

(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2016-516008

(P2016-516008A)

(43) 公表日 平成28年6月2日(2016.6.2)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/32 (2006.01)	C O 7 K 16/32 Z N A	4 B O 2 4
C12N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 6 3
C12N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	4 B O 6 5
C12Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	4 C O 8 5
G01N 33/574 (2006.01)	G O 1 N 33/574 A	4 H O 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 81 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-560386 (P2015-560386)
 (86) (22) 出願日 平成26年2月28日 (2014. 2. 28)
 (85) 翻訳文提出日 平成27年10月6日 (2015. 10. 6)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2014/019705
 (87) 国際公開番号 W02014/134587
 (87) 国際公開日 平成26年9月4日 (2014. 9. 4)
 (31) 優先権主張番号 61/770, 956
 (32) 優先日 平成25年2月28日 (2013. 2. 28)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

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

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗P40抗体システムおよび方法

(57) 【要約】

本発明は、抗p40抗体、キット、カクテル、および癌の検出のための抗p40抗体に関する。本発明の一般的な実施形態は、p40を認識するためのモノクローナル抗体、それらの調製のための方法、免疫組織化学における使用などを含み得る。実施形態において、抗p40抗体クローンBC28などの抗p40抗体クローンは、ヒトp40タンパク質アミノ酸1-17のサブセットに対応する1つ以上のペプチドを用いてBalb/Cマウスを免疫することによって得ることができる。

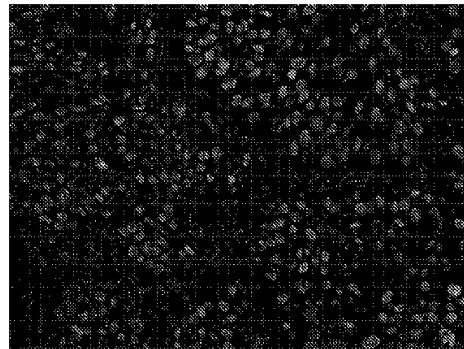


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

p 40 タンパク質に特異的に結合する抗体の単離された調製物であって、前記抗体がペプチド配列番号 3 におけるエピトープに結合する、調製物。

【請求項 2】

p 40 タンパク質に特異的に結合する抗体の単離された調製物であって、前記抗体がペプチド配列番号 4 におけるエピトープに結合する、調製物。

【請求項 3】

p 40 タンパク質に特異的に結合する抗体の単離された調製物であって、前記抗体が配列番号 3 および配列番号 5 の混合物を含むエピトープに結合する、調製物。

10

【請求項 4】

p 40 タンパク質に特異的に結合する抗体の単離された調製物であって、前記抗体が配列番号 3 および配列番号 5 の混合物からなるエピトープに結合する、調製物。

【請求項 5】

p 40 タンパク質に特異的に結合する抗体の単離された調製物であって、配列番号 3 からなるペプチドを免疫原として使用して前記抗体が生成される、調製物。

【請求項 6】

p 40 タンパク質に特異的に結合する抗体の単離された調製物であって、配列番号 4 からなるペプチドを免疫原として使用して前記抗体が生成される、調製物。

【請求項 7】

p 40 タンパク質に特異的に結合する抗体の単離された調製物であって、配列番号 3 および配列番号 5 の混合物を含むペプチドを免疫原として使用して前記抗体が生成される、調製物。

20

【請求項 8】

p 40 タンパク質に特異的に結合する抗体の単離された調製物であって、配列番号 3 および配列番号 5 の混合物からなるペプチドを免疫原として使用して前記抗体が生成される、調製物。

【請求項 9】

ペプチド配列番号 3 におけるエピトープに特異的に結合する抗体の単離された調製物。

【請求項 10】

ペプチド配列番号 4 におけるエピトープに特異的に結合する抗体の単離された調製物。

30

【請求項 11】

配列番号 3 および配列番号 5 の混合物を含むペプチドにおけるエピトープに特異的に結合する抗体の単離された調製物。

【請求項 12】

配列番号 3 および配列番号 5 の混合物からなるペプチドにおけるエピトープに特異的に結合する抗体の単離された調製物。

【請求項 13】

前記抗体がモノクローナルである、請求項 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または 12 に記載の抗体の単離された調製物。

40

【請求項 14】

前記抗体がポリクローナルである、請求項 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または 12 に記載の抗体の単離された調製物。

【請求項 15】

アメリカンタイプカルチャーコレクション (ATCC) に ATCC 特許寄託番号 PTA-120163 で寄託されているハイブリドーマによって産生された抗体またはそのフラグメント。

【請求項 16】

アメリカンタイプカルチャーコレクション (ATCC) に ATCC 特許寄託番号 PTA-120163 で寄託されているハイブリドーマ細胞。

50

【請求項 17】

前記ハイブリドーマ細胞によって産生される抗体またはそのフラグメントをさらに含む、請求項 16 に記載のハイブリドーマ細胞。

【請求項 18】

請求項 15 に記載のモノクローナル抗体を産生するための方法であって、p 40 を特異的に認識することが可能なモノクローナル抗体を産生する前記ハイブリドーマを培養する工程、および前記ハイブリドーマにモノクローナル抗体を産生させることを可能にする工程を包含する、方法。

【請求項 19】

配列番号 1 または配列番号 2 の核酸配列によってコードされるアミノ酸配列のポリペプチドを含む、抗体またはそのフラグメント。

【請求項 20】

配列番号 2 の核酸配列によってコードされるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、および配列番号 1 の核酸配列によってコードされるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、抗 p 40 抗体またはそのフラグメント。

【請求項 21】

配列番号 1 または配列番号 2 の核酸配列によってコードされるアミノ酸配列に対して少なくとも約 70% 同一であるアミノ酸配列を含む抗体。

【請求項 22】

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

【請求項 23】

前記配列番号 1 または配列番号 2 に対して少なくとも約 70% 同一が、配列番号 1 および配列番号 2 に対して少なくとも約 70% 同一を含む、請求項 21 または 22 に記載の配列。

【請求項 24】

前記少なくとも約 70% 同一が、少なくとも約 71%、少なくとも約 72%、少なくとも約 73%、少なくとも約 74%、少なくとも約 75%、少なくとも約 76%、少なくとも約 77%、少なくとも約 78%、少なくとも約 79%、少なくとも約 80%、少なくとも約 81%、少なくとも約 82%、少なくとも約 83%、少なくとも約 84%、少なくとも約 85%、少なくとも約 86%、少なくとも約 87%、少なくとも約 88%、少なくとも約 89%、少なくとも約 90%、少なくとも約 91%、少なくとも約 92%、少なくとも約 93%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、および少なくとも約 99% からなる群より選択されるパーセンテージを含む、請求項 23 に記載の配列。

【請求項 25】

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

【請求項 26】

少なくとも 2 種の抗体またはそれらのフラグメントを含む組成物であって、前記少なくとも 2 種の抗体またはそれらのフラグメントの少なくとも 1 つが少なくとも p 40 に特異的に結合する、組成物。

【請求項 27】

少なくとも p 40 に特異的に結合する前記少なくとも 2 種の抗体またはそれらのフラグメントの前記少なくとも 1 つが、p 40 [BC28] 抗体またはそのフラグメントを含む、請求項 26 に記載の組成物。

【請求項 28】

少なくとも p 40 に特異的に結合する前記少なくとも 2 種の抗体またはそれらのフラグメントの前記少なくとも 1 つが、p 40 に特異的に結合する前記少なくとも 2 種の抗体ま

10

20

30

40

50

たはそれらのフラグメントの少なくとも1つを含み、かつ染色細胞の約5%より大きい陽性指示カットオフ値を有する、請求項26に記載の組成物。

【請求項29】

請求項26に記載の組成物であって、p40に特異的に結合する前記少なくとも2種の抗体またはそれらのフラグメントの前記少なくとも1つが、p40に特異的に結合する前記少なくとも2種の抗体またはそれらのフラグメントの少なくとも1つを含み、かつ以下の陽性指示カットオフ値：

- 染色細胞の約2%より大きい
- 染色細胞の約3%より大きい
- 染色細胞の約4%より大きい
- 染色細胞の約5%より大きい
- 染色細胞の約6%より大きい
- 染色細胞の約7%より大きい
- 染色細胞の約8%より大きい
- 染色細胞の約9%より大きい、および
- 染色細胞の約10%より大きい

からなる群より選択される陽性指示カットオフ値を有する、組成物。

【請求項30】

請求項26に記載の組成物であって、前記少なくとも2種の抗体またはそれらのフラグメントの前記少なくとも1つが、配列番号2の核酸配列によってコードされるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、および配列番号1の核酸配列によってコードされるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、組成物。

【請求項31】

請求項26に記載の組成物であって、前記少なくとも2種の抗体またはそれらのフラグメントの前記少なくとも1つが、配列番号2の核酸配列によってコードされるアミノ酸配列の少なくとも約70%に対して同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、および配列番号1の核酸配列によってコードされるアミノ酸配列の少なくとも約70%であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、組成物。

【請求項32】

請求項31に記載の組成物であって、前記少なくとも約70%同一が、少なくとも約71%、少なくとも約72%、少なくとも約73%、少なくとも約74%、少なくとも約75%、少なくとも約76%、少なくとも約77%、少なくとも約78%、少なくとも約79%、少なくとも約80%、少なくとも約81%、少なくとも約82%、少なくとも約83%、少なくとも約84%、少なくとも約85%、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、および少なくとも約99%からなる群より選択されるパーセンテージを含む、組成物。

【請求項33】

前記少なくとも2種の抗体またはそれらのフラグメントの前記少なくとも1つが、配列番号3、配列番号4、および配列番号3と配列番号4の混合物からなる群より選択される残基を含むアミノ酸配列を有する少なくとも1つのポリペプチドに特異的に結合する、請求項26に記載の組成物。

【請求項34】

前記少なくとも2種の抗体またはそれらのフラグメントの前記少なくとも1つが、配列番号3、配列番号4、および配列番号3と配列番号4の混合物からなる群より選択される残基に対して少なくとも約70%同一であるアミノ酸配列を有する少なくとも1つのポリペプチドに特異的に結合する、請求項26に記載の組成物。

【請求項35】

請求項34に記載の組成物であって、前記少なくとも約70%同一が、少なくとも約7

10

20

30

40

50

1%、少なくとも約72%、少なくとも約73%、少なくとも約74%、少なくとも約75%、少なくとも約76%、少なくとも約77%、少なくとも約78%、少なくとも約79%、少なくとも約80%、少なくとも約81%、少なくとも約82%、少なくとも約83%、少なくとも約84%、少なくとも約85%、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、および少なくとも約99%からなる群より選択されるパーセンテージを含む、組成物。

【請求項36】

前記少なくとも2種の抗体またはそれらのフラグメントの前記少なくとも1つが、アメリカンタイプカルチャーコレクション(ATCC)にATCC特許寄託番号PTA-120163で寄託されたハイブリドーマによって産生された抗体またはそのフラグメントを含む、請求項26に記載の組成物。

10

【請求項37】

前記組成物が一次抗体カクテルを含む、請求項26に記載の組成物。

【請求項38】

前記少なくとも2種の抗体またはそれらのフラグメントが少なくとも2つの異なる種に由来する、請求項27に記載の組成物。

【請求項39】

前記少なくとも2つの異なる種が、マウス、ウサギ、ヤギ、ウマ、ニワトリ、ヒト、およびこれらの任意の組み合わせからなる群より選択される、請求項38に記載の組成物。

20

【請求項40】

前記少なくとも2種の抗体またはそれらのフラグメントが二重染色手順を含む、請求項26に記載の組成物。

【請求項41】

前記少なくとも2種の抗体またはそれらのフラグメントが、異なる可視化結果を提供できる、請求項26に記載の組成物。

【請求項42】

前記可視化結果が色の結果を含む、請求項41に記載の組成物。

【請求項43】

前記少なくとも2種の抗体またはそれらのフラグメントの前記少なくとも1つの他方が、DSG-3、CK4、ナブシンA、HMWCK、p504s、CK5/14、CK7/18、CK8/18、ウロプラキンII、ウロプラキンIII、GATA-3、およびこれらの任意の組み合わせからなる群より選択されるタンパク質に特異的に結合する、請求項26に記載の組成物。

30

【請求項44】

請求項26に記載の組成物であって、少なくとも2種の抗体またはそれらのフラグメントが、

- p40およびDSG-3およびCK5およびナブシンA、
 - p40およびDSG-3およびCK5、
 - p40およびナブシンA、
 - p40およびHMWCKおよびp504s、
 - p40およびp504sおよびCK5/14、
 - p40およびCK5/14およびCK7/18、
 - p40およびCK5/14およびCK8/18
 - p40およびウロプラキンIIおよびウロプラキンIII、ならびに
 - p40およびウロプラキンIIおよびウロプラキンIIIおよびGATA-3
- からなる群より選択されるタンパク質に各々特異的に結合する、組成物。

40

【請求項45】

請求項26に記載の組成物であって、少なくとも2種の抗体またはそれらのフラグメン

50

トが、

- p 4 0 および D S G - 3 および ナブシン A、
- p 4 0 および D S G - 3、ならびに
- p 4 0 および C K 5

からなる群より選択されるタンパク質に各々特異的に結合する、組成物。

【請求項 4 6】

請求項 2 6 に記載の組成物であって、前記組成物が、S C C 癌腫検出組成物、膀胱検出組成物、乳癌検出組成物、前立腺癌検出組成物、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される検出組成物を含む、組成物。

【請求項 4 7】

p 4 0 に特異的に結合し、かつ染色細胞の 1 % より大きい陽性指示カットオフ値を有する、モノクローナル抗体またはそのフラグメント。

【請求項 4 8】

請求項 4 7 に記載のモノクローナル抗体またはそのフラグメントであって、前記陽性指示カットオフ値が、

- 染色細胞の約 2 % より大きい
- 染色細胞の約 3 % より大きい
- 染色細胞の約 4 % より大きい
- 染色細胞の約 5 % より大きい
- 染色細胞の約 6 % より大きい
- 染色細胞の約 7 % より大きい
- 染色細胞の約 8 % より大きい
- 染色細胞の約 9 % より大きい、および
- 染色細胞の約 1 0 % より大きい

からなる群より選択される、モノクローナル抗体またはそのフラグメント。

【請求項 4 9】

請求項 1 9、2 0、2 5、2 6、または 4 7 に記載の抗体であって、前記抗体またはそのフラグメントが、アメリカンタイプカルチャーコレクションに A T C C 特許寄託番号 P T A - 1 2 0 1 6 3 で寄託されているハイブリドーマ細胞によって産生される、抗体。

【請求項 5 0】

請求項 1 5、1 7、2 5、または 4 7 に記載の抗体であって、前記抗体またはそのフラグメントが、配列番号 1 または配列番号 2 の核酸配列によってコードされているアミノ酸配列のポリペプチドを含む、抗体。

【請求項 5 1】

請求項 1 5、1 7、2 5、または 4 7 に記載の抗体であって、前記抗体またはそのフラグメントが、配列番号 1 および配列番号 2 の核酸配列によってコードされているアミノ酸配列のポリペプチドを含む、抗体。

【請求項 5 2】

請求項 1 5、1 7、2 5、または 4 7 に記載の抗体であって、前記抗体またはそのフラグメントが、配列番号 1 または配列番号 2 の核酸配列によってコードされているアミノ酸配列に対して少なくとも約 7 0 % 同一であるポリペプチドを含む、抗体。

【請求項 5 3】

請求項 1 5、1 7、2 5、または 4 7 に記載の抗体であって、前記抗体またはそのフラグメントが、配列番号 1 および配列番号 2 の核酸配列によってコードされているアミノ酸配列に対して少なくとも約 7 0 % 同一であるポリペプチドを含む、抗体。

【請求項 5 4】

請求項 1 5、1 7、2 5、または 4 7 に記載の抗体であって、前記抗体またはそのフラグメントが、配列番号 3、配列番号 4、および配列番号 3 と配列番号 5 の混合物からなる群より選択される残基を含むアミノ酸配列を有する少なくとも 1 つのポリペプチドに特異的に結合する、抗体。

10

20

30

40

50

【請求項 55】

請求項 15、17、25、または 47 に記載の抗体であって、前記抗体またはそのフラグメントが、配列番号 3、配列番号 4、および配列番号 3 と配列番号 5 の混合物からなる群より選択される残基に対して少なくとも約 70% 同一であるアミノ酸配列を有する少なくとも 1 つのポリペプチドに特異的に結合する、抗体。

【請求項 56】

請求項 55 に記載の抗体であって、前記少なくとも約 70% 同一が、少なくとも約 71%、少なくとも約 72%、少なくとも約 73%、少なくとも約 74%、少なくとも約 75%、少なくとも約 76%、少なくとも約 77%、少なくとも約 78%、少なくとも約 79%、少なくとも約 80%、少なくとも約 81%、少なくとも約 82%、少なくとも約 83%、少なくとも約 84%、少なくとも約 85%、少なくとも約 86%、少なくとも約 87%、少なくとも約 88%、少なくとも約 89%、少なくとも約 90%、少なくとも約 91%、少なくとも約 92%、少なくとも約 93%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、および少なくとも約 99% からなる群より選択されるパーセンテージを含む、抗体。

10

【請求項 57】

前記抗体がモノクローナル抗体を含む、請求項 15、17、19、20、25、26、または 47 に記載の抗体。

【請求項 58】

前記モノクローナル抗体が染色細胞の 1% より大きい陽性指示カットオフ値を有する、請求項 57 に記載の抗体。

20

【請求項 59】

請求項 58 に記載の抗体であって、前記陽性指示カットオフ値が、

- 染色細胞の約 2% より大きい
- 染色細胞の約 3% より大きい
- 染色細胞の約 4% より大きい
- 染色細胞の約 5% より大きい
- 染色細胞の約 6% より大きい
- 染色細胞の約 7% より大きい
- 染色細胞の約 8% より大きい
- 染色細胞の約 9% より大きい、および
- 染色細胞の約 10% より大きい

からなる群より選択される、抗体。

30

【請求項 60】

前記モノクローナル抗体が、マウスモノクローナル抗体、ウサギモノクローナル抗体、ヤギモノクローナル抗体、ウマモノクローナル抗体、ニワトリモノクローナル抗体、ヒトモノクローナル抗体、キメラ抗体、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される、請求項 57 に記載の抗体。

【請求項 61】

前記抗体がポリクローナル抗体を含む、請求項 15、17、19、20、25、26、または 47 に記載の抗体。

40

【請求項 62】

前記ポリクローナル抗体が、ウサギポリクローナル抗体、マウスポリクローナル抗体、ヤギポリクローナル抗体、ウマポリクローナル抗体、ニワトリポリクローナル抗体、ヒト化ポリクローナル抗体、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される、請求項 61 に記載の抗体。

【請求項 63】

前記抗体が単離された抗体を含む、請求項 15、17、19、20、25、26、または 47 に記載の抗体。

【請求項 64】

50

前記そのフラグメントがその抗原結合フラグメントを含む、請求項 15、17、19、20、25、26、または 47 に記載の抗体。

【請求項 65】

前記抗体またはそのフラグメントに結合しれた標識をさらに含む、請求項 15、17、19、20、25、26、または 47 に記載の抗体。

【請求項 66】

標識と結合体化された請求項 15、17、19、20、25、26、または 47 に記載の前記抗体またはそのフラグメントを含む癌診断剤。

【請求項 67】

前記標識が、放射性元素、磁気粒子、ラジオアイソトープ、蛍光色素、酵素、毒素、シグナル、染料、検出酵素、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP)、アルカリホスファターゼ (AP)、 α -ガラクトシダーゼ、色素原、ファストレッド、3,3'-ジアミノベンジジン、3-アミノ-9-エチルカルバゾール、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリルホスフェート、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル-D-グルクロニド、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される、請求項 65 に記載の抗体。

10

【請求項 68】

前記標識が、放射性元素、磁気粒子、ラジオアイソトープ、蛍光色素、酵素、毒素、シグナル、染料、検出酵素、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP)、アルカリホスファターゼ (AP)、 α -ガラクトシダーゼ、色素原、ファストレッド、3,3'-ジアミノベンジジン、3-アミノ-9-エチルカルバゾール、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリルホスフェート、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル-D-グルクロニド、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される、請求項 66 に記載の抗体。

20

【請求項 69】

診断または予後診断テストキットであって、
- 請求項 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、15、17、19、20、25、26、または 47 に記載の抗体またはそのフラグメント、および
- 抗原に結合したときの前記抗体または前記そのフラグメントの抗体検出エレメントを含む、キット。

30

【請求項 70】

請求項 69 に記載のキットを使用して生物学的サンプル中の p40 を検出するための方法であって、
- 生物学的サンプルを前記抗体またはそのフラグメントと接触させる工程、および
- 前記抗体検出エレメントを使用して、前記生物学的サンプル中の抗原との前記抗体または前記そのフラグメントの結合を検出する工程
を包含する、方法。

【請求項 71】

前記抗体または前記そのフラグメントが p40 に特異的に結合する、請求項 15、17、19、20、または 25 に記載の抗体。

40

【請求項 72】

癌を検出するための、請求項 15、17、19、20、25、または 47 に記載の抗体あるいはそのフラグメントまたは組成物の使用。

【請求項 73】

癌を診断または予後診断するための、請求項 15、17、19、20、25、または 47 に記載の抗体あるいはそのフラグメントまたは組成物の使用。

【請求項 74】

癌の治療の転帰を予測するための、請求項 15、17、19、20、25、または 47 に記載の抗体あるいはそのフラグメントまたは組成物の使用。

【請求項 75】

50

癌の治療の効力を評価するための、請求項 15、17、19、20、25、または 47 に記載の抗体あるいはそのフラグメントまたは組成物の使用。

【請求項 76】

癌の再発を予測するための、請求項 15、17、19、20、25、または 47 に記載の抗体あるいはそのフラグメントまたは組成物の使用。

【請求項 77】

前記抗体またはそのフラグメントあるいは組成物の前記使用が、自動化染色デバイス上で実施される、請求項 72 に記載の抗体またはそのフラグメントあるいは組成物。

【請求項 78】

前記検出が手動で行われる、請求項 72 に記載の抗体またはそのフラグメントあるいは組成物。 10

【請求項 79】

前記検出が自動で行われる、請求項 72 に記載の抗体またはそのフラグメントあるいは組成物。

【請求項 80】

前記検出が画像分析によって行われる、請求項 72 に記載の抗体またはそのフラグメントあるいは組成物。

【請求項 81】

請求項 15、17、19、20、25、26、または 47 に記載の抗体またはそのフラグメントが生物学的サンプル中で結合するタンパク質を検出するための方法であって、生物学的サンプルを前記抗体またはそのフラグメントと接触させる工程、および生物学的サンプル中のタンパク質に結合した抗体またはそのフラグメントの存在を検出する工程を包含する、方法。 20

【請求項 82】

前記生物学的サンプルが肺組織、膀胱組織、乳房組織、および前立腺組織を含む、請求項 81 に記載の方法。

【請求項 83】

前記生物学的サンプルが、正常組織、新生物組織、膀胱組織、腎臓組織、卵巣組織、甲状腺組織、子宮内膜組織、腎臓組織、扁桃腺組織、膵臓組織、結腸組織、リンパ節組織、新生物膵臓組織、胃組織、前立腺組織、肺組織、および乳房組織からなる群より選択される、請求項 81 に記載の方法。 30

