗体を捕捉剤または検出剤として用いてもよい。しかし、好ましくは、捕捉剤および検出剤は異なる。PRL3の場合、特に好ましい組み合わせは、捕捉抗体としてのモノクローナル抗体223の使用である。ウサギ抗血清#1992は検出剤として好ましい。検出剤を金粒子に連結させて、検出を可能にすることも可能である。

【0039】

本発明記載の方法には、以下の工程が含まれることも可能である：

- a) 個体から得た生物学的試料を提供する工程；
- b) 癌タンパク質結合剤を固定した固体支持体に、生物学的試料を曝露し、生物学的試料内の癌タンパク質が固体支持体に固定されるようにする工程；
- c) 生物学的試料から癌タンパク質を分配する工程；
- d) 癌タンパク質を検出する工程。

【0040】

癌タンパク質の存在は、個体が癌を有する指標となりうる。該方法は、検出される癌タンパク質の量を定量化する工程を含むことも可能である。該方法は、1またはそれより多い洗浄工程を、例えば固体支持体上に癌タンパク質を固定した後に含むことも可能である。該方法は、工程（d）で得た結果を、癌を持たないことが知られる個体から得た結果に比較する、比較工程を含むことも可能である。比較は、データベース中の既知の値との比較を含むことも可能である。

【0041】

いくつかの場合、固体支持体は、ニトロセルロース膜、特にニトロセルロースAE99である。好ましくは、モノクローナル抗体を、捕捉抗体として、固体支持体に結合させる。好ましくは、抗体は抗体223である。アッセイは、生物学的試料を、捕捉抗体に、10～20分間、好ましくは11～19分間、好ましくは14～16分間、好ましくはおよそ15分間曝露する工程を含むことも可能である。

【0042】

好ましくは、ポリクローナル抗体を検出剤として用いる。好ましくは、ウサギ抗PRL 3 # 1992血清を検出剤として用いる。好ましくは、検出剤を金粒子にコンジュゲート化して、検出を可能にする。

【0043】

特定の癌タンパク質の存在またはレベルによる癌の診断後、個体は、適切な療法治療を処方されるかまたは経ることも可能である。例えば、特定の癌タンパク質の検出は、特定の免疫療法が有益でありうることの指標でありうる。例えば、PRL 3の存在の同定は、患者がPRL 3免疫療法、例えば抗PRL 3抗体療法から利益を得るであろうことの指標でありうる。

【図面の簡単な説明】

【0044】

【図1】図1：PRL-3は癌病期のバイオマーカーとして使用可能である。より後期の患者の8/10でPRL-3が高発現し、一方、初期の患者の1/10で高発現する。

【図2】図2：2つの正常な尿試料および膀胱癌患者由来の6つの尿試料における癌タンパク質発現。癌タンパク質は、癌尿試料において一般的に検出可能である。

【図3】図3：レーン1～2、正常尿、3～8、癌尿。PRL-3を後期癌のバイオマーカーとして用いることも可能である。より後期の患者の8/10でPRL-3が高発現し、一方、初期の患者の1/10で高発現する。PRL 3に関連するエクソソームが膀胱癌患者の尿中に存在する。膀胱癌患者尿試料由来の精製エクソソーム分画を、PRL 3、CD 63、エクソソームマーカーに対する抗体で分析した。

【図4】図4：肺癌患者由来の34の尿試料。

【図5】図5：肺癌患者由来の34の尿試料。

【図6】図6：乳癌、胃癌および鼻咽頭癌患者由来の肺、尿試料における癌タンパク質発現。

【図7】図7：肺癌、膀胱炎、前立腺癌対良性前立腺肥大患者由来の22の尿試料。

【図8】図8：正常尿（レーン1）と比較して、本発明者らは、大細胞型B細胞リンパ腫患者（レーン2）において、非常に強いPRL-3発現レベルを、そして肺癌尿（レーン3～4）において、低レベルを検出する。

【図9】図9：ドットプロット（左パネル）上のPRL-3陰性試料（1、2、3、5）および陽性試料（8、9、12、14、16）をウェスタンブロット（右パネル）によって再確認する。本発明者らは、ドットプロットを用いて、一度に多数の試料を試験可能である。

【図10】図10：SDS PAGEによって試験した抗体純度。左から、Ab 223、318、1992、1994、参照MoAbおよび参照ウサギ抗体（4%～20% Tris-グリッセル）。

【図11】図11：PRL 3原型デバイスに関する用量反応曲線。

【図12-1】図12：A、試験ラインシグナルをスコア付けするために用いたQCカラーチャート；B、原型試験デバイス；C、試験デバイス解釈；D、陰性、陽性および希釈陽性尿試料を用いた原型試験デバイス。

【図12-2】図12：A、試験ラインシグナルをスコア付けするために用いたQCカラーチャート；B、原型試験デバイス；C、試験デバイス解釈；D、陰性、陽性および希釈陽性尿試料を用いた原型試験デバイス。

【図13-1】図13：細胞内PRL-3癌タンパク質は、細胞培地内に分泌されることも可能であり、そして癌尿の61%で存在するが、正常尿には存在しない。（a）マッチした溶解物および示すGC細胞株の馴化培地におけるPRL-3のウェスタンブロッティング。CANX、カルネキシン。（b）研究したすべての癌患者および正常個体由来の尿試料におけるPRL-3陽性%の要約。（c～f）（c）正常個体およびGC患者、（d）鼻咽頭癌患者および（e）膀胱癌患者の尿におけるPRL-3のウェスタンブロット検出。代表的なプロットを示す。Mr、相対分子量（kDa）。

【図13-2】図13：細胞内PRL-3癌タンパク質は、細胞培地内に分泌されること

10

20

30

40

50

も可能であり、そして癌尿の61%で存在するが、正常尿には存在しない。(a) マッチした溶解物および示すGC細胞株の馴化培地におけるPRL-3のウェスタンブロッティング。CANX、カルネキシン。(b) 研究したすべての癌患者および正常個体由来の尿試料におけるPRL-3陽性%の要約。(c~f) (c) 正常個体およびGC患者、(d) 鼻咽頭癌患者および(e) 膀胱癌患者の尿におけるPRL-3のウェスタンブロット検出。代表的なブロットを示す。Mr、相対分子量(kDa)。

【図13-3】図13：細胞内PRL-3癌タンパク質は、細胞培地内に分泌されることも可能であり、そして癌尿の61%で存在するが、正常尿には存在しない。(a) マッチした溶解物および示すGC細胞株の馴化培地におけるPRL-3のウェスタンブロッティング。CANX、カルネキシン。(b) 研究したすべての癌患者および正常個体由来の尿試料におけるPRL-3陽性%の要約。(c~f) (c) 正常個体およびGC患者、(d) 鼻咽頭癌患者および(e) 膀胱癌患者の尿におけるPRL-3のウェスタンブロット検出。代表的なブロットを示す。Mr、相対分子量(kDa)。

【図14】有効な抗PRL3抗体処置は、尿PRL-3の喪失を生じ、そして機構的に腫瘍内集積および免疫エフェクター補充を伴う。(a) PRL-3+ SNU484またはPRL-3- MKN45同所性胃腫瘍を宿する、未処置または抗PRL3抗体処置マウス由来のマッチした尿および腫瘍試料におけるPRL-3タンパク質のウェスタンブロッティング。上部パネル、第28日(SNU-484)または第56日(MKN45)の切除胃。(b) PRL-3+癌細胞に対する抗PRL3抗体作用の提唱される機構。2つの型の分泌PRL-3抗原、可溶性遊離型またはエクソソーム結合型を示す。

【発明を実施するための形態】

【0045】

本発明者らは、ウェスタンブロット、ドットブロット、ELISAなどの多様な免疫学的アッセイを記載する。本発明者らはまた、尿および血液試料(およびまた唾液)において、癌タンパク質を検出する妊娠様試験も記載する。

【0046】

本発明者らは、癌タンパク質のレベルが癌の病期と関連するかどうかを調べる。

尿および血液試料を用いたバイオマーカーのスクリーニングは、腫瘍試料を用いた場合に比較してより容易であり、これは、例えば内部中心部の脳腫瘍など、腫瘍に到達することが困難である可能性があるためである。

【0047】

本発明者らは、2つの独立のPRL-3モノクローナル抗体(#318または#223)を有する；本発明者らはまた、PRL-3、ならびにその関連PRL-1およびPRL-2と反応するポリクローナルウサギ抗体も有する。ウェスタンブロットおよびELISAアッセイに加えて、本発明者らは、尿または血清(おそらく唾液)試料からPRL-3抗原を捕捉するためのPRL-3クローナル抗体#318または#223のいずれかを含有する紙片を作製可能であり、HRPまたはAPとコンジュゲート化された二次抗体は、紙片またはプレート上で、PRL-3抗原が存在することを反映する抗体-抗原酵素反応の色を明らかに表すであろう。この技術は、家庭用妊娠試験(反応ゾーン、試験ゾーン、対照ゾーン)に似ており、これを尿試料中で検出される任意の他のバイオマーカーに適用可能である。

【0048】

本発明者らはまた、単純な尿試料において他の分泌癌ターゲットを試験する類似の技術も使用する。

細胞内タンパク質が、エクソソームを通じて尿に排出されうることが、以前には報告されてこなかった。本発明はこれを立証する最初の研究であり、そして癌を検出し、そして癌の病期を反映する単純な方法を提供する。本明細書に開示するのは、癌尿試料または前年以来の数百の尿試料から精製した対応するエクソソームを分析することによって得られるデータである。

【0049】

10

20

30

40

50

本明細書において、用語「バイオマーカー」は、個体において生物学的状態または疾患、例えば癌の指標となるタンパク質を指す。本発明のバイオマーカーは、典型的にはタンパク質、または癌タンパク質である。癌タンパク質は、癌を引き起こす能力を持つかまたは癌に関連するタンパク質である。特に、本発明は、細胞内癌タンパク質であるバイオマーカーに関する。

【0050】

細胞内癌タンパク質

本発明者らは、細胞内癌タンパク質が、体内で長い距離を移動して、エクソソームを通じて非慣用的に分泌されうることを決定した。本発明はしたがって、特に、細胞内癌タンパク質に関する。

10

【0051】

細胞内癌タンパク質および細胞内抗原は当該技術分野に知られ、そしてこれらには、とりわけ、以下のもの、あるいはその変異体、誘導体、相同体または断片の任意の1またはそれより多くが含まれることも可能である。

【0052】

適切な細胞内癌タンパク質は、当業者に認識されうるであろう。腫瘍形成中には特異的に上方制御されるが、宿主組織においてほとんどまたはまったく発現されない遺伝子は、腫瘍特異的ターゲットとして特に有望である。遺伝的関連を示す癌に関しては、免疫適格性の若い感受性ファミリーメンバーを、家族性癌に関連する抗原（エピトープに基づくペプチドワクチン）で免疫すると、その癌タンパク質に対する免疫系をプライミングすることも可能である。これらの内因性刺激抗体は、次いで、その特定の癌タンパク質を発現する癌細胞と潜在的に戦いうる。本明細書記載の結果は、抗体に基づく療法および癌に対するワクチン接種が、療法ターゲットとしてより広く多様な細胞内癌タンパク質に拡張可能であることを示唆する。療法抗体またはワクチン接種によってターゲットとすることが不能であると以前考えられていた細胞内癌タンパク質のすべてのクラスが、現在、オーダーメイド癌療法の範囲を拡張するとともに、癌ワクチンの新時代を先導することも可能になっている。本発明者らは、細胞内自己抗原を用いる1つの潜在的な利点が、これらが細胞外自己抗原よりも免疫反応を誘発するより優れた可能性を有しうる点であると期待しており、これは細胞外自己抗原をターゲティングする免疫細胞が一般的に発生中に排除されるためである。本発明者らは、外因性送達抗体に比較して、抗原誘導性抗体療法が類似の抗腫瘍療法効率を達成可能であることを見出した。存在する慣用的な臨床抗体療法は高価であるため、高力価の抗原誘導抗体を誘導する手段として、ワクチン接種がより有用であり、そして経済的でありうる。「癌ワクチン接種」のこの概念は有望であり、そして魅力的である。

20

30

【0053】

本明細書に記載するような癌タンパク質は、腫瘍原性細胞増殖に関連するタンパク質の制御または合成に関与するタンパク質である。癌タンパク質は、正常細胞の癌細胞への形質転換に関与する、発癌性ポリペプチドであることも可能である。癌タンパク質は正常細胞におけるよりも腫瘍細胞においてより高い発現を有しうる。癌タンパク質は細胞内であり、つまり、これらは細胞内部、例えば核または細胞質に位置するか、あるいは細胞膜の細胞内表面に付着する。好ましくは、癌タンパク質は自己抗原であり、つまり、これらは、動物に通常見られるタンパク質であり、そして動物ゲノムから発現されるタンパク質集団の一部を形成し、そして動物にとって異種の、例えばウイルスタンパク質ではない。

40

【0054】

あるいは、細胞内癌タンパク質は、細胞内領域を有する癌タンパク質であることも可能である。例えば、該タンパク質は、細胞質内に伸長する領域を有する、膜係留タンパク質であることも可能である。

【0055】

癌タンパク質は、非自己抗原、例えば感染細胞によって発現されるウイルスタンパク質であることも可能である。いくつかの場合、細胞内癌タンパク質は、微生物由来ではない

50

。例えば、該タンパク質は、ウイルス性癌タンパク質ではなく、また細菌性癌タンパク質ではなく、また真菌性癌タンパク質ではない。好ましくは、癌タンパク質は自己抗原である。細胞内自己抗原を用いる1つの潜在的な利点は、これらが細胞外自己抗原よりも免疫反応を誘発するより優れた可能性を有しうることであり、これは、細胞外自己抗原をターゲティングする免疫細胞が、一般的に、発生中に除去されるためである。

【0056】

PRL-3

以下のテキストは、OMIMエントリー606449より適合されている。

PRL-3はまた、プロテインチロシン・ホスファターゼ4A型3;PTP4A3としても知られる。PRL-3の染色体位置は、遺伝子マップ遺伝子座8q24.3である。

10

【0057】

心臓において、プロテインキナーゼは、収縮性、イオン輸送、代謝および遺伝子発現を制御する。ホスファターゼは、脱リン酸化における役割に加えて、心臓肥大および機能不全に関与する。

【0058】

心臓cDNAライブラリーのデータベース検索およびスクリーニングによって、Matterら2001, Biochem. Biophys. Res. Commun. 283:1061-1068は、PTP4A3をコードするcDNAを同定し、これをPRL3と名付けた。推定されるPRL3タンパク質は、PRL1(PTP4A1;601585)に76%同一であり、そしてマウスPr13に96%同一である。ノーザンブロット分析は、主に心臓および骨格筋において、より低い発現で脾臓において、およそ2.3kb PRL3転写物の発現を明らかにした。この発現パターンは、PRL1およびPRL2(PTP4A2;601584)のより広い発現とは異なっている。in situハイブリダイゼーション分析によって、PRL3発現は心筋細胞に位置づけられた。Trisグリシンゲル分析によって、PRL3が22kDタンパク質として発現されることが示された。機能的および突然変異分析によって、リン酸切断は、PRL3のcyclin 04に依存することが示された。PRL3の過剰発現は、細胞増殖増加を生じた。ウェスタンブロット分析によって、アンギオテンシンII(106150)に反応したpI 30cas(BCAR1;602941)の脱リン酸化が示され、アンギオテンシンIIによって誘導される細胞内カルシウム・トランジェントの調節において、PRL3の役割が示唆される。

20

30

【0059】

転移の分子的基础に関する洞察を得るため、Sahara, 2001, Science 294:1343-1346は、原発性癌、良性結腸直腸腫瘍および正常結腸直腸上皮と転移性結腸直腸癌の全体的な遺伝子発現プロファイルを比較した。PRL3は、研究した18の癌転移各々で高レベルで発現されたが、非転移性腫瘍および正常結腸直腸上皮ではより低いレベルで発現された。調べた12の転移のうち3つで、染色体8q24.3に位置する小さいアンプリコン内に、多コピーのPRL3遺伝子が見出された。Sahara(2001)は、PRL3遺伝子が結腸直腸癌転移に重要であると結論づけた。

40

【0060】

Stanford G3放射ハイブリッドパネルおよびデータベース配列分析を用いて、Sahara(2001)は、PRL3遺伝子を周囲マーカー145.20にマッピングした。PRL3遺伝子はまた、8qテロメアからおよそ3Mbである8q24.3に位置するマーカーSHGC-22154に緊密に関連づけられる。

【0061】

マウスおよびヒトPRL-3タンパク質は、Liら(2005), Clin Cancer Res;11:2195-204に詳細に記載された。

PRL-3配列

本明細書に記載する方法および組成物は、以下に詳細に記載するPRL-3ポリペプチ

50

ドを利用する。本明細書において、用語「PRL-3」は、以下より選択される配列を指すよう意図される。

【0062】

【表1-1】

Unigene	バージョン	説明	
AF041434.1	GI:3406429	ホモ・サピエンス (Homo sapiens) 潜在的プレニル化プロテイン・チロシン・ホスファターゼ hPRL-3 mRNA, 完全 cds	10
BT007303.1	GI:30583444	ホモ・サピエンス ・プロテイン・チロシン・ホスファターゼ IVA 型, メンバー 3 mRNA, 完全 cds	
AK128380.1	GI:34535719	ホモ・サピエンス cDNA FLJ46523 fis, クローン THYMU3034099	20
NM_007079.2	GI:14589853	ホモ・サピエンス ・プロテイン・チロシン・ホスファターゼ IVA 型, メンバー 3 (PTP4A3), 転写変異体 2, mRNA	
AY819648.1	GI:55977462	ホモ・サピエンス HCV p7 トランス制御タンパク質 2 mRNA, 完全 cds	30
BC003105.1	GI:13111874	ホモ・サピエンス ・プロテイン・チロシン・ホスファターゼ IVA 型, メンバー 3, mRNA (cDNA クローン MGC: 1950 IMAGE:3357244), 完全 cds	
NM_032611.1	GI:14589855	ホモ・サピエンス ・プロテイン・チロシン・ホスファターゼ IVA 型, メンバー 3 (PTP4A3), 転写変異体 1, mRNA	40
AK311257.1	GI:164696021	ホモ・サピエンス cDNA, FLJ 18299	
U87168.1	GI:1842085	ヒト・プロテイン・チロシン・ホスファターゼ 相同体 hPRL-R mRNA, 部分的 cds	