【請求項 84】

前記タンパク質に結合した抗体またはそのフラグメントの存在を前記検出する工程が自動染色デバイス上で実施される、請求項 81 に記載の方法。

【請求項 85】

前記タンパク質に結合した抗体またはそのフラグメントの存在を検出する工程が手動で行われる、請求項 81 に記載の方法。

【請求項 86】

前記タンパク質に結合した抗体またはそのフラグメントの存在を検出する工程が自動で行われる、請求項 81 に記載の方法。 40

【請求項 87】

前記タンパク質に結合した抗体またはそのフラグメントの存在を検出する工程が画像分析によって行われる、請求項 81 に記載の方法。

【請求項 88】

前記検出する工程が、免疫組織化学 (IHC)、FFPE の IHC、凍結組織切片の IHC、免疫細胞化学、および ELISA からなる群より選択される方法を含む、請求項 81 に記載の方法。

【請求項 89】

生物学的サンプル中の少なくとも 2 つの異なるタンパク質を検出するための方法であって、

- 前記生物学的サンプルを少なくとも2種の抗体またはそれらのフラグメントを含む組成物と接触させる工程であって、前記少なくとも2種の抗体またはそれらのフラグメントの少なくとも1つが、少なくともp40に特異的に結合して、抗原-抗体複合体を形成する工程、および

- 前記抗原-抗体複合体を検出する工程
を包含する、方法。

【請求項90】

前記少なくとも2種の抗体またはそれらのフラグメントのうちの前記少なくとも1つが少なくともp40に特異的に結合することが、前記少なくとも2種の抗体またはそれらのフラグメントの少なくとも1つが少なくともp40に特異的に結合し、そして染色細胞の約1%より大きい陽性指示カットオフ値を有することを含む、請求項89に記載の方法。

10

【請求項91】

請求項90に記載の方法であって、前記陽性指示カットオフ値が、

- 染色細胞の約2%より大きい
- 染色細胞の約3%より大きい
- 染色細胞の約4%より大きい
- 染色細胞の約5%より大きい
- 染色細胞の約6%より大きい
- 染色細胞の約7%より大きい
- 染色細胞の約8%より大きい
- 染色細胞の約9%より大きい、および
- 染色細胞の約10%より大きい

20

からなる群より選択される、方法。

【請求項92】

前記少なくとも2種の抗体またはそれらのフラグメントが少なくとも1つの第1の一次抗体および少なくとも1つの第2の一次抗体を含む、請求項89に記載の方法。

【請求項93】

前記少なくとも2種の抗体またはそれらのフラグメントの前記少なくとも1つが、配列番号2の核酸配列によってコードされるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、および配列番号1の核酸配列によってコードされるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、請求項89に記載の方法。

30

【請求項94】

前記少なくとも2種の抗体またはそれらのフラグメントの前記少なくとも1つが、配列番号2の核酸配列によってコードされるアミノ酸配列の少なくとも約70%と同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、および配列番号1の核酸配列によってコードされるアミノ酸配列の少なくとも約70%であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、請求項89に記載の方法。

【請求項95】

前記少なくとも約70%同一が、少なくとも約71%、少なくとも約72%、少なくとも約73%、少なくとも約74%、少なくとも約75%、少なくとも約76%、少なくとも約77%、少なくとも約78%、少なくとも約79%、少なくとも約80%、少なくとも約81%、少なくとも約82%、少なくとも約83%、少なくとも約84%、少なくとも約85%、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、および少なくとも約99%からなる群より選択されるパーセンテージを含む、請求項94に記載の方法。

40

【請求項96】

前記少なくとも2種の抗体またはそれらのフラグメントの前記少なくとも1つが、配列番号3、配列番号4、および配列番号3と配列番号5の混合物からなる群より選択される

50

残基を含むアミノ酸配列を有する少なくとも1つのポリペプチドに特異的に結合する、請求項89に記載の方法。

【請求項97】

前記少なくとも2種の抗体またはそれらのフラグメントの前記少なくとも1つが、配列番号3、配列番号4、および配列番号3と配列番号5の混合物からなる群より選択される残基に少なくとも約70%同一であるアミノ酸配列を有する少なくとも1つのポリペプチドに特異的に結合する、請求項89に記載の方法。

【請求項98】

前記少なくとも約70%同一が、少なくとも約71%、少なくとも約72%、少なくとも約73%、少なくとも約74%、少なくとも約75%、少なくとも約76%、少なくとも約77%、少なくとも約78%、少なくとも約79%、少なくとも約80%、少なくとも約81%、少なくとも約82%、少なくとも約83%、少なくとも約84%、少なくとも約85%、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、および少なくとも約99%からなる群より選択されるパーセンテージを含む、請求項97に記載の方法。

10

【請求項99】

前記少なくとも2種の抗体またはそれらのフラグメントの前記少なくとも1つが、アメリカンタイプカルチャーコレクション(ATCC)にATCC特許寄託番号PTA-120163で寄託されているハイブリドーマによって産生された抗体またはそのフラグメントを含む、請求項89に記載の方法。

20

【請求項100】

前記組成物が一次抗体カクテルを含む、請求項89に記載の方法。

【請求項101】

前記少なくとも2種の抗体またはそれらのフラグメントが少なくとも2つの異なる種に由来する、請求項89に記載の方法。

【請求項102】

前記少なくとも2つの異なる種が、マウス、ウサギ、ヤギ、ウマ、ニワトリ、ヒト、およびこれらの任意の組み合わせからなる群より選択される、請求項101に記載の方法。

30

【請求項103】

前記生物学的サンプルを二重染色する工程をさらに含む、請求項89に記載の方法。

【請求項104】

異なる可視化結果を提供する工程をさらに含む、請求項89に記載の方法。

【請求項105】

前記可視化結果が色の結果を含む、請求項104に記載の方法。

【請求項106】

請求項89に記載の方法であって、前記少なくとも2種の抗体またはそれらのフラグメントが、

40

- p40およびDSG-3およびCK5およびナプシンA、
 - p40およびDSG-3およびCK5、
 - p40およびナプシンA、
 - p40およびHMWCKおよびp504s、
 - p40およびp504sおよびCK5/14、
 - p40およびCK5/14およびCK7/18、
 - p40およびCK5/14およびCK8/18
 - p40およびウロプラキンIIおよびウロプラキンIII、ならびに
 - p40およびウロプラキンIIおよびウロプラキンIIIおよびGATA-3
- からなる群より選択されるタンパク質に特異的に各々結合する、方法。

【請求項107】

50

請求項 89 に記載の方法であって、前記少なくとも 2 種の抗体またはそれらのフラグメントが、

- p 40 および D S G - 3 および ナブシン A、
- p 40 および D S G - 3、ならびに
- p 40 および C K 5

からなる群より選択されるタンパク質に特異的に各々結合する、方法。

【請求項 108】

請求項 89 に記載の方法であって、前記抗原 - 抗体複合体を検出する前記工程が前記サンプル上の少なくとも 2 つの抗原 - 抗体複合体の形成を検出する工程を含み、ここで、前記第 1 の抗体が p 40 に特異的に結合し、前記第 2 の抗体が、D S G - 3、C K 4、ナブシン A、H M W C K、p 5 0 4 s、C K 5 / 1 4、C K 7 / 1 8、C K 8 / 1 8、ウロプラキン I I、ウロプラキン I I I、G A T A - 3、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される抗原に特異的に結合する、方法。

10

【請求項 109】

動物またはヒトにおける p 40 タンパク質を検出するための免疫アッセイ方法であって、

- 試験される動物またはヒトから組織を入手する工程、
 - 前記組織中に前記タンパク質が存在するならば、前記組織を請求項 15、17、19、20、25、26、または 47 に記載の抗体またはそのフラグメントと、前記抗体またはそのフラグメントが p 40 タンパク質に結合するような量および条件下で接触させる工程、および
 - 前記結合した抗体の存在を検出する工程
- を包含する、方法。

20

【請求項 110】

前記組織を固定または凍結する工程をさらに包含する、請求項 109 に記載の動物またはヒトにおいて p 40 タンパク質を検出するための免疫アッセイ方法。

【請求項 111】

p 40 に対するエピトープをアンマスクするために前記固定組織または凍結組織を処理する工程をさらに含む、請求項 110 に記載の動物またはヒトにおける p 40 タンパク質を検出するための免疫アッセイ方法。

30

【請求項 112】

免疫組織化学 (I H C)、F F P E の I H C、凍結組織切片の I H C、免疫細胞化学、および E L I S A からなる群より選択される方法を用いて、前記動物またはヒトにおいて前記 p 40 タンパク質を検出する工程をさらに包含する、請求項 109 に記載の p 40 タンパク質を検出するための免疫アッセイ方法。

【請求項 113】

p 40 タンパク質に特異的に結合する抗体の単離された調製物であって、前記抗体が、配列番号 3、配列番号 4、および配列番号 3 と配列番号 5 の混合物からなる群より選択されるエピトープに結合する、調製物。

【発明の詳細な説明】

40

【技術分野】

【0001】

本出願は、2013年2月28日に提出された米国仮特許出願第 61 / 770, 956 号に対する優先権および利益を請求し、本明細書によってその全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

【0002】

本発明は、新規な抗 p 40 抗体、この抗体を含む組成物、カクテル、およびキット、ならびにこの抗体を使用するための方法に関する。

【背景技術】

【0003】

50

組織サンプルの顕微鏡検査、特に、生検によって得られる検査は、疾患の診断のための一般的な方法である。特に、組織サンプル中の特定のタンパク質の発現を検出するために特定の抗体が使用される技術である免疫組織化学 (IHC) は、診断のため、特に、癌の検出および診断のための価値のあるツールであり得る。

p53 は、多くのヒトの癌において変異し得る腫瘍抑制遺伝子である (例えば、各々が参照により本明細書に組み込まれる、「p53 Isoforms: An Intracellular Microprocessor?」Khoury MP, Bourdon JC. *Genes Cancer*. 2011 Apr; 2(4): 453-65 という論文、および「p53/p63/p73 isoforms: an orchestra of isoforms to harmonise cell differentiation and response to stress」Murray-Zmijewski F, Lane DP, Bourdon JC. *Cell Death Differ*. 2006 Jun; 13(6): 962-72 の論文を参照のこと)。p53 の不活性化は、ヒトの癌における最も一般的な遺伝子変化の1つであり得、すべてのヒトの癌の約50%においてさえ存在し得る。p53 は、おそらく、細胞周期の停止またはアポトーシスを生じ得る細胞経路を活性化することによって、DNA 損傷、低酸素症、および代謝の変化を含む、広範な種々の細胞ストレスに応答し得る。p73 は、p53 の鍵となる領域との配列の相同性に基づいて、クローニングされ、p53 ファミリーのメンバーであると同定され得る。p73 は p53 と同様の転写活性を実証し得る。しかし、p73 は p53 とは異なる活性を示しているのではない可能性がある (例えば、各々が参照により本明細書に組み込まれる、「Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers」Kaghad M, Bonnet H, Yang A, Creancier L, Biscan JC, Valent A, Minty A, Chalon P, Lelias JM, Dumont X, Ferrara P, McKeon F, Caput D. *Cell*. 1997 Aug 22; 90(4): 809-19 の論文を参照のこと)。

【0004】

p53 および p73 の DNA 結合ドメインに基づく PCR プライマーを使用して、遺伝子がクローニングされ得、クローニングされた遺伝子配列は、およそ 40 kDa のタンパク質に対応し得る。従って、p53 ファミリーのさらなるメンバーであるこの新たに同定された遺伝子は、p40 として同定され得る (例えば、参照により本明細書に組み込まれる、「A new human p53 homologue」Trink B, Okami K, Wu L, Sriuranpong V, Jen J, Sidransky D. *Nat Med*. 1998 Jul; 4(7): 747-8 の論文を参照のこと)。同じ遺伝子の他のアイソフォームがクローニングされ得、それらの産物が p51、p63、または p73 L と呼ばれ得る (例えば、各々が参照により本明細書に組み込まれる、「Cloning and functional analysis of human p51, which structurally and functionally resembles p53」Osada M, Ohba M, Kawahara C, Ishioka C, Kanamaru R, Kato H, Ikawa Y, Nishimura Y, Nakagawara A, Obinata M, Ikawa S. *Nat Med*. 1998 Jul; 4(7): 839-43 の論文、および「p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities」Yang A, Kaghad M, Wang Y, Gillett E, Fleming M D, Dotsch V, Andrews NC, Caput D, McKeon F. *Mol Cell*. 1998 Sep; 2(3): 305-16 の論文、および「A se

10

20

30

40

50

cond p53-related protein, p73L, with high homology to p73」Senoo M, Seki N, Ohira M, Sugano S, Watanabe M, Inuzuka S, Okamoto T, Tachibana M, Tanaka T, Shinkai Y, Kato H. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998 Jul 30; 248(3): 603-7の論文、および「Cloning and functional analysis of human p51, which structurally and functionally resembles p53」Osada M, Ohba M, Kawahara C, Ishioka C, Kanamaru R, Kato H, Ikawa Y, Nimura Y, Nakagawara A, Obinata M, Ikawa S. *Nat Med*. 1998 Jul; 4(7): 839-43の論文を参照のこと)。これらのアイソフォームの各々は、N末端転写活性化ドメインの存在または非存在さえによって異なり得る。p40、Np63、およびp73Lはこのドメインを欠く可能性がある。

10

【0005】

p40/p63/p51/p73L遺伝子は、頭頸部扁平上皮細胞癌腫および原発性肺扁平上皮細胞癌腫の細胞系統において過剰発現していることが見出され得る(例えば、参照により本明細書に組み込まれる、「AIS is an oncogene amplified in squamous cell carcinoma」Hibi K, Trink B, Patturajan M, Westra WH, Caballero OL, Hill DE, Ratovitski EA, Jen J, Sidransky D. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000 May 9; 97(10): 5462-7の論文を参照のこと)。扁平上皮細胞癌腫におけるこの増幅に起因して、p40/p63/p51/p73L遺伝子は、AIS (amplified in squamous cell carcinoma) と呼ばれ得る。おそらく転写活性化ドメインを含むp40/p63/p51/p73L遺伝子の最長のアイソフォームは、クローニングされ、p63と名付けられたものであり得る(例えば、参照により本明細書に組み込まれる、「p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities」Yang A, Kaghad M, Wang Y, Gillett E, Fleming MD, Dotsch V, Andrews NC, Caput D, McKeon F. *Mol Cell*. 1998 Sep; 2(3): 305-16の論文を参照のこと)。

20

30

【0006】

従って、単純化のために、p40/p63/p51/p73L遺伝子は、頻繁に、p63と呼ばれ得る。しかし、p40、p63、p51、p73L、およびAISはすべて、おそらく対応する様々な長さのタンパク質アイソフォームを生じ、様々な長さの転写物を産生し得る同じ遺伝子についての用語であることに注目すべきである。

【0007】

全長のp63遺伝子は、DNA結合ドメインであるN末端転写活性化ドメインおよびカルボキシオリゴマー化ドメインをコードし得る。p63は2つのプロモーターを有し得、これらは、おそらく、2つの明瞭に異なるタンパク質のクラスを生じ、1つのクラスはトランス活性化ドメイン(TA)を含有し得(おそらくp63またはTAp63として知られる)、他のクラスはN末端トランス活性化ドメインを欠く可能性がある(おそらくp40またはNp63として知られる)(例えば、参照により本明細書に組み込まれる、「p40: A p63 Isoform Useful for Lung Cancer Diagnosis - A Review of the Physiological and Pathological Role of p63」Nobre AR, Albergaría A, Schmitt F. *Acta Cytol*. 2013; 57

40

50

(1) : 1 - 8の論文を参照のこと)。p 40タンパク質は、DNA結合部位について競合すること、またはp 53、p 63、もしくはp 73アイソフォームに直接結合することのいずれかによって、転写についてのドミナントネガティブ因子として作用し得、おそらく転写を誘導するそれらの能力を阻害する。しかし、ある例において、p 40は、おそらく他の方法ではTA型のp 53、p 63、またはp 73によつては活性化されない遺伝子の転写を活性化し得る。1つの見解において、p 63遺伝子は、対立する分子のファミリー、おそらくp 53様の腫瘍抑制因子特性を有するN末端トランス活性化ドメインを含有するタンパク質、およびおそらく発癌特性を有するN末端ドメインを欠いているタンパク質を産生するものと考えられ得る。

【0008】

成体の正常組織において、p 63アイソフォームの発現は、皮膚、食道、および尿路上皮などの正常上皮の基底細胞、ならびに前立腺、乳房、および気管支などの腺状構造の基底細胞の核に制限され得る。これらの細胞において、p 40の発現は、おそらくTA p 63よりも約100倍高いことが見出され得る。p 40およびTA p 63は重複する組織分布を示し得るが、TA p 63は、p 40発現と比較して、分化した細胞中でより多く発現され、おそらく基底細胞中でより少なく発現され得る。アイソフォームについての発現パターンの違いは、おそらく、発生および疾患における各アイソフォームについての異なる役割を示し得る(例えば、参照により本明細書に組み込まれる、「p 40 : A p 63 Isoform Useful for Lung Cancer Diagnosis - A Review of the Physiological and Pathological Role of p 63」Nobre AR, Albergaria A, Schmitt F. *Acta Cytol.* 2013; 57(1) : 1 - 8の論文を参照のこと)。

【0009】

TA p 63およびp 40のアイソフォームの発現レベルを決定することは癌の診断において有用であり得る。特に、IHCは、TA p 63および/またはp 40タンパク質を結合する抗体を使用して、タンパク質の発現を検出するため、そしておそらく、癌、特に、肺癌、前立腺癌、乳癌、および膀胱癌を診断するために有用であり得る。ウサギポリクローナル(RP)抗p 40抗体は、頭頸部扁平上皮癌腫細胞系統および扁平上皮癌腫型の原発性肺腫瘍におけるp 40の発現を同定するためのIHC法において産生および使用され得る(例えば、参照により本明細書に組み込まれる、「A new human p 53 homologue」Trink B, Okami K, Wu L, Sriuranpong V, Jen J, Sidransky D. *Nat Med.* 1998 Jul; 4(7) : 747 - 8の論文を参照のこと)。マウスモノクローナル抗p 63抗体(4A4)もまた、p 63タンパク質のアイソフォームを検出するためにIHC法において産生および使用され得る(例えば、参照により本明細書に組み込まれる、「p 63, a p 53 homolog at 3q27 - 29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities」Yang A, Kaghad M, Wang Y, Gillett E, Fleming MD, Dotsch V, Andrews NC, Caput D, McKeon F. *Mol Cell.* 1998 Sep; 2(3) : 305 - 16の論文を参照のこと)。重要なことに、RP抗p 40抗体は、TA p 63にはおそらく存在しない配列である、p 40アイソフォームに独特であるエピトープ配列を結合し得る。対照的に、抗p 63抗体4A4は、TAとp 40の両方のアイソフォームに共通であり得るエピトープ配列を結合し得、おそらく、p 63遺伝子に由来する両方のクラスのタンパク質を認識することによって汎p 63マーカーの特性を示す4A4を生じるのに対し、RP抗p 40抗体はp 40アイソフォームのみを認識し得、おそらく、より選択的なマーカーであり得る。

【0010】

肺癌は、男性と女性の両方の癌による死亡の主要原因である。結腸癌、乳癌、および前

10

20

30

40

50

立腺癌の合計よりも多くの人が肺癌で死亡している。非小細胞肺癌腫（NSCLC）は肺癌のおよそ80%を含み、いくつかの組織学的型に分類されてもよく、最も一般的には、腺癌（ADC）または扁平上皮癌腫（SCC）さえも含むことがある。肺癌腫の組織学的型への分類は、ヘマトキシリンおよびエオシン（H&E）またはIHC、ある場合においては、ムチン染色を使用する形態学的検査によって実施されてもよい。しかし、正確な分類は、分化が乏しく、またさらには未分化の肺癌腫では困難であり得る。診断は、ニードルコア生検の使用によってさらに複雑にされる可能性があり、これは、免疫組織化学と分子試験の両方のために限られた量の組織を提供し得、粉碎人工物を含み得る。加えて、細胞学試料は、H&E単独を用いる診断のために必要とされる形態学的特徴を欠く可能性がある。

10

【0011】

肺癌の大部分（特に、グレードIおよびII）は、H&E染色のみを用いて診断できるが、標的化治療の出現に伴って、診断の必要性は変化してきており、多くの数のNSCLCの症例の分類のための方法の改善が必要とされている。過去において、おそらく、NSCLCサブタイプに関わらず、同じ治療が患者に提供され得るという事実に起因して、NSCLCの組織学的サブタイピングは限られた診断的価値しかなかった。しかし、標的化治療の利用可能性は、NSCLCの正確なサブタイピングの必要性を生じてきた。例えば、血管内皮成長因子を標的とする治療用ヒトモノクローナル抗体であるペバシズマブは、NSCLC患者のための一般的な治療であり得る。しかし、SCCサブタイプを有する患者は、おそらく、致命的な肺出血による約30%の死亡率に起因して、ペバシズマブを用いるべきではない。さらに、効力の増強は、非扁平上皮癌腫において、従来化学療法へのプリメックストレッド（premetred）の追加を用いて実証できたが、SCCでは実証されない可能性がある。従って、NSCLC試料をサブタイピングするための正確な方法は、最適な治療効力および最小限の副作用で、患者を最良にケアするために有用であり得る。

20

【0012】

IHCは、一般に、NSCLC試料の組織学的サブタイプを決定する際に、おそらく、特に、肺の小細胞癌腫からと同様にSCCからADCを区別する際に、病理学者を補助するために使用することができる。特に、p40へのIHC抗体は、肺癌の診断において、そしておそらく、ADCおよびSCCなどの組織学的サブタイプを区別する際に有用であり得る。RP抗p40抗体を使用して、原発性肺SqCCにおけるp40タンパク質の発現はIHCによって同定されてきたのに対して、肺腺癌の場合においては、p40タンパク質は検出されてこなかった可能性がある（例えば、参照により本明細書に組み込まれる、「AIS is an oncogene amplified in squamous cell carcinoma」Hibi K, Trink B, Patturajan M, Westra WH, Caballero OL, Hill DE, Ratovitski EA, Jen J, Sidransky D. Proc Natl Acad Sci USA. 2000 May 9; 97(10): 5462-7の論文を参照のこと）。

30

【0013】

さらなる研究は、RP抗p40抗体が、扁平上皮癌腫の診断のために汎p63抗体4A4よりも優れ得ること、およびおそらく、RP抗p40抗体はより特異的であり得ることを示してきた。1つの研究において、RP抗p40抗体と汎p63抗体の両方は、評価されたSCCの81の症例すべてを染色し、おそらく、両方の抗体がSCCにおいて等価な感度を示すことを示した。対照的に、汎p63抗体は、ADCの症例の74/237（約31%）を染色した一方、RP抗p40抗体はADCの症例の7/205（約3%）のみを染色し、おそらく、RP抗p40抗体は汎p63 4A4よりもより特異的であり得ることを示した。さらに、汎p63 4A4抗体は、試験された大細胞リンパ腫の試験された症例の82/152（約54%）を染色したのに対して、RP抗p40抗体は、これらの症例のいずれにおいても染色を欠いており、おそらくRP抗p40抗体についての特異

40

50

性の改善を生じていた。本研究は、4A4を用いる複数のp63アイソフォームの検出の代わりにp40のIHC検出が、SCCとしての分化が乏しいADCまたはリンパ腫の誤った解釈を妨害することを示し得る（例えば、各々が参照により本明細書に組み込まれる、「p40 (Np63) is superior to p63 for the diagnosis of pulmonary squamous cell carcinoma」Bishop JA, Teruya-Feldstein J, Westra WH, Pelosi G, Travis WD, Rekhtman N. *Mod Pathol*. 2012 Mar; 25(3): 405-15の論文および「A study of Np63 expression in lung non-small cell carcinomas」Nonaka D. *Am J Surg Pathol*. 2012 Jun; 36(6): 895-9の論文を参照のこと）。

10

【0014】

他の研究もまた、SCCを同定する際のRP抗p40抗体の使用を、おそらく、抗TTF-1抗体と組み合わせて報告し得、これはADCのためのマーカーであり得る。1つのこのような研究において、生検試料からの小さな組織サンプルのIHCを使用して、ADCおよびSCCの45/46（約98%）の症例が、RP抗p40および抗TTF-1抗体の組み合わせを使用して診断された（例えば、参照により本明細書に組み込まれる、「Np63 (p40) and thyroid transcription factor-1 immunoreactivity on small biopsies or cell blocks for typing non-small cell lung cancer: a novel two-hit, sparing-material approach」Pelosi G, Fabbri A, Bianchi F, Maisonneuve P, Rossi G, Barbareschi M, Graziano P, Cavazza A, Rekhtman N, Pastorino U, Scanagatta P, Papotti M. *J Thorac Oncol*. 2012 Feb; 7(2): 281-90の論文を参照のこと）。

20

【0015】

同様の研究において、RP抗p40抗体および抗TTF-1抗体を含有する抗体カクテルは、SCCについてRP抗p40抗体の約92%の感度および約93%の特異性、ならびにADCについて抗TTF-1の約77%の感度および約100%の特異性を生じた（例えば、参照により本明細書に組み込まれる、「Tissue-Preserving Antibody Cocktails to Differentiate Primary Squamous Cell Carcinoma, Adenocarcinoma, and Small Cell Carcinoma of Lung」Brown AF, Sirohi D, Fukuoka J, Cagle P, Policarpio-Nicolas M, Tacha D, Jagirdar J. *Arch Pathol Lab Med*. 2013 Jan 4の論文を参照のこと）。

30

【0016】

正常膀胱組織において、TA p63は、尿路上皮の基底細胞および中間細胞において発現され得るのに対して、p40は検出されない可能性がある。対照的に、p40発現は、尿路上皮癌腫においてIHCによって検出され得、おそらく、非侵襲性の29/147（約19.7%）の症例で、おそらく侵襲性の癌腫の23/55（約41.8%）の症例であった（例えば、参照により本明細書に組み込まれる、「Distinct expression profiles of p63 variants during urothelial development and bladder cancer progression」Karni-Schmidt O, Castillo-Martin M, Shen TH, Gladoun N, Domingo-Domenech J, Sanchez-Carbayo M, Li Y, Lowe S, Prives C, Cordon-Cardo C. *Am J Pathol*. 2011 Mar; 178(3): 1350-60の論文を参照のこと）。p40の発現は尿路上皮癌腫の予後因

40

50

子でもあり得る。例えば、p40の発現を実証する筋肉侵襲性尿路上皮癌腫の症例は、おそらく約11.6 ± 約1.3ヶ月のメジアン ± SD全体生存を示し得、おそらく、p40発現が乏しい予後の予測因子であることを示す。対照的に、p40発現を欠いている侵襲性尿路上皮癌腫の症例は、おそらく約25 ± 約6.4ヶ月のより長いメジアン ± SD全体生存を実証し得、おそらく、p40発現の欠如がより良好な予後の予測因子であることを示す。顕著には、総p63発現は、侵襲性癌腫の予後指標ではない可能性があり、これはおそらく、TA p63およびp40アイソフォームが対立する生物学的活性を示すからである。結果として、p40アイソフォームに特異的なマーカーは、汎p63マーカーと比較して、尿路上皮癌腫のために使用されてもよい。

【0017】

前立腺の基底細胞において通常発現され得るp40の発現の喪失は、一般的に、前立腺癌の指標として使用されてもよい。具体的には、p40 mRNA転写物の量は、前立腺癌細胞中では、TA p63 mRNAの量と比較して、より低い可能性があり、おそらく、およそ約2000倍低く、またはおそらく、検出不可能でさえあり得る。従って、おそらく、p40は前立腺癌細胞系統には実質的に存在しないのに対して、TA p63 mRNAは様々なレベルで検出可能である。良性および悪性の前立腺組織の示差的診断において、p40の喪失を検出し得る方法は、TA p63を検出し得る方法よりも好ましい可能性がある(例えば、各々が参照により本明細書に組み込まれる、「p63 is a prostate basal cell marker and is required for prostate development」Signoretti S, Waltregny D, Dilks J, Isaac B, Lin D, Garraway L, Yang A, Montironi R, McKeon F, Loda M. *Am J Pathol.* 2000 Dec; 157(6): 1769-75の論文、および「Differential expression of p63 isoforms in normal tissues and neoplastic cells」Nylander K, Vojtesek B, Nenutil R, Lindgren B, Roos G, Zhanxiang W, Sjostrom B, Dahlgqvist A, Coates PJ. *J Pathol.* 2002 Dec; 198(4): 417-27の論文を参照のこと)。

【0018】

正常乳管において、筋上皮細胞は、上皮構造に沿って連続基底リムを形成し得る。この基底境界の連続性の段階的な喪失は、インサイチュで癌腫の存在を示すものであり得、筋上皮細胞の全体的な喪失は、しばしば、侵襲性の乳癌において観察され得る。良性病変は、典型的には、悪性病変と形態学的に類似しながら、それらの連続する筋上皮層を保持し得る。IHCによる筋上皮の核染色は、抗p40抗体を使用して観察されてもよい。この様式において、抗p40抗体は、基底層における筋上皮細胞の連続性を評価するために有用であり得、従って、乳房の病変の診断に役立つ(例えば、参照により本明細書に組み込まれる、「p63, a p53 homologue, is a selective nuclear marker of myoepithelial cells of the human breast」Barbareschi M, Pecciarini L, Cangi MG, Macri E, Rizzo A, Viale G, Doglioni C. *Am J Surg Pathol.* 2001 Aug; 25(8): 1054-60の論文を参照のこと)。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0019】

【非特許文献1】p53 Isoforms: An Intracellular Microprocessor?」Khoury MP, Bourdon JC. *Genes Cancer.* 2011 Apr; 2(4): 453-65

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0020】

従って、癌の診断における使用のための高感度でさらに特異的である抗 p 4 0 抗体についての明確な必要性が存在する。本発明の実施形態は、高感度であることができ、さらに高度に特異的であり得る抗 p 4 0 マウスモノクローナル抗体 [クローン B C 2 8] を提供する。本発明の1つの例は、S C C、膀胱癌、乳癌、および前立腺癌などを含むがこれらに限定されない特定の癌における p 4 0 タンパク質の存在または非存在を検出し得るマウスモノクローナル抗 p 4 0 抗体を提供する。N S C L C の場合において、本発明の1つの例は、肺 S C C に対して優秀な感度を実証することができ (約 6 5 / 6 7、約 9 7 %)、おそらく、肺 A D C に対してさえも優秀な特異性であった (約 0 / 7 1、約 0 %)。R P 抗 p 4 0 抗体と比較したときに、マウスモノクローナル抗 p 4 0 B C 2 8 は、典型的には、より明確な染色パターンを示すことができ、おそらく、モノクローナル抗体の利点を提供しながら、マクロファージの染色が欠如し、人工物もより少なかった。B C 2 8 はまた、R P 抗 p 4 0 抗体によって染色され得る肺 A D C のいくつかの試料を染色しないことができ、おそらく、代替品に対する B C 2 8 の優れた特異性を示している。従って、B C 2 8 などのモノクローナル抗 p 4 0 抗体は、他の汎 p 6 3 マーカーまたは代替の抗 p 4 0 抗体と比較して、診断のために好ましい可能性がある。

10

【0021】

抗 p 4 0 抗体の開発は、原発性癌およびさらには転移性癌の診断、特に、肺 S C C、尿路上皮癌腫、前立腺癌、および乳癌などの診断において補助となることができ、さらには p 4 0 対 T A p 6 3 のタンパク質発現を区別する際の補助になることができる。おそらく、汎 p 6 3 マーカー 4 A 4 および R P 抗 p 4 0 抗体と比較した場合などに、等価なまたは優れた染色感度を有し、そしておそらく、さらに優れた染色特異性を有する、マウスモノクローナル抗 p 4 0 抗体 [B C 2 8] などの新たな抗 p 4 0 抗体が、本発明において提供される。

20

【課題を解決するための手段】

【0022】

発明の開示

本発明の一般的な実施形態は、p 4 0 を認識するためのモノクローナル抗体、それらの調製のための方法、免疫組織化学における使用などを含み得る。実施形態において、抗 p 4 0 抗体クローン B C 2 8 などの抗 p 4 0 抗体クローンは、ヒト p 4 0 タンパク質アミノ酸 1 - 1 7 のサブセットに対応する1つ以上のペプチドを用いて B a l b / C マウスを免疫することによって得ることができる。p 4 0 ペプチドは、腹腔内注射を介して、アジュバントとともに、B A L B / c マウスに注射されてもよく、おそらく、約3週間の間隔で約5回である。p 4 0 に対する免疫反応は、組換え p 4 0 タンパク質への直接 E L I S A によって評価されてもよい。最高の力価を有するマウスは、細胞融合によるハイブリドーマの発生のために選択されてもよい。ヒト組織での p 4 0 に対する最良の反応を実証するハイブリドーマクローンが選択されてもよく、B C 2 8 と名付けられてもよい。B C 2 8 クローンはアイソタイプについて試験されてもよく、マウス I g G 1 / k a p p a として同定されてもよい。B C 2 8 抗体は、ハイブリドーマ細胞の大規模組織培養によって、および B A L B / c マウスにおける腹水によって、産生されてもよい。上清および抗体の腹水が収集されてもよく、抗体はプロテイン A アフィニティーカラムによって精製されてもよい。B C 2 8 は、E L I S A、ウェスタンブロッティング、およびさらにはヒト組織によって、ヒト p 4 0 タンパク質に対する特異的反応を実証してもよい。

30

40

【0023】

マウスモノクローナル抗 p 4 0 抗体 B C 2 8 などの抗 p 4 0 抗体は、組織サンプル中の p 4 0 の検出のために有用であり得、おそらく、T A p 6 3 および p 4 0 アイソフォームに対する現在知られている抗体を超えたいくつかの顕著であるが予測されなかった利点を伴う。従来的な免疫組織化学手順において使用されるとき、マウス抗 p 4 0 抗体 B C 2 8 などの抗 p 4 0 抗体は、おそらく、知られている抗 p 6 3 抗体および抗 p 4 0 抗体と同様

50

の感度で、p 4 0 の核染色を生じることができる。一方で、BC 2 8 などの抗 p 4 0 抗体は、おそらく、抗 p 6 3 抗体および他の知られている抗 p 4 0 抗体と比較した場合に、特異性の増加を示すことができ、これは有意な改善を提供し得る。モノクローナルの供給源に由来するという可能な利点に加えて、BC 2 8 などの抗 p 4 0 抗体はまた、他の知られている抗 p 4 0 および抗 p 6 3 抗体と比較したときに、より少ない人工物およびより高い細胞型特異性を伴って、例えば、おそらく、マクロファージを染色せずに、より明確な染色を提供することができる。BC 2 8 などの抗 p 4 0 抗体を用いると、サンプルの分析は単純化することができ、腫瘍細胞中の p 4 0 発現を容易に同定可能にすることができ、さもなくば診断が困難、あいまい、または可能でないことさえあり得る場合において診断を可能にする。

10

【図面の簡単な説明】

【0024】

【図1】図1は、肺扁平上皮癌腫の症例を染色する抗 p 4 0 抗体 BC 2 8 の例の白黒バージョンを示す。

【0025】

【図2】図2は、肺扁平上皮癌腫の症例を染色する抗 p 4 0 抗体 BC 2 8 の例の白黒バージョンを示す。

【0026】

【図3】図3は、図2に示されるのと同じ肺扁平上皮癌腫の症例を染色する RP 抗 p 4 0 抗体の例の白黒バージョンを示す。

20

【0027】

【図4】図4は、BC 2 8 による染色を伴わない、肺腺癌の症例に対する抗 p 4 0 抗体 BC 2 8 の例の白黒バージョンを示す。

【0028】

【図5】図5は、図4に示されるのと同じ肺腺癌の症例を染色する RP 抗 p 4 0 抗体の例の白黒バージョンを示す。

【0029】

【図6】図6は、膀胱癌の症例を染色する抗 p 4 0 抗体 BC 2 8 の例の白黒バージョンを示す。

【0030】

【図7】図7は、図6に示されるのと同じ膀胱癌の試料を染色する抗 p 6 3 抗体 4 A 4 の例の白黒バージョンを示す。

30

【0031】

【図8】図8は、膀胱癌の症例を染色する抗 p 4 0 抗体 BC 2 8 の例の白黒バージョンを示す。

【0032】

【図9】図9は、正常前立腺を染色する抗 p 4 0 抗体 BC 2 8 の例の白黒バージョンを示す。

【0033】

【図10】図10は、BC 2 8 による染色を伴わない、前立腺癌の症例の抗 p 4 0 抗体 BC 2 8 の例の白黒バージョンを示す。

40

【0034】

【図11】図11は、正常乳管を染色する抗 p 4 0 抗体 BC 2 8 の例の白黒バージョンを示す。

【0035】

【図12】図12は、乳管癌腫インサイチュ(DCIS)の症例を染色する抗 p 4 0 抗体 BC 2 8 の例の白黒バージョンを示す。

【0036】

【図13】図13は、皮膚の基底細胞癌腫の症例を染色する抗 p 4 0 抗体 BC 2 8 の例の白黒バージョンを示す。

50

【 0 0 3 7 】

【 図 1 4 】 図 1 4 は、喉頭の扁平上皮癌腫の症例を染色する抗 p 4 0 抗体 B C 2 8 の例の白黒バージョンを示す。

【 0 0 3 8 】

【 図 1 5 】 図 1 5 は、喉頭蓋の扁平上皮癌腫の症例を染色する抗 p 4 0 抗体 B C 2 8 の例の白黒バージョンを示す。

【 0 0 3 9 】

【 図 1 6 】 図 1 6 は、R P 抗 p 4 0 抗体による、図 1 7 における肺の同じ試料における肺胞内マクロファージの中等度染色の例の白黒バージョンを示す。

【 0 0 4 0 】

【 図 1 7 】 図 1 7 は、抗 p 4 0 抗体 B C 2 8 による、肺における肺胞内マクロファージの非常に弱い染色またはおそらく染色の非存在の例の白黒バージョンを示す。

【 0 0 4 1 】

【 図 1 8 】 図 1 8 は、バックグラウンド染色の非常に弱い染色またはおそらく染色の非存在を伴う、小腸を染色する抗 p 4 0 抗体 B C 2 8 の例の白黒バージョンを示す。

【 0 0 4 2 】

【 図 1 9 】 図 1 9 は、バックグラウンド染色が存在する場合の、図 1 8 に示されるのと同じ小腸の症例を染色する抗 p 6 3 抗体 4 A 4 の例の白黒バージョンを示す。

【 0 0 4 3 】

【 図 2 0 】 図 2 0 は、細胞質染色を伴わない、乳管の筋上皮細胞の核を染色する抗 p 4 0 抗体 B C 2 8 の例の白黒バージョンを示す。

【 0 0 4 4 】

【 図 2 1 】 図 2 1 は、図 2 0 の同じ乳房試料を染色する抗 p 6 3 抗体 4 A 4 の例の白黒バージョンを示す。しかし、強力な細胞質染色が存在している。

【 0 0 4 5 】

【 図 2 2 】 図 2 2 は、前立腺組織、おそらく、前立腺上皮内新生物形成 (P I N) の試料を染色する抗 p 4 0 抗体 B C 2 8 の例の白黒バージョンを示し、前立腺の基底細胞の強力な核染色を伴う。染色は図 2 3 よりもわずかに強くかつ鋭敏である。

【 0 0 4 6 】

【 図 2 3 】 図 2 3 は、図 2 2 と同じ前立腺試料を染色する抗 p 6 3 抗体 4 A 4 の例の白黒バージョンを示し、前立腺の基底細胞の強力な核染色を伴う。染色は図 2 2 よりもわずかに弱くかつ鋭敏でない。また、4 A 4 によって染色される基底細胞は B C 2 8 よりも少ない。

【 0 0 4 7 】

【 図 2 4 】 図 2 4 は、前立腺組織、おそらく、前立腺上皮内新生物形成 (P I N) の試料を染色する抗 p 4 0 抗体 B C 2 8 の例の白黒バージョンを示し、前立腺の基底細胞の強力な核染色を伴う。

【 0 0 4 8 】

【 図 2 5 】 図 2 5 は、図 2 2 の同じ前立腺試料を染色する抗 p 6 3 抗体 4 A 4 の例の白黒バージョンを示し、前立腺の基底細胞の強力な核染色を伴う。

【 0 0 4 9 】

【 図 2 6 】 図 2 6 は、肺扁平上皮癌腫の試料を染色する D S G - 3 + C K 5 + p 4 0 [B C 2 8] + ナプシン A の例の白黒バージョンを示す。D S G - 3 の染色 (茶色) は膜性であり、C K 5 の染色 (茶色) は細胞質性であり、p 4 0 の染色 (茶色) は核性である。ナプシン A は減少し得、またはおそらく、この試料中に残存している正常肺に制限され得る。

【 0 0 5 0 】

【 図 2 7 】 図 2 7 は、肺腺癌の試料を染色する D S G - 3 + C K 5 + p 4 0 [B C 2 8] + ナプシン A の例の白黒バージョンを示す。ナプシン A (赤色) の染色は細胞質性である。D S G - 3、C K 5、および p 4 0 の染色 (茶色) は減少し得、またはおそらく、この

10

20

30

40

50

サンプル中には存在していない可能性がある。

【0051】

【図28】図28は、肺扁平上皮癌腫の試料を染色するDSG-3 + CK5 + p40 [BC28]の例の白黒バージョンを示す。DSG-3の染色(茶色)は膜性であり、CK5の染色(茶色)は細胞質性であり、p40(茶色)の染色は核性である。

【0052】

【図29】図29は、肺腺癌の試料を染色するDSG-3 + CK5 + p40 [BC28]の例の白黒バージョンを示す。DSG-3、CK5、およびp40の染色(茶色)は減少し得、またはおそらく、このサンプル中には存在していない可能性がある。

【0053】

【図30】図30は、肺腺癌の試料を染色する抗体カクテルDSG-3 + p40 [BC28] + ナブシンAの例の白黒バージョンを示す。ナブシンAの染色(赤色)は細胞質性である。DSG-3の染色(茶色、膜性)およびp40の染色(茶色、核性)は減少し得、またはおそらく、このサンプル中には存在していない可能性がある。

10

【0054】

【図31】図31は、肺腺癌の試料を染色する抗体カクテルDSG-3 + p40 [BC28] + ナブシンAの例の白黒バージョンを示す。ナブシンAの染色(赤色)は細胞質性である。DSG-3染色(茶色、膜性)およびp40染色(茶色、核性)は減少し得、またはおそらく、このサンプル中では正常肺組織に制限され得る。

【0055】

【図32】図32は、肺扁平上皮癌腫の試料を染色する抗体カクテルDSG-3 + p40 [BC28] + ナブシンAの例の白黒バージョンを示す。DSG-3の染色(茶色)は膜性である。p40の染色(茶色、核性)およびナブシンAの染色(赤色、細胞質性)は減少し得、またはおそらく、このサンプル中には存在していない可能性がある。

20

【0056】

【図33】図33は、肺扁平上皮癌腫の試料を染色する抗体カクテルDSG-3 + p40 [BC28] + ナブシンAの例の白黒バージョンを示す。DSG-3の染色(茶色)は膜性であり、p40の染色(茶色)は核性である(in nuclear)。ナブシンA(赤色、細胞質性)は減少し得、またはおそらく、このサンプル中では正常肺組織に制限され得る。

30

【0057】

【図34】図34は、肺扁平上皮癌腫の試料を染色する抗体カクテルDSG-3 + p40 [BC28] + ナブシンAの例の白黒バージョンを示す。p40の染色(茶色)は核性である。DSG-3の染色(茶色、膜性)および/またはナブシンAの染色(赤色、細胞質性)は減少し得、またはおそらく、このサンプル中には存在していない可能性がある。

【0058】

【図35】図35は、肺扁平上皮癌腫の試料を染色する抗体カクテルDSG-3 + p40 [BC28]の例の白黒バージョンを示す。DSG-3の染色(茶色)は膜性であり、p40の染色(茶色)は核性である。

【0059】

【図36】図36は、肺扁平上皮癌腫の試料を染色する抗体カクテルp40 [BC28] + CK5 (RM)の例の白黒バージョンを示す。p40の染色(茶色)は核性であり、CK5の染色(赤色)は細胞質性である。

40

【0060】

【図37】図37は、肺腺癌の試料を染色する抗体カクテルp40 [BC28] + CK5 (RM)の例の白黒バージョンを示す。p40の染色(茶色、核性)およびCK5の染色(赤色、細胞質性)は減少し得、またはおそらく、このサンプル中には存在していない可能性がある。

【0061】

【図38】図38は、肺扁平上皮癌腫の試料を染色する抗体カクテルp40 [BC28]

50

+ ナプシン A の例の白黒バージョンを示す。p 40 の染色（茶色）は核性である。ナプシン A（赤色、細胞質性）は減少し得、またはおそらく、このサンプル中では正常肺組織に制限され得る。

【0062】

【図39】図39は、肺腺癌の試料を染色する抗体カクテル p 40 [BC28] + ナプシン A の例の白黒バージョンを示す。ナプシン A の染色（赤色）は細胞質性である。p 40 の染色（茶色、核性）は減少し得、またはおそらく、このサンプル中には存在していない可能性がある。

【0063】

【図40】図40は、おそらく正常前立腺、おそらく前立腺癌、およびおそらく前立腺上皮内新生物形成（PIN）の領域さえも含有し得る前立腺の試料を染色する抗体カクテル p 40 [BC28] + HMWCK + P504S の例の白黒バージョンを示す。p 40 の染色（茶色）は核性である。HMWCK の染色（茶色）は細胞質性である。P504S の染色（赤色）は細胞質性であり、おそらく顆粒状である。

10

【0064】

【図41】図41は、おそらく正常前立腺、おそらく前立腺癌、およびおそらく前立腺上皮内新生物形成（PIN）の領域さえも含有し得る前立腺の試料を染色する抗体カクテル p 40 [BC28] + CK5 / 14 + P504S の例の白黒バージョンを示す。p 40 の染色（茶色）は核性である。CK5 / 14 の染色（茶色）は細胞質性である。P504S の染色（赤色）は細胞質性であり、おそらく顆粒状である。

20

【0065】

【図42】図42は、乳房組織、おそらく異常組織、またはおそらくさらに乳癌の試料を染色する抗体カクテル p 40 [BC28] + CK5 / 14 + CK7 / 18 の例の白黒バージョンを示す。p 40 の染色（茶色）は核性である。CK5 / 14 の染色（茶色）は細胞質性である。CK7 / 18 の染色（赤色）は細胞質性である。

【0066】

【図43】図43は、乳房組織、おそらく、異常組織、またはおそらくさらに乳癌の試料を染色する抗体カクテル p 40 [BC28] + CK5 / 14 + CK7 / 18 の例の白黒バージョンを示す。p 40 の染色（茶色）は核性であり、おそらく、減少しているかまたはこのサンプル中には存在していない。CK5 / 14 の染色（茶色）および CK7 / 18 の染色（赤色）は細胞質性および膜性である。観察された染色パターンは、おそらく、2モード染色である。