【0063】

【表 1 - 2】

BC066043.1	GI:42406367	ムス・ムスキュルス (Mus musculus) プロテイン・チロシン・ホスファターゼ 4a3, mRNA (cDNA クローン MGC:90066 IMAGE:6415021), 完全 cds	
AJ276554.1	GI:26985935	プロテイン・チロシン・ホスファターゼ hPRL-3, 短鎖型のホモ・サピエンス mRNA	10
AK190358.1	GI:56014535	ムス・ムスキュルス cDNA, クローン:YIG0102103, プラス鎖, 参照:ENSEMBL:マウス転写物 ENST:ENSMUST00000053232, BLAT 検索に基づく	20
CT010215.1	GI:71059758	遺伝子 Ptp4a3 のムス・ムスキュルス全長オープンリーディングフレーム cDNA クローン RZPDo836H0950D, プロテイン・チロシン・ホスファターゼ 4a3; 完全 cds, 停止コドンを含む	
AK147489.1	GI:74184679	ムス・ムスキュルス成体オス脳未定義細胞株 cDNA, RIKEN 全長濃縮ライブラリー, クローン:M5C1053F14 産物:プロテイン・チロシン・ホスファターゼ 4a3, 全挿入配列	30
AK172192.1	GI:74182510	ムス・ムスキュルス活性化脾臓 cDNA, RIKEN 全長濃縮ライブラリー, クローン:F830102P03 産物: プロテイン・チロシン・ホスファターゼ 4a3,全挿入物配列	40

【 0 0 6 4 】

【表 1 - 3】

AK 143702.1	GI:74150753	ムス・ムスキュルス 6 日新生脾臓 cDNA, RIKEN 全長濃縮ライブラリー, クローン:F43001 1 C20 産物 プロテイン・チロシン・ホスファターゼ 4a3, 全挿入物配列	
AF035645.1	GI:2992631	ムス・ムスキュルス 潜在的プレニル化プロテイン・チロシン・ホスファターゼ mPRL-3 (PrI3) mRNA, 完全 cds	10
NM_008975.2	GI:31543526	ムス・ムスキュルス・プロテイン・チロシン・ホスファターゼ 4a3 (Ptp4a3), mRNA	
AK014601.1	GI:12852557	ムス・ムスキュルス 0 日新生皮膚 cDNA, RIKEN 全長濃縮ライブラリー, クローン:4632430E19 産物:プロテイン・チロシン・ホスファターゼ 4a3, 全挿入物配列	20
AK004562.1	GI:12835815	ムス・ムスキュルス成体オス肺 cDNA, RIKEN 全 長濃縮ライブラリー, クローン: 1200003F10 産 物 プロテイン・チロシン・ホスファターゼ 4a3,全挿入物配列	30
AK003954.1	GI:12834926	ムス・ムスキュルス 18 日胚全身 cDNA, RIKEN 全長濃縮ライブラリー, クローン: 1110029E17 産物:プロテイン・チロシン・ホスファターゼ 4a3, 全挿入物配列	40
BC027445.1	GI:20071662	ムス・ムスキュルス・プロテイン・チロシン・ホ スファターゼ 4a3, mRNA (cDNA クローン MGC:36146 IMAGE:4482106), 完全 cds	

【 0 0 6 5 】

「PRL-3 ポリペプチド」は、ヒト PRL-3 ポリペプチド、例えば Unigene 寄託番号 AF041434. 1 を有する配列を含むかまたはこうした配列からなることも可能である。

【0066】

これらのポリペプチドのいずれか、いくつかまたはすべての相同変異体および誘導体もまた含まれる。例えば、PRL-3には、Unigene 寄託番号 BC066043.1 も含まれることも可能である。

【0067】

PRL1

以下のテキストは、OMIM エントリー 606449 より適合されている。

PRL1 はまた、プロテインチロシン・ホスファターゼ 4a 型 1 ; PTP4A1、ホスファターゼまたは肝臓再生 1、PTP (CAAX1) としても知られる。PRL1 の染色体位置は、遺伝子マップ 遺伝子座 6q12 である。

10

【0068】

増殖、分化、および代謝を伴う細胞プロセスはしばしば、部分的に、タンパク質リン酸化および脱リン酸化によって制御される。チロシン残基のリン酸エステルを加水分解するプロテインチロシン・ホスファターゼ (PTP) はすべて、共通の活性部位モチーフを共有し、そして 3 つの群に分類される。

【0069】

これらには、受容体様 PTP、細胞内 PTP、および二重特異性 PTP が含まれ、これらはセリンおよびスレオニン残基で、ならびにチロシンで、脱リン酸化可能である。

Diamond ら 1994 Cell. Bio. 14:3752-3762 は、再生ラット肝臓由来の、第 4 のクラスのメンバーである PTP を記載した。PRL1 と名付けられたこの遺伝子は、多くの極初期遺伝子の 1 つであり、そして主に核において発現された。安定トランスフェクションされる細胞において PRL1 の過剰発現は、形質転換された表現型を生じ、これは、これが腫瘍形成において何らかの役割を果たしうることを示唆した。

20

【0070】

in vitro プレニル化スクリーンを用いることによって、Cates ら、1996, Cancer Lett. 110:49-55 は、PRL1 相同体をコードする 2 つのヒト cDNA を単離し、PTP (CAAX1) および PTP (CAAX2) (PRL2; 601584) と名付け、これらは哺乳動物ファルネシル：タンパク質トランスフェラーゼによって、in vitro でファルネシル化される。上皮細胞におけるこれらの PTP の過剰発現は、培養細胞において形質転換表現型を、そしてヌードマウスにおいて腫瘍増殖を引き起こした。著者らは、PTP (CAAX1) および PTP (CAAX2) がイソプレニル化発癌性 PTP の新規クラスに相当すると結論づけた。

30

【0071】

Peng ら 1998, J. Biol. Chem. 273:17286-17295 は、ヒト PTP (CAAX1) 遺伝子、または PRL1 が 6 つのエクソンで構成され、そして 2 つのプロモーターを含有すると報告した。予測されるマウス、ラット、およびヒト PRL1 タンパク質は同一である。Zeng ら 1998, Biochem.

Biophys. Res. Commun. 244:421-427 は、ヒト PRL1 および PRL2 タンパク質が、87% アミノ酸配列同一性を共有すると決定した。FISH によって、Peng ら (1998) は、PRL1 遺伝子を 6q12 にマッピングした。

40

【0072】

用語「PRL1」を用いる場合、これは、PRL-1 タンパク質または PRL-1 核酸およびその任意の断片、変異体相同体、誘導体、変異体を含む、任意の PRL-1 配列を指すと解釈すべきである。

【0073】

PRL-1 の特性および活性を本文書に、例えば参考文献中に記載する。

マウスおよびヒト PRL-1 タンパク質は、Zeng ら (1998)、上記に詳細に記載された。

50

【 0 0 7 4 】

P R L - 1 配 列

本明細書に記載する方法および組成物は、以下に詳細に記載する P R L - 1 ポリペプチドを利用する。本明細書において、用語「P R L - 1」は、以下の表 D 1 に示す配列を指すよう意図される。

【 0 0 7 5 】

【表 2 - 1】

Unigene	説明	
NM 003463.3	ホモ・サピエンス・プロテイン・チロシン・ホスファターゼ IV型A, メンバー 1(PTP4A1), mRNA	
CR602427.1	ホモ・サピエンス (ヒト)のCot 25規準化HeLa細胞の全長 eDNA クローン CSODK012YJ03	10
CR599216.1	ホモ・サピエンス (ヒト)の神経芽細胞腫の全長 cDNA クローン CLOBB007ZF05	
CR596545.1	ホモ・サピエンス (ヒト)のCot 25規準化HeLa細胞の全長 eDNA クローン CSODK010YM06	20
CR749458.1	ホモ・サピエンス mRNA; eDNA DKFZp779M0721 (クローン DKFZp779M0721由来)	30
BC045571.1	ホモ・サピエンス・プロテイン・チロシン・ホスファターゼ IV型A, メンバー 1, mRNA (eDNA クローン MGC:57320 IMAGE:4826233), 完全 cds	
AJ420505.1	ホモ・サピエンス mRNA 全長挿入eDNA クローン EUROIMAGE 2096405	40
AK312526.1	ホモ・サピエンス eDNA, FLJ92892	

【 0 0 7 6 】

【表 2 - 2】

BC023975.2	ホモ・サピエンス・プロテイン・チロシン・ホスファターゼ IV型A, メンバー 1, mRNA (eDNA クローン MGC:1659 IMAGE:2960001), 完全 cds	
U69701.1	ヒト プロテイン・チロシン・ホスファターゼ hPRL-1N mRNA, 部分的cds	10
U48296.1	ホモ・サピエンス・プロテイン・チロシン・ホスファターゼ PTPCAAX 1 (hPTPCAAX1) mRNA, 完全cds	
AK081491.1	ムス・ムスキュルス16日胚頭部 eDNA, RIKEN 全長濃縮ライブラリー, クローン:C 130021 BO 1産物:プロテイン・チロシン・ホスファターゼ 4a1, 完全挿入配列	20
AK078120.1	ムス・ムスキュルス成体オス延髄eDNA, RIKEN 全長濃縮ライブラリー, クローン:6330521 E 18産物: プロテイン・チロシン・ホスファターゼ 4a1, 完全挿入配列	30
BC055039.1	ムス・ムスキュルス・プロテイン・チロシン・ホスファターゼ 4a1, mRNA (eDNA クローン MGC:62623 IMAGE:6396041), 完全cds	
AK199907.1	ムス・ムスキュルスeDNA, クローン:Y1G0132L24, マイナス鎖, 参照:ENSEMBL:マウス転写物ENST: ENSMUST000000061959, BLAT 検索 ムス・ムスキュルスeDNAに基づく, クローン:Y1G0129D05, プラス鎖, 参照:ENSEMBL:マウス転写物-	40

【表 2 - 3】

AK198788.1	ENST:ENSMUST000000061959, BLAT検索ムス・ムスキュルスeDNAに基づく, クローン:Y1G0109N22, プラス鎖, 参照:ENSEMBL:マウス転写物-	
AK192767.1	ENST:ENSMUST000000055216, BLAT検索ムス・ムスキュルスeDNAに基づく, クローン:YOG0140011, プラス鎖, 参照:ENSEMBL:マウス転写物-	10
AK187266.1	ENST:ENSMUST000000061959, BLAT 検索ムス・ムスキュルス・プロテイン・チロシン・ホスファターゼ 4a1に基づく, mRNA (eDNA クローン BC086787.1 MGC:102117 IMAGE:30538771)	20
BC094447.1	完全cds ムス・ムスキュルス・プロテイン・チロシン・ホスファターゼ 4a1, mRNA (eDNA クローン MGC:102501 IMAGE:3990529), 完全cds	
AK 150506.1	ムス・ムスキュルス骨髄マクロファージeDNA, RIKEN 全長濃縮ライブラリー, クローン:I830008L20産物:プロテイン・チロシン・ホスファターゼ 4a 1,完全挿入配列	30
AK 148288.1	全ムス・ムスキュルスB16 F10Y 細胞eDNA, RIKEN 全長濃縮ライブラリー, クローン:G3 70079M23産物:プロテイン・チロシン・ホスファターゼ 4a1, 挿入配列	40
AK151533.1	ムス・ムスキュルス骨髄マクロファージ cDNA, RIKEN 全長濃縮ライブラリー, クローン:I830031H07産物:プロテイン・チロシン・ホスファターゼ 4a1, 完全挿入配列	

【表 2 - 4】

U84411.1 ムス・ムスキュルス・プロテイン・チロシン・ホスファターゼ (PRL-1)
mRNA, 完全cds

NM 011200.2 ムス・ムスキュルス・プロテイン・チロシン・ホスファターゼ 4a1
(Ptp4a1), mRNA, ムス・ムスキュルス・プロテイン・チロシン・ホス
ファターゼ 4a1, クローン

10

BC031734.1 IMAGE:3590144, mRNA ムス・ムスキュルス, プロテイン・チロシン・
ホスファターゼ 4a 1, クローン

20

BC003761.1 IMAGE:3157812, mRNA

【0079】

「PRL-1 ポリペプチド」は、ヒト PRL-1 ポリペプチド、例えば Unigene 寄託番号 NM_003463. 3 を有する配列を含むかまたはこうした配列からなることも可能である。これらのポリペプチドのいずれか、いくつかまたはすべての相同変異体および誘導体もまた含まれる。例えば、PRL-1 には、Unigene 寄託番号 U84411. 1 も含まれることも可能である。

【0080】

VHZ

本明細書記載の方法および組成物は、以下に詳細に記載する VHZ を利用する。

30

VHZ はまた、DUSP23、MOSP、LDP-3、DUSP25、FLJ20442 および RPI1-190A12. 1 としても知られる。

【0081】

本明細書において、用語「VHZ」は、GenBank 寄託番号 NP_060293. 2、NP_081001. 1、XP_341157. 1、XP_001170819. 1、XP_001170835. 1、XP_545747. 2、NP_001076078. 1、NP_001011371. 1、NP_783859. 1、NP_001034709. 1、XP_001480730. 1、XP_001117253. 1 または XP_001117256. 1 を有するポリペプチド配列を指すことも可能である。

40

【0082】

「VHZ ポリペプチド」は、ヒト VHZ ポリペプチド、例えば寄託番号 NP_060293 を有する配列を含むかまたはこうした配列からなることも可能である。

核酸配列に関して、用語「VHZ ポリヌクレオチド」、「VHZ ヌクレオチド」、および「VHZ 核酸」は交換可能に使用可能であり、そして cDNA およびゲノム両方の VHZ 配列を特に含むと理解されるべきである。これらの用語はまた、VHZ ポリペプチドおよび／またはその断片、誘導体、相同体または変異体をコード可能な核酸配列を含むこともまた意図される。

【0083】

VHZ 核酸に言及される場合、これは核酸の VHZ ファミリーの任意のメンバーへの言

50

及と解釈されるべきである。特に興味深いのは：NM__017823.3、NM__026725.2、XM__341156.3、XM__001170819.1、XM__170835.1、XM__545747.2、NM__001082609.1、NM__001011371.1、NM__175732.1、NM__001039620.1、XM__001480680.1、XM__001117253.1またはXM__001117256.1からなる群より選択されるVHZ核酸である。

【0084】

やはり含まれるのは、以下の「他のVHZ核酸配列」として示される核酸配列の任意の1またはそれより多くである。

例えば、VHZ核酸は、GenBank寄託番号NM__017823.3を有するヒトVHZ配列を含むことも可能である。

【0085】

Her2

Her2/neu (ErbB-2としても知られる)は、「ヒト上皮増殖因子受容体2」を指し、そして乳癌において、より高い悪性度を与えるタンパク質である。該タンパク質は、ErbBタンパク質ファミリーのメンバーであり、より一般的に、上皮増殖因子受容体ファミリーとして知られる。HER2/neuはまた、CD340 (分化クラスター340)およびp185とも称されてきている。HER2は細胞膜表面結合受容体チロシンキナーゼであり、そして一般的に、細胞増殖および分化を導くシグナル伝達経路に関与する。

【0086】

本明細書に記載するように、HER2は、NP__004439.2、NP__001005862.1、NP__001003817.1、AAI67147.1より選択されるポリペプチド配列を指すことも可能である。

【0087】

「Her2ポリペプチド」は、本明細書において、寄託番号P04626.1のものなどのヒトHER2ポリペプチド配列を含むかまたはこうした配列からなることも可能である。

【0088】

Her2ポリペプチドは、US6333169およびEP1418235に記載される。

本発明で有用な他の癌タンパク質には、EGFR (GenBank寄託番号CAA25240 (GI:119533)、ADZ75461.1 (GI:326467049))、SHP1 (GenBank寄託番号NP002822.2 (GI:18104989)、NP536858.1 (GI:18104991)、NP536859.1 (GI:18104991))、Tiam (GenBank寄託番号NP003244.2 (GI:115583670)、AAA98443.1 (GI:897557)、Q13009.2 (GI:152031709))、Myc (GenBank寄託番号AAA59886.1 (GI:188975)、AAA59887.1 (GI:188977)、CAA25015.2 (GI:29839758)、NP002458.2 (GI:71774083))、Ras (GenBank寄託番号AAA34557.1 (GI:171374))およびRunx-1 (GenBank寄託番号NP001079966.1 (GI:148232064))が含まれる。

【0089】

エストロゲン受容体

本発明で有用な癌タンパク質は、エストロゲン受容体 (ER) である。癌タンパク質は、ヒトERであることも可能である。該タンパク質は、P03372 (GI:544257) に示されるタンパク質配列を含むかまたはこうした配列からなることも可能である。

【0090】

エストロゲン受容体およびその断片は、エストロゲン受容体 (ER) の過剰発現によっ

10

20

30

40

50

て引き起こされるかまたは過剰発現と関連する乳癌の治療に有用であろう。ERに対する抗体あるいはER癌タンパク質またはその断片を用いたワクチン接種を用いて、蔓延を防止することも可能である。これは、Her2または他のタンパク質の発現に関わりなく、ER陽性乳癌患者をターゲティングするために特に有用である。