30

【0067】

【図44】図44は、乳房組織、おそらく、異常組織、またはおそらくさらに乳癌の試料を染色する抗体カクテル p 40 [BC28] + CK5 / 14 + CK8 / 18 の例の白黒バージョンを示す。p 40 の染色（茶色）は核性であり、おそらく、減少しているか、またはこのサンプル中には存在していない。CK5 / 14 の染色（茶色）および CK8 / 18 の染色（赤色）は細胞質性である。

【0068】

【図45】図45は、尿路上皮癌腫の試料を染色する抗体カクテル p 40 [BC28] + ウロプラキン II + ウロプラキン III の例の白黒バージョンを示す。p 40 の染色（茶色）は核性である。ウロプラキン II の染色（茶色）およびウロプラキン III の染色（茶色）は細胞質性および膜性である。

40

【0069】

【図46】図46は、尿路上皮癌腫の試料を染色する抗体カクテル p 40 [BC28] + ウロプラキン II + ウロプラキン III + GATA - 3 の例の白黒バージョンを示す。p 40 の染色（茶色）および GATA - 3 の染色（赤色）は核性である。ウロプラキン II の染色（茶色）およびウロプラキン III（茶色）の染色は細胞質性および膜性である。

【0070】

【図47】図47は、肺扁平上皮癌腫の試料を染色する抗体カクテル p 40 [BC28]

50

+ C K 5 の例の白黒バージョンを示す。p 4 0 の染色（茶色）は核性であり、C K 5 の染色（茶色）は細胞質性である。

【0071】

【図48】図48は、ウェスタンブロットによる、抗p40抗体BC28のp40タンパク質（左のパネル、レーン2）およびTAp63タンパク質（左のパネル、レーン3）との反応性の白黒バージョンを示す。右のパネルは、ウェスタンブロットによる、抗p63抗体4A4のp40タンパク質（右のパネル、レーン2）およびTAp63タンパク質（右のパネル、レーン3）との反応性を示す。レーン1は両方のパネルにおいて対照溶解物である。

【0072】

【図49】図49は、本発明の様々な実施形態に従うキットの図解的な概略の例を示す。

【0073】

【図50】図50は、本発明の様々な実施形態に従う免疫アッセイ法の図式的な概略の例を示す。

【0074】

【図51】図51は、肺扁平上皮癌腫の症例を染色する抗p40抗体BC28の例の図1のカラーバージョンを示す。

【0075】

【図52】図52は、肺扁平上皮癌腫の症例を染色する抗p40抗体BC28の例の図2のカラーバージョンを示す。

【0076】

【図53】図53は、図52に示されるのと同じ肺扁平上皮癌腫の症例を染色するRP抗p40抗体の例の図3のカラーバージョンを示す。

【0077】

【図54】図54は、BC28による染色を伴わない、肺腺癌の症例の抗p40抗体BC28の例の図4のカラーバージョンを示す。

【0078】

【図55】図55は、図54に示されるのと同じ肺腺癌の症例を染色するRP抗p40抗体の例の図5のカラーバージョンを示す。

【0079】

【図56】図56は、膀胱癌の症例を染色する抗p40抗体BC28の例の図6のカラーバージョンを示す。

【0080】

【図57】図57は、図56に示されるのと同じ膀胱癌の試料を染色する抗p63抗体4A4の例の図7のカラーバージョンを示す。

【0081】

【図58】図58は、膀胱癌の症例を染色する抗p40抗体BC28の例の図8のカラーバージョンを示す。

【0082】

【図59】図59は、正常前立腺を染色する抗p40抗体BC28の例の図9のカラーバージョンを示す。

【0083】

【図60】図60は、BC28による染色を伴わない、前立腺癌の症例の抗p40抗体BC28の例の図10のカラーバージョンを示す。

【0084】

【図61】図61は、正常乳管を染色する抗p40抗体BC28の例の図11のカラーバージョンを示す。

【0085】

【図62】図62は、乳管癌腫インサイチュ(DCIS)の症例を染色する抗p40抗体BC28の例の図12のカラーバージョンを示す。

10

20

30

40

50

【 0 0 8 6 】

【 図 6 3 】 図 6 3 は、皮膚の基底細胞癌腫の症例を染色する抗 p 4 0 抗体 B C 2 8 の例の図 1 3 のカラーバージョンを示す。

【 0 0 8 7 】

【 図 6 4 】 図 6 4 は、喉頭の扁平上皮癌腫の症例を染色する抗 p 4 0 抗体 B C 2 8 の例の図 1 4 のカラーバージョンを示す。

【 0 0 8 8 】

【 図 6 5 】 図 6 5 は、喉頭蓋の扁平上皮癌腫の症例を染色する抗 p 4 0 抗体 B C 2 8 の例の図 1 5 のカラーバージョンを示す。

【 0 0 8 9 】

【 図 6 6 】 図 6 6 は、R P 抗 p 4 0 抗体による、図 6 7 と同じ肺の試料における肺胞内マクロファージの中程度の染色の例の図 1 6 のカラーバージョンを示す。

【 0 0 9 0 】

【 図 6 7 】 図 6 7 は、抗 p 4 0 抗体 B C 2 8 による、肺における肺胞内マクロファージの非常に弱い染色またはおそらく染色の非存在の例の図 1 7 のカラーバージョンを示す。

【 0 0 9 1 】

【 図 6 8 】 図 6 8 は、非常に低いバックグラウンド染色またはおそらくバックグラウンド染色の非存在を伴う、小腸を染色する抗 p 4 0 抗体 B C 2 8 の例の図 1 8 のカラーバージョンを示す。

【 0 0 9 2 】

【 図 6 9 】 図 6 9 は、バックグラウンド染色が存在する場合の、図 1 8 に示されるのと同じ小腸の症例を染色する抗 p 6 3 抗体 4 A 4 の例の図 1 9 のカラーバージョンを示す。

【 0 0 9 3 】

【 図 7 0 】 図 7 0 は、細胞質染色を伴わない、乳管の筋上皮細胞の核を染色する抗 p 4 0 抗体 B C 2 8 の例の図 2 0 のカラーバージョンを示す。

【 0 0 9 4 】

【 図 7 1 】 図 7 1 は、図 7 0 の同じ乳房試料を染色する抗 p 6 3 抗体 4 A 4 の例の図 2 1 のカラーバージョンを示す。しかし、強力な細胞質染色が存在している。

【 0 0 9 5 】

【 図 7 2 】 図 7 2 は、前立腺組織、おそらく、前立腺上皮内新生物形成 (P I N) の試料を染色する抗 p 4 0 抗体 B C 2 8 の例の図 2 2 のカラーバージョンを示し、前立腺の基底細胞の強力な核染色を伴う。染色は図 7 3 よりもわずかに強くかつ鋭敏である。

【 0 0 9 6 】

【 図 7 3 】 図 7 3 は、図 7 2 と同じ前立腺試料を染色する抗 p 6 3 抗体 4 A 4 の例の図 2 3 のカラーバージョンを示し、前立腺の基底細胞の強力な核染色を伴う。染色は図 7 2 よりもわずかに弱くかつ鋭敏でない。また、4 A 4 によって染色される基底細胞は B C 2 8 よりも少ない。

【 0 0 9 7 】

【 図 7 4 】 図 7 4 は、前立腺組織、おそらく、前立腺上皮内新生物形成 (P I N) の試料を染色する抗 p 4 0 抗体 B C 2 8 の例の図 2 4 のカラーバージョンを示し、前立腺の基底細胞の強力な核染色を伴う。

【 0 0 9 8 】

【 図 7 5 】 図 7 5 は、図 7 2 の同じ前立腺試料を染色する抗 p 6 3 抗体 4 A 4 の例の図 2 5 のカラーバージョンを示し、前立腺の基底細胞の強力な核染色を伴う。

【 0 0 9 9 】

【 図 7 6 】 図 7 6 は、肺扁平上皮癌腫の試料を染色する D S G - 3 + C K 5 + p 4 0 [B C 2 8] + ナプシン A の例の図 2 6 のカラーバージョンを示す。D S G - 3 の染色 (茶色) は膜性であり、C K 5 の染色 (茶色) は細胞質性であり、p 4 0 の染色 (茶色) は核性である。ナプシン A の染色は減少し得、またはおそらく、この試料中に残存している正常肺に制限され得る。

10

20

30

40

50

【 0 1 0 0 】

【図 7 7】図 7 7 は、肺腺癌の試料を染色する D S G - 3 + C K 5 + p 4 0 [B C 2 8] + ナブシン A の例の図 2 7 のカラーバージョンを示す。ナブシン A (赤色) の染色は細胞質性である。D S G - 3、C K 5、および p 4 0 の染色 (茶色) は減少し、またはおそらく、このサンプル中には存在していない可能性がある。

【 0 1 0 1 】

【図 7 8】図 7 8 は、肺扁平上皮癌腫の試料を染色する D S G - 3 + C K 5 + p 4 0 [B C 2 8] の例の図 2 8 のカラーバージョンを示す。D S G - 3 の染色 (茶色) は膜性であり、C K 5 の染色 (茶色) は細胞質性であり、p 4 0 (茶色) の染色は核性である。

【 0 1 0 2 】

【図 7 9】図 7 9 は、肺腺癌の試料を染色する D S G - 3 + C K 5 + p 4 0 [B C 2 8] の例の図 2 9 のカラーバージョンを示す。D S G - 3、C K 5、および p 4 0 の染色 (茶色) は減少し、またはおそらく、このサンプル中には存在していない可能性がある。

【 0 1 0 3 】

【図 8 0】図 8 0 は、肺腺癌の試料を染色する抗体カクテル D S G - 3 + p 4 0 [B C 2 8] + ナブシン A の例の図 3 0 のカラーバージョンを示す。ナブシン A の染色 (赤色) は細胞質性である。D S G - 3 の染色 (茶色、膜性) および p 4 0 の染色 (茶色、核性) は減少し、またはおそらく、このサンプル中には存在していない可能性がある。

【 0 1 0 4 】

【図 8 1】図 8 1 は、肺腺癌の試料を染色する抗体カクテル D S G - 3 + p 4 0 [B C 2 8] + ナブシン A の例の図 3 1 のカラーバージョンを示す。ナブシン A の染色 (赤色) は細胞質性である。D S G - 3 の染色 (茶色、膜性) および p 4 0 の染色 (茶色、核性) は減少し得、またはおそらく、このサンプル中では正常肺組織に制限され得る。

【 0 1 0 5 】

【図 8 2】図 8 2 は、肺扁平上皮癌腫の試料を染色する抗体カクテル D S G - 3 + p 4 0 [B C 2 8] + ナブシン A の例の図 3 2 のカラーバージョンを示す。D S G - 3 の染色 (茶色) は膜性である。p 4 0 の染色 (茶色、核性) およびナブシン A の染色 (赤色、細胞質性) は減少し得、またはおそらく、このサンプル中には存在していない可能性がある。

【 0 1 0 6 】

【図 8 3】図 8 3 は、肺扁平上皮癌腫の試料を染色する抗体カクテル D S G - 3 + p 4 0 [B C 2 8] + ナブシン A の例の図 3 3 のカラーバージョンを示す。D S G - 3 の染色 (茶色) は膜性であり、p 4 0 の染色 (茶色) は核性である。ナブシン A (赤色、細胞質性) は減少し得、またはおそらく、このサンプル中では正常肺組織に制限され得る。

【 0 1 0 7 】

【図 8 4】図 8 4 は、肺扁平上皮癌腫の試料を染色する抗体カクテル D S G - 3 + p 4 0 [B C 2 8] + ナブシン A の例の図 3 4 のカラーバージョンを示す。p 4 0 の染色 (茶色) は核性である。D S G - 3 の染色 (茶色、膜性) および / またはナブシン A の染色 (赤色、細胞質性) は減少し得、またはおそらく、このサンプル中には存在していない可能性がある。

【 0 1 0 8 】

【図 8 5】図 8 5 は、肺扁平上皮癌腫の試料を染色する抗体カクテル D S G - 3 + p 4 0 [B C 2 8] の例の図 3 5 のカラーバージョンを示す。D S G - 3 の染色 (茶色) は膜性であり、p 4 0 の染色 (茶色) は核性である。

【 0 1 0 9 】

【図 8 6】図 8 6 は、肺扁平上皮癌腫の試料を染色する抗体カクテル p 4 0 [B C 2 8] + C K 5 (R M) の例の図 3 6 のカラーバージョンを示す。p 4 0 の染色 (茶色) は核性であり、C K 5 の染色 (赤色) は細胞質性である。

【 0 1 1 0 】

【図 8 7】図 8 7 は、肺腺癌の試料を染色する抗体カクテル p 4 0 [B C 2 8] + C K 5 (R M) の例の図 3 7 のカラーバージョンを示す。p 4 0 の染色 (茶色、核性) および C

10

20

30

40

50

K 5 の染色（赤色、細胞質性）は減少し得、またはおそらく、このサンプル中には存在していない可能性がある。

【 0 1 1 1 】

【 図 8 8 】 図 8 8 は、肺扁平上皮癌腫の試料を染色する抗体カクテル p 4 0 [B C 2 8] + ナプシン A の例の図 3 8 のカラーバージョンを示す。p 4 0 の染色（茶色）は核性である。ナプシン A（赤色、細胞質性）は減少し得、またはおそらく、このサンプル中では正常肺組織に制限され得る。

【 0 1 1 2 】

【 図 8 9 】 図 8 9 は、肺腺癌の試料を染色する抗体カクテル p 4 0 [B C 2 8] + ナプシン A の例の図 3 9 のカラーバージョンを示す。ナプシン A の染色（赤色）は細胞質性である。p 4 0 の染色（茶色、核性）は減少し得、またはおそらく、このサンプル中には存在していない可能性がある。

10

【 0 1 1 3 】

【 図 9 0 】 図 9 0 は、おそらく正常前立腺、おそらく前立腺癌、およびおそらくさらに前立腺上皮内新生物形成（P I N）の領域を含有し得る前立腺の試料を染色する抗体カクテル p 4 0 [B C 2 8] + H M W C K + P 5 0 4 S の例の図 4 0 のカラーバージョンを示す。p 4 0 の染色（茶色）は核性である。H M W C K の染色（茶色）は細胞質性である。P 5 0 4 S の染色（赤色）は細胞質性であり、おそらく顆粒状である。

【 0 1 1 4 】

【 図 9 1 】 図 9 1 は、おそらく正常前立腺、おそらく前立腺癌、およびおそらくさらに前立腺上皮内新生物形成（P I N）の領域を含有し得る前立腺の試料を染色する抗体カクテル p 4 0 [B C 2 8] + C K 5 / 1 4 + P 5 0 4 S の例の図 4 1 のカラーバージョンを示す。p 4 0 の染色（茶色）は核性である。C K 5 / 1 4 の染色（茶色）は細胞質性である。P 5 0 4 S の染色（赤色）は細胞質性であり、おそらく顆粒状である。

20

【 0 1 1 5 】

【 図 9 2 】 図 9 2 は、乳房組織、おそらく異常組織、またはおそらくさらに乳癌の試料を染色する抗体カクテル p 4 0 [B C 2 8] + C K 5 / 1 4 + C K 7 / 1 8 の例の図 4 2 のカラーバージョンを示す。p 4 0 の染色（茶色）は核性である。C K 5 / 1 4 の染色（茶色）は細胞質性である。C K 7 / 1 8 の染色（赤色）は細胞質性である。

【 0 1 1 6 】

【 図 9 3 】 図 9 3 は、乳房組織、おそらく異常組織、またはおそらくさらに乳癌の試料を染色する抗体カクテル p 4 0 [B C 2 8] + C K 5 / 1 4 + C K 7 / 1 8 の例の図 4 3 のカラーバージョンを示す。p 4 0 の染色（茶色）は核性であり、おそらく、減少しているかまたはこのサンプル中には存在していない。C K 5 / 1 4 の染色（茶色）および C K 7 / 1 8 の染色（赤色）は細胞質性および膜性である。観察された染色パターンは、おそらく、2 モード染色である。

30

【 0 1 1 7 】

【 図 9 4 】 図 9 4 は、乳房組織、おそらく異常組織、またはおそらくさらに乳癌の試料を染色する抗体カクテル p 4 0 [B C 2 8] + C K 5 / 1 4 + C K 8 / 1 8 の例の図 4 4 のカラーバージョンを示す。p 4 0 の染色（茶色）は核性であり、おそらく、減少しているか、またはこのサンプル中には存在していない。C K 5 / 1 4 の染色（茶色）および C K 8 / 1 8 の染色（赤色）は細胞質性である。

40

【 0 1 1 8 】

【 図 9 5 】 図 9 5 は、尿路上皮癌腫の試料を染色する抗体カクテル p 4 0 [B C 2 8] + ウロプラキン I I + ウロプラキン I I I の例の図 4 5 のカラーバージョンを示す。p 4 0 の染色（茶色）は核性である。ウロプラキン I I の染色（茶色）およびウロプラキン I I I の染色（茶色）は細胞質性および膜性である。

【 0 1 1 9 】

【 図 9 6 】 図 9 6 は、尿路上皮癌腫の試料を染色する抗体カクテル p 4 0 [B C 2 8] + ウロプラキン I I + ウロプラキン I I I + G A T A - 3 の例の図 4 6 のカラーバージョン

50

を示す。p 4 0 の染色（茶色）および G A T A - 3 の染色（赤色）は核性である。ウロプラキニン I I の染色（茶色）およびウロプラキニン I I I （茶色）の染色は細胞質性および膜性である。

【 0 1 2 0 】

【 図 9 7 】 図 9 7 は、肺扁平上皮癌腫の試料を染色する抗体カクテル p 4 0 [B C 2 8] + C K 5 の例の図 4 7 のカラーバージョンを示す。p 4 0 の染色（茶色）は核性であり、C K 5 の染色（茶色）は細胞質性である。

【 0 1 2 1 】

【 図 9 8 】 図 9 8 は、ウェスタンブロットによる、抗 p 4 0 抗体 B C 2 8 の p 4 0 タンパク質（左のパネル、レーン 2）および T A p 6 3 タンパク質（左のパネル、レーン 3）との反応性の図 4 8 のカラーバージョンを示す。右のパネルは、ウェスタンブロットによる、抗 p 6 3 抗体 4 A 4 の p 4 0 タンパク質（右のパネル、レーン 2）および T A p 6 3 タンパク質（右のパネル、レーン 3）との反応性を示す。レーン 1 は両方のパネルにおいて対照溶解物である。

10

【 発明を実施するための形態 】

【 0 1 2 2 】

先の議論から理解され得るように、本発明は、異なる方法で組み合わせられてもよい種々の態様を含む。以下の説明は、本発明の構成要素を列挙し、実施形態のいくつかを記載するために提供される。これらの構成要素は、最初の実施形態とともに列挙されるが、しかし、これらは、さらなる実施形態を作製するために、任意の様式で、および任意の数で組み合わせられてもよいことが理解されるべきである。様々に記載される実施例および好ましい実施形態は、明白に記載されるシステム、技術、および適用のみに本発明を限定することが意図されるべきではない。さらに、この説明は、この適用または任意の引き続く適用において、任意の数の開示される構成要素を用いて、各構成要素を単独で用いて、そしてまた、すべての構成要素の任意のおよびすべての様々な順列と組み合わせを用いて、すべての様々な実施形態、システム、技術、方法、デバイス、および適用の説明および特許請求の範囲をサポートおよび包含することが理解されるべきである。

20

【 0 1 2 3 】

本発明の実施形態は、p 4 0 に特異的に結合するモノクローナル抗体およびその方法を提供することができ、様々な型の癌のための診断における p 4 0 の検出のために使用することができる。モノクローナル抗体は、抗体フラグメント、マウスモノクローナル抗体、ウサギモノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化モノクローナル抗体、ヒトモノクローナル抗体、検出可能なシグナルまたは染色で標識された抗体、毒素で標識された抗体などであってもよい。本発明のシステムおよび方法は、p 4 0 に結合することが可能なモノクローナル抗体またはその抗原結合部分に関し得る。

30

【 0 1 2 4 】

マウスモノクローナル抗体は、免疫組織化学手順における一次抗体としてのものを含む、特定の分析物を同定するための免疫アッセイ方法において共通して使用されてもよい。関心対象のタンパク質標的に特異的なマウスモノクローナル抗体は、一般的に公知の手順を使用して産生できる。一般的に、マウスを関心対象の抗原（例えば、所望の標的のペプチドフラグメントまたは全長タンパク質標的）にさらすことは、免疫応答を誘導し得、ここでは、マウスが抗原を結合する複数の抗体を生成し得、これらの各々は特定の B 細胞によって産生され得る。これらの B 細胞はマウス脾臓から単離されてもよく、産生される抗体は、I H C における一次抗体としてのそれらの適合性について評価されてもよい。最適な抗体を選択した後、関連する B 細胞は公知の手順を使用して腫瘍細胞と融合されてもよく、おそらく、無限に複製できかつ連続して所望の抗体を産生し得る新たな細胞系統であるハイブリドーマを生じる。

40

【 0 1 2 5 】

モノクローナル抗体は、特定の実施形態において、いくつかの理由によってポリクローナル抗体よりも好ましい可能性がある。特に、モノクローナル抗体は、単一の B 細胞に由

50

来していてもよく、このようなものとして、単一のエピトープを認識してもよく、おそらく、より高い特異性を生じる。モノクローナル抗体はまた、細胞培養において便利にかつ再現性よく生成されてもよく、おそらく、所望の抗体の定常的な供給を生じる。当然、ポリクローナル抗体は他の実施形態において利用されてもよい。

【0126】

マウスモノクローナル抗p40抗体BC28などの抗p40抗体は、これらの一般的な手順を使用して産生されてもよく、様々な正常組織および新生物組織に対して感度および特異性について免疫組織化学によって、おそらく、特に、以前に知られているRP抗p40抗体および抗p63抗体[4A4]と比較して、評価されてもよい。

【0127】

ペプチド調製の例：配列MLYLENNAQTQFSE PQYに対応するアミノ酸配列1~17aaのp40ペプチドが半自動ペプチドシンセサイザー上で合成されてもよい。同様に、配列ENNAQTQFSE PQYに対応するアミノ酸配列5~17aaのp40ペプチドが半自動ペプチドシンセサイザー上で合成されてもよい。ペプチドはキャリア分子に共有結合的に結合体化されてもよい。1つの実施形態において、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)キャリア分子が使用されてもよい。ペプチドはまた、免疫アッセイのためにヤギガンマグロブリン(GGG)に結合体化されてもよい。

【0128】

宿主免疫の例：雌性BALB/c(約6~約8週齢)マウスは、完全フロイントアジュバント中のマウスあたり約100μgのヒトp40ペプチドを用いて腹腔内(i.p.)免役されてもよい。免疫のために使用されるp40ペプチドは、p40からの1-17のアミノ酸配列、p40からの1-9のアミノ酸配列、p40からの1-17および5-17のアミノ酸配列の混合物、またはこの配列の任意の部分、ならびにこれらのすべての順列および組み合わせに対応してもよい。単一のペプチドが免疫原として使用されてもよく、またはおそらく、アミノ酸配列1-17、1-9、1-17と5-17との混合に由来するペプチドの混合物である。特定の実施形態において、4位のアミノ酸を含み、またはおそらく、1、2もしくは3位のアミノ酸を含む免疫原が使用されてもよく、BC28で観察されるもののような有利な特性を有する抗体を産生することができる。約3週間後、マウスは、約3週間の間隔で、約4回、マウスあたり不完全フロイントアジュバント中の別の約100μgヒトp40で追加免役されてもよい。マウスは尾部から採血されてもよく、血清が収集され、後の酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)による抗体力価の分析のために、約-20℃で保存されてもよい。p40タンパク質のアミノ酸配列5-17に基づく抗体は成功せず、良好な融合を可能にしなかったのかもしれない。従って、そこから抗体を開発するために、p40タンパク質のアミノ酸配列5-17を利用することは好ましくない可能性がある。

【0129】

ハイブリドーマの例：p40に対する抗体を産生するハイブリドーマは、p40で免疫されたBALB/cマウスの脾細胞から標準的な技術によって生成されてもよい。例えば、約50%ポリエチレングリコールとのインキュベーションによって、約4:1の比率で、p40で免疫されたマウスからの脾細胞はP3-X63-Ag 8.653ミエローマ細胞(Balb/cマウスに由来する非分泌性ミエローマ細胞)に融合されてもよい。インキュベーション後、細胞は、おそらく、約300×g、約10分間の遠心分離によってペレット化され、約25mlのPBS中で洗浄され、再遠心分離されてもよく、そして細胞ペレットは、約20%ウシ胎仔血清(Hyclone, Logan, UT)を含有する100mlの新鮮なダルベッコ培地に再懸濁されてもよい。約100μlのアリコートをして、約10個の96ウェルマイクロタイタープレート(Corning, Lowell, MA)の各ウェルに加えることができる。約24時間後、ヒポキサンチン-アミノプテリン-チミジン(HAT)を補充した約100μl DMEM培養培地を各マイクロタイターウェルに加えることができる。培地は、おそらく、約4時間後に、完全培地(おそらく、ヒポキサンチン-チミジン(HT)を含有する)で置き換えられてもよい。引き続き約1

10

20

30

40

50

0 日間にわたって、培地は取り除かれ、そして、加える HT が減らされるか、またはおそらく、HT が加えられてさえいない新鮮な培地で置き換えられてもよい。ハイブリドーマ上清は、p 40 に対する抗体反応性について ELISA によってスクリーニングされてもよく、次に、ハイブリドーマクローンは、おそらく、限界希釈によって、2 回クローニングすることにより、選択および安定化されてもよい。

【0130】

抗ヒト p 40 ハイブリドーマクローン BC 28 Lot : 011713 と称するハイブリドーマ細胞は、参照により本明細書に組み入れられる「ブダペスト条約によって制限される寄託の証明書 (Budapest Restricted Certificate of Deposit)」というタイトルの添付の提出物に示されるように、Manassas, Virginia のアメリカンタイプカルチャーコレクション (ATCC) に 2013 年 1 月 29 日に寄託されており、ATCC 特許寄託番号 PTA - 120163 を受けた。本発明の実施形態は、ATCC に寄託されたハイブリドーマによって産生される抗体またはそのフラグメントを提供してもよく、そして p 40 を特異的に認識することが可能であるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞を培養すること、およびさらにハイブリドーマにモノクローナル抗体を産生させることによる、モノクローナル抗体を産生するための方法を含んでもよい。

10

【0131】

ELISA : 宿主の p 40 に対する抗血清免疫応答は ELISA によって測定されてもよい。例えば、リン酸緩衝化生理食塩水 (PBS) 中の p 40 (約 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$) の溶液が、約 96 ウェル平底ポリスチレンプレートにコートするために使用されてもよい。次いで、これらのプレートは、約 1% ウシ血清アルブミン (BSA) - PBS でブロックされてもよい。希釈された免疫血清またはハイブリドーマ上清のいずれかが加えられ、約 37 で 1 時間インキュベートされてもよい。これらのプレートが PBS で洗浄された後、これらのプレートは、ヤギ抗マウス - HRP 試薬 (Jackson Labs) とともにインキュベートされてもよい。インキュベーションは、約 37 で約 30 分間行われてもよい。ABTS 基質が発色のために加えられてもよく、約 405 nm (A 405) における吸収がマイクロタイタープレートリーダーにおいて測定されてもよい。

20

【0132】

モノクローナル抗体のアイソタイプ : BC 28 モノクローナル抗体などの抗 p 40 抗体は、マウスモノクローナル抗体アイソタイプ決定キット (Invitrogen, Carlsbad CA) を使用してアイソタイプ決定されてもよい。例えば、マウスモノクローナル抗体 [BC 28] 細胞からの約 $100 \mu\text{l}$ の上清は、プレートにコートされたヤギ抗マウス IgG1、IgG2A、IgG2B、IgG3、IgM、および IgA 重鎖、カップおよびラムダ軽鎖に加えられてもよい。約 30 分間のインキュベーション後、プレートは PBS で 3 回洗浄されてもよく、ヤギ抗マウス Ig - HRP 試薬とともにインキュベートされてもよい。ABTS 基質が発色のために加えられてもよく、約 405 nm (A 405) における吸収がマイクロタイタープレートリーダーにおいて測定されてもよい。BC 28 クローンは、アイソタイプについて試験されてもよく、マウス IgG1 / カップとして同定されてもよい。

30

40

【0133】

抗体産生および精製 : クローン BC 28 から選択されたハイブリドーマ細胞は、約 10% FBS を補充した DMEM 培養培地または任意の無血清培地とともに培養されてもよい。培養上清は、プロテイン A アフィニティーカラムによってさらに精製されてもよい。ハイブリドーマ細胞はまた、プリスタンでプライムした BALB / c マウスに注射されて、抗体腹水を産生してもよい。抗体腹水は、プロテイン A アフィニティーカラムによってさらに精製されてもよい。IgG 濃度は、約 280 nm における約 1.4 のヒト IgG の吸光係数を使用して、分光光度的に測定されてもよい。IgG の純度は SDS - PAGE によって決定されてもよい。

【0134】

50

ウェスタンブロッティングによって測定される交差反応性：精製されたモノクローナル抗体 [B C 2 8] はウェスタンブロッティングによって特徴付けされてもよい (図 4 8 および 9 8) 。 全長 p 4 0 または T A p 6 3 トランスフェクト細胞溶解物 (O r i g e n e , R o c k v i l l e , M D) は、 T r i s - グリシン緩衝液を用いる約 4 ~ 約 1 2 % S D S - P A G E を使用するタンパク質ゲル電気泳動に供されてもよく、 T r i s - グリシン緩衝液中のニトロセルロースフィルターに転写されてもよい。プロット上のタンパク質は、ブロッキング緩衝液を用いるブロッキング後、室温で約 6 0 分間、 p 6 3 モノクローナル抗体 4 A 4 または B C 2 8 抗体をインキュベートすること、おそらく、続いて、ペルオキシダーゼ結合体化ヤギ抗マウス免疫グロブリンとのインキュベーションによって可視化されてもよい。プロットは、 T M B 色素原を使用して検出されてもよい。

10

【 0 1 3 5 】

V H 配列および V L 配列の決定：総 R N A は、 Q i a g e n キット (U S A , G a i t h e r s b u r g , M D) を製造業者の指示書の通りに使用して、ハイブリドーマから抽出されてもよい。1回目のラウンドの R T - P C R は、 Q I A G E N (登録商標) O n e S t e p R T - P C R K i t を用いて実行されてもよい。R T - P C R は、重鎖および軽鎖に特異的なプライマーを用いて行われてもよい。各 R N A サンプルについて、約 1 2 の個別の重鎖および約 1 1 の軽鎖 R T - P C R 反応が、可変領域のリーダー配列をカバーする縮重フォワードプライマー混合物を使用してセットアップできる。リバースプライマーは、重鎖および軽鎖の定常領域に位置していてもよい。制限部位はプライマーの中に操作されない可能性がある。1回目のラウンド反応からの R T - P C R 産物は、2回目のラウンドの P C R において増幅され得る。約 1 2 の個別の重鎖および約 1 1 の軽鎖の R T - P C R 反応が、抗体可変領域に特異的な半ネスト化プライマーセットを使用してセットアップできる。増幅された c D N A はゲル精製でき、次いで、配列決定されてもよい。

20

【 0 1 3 6 】

B C 2 8 可変ドメインは、配列番号 3 として同定される p 4 0 エピトープ M L Y L E N N A Q T Q F S E P Q Y または配列番号 4 として同定される p 4 0 エピトープ M L Y L E N N A Q に結合する本明細書に記載されるモノクローナル抗体の軽鎖および/または重鎖可変領域の C D R の 1 つ以上のアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む単離されたポリヌクレオチドを提供するために配列決定された。重鎖の可変領域の配列は配列番号 1 として同定され、軽鎖の可変領域の配列は配列番号 2 として同定された。抗体またはそのフラグメントは、配列番号 1 および/または配列番号 2 の核酸配列によってコードされるアミノ酸配列のポリペプチドを含んでもよい。抗体またはそのフラグメントは、配列番号 2 の核酸配列によってコードされるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含んでもよく、そしてさらに配列番号 1 の核酸配列によってコードされるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含んでもよい。抗体またはそのフラグメントは、配列番号 3 および/または配列番号 4 のアミノ酸配列の少なくとも 1 つのポリペプチドに特異的に結合してもよい。本明細書において言及されるように、そのフラグメントとは、その抗原結合フラグメントを含んでもよい。

30

【 0 1 3 7 】

実施形態において、抗体またはそのフラグメント、またはさらに単離および精製された核酸配列は、配列番号 1 および/もしくは配列番号 2 の核酸配列によってコードされるアミノ酸配列ならびに/または配列番号 3 および/もしくは配列番号 4 のアミノ酸配列に対して少なくとも約 7 0 % 同一であるアミノ酸配列を有し得る。抗体またはそのフラグメントは、配列番号 3 および/または配列番号 4 の残基に対して少なくとも約 7 0 % 同一であるアミノ酸配列を有する少なくとも 1 つのポリペプチドに特異的に結合し得る。他のパーセンテージは、少なくとも約 7 1 % 、 少なくとも約 7 2 % 、 少なくとも約 7 3 % 、 少なくとも約 7 4 % 、 少なくとも約 7 5 % 、 少なくとも約 7 6 % 、 少なくとも約 7 7 % 、 少なくとも約 7 8 % 、 少なくとも約 7 9 % 、 少なくとも約 8 0 % 、 少なくとも約 8 1 % 、 少なくとも約 8 2 % 、 少なくとも約 8 3 % 、 少なくとも約 8 4 % 、 少なくとも約 8 5 % 、 少なくとも約 8 6 % 、 少なくとも約 8 7 % 、 少なくとも約 8 8 % 、 少なくとも約 8 9 % 、 少なく

40

50

とも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、およびおそらく少なくとも約99%などを含み得るが、これらに限定されない。

【0138】

マウス抗p40 [BC28] 結合配列のエピトープマッピング：BC28などの抗p40抗体によって認識されるp40のペプチド配列のペプチド配列を決定するために、エピトープマッピングが、おそらく2つのアッセイ、直接ELISAおよびさらにドットプロットを使用して実施されてもよい。ELISAアッセイにおいて、抗p40 [BC28] 抗体の感度および特異性は、約1：500および約1：1000の抗体力価を測定することによって決定されてもよい。おそらく1～17アミノ酸からのヒトp40タンパク質配列をカバーする各約15アミノ酸長の重複ペプチドが、BC28結合の配列を決定するために使用されてもよい。

10

【0139】

BC28のエピトープの1つは、配列番号3として同定されるMLYLENNAQTQFSEPTYであるp40の1-17アミノ酸残基を含んでもよい。別のエピトープは、配列番号4として同定されるMLYLENNAQであるp40の1-9アミノ酸残基を含んでもよい。さらに別のエピトープは、配列番号4と、配列番号5として同定されるENNAQTQFSEPTYであるp40の5-17アミノ酸残基の混合物を含んでもよい。抗体は、配列番号3、配列番号4、またはおそらくさらに配列番号3の配列番号5との混合物のペプチド配列を免疫原として使用して生成されてもよい。マウスモノクローナルp40 [BC28] 抗体、またはその一部のエピトープは、マウス以外の種（例えば、ウサギ、ヤギ、ウマ、ニワトリなど）における産生を含む、新たなモノクローナル抗体の産生のために有用な抗原であり得る。当然、ポリクローナル抗体は、配列番号3、配列番号4、またはおそらくさらに配列番号4と配列番号5の混合物、またはその任意の組み合わせもしくは順列におけるエピトープに特異的に結合し得る。

20

【0140】

直接ELISAプロトコールのために、プレートは、コーティング緩衝液（pH約9.5）中約5μg/mLのp40ペプチド約100μlで、約4で一晚、最初にコートされてもよく、続いて室温で約1時間、約200μl/ウェルでブロッキング（約3%BSA）を行ってもよい。プレートは、ELISAプレートシェーカー上で、約室温で約1時間、約100ng/mLおよび約200ng/mLのp40抗体とともに別々にインキュベートされてもよい。次いで、プレートは、PBST（約300μl/ウェル）でおそらく5回洗浄されてもよく、続いて、プレートにヤギ抗マウスIgG-HRPを加え、プレートシェーカー上で約1時間インキュベーションを行ってもよい。次いで、プレートは、PBST（約300μl/ウェル）で洗浄され、プロットされて乾燥させてもよく、TMBが約100μl/ウェルで加えられ、シェーカー上で約5分間発色されてもよく、その後、停止用液（約50μl/ウェル）が続いてもよい。吸収は、製造業者の推奨に従って、ELISAプレートリーダー上で約450nmにて測定されてもよい。

30

【0141】

ドットプロットアッセイのために、ニトロセルロースメンブレンに、約1mg/mLの濃度のペプチドを、ペプチドあたり4連で、約1μlプロットしてもよい。このメンブレンは、これが完全に乾燥し得るまで、室温で約1時間インキュベートされてもよい。このメンブレンは、TBST（例えば、約50mM Tris, 約0.5M NaCl, 約0.05% Tween-20, pH約7.4）中約3%BSAで、室温で約1時間ブロックされてもよく、次いで、マウス抗p40抗体 [BC28] が、TBST中で、RTで約1時間、約200ng/mLで加えられてもよい。次いで、このメンブレンは、オービタルシェーカー上で、TBST中で約3回（各約10分間）洗浄されてもよく、続いて、TBST中で二次抗体ヤギ抗マウスIgG1-APと、室温で約1時間インキュベートされてもよい。このメンブレンは、振盪機上で、TBST中で、おそらく、約3回（各約10

40

50

分間)洗淨されてもよい。結合は、Western Glo Chemiluminescent 検出試薬を加えること、およびフィルムに露出することによって検出されてもよい。

【0142】

抗p40 BC28を用いるIHC方法：マウスモノクローナル抗p40抗体BC28などの抗p40抗体を使用する免疫組織化学は、以下の非限定的な実施例によって一般的に例示されるような、当業者に一般的に公知である手順を使用して、ホルマリン固定されたパラフィン包埋(FFPE)組織サンプル上で実施されてもよい(例えば、工程の間にTris緩衝化生理食塩水、pH約7.6で洗淨する)：

【0143】

1)ホルマリン固定されたパラフィン包埋組織の切片(~5µm)が、おそらく、ポリリジンでコートされた市販の顕微鏡スライド上に装着されてもよい。

【0144】

2)切片は脱パラフィンされてもよく(キシレンまたはキシレン代用品を使用)、おそらく、一連のアルコール/水溶液を通して再水和されてもよく、続いて、おそらく、約3%過酸化水素溶液を用いて、内因性ペルオキシダーゼをブロックしてもよい。

【0145】

3)サンプルは、圧力鍋(Diva, Decloaking Chamber; Biocare Medical)中で、クエン酸緩衝液を使用して、加熱誘導性抗原回復に供せられてもよく、約125で約30秒間加熱されてもよい[当業者に公知である他の抗原回復方法(例えば、スチーム、電子レンジ、酵素など)もまた利用可能であり得る]。組織は、約10分間冷却されてもよく、次いで、脱イオン水ですすがれてもよい。

【0146】

4)p40抗体BC28は、キャリアタンパク質としてウシ血清アルブミンを有するリン酸緩衝液(pH約6.0)中で、約30分間適用されてもよい。p40抗体BC28は、おそらく、1:500に希釈されてもよい。

【0147】

5)おそらく、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)と結合体化された二次抗体(MACH 4 Universal HRP-Polymer Detection, Biocare Medical)を用いるp40抗体の検出は、2段階で達成されてもよい。ウサギ抗マウスIgG抗体の最初の約10分間の適用に続いて、ヤギ抗ウサギ-HRP結合体との約10分間のインキュベーションが行われてもよい。

【0148】

6)おそらく、最後の検出工程において、おそらく、約0.02%過酸化水素を含有する緩衝液中の3,3'-ジアミノベンジジン(DAB)(Betazoid DAB, Biocare Medical)が適用されてもよい。HRP媒介メカニズムを通してのDABの酸化は、茶色の発色生成物の沈殿を生じ得、おそらく、p40発現の部位の同定を可能にする。

【0149】

7)スライドは、おそらく、改変マイヤーヘマトキシリン中で手短に対比染色されてもよい。

【0150】

マウスモノクローナル抗p40抗体BC28を用いるIHC染色の結果：上記のプロトコールを使用して、様々な正常組織および新生物組織が、BC28を使用してp40発現について評価され、ある場合においては、RP抗p40抗体およびマウスモノクローナル抗p63抗体[4A4]を使用して、染色パターンを比較されてもよい。すべての抗体は、当業者に周知である方法を使用して、力価(例えば、濃度)について最適化された。例えば、おそらく、バックグラウンド染色を最小化しながら、またはバックグラウンド染色を除去さえしながら、様々な抗体力価が染色強度を最大化するために評価された。各抗体について、おそらく最小のバックグラウンド染色を伴って、最大染色強度を提供した力価

10

20

30

40

50

が使用された。

【 0 1 5 1 】

図 1 および図 5 1 は、抗 p 4 0 抗体 [B C 2 8] による肺扁平上皮癌腫の F F P E 試料の染色を示す。予測されたように、p 4 0 の核染色が観察され、明白なバックグラウンド染色はなかった。B C 2 8 で染色された肺扁平上皮細胞癌腫の異なる症例は、図 2 および 5 2 に示される。B C 2 8 を用いる p 4 0 の染色は、顕著に強い可能性があり、おそらく、明白なバックグラウンドまたは非特異的な染色を伴ってさえいない。対照的に、R P 抗 4 0 抗体を用いる同じ症例の染色は、間質組織において、より強度が低い染色および顕著に明るいバックグラウンド染色を生じ得る (図 3 および図 5 3) 。

【 0 1 5 2 】

図 4 および図 5 4 において、B C 2 8 は肺腺癌の症例に適用され、おそらく、目に見える染色がなかった。p 4 0 は肺腺癌において有意に発現されていないことが予測されていない可能性があるため、これは有用な結果であり得る。従って、陰性染色が好ましい可能性がある。R P 抗 p 4 0 抗体でこの症例の肺腺癌を染色することは、中程度の強度の陽性細胞質染色を生じ得、これは、解釈することをより難しくする潜在的にあいまいな結果である (図 5 および図 5 5) 。

【 0 1 5 3 】

図 6、図 7、図 5 6、および図 5 7 は、膀胱癌 (膀胱の移行細胞癌腫、または尿路上皮癌腫) の症例の B C 2 8 および R P 抗 p 4 0 による染色の例を示す。図 6 および図 5 6 において、p 4 0 の強力な核染色が観察され得、おそらく、最小限のバックグラウンド染色またはさらにバックグラウンド染色がないことを伴う。図 7 および 5 7 において、細胞質バックグラウンド染色を伴い、p 6 3 のより明るい核染色が観察される。図 8 および図 5 8 は、尿路上皮癌腫における B C 2 8 を用いる強力な染色の例を示す。

【 0 1 5 4 】

p 4 0 の発現は、前立腺の基底細胞において予測され得、おそらく、B C 2 8 を用いて、正常前立腺において観察される染色と一致している (図 9 および図 5 9) 。前立腺上皮内新生物形成 (P I N) などの前悪性病変から侵襲性前立腺癌までの進行は、基底細胞における p 4 0 の発現の喪失を生じ得る。結果として、B C 2 8 を用いる染色の欠如は、図 1 0 および図 6 0 に示されるように、前立腺癌における p 4 0 の非存在についての有用なマーカーであり得る。前立腺のいくつかの症例において、B C 2 8 は、4 A 4 などの代替の抗体よりも、より強力であり鋭敏な染色を提供し得、そしておそらく、より多くの数の基底細胞を染色し得る (それぞれ、図 2 2 および図 7 2、ならびに図 2 3 および図 7 3) 。図 2 4、図 7 4、図 2 5、および図 7 5 は、前立腺組織の例が、低倍率で、B C 2 8 および 4 A 4 をそれぞれ染色したことを示す。この場合において、B C 2 8 および 4 A 4 は、類似の全体的な染色パターンを実証し、おそらく、B C 2 8 によるより強烈でかつ鋭敏な染色を伴う。

【 0 1 5 5 】

前立腺と同様に、p 4 0 の発現は、初期の病変の段階的な喪失を伴って、正常乳管の筋上皮細胞において観察され得、そして侵襲的な乳癌において最終的に非存在となり得る。正常乳管の基底層の筋上皮細胞における p 4 0 の染色は、B C 2 8 を用いて観察され得るかまたは観察される (図 1 1 および図 6 1) 。インサイチュ乳管癌腫の場合において、基底層の完全性は損なわれている可能性があり、B C 2 8 を用いる p 4 0 の染色は、不連続的になり得る (図 1 2 および図 6 2) 。いくつかの場合において、4 A 4 などの代替的な抗体は、B C 2 8 では非存在である乳房組織における異常な細胞質染色を産生し得る (図 2 0、図 7 0、図 2 1、および図 7 1) 。この 4 A 4 を用いる細胞質染色は広範囲であり得る。B C 2 8 を用いての細胞質染色の非存在は利点であり得る。

【 0 1 5 6 】

皮膚の基底細胞癌腫において、B C 2 8 を用いる染色は、p 4 0 発現によって腫瘍細胞を同定するための有用なマーカーであり得る (図 1 3 および図 6 3) 。同様に、B C 2 8 を用いる染色は、扁平上皮癌腫、おそらく、喉頭またはさらに喉頭蓋の扁平上皮癌腫にお

10

20

30

40

50

ける p 4 0 発現を同定するために有用であり得る（それぞれ、図 1 4 および図 6 4、ならびに図 1 5 および図 6 5）。

【 0 1 5 7 】

B C 2 8 以外の抗 p 4 0 抗体の 1 つの不利な点は、肺組織における肺胞内マクロファージの染色であり得る。マクロファージの陽性染色は、誤った染色に起因して、偽陽性または不正確な診断をもたらし得る。例えば、肺胞内マクロファージの中程度染色は、R P 抗 p 4 0 抗体を用いて観察され得る（図 1 6 および図 6 6）。対照的に、B C 2 8 は、同じ様式で肺胞内（i n t r a a l v e l o a r）マクロファージを染色しない可能性があり、おそらく、明白な利点である（図 1 7 および図 6 7）。B C 2 8 による肺胞内（i n t r a a l v e l o a r）マクロファージの染色の欠如は診断の解釈を単純化し得、そして、おそらくマクロファージの不正確な染色に起因する偽陽性または不正確な診断の潜在的なエラーを除去さえし得る。

10

【 0 1 5 8 】

B C 2 8 は、代替りの抗体と同様の、または代替りの抗体よりも優れてさえいる染色を提供し得る。例えば、B C 2 8 を用いて前立腺を染色することは、おそらく、抗 p 6 3 抗体 4 A 4 よりも、より強力であり、さらに多分、基底層中でより多くの細胞を染色し得る（図 2 2、図 7 2 および図 2 3 および図 7 3、ならびに図 2 4 および図 7 4 および図 2 5 および図 7 5）。