【0091】

エストロゲン受容体(ER)は、ホルモン結合、DNA結合、および転写活性化に重要ないくつかのドメインで構成されるリガンド活性化転写因子である。選択的スプライシングは、いくつかのER mRNA転写物を生じ、これは主に、5'非翻訳領域で異なる。翻訳された受容体は、より少ない可変性を示す(OMIM参照133430を参照されたい)。

10

【0092】

B型肝炎ウイルス(HBV)タンパク質

B型肝炎ウイルスタンパク質は、本発明で使用するために適している可能性もある。HBVは、8遺伝子型として存在する。

【0093】

例えば、HBV X-タンパク質。HBV X-タンパク質は、感染細胞の核に局在する。大部分の肝細胞癌(HCC)は、HBV感染と関連する。したがって、HBVタンパク質は、HCCを治療するために有用である可能性もあり、ウイルスタンパク質をターゲティングする抗体は、ウイルス感染細胞を特異的に破壊する一方、正常細胞を無傷のまま残す。

20

【0094】

HBV-Xタンパク質のタンパク質配列はGenBankに寄託され、そして本発明で使用するために適している。例えば、用語「HBV-Xタンパク質」を用いて、GenBank CBX46805.1(GI:310923520)、またはEMBL寄託番号FR714506.1に示される配列を含むかまたはこうした配列からなるタンパク質、あるいは寄託番号AB670311.1(GI:371919030)に示されるような配列を有する遺伝子によってコードされるタンパク質を指すことも可能である。

【0095】

本明細書において特に好ましい他の癌タンパク質は、c-myc(CAA46984.1 GI:396512)、H-ras(CAG38816.1 GI:49168642)、AKT-1(AAL55732.1 GI:18027298)、p53(BAC16799.1 GI:23491729またはその変異体、例えばNP_000537.3 GI:120407068)、Rac1(CAB53579.5 GI:8574038)、FAK(NP_722560.1 GI:24476013またはNP_005598.3 GI:27886593)、Runx1(AAI36381.1 GI:223459612)、PTEN(AAD13528.1 GI:4240387)、b-アクチン(NP_001092.1 GI:4501885)またはGAPDH(NP_001243728.1 GI:378404908)、N-カドヘリン(CAA40773.1 GI:1335229)、PDGF受容体(アルファ)(NP_006197.1 GI:5453870)、FLT-3(NP_004110.2 GI:121114304)またはEGFRまたはp-EGFR(NP_005219.2 GI:29725609)である。

30

40

【0096】

ポリペプチド

「ポリペプチド」は、ペプチド結合または修飾ペプチド結合によって互いに連結された、2またはそれより多いアミノ酸を含む任意のペプチドまたはタンパク質、すなわちペプチドアイソスターを指す。「ポリペプチド」は、一般的にペプチド、オリゴペプチドまたはオリゴマーと称される短い鎖、および一般的にタンパク質と称されるより長い鎖の両方を指す。ポリペプチドは、20の遺伝子コードアミノ酸以外のアミノ酸を含有することも可能である。

50

【0097】

「ポリペプチド」には、天然プロセス、例えば翻訳後プロセッシングによって、または当該技術分野に周知である化学的修飾技術によってのいずれかで修飾されるアミノ酸配列が含まれる。こうした修飾は、基本的教科書、そしてより詳細なモノグラフ、ならびに、膨大な研究文献によく記載されている。修飾は、ペプチド主鎖、アミノ酸側鎖およびアミノ末端またはカルボキシル末端を含めて、ポリペプチドのどこに存在することも可能である。同じタイプの修飾が、所定のポリペプチドのいくつかの部位で、同じ度合いで、または異なる度合いで存在することも可能であることが認識されるであろう。また、所定のポリペプチドが、多くのタイプの修飾を含有することも可能である。

【0098】

ポリペプチドは、ユビキチン化の結果として分枝していることも可能であるし、そして分枝を伴い、または伴わずに、環状であることも可能である。環状、分枝および分枝環状ポリペプチドは、翻訳後天然プロセスから生じることも可能であるし、または合成法によって作製されることも可能である。修飾には、アセチル化、アシル化、ADP-リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質または脂質誘導体の共有結合、ホスファチジルイノシトール (phosphatidylinositol) の共有結合、架橋、環状化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有架橋の形成、シスチンの形成、ピログルタミン酸の形成、ホルミル化、ガンマーカルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨウ素化、メチル化、ミリスチル化、酸化、タンパク質分解プロセッシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化 (selenoylation)、硫酸化、アルギニル化などのトランスファーRNAが仲介するタンパク質へのアミノ酸の付加、およびユビキチン化が含まれる。例えば、Proteins-Structure and Molecular Properties, 第2版, T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, ニューヨーク, 1993およびWold, F., Posttranslational Protein Modifications: Perspectives and Prospects, 1-12ページ Posttranslational Covalent Modification of Proteins中, B. C. Johnson監修, Academic Press, New York, 1983; Seiffterら, "タンパク質修飾および非タンパク質補因子の分析", Meth Enzymol (1990) 182: 626-646、およびRattanら, "タンパク質合成: 翻訳後修飾および加齢", Ann NY Acad Sci (1992) 663: 48-62を参照されたい。

【0099】

用語「ポリペプチド」には、当該技術分野に知られる多様な合成ペプチド変異、例えばレトロインベルソ (retroinverso) Dペプチドが含まれる。ペプチドは、抗原決定基および／またはT細胞エпитープであることも可能である。ペプチドはin vivoで免疫原性でありうる。ペプチドは、in vivoで中和抗体を誘導可能でありうる。

【0100】

細胞内癌タンパク質に適用した際、生じるアミノ酸配列は、細胞内癌タンパク質ポリペプチド、例えばヒト細胞内癌タンパク質と共通の生物学的活性などの1またはそれより多い活性を有することも可能である。例えば、細胞内癌タンパク質相同体は、正常乳房細胞に比較して、癌細胞において、増加した発現レベルを有することも可能である。特に、用語「相同体」は、生じるアミノ酸配列が細胞内癌タンパク質活性を有するならば、構造および／または機能に関する同一性を含む。配列同一性 (すなわち類似性) に関して、少なくとも70%、例えば少なくとも75%、例えば少なくとも85%、例えば少なくとも90%の配列同一性があることも可能である。少なくとも95%、例えば少なくとも98%の配列同一性があることも可能である。これらの用語はまた、細胞内癌タンパク質核酸配

10

20

30

40

50

列のアレル変異であるアミノ酸に由来するポリペプチドもまた含む。

【0101】

ポリペプチド、例えば細胞内癌タンパク質の「活性」または「生物学的活性」に言及する場合、これらの用語は、類似の活性または改善された活性または望ましくない副作用が減少したこれらの活性を含めて、細胞内癌タンパク質の代謝または生理学的機能を指すよう意図される。やはり含まれるのは、細胞内癌タンパク質の抗原性および免疫原性活性である。こうした活性の例、およびこれらの活性をアッセイし、そして定量化する方法が当該技術分野に知られ、そして本文書の別の箇所に詳細に記載される。

【0102】

変異体、誘導体および相同体

本明細書記載の方法は、PRL3ポリペプチド、あるいはこうしたペプチドの変異体、相同体または誘導体の検出または定量化を伴うことも可能である。本明細書記載の方法は、本明細書開示の配列に同一ではない癌タンパク質の検出を伴うことも可能であるが、既知の配列に対して1またはそれより多い突然変異を所持することも可能である。したがって、こうした配列は、本文書に示す特定の配列に限定されず、相同配列、例えば関連細胞相同体、他の種由来の相同体およびその変異体または誘導体もまた含む。

【0103】

本文書に記載するヌクレオチド配列に関連する用語「変異体」、「相同体」または「誘導体」には、配列の置換、変動、修飾、交換、配列からのまたは配列への1（またはそれより多い）ヌクレオチドの欠失または付加のいずれも含まれる。生じる配列は、本文書の別の箇所に記載するように、細胞内癌タンパク質結合活性を有するポリペプチドをコードすることが可能でありうる。

【0104】

上に示すように、配列同一性に関して、「相同体」は、例えば、適切な配列に対して、少なくとも5%同一性、少なくとも10%同一性、少なくとも15%同一性、少なくとも20%同一性、少なくとも25%同一性、少なくとも30%同一性、少なくとも35%同一性、少なくとも40%同一性、少なくとも45%同一性、少なくとも50%同一性、少なくとも55%同一性、少なくとも60%同一性、少なくとも65%同一性、少なくとも70%同一性、少なくとも75%同一性、少なくとも80%同一性、少なくとも85%同一性、少なくとも90%同一性、または少なくとも95%同一性を有する。

【0105】

少なくとも95%同一性、例えば少なくとも96%同一性、例えば少なくとも97%同一性、例えば少なくとも98%同一性、例えば少なくとも99%同一性を有することも可能である。ヌクレオチド相同性比較を、上述のように行うことも可能である。配列比較プログラム、例えば上述のGCG Wisconsin Bestfitプログラムを、この目的のために用いてもよい。デフォルト・スコアリング・マトリックスは、同一のヌクレオチド各々に関して10、そして各ミスマッチに関して-9のマッチ値を有する。デフォルトギャップ生成ペナルティは-50であり、そしてデフォルトギャップ伸長ペナルティは、各ヌクレオチドに関して-3である。

【0106】

患者

治療される患者は、任意の動物またはヒトであってもよい。患者は、好ましくは、非ヒト哺乳動物、より好ましくはヒト患者である。患者は男性であってもまたは女性であってもよい。患者は癌を有してもよいし、または有すると推測されてもよい。いくつかの場合、患者は以前、癌を有すると診断されたことがない。いくつかの場合、患者は癌に関連する症状を示さない。いくつかの場合、患者は癌に対する素因、例えば癌の家族歴、または癌のライフスタイル指標を有することが知られる。いくつかの場合、個体または患者は、以前、癌を有すると診断されている。

【0107】

用語、患者および被験体は、本明細書において交換可能に用いられる。

10

20

30

40

50

癌

本明細書開示の方法は、癌の診断、予後診断、治療または防止に関する。癌はPRL3を発現する癌であることも可能である。癌はPRL3を過剰発現する癌（すなわち非癌組織と比較して上昇したレベルで、または他の癌組織と比較して上昇したレベルで、PRL3を発現する癌）であることも可能である。

【0108】

特に、本明細書開示の方法は、胃癌に関する。方法は、鼻咽頭癌、膀胱癌、肺癌、乳癌または前立腺癌に関することも可能である。いくつかの方法は、結腸癌またはブドウ膜黒色腫に関する。癌は、原発性癌または転移性癌であることも可能である。

【0109】

やはり本明細書において、「癌」は、以下の任意の1またはそれより多くを含むことも可能である：急性リンパ球性白血病（ALL）、急性骨髄性白血病（AML）、副腎皮質癌、肛門癌、膀胱癌、血液癌、骨癌、脳腫瘍、乳癌、女性生殖器系癌、男性生殖器系癌、中枢神経系リンパ腫、子宮頸癌、小児横紋筋肉腫、小児肉腫、慢性リンパ球性白血病（CLL）、慢性骨髄性白血病（CML）、結腸および直腸癌、結腸癌、子宮内膜癌、子宮内膜肉腫、食道癌、眼の癌、胆嚢癌、胃癌、胃腸管癌、毛様細胞白血病、頭頸部癌、肝細胞癌、ホジキン病、下咽頭癌、カボジ肉腫、腎癌、喉頭癌、白血病、肝臓癌、肺癌、悪性線維性組織球腫、悪性胸腺腫、黒色腫、中皮腫、多発性骨髄腫、骨髄腫、鼻腔および副鼻腔癌、鼻咽頭癌、神経系癌、神経芽腫、非ホジキンリンパ腫、口腔癌、中咽頭癌、骨肉腫、卵巣癌、膵臓癌、副甲状腺癌、陰茎癌、咽頭癌、下垂体腫瘍、形質細胞新生物、原発性CNSリンパ腫、前立腺癌、直腸癌、呼吸器、網膜芽細胞腫、唾液腺癌、皮膚癌、小腸癌、軟組織肉腫、胃癌、精巣癌、甲状腺癌、泌尿器系癌、子宮肉腫、膣癌、血管系、ワルデンストレーム・マクログロブリン血症およびウィルムス腫瘍。

【0110】

癌は特定のタイプののものであってもよい。癌のタイプの例には、星状細胞腫、癌腫（例えば腺癌、肝細胞癌、髄様癌、乳頭癌、扁平細胞癌）、神経膠腫、リンパ腫、髄芽腫、黒色腫、骨髄腫、髄膜腫、神経芽腫、肉腫（例えば血管肉腫、軟骨肉腫、骨肉腫）が含まれる。

【0111】

試料

本明細書記載の方法を、患者から得られている試料に対して行ってもよい。したがって、こうした方法をex vivoで行ってもよい。これらをin vitroで行ってもよい。

【0112】

好ましくは、本明細書記載の方法で有用な試料は尿試料である。

いくつかの設定において、試料を体液、より好ましくは体全体を循環する体液から採取する。したがって、試料は血液試料またはリンパ液試料であることも可能である。本発明の方法で適切な他の体液には、血清、尿、唾液および母乳が含まれる。

【0113】

試料は：ある量の血液；フィブリン塊および血球を除去した後に得られる、血液の液体部分を含んでもよい、個体の血液由来のある量の血清；ある量の血漿；ある量の脾液；組織試料または生検；あるいは前記個体から単離された細胞を含んでもよいし、またはこれらに由来してもよい。

【0114】

試料は血液試料または血液由来試料であってもよい。血液由来試料は、患者血液の選択された分画、例えば選択された細胞含有分画あるいは血漿または血清分画であってもよい。

【0115】

試料は、体液試料から調製したエクソソームの試料、例えば尿、血漿または唾液由来のエクソソームの試料であってもよい。試料は、エクソソームの比率が、患者から抽出した

10

20

30

40

50

試料に比較して増加している（すなわちエクソソームが濃縮されている）試料であることも可能である。いくつかの場合、試料は、実質的にエクソソームのみを含有する。

【0116】

診断

診断は、疾患、例えば癌の同定を指す。本明細書に記載する方法を用いて、癌を検出することも可能である。これらを用いて、特定の癌のサブタイプまたはサブクラス、あるいは病期を診断してもよい。

【0117】

本発明の方法にしたがって、癌タンパク質の試料における検出を、患者における癌状態の診断、癌状態に対する素因の診断の目的のために、あるいは癌状態の予後（予後診断）を決定するために、使用可能である。診断または予後診断は、存在する（以前診断された）良性または悪性であってもよい癌状態に関連することも可能であり、あるいは推測される癌状態に関連することも可能であり、あるいは患者における癌状態（以前未診断であってもよい）に関してスクリーニングすることに関連することも可能である。

【0118】

他の診断試験は、本明細書に記載するものと組み合わせて用い、癌状態の診断または予後診断の正確さを増進するか、あるいは本明細書記載の試験を用いることによって得られる結果を確認することも可能である。

【0119】

診断法は、患者試料に対して、または患者試料のプロセッシング後に実行される *in vivo* 法であってもよい。試料が収集されたら、診断の *in vivo* 法が実行されるために、患者が居合わせる必要はなく、そしてしたがって、方法は、ヒトまたは動物の身体に対して行わないものであることも可能である。

【0120】

他の診断試験を、本明細書に記載するものと組み合わせて用いて、診断または予後診断の正確さを増進してもよいし、あるいは本明細書記載の試験を用いることによって得た結果を確認してもよい。

【0121】

予後診断

予後診断、予後診断することおよび予後診断する、は、臨床および非臨床特性に基づいて、個体における将来の転帰のリスクを推定することを指す。特に、本明細書に用いるような予後を決定する方法は、個体または患者の癌の転帰または将来の経過の予測を指す。予後診断には、患者の生存の予測が含まれる。予後診断は、適切な療法治療を決定するために有用でありうる。予後試験は、以前診断されなかった癌状態の診断とともに（例えば同時に）行ってもよいし、あるいは現存する（以前診断された）状態に関連してもよい。

【0122】

予後診断の方法は、患者試料に対して、または患者試料のプロセッシング後に行う *in vivo* 法であってもよい。試料が収集されたら、予後診断 *in vivo* 法が実行されるために、患者が居合わせる必要はなく、そしてしたがって、方法は、ヒトまたは動物の身体に対して行わないものであることも可能である。

【0123】

本明細書に開示するように、試料中の癌タンパク質レベルを用いて、患者癌の予後を示すことも可能である。本明細書に記載するように、上昇した癌タンパク質発現および活性は、より後期またはより進行した癌と相関する可能性もあり、そしてより短い全生存を示しうる。したがって、癌タンパク質レベルの増加は、劣った予後、例えば生存時間減少を示す可能性もある。

【0124】

予後診断を用いて、個体の無病生存時間、無進行生存時間、疾患特異的生存時間、生存率、または生存時間を予測することも可能である。

患者選択

本明細書開示の方法には、治療に適した患者の選択または分類が含まれる。例えば、方法は、抗 P R L 3 抗体療法での治療に適した患者を選択するかまたは分類するために有用でありうる。本明細書において、治療に適していると見なされる被験体は、治療から利益を得るかまたは治療に反応とすると期待される被験体である。被験体は、癌を有するか、または癌を有すると推測されるか、または癌を有するリスクがある可能性もある。被験体は癌の診断を受けていてもよい。特に、被験体は、癌を有するか、または癌を有すると推測されるか、または癌を有するリスクがある可能性もある。いくつかの側面において、患者は、試料における癌タンパク質の存在、または癌タンパク質発現の量、例えば患者由来の尿試料における P R L 3 の存在または量に基づいて選択される。やはり開示するのは、これらの方法によって選択される患者を治療する方法である。