【 0 1 5 9 】

p 4 0 または p 6 3 などの核マーカーを染色するとき、細胞質染色は正確な診断のための複雑化因子であり得る。ある場合において、B C 2 8 は、より明確な核染色を提供する利点を有し得、おそらく、さらに細胞質染色を伴わない。例えば、B C 2 8 は、弱い染色から中程度の細胞質染色で同じ試料を染色し得る 4 A 4 と比較して（図 7 および図 5 7）、明確な核染色でかつ細胞質染色なしで膀胱癌の症例を染色し得る（図 6 および図 5 6）。同様に、B C 2 8 は、小腸の例においては陰性であり得る（図 1 8 および図 6 8）のに対して、4 A 4 は同じ症例において明瞭な細胞質染色を示し得る（図 1 9 および図 6 9）。1 つの例において、B C 2 8 はまた、乳房組織において細胞質染色を産生しない可能性があるのに対して（図 2 1 および図 7 1）、細胞質染色は 4 A 4 を用いて観察されている（図 2 0 および図 7 0）。これらのような症例における細胞質染色の非存在は、B C 2 8 の明瞭な利点であり得る。

20

30

【 0 1 6 0 】

表 1 は、F F P E 組織の組織マイクロアレイ（T M A）を使用して、肺扁平上皮癌腫の 6 7 の症例を染色する抗 p 4 0 抗体 [B C 2 8] の感度を示す。p 4 0 についての「陽性」の症例を決定するための判断基準としての腫瘍細胞染色の約 5 % のカットオフを利用し、そして、逆に、「陰性」の症例を決定するための判断基準として腫瘍細胞染色の < 約 5 % を利用して、6 7 のうちの 6 5（約 9 7 %）が p 4 0 [B C 2 8] について陽性であることが見出された。より重いグレードの腫瘍の診断は、時折、困難であり得る。これらの試料において、抗 p 4 0 抗体 [B C 2 8] は、グレード I I 腫瘍 3 5 のうち 3 5（約 1 0 0 %）、およびグレード I I I 腫瘍 2 8 のうち 2 6（約 9 2 . 9 %）を同定した。

【 0 1 6 1 】

表 2 は、組織マイクロアレイ（T M A）を使用して、肺腺癌癌腫の 7 1 の試料を染色する抗 p 4 0 抗体 [B C 2 8] の特異性の例を示す。p 4 0 についての「陽性」の症例を決定するための判断基準としての腫瘍細胞染色の約 5 % のカットオフを利用し、そして、逆に、「陰性」の症例を決定するための判断基準として腫瘍細胞染色の < 約 5 % を利用して、7 1 のうちの 0（約 0 %）が p 4 0 [B C 2 8] について陽性であることが見出された。

40

【表 1】

表 1：肺 SCC を染色する抗 p 4 0 抗体 [B C 2 8]

グレード	試料の数	陽性試料の数	陽性%	陰性試料の数	陰性%
グレード I、I I および I I I	67	65	97%	2	3%
グレード I	4	4	100%	0	0%
グレード I I	35	35	100%	0	0%
グレード I I I	28	26	92.9%	2	7.1%

10

【表 2】

表 2：肺 ADC を染色する抗 p 4 0 抗体 [B C 2 8]

グレード	試料の数	陽性試料の数	陽性%	陰性試料の数	陰性%
グレード I、I I および I I I	71	0	0%	71	100%
グレード I	5	0	0%	5	100%
グレード I I	44	0	0%	44	100%
グレード I I I	22	0	0%	22	100%

20

【表 3】

表 3：新生物組織を染色する抗 p 4 0 抗体 [B C 2 8]

病理	試料の数	陽性試料の数	陽性%	陰性試料の数	陰性%
頭頸扁平上皮癌 腫	59	46	78.0%	13	22%
尿路上皮癌腫	48	41	85.4%	7	14.6%
乳癌	65	18	27.6%	47	72.3%
前立腺癌	12	0	0%	12	100%

30

【 0 1 6 2 】

表 3 は、いくつかの他の新生物組織における抗 p 4 0 抗体 [B C 2 8] の感度の例を示す。B C 2 8 で染色された頭頸部扁平上皮癌腫の 5 9 の症例のうち、4 6 (約 7 8 %) が陽性であることが見出された。B C 2 8 はまた、膀胱の尿路上皮癌腫においても高感度であり、4 1 / 4 8 (約 8 5 . 4 %) の症例を陽性に染色した。p 4 0 発現の損失は、乳癌および前立腺癌において予測され得る。B C 2 8 で染色された乳癌の 6 5 の症例のうち、4 7 の症例 (約 7 2 . 3 %) が p 4 0 について陰性であった。前立腺癌においては、試験された 1 2 の症例のうちどれも p 4 0 について陽性ではなかった。加えて、良性前立腺および前立腺上皮内新生物形成を含有する前立腺組織の 1 5 の症例は、B C 2 8 で染色され、p 6 3 [4 A 4] と比較された。B C 2 8 と p 6 3 で染色された同じ試料について、代表的な領域が、2 人の別々の研究者によって比較され、彼らは、B C 2 8 が等価であること、またはおそらく、染色の強度および鋭敏さにおいて p 6 3 よりも優れており、おそらくバックグラウンドがより低いことを見出した。しかし、p 6 3 は、横紋筋を染色し、B C 2 8 は陰性であった。おそらく、B C 2 8 での横紋筋の染色の非存在は利点である。

40

【 0 1 6 3 】

R P 抗 p 4 0 抗体および抗 p 6 3 抗体 [4 A 4] と比較された抗 p 4 0 抗体 [B C 2 8

50

]の感度は、各抗体を用いての肺扁平上皮癌腫の様々な症例を染色することによって実証され得る(表4)。同じ判断基準を使用して、抗p40抗体[BC28]は、65/67試料を陽性として同定した(約97%)。比較すると、RP抗p40は肺扁平上皮癌腫の34/41(約83%)の症例を陽性として染色し、そして抗p63[4A4]は35/41(約85%)の症例を陽性として染色した。RP抗p40および4A4と比較して、BC28についてのより高い特異性が肺腺癌の症例に対して観察され得る。BC28は、評価された肺腺癌の71の症例のいずれも染色せず、従って、おそらく、偽陽性を生じない。比較すると、RP抗p40を用いる染色は、1/50(約2%)の症例を陽性として生じ、そして症例の5/50(約10%)が、4A4を使用するとき陽性であることが見出された。

【表4】

表4：抗p40抗体[BC28]、RP抗p40、および抗p63[4A4]の比較

肺癌表現型	p40[BC28]	RP p40	p63 [4A4]
扁平上皮癌腫	65/67 97%	34/41 83%	35/41 85%
腺癌	0/71 0%	1/50 2%	5/50 10%

【0164】

抗p40抗体[BC28]は、おそらく、様々な正常組織に対して評価されるときに(表5)、高度に特異的であり得る。p40を用いる正常組織の染色は、扁平上皮(例えば、皮膚、食道、および膀胱など)および腺組織(例えば、乳房および前立腺など)の存在に基づいて予測される組織において観察されてもよい。このような染色は予測され得、抗p40抗体[BC28]は任意の他の正常組織または新生物組織を染色しない可能性があり、これは、その高い特異性を実証し得る。

【0165】

モノクローナルマウス抗p40抗体[BC28]などの抗p40抗体は、おそらく、RP抗p40抗体およびモノクローナルマウス抗p63抗体[4A4]と比較した場合でさえ、その改善された感度、特異性、および染色特性に伴う明瞭な利点を提供し得る。図2、図52、および図3、図53は、肺扁平上皮癌腫の同じ試料の一連の切片を染色するRP抗p40抗体とのBC28の比較を示し、おそらく、BC28のより高い染色強度および特異性を実証する。例えば、図2および図52の試料は、BC28を用いる強力な核染色を示し、間質組織においては明白な染色を示さない可能性があるのに対して、RP抗p40抗体を用いる同じ試料の染色の間、図3および図53は、間質組織において、強度がより低く、弱い染色を生じ得る。BC28の1つの重要な利点は、おそらく、RP抗p40抗体または4A4と比較した場合でさえ、肺腺癌に対する特異性の改善であり得る。例えば、図5および図55は、RP抗p40抗体を用いて染色された肺腺癌の症例を示し、陽性染色を生じるが、しかし、BC28を用いる同じ試料の染色(図4および図54)は、完全に陰性であり、BC28の優れた特異性を実証する。抗p40抗体BC28はまた、肺組織における肺胞内マクロファージを染色しないことによる利点を提供し得る。例えば、RP抗p40抗体は、中程度から強力まで、肺胞内マクロファージを染色し得る(図16および図66)。対照的に、BC28は、同じ試料のマクロファージを、弱く染色するか、またはおそらく全く染色しないかのいずれかであり得(図17および図67)、多分、BC28の優れた特異性およびより明確な染色パターンさえも実証する。これらの例は、BC28の利点を実証し、おそらく、BC28は、優れた感度または特異性を含む、公知の抗体を超えたいくつかの利点を有し、多分、少ないバックグラウンドまたは望ましくない細胞質染色を伴って、より明確な染色パターンを生じる。

10

20

30

40

【表 5】

表 5 : 正常組織の抗 p 4 0 抗体 [B C 2 8] 染色

組織	#陽性/総組織	組織	#陽性/総組織
副腎	0/3	卵巣	0/3
膀胱、泌尿器	2/3	膵臓	0/3
骨髄	0/1	副甲状腺	0/3
眼	0/1	下垂体	0/2
乳房	3/3	胎盤	1/3
脳口小脳	0/3	前立腺	3/3
脳、大脳皮質	0/3	皮膚	1/1
卵管	0/3	脊髄	0/2
食道	3/3	脾臓	0/2
胃	0/3	骨格筋	0/3
腸、小腸	0/3	精巣	0/3
腸、結腸	0/3	胸腺	0/3
腸、直腸	0/3	甲状腺	0/3
心臓	0/3	炎症性扁桃炎*	3/3
腎臓	0/6	尿管	3/3
肝臓	0/3	子宮頸部	3/3
肺	0/3	子宮内膜	0/3

* B細胞およびT細胞は陰性である。正常扁平上皮のみが陽性である。

【 0 1 6 6 】

マウスモノクローナル抗 p 4 0 抗体 B C 2 8 を用いるウェスタンブロットの結果

p 4 0 タンパク質への B C 2 8 の結合はウェスタンブロットによって実証され得る (図 3 1、左のパネル、レーン 2)。 B C 2 8 の T A p 6 3 タンパク質への同様の結合の非存在もまた、ウェスタンブロットによって示され得る (図 4 8 および図 9 8、左のパネル、レーン 3)。逆に、抗 p 6 3 抗体 4 A 4 は、 p 4 0 タンパク質と T A p 6 3 タンパク質の両方を結合し得る (図 4 8 および図 9 8、右のパネル、レーン 2 およびレーン 3)。 B C 2 8 のより高い特異性 (p 4 0 の結合であって、 T A p 6 3 ではない) は、その優れた特性に寄与する利点であり得る。

【 0 1 6 7 】

本発明のいくつかの実施形態において、マウスモノクローナル抗 p 4 0 抗体 B C 2 8 な

10

20

30

40

50

どの抗 p 4 0 抗体は、上記のプロトコールおよび当業者に公知である他の方法の多くのバリエーションにおける使用のために適切であり得る。BC 2 8 で染色された試料は、永続的な封入剤およびカバースリップを使用して保管されてもよい。抗体 BC 2 8 はまた、標準的なプロトコールを使用して、自動染色機器において使用されてもよい。当業者に一般的に知られている多くの代替的な検出方法（例えば、蛍光）、検出酵素（例えば、アルカリホスファターゼ（AP）、 α -ガラクトシダーゼなど）、およびおそらく、色素原（例えば、ファストレッド、ファストブルー、3-アミノ-9-エチルカルバゾール、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリルホスフェート、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル-D-グルクロニドなど）さえも使用もまた、想定することができる。

10

【0168】

マウスモノクローナル抗 p 4 0 抗体などの抗 p 4 0 抗体のエピトープまたはその一部は、当業者が理解するように、マウス以外の種（例えば、ウサギ、ヤギ、ウマ、ニワトリなど）における産生を含む、新たなモノクローナル抗体の産生のために有用な抗原であり得る。

【0169】

ホルマリン固定されたパラフィン包埋組織の免疫組織化学における BC 2 8 などの抗 p 4 0 抗体の使用は、本明細書に記載され得るが、他の免疫アッセイにおけるその有用性は容易に想定することができ、本出願において含まれることが意味される。特に、FFPE の IHC において使用される同じ試薬の多くは、凍結組織切片の IHC においてもまた使用されてもよいことが周知であり得る。BC 2 8 などの抗 p 4 0 抗体は、おそらく、一般的に知られた方法を使用して、ELISA を含む他の免疫アッセイにおいてもまた有用であり得る。

20

【0170】

本発明の別の態様において、おそらく、IHC に関連して、抗 p 4 0 抗体は、「二重染色」手順（複数染色またはさらに多重染色としても記載される）を実施するために、カクテルの一部として、1つ以上のさらなる一次抗体とともに使用してもよい。そのような二重染色は一般に当該分野において周知であり得る。しかし、特定の診断的適用のための一次抗体の最良の組み合わせは知られていない可能性がある。

【0171】

この方法において、マウスモノクローナル抗 p 4 0 抗体 BC 2 8 などの抗 p 4 0 抗体は、おそらく、試料への同時適用のために適している単独の一次抗体カクテル中の1つ以上の抗体と組み合わせることができる。これらの抗体は、マウス宿主またはウサギ宿主などに由来してもよい。これらの抗体は、モノクローナルまたはポリクローナルであってもよい。実施形態において、抗体カクテルは、組織試料中で標的タンパク質抗原の存在または非存在を同定し得る2つ以上のカラー染色を生じるために、二重染色 IHC 手順において使用されてもよい。例えば、抗体カクテルがマウス抗体およびウサギ抗体から構成されてもよい実施形態において、検出システムは、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）に結合体化された抗マウス抗体を含んでもよく、おそらく、アルカリホスファターゼ（AP）に結合体化された抗ウサギ抗体さえも2色染色を産生するために使用されてもよい。3, 3'-ジアミノベンジジン（DAB）は、茶色染色を産生するために使用されてもよく、おそらく、HRP によって容易にされ、そして、試料中で結合されたマウス抗体の存在もしくは非存在、および/または位置を同定してもよく；ファストレッドは、赤紫色/赤色染色を産生するために使用されてもよく、おそらく、AP によって容易にされ、そして、これは試料中のウサギ抗体の存在もしくは非存在、および/または位置を同定してもよい。他の実施形態において、検出システムは、AP に結合体化された抗マウス抗体および HRP に結合体化された抗ウサギ抗体を含んでもよく、これらは、赤色染色を用いてマウス抗体の、そして茶色染色を用いてウサギ抗体の、存在もしくは非存在、および/または位置を同定してもよい2色染色を産生するために使用されてもよく、おそらく、このとき、ファストレッドおよび DAB が色素原として使用されてもよい。いくつかの実施形態にお

30

40

50

いて、HRPに結合体化された抗マウス抗体、およびおそらく、APに結合体化された抗ウサギ抗体は、単一溶液中で、カクテルとして試料に適用されてもよく、またはこれらは、別々の、連続する段階で適用されてもよい。

【0172】

抗体-酵素結合体を含む抗マウスまたは抗ウサギ抗体は、マウス、ウサギ、ニワトリ、ウマ、ラット、ヤギ、ヒツジなどを含むがこれらに限定されない様々な宿主種に由来してもよい。一次抗体は、マウス、ウサギ、ニワトリ、ウマ、ラット、ヤギ、ヒツジなどを含むがこれらに限定されない様々な宿主種からであってもよい。実施形態において、抗体は抗体-酵素結合体を含んでもよく、そして一次抗体は、2種の異なる宿主種から入手できる。DABおよび/またはファストレッド以外の色素原が同様に使用されてもよい。

10

【0173】

二重染色方法に対する複数の代替が可能であり、これには、2種より多い抗体の使用、マウスおよびウサギ以外の種の使用、他の色素原および検出システム、異なる順番の検出工程、ならびに、おそらく、3色以上の色を生じる改変（これは、変性工程を必要とし得る）が含まれるがこれらに限定されない。

【0174】

本発明の実施形態は、おそらく、カクテルとして、少なくとも2種の抗体またはそのフラグメントを有する組成物を提供してもよく、ここで、少なくとも2種の抗体またはそのフラグメントの少なくとも1種が、少なくともp40に特異的に結合する。これは、おそらく、生物学的サンプルを、少なくとも2種の抗体またはそのフラグメントを含む組成物と接触させることによって、生物学的サンプル中の少なくとも2種の異なるタンパク質を検出するための方法を提供してもよく、ここで、少なくとも2種の抗体またはそのフラグメントの少なくとも1種が少なくともp40に特異的に結合して抗原-抗体複合体を形成してもよく、そして抗原-抗体複合体は検出されてもよい。組成物は、少なくとも1種の第1の一次抗体および少なくとも1種の第2の一次抗体を有してもよい。

20

【0175】

少なくとも1種の抗体またはそのフラグメントは少なくともp40に特異的に結合してもよく、さらに1%より多い染色細胞の陽性指示カットオフ値を有してもよい。本明細書で言及されるように、陽性指示カットオフ値は、陽性染色結果を示すために必要である染色細胞のパーセンテージを提供し得る。他のカットオフ値には、約1%より多い染色細胞、約2%より多い染色細胞、約3%より多い染色細胞、約4%より多い染色細胞、約5%より多い染色細胞、約6%より多い染色細胞、約7%より多い染色細胞、約8%より多い染色細胞、約9%より多い染色細胞、およびおそらくさらに約10%より多い染色細胞、またはそれ以上などが含まれるがこれらに限定されない。

30

【0176】

実施形態において、本発明は、異なる色の結果などの異なる可視化結果を提供することが可能であり得る、少なくとも2種の抗体またはそのフラグメントを有する組成物を提供し得る。以下で他の実施形態において議論するように、組成物は、少なくとも2種の抗体またはそのフラグメントの少なくとも1つの他方が、DSG-3、CK4、ナブシンA、HMWCK、p504s、CK5/14、CK7/18、CK8/18、ウロプラキンI、ウロプラキンIII、GATA-3、およびそれらの任意の組み合わせなどに特異的に結合してもよいことを提供し得る。おそらく、抗p40抗体を有する、抗体、その組成物は、SCC癌腫検出組成物、膀胱検出組成物、乳癌検出組成物、前立腺癌腫検出組成物、およびそれらの任意の組み合わせなどを含むがこれらに限定されない検出システムを提供し得る。

40

【0177】

いくつかの実施形態において、単色染色は、一次抗体カクテルのために使用されてもよい。1つの例において、一次抗体カクテルが、同じ宿主種に由来するすべての抗体から構成されるならば、単色を用いて、すべての抗体の存在について染色するために単一の検出システムが使用されてもよい。各抗体の存在または非存在は細胞内局在に基づいて決定さ

50

れてもよく、またはおそらく、このような決定は必要ではなく、染色は、各抗体の存在または非存在を同定することなく効果的に解釈されてもよい。例えば、マウスモノクローナル抗 p 4 0 抗体 B C 2 8 は、一次抗体カクテル中でマウスモノクローナルデスマグレイン - 3 (D S G - 3) [B C 1 1] と組み合わせられてもよく、可視化のために抗マウス結合体化 H R P 検出および D A B を用いる I H C 手順において使用されて、茶色染色を産生してもよい。別の態様において、異なる宿主種からの 2 種以上の抗体から構成された一次抗体カクテルが、単色染色を産生するために同様の様式で使用されてもよい。例えば、マウスモノクローナル抗 p 4 0 B C 2 8 は、ウサギモノクローナル抗 C K 2 0 抗体 E P R 1 6 2 2 Y と組み合わせ、可視化のために抗マウス結合体化 H R P および抗ウサギ結合体化 H R P、ならびに D A B を用いる I H C 手順において使用されて、茶色染色を産生してもよい。

10

【 0 1 7 8 】

I H C 手順の特定の工程は、おそらく、当業者に公知であるような試薬のカクテルを使用することによって、連続的にまたは同時に実施されてもよい。例えば、一次抗体カクテルにおいて記載されている抗体は、1 つ以上の抗体の連続工程において代替的に適用されてもよい。同様に、検出試薬は、試薬カクテル中で同時に適用されてもよく、または別々の試薬が連続工程において適用されてもよい。

【 0 1 7 9 】

いくつかの実施形態において、第 1 の一次抗体が適用され、続いて第 1 の抗体 - 酵素結合体および第 1 の色素原が適用され、次いで、変性工程、その後、第 2 の一次抗体の適用に進み、続いて、第 2 の抗体 - 酵素結合体および第 2 の色素原を提供し得る。この様式において、2 つの異なる色の二重染色は、同じ種に由来する一次抗体を使用して達成されてもよい。

20

【 0 1 8 0 】

当業者に周知であるように、I H C 手順の特定の工程は、おそらく当業者に公知であるように試薬のカクテルを使用することによって、連続的にまたは同時に実施されてもよい。例えば、一次抗体カクテルにおいて記載されている抗体は、1 つ以上の抗体の連続工程において代替的に適用されてもよい。同様に、検出試薬は、試薬カクテル中で同時に適用されてもよく、または別々の試薬が連続工程において適用されてもよい。

【 0 1 8 1 】

複数染色手順における使用のために一次抗体カクテル中でマウスモノクローナル抗 p 4 0 抗体 B C 2 8 などの抗 p 4 0 抗体を組み合わせられたときに、診断のために有用であり得る抗体には以下が挙げられる：

30

【表 A - 1】

抗体の組み合わせおよび（宿主種）	可能性のある染色パターン（細胞内局在、染色の色*）	可能性のある診断的有用性	実施例において使用された検出システムおよび図面の番号
DSG-3（マウス） CK5（マウス） p40 [BC28]（マウス） ナプシンA（ウサギ）	DSG-3（膜、茶色） CK5（細胞質、茶色） p40（核、茶色） ナプシンA（細胞質、Red）	DSG-3および／またはCK5および／またはp40染色が肺SCCにおいて観察され得る；ナプシンA染色は肺ADCにおいて観察され得る	DS#2 図26、27、76、77
DSG-3（マウス） CK5（マウス） p40 [BC28]（マウス）	DSG-3（膜、茶色） CK5（細胞質、茶色） p40（核、茶色）	DSG-3および／またはCK5および／またはp40染色は肺SCCにおいて観察され得る	ヤギ抗マウス-HRP 図28、29、78、79
DSG-3（マウス） p40 [BC28]（マウス） ナプシンA（ウサギ）	DSG-3（膜、茶色） p40 (M)（核、茶色） ナプシンA（細胞質、赤色）	DSG-3および／またはp40染色はSCCにおいて観察され得る；ナプシンA染色はADCにおいて観察され得る	DS#2 図30-34および80-84
DSG-3（マウス） p40 [BC28]（マウス）	DSG-3（膜、茶色） p40（核、茶色）	DSG-3および／またはp40染色は肺SCCにおいて観察され得る	ヤギ抗マウス-HRP 図35、85
p40 [BC28]（マウス） CK5（ウサギ）	p40（核、茶色） CK5（細胞質、赤色）	CK5および／またはp40染色はSCCにおいて観察され得る	DS#2 図36、37、86、87
p40 [BC28]（マウス） ナプシンA（ウサギ）	p40（核、茶色） ナプシンA（細胞質、赤色）	p40染色は肺SCCにおいて観察され得る； ナプシンA染色は肺ADCにおいて観察され得る	DS#2 図38、39、88、89