10

【0125】

いくつかの場合、バイオマーカータンパク質、例えば P R L 3 が、非癌患者由来の試料に比較した際、試料において過剰発現されるという観察は、該患者が治療に適していることの指標でありうる。他の場合、非癌患者由来の試料における非存在に比較した際、バイオマーカータンパク質の存在は、該患者が治療に適していることの指標でありうる。

【0126】

検出および定量化

本明細書に開示する方法は、癌タンパク質の検出および／または定量化を伴う。本明細書において、検出は、定量化を伴わない癌タンパク質の測定を指す。P R L 3 ヌクレオチドおよびタンパク質の検出および定量化のための方法は、当該技術分野に周知であり、そして当業者によって容易に認識されるであろう。

20

【0127】

タンパク質は、例えば、イムノアッセイによって検出または定量化可能である。イムノアッセイ法は、当該技術分野に周知であり、そして一般的に：（a）前記タンパク質に対する抗体によって結合可能なエピトープを含むポリペプチドを提供し；（b）抗体－抗原複合体の形成を可能にする条件下で、前記ポリペプチドと生物学的試料をインキュベーションし；そして（c）前記ポリペプチドを含む抗体－抗原複合体が形成されるかどうかを決定する工程を含むであろう。イムノアッセイ法には、ウェスタンブロッティングおよび E L I S A が含まれる。

【0128】

イムノアッセイには、限定されるわけではないが、酵素連結免疫吸着アッセイ（E L I S A）、側方流動試験、ラテックス凝集、イムノクロマトグラフィの他の型、ウェスタンブロット、および／または磁気イムノアッセイが含まれる。

30

【0129】

タンパク質はまた、質量分析を用いて、検出または定量化可能である。例えば、エレクトロスプレーイオン化（E S I）またはマトリックス補助レーザー脱離／イオン化（M A L D I）を用いた質量分析。

【0130】

タンパク質定量化の他の方法には、分光法に基づく方法が含まれる。こうした方法は、比色アッセイまたは分光光度測定アッセイを伴うことも可能である。

40

核酸を検出し、そして定量化するための方法が当該技術分野に周知である。方法には、ポリメラーゼ連鎖反応（P C R）に基づく方法およびハイブリダイゼーション法が含まれる。

【0131】

ポリメラーゼ連鎖反応に基づく方法には、P C R、逆転写 P C R（R T－P C R）、および定量的 R T－P C R が含まれる。こうした方法は、関心対象の D N A 配列に特異的に結合するプライマー、または小分子 D N A 断片を利用する。方法前にまたは方法中に、R N A を D N A に転写することも可能である。

【0132】

上昇した発現または活性

50

本明細書に開示するように、上昇した癌タンパク質発現は、癌患者の劣った予後の指標でありうる。本明細書において、上昇した発現は、増加した発現、高発現または高レベルと交換可能に用いられる。タンパク質発現上昇は、尿中のそのタンパク質のレベル上昇と関連しうる。

【0133】

上昇した発現は、癌タンパク質レベルの増加を意味する。発現は、例えば特定の組織または細胞タイプ内で、例えば腫瘍内または骨髄内で、局所的にまたは全体として上昇していてもよく、あるいは患者の身体全体で上昇していてもよい。上昇した発現は、そのタンパク質または核酸の産生増加によって、あるいはそのタンパク質または核酸の除去または破壊の減少によって、あるいはその両方によって、引き起こされていてもよい。

10

【0134】

上昇した活性は、タンパク質または核酸の量の増加によって、あるいは各個々の分子の活性の増加によって引き起こされていてもよい。これは、遺伝子またはタンパク質配列の突然変異、例えば活性化突然変異によって引き起こされてもよいし、あるいは翻訳後変化、例えば異常なタンパク質リン酸化のためであってもよい。

【0135】

いくつかの場合、癌タンパク質の発現は、非癌個体または非癌組織の発現に比較して、患者または試料において有意に上方制御されている。

対照に比較した癌タンパク質の過剰発現または活性増加は、劣った予後および劣った生存の指標でありうる。癌タンパク質の非常に高い過剰発現または非常に高い活性は、非常に劣った予後、および非常に劣った生存の指標でありうる。

20

【0136】

いくつかの場合、対照の発現または活性より5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、150%、200%、300%、400%、500%、750%または1000%あるいはそれより高い割合は、劣った予後の指標である。

【0137】

いくつかの場合、対照の発現または活性よりも1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、25倍、30倍、35倍、40倍、45倍、50倍、100倍、またはそれより多い発現または活性は、劣った予後の指標である。

30

【0138】

対照

いくつかの場合、方法は、1またはそれより多い対照試料における癌タンパク質と、患者由来の試料における癌タンパク質を比較する工程を含む。

【0139】

比較は、対照試料の分析が、患者由来の試料の分析と同時にまたは連続して行われることを必要としない可能性もある。その代わり、比較は、対照試料から以前得られた結果、例えばデータベースに保存されている結果と行うことも可能である。

40

【0140】

対照試料は、癌の開始前、または癌に関連する症状の観察前に、患者から得られた試料であることも可能である。

対照試料は、別の個体、例えば癌を持たない個体から得た試料であってもよい。個体は、1またはそれより多い特性、例えば性別、年齢、病歴、民族、体重または特定のマーカーの発現にしたがって、患者にマッチしていてもよい。対照試料は、身体の位置から得られていてもよいし、あるいは患者から得た試料と同じ組織または試料タイプのものであってもよい。

【0141】

対照試料は、いくつかの異なる個体または組織に渡る代表値を提供する、試料のコレク

50

ションであってもよい。

いくつかの場合、対照は、参照試料または参照データセットであってもよい。参照は、特定の治療に関して既知の度合いの適切性を持つ被験体から以前得られていた試料であることも可能である。参照は、参照試料を分析することから得られたデータセットであることも可能である。

【0142】

対照は、ターゲット分子が存在するか、または高レベルで発現されることが知られる、陽性対照であることも可能であるし、あるいはターゲット分子が存在しないか、または低レベルで発現されることが知られる、陰性対照であることも可能である。

【0143】

対照は、治療から利益を得ることが知られる被験体由来の組織試料であることも可能である。組織は、試験しようとする試料と同じタイプのものであることも可能である。例えば、治療に適していることが知られる被験体、例えば治療に以前反応したことがある被験体由来の腫瘍組織の対照試料に、被験体由来の腫瘍組織の試料を比較することも可能である。

【0144】

いくつかの場合、対照は、試験試料と同じ被験体から、しかし被験体が健康であったことが知られる時点、例えば被験体が癌ではないことが知られていた時点から得られた試料であることも可能である。したがって、被験体由来の癌組織試料を、非癌組織試料に比較することも可能である。

【0145】

いくつかの場合、対照は細胞培養試料である。

いくつかの場合、試験試料は、その試料に生得的なバックグラウンド染色レベルを決定するため、抗体とインキュベーションする前に分析される。

【0146】

いくつかの場合、アイソタイプ対照を用いる。アイソタイプ対照は、ターゲット特異的抗体と同じクラスであるが、試料と免疫反応しない抗体を用いる。こうした対照は、ターゲット特異的抗体の非特異的相互作用を区別するために有用である。

【0147】

抗癌タンパク質抗体

本明細書開示の方法において有用である抗体を、当該技術分野に知られる任意の方法によって作製することも可能である。用語、抗体には、本明細書において、全抗体および抗体断片、ヒト化、キメラ、および組換え抗体が含まれる。抗体は、モノクローナルまたはポリクローナルであることも可能である。

【0148】

PRL1およびPRL3に結合するであろう抗体が知られる。例えば、Liら、2005に開示される通りである。

抗原結合部分は、抗体の一部（例えばFab断片）または合成抗体断片（例えば一本鎖Fv断片[ScFv]）であってもよい。選択した抗原に対する適切なモノクローナル抗体を、既知の技術、例えば”モノクローナル抗体：技術マニュアル”，H Zola（CRC Press，1988）および”モノクローナルハイブリドーマ抗体：技術および適用”，J G R Hurrell（CRC Press，1982）に開示されるものによって調製することも可能である。キメラ抗体は、Neubergerら（1988，8th International Biotechnology Symposium Part 2，792-799）によって議論される。

【0149】

モノクローナル抗体（mAb）は、本発明の方法において有用であり、そして抗原上の単一のエピトープを特異的にターゲティングする抗体の均一な集団である。当該技術分野に周知の方法を用いて、適切なモノクローナル抗体を調製することも可能である（例えば、Koehler，G.；Milstein，C.（1975）．”あらかじめ

10

20

30

40

50

定義した特異性の抗体を分泌する、融合細胞の連続培養”。Nature 256 (5517): 495; Siegel DL (2002). ”組換えモノクローナル抗体技術”。Schmitz U, Versmold A, Kaufmann P, Frank HG (2000); ”ファージディスプレイ：抗体生成のための分子ツール—概説”。Placenta. 21 Suppl A: S106-12. Helen E. ChaddおよびSteven M. Chamow; ”療法抗体発現技術”, Current Opinion in Biotechnology 12, 第2号 (2001年4月1日): 188-194; McCafferty, J.; Griffiths, A.; Winter, G.; Chiswell, D. (1990). ”ファージ抗体：抗体可変ドメインをディスプレイする糸状ファージ”。Nature 348 (6301): 552-554; ”モノクローナル抗体：技術マニュアル”, H Zola (CRC Press, 1988) および ”モノクローナルハイブリドーマ抗体：技術および適用”, J G R Hurrell (CRC Press, 1982) を参照されたい。キメラ抗体は、Neubergerら (1988, 8th International Biotechnology Symposium Part 2, 792-799) に論じられる)。

【0150】

ポリクローナル抗体は、本発明の方法に有用である。単一特異性ポリクローナル抗体が好ましい。当該技術分野に周知の方法を用いて、適切なポリクローナル抗体を調製することも可能である。

【0151】

抗体断片、例えばFabおよびFab2断片もまた使用可能であり、遺伝子操作抗体および抗体断片も使用可能である。抗体の可変重鎖 (VH) および可変軽鎖 (VL) ドメインが抗原認識に関与し、この事実は、先のプロテアーゼ消化実験によって最初に認識された。さらなる確証は、齧歯類抗体の「ヒト化」によって見出された。生じる抗体が、齧歯類親抗体の抗原特異性を保持するように、齧歯類起源の可変ドメインをヒト起源の定常ドメインに融合させてもよい (Morrisonら (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6851-6855)。

【0152】

抗原特異性は、可変ドメインによって与えられ、そして定常ドメインに独立であることは、すべて1またはそれより多い可変ドメインを含有する抗体断片の細菌発現を伴う実験から知られる。これらの分子には、Fab様分子 (Betterら (1988) Science 240, 1041); Fv分子 (Skerraら (1988) Science 240, 1038); VHおよびVLパートナードメインが、柔軟なオリゴペプチドを通じて連結されている一本鎖Fv (ScFv) 分子 (Birdら (1988) Science 242, 423; Hustonら (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5879) ならびに単離されたVドメインを含む単一ドメイン抗体 (dAb) (Wardら (1989) Nature 341, 544) が含まれる。特異的結合部位を保持する抗体断片の合成に関与する技術の一般的な概説は、WinterおよびMilstein (1991) Nature 349, 293-299に見出される。

【0153】

「ScFv分子」によって、本発明者らは、VHおよびVLパートナードメインが、例えば直接、ペプチドによってまたは柔軟なオリゴペプチドによって共有結合される分子を意味する。Fab、Fv、ScFvおよびdAb抗体断片は、すべて、大腸菌 (E. coli) において発現され、そしてそこから分泌されることが可能であり、したがって、前記断片を多量に容易に産生することが可能である。

【0154】

全抗体、およびF(ab')₂断片は、「二価」である。「二価」によって、本発明者らは、前記抗体およびF(ab')₂断片が2つの抗原結合部位を有することを意味する

。対照的に、F a b、F v、S c F vおよびd A b断片は、1つの抗原結合部位しか持たない、一価である。P R L 3に結合する合成抗体もまた、当該技術分野に周知であるようなファージディスプレイ技術を用いて作製可能である（例えば、“ファージディスプレイ：抗体生成のための分子ツール—概説”，Placenta, 21 Suppl A: S106-12, Helen E. ChaddおよびSteven M. C hamow; “ファージ抗体：抗体可変ドメインをディスプレイする糸状ファージ”，Nature 348 (6301): 552-554を参照されたい）。

【0155】

いくつかの好ましい態様において、抗体は、検出可能に標識されるか、または少なくとも検出可能である。例えば、抗体を放射性原子または着色分子または蛍光分子または任意の他の方式で容易に検出可能な分子で標識してもよい。適切な検出可能分子には、蛍光タンパク質、ルシフェラーゼ、酵素基質、および放射標識が含まれる。抗体は、検出可能標識で直接標識されてもよいし、または間接的に標識されてもよい。例えば、抗体を標識しなくてもよく、そしてそれ自体が標識されている別の抗体によって検出してもよい。あるいは、第二の抗体がビオチンに結合していてもよく、そして標識ストレプトアビジンのビオチンへの結合を用いて、第一の抗体を間接的に標識する。

【0156】

抗体は、エピトープK A K F Y Nおよび／またはH T H K T Rに結合可能な抗体であってもよい。抗体は、L iら、2005に報告されるようなハイブリドーマ・クローン223またはハイブリドーマ・クローン318由来のマウス抗P R L 3抗体と同一の配列を有する抗体であってもよい。抗体は、L iら、2005に記載されるハイブリドーマ・クローン223またはハイブリドーマ・クローン318由来の抗体とのターゲット結合に関して競合することも可能である。抗体はヒト化抗体、キメラ抗体または完全ヒト抗体であってもよい。抗体は、本明細書記載の抗体に相同であってもよい。

【0157】

上に示すように、配列同一性に関して、「相同体」は、適切な配列に対して、例えば少なくとも5%同一性、少なくとも10%同一性、少なくとも15%同一性、少なくとも20%同一性、少なくとも25%同一性、少なくとも30%同一性、少なくとも35%同一性、少なくとも40%同一性、少なくとも45%同一性、少なくとも50%同一性、少なくとも55%同一性、少なくとも60%同一性、少なくとも65%同一性、少なくとも70%同一性、少なくとも75%同一性、少なくとも80%同一性、少なくとも82%同一性、少なくとも84%同一性、少なくとも86%同一性、少なくとも88%同一性、少なくとも90%同一性、少なくとも92%同一性、少なくとも94%同一性、少なくとも96%同一性、または少なくとも98%同一性を有する。適切な配列は、C D R配列、あるいは重鎖および／または軽鎖可変鎖の配列に渡ってもよい。

【0158】

方法

本発明記載の方法をin vitroまたはex vivoで行うことも可能である。用語「in vitro」は、材料、生物学的物質、細胞および／または組織を用いた、実験室条件中または培養中の実験を含むよう意図される。「ex vivo」は、生物外部、例えばヒトまたは動物体外で存在するかまたは外部で行われる何かを指し、これは生物から取り出された組織（例えば全器官）または細胞上であることも可能である。

【0159】

本明細書開示の方法は、タンパク質発現の決定に関する。細胞、組織または試料においてタンパク質の量を定量化することによって、あるいは細胞および組織内でタンパク質の局在を観察することによって、タンパク質発現を測定することも可能である。

【0160】

いくつかの場合、イムノアッセイを用いて、被験体由来の試料においてターゲット（例えばP R L 3）を検出する。イムノアッセイは、検出可能な分子と組み合わせて、ターゲット分子に関する特異的アフィニティを持つ抗体を用いる。いくつかの場合、抗体を検出

可能分子にコンジュゲート化する。検出可能分子は標識と称されることも可能である。検出可能分子は、抗体がターゲット分子に結合した際、検出可能シグナルを生じる。検出可能シグナルは、定量化可能シグナルであることも可能である。いくつかの場合、アプタマーを抗体の代わりにまたは抗体とともに用いる。イムノアッセイには、免疫組織化学、E L I S A、イムノブロットティングおよびフローサイトメトリーが含まれる。本明細書記載の特定の側面において、アッセイは免疫組織化学アッセイである。こうしたアッセイは、一般的に、抗体を用いるが、他のターゲット特異的分子、例えばアプタマーまたは他のリガンドを用いることも可能である。

【0161】

方法は監督官庁によって使用に関して認可されることも可能である。方法はF D Aに認可された方法であることも可能である。

10

E L I S A

いくつかの場合、ターゲットをE L I S A（酵素連結免疫吸着アッセイ）によって検出することも可能である。試料由来のターゲット分子を表面に付着させ、そして特異的抗体を用いて検出する。ターゲットを表面に非特異的に（表面への吸着を通じて）または特異的に（特異的捕捉剤、例えば抗体）付着させることも可能である。E L I S Aを用いて、試料中のターゲットを定量化することも可能である。E L I S Aは、液体試料、例えば血清、尿または唾液の分析に特に適している。

【0162】

イムノブロットティング

いくつかの側面において、イムノブロットティングまたはウェスタンブロットティングによってターゲットを検出する。こうした方法において、試料中のタンパク質は、電荷またはサイズに基づいて分離される。これらを電気泳動に基づく方法によって分離することも可能である。分離されたタンパク質を膜にトランスファーして、ここでこれらのタンパク質は、ターゲットに特異的な抗体で染色される。次いで、検出可能な標識にコンジュゲート化された抗体によって直接、または標識二次抗体を添加することによって間接的にのいずれかで、検出する。

20

【0163】

治療

本明細書に開示する診断法を用いて、療法の選択を導くことも可能である。該方法を用いて、治療、例えば特定のタイプの治療に関して、患者を選択することも可能である。該方法を用いて、特定の療法の進行、または成功を監視することも可能である。該方法を用いて、治療に関して患者を選択することも可能である。やはり本明細書に開示するのは、治療法であって、患者由来の尿試料において、1またはそれより多い癌タンパク質の存在またはレベルに基づいて、治療に関して選択された患者を治療する工程を含む、前記方法である。

30

【0164】

治療は、癌の症状の軽減を生じることも可能であるし、または癌の完全な治療を生じることも可能である。治療は癌の進行を遅延させることも可能であるし、または癌の症状の悪化を防止することも可能である。特に好ましい態様において、方法を用いて、治療に関して患者を選択するか、あるいは抗細胞内癌タンパク質抗体、例えば抗P R L 3抗体での治療の進行または成功を監視することも可能である。

40

【0165】

本発明の側面にしたがった薬剤および薬学的組成物を、限定されるわけではないが、非経口、静脈内、動脈内、筋内、腫瘍内、口腔および鼻を含むいくつかの経路による投与のために配合することも可能である。薬剤および組成物を液体または固体型で配合してもよい。液体配合物を、ヒトまたは動物の身体の選択した領域への注射による投与のために配合してもよい。

【0166】

投与は、好ましくは、個体への利益を示すために十分な「療法的有効量」である。投与

50

する実際の量、ならびに投与速度および時間的経過は、治療中の疾患の性質および重症度に応じるであろう。治療の処方、例えば投薬量等に関する決定は、開業医および他の医師の責任の範囲内であり、そして典型的には、治療される障害、個々の患者の状態、送達部位、投与法および医師に知られる他の要因を考慮する。上述の技術およびプロトコルの例は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 第20版, 2000, Lippincott, Williams & Wilkins 刊行に見出されうる。

【0167】

治療は、1より多い療法剤の投与を伴ってもよい。治療しようとする状態に応じて、剤を単独で、あるいは他の治療と組み合わせて、同時にまたは連続してのいずれかで投与してもよい。例えば、治療は、1またはそれより多くが癌を治療することを意図しうる、2つの剤の投与を伴う共療法であってもよい。したがって、抗PRL3抗体を、別の薬剤、例えば化学療法剤、プロドラッグ、抗体またはホルモン治療とともに投与してもよい。治療はさらに、放射療法を伴ってもよい。

【0168】

治療および療法の例には、限定されるわけではないが、化学療法（例えば薬剤、例えば化学療法剤を含む、活性剤投与）；手術；および放射線療法が含まれる。

「化学療法剤」は、作用機構に関わらず、癌の治療に有用な化学的化合物である。化学療法剤のクラスには、限定されるわけではないが：アルキル化剤、代謝拮抗剤、紡錘体毒植物アルカロイド、細胞傷害性／抗腫瘍抗生物質、トポイソメラーゼ阻害剤、抗体、光増感剤、およびキナーゼ阻害剤が含まれる。化学療法剤には、「ターゲティング療法」および慣用的化学療法で用いる化合物が含まれる。

【0169】

化学療法剤の例には：レナリドミド（REVLIMID（登録商標）、Celgene）、ボリノスタット（ZOLINZA（登録商標）、Merck）、パノビノスタット（FARYDAK（登録商標）、Novartis）、モセティノスタット（MGCD0103）、エベロリムス（ZORTRESS（登録商標）、CERTICAN（登録商標）、Novartis）、ベンダムスチン（TREAKISYM（登録商標）、RIBOMUSTIN（登録商標）、LEVACT（登録商標）、TREANDA（登録商標）、Mundipharma International）、エルロチニブ（TARCEVA（登録商標）、Genentech/OSI Pharm.）、ドセタキセル（TAXOTERE（登録商標）、Sanofi-Aventis）、5-FU（フルオロウラシル、5-フルオロウラシル、CAS No. 51-21-8）、ゲムシタビン（GEMZAR（登録商標）、Lilly）、PD-0325901（CAS No. 391210-10-9、Pfizer）、シスプラチン（シス-ジアミン、ジクロロ白金（II）、CAS No. 15663-27-1）、カルボプラチン（CAS No. 41575-94-4）、パクリタキセル（TAXOL（登録商標）、Bristol-Myers Squibb Oncology、ニュージャージー州プリンストン）、トラスツズマブ（HERCEPTIN（登録商標）、Genentech）、テモゾロミド（4-メチル-5-オキソ-2, 3, 4, 6, 8-ペントアザビシクロ[4.3.0]ノナ-2, 7, 9-トリエン-9-カルボキサミド、CAS No. 85622-93-1、TEMODAR（登録商標）、TEMODAL（登録商標）、Schering Plough）、タモキシフェン（（Z）-2-[4-（1, 2-ジフェニルブト-1-エニル）フェノキシ]-N, N-ジメチルエタンアミン、NOLVADEX（登録商標）、ISTUBAL（登録商標）、VALODEX（登録商標））、およびドキソルビシン（ADRIAMYCIN（登録商標））、Akti-1/2、HPPD、およびラパマイシンが含まれる。

【0170】

化学療法剤のより多くの例には：オキサリプラチン（ELOXATIN（登録商標）、Sanofi）、ボルテゾミブ（VELCADE（登録商標）、Millennium

10

20

30

40

50

Pharm.)、スーテント (SUNITINIB (登録商標)、SU11248、Pfizer)、レトロゾール (FEMARA (登録商標)、Novartis)、メシル酸イマチニブ (GLEEVEC (登録商標)、Novartis)、XL-518 (Mek阻害剤、エキセリキス、WO 2007/044515)、ARRY-886 (Mek阻害剤、AZD6244、Array BioPharma、Astra Zeneca)、SF-1126 (PI3K阻害剤、Semafore Pharmaceuticals)、BEZ-235 (PI3K阻害剤、Novartis)、XL-147 (PI3K阻害剤、Exelixis)、PTK787/ZK 222584 (Novartis)、フルベストラント (FASLODEX (登録商標)、AstraZeneca)、ロイコボリン (フォリン酸)、ラパマイシン (シロリムス、RAPAMUNE (登録商標)、Wyeth)、ラパチニブ (TYKERB (登録商標)、GSK572016、Glaxo Smith Kline)、ロナファルニブ (SARASARTM、SCH 66336、Schering Plough)、ソラフェニブ (NEXAVAR (登録商標)、BAY43-9006、Bayer Labs)、ゲフィチニブ (IRESSA (登録商標)、AstraZeneca)、イリノテカン (CAMPTOSAR (登録商標)、CPT-11、Pfizer)、ティピファルニブ (ZARNESTRATM、Johnson & Johnson)、ABRAXANETM (Cremophor 不含)、パクリタキセルのアルブミン操作ナノ粒子配合物 (American Pharmaceutical Partners、イリノイ州ショームバーグ)、バンデタニブ (rINN、ZD6474、ZACTIMA (登録商標)、AstraZeneca)、クロラムブシル、AG1478、AG1571 (SU 5271; Sugen)、テムシロリムス (TORISEL (登録商標)、Wyeth)、パゾパニブ (GlaxoSmithKline)、キャンホスファミド (TELCYTA (登録商標)、Telik)、チオテパおよびシクロホスファミド (CYTOXAN (登録商標)、NEOSAR (登録商標)) ; スルホン酸アルキル、例えばブスルファン、イムプロスルファンおよびピボスルファン ; アジリジン、例えばベンゾドパ、カルボクオン、メツレドパ、およびウレドパ ; アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチレンチオホスホラミドおよびトリメチロメラミンを含むエチレンイミンおよびメチラメラミン ; アセトゲニン (特にブラタシンおよびブラタシノン) ; カンプトテシン (合成類似体トボテカンを含む) ; ブリオスタチン ; カリスタチン ; CC-1065 (アドゼレシン、カルゼレシンおよびビゼレシン合成類似体を含む) ; クリプトフィシン (特に、クリプトフィシン1およびクリプトフィシン8) ; ドラスタチン ; デュオカルマイシン (合成類似体、KW-2189およびCB1-TM1を含む) ; エリュテロビン ; パンクラティスタチン ; サルコジクティン ; スポンジスタチン ; ナイトロジェンマスタード、例えばクロラムブシル、クロルナファジン、クロロホスファミド、エストラムスチン、イフォスファミド、メクロレタミン、酸化メクロレタミン塩酸、メルファラン、ノベムビチン、フェネステリン、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスタード ; ニトロソ尿素、例えばカルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、およびラニムスチン ; 抗生物質、例えばエンジイン抗生物質 (例えば、カリケアマイシン、カリケアマイシン・ガンマ11、カリケアマイシン・オメガ11 (Angew Chem. Intl. Ed. Engl. (1994) 33:183-186) ; ダイネマイシン、ダイネマイシンA ; ビホスホネート、例えばクロドロネート ; エスペラマイシン ; ならびにネオカルジノスタチン発色団および関連色素タンパク質エンジイン抗生物質発色団)、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、アウスラマイシン (authramycin)、アザセリン、プレオマイシン、カクチノマイシン、カラビシン、カルミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、モルホリノードキソルビシン、シアノモルホリノードキソルビシン、2-ピロリノードキソルビシンおよびデオキシドキソルビシン)、エピルビシン、エソルビシン、イダルビシン、ネモルビシン、マルセロマイシン、マイトマイシン、例えばマイトマイシンC、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン

、ペプロマイシン、ポルフィロマイシン、ピューロマイシン、ケラマイシン、ロドルビシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルビシン；代謝拮抗剤、例えばメトトレキセートおよび5-フルオロウラシル（5-FU）；葉酸類似体、例えばデノプテリン、メトトレキセート、プテロプテリン、トリメトトレキセート；プリン類似体、例えばフルダラビン、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニン；ピリミジン類似体、例えばアンシタビン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、フロクスウリジン；アンドロゲン、例えばカルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトン；抗副腎剤、例えばアミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタン；葉酸補充剤、例えばフロリン酸（f r o l i n i c a c i d）；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド；アミノレブリン酸；エニルウラシル；アムサクリン；ベストラブシル；ビスアントレン；エダトラキセート（e d a t r a x a t e）；デフォファミン；デメコルシン；ジアジコン；エルフォルニチン；酢酸エリプチニウム；エポチロン；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシ尿素；レンチナン；ロニダイニン；メイタンシノイド、例えばメイタンシンおよびアンサミトシン；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モピダンモール（m o p i d a n m o l）；ニトラエリン（n i t r a e r i n e）；ペントスタチン；フェナメト；ピラルビシン；ロソキサントロン；ポドフィリン酸；2-エチルヒドラジド；プロカルバジン；PSK（登録商標）多糖複合体（J H S N a t u r a l P r o d u c t s、オレゴン州ユージーン）；ラゾキサン；リゾキシン；シゾフィラン；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジコン；2, 2', 2"-トリクロロトリエチルアミン；トリコテセン（特にT-2毒素、ベラキュリンA、ロリジンAおよびアングジン）；ウレタン；ビンデシン；ダカルバジン；マノムスチン；ミトプロニトール；ミトラクトール；ピポプロマン；ガシトシン；アラビノシド（「A r a - C」）；シクロホスファミド；チオテパ；6-チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキセート；白金類似体、例えばシスプラチンおよびカルボプラチン；ビンブラスチン；エトポシド（V P - 1 6）；イホスファミド；ミトキサントロン；ピンクリスチン；ビノレルビン（N A V E L B I N E（登録商標））；ノバントロン；テニポシド；エダトレキセート；ダウノマイシン；アミノプテリン；カペシタビン（X E L O D A（登録商標）、R o c h e）；イバンドロネート；C P T - 1 1；トポイソメラーゼ阻害剤R F S 2 0 0 0；ジフルオロメチルオルニチン（D M F O）；レチノイド、例えばレチノイン酸；ならびに上記のいずれかの薬学的に許容されうる塩、酸および誘導体が含まれる。剤の組み合わせ、例えばCHP（ドキシソルビシン、プレドニゾン、シクロホスファミド）、またはCHOP（ドキシソルビシン、プレドニゾン、シクロホスファミド、ピンクリスチン）を使用してもよい。

【0171】

「化学療法剤」の定義にやはり含まれるのは：（i）例えば、タモキシフェン（N O L V A D E X（登録商標）；クエン酸タモキシフェンを含む）、ラロキシフェン、ドロロキシフェン、4-ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン、ケオキシフェン、L Y 1 1 7 0 1 8、オナプリストン、およびF A R E S T O N（登録商標）（クエン酸トレミフィン）を含む、抗エストロゲンおよび選択的エストロゲン受容体調節剤（S E R M）のように、腫瘍に対するホルモン作用を制御するかまたは阻害するよう作用する、抗ホルモン剤；（i i）副腎におけるエストロゲン産生を制御する、酵素アロマターゼを阻害するアロマターゼ阻害剤、例えば4（5）-イミダゾール、アミノグルテチミド、M E G A S E（登録商標）（酢酸メゲストロール）、A R O M A S I N（登録商標）（エキセメスタン；P f i z e r）、フォルメスタン、ファドロゾール、R I V I S O R（登録商標）（ボロゾール）、F E M A R A（登録商標）（レトロゾール；N o v a r t i s）、およびA R I M I D E X（登録商標）（アナストロゾール；A s t r a Z e n e c a）など；（i i i）抗アンドロゲン、例えばフルタミド、ニルタミド、ピカルタミド、リュープロリド、およびゴセレリン；ならびにトロキサシタビン（1, 3-ジオキソランヌクレオシドシトシン類似体）；（i v）プロテインキナーゼ阻害剤、例えばM E K阻害剤（W O 2 0

10

20

30

40

50

07/044515) ; (v) 脂質キナーゼ阻害剤 ; (vi) アンチセンスオリゴヌクレオチド、特に異常な細胞増殖に關与するシグナル伝達経路における遺伝子、例えばPKC- α 、RafおよびH-Rasの発現を阻害するもの、例えばオブリメルセン (GENASENSE (登録商標)、Genta Inc.) ; (vii) リボザイム、例えばVEGF発現阻害剤 (例えばANGIOZYME (登録商標)) およびHER2発現阻害剤 ; (viii) ワクチン、例えば遺伝子療法ワクチン、例えばALLOVECTIN (登録商標)、LEUVECTIN (登録商標)、およびVAXID (登録商標) ; PROLEUKIN (登録商標) rIL-2 ; トポイソメラーゼI阻害剤、例えばLURTOTECAN (登録商標) ; ABARELIX (登録商標) rmRH ; (ix) 抗血管形成剤、例えばベバシズマブ (AVASTIN (登録商標)、Genentech) ; ならびに上記いずれかの薬学的に許容されうる塩、酸および誘導体である。

10

【0172】

「化学療法剤」の定義にやはり含まれるのは、療法抗体、例えばアレムツズマブ (Campath)、ベバシズマブ (AVASTIN (登録商標)、Genentech) ; セツキシマブ (ERBITUX (登録商標)、Imclone) ; パニツムマブ (VECTIBIX (登録商標)、Amgen)、リツキシマブ (RITUXAN (登録商標)、Genentech/BioGen Idec)、オフアツムマブ (ARZERRA (登録商標)、GSK)、ペルツズマブ (PERJETATM、OMNITARGTM、2C4、Genentech)、トラスツズマブ (HERCEPTIN (登録商標)、Genentech)、トシツモマブ (Bexxar、Corixa)、MDX-060 (Medarex) および抗体薬剤コンジュゲート、ゲムツズマブ・オゾガマイシン (MYLOTARG (登録商標)、Wyeth) である。

20

【0173】

本発明のコンジュゲートと組み合わせて、化学療法剤として療法的潜在性を持つヒト化モノクローナル抗体には：アレムツズマブ、アポリズマブ、アセリズマブ、アトリズマブ、バピニューズマブ、ベバシズマブ、ビバツズマブ・メルタンシン、カンツズマブ・メルタンシン、セデリズマブ、セルトリズマブ・ペゴール、シドフシツズマブ、シドツズマブ、ダクリズマブ、エクリズマブ、エファリズマブ、エブラツズマブ、エルリズマブ、フェルビズマブ、フォントリズマブ、ゲムツズマブ・オゾガマイシン、イノツズマブ・オゾガマイシン、イピリムマブ、ラベツズマブ、リンツズマブ、マツズマブ、メポリズマブ、モタビズマブ、モトビズマブ、ナタリズマブ、ニモツズマブ、ノロビズマブ、ヌマビズマブ、オクレリズマブ、オマリズマブ、パリビズマブ、パスコリズマブ、ペクフシツズマブ、ペクツズマブ、ペルツズマブ、ペキセリズマブ、ラリビズマブ、ラニビズマブ、レスリビズマブ、レスリズマブ、レシビズマブ、ロベリズマブ、ルブリズマブ、シブロッツズマブ、シブリズマブ、ソンツズマブ、タカツズマブ・テトラキセタン、タドシズマブ、タリズマブ、テフィバズマブ、トシリズマブ、トラリズマブ、トラスツズマブ、ツコツズマブ・セルモロイキン、ツクシツズマブ、ウマビズマブ、ウルトキサズマブ、およびビジリズマブが含まれる。

30

【0174】

治療監視

やはり本明細書に開示するのは、療法治療の成功を監視する方法である。こうした方法は、異なる時点の同じ患者に由来する2またはそれより多い試料の比較を伴う。例えば、治療を開始する前に、または開始する時点で、試料を採取することも可能である。こうした試料を、治療開始後、例えば治療開始1週間後、1ヶ月後、2ヶ月後、3ヶ月後、4ヶ月後、5ヶ月後、6ヶ月後、7ヶ月後、8ヶ月後、9ヶ月後、10ヶ月後、11ヶ月後、12ヶ月後、14ヶ月後、16ヶ月後、18ヶ月後または2年後に採取した試料に比較してもよい。尿中のバイオマーカーレベルの減少は、治療が成功した指標となりうる。尿中のバイオマーカーレベルの増加、またはバイオマーカーレベルの有意な変化がないことは、より徹底的な治療が必要とされる、例えば療法剤の投薬量増加、または療法措置へのさらなる剤の追加が必要である指標となりうる。あるいは、こうした増加または有意でない