10

20

30

【表 A - 2】

抗体の組み合わせおよび（宿主種）	可能性のある染色パターン（細胞内局在、染色の色*）	可能性のある診断的有用性	実施例において使用された検出システムおよび図面の番号
p 4 0 [B C 2 8]（マウス） HMWCK（マウス） P 5 0 4 S（ウサギ）	p 4 0 [B C 2 8]（核、茶色） HMWCK（細胞質、茶色） P 5 0 4 S（細胞質、赤色）	p 4 0 および / または HMWCK 染色は前立腺癌において減少しているかまたはおそらく、存在していない可能性がある P 5 0 4 S 染色は前立腺癌において観察され得る	D S # 2 図 4 0、9 0
p 4 0 [B C 2 8]（マウス） CK 5 / 1 4（マウス） P 5 0 4 S（ウサギ）	p 4 0 [B C 2 8]（核、茶色） CK 5 / 1 4（細胞質、茶色） P 5 0 4 S（細胞質、赤色）	p 4 0 および / または CK 5 / 1 4 染色は前立腺癌において減少しているかまたはおそらく、存在していない可能性がある P 5 0 4 S 染色は前立腺癌において観察され得る	D S # 2 図 4 1、9 1
p 4 0 [B C 2 8]（マウス） CK 5 / 1 4（マウス） CK 7 / 1 8（ウサギ）	p 4 0 [B C 2 8]（核、茶色） CK 5 / 1 4（細胞質、茶色） CK 7 / 1 8（細胞質、赤色）	染色パターンは癌腫などの乳房病変をインサイチュで同定するため、おそらく、新生物病変から良性を区別するために有用であり得る	D S # 2 図 4 2、4 3、9 2、9 3
p 4 0 [B C 2 8]（マウス） CK 5 / 1 4（マウス） CK 8 / 1 8（ウサギ）	p 4 0 [B C 2 8]（核、茶色） CK 5 / 1 4（細胞質、茶色） CK 8 / 1 8（細胞質、赤色）	染色パターンは癌腫などの乳房病変をインサイチュで同定するため、おそらく、新生物病変から良性を区別するために有用であり得る	D S # 2 図 4 4、9 4

10

20

30

【表 A - 3】

抗体の組み合わせおよび（宿主種）	可能性のある染色パターン（細胞内局在、染色の色*）	可能性のある診断的有用性	実施例において使用された検出システムおよび図面の番号
p40 [BC28]（マウス） および/または ウロプラキンII [BC21]（マウス） および/または ウロプラキンIII [BC17]（マウス）	p40 [BC28]（核、茶色） ウロプラキンII（膜および細胞質、茶色） ウロプラキンIII（膜および細胞質、茶色）	p40および/またはウロプラキンIIおよび/またはウロプラキンIII染色は、膀胱癌において観察され得る	ヤギ抗マウス-HRP 図45、95
p40 [BC28]（マウス）および/または ウロプラキンII [BC21]（マウス）および/または ウロプラキンIII [BC17]（マウス）および/または GATA-3（ウサギ）	p40 [BC28]（核、茶色） ウロプラキンII（膜および細胞質、茶色） ウロプラキンIII（膜および細胞質、茶色） GATA-3（核、赤色）	p40および/またはウロプラキンIIおよび/またはウロプラキンIIIおよび/またはGATA-3染色は、膀胱癌において観察され得る	DS#2 図46、96
p40 [BC28]（マウス） CK5（マウス）	p40（核、茶色） CK5（細胞質、茶色）	CK5および/またはp40染色はSCCにおいて観察され得る	ヤギ抗マウス-HRP 図47、97

10

20

30

*各染色の列挙された色は、おそらくHRPに結合体化された抗マウス抗体、および、おそらくAPに結合体化された抗ウサギ抗体さえを含んでもよく、おそらく、色素原としてDABおよびファストレッドを用いる、マウス抗体については茶色染色を生じ、ウサギ抗体については赤色染色を生じ得る、検出システムの結果であり得る（DS#2と称する）。あるいは、検出システムは、おそらくAPに結合体化された抗マウス抗体、および、おそらくHRPに結合体化された抗ウサギ抗体さえ含んでもよく、おそらく、色素原としてDABおよびファストレッドを用い、色素原はマウス抗体については赤色染色を生じ、ウサギ抗体については茶色染色を生じ得る（DS#1と称する）。いくつかの例において、2色は必要でない可能性がある。なぜなら、抗原は、染色の細胞内局在によって区別され得、おそらくどの抗原が染色されているかを決定することは診断的に意味のあることではない。他の色の組み合わせは、他の検出システムおよび色素原を使用して得られ得、すべてが本開示に含まれることが意味される。

40

【0182】

他のカクテルの例は、参照により本明細書に組み込まれる、2013年12月18日出願された「Antibody Cocktail Systems and Methods for Classification of Histologic Subtypes in Lung Cancer」という標題のPCT特許出願番号PCT/US2013/076203において提供され得る。

【0183】

50

D S G - 3、C K 5、p 4 0 [B C 2 8] およびナブシン A の抗体カクテルを用いる I H C 二重染色方法：おそらく、D S G - 3 + C K 5 + p 4 0 [B C 2 8] + ナブシン A などの抗体カクテルを使用する「二重染色」または「多重手順」を産生するための免疫組織化学は、一般的には、以下の非限定的な例によって例示されるような、当業者に一般的に公知である手順（例えば、工程間での T r i s - 緩衝化生理食塩水、p H 約 7 . 6 を用いる洗浄）を使用して、ホルマリン固定パラフィン包埋（F F P E）組織サンプルに対して実施されてもよい。

【 0 1 8 4 】

1) ホルマリン固定パラフィン包埋組織の切片（ $\sim 5 \mu\text{m}$ ）は、おそらく、ポリリジンでコートされた市販の顕微鏡スライド上に装着されてもよい。

10

【 0 1 8 5 】

2) 切片は脱パラフィンされてもよく（キシレンまたはキシレン代用品を使用）、おそらく、一連のアルコール / 水溶液を通して再水和されてもよく、続いて、おそらく、約 3 % 過酸化水素溶液を用いて、内因性ペルオキシダーゼをブロックしてもよい。

【 0 1 8 6 】

3) サンプルは、圧力鍋（D i v a , D e c l o a k i n g C h a m b e r ; B i o c a r e M e d i c a l）中で、クエン酸緩衝液を使用して、加熱誘導性抗原回復に供せられてもよく、約 1 2 5 で約 3 0 秒間加熱されてもよい [当業者に公知である他の抗原回復方法（例えば、スチーム、電子レンジ、酵素など）もまた利用可能であり得る]。組織は、約 1 0 分間冷却されてもよく、次いで、脱イオン水ですすがれてもよい。

20

【 0 1 8 7 】

4) D S G - 3 + C K 5 + p 4 0 [B C 2 8] + ナブシン A の抗体カクテルは、キャリアタンパク質としてウシ血清アルブミンを用いて、リン酸緩衝化溶液（p H 約 6 . 0）に約 3 0 分間適用されてもよい。

【 0 1 8 8 】

5) おそらく、ヤギ抗マウス西洋ワサビペルオキシダーゼ（H R P）結合体化二次抗体およびヤギ抗ウサギアルカリホスファターゼ（A P）結合体化二次抗体（M A C H 2 D o u b l e S t a i n # 2 , B i o c a r e M e d i c a l）のカクテルを用い、約 3 0 分間のインキュベーションを用いる抗体の検出。

30

【 0 1 8 9 】

6) おそらく、最後の検出工程において、おそらく、約 p H 8 . 3 の緩衝液中の、ナフトールホスフェート基質を伴うファストレッド色素原（V u l c a n F a s t R e d , B i o c a r e M e d i c a l）が、約 2 0 分間適用されてもよく、これが、赤紫色（f u s c h i a） / 赤色の色素原性生成物を染色として産生し得る。続いて、おそらく、約 0 . 0 2 % 過酸化水素（B e t a z o i d D A B , B i o c a r e M e d i c a l）を含有する緩衝液中の 3 , 3 ' - ジアミノベンジジン（D A B）が適用されてもよい。H R P 媒介性メカニズムを通しての D A B の酸化は、茶色の色素原性生成物の沈殿を生じ得、おそらく、各抗体についての抗原発現の部位の同定を可能にする。抗体 p 4 0、D S G - 3、および C K 5 の存在は、茶色の染色によって決定されてもよい。ナブシン A 抗体の存在は赤色染色によって決定されてもよい。

40

【 0 1 9 0 】

7) スライドは、おそらく、改変マイヤーヘマトキシリン中で手短に対比染色されてもよい。

【 0 1 9 1 】

D S G - 3、C K 5、および p 4 0 [B C 2 8] の抗体カクテルを用いる I H C 単一染色方法：D S G - 3 + C K 5 + p 4 0 [B C 2 8] などの抗体カクテルを使用する免疫組織化学は、一般的には、以下の非限定的な例によって例示されるような、当業者に一般的に公知である手順（例えば、工程間での T r i s - 緩衝化生理食塩水、p H 約 7 . 6 を用いる洗浄）を使用して、ホルマリン固定パラフィン包埋（F F P E）組織サンプルに対して実施されてもよい。

50

【 0 1 9 2 】

1) ホルマリン固定パラフィン包埋組織の切片 (~ 5 μ m) は、おそらく、ポリリジンでコートされた市販の顕微鏡スライド上に装着されてもよい。

【 0 1 9 3 】

2) 切片は脱パラフィンされてもよく (キシレンまたはキシレン代用品を使用)、おそらく、一連のアルコール / 水溶液を通して再水和されてもよく、続いて、おそらく、約 3 % 過酸化水素溶液を用いて、内因性ペルオキシダーゼをブロックしてもよい。

【 0 1 9 4 】

3) サンプルは、圧力鍋 (Diva , Decloaking Chamber ; Biocare Medical) 中で、クエン酸緩衝液を使用して、加熱誘導性抗原回復に供せられてもよく、約 125 で約 30 秒間加熱されてもよい [当業者に公知である他の抗原回復方法 (例えば、スチーマ、電子レンジ、酵素など) もまた利用可能であり得る]。組織は、約 10 分間冷却されてもよく、次いで、脱イオン水ですすがれてもよい。

10

【 0 1 9 5 】

4) D S G - 3 + C K 5 + p 4 0 [B C 2 8] の抗体カクテルは、キャリアタンパク質としてウシ血清アルブミンを用いて、リン酸緩衝化溶液 (p H 約 6 . 0) に約 30 分間適用されてもよい。

【 0 1 9 6 】

5) おそらく、西洋ワサビペルオキシダーゼ (H R P) と結合体化されたヤギ抗マウス二次抗体 (M A C H 2 Mouse HRP - Polymer Detection , Biocare Medical) のカクテルを用い、約 30 分間のインキュベーションを用いる抗体の検出。あるいは、おそらく、西洋ワサビペルオキシダーゼ (H R P) と結合体化された二次抗体 (M A C H 4 Universal HRP - Polymer Detection , Biocare Medical) を用いる抗体の検出は、2段階で達成されてもよい。ウサギ抗マウス I g G 抗体の最初の約 10 分間の適用に続いて、ヤギ抗ウサギ - H R P 結合体との約 10 分間のインキュベーションが行われてもよい。

20

【 0 1 9 7 】

6) おそらく、最後の検出工程において、おそらく、約 0 . 0 2 % 過酸化水素を含有する緩衝液中の 3 , 3 ' - ジアミノベンジジン (D A B) (Betazoid DAB , Biocare Medical) が適用されてもよい。HRP 媒介メカニズムを通しての D A B の酸化は、茶色の発色生成物の沈殿を生じ得、おそらく、各抗体についての抗原発現の部位の同定を可能にする。抗体 p 4 0、D S G - 3、および C K 5 の存在は、茶色染色によって決定され得る。

30

【 0 1 9 8 】

7) スライドは、おそらく、改変マイヤーヘマトキシリン中で手短に対比染色されてもよい。

【 0 1 9 9 】

D S G - 3、C K 5、p 4 0 [B C 2 8]、およびナブシン A を用いる I H C 染色の結果：上記の二重染色プロトコールを使用して、FFPE 組織は、D S G - 3、p 4 0 [B C 2 8]、C K 5、およびナブシン A のカクテルを用いて染色されてもよい。肺 S C C の染色の一例が図 2 6 および図 7 6 において示される。抗体 D S G - 3、p 4 0、および / または C K 5 の存在は茶色染色を生じ得る。ナブシン A の赤色染色は減少しているかまたは存在していない可能性があり、またはおそらく、残存している正常肺組織に制限され得る。肺 A D C の染色の一例が図 2 7 および図 7 7 において示される。ナブシン A の存在は赤色染色を生じ得る。p 4 0、D S G - 3、および / または C K 5 からの茶色染色は、減少しているかまたは存在していない可能性がある (例えば、図 2 7 および図 7 7 を参照のこと)。

40

【 0 2 0 0 】

D S G - 3、C K 5、および p 4 0 [B C 2 8] を用いる I H C 染色の結果：上記の単一染色プロトコールを使用して、FFPE 組織は、D S G - 3、p 4 0 [B C 2 8]、お

50

よび C K 5 のカクテルを用いて染色されてもよい。肺 S C C の染色の一例が図 2 8 および図 7 8 において示される。D S G - 3、p 4 0、および / または C K 5 抗体の存在は茶色染色を生じ得る。この例において、検出のためにヤギ抗マウス H R P などの単色染色を使用することが受け入れ可能である。なぜなら、D S G - 3、p 4 0、または C K 5 の存在は、すべてが扁平上皮癌腫を示すからである。肺 A D C の染色の一例が図 2 9 および図 7 9 において示される。D S G - 3、p 4 0、および / または C K 5 からの茶色染色は、減少しているかまたは存在していない可能性があり（例えば、図 2 9 および図 7 9 を参照のこと）、または残存している正常肺組織に制限さえされ得る。

【 0 2 0 1 】

D S G - 3、p 4 0 (M)、およびナブシン A を用いる I H C 染色の結果：上記の二重染色プロトコールを使用して、F F P E 組織は、D S G - 3、p 4 0 (M)（例えば、マウスモノクローナル [B C 2 8]）、およびナブシン A のカクテルを用いて染色されてもよい。A D C の染色の例は、図 2 0 A および図 2 0 B において示される。ナブシン A の存在は赤色染色を生じ得る。p 4 0 または D S G - 3 からの茶色染色は、減少しているかまたは存在していない可能性があり（例えば、図 3 0、図 8 0、図 3 1、および図 8 1 を参照のこと）、または残存している正常肺組織に制限さえされ得る（例えば、図 3 1 および図 8 1 を参照のこと）。S C C の染色の例は、図 3 2、図 8 2、図 3 3、図 8 3、図 3 4、および図 8 4 に示される。抗体 D S G - 3 または p 4 0 の存在は茶色染色を生じ得る。ナブシン A の赤色染色は減少しているかまたは存在していない可能性があり、またはおそらく、残存している正常肺組織に制限され得る（例えば図 3 3 および図 8 3 を参照のこと）。

10

20

【 0 2 0 2 】

D S G - 3 および p 4 0 (M) を用いる I H C 染色の結果：上記の単一染色プロトコールを使用して、ヤギ抗マウス H R P の検出システムを用いて、F F P E 組織は、D S G - 3 および p 4 0 (M) のカクテルを用いて染色されてもよい。S C C の染色の一例が図 3 5 および図 8 5 において示される。D S G - 3 および / または C K 5 抗体の存在は茶色染色を生じ得る。

【 0 2 0 3 】

p 4 0 (M) および C K 5 (R M) を用いる I H C 染色の結果：上記の二重染色プロトコールを使用して、F F P E 組織は、p 4 0 [B C 2 8] および C K 5 (R M) のカクテルを用いて染色されてもよい（例えば、ウサギモノクローナル [E P 1 6 0 1 Y]）。肺 S C C の染色の一例が図 3 6 および図 8 6 において示される。p 4 0 (M) 抗体の存在は茶色染色を生じ得、C K 5 (R M) 抗体の存在は赤色染色を生じ得る。肺 A D C の染色の一例が図 3 7 および図 8 7 において示される。茶色または赤色の染色は観察されない可能性があり、おそらく、p 4 0 および C K 5 の非存在を示唆する。

30

【 0 2 0 4 】

p 4 0 (M) およびナブシン A を用いる I H C 染色の結果：上記の二重染色プロトコールを使用して、F F P E 組織は、p 4 0 (M) のカクテル（例えば、マウスモノクローナル [B C 2 8]）およびナブシン A を用いて染色されてもよい。S C C の染色の一例が図 3 8 および図 8 8 において示される。p 4 0 抗体の存在は茶色染色を生じ得る。ナブシン A の赤色染色は、減少しているかまたは存在していない可能性があり、またはおそらく、残存している正常肺組織に制限され得る。A D C の染色の一例が図 3 9 および図 8 9 において示される。ナブシン A の存在は赤色染色を生じ得る。p 4 0 からの茶色染色は、減少しているかまたは存在していない可能性がある。

40

【 0 2 0 5 】

p 4 0 [B C 2 8]、H M W C K、および P 5 0 4 S を用いる I H C 染色の結果：上記の二重染色プロトコールを使用して、F F P E 組織は、p 4 0 [B C 2 8]、H M W C K（例えば、マウスモノクローナルクローン 3 4 E 1 2）、および P 5 0 4 S（おそらく、A M A C R としてもまた知られる、例えば、ウサギモノクローナル抗 A M A C R [1 3 H 4]、またはウサギポリクローナル抗体）のカクテルを用いて染色されてもよい。前立

50

腺組織の染色の一例が図40および図90において示される。抗体p40およびまたはHMWCKの存在は茶色染色を生じ得る。P504S抗体の存在は赤色染色を生じ得る。組織は、正常前立腺、前立腺癌の領域、またはおそらく、前立腺上皮内新生物形成(PIN)を含有してもよい。

【0206】

p40[BC28]、CK5/14、およびP504Sを用いるIHC染色の結果：上記の二重染色プロトコールを使用して、FFPE組織は、p40[BC28]、CK5/14(例えば、抗CK5クローン[XM26]と抗CK14クローン[LL002]との組み合わせ)、およびP504S(おそらく、AMACRとしてもまた知られる、例えば、ウサギモノクローナル抗AMACR[13H4]またはウサギポリクローナル抗体)カクテルを用いて染色されてもよい。前立腺組織の染色の一例が図41および図91において示される。抗体p40およびまたはCK5/14の存在は茶色染色を生じ得る。P504S抗体の存在は赤色染色を生じ得る。組織は正常前立腺、前立腺癌の領域、またはおそらく、前立腺上皮内新生物形成(PIN)を含有してもよい。図40、図90、図41、および図91における例は、サイトケラチンマーカーが交換可能であり得る場合の代表例である。これらの例において、HMWCKおよびCK5/14は、両方とも、有効なサイトケラチンマーカーであり、有効な等価物と見なされてもよい。

10

【0207】

p40[BC28]、CK5/14、およびCK7/18を用いるIHC染色の結果：上記の二重染色プロトコールを使用して、FFPE組織は、p40[BC28]、CK5/14(例えば、抗CK5クローン[XM26]と抗CK14クローン[LL002]の組み合わせ)、およびCK7/18(例えば、ウサギモノクローナル抗CK7抗体[BC1]とウサギモノクローナル抗CK18抗体クローン[E431-1]の組み合わせ)のカクテルを用いて染色されてもよい。乳房組織、おそらく、乳癌の染色の一例が、図42、図92、図43、および図93において示される。抗体p40およびまたはCK5/14の存在は茶色染色を生じ得る。CK7/18抗体の存在は赤色染色を生じ得る。図43および図93は、2モード染色の例であり得る。p63+CK5/14+CK7/18の抗体カクテルは、臨床診断において有用であることが示され得る(例えば、参照により本明細書に組み込まれる、論文「Atypical ductal hyperplasia: interobserver and intraobserver variability」Jain RK, Mehta R, Dimitrov R, Larsson LG, Musto PM, Hodges KB, Ulbright TM, Hattab EM, Agaram N, Idrees MT, Badve S. Mod Pathol. 2011 Jul; 24(7): 917-23を参照のこと)。p63の代わりにp40を使用する抗体カクテル(例えば、p40[BC28]+CK5/14+CK7/18)は、同様に診断のために有用であり得、おそらく、p40[BC28]の利点を提供さえし得る。

20

30

【0208】

p40[BC28]、CK5/14、およびCK8/18を用いるIHC染色の結果：上記の二重染色プロトコールを使用して、FFPE組織は、p40[BC28]、CK5/14(例えば、抗CK5クローン[XM26]および抗CK14クローン[LL002]の組み合わせ)、およびCK8/18(例えば、ウサギモノクローナル抗CK8抗体[EP17]およびウサギモノクローナル抗CK18抗体クローン[E431-1]の組み合わせ)のカクテルを用いて染色されてもよい。乳房組織、おそらく、乳癌の染色の一例が、図44および図94において示される。抗体p40およびまたはCK5/14の存在は茶色染色を生じ得る。CK8/18抗体の存在は赤色染色を生じ得る。

40

【0209】

p40[BC28]、ウロプラキンII、およびウロプラキンIIIを用いるIHC染色の結果：上記の単一染色プロトコールを使用して、FFPE組織は、p40[BC28]、ウロプラキンII[BC21]、およびウロプラキンIII[BC17]のカクテル

50

を用いて染色されてもよい。膀胱組織、おそらく、尿路上皮癌腫の染色の一例が、図45および図95において示される。抗体p40、ウロプラキンII、および/またはウロプラキンIIIの存在は茶色染色を生じ得る。図45および図95の例は、おそらく、ヤギ抗マウスHRPを使用する単色染色が有用である事例である。なぜなら、p40、ウロプラキンII、またはウロプラキンIIIはすべてが尿路上皮癌腫を示すからである。

【0210】

p40 [BC28]、ウロプラキンII、ウロプラキンIII、およびGATA-3を用いるIHC染色の結果：上記の二重染色プロトコールを使用して、FFPE組織は、p40 [BC28]、ウロプラキンII [BC21]、ウロプラキンIII [BC17]、およびGATA-3（例えば、ウサギ抗GATA-3抗体）のカクテルを用いて染色されてもよい。膀胱組織、おそらく、尿路上皮癌腫の染色の一例が、図46および図96において示される。p40、ウロプラキンII、および/またはウロプラキンIII抗体の存在は茶色染色を生じ得る。GATA-3の存在は赤色染色を生じ得る。

10

【0211】

p40 (M) およびCK5 (M) を用いるIHC染色の結果：上記の単一染色プロトコールを使用して、FFPE組織は、p40 [BC28] およびCK5 (M)（例えば、マウスモノクローナル [XM26]）のカクテルを用いて染色されてもよい。肺SCCの染色の一例が図47および図97において示される。p40 および/またはCK5抗体の存在は茶色染色を生じ得る。

20

【0212】

多くの実施形態において、サイトケラチンマーカーを結合する抗体は、異なる組み合わせで使用されてもよく、いくつかの場合において、当業者に公知であるように、交換可能である。例えば、CK5は、おそらく、CK5/6またはCK5/14と交換可能であり得る。同様に、HMWCK（高分子量サイトケラチン）は、CK5/6またはCK5/14と交換可能に使用されてもよい。別の例において、CK7はCK8と交換可能に使用されてもよい。

【0213】

他の実施形態は、例示したカクテルに対するバリエーションを含む、抗体の他の組み合わせを伴う、p40 [BC28] から構成される一次抗体カクテルを含んでもよい。いくつかの実施形態において、他の宿主種が使用されてもよい。列挙された例に含まれる1つ以上の抗体を欠いている実施形態もまた有用であり得る。