40

50

変化は、存在する治療の代わりに別の治療を行うべきであることの指標でありうる。

【0175】

疾患の再燃または再発を監視するなどのため、治療を終えた後に試料の1つが採取されていてもよい。例えば治療を止めた1ヶ月後、3ヶ月後、6ヶ月後、9ヶ月後、12ヶ月後、18ヶ月後、2年後、2～5年後、3年後、5年後またはそれより後であってもよい。例えば、最後の投薬後、または患者が癌を持たないと決定された後であってもよい。

【0176】

本発明には、こうした組み合わせが明らかに許容し得ないか、または明確に回避される場合を除いて、記載する側面および好ましい特徴の組み合わせが含まれる。

本明細書で用いるセクション見出しは、構成目的のみのためであり、そして記載する主題を限定すると見なされないものとする。

10

【0177】

本テキストに言及するすべての文書は、本明細書に援用される。

本発明の1またはそれより多い態様の詳細を、例として、本発明を実行するために本発明者らに意図される最適な様式の特定の詳細を含めて、以下の付随する説明に示す。当業者には、これらの特定の詳細に限定されることなく、本発明を実施可能であることが明らかであろう。

【実施例】

【0178】

実施例 1

20

本発明者らは、101の癌の尿（26の膀胱癌、44の肺癌、10の乳癌、6の胃癌、15のNPC）、および11の正常尿から、細胞内癌タンパク質：PRL-3、PRL-1、VHZ、c-myc、H-ras、AKT-1、p53、Rac1、FAK、Runx1、エストロゲン受容体、PTEN、b-アクチン、GAPDHを調べた。本発明者らはしばしば、癌の尿において、これらの細胞内癌タンパク質を検出する。本発明者らはまた、癌の尿においてGAPDHおよびb-アクチンの突然変異型も検出する（が正常尿ではしない）。これらの結果を図1～8に示す。

【0179】

本発明者らは、81の癌の尿（6の膀胱癌、44の肺癌、10の乳癌、6の胃癌、15のNPC）および11の正常尿から、細胞外癌タンパク質：Her2、N-カドヘリン、PDGF受容体（アルファ）、FLT-3、p-EGFRを調べ、ウェスタンブロットを用いて、6の膀胱癌の尿のうち3つで低レベルのFLT-3を検出したのみだった。

30

【0180】

本発明者らは、癌の尿において、細胞外癌タンパク質よりも細胞内癌タンパク質を（はるかにより頻繁に）検出したが、正常尿においては検出しなかった。理論によって束縛されることは望ましくないが、これは、細胞外癌タンパク質が、脂質二重層により緊密に会合している可能性があり、したがって、これらは細胞膜から解離して、そしてエクソソームとともに尿内に移動することがより困難であることを示唆する。しかし、細胞内癌タンパク質は、より容易にそして自由に形成され、そしてエクソソームを通じて分泌されて、体液（血液、尿、唾液）内へと移動することが可能である。本発明者らの知見は、癌治療に用いた癌バイオマーカーの診断を容易にするであろう。

40

【0181】

実施例 2：エクソソーム単離およびキット

本実施例は、体液試料中のエクソソームからタンパク質を得るためのサンプル・プロトコルを提供する。該プロトコルを図9に示す。

【0182】

プロトコル：カタログ番号EXOAB-KIT-1

試料が凍結されている場合、氷上で融解する

10ml 試料 + 2ml ExoQuick-TCを合わせる（すなわち、試料が500μlであれば、100μlのExoQuick-TCを合わせる）

50

3 回反転することによってよく混合する

4 ℃で一晩置く

1 5 0 0 x g で 3 0 分間遠心分離する（または 1 . 5 r f c ）

上清を取り除き、エクソソームペレットを保持する

1 5 0 0 x g で 5 分間遠心分離して、液体のすべての痕跡を取り除く

1 0 0 μ l R I P A （放射免疫沈殿アッセイ）緩衝液または P B S （ペレットによる）をエクソソームペレットに添加し、そして簡単に 1 5 秒間ボルテックスする。

【0183】

室温に 2 0 分間置き、そして 5 9 5 n m でタンパク質を読み取る

S D S 色素を添加し、そして試料を 1 0 0 ℃で 5 分間加熱する

ウェスタンブロットを行う。

10

【0184】

実施例 3：原型迅速試験デバイスの評価

I. 目的

1. 患者尿試料におけるバイオマーカー P R L 3 の検出のための原型迅速試験デバイスを開発する可能性を研究する。

【0185】

I I. 背景

バイオマーカー P R L 3 は、シンガポール国立大学 I M C B の Z e n g Q i 博士によって、1 9 9 8 年に発見された。数千の癌患者において、P R L 3 レベルが上昇していることが示された。Z e n g 博士は、2 つのモノクローナルおよび 2 つのウサギ抗体抗 P R L 3 を開発した。本研究は、これらの 4 つの抗体を評価し、そしてこれらの抗体を用いて、癌および正常個人の間の尿を区別する、側方流動技術を用いた免疫クロマトグラフィデバイスを開発する実現可能性を調べることを意図する。

20

【0186】

迅速試験形式（側方流動デバイス）は、短いアッセイ時間（試験結果を見るために 1 0 ～ 2 0 分しか必要としない）の利点を有する。アッセイはまた、特別な装置を伴わずに、現場または医院で実行可能である。Z e n g 博士は、こうした迅速試験を開発することに関心を持ち、そして A D C o n s u l t a n t （アリゾナ州フェニックス）と、これらの抗体を用いることによって実現可能性試験を実行する契約を結んだ。以下がこの研究の結果である。

30

【0187】

I I I. 推奨：

I V 部の結論に基づいて、本発明者らは以下を推奨する：

・セットアップ 明細

1. 感度、未定
2. 特異性、未定
3. 検出限界（L O D）：未定
4. 1 5 分間アッセイ
5. 試料タイプ：尿試料
6. 保管：室温
7. 使用期限：製造後 2 4 ヶ月
8. 緩衝研究：未定
9. 提出タイプ：未定
- 1 0. 時間スケジュール：未定

40

・迅速試験のため、捕捉抗体として M o A b 2 2 3 （コーティングのため）および検出剤として（金粒子にコンジュゲート化された）ウサギ抗 P R L 3 （1 9 9 2）を用いる。

【0188】

- ・抗体 2 2 3 が結合する固相としてニトロセルロース膜 A E 9 9 を用いる。

50

・臨床試料（５０陽性および１００陰性）を泳動して、この原型の特異性および感度を決定する

・必要な場合、さらなる改善には、アフィニティ精製ウサギ抗 P R L 3 抗体を用いることによって達成される感度および特異性の増加が含まれるであろう。

【 0 1 8 9 】

・必要な場合さらなる修飾のためにフィードバックする。

I V . 結 論 :

1 . M o A b 2 2 3 およびポリクローナル抗体 1 9 9 2 は、P R L 3 迅速試験を開発するために最適な対である。M o A b 2 2 3 を検出剤として、そしてポリクローナル 1 9 9 2 を捕捉剤として用いた（V . 2 を参照されたい）。 10

【 0 1 9 0 】

2 . 1 0 ~ 2 0 n g の P R L 3 - G S T / m l の検出可能性は、1 5 分間で達成可能である（V . 3 . 3 を参照されたい）。

3 . 1 2 . 5 n g / m l ~ 4 , 0 0 0 n g / m l の反応曲線を V . 3 . 1 に示した。

【 0 1 9 1 】

4 . 陰性尿および低レベル試料再現性を V . 3 . 2 に示した。

5 . この原型は、1 つの陽性尿（B）を他の 8 つの陰性尿試料から区別可能である（3 . 4 を参照されたい）

6 . 抗体精製は V . 1 であった。 20

【 0 1 9 2 】

7 . 抗体目録は V I であった。

V . 試 験 結 果 お よ び 考 察 :

1 . 抗体精製

ハイブリドーマ 2 2 3 および 3 1 8 の腹水、ならびに 1 9 9 2 および 1 9 9 3 の抗血清を 2 0 1 4 年 5 月 2 8 日に受け取った。4 つの抗体はすべて、タンパク質を用いて精製された。結果を表に要約する。

【 0 1 9 3 】

モノクローナルおよびポリクローナル抗体のプロテイン G 精製の要約

【 0 1 9 4 】 30

【表 3】

抗血清/腹水	体積, ml	プロテインG精製 抗体	抗血清または腹 水からの抗体収 量	ロット番号
MoAb 318, 腹水	5.1	3.42mg/ml x 3ml = 10.26 mg	10.26 mg/5.1 mg = 2.0 mg /ml	R-1405001
MoAb 223, 腹水	2.3	5.96 mg/ml x 0.82m = 4.88 mg 2.06mg/ml x 0.35 ml = 0.72 mg	5.6 mg / 2.3 ml = 2.4 mg/ml	R-1405002-1 R-1405002-2
ウサギ抗 PRL3 抗血清 #1992	5.5 ml	4.45 mg/ml x 14.3 ml = 63.6 mg	63.6 mg /5.5 ml = 11.56 mg/ml	R-1406002
ウサギ抗 PRL3 抗血清 #1993	6 ml	3.54 mg/ml x 17.8 ml = 63 mg	63 mg /6 ml = 10.44 mg/ml	R-1406003

【0195】

抗体純度を SDS-PAGE によって試験した。図 10 を参照されたい。

考察：

1. PAGE には、軽鎖（25 kDa）および重鎖（55 kDa）のみが見られた。抗体純度は満足のいくものである。

【0196】

2. 腹水からの抗体回収量は 2.0～2.5 mg/ml である。これは、透析および濃縮後に計算され、そして少量の腹水（5.1 ml および 2.3 ml）に基づいた。

3. 2 匹のウサギの抗血清からの抗体回収量は、それぞれ、10～11 mg/ml であった。

【0197】

2. 最適マッチ対に関する研究

抗体対形成のための設計チャート

【0198】

10

20

30

40

50

【表 4】

		Au - Ab コンジュゲート			
		MoAb 223	MoAb 318	ウサギ抗 PRL3 #1992	ウサギ抗 PRL3 #1993
コーティング抗体	MoAb 223	1	2	3	4
	MoAb 318	5	6	7	8
	ウサギ抗 PRL3 #1992	9	10	11	12
	ウサギ抗 PRL3 #1993	13	14	15	16

10

20

【 0 1 9 9 】

16 対を研究し、そして結果を以下の 2 つの表に列挙する。

陰性試料試験結果

【 0 2 0 0 】

【表 5】

抗体対#	試料緩衝液 6190	尿 1	尿 2	dH ₂ O	PBS
1	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0
9	3	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0
11	3	0	0	0	2
12	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0
15	0	0	3	0	0
16	0	0	3	0	0

【0201】

陽性対照試験結果

【0202】

【表 6】

抗体対	PRL3 GST 100 ng/ml
1	2
3	0
4	6
4	3
5	2
6	3
7	3
8	2
9	3
10	0
11	8
12	3
13	2
14	3
15	6
16	6

10

20

30

【0203】

結果および考察：

2. 1 陽性対照試験結果から、ウサギ抗体 1992 が最高のアフィニティを示した（対 11）。

40

【0204】

2. 2 対 1～8、9、10、13 および 14 の情報に基づいて、MoAb 223 のアフィニティは 318 より高いと推測された。

2. 3 アフィニティ精製を伴わない場合、ポリクローナル抗体は、通常、動物免疫中の感染から生じるいくつかの抗体を含有しうる。よい例は、シュードモナス（*Pseudomonas*）による感染である。通常の精製後、この抗体は、試験ラインおよび試験デバイス中のコンジュゲート化に導入され、こうして患者試料がシュードモナスを含有する場合、偽陽性を引き起こすであろう。

【0205】

2. 4 2. 3 の理由のため、本研究は、試験デバイスにおいて、検出剤および捕捉剤

50

として、同時にポリクローナル抗体を使用することを考慮しないであろう。

2. 5 原型試験後に感度および特異性が満たされない場合、アフィニティ精製ウサギ抗 P R L 3 は、オプションでありうる。

【0206】

3. 原型 P R L 3 迅速試験の性能

用量反応曲線および再現性に関して、P R L 3 原型デバイスを実行するため、この研究は、迅速試験読み取り装置を用いて、試験ラインシグナルをデジタルに定量化した。

【0207】

3. 1 P R L 3 反応曲線

本研究において、P R L 3 抗原を試料緩衝液 6 1 2 9 (社内) に希釈した。1 4 0 μ l の希釈 P R L 3 を試験カセットの試料ウェルに適用した (デバイス)。1 5 分後、試験デバイスを迅速試験読み取り装置によって読み取った。3 つ組を各 P R L 3 レベルに関して実行した。C V % を各レベルに関して計算した。

【0208】

結果および考察：

【0209】

【表 7】

濃度 ng/ml	実行			平均	CV%
	1	2	3		
12.5	0.0087	0.0083	0.0086	0.00857	2.4
25	0.0132	0.0123	0.0127	0.012733	3.5
50	0.0181	0.0186	0.0232	0.019967	14.0
100	0.0425	0.0481	0.0497	0.046767	8.0
200	0.1002	0.1069	0.1054	0.104167	3.3
400	0.1820	0.1925	0.2200	0.198233	9.8
1000	0.4686	0.5232	0.4998	0.4972	5.5
2000	0.8349	0.7645	0.7000	0.766467	8.8
4000	1.2854	N/A	N/A	1.2854	N/A

【0210】

考察：

3. 1. 1 2 0 0 0 n g / m l の後、曲線はより深くなくなった (感度低下)。

3. 1. 2 4 0 0 0 n g / m l 未満ではフック効果 (hook effect) は見られなかった。曲線の分析物 (analyte) は P R L 3 - G S T であった。遊離の P R L 3 がどのようにフック効果を受けるかは明らかでない。

【0211】

3. 2 再現性

アッセイプロトコルは 3. 1 に記載するものと同じであった。2 0 回の実行を、定義される陰性尿試料に関して反復し、そして I M C B によって提供した。1 0 回の実行を、試料緩衝液中で調製された低陽性 P R L 3 に関して反復した。C V % を各々計算した。

【0212】

陰性尿#2の20の読み取り

【0213】

【表8】

読み取り試料数 = 10	平均	CV%
0.0023, 0.0014, 0.0033, 0.0013, 0.0022 0.0024, 0.0054, 0.0024, 0.0019, 0.0014, 0.0030, 0.0026, 0.0025, 0.0018, 0.0041 0.0035, 0.0036, 0.0021, 0.0049, 0.0020	0.0027	40

10

【0214】

1つの弱陽性対照の10の読み取り

【0215】

【表9】

読み取り試料数 = 10	平均	CV%
0.0210, 0.0196, 0.0164, 0.0171, 0.0202, 0.0163, 0.0160, 0.0148, 0.0128, 0.0163	0.0170	14.1

20

【0216】

考察

3.2.1 陰性尿のCVは40%であるが、最高および最低読み取り値は0.0054および0.0014であった。この読み取り装置の閾値は、陽性としては0.010またはそれより高い。したがってこのデータは許容されうる。

30

【0217】

3.2.2 低陽性CVは14.1%であり、そして許容可能である。

3.3 検出限界(LOD)

QC対照カラーチャートを用いて、試験ラインシグナルをスコア付けした。スコア3は境界線であり、そして3未満が陰性と見なされるであろう。

【0218】

PRL3-GSTを表に示す各レベルで試料緩衝液中に希釈した。

100μlの希釈物を試験カセットの試料ウェルに適用した。15分のシグナルをスコア付けした。

【0219】

【表10】

40

ng/ml	10,000	5,000	1,000	500	100	50	20	10
スコア	10	9	8	7	6	5	4	3
+/-	+	+	+	+	+	+	+	+

【0220】

考察

50

3. 3. 1 検出可能性は10～20 mg T3-GST/mlであった。

3. 2. 2 10,000 ng/mlの高さでもフック効果は見られなかった。

【0221】

3. 4 臨床尿試料研究

5つの陰性尿試料および2つの陽性尿試料をIMCBから受け取った。さらに3つの尿試料を本発明者らの実験室から収集した。陽性尿試料の1つ(L)を用いて、抗体を認定した。したがって、原型デバイスを用いた最終試験では、1つの陽性尿試料(尿B)しか用いなかった。

【0222】

3. 4. 1 アッセイプロトコル

1) 尿試料を室温にする(注: PRL3は、冷却下では、膜上で異なる遊走の振る舞いを有するため、試験実行前に試料を室温にしておくことは非常に重要である)。

【0223】

2) 100 μlの尿試料を試験デバイスに適用する。

3) 15分で結果を読み取る。

4) 試験結果解釈:

3. 4. 2 アッセイ結果

試料#1～#5はIMCB由来の陰性尿であり、#6～#8は本発明者らの研究室由来であり、#9は、陽性尿Bであった。尿Bは陽性であり、そして1:10希釈でもまた弱陽性が観察された。

【0224】

【表11】

#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9
-	-	-	-	-	-	-	-	+

【0225】

VI. 抗体目録

【0226】

10

20

30

【表 1 2】

抗体／ロット番号	濃度, mg/ml	体積, ml	総 Mg
MoAb 223/ R1405002-1	5.96 mg/ml	0.39 ml	2.3 mg
R1405002-2	2.06 mg/ml	0.35 ml	<u>+) 0.72 mg</u> 3,0 mg
MoAb 318 R1405001	3.42 mg/ml	2.8 ml	9.5 mg
ウサギ抗 PRL3 1992 R1406002	4.45 mg/ml	14 ml	62.3 mg
ウサギ抗 PRL3 1993 R1406003	3.54 mg/ml	17.4 ml	61.5 mg

10

20

【0 2 2 7】

実施例 4

予期せぬことに、本発明者らは、多数のタイプのヒト癌尿の 6 1 %において、そして P R L - 3 + 腫瘍所持マウス由来のすべての癌尿において、分泌 P R L - 3 癌タンパク質を見出した (P R L - 3 - では見出されなかった)。P R L 3 抗体での有効な治療後、尿 P R L - 3 レベルは有意に減少した。本発明者らは、多数の癌タイプにおける P R L 3 抗体療法の療法反応監視のための新規診断および代理バイオマーカーとしての尿 P R L - 3 を提唱する。

30

【0 2 2 8】

材料および方法

ウェスタンブロッティング。2 0 0 μ g の溶解物を 1 2 % S D S - ポリアクリルアミドゲルの別個のウェルにおいて分離し、そしてニトロセルロース膜にトランスファーした後、ブロッキングし、そして 1 : 1 , 0 0 0 希釈の示す一次抗体で 4 ° C で一晩探査した (p r o b i n g)。T B S - T 緩衝液 (2 0 m M T r i s p H 7 . 6 , 1 4 0 m M N a C l , 0 . 2 % T w e e n - 2 0) で徹底的に洗浄した後、1 : 5 , 0 0 0 希釈したそれぞれのセイヨウワサビ (h o r s e r a d i s h) ペルオキシダーゼ (H R P) - コンジュゲート化二次抗体と膜を 1 時間インキュベーションし、T B S - T で洗浄し、そして化学発光基質 (P i e r c e) を用いて視覚化した。

40

【0 2 2 9】

抗体。B 細胞マーカー (C D 4 5 / C D 2 2 0 、クローン R A 3 - 6 B 2)、NK 細胞マーカー (C D 3 3 5 / N k p 4 6 、クローン 2 9 A 1 . 4)、および H S P 7 0 (カタログ番号 6 1 0 6 0 7) 抗体を B D P h a r m i n g e n より購入した。カルネキシン (カタログ番号 2 6 7 9) 抗体を C e l l S i g n a l i n g より購入した。C D 6 3 (カタログ番号 s c - 1 5 3 6 3) 抗体を S a n t a C r u z B i o t e c h n o l o y より購入した。G A P D H (クローン M A B 3 7 4) 抗体を M i l l i p o r e より購入した。

【0 2 3 0】

50

尿分析。シンガポール国立大学病院から患者の承諾を得て収集した朝の尿試料を、分析まで -80°C で保存した。分析前に、試料を $4,000\times g$ 、 4°C で20分間、2回遠心分離して、不溶性破片を除去した。等体積($30\mu\text{L}$)の尿試料をウェスタンブロッティングのためのゲル上に装填した。

【0231】

エクソソーム単離。70～80%集密で指数関数的に増殖している細胞をPBSで2回洗浄した後、 10mL の血清不含RPMI-1640と24時間インキュベーションした。馴化培地を $300\times g$ で10分間、2回遠心分離して、死んだ細胞および破片を除去した。あらかじめ清澄にした馴化培地を、続いて、超遠心3Kフィルター濃縮装置(Milipore)を用いて $\sim 500\mu\text{L}$ に濃縮し、そして製造者の指示にしたがって、総エクソソーム単離試薬(Invitrogen)を用いて、保持物からエクソソームを抽出した。ヒト尿エクソソーム抽出に関しては、 1mL のあらかじめ清澄にした尿を、記載するようなエクソソーム抽出に直接用いた。

【0232】

結果

細胞内PRL-3癌タンパク質を細胞培地内に分泌することも可能であり、そして該タンパク質は、癌尿の61%に存在するが、正常尿には存在しない。2008年、本発明者らは、細胞内癌タンパク質に対する伝統的でない免疫療法を最初に報告し、そしてPRL-3抗体が腫瘍細胞によって取り込まれうることを立証した₂₂。しかし、細胞内抗原の抗体認識がどのように、そしてどこで行われているのかはなお不明であった。本明細書において、本発明者らは、「細胞内」PRL-3タンパク質が、対応するPRL-3+癌細胞株由来の濃縮培地中で*in vitro*で検出可能であるが、PRL-3-癌細胞株のものは検出不能であるという、知られていなかった自然現象を見出した(図13a、レーン5～8)。対照として、ER局在タンパク質、カルネキシン(CANX)はもっぱら溶解物中に見られ、馴化培地中には見られず(図13a)、したがって、死んだ細胞または細胞破片による非特異的混入の可能性は排除された。PRL-3は、マイクロアレイおよび組織学的研究に基づいて、有望な癌バイオマーカー潜在性を有する₆ため、本発明者らは、健康な個体および癌患者の両方に由来する尿試料を分析することによって、「分泌された」PRL-3がバイオマーカーとして臨床的に適切でありうるかどうかを調べることにした。

【0233】

健康な個体由来の総数15の尿試料および癌患者由来の195の尿試料を、ウェスタンブロットによって分析して、PRL-3タンパク質を検出した。予期せぬことに、PRL-3は、異なるタイプの癌の患者由来の尿試料の平均61%(195のうち119)で容易に検出された(図13b)が、いかなる正常尿試料でも検出されなかった(図13c、レーン1～15)。特に、尿PRL-3タンパク質は、胃癌尿の10/12(83%)(図13c、レーン16～27)、鼻咽頭癌尿の12/17(70%)(図13d)、膀胱癌尿の30/67(45%)(図13e)、肺癌尿の56/85(66%)(図13f)、乳癌尿の8/10(80%)、および前立腺癌尿の3/4(75%)(データ未提示)で検出された。これらの210の尿試料からの本発明者らの結果は、PRL-3を一般的な癌特異的尿タンパク質として同定する。

【0234】

PRL-3タンパク質は、ER/ゴルジ経路を通じた古典的な分泌のための配列ペプチドを持たないため、本発明者らは、該タンパク質が非古典的なエクソソーム分泌を通じて分泌される可能性を考慮した。エクソソームは、多くの生物学的液体および細胞培地中に存在する50～150nmの間の細胞膜および/またはエンドソーム由来小胞である₃₃。分泌されたPRL-3がエクソソーム性であるかどうかを決定するため、本発明者らは、対照エクソソームタンパク質としてテトラスパニンCD63を用いて、異なるタイプの癌を有する患者由来の尿試料のエクソソーム分画を行った₃₄。驚くべきことに、本発明者らはもっぱら膀胱癌の尿でエクソソーム会合PRL-3を検出した(図3)が、他のタ

イプの癌尿では検出しなかった（データ未提示）。上皮性膀胱癌細胞によって分泌されるエクソソームは、糸球体濾過によって強制される物理的排除限界をバイパスし₃₅、そして膀胱の尿プールに直接進入しうるため、本発明者らの結果は、PRL-3が、*in vivo*で、腫瘍細胞から少なくとも2つの型で分泌されうることを間接的に示す：1）多数のタイプの癌の尿に存在する、～20kDa可溶性濾過可能型として。この「遊離PRL-3」は、腫瘍壊死、アポトーシス、または腫瘍細胞溶解によって体液内に漏出しうる。「遊離PRL-3」は、概算されるカットオフ値が70kDaである腎臓濾過系を通過するために十分に小さい（～20kDa）ため₃₅、癌の尿中に容易に集積可能である。2）膀胱癌患者の尿中にもっぱら見られるエクソソーム会合型として。他の癌組織（例えば胃、肝臓、肺）由来の循環エクソソームは、糸球体濾過を通過不能であるため、膀胱尿系への妨害されないアクセスを持つ膀胱癌細胞のみが、こうしたPRL-3含有エクソソームを尿内に直接排出しうる。要約すると、分泌PRL-3は、少なくとも2つの型、可溶性「遊離」型（多様な癌患者由来の尿で検出可能）、およびより大きいエクソソーム会合型（膀胱癌患者の尿でのみ検出可能）を含む癌特異的マーカーである。

10

【0235】

尿PRL-3は、抗PRL3抗体療法を監視する療法反応に関する新規代理バイオマーカーである。PRL-3は、癌患者由来の尿試料で頻繁に検出可能であるため、本発明者らは、尿PRL-3発現が*in vivo*で真性PRL-3+腫瘍の存在を反映するかどうか疑問を持った。臨床的にマッチした腫瘍-尿試料を得て、この関係を検証することが困難であるため、本発明者らは、代わりに、PRL-3+ SNU-484およびPRL-3-MKN45同所性胃マウスモデルを用いて、マッチした腫瘍-尿対でのPRL-3の発現を比較した。さらに、各同所性モデルを2つの群-PBSを投与されるマウス（未処置）、または抗PRL3抗体処置（処置）に細分割して、抗PRL3抗体療法および尿PRL-3発現の間の関係を解明した。

20

【0236】

未処置PRL-3+ SNU-484腫瘍所持マウスにおいて、PRL-3は、尿中に非常に豊富であった（図14a、奇数レーン1～9）。しかし、抗PRL3抗体処置後、PRL-3の腫瘍内発現減少と一致して、すべてのマウスにおいて、尿PRL-3は、もはや検出不能であった（図14a、偶数レーン2～10）。重要なことに、抗PRL3抗体処置マウス由来の尿PRL-3シグナルの喪失は、各場合で、胃の腫瘍収縮と対応し（図14a、上部パネル）、尿PRL-3が、抗PRL3抗体療法有効性の代理バイオマーカーとして有用でありうることを示唆する。対照として、本発明者らは、PRL-3-MKN45同所性腫瘍を所持するマウスにおいて、抗PRL3抗体療法とは関わりなく、尿PRL-3を検出しなかった（図14a、レーン11～12）。したがって、尿PRL-3は、PRL-3+を所持するマウスで特異的に検出されたが、PRL-3-癌を持つマウスでは検出されず、そして抗PRL3抗体での処置に際して減少する。

30

【0237】

考察

本研究は、診断および療法反応監視のための分泌尿PRL-3のバイオマーカー潜在能力を同定する。本発明者らは、多数のヒト癌患者の平均61%で、尿PRL-3を検出した。

40

【0238】

可溶性PRL-3は、多数の癌患者由来の尿で検出されたが、本発明者らは、膀胱癌患者の尿においてのみ、エクソソーム会合PRL-3を検出し、他の悪性腫瘍の患者では検出しなかった。この尿のありうる説明は、糸球体濾過によって課される物理的制約であり、このため、尿排出のため、血漿からボウマン嚢には70kDaより小さいタンパク質しか通過は可能でない₃₅。したがって、可溶性「遊離」PRL-3（～20kDa）は、これらの他の癌タイプ由来の尿中で検出可能なままであり、エクソソーム会合PRL-3は検出不能であった。にもかかわらず、エクソソーム会合PRL-3が存在することは、PRL-3+腫瘍から出芽するエクソソームが、*in vivo*で、腫瘍領域内の抗PRL

50

L 3 抗体認識およびエフェクター免疫反応開始の係留点として働きうるという興味深い可能性を提示する（図 1 4 b）。

【0 2 3 9】

マウスモデルにおいて観察される、腫瘍および尿 P R L - 3 発現の間の緊密な相関によって、多様なヒト悪性腫瘍において、尿 P R L - 3 発現が、P R L - 3 ターゲティング癌療法（抗 P R L 3 抗体を含む）の有望な診断バイオマーカーとして使用可能であることを示唆する。さらに、尿 P R L - 3 はまた、代理バイオマーカーとして機能可能であり、臨床家に療法有効性を示す、非侵襲性、迅速、および単純な定性法を提供する。

【図 1】

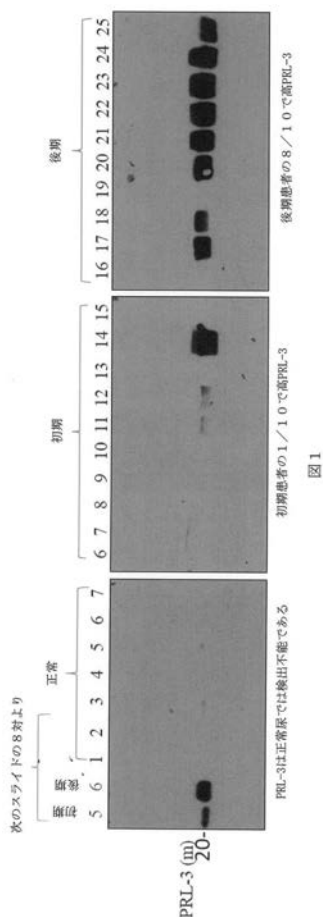


図 1

【図 2】

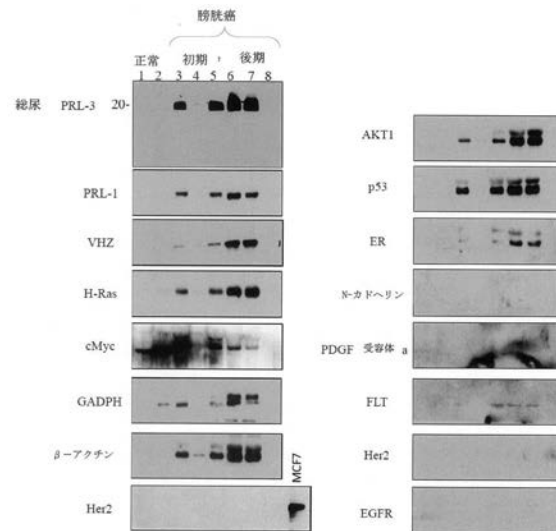
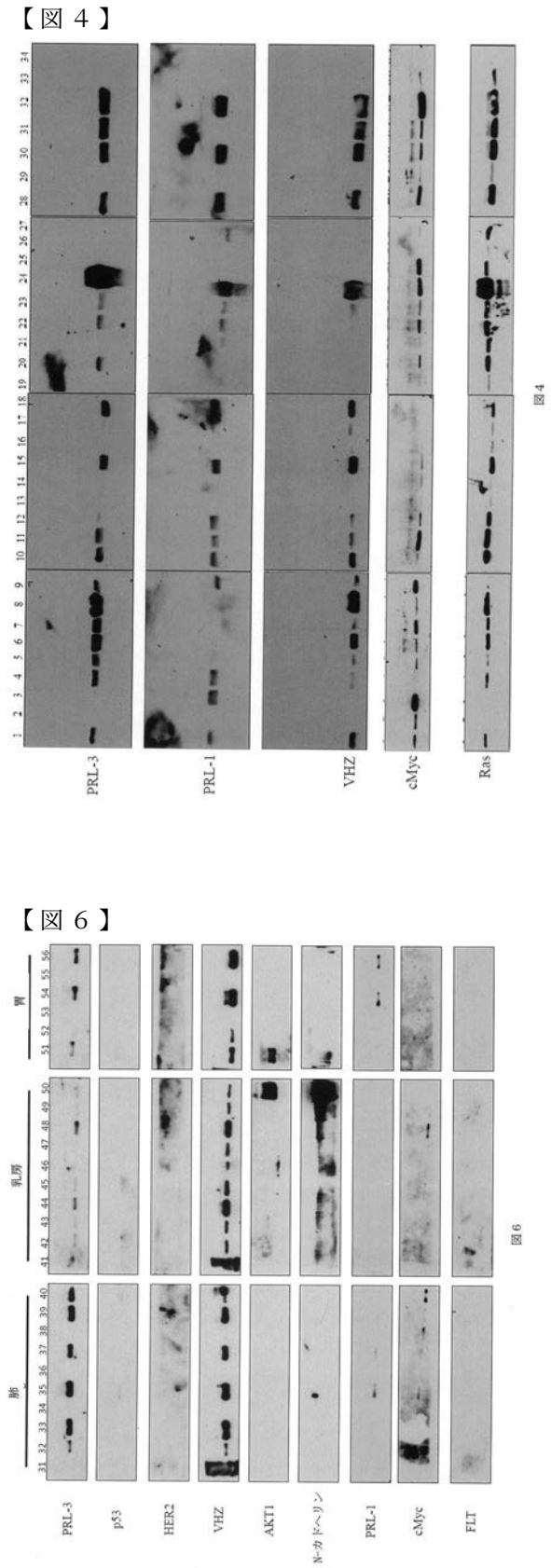
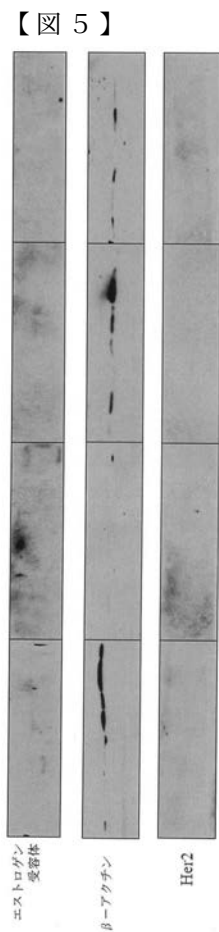
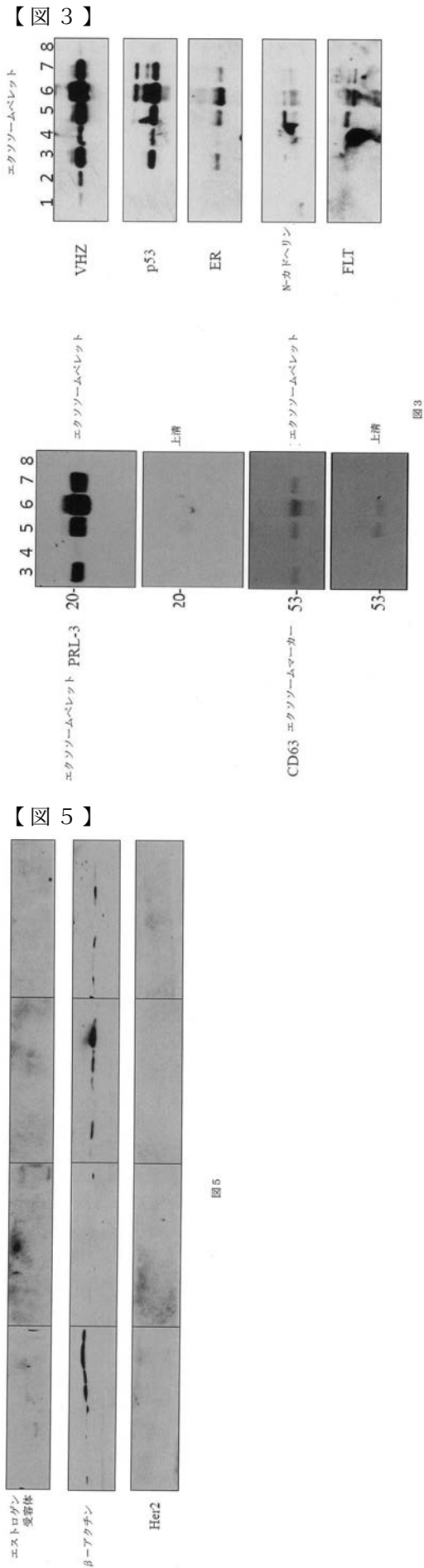


図 2



【図 7】

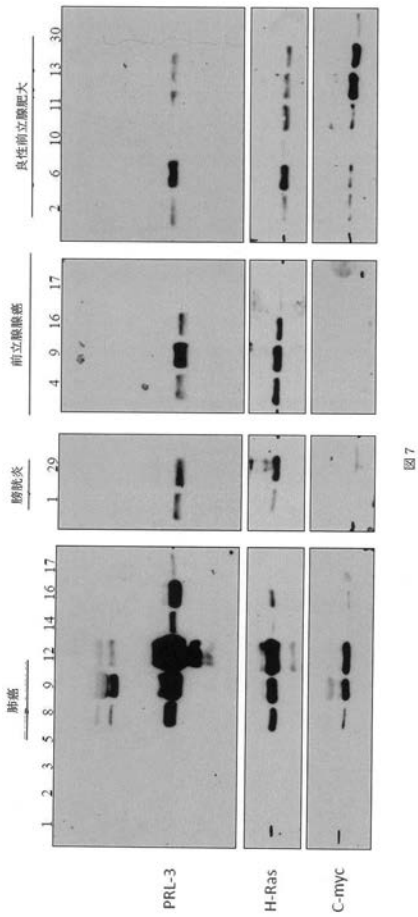


図 7

【図 8】

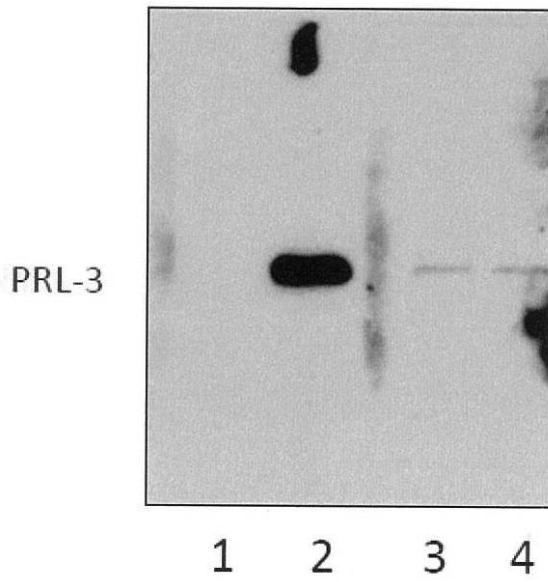


図 8

【図 9】

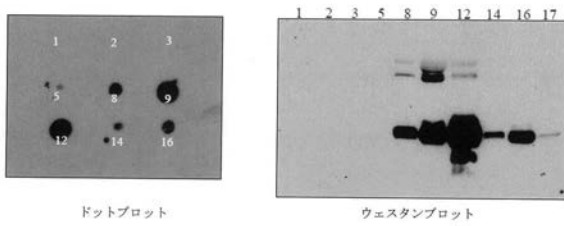


図 9

【図 1 1】

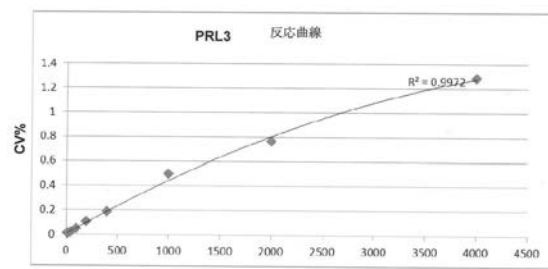


図 1 1

【図 1 0】

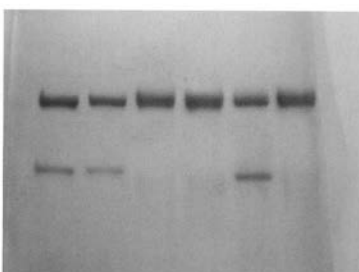


図 1 0

【図 1 2 - 1】

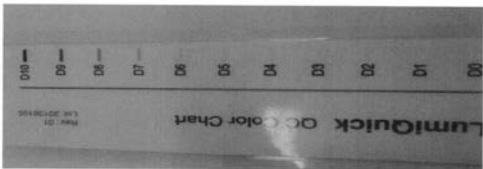


図 12A

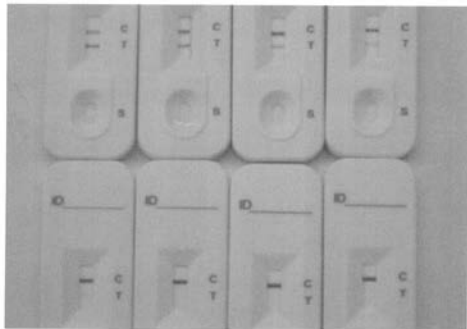


図 12

【図 1 2 - 2】

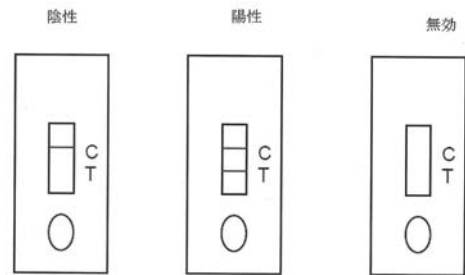


図 12C



図 12D

【図 1 3 - 1】

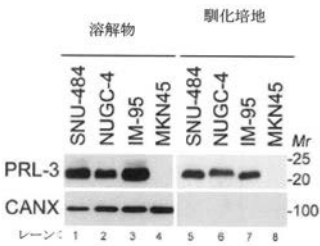


図 13A

癌タイプ	n	尿 PRL-3 発現	
		PRL-3 陽性数	% PRL-3 陽性
胃癌	12	10	83
鼻咽頭癌	17	12	71
膀胱癌	67	30	45
肺癌	85	56	66
乳癌	10	8	80
前立腺癌	4	3	75
総計	195	119	61.0 (平均)
正常個体	15	0	0

図 13B

【図 1 3 - 2】

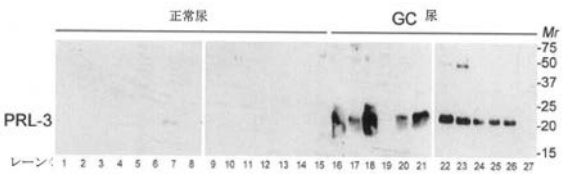


図 13C

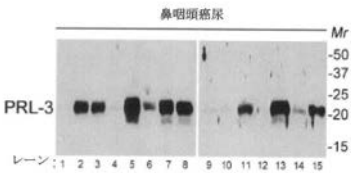
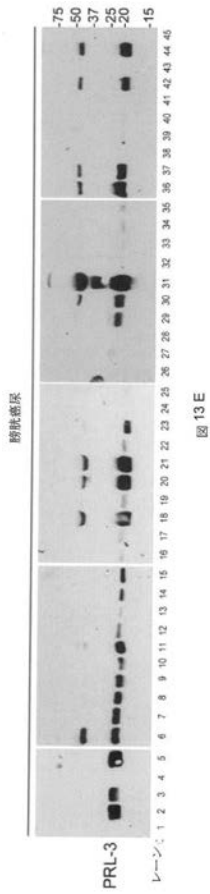


図 13D

【図 13-3】



【図 14】

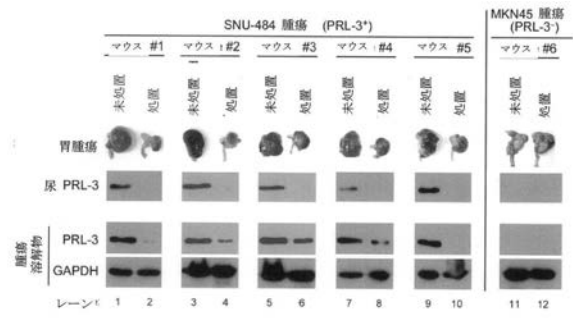


図 14 A

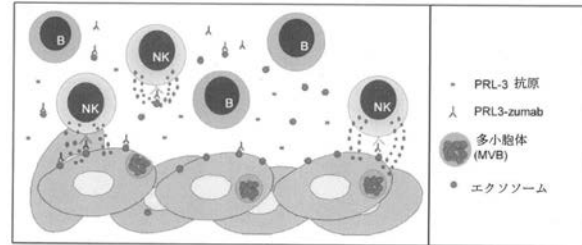


図 14 B

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/SG2015/050259
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N 33/574 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WPIAP, EPODOC, MEDLINE, CAPLUS, BIOSIS, EMBASE & keywords: cancer, exosome, PRL3, bladder and like terms AUSPAT, ESPACENET, PUBMED: Zeng Qi		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	Documents are listed in the continuation of Box C	
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C ☒ See patent family annex		
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 21 September 2015	Date of mailing of the international search report 21 September 2015	
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA Email address: pct@ipaustralia.gov.au	Authorised officer Richard Filmer AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No. +6 12 6283 2735	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		PCT/SG2015/050259
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2008/136774 A1 (AGENCY FOR SCIENCE, TECHNOLOGY AND RESEARCH) 13 November 2008 Abstract; page 4 lines 20-23; page 31 line 19 – page 34 line 5; page 39 line 1 – page 43 line 17; page 66 line 11 – page 67 line 23	1-3, 5-8, 11-13, 15-20
X	WO 2010/070276 A1 (OXFORD BIOMEDICA (UK) LIMITED) 24 June 2010 Abstract; page 1 line 23 – page 4 line 8; page 9 line 19 – page 10 line 6	1-15, 17-19
X	WO 2010/056337 A2 (CARIS MPI, INC.) 20 May 2010 Abstract; [0005]-[0012], [00105], [00287]	1-15, 17-19
X	KUMAR, A. et al., "Comparison of NMP22 BladderChek Test and Urine Cytology for the Detection of Recurrent Bladder Cancer," Japanese Journal of Clinical Oncology, 2006, vol. 36, no. 3, pages 172-175 Abstract; Patients and Methods	1-3, 5-8, 11-13, 15, 17-19

Form PCT/ISA/210 (fifth sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.	
Information on patent family members		PCT/SG2015/050259	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
WO 2008/136774 A1	13 November 2008	WO 2008136774 A1	13 Nov 2008
		AU 2008246368 A1	13 Nov 2008
		CA 2685954 A1	13 Nov 2008
		CN 101820910 A	01 Sep 2010
		CN 101820910 B	06 Aug 2014
		CN 102847148 A	02 Jan 2013
		EP 2150276 A1	10 Feb 2010
		EP 2150276 B1	21 May 2014
		EP 2529754 A1	05 Dec 2012
		GB 2462048 A	27 Jan 2010
		GB 2462048 B	21 Mar 2012
		JP 2010530735 A	16 Sep 2010
		US 2011206657 A1	25 Aug 2011
		US 8715674 B2	06 May 2014
		US 2014286937 A1	25 Sep 2014
WO 2010/070276 A1	24 June 2010	WO 2010070276 A1	24 Jun 2010
		CN 102301236 A	28 Dec 2011
		CN 102301236 B	25 Jun 2014
		EP 2370818 A1	05 Oct 2011
		JP 2012512389 A	31 May 2012
		JP 5671475 B2	18 Feb 2015
		US 2012027749 A1	02 Feb 2012
WO 2010/056337 A2	20 May 2010	WO 2010056337 A2	20 May 2010
		AU 2011223789 A1	20 Sep 2012
		AU 2011237669 A1	01 Nov 2012
		AU 2011291599 A1	07 Mar 2013
		AU 2011291599 B2	10 Sep 2015
		AU 2012220872 A1	12 Sep 2013
		AU 2012267884 A1	23 Jan 2014
		AU 2012271516 A1	23 Jan 2014
		AU 2012294458 A1	27 Feb 2014
		CA 2742324 A1	03 Jun 2010
		CA 2743211 A1	20 May 2010
		CA 2791905 A1	09 Sep 2011
		CA 2795776 A1	13 Oct 2011
Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.			
Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2009)			

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.	
Information on patent family members		PCT/SG2015/050259	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
		CA 2808417 A1	23 Feb 2012
		CA 2827894 A1	30 Aug 2012
		CA 2838728 A1	13 Dec 2012
		CA 2839530 A1	20 Dec 2012
		CA 2844671 A1	14 Feb 2013
		CN 102301002 A	28 Dec 2011
		CN 102308004 A	04 Jan 2012
		CN 103025890 A	03 Apr 2013
		CN 103237901 A	07 Aug 2013
		CN 103492590 A	01 Jan 2014
		CN 103782174 A	07 May 2014
		CN 103797131 A	14 May 2014
		CN 103874770 A	18 Jun 2014
		EP 2350320 A2	03 Aug 2011
		EP 2358912 A2	24 Aug 2011
		EP 2542696 A1	09 Jan 2013
		EP 2556172 A1	13 Feb 2013
		EP 2606353 A1	26 Jun 2013
		EP 2678448 A1	01 Jan 2014
		EP 2718721 A1	16 Apr 2014
		EP 2721179 A2	23 Apr 2014
		EP 2730662 A1	14 May 2014
		EP 2742154 A2	18 Jun 2014
		GB 2465088 A	12 May 2010
		GB 2465088 B	18 Jul 2012
		GB 2463401 A	17 Mar 2010
		GB 2463401 B	29 Jan 2014
		HK 1142371 A1	18 Jul 2014
		IL 212591 A	31 Jul 2014
		IL 212768 A	31 Jul 2014
		JP 2012507300 A	29 Mar 2012
		JP 2012508577 A	12 Apr 2012
		JP 2013521502 A	10 Jun 2013
		JP 2013526852 A	27 Jun 2013
		JP 2013540995 A	07 Nov 2013
		JP 2014507160 A	27 Mar 2014
Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.			
Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2009)			

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.	
Information on patent family members		PCT/SG2015/050259	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
		JP 2014519340 A	14 Aug 2014
		JP 2014522993 A	08 Sep 2014
		JP 2014526032 A	02 Oct 2014
		KR 20130043104 A	29 Apr 2013
		KR 20130056855 A	30 May 2013
		KR 20140067001 A	03 Jun 2014
		KR 20140072014 A	12 Jun 2014
		KR 20140076543 A	20 Jun 2014
		US 2010113290 A1	06 May 2010
		US 7888035 B2	15 Feb 2011
		US 2010184046 A1	22 Jul 2010
		US 7897356 B2	01 Mar 2011
		US 2011159506 A1	30 Jun 2011
		US 8192954 B2	05 Jun 2012
		US 2011151460 A1	23 Jun 2011
		US 8211653 B2	03 Jul 2012
		US 2011237450 A1	29 Sep 2011
		US 8278059 B2	02 Oct 2012
		US 2013287772 A1	31 Oct 2013
		US 9128101 B2	08 Sep 2015
		US 2010203529 A1	12 Aug 2010
		US 2013005599 A1	03 Jan 2013
		US 2013045882 A1	21 Feb 2013
		US 2013178383 A1	11 Jul 2013
		US 2013184169 A1	18 Jul 2013
		US 2014141986 A1	22 May 2014
		US 2014148350 A1	29 May 2014
		US 2014162888 A1	12 Jun 2014
		US 2014220580 A1	07 Aug 2014
		US 2014228233 A1	14 Aug 2014
		US 2015024961 A1	22 Jan 2015
		WO 2010062706 A2	03 Jun 2010
		WO 2011109440 A1	09 Sep 2011
		WO 2011127219 A1	13 Oct 2011
		WO 2012024543 A1	23 Feb 2012
		WO 2012115885 A1	30 Aug 2012
Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.			
Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2009)			

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members		International application No. PCT/SG2015/050259	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
		WO 2012170711 A1	13 Dec 2012
		WO 2012174282 A2	20 Dec 2012
		WO 2013022995 A2	14 Feb 2013
End of Annex			
Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001. Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2009)			

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	E
	A 6 1 K 39/395	T
	A 6 1 K 39/395	P

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

(74)代理人 100128750
弁理士 廣瀬 しのぶ

(72)発明者 ツォン, チ
シンガポール国 1 3 8 6 7 3 シンガポール, プロテオス, バイオポリス・ドライブ 6 1, ケ
ア・オブ・エージェンシー フォー サイエンス, テクノロジー アンド リサーチ

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA19 QQ03 QQ79 QR62 QS25 QS34
4C085 AA13 AA14 BB01 BB11 BB22 EE01 GG01
4H045 AA11 BA10 CA40 DA75 DA76 EA20 EA50 FA74