30

【0214】

いくつかの実施形態において、BC28以外の抗p40抗体もまた、有用であり得る。ウサギポリクローナル抗p40抗体またはウサギモノクローナル抗p40抗体がいくつかの実施形態において使用されてもよい。他の実施形態において、BC28以外のマウスモノクローナル抗p40抗体クローンは同様に有用であり得、そしておそらく、BC28と交換可能である。

【0215】

多くの症例において、しかしおそらく、特に、肺癌の症例において、診断は、しばしば、細胞診または生検からの限られた組織サンプルで実施され得、そして、さらなる分子試験のために組織を保存することが重要であり得る。従って、最小限の組織を消費するが、最適な特異性および/または感度を提供する診断に対する効率的なアプローチが好ましい可能性がある。試料から最小限の組織を消費しながら、有用な診断情報を提供する方法は、おそらく、抗体カクテルの使用を通しての、同じサンプルへの複数の抗体の適用によって、または抗体の連続適用によって、または感度または特異性の改善の特徴によって想定可能に使用されてもよい。

40

【0216】

マウスモノクローナル抗p40抗体BC28などの抗p40抗体は、p40の検出のために特異的であり得、ヒト組織サンプルにおけるいくつかの型の癌の診断のための免疫組織化学的手順において有用であり得る。特に、BC28などの抗p40抗体は、RP抗p

50

40抗体および抗p63抗体[4A4]を超えた利点を有し、これには、より高い特異性およびより明確な染色、肺腺癌のいくつかの症例の染色の不在、ならびにマクロファージの染色の欠如が挙げられるがこれらに限定されない。

【0217】

p40レベルの決定は、患者の転帰の有用な予後因子および指標であり得る。IHCによって決定されるようなp40発現の損失は、攻撃的な膀胱癌に付随し、そして患者の生存を予測することが示されてきた(参照により本明細書に組み込まれる、Matsumoto Kら、Urology, 2008; 72: 444-449, and Ohtsuka Y et al. BJU Int, 2006; 97: 1322-1326を参照のこと)。このようなものとして、本明細書で議論されるような様々なシステムおよび方法が検出システムを提供してもよく、これは例えば、癌の検出、癌の診断または予後診断でさえ、癌の転帰の予測、癌の治療の効力の評価、癌の再発の予測などであるがこれらに限定されない。本明細書で言及した通り、抗体またはそのフラグメントの使用は、自動染色デバイス上で実施されてもよい。検出は、自動、手動、画像分析によってなどで行われてもよい。検出は、免疫組織化学(IHC)、FFPEのIHC、凍結組織切片のIHC、免疫細胞化学、ELISAなどを含むがこれらに限定されない方法を利用してよい。

10

【0218】

免疫アッセイ方法の例としてであるがしかし1つの例として、本発明の実施形態は、図50に模式的に表示した通り、試験される動物またはヒトから組織を入手する工程(6)前記組織を固定もしくは凍結する工程(7)、p40に対するエピトープをアンマスクするために前記固定または凍結組織を処理する工程(8)、前記組織中に前記タンパク質が存在するならば、前記抗体またはそのフラグメントがp40タンパク質に結合するような量および条件下で、前記処理された組織を本明細書で議論されるような抗体またはそのフラグメントと接触させる工程(9)、ならびにおそらく、前記結合した抗体の存在を検出さえる工程(10)を提供し得る。

20

【0219】

図49は、おそらくハイブリドーマから提供さえる、組成物中またはカクテル中でさえある、抗体、そのフラグメント、その部分を提供し得るキット(5)を含む本明細書の様々な実施形態の図式的な概略を示し、抗体(1)などは生物学的サンプル(2)と接触されてもよく、少なくとも1つの抗体-抗原複合体(3)を形成し、次いでこれは、検出器(4)を用いて検出されてもよい。

30

【0220】

本発明は、実施形態において、抗体またはそのフラグメント(本明細書において議論されるような)を、おそらく、抗原に結合したときの抗体またはそのフラグメントの抗体検出エレメントとともに含んでもよい、診断用または予後診断用でさえある試験キットを提供し得る。これは、生物学的サンプルを、抗体またはそのフラグメントと接触させる工程、および、おそらく抗体検出エレメントを使用して、生物学的サンプル中で、抗体またはそのフラグメントのタンパク質または抗原との結合またはその存在をさえも検出する工程の方法を提供し得る。実施形態は、おそらく、試験される動物またはヒトから組織を入手する工程、前記組織中に前記タンパク質が存在するならば、前記抗体またはそのフラグメントがp40タンパク質に結合するような量および条件下で、前記組織を、本明細書で提示される様々な実施形態に従う抗体またはそのフラグメントと接触させる工程、および、さらに前記結合した抗体の存在を検出する工程によって、哺乳動物またはヒトにおけるp40タンパク質を検出するための免疫アッセイ法を提供し得る。生物学的サンプルは、おそらく、使用される抗体またはカクテルに依存して、血液、尿、尿路上皮組織、移行細胞組織、膀胱組織、正常組織、新生物組織、腎臓組織、卵巣組織、甲状腺組織、子宮内膜組織、腎臓組織、扁桃腺組織、膵臓組織、結腸組織、リンパ節組織、新生物膵臓組織、胃組織、前立腺組織、肺組織、乳房組織などを含んでもよいがこれらに限定されない。

40

【0221】

現在当業者に知られている抗p63抗体を使用する多数の適用および方法の中で、抗p

50

63抗体は、抗p40抗体（例えば、BC28）と置き換えられてもよく、おそらく等価な、またはさらに、おそらく優れた結果を伴うことが注目される。

【0222】

p40、p40抗体、BC28などの用語の使用は、当業者が理解する程度に適切に、抗p40抗体に関連し得ることが注目される。

【0223】

前述から容易に理解できるように、本発明の基本的なコンセプトは、様々なやり方で具体化されてもよい。これは、抗体技術、ならびに、適切な抗体を達成するためのデバイスの両方を包含する。本出願において、抗体技術は、記載された様々なデバイスによって達成されることが示された結果の一部として、および、利用のために固有である工程として開示されている。これらは、単純に、意図されかつ記載されるようなデバイスを利用することの自然な結果である。加えて、いくつかのデバイスが開示されているが、これらは特定の方法を達成するのみならず、多くの方法で変動できることが理解されるべきである。重要なことに、前述のすべてに関して、これらの面のすべてが本開示によって包含されることが理解されるべきである。

【0224】

本出願に含まれる議論は、基本的な説明として役立つことが意図される。読者は、特定の議論がすべての可能な実施形態を明確に説明していない可能性があること；多くの代替は黙示的であることに気付いているはずである。これはまた、本発明の一般的な性質を完全に説明していない可能性があり、そして、各々の特徴または要素が、いかにして実際に、より広範な機能または多くの様々な代替もしくは等価な要素の代表であり得るかを明確に示していない可能性がある。再度、これらは、本開示の中に明白に含まれている。本発明がデバイスに向けられた専門用語で説明される場合、デバイスの各々の要素は明白に機能を発揮する。装置の請求項が、記載されたデバイスについて含まれるのみならず、方法またはプロセスの請求項もまた、本発明および各要素が実施する機能に取り組むために含まれ得る。説明と専門用語のいずれも、いかなる引き続き特許出願において含まれるであろう請求項の範囲を限定することを意図するものでもない。

【0225】

様々な変更が本発明の本質から逸脱することなく行われてもよいこともまた理解されるべきである。このような変更もまた、黙示的に本明細書に含まれる。これらはなお、本発明の範囲内に含まれる。示される明示的な実施形態を包含する広い開示、とても様々な黙示的な代替的な実施形態、および広範な方法またはプロセスなどが本開示に包含され、いかなる引き続き特許出願のためにも請求項を作成するときに根拠となり得る。このような文言上の変更およびより広いかまたはより詳細な特許請求は、より後の日付で（例えば、いかなる要求される期限日まで）または出願人が引き続いてこの出願を基礎として特許出願を追求する事象において、達成されてもよいことが理解されるべきである。この理解を用いて、読者は、本開示が、引き続いて出願される特許出願をサポートすることに気付くべきであり、この特許出願は、出願人の権利の中にあると見なされる程度に広い請求項の基礎の審査を追求してもよく、独立しておよび全体のシステムとしての両方で、本発明の多くの態様を網羅する特許を生じるように設計されてもよい。

【0226】

さらに、各々の本発明の様々な要素および請求項はまた、様々な様式で達成される得る。さらに、使用されるかまたは暗示されるとき、要素は、個々の構造、ならびに、物理的に接続されてもよく、接続されていなくてもよい複数の構造を包含するものとして理解される。本開示は、このようなバリエーションを包含することが理解されるべきであり、任意の装置の実施形態、方法またはプロセスの実施形態、またはさらに単にこれらの任意の要素の実施形態のバリエーションが存在する。特に、開示が本発明の要素に関する場合、各要素についての用語は、たとえ機能または結果のみが同じであるとしても、各要素についての用語は等価な装置の用語または方法の用語によって表現されてもよいことが理解されるべきである。このような等価な、より広い、またはさらにより一般的な用語は、各要

10

20

30

40

50

素または作用の説明において包含されると見なされるべきである。このような用語は、本発明が権利を与えられる默示的に広い適用範囲を明示的にするよう望まれる場合には、置き換えができる。例として、しかし1つの例として、すべての作用は、その作用を取るために手段として、またはその作用を引き起こす要素として表現されてもよいことが理解される。同様に、開示される各物理的要素は、物理的な要素が容易にする作用の開示を包含することが理解されるべきである。この最後の態様に関して、例としてしかし1つの例として、「検出」または「検出器」の開示は、明示的に議論されるか否かに関わらず、「検出する」の作用の開示を包含すると理解されるべきであり、そして逆に、「検出する」の作用の開示が効果的に存在し、このような開示は、「検出器」およびさらに「検出するための手段」の開示を包含することが理解されるべきである。このような変更および代替の用語は、本明細書に明示的に含まれることが理解される。さらに、各々のこのような用語は（そのように明示的に記載されるか否かに関わらず）、所定の機能を発揮できるすべての要素を包含するものとして理解されるべきであり、そして記載される機能を発揮する要素のすべての記載は、機能を実行するための手段の非限定的な例として理解されるべきである。

10

20

30

【0227】

本出願において特許のために言及されたあらゆる法律、制定法、規定、もしくは規則、または本出願において特許のために言及された特許、刊行物、または他の文献は参照により本明細書によって組み込まれる。本出願によって主張されたあらゆる優先権の案件は本明細書に付記され、参照により本明細書によって組み込まれる。加えて、使用される各用語に関して、本出願におけるその利用が広くサポートする解釈を一致していないことがない限り、共通の辞書的な定義は、参照により本明細書に組み込まれる the Random House Webster's Unabridged Dictionary, second edition に含まれるような各々の用語およびすべての定義、代替的な用語、および同義語について組み入れられるものと理解されるべきである。最後に、以下のリストまたは本出願と共に出願された他の情報陳述書に列挙されてすべての文献は、本明細書に添付され、参照により本明細書に組み込まれる。しかし、上記の各々に関しては、参照により組み込まれたこのような情報または陳述書が本発明の特許許可と一貫していないと見なされ得る程度まで、このような陳述は、明確に出願人によってなされたものと見なされない。

【表 B】

I. 米国特許文献

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

【表 C】

I I. 非特許文献

Jain, r., et al.: Atypical ductal hyperplasia: interobserver and intraobserver variability, Modern Pathology (2011) 24, 917-923	
Tacha, d., et al.: An Immunohistochemical Analysis of a Newly Developed, Mouse Monoclonal p40 (BC28) in Lung, Bladder, Skin, Breast, Prostate, and Head and Neck Cancers: 2014 College of American Pathologists, pg 1-7, posted 02/2014	
Khoury M. P. et al. p53 Isoforms: An Intracellular Microprocessor? Genes Cancer. 2011 Apr;2(4):453-65	
Murray-Zmijewski F. et al. p53/p63/p73 isoforms: an orchestra of isoforms to harmonise cell differentiation and response to stress, Cell Death Differ. 2006 Jun;13(6):962-72	10
Kaghad M. et al. Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers, Cell. 1997 Aug 22;90(4):809-19	
Trink B. et al. A new human p53 homologue, Nat Med. 1998 Jul;4(7):747-8	
Osada M. et al. Cloning and functional analysis of human p51, which structurally and functionally resembles p53, Nat Med. 1998 Jul;4(7):839-43	
Yang A. et al. p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities, Mol Cell. 1998 Sep;2(3):305-16	
Senoo M. et al. A second p53-related protein, p73L, with high homology to p73, Biochem Biophys Res Commun. 1998 Jul 30;248(3):603-7	
Hibi K. et al. AIS is an oncogene amplified in squamous cell carcinoma, Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 May 9;97(10):5462-7	20
Nobre A. R. et al. p40: A p63 Isoform Useful for Lung Cancer Diagnosis - A Review of the Physiological and Pathological Role of p63, Acta Cytol. 2013;57(1):1-8	
Bishop J. A. et al. p40 (Δ Np63) is superior to p63 for the diagnosis of pulmonary squamous cell carcinoma, Mod Pathol. 2012 Mar;25(3):405-15	
Nonaka D. A study of Δ Np63 expression in lung non-small cell carcinomas, Am J Surg Pathol. 2012 Jun;36(6):895-9	
Pelosi G. et al. Δ Np63 (p40) and thyroid transcription factor-1 immunoreactivity on small biopsies or cellblocks for typing non-small cell lung cancer: a novel two-hit, sparing-material approach, J Thorac Oncol. 2012 Feb;7(2):281-90	
Brown A. F. et al. Tissue-Preserving Antibody Cocktails to Differentiate Primary Squamous Cell Carcinoma, Adenocarcinoma, and Small Cell Carcinoma of Lung, Arch Pathol Lab Med. 2013 Jan 4	30
Karni-Schmidt O. et al. Distinct expression profiles of p63 variants during urothelial development and bladder cancer progression, Am J Pathol. 2011 Mar;178(3):1350-60	
Signoretti S. et al. p63 is a prostate basal cell marker and is required for prostate development, Am J Pathol. 2000 Dec;157(6):1769-75	
Nylander K. et al. Differential expression of p63 isoforms in normal tissues and neoplastic cells, J Pathol. 2002 Dec;198(4):417-27	
Barbareschi M, et al. p63, a p53 homologue, is a selective nuclear marker of myoepithelial cells of the human breast, Am J Surg Pathol. 2001 Aug;25(8):1054-60	
米国仮出願 61/770,956, 2013年2月28日に出願, 発明の名称“Systems and Methods for Anti-p40 Antibodies”,	
PCT出願番号PCT/US2013/076203, 2013年12月18日に出願, 発明の名称“Antibody Cocktail Systems and Methods for Classification of Histologic Subtypes in Lung Cancer”	40
PCT 出願番号PCT/US2013/062043, 2013年9月26日に出願, 発明の名称“Anti-Uroplakin II Antibodies Systems and Methods”	

【 0 2 2 8 】

従って、出願人は、発明を特許請求し、発明の陳述書を作成するためのサポートを少なくとも以下まで有することが理解されるべきである： i) 本明細書に開示され、記載されるような各抗体デバイス、 i i) 開示され、記載される関連方法、 i i i) これらのデバイスおよび方法の各々の類似の、等価な、およびさらに黙示的なバリエーション、 i v) 開示され、記載されるとして示される機能の各々を達成する代替設計、 v) 開示され、記載されるものを達成するために黙示的であると示されている各機能を達成する代替の設計

および方法、v i) 別々のかつ独立した発明として示される各特徴、成分、および工程、v i i) 開示された様々なシステムまたは成分によって増強された適用、v i i i) このようなシステムまたは成分によって産生された得られた生成物、i x) 言及された任意の特異的フィールドまたはデバイスに現在適用されたとして示されまたは記載された各システム、方法、および要素、x) 本明細書上記に、および付随する実施例のいずれかを参照して実質的に記載される方法および装置、x i) 工程を実施するための手段を含む本明細書に記載の方法を実施するための装置、x i i) 開示される要素の各々の様々な組み合わせおよび順序、x i i i) 各潜在的な従属項または独立項の各々およびすべての1つに対する依存性としてのコンセプト、または提示されるコンセプト、およびx i v) 本明細書に記載されるすべての発明。

10

【0229】

請求項に関して、審査のために現在提示されるかまたは後で提示されるかに関わらず、実務的な理由のため、そして審査の負担の大きな拡大を回避するために、出願人は、任意の時点で最初の請求項のみを提示し、またはおそらく、最初の従属性のみを伴って、最初の請求項を提示してもよい。本出願または引き続き出願の潜在的な範囲に興味がある特許庁および第三者は、いかなる予備的補正、他の補正、請求項の文言、または提示される議論に関わらず、より広い請求項が、本件において、本件の利益を主張する案件において、またはいかなる継続出願においても、後の日付で提示されてもよく、従って、任意の案件の係属の間、いかなる潜在的な内容も請求から外し、または断念する意図はないことを理解するべきである。より広い請求項が提示されるならば、または提示される時、このよう

20

のようなものは、本出願または任意の引き続き出願において提示されたいかなる補正、請求項の文言、または議論がこのような先行技術を回避するように行われたと見なされた程度まで、このような理由は後で提示される請求項などによって除外されてもよいから、いかなる先行する時点で考慮され得るいかなる関連する先行技術も、再検討する必要はないということ

30

を要求してもよいことが理解されるべきである。既存のまたはより後での潜在的な適用範囲、または潜在的な適用範囲の請求から外すことまたは断念することのいかなる可能性も任意の時点で存在したか否かの考慮に興味がある審査官と、さもなくば任意の人の両方が、このような断念または請求から外すことは、本出願または任意の続く出願において、さらに意図されず、またはさらに存在することはないことに気付くべきである。H a k i m v . C a n n o n A v e n t G r o u p , P L C , 4 7 9 F . 3 d 1 3 1 3 (F e d . C i r 2 0 0 7) などの

40

において提起されたような限定は、このことまたはいかなる引き続き関連する問題においても明確に意図されない。加えて、サポートは、任意の他の独立請求項またはコンセプトの下での従属性または要素として、1つの独立項またはコンセプトの下で提示される様々な従属性または他の要素のいずれかの追加を許容するために、新規事項に関する法律 - ヨーロッパ特許条約第123条(2)および米国特許法第132条または他のこのような法律を含むがこれらに限定されない - の下で要求される程度まで存在することが理解されるべきである。本出願においてまたはいずれかの引き続き出願に関わらず任意の時点で任意の請求項を作成する際に、出願人は、法的に利用可能なように、十分かつ広い適用範囲をとらえることを意図してきたこともまた理解されるべきである。実体のない置き換えが行われる程度まで、出願人が実際に任意の特定の

40

実施形態を文字通り包含するように任意の請求項を作成しなかった程度まで、およびさもなくば適用可能な程度まで、出願人は、このような網羅を断念することを意図するか、または実際に断念してきたことを理解するべきではない。なぜなら、出願人は、すべての事態を予期することは可能でないかもしれないからである。当業者は、このような代替の実施形態を文字通り包含した請求項を作成することを合理的に予測するはずがない。

20

30

40

【0230】

さらに、使用されるならば、または使用される時、移行句「含む」の使用は、従来の請求項の解釈に従うと、本明細書で「オープンエンド」請求項を維持するために使用される。従って、文脈が逆のことを要求しない限り、「含む」という用語または「含み」または「含むこと」などのバリエーションは、1つの言及された要素もしくは工程、または

50

要素もしくは工程の群を含めることを暗示することを意図しているが、任意の他の要素もしくは工程または要素もしくは工程の群の除外を意図しているわけではないことが理解されるべきである。このような用語は、それらの最も広い型で解釈されるべきであり、法的に許容可能な最も広い適用範囲を出願人に可能にする。各請求項は、「または任意の他の請求項」を含めるように補正されてもよく、このような補正は出願時の明細書によって完全にサポートされている。「または任意の他の請求項」という語句の使用は、任意の他の請求項、別の従属項など、別の独立項、以前に列挙された請求項、次に列挙される請求項などに依存している任意の請求項のためにサポートを提供するために使用されている。1つの明確な例として、請求項が「請求項20または任意の他の請求項」などに依存する場合、これは、もしも所望されかつ本開示の範囲内になおあるならば、これは、請求項1、請求項15、またはさらに請求項25（もしもこのようなものが存在する場合）に従属するよう再作成できる。この語句はまた、請求項における要素の任意の組み合わせについてのサポートを提供し、さらに、例えば、方法、装置、プロセスなどの請求項の組み合わせを用いて、特定の請求項の組み合わせについて、任意の所望の適切な先行の基礎を組み込むことが理解されるべきである。

10

【0231】

最後に、任意の時点で示される任意の請求項は、本発明のこの記載の一部として参照により本明細書に組み込まれ、組み込まれた請求項は「任意の他の請求項に従属」でき、そして出願人は、このような請求項のこのような組み込まれた内容のすべてまたは一部を、請求項のいずれかもしくはすべてまたはその任意の要素もしくは成分をサポートするためのさらなる記載として使用する権利を留保し、そして出願人は、本出願によって、またはそのいずれかの引き続く継続出願、分割出願、または一部継続出願によって追求される保護の対象を規定するために、または準拠する料金の減少の何らかの利益を得るため、または任意の国の特許法、規則、もしくは規定、または条約に準拠させるために、このような請求項の組み込まれた内容のいずれかもしくはすべてまたはその任意の要素もしくは成分を、必要に応じて、明細書から請求項まで移動させ、または逆に移動させる権利をさらに明白に留保し、そして参照により組み込まれるこのような内容は、いずれかの引き続く継続出願、その分割出願、または一部継続出願、またはそれに対するあらゆる再発行または延長を含む本出願全体の係属の間において生き残るはずである。

20

30

【 図 1 】

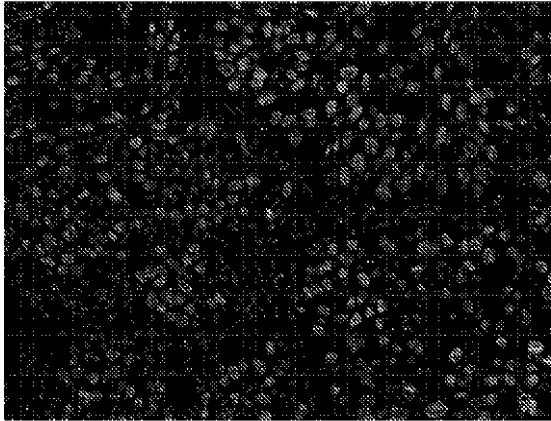


FIG. 1

【 図 2 】

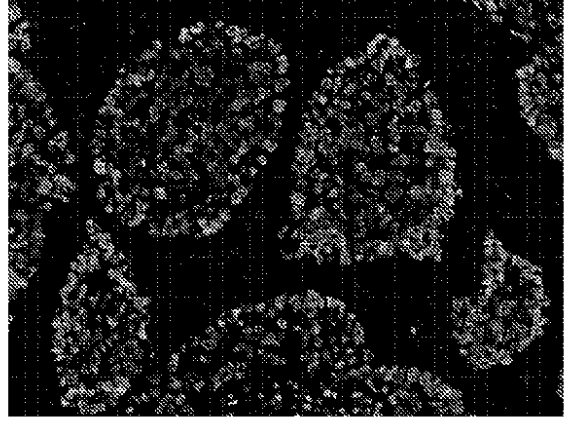


FIG. 2

【 図 3 】



FIG. 3

【 図 4 】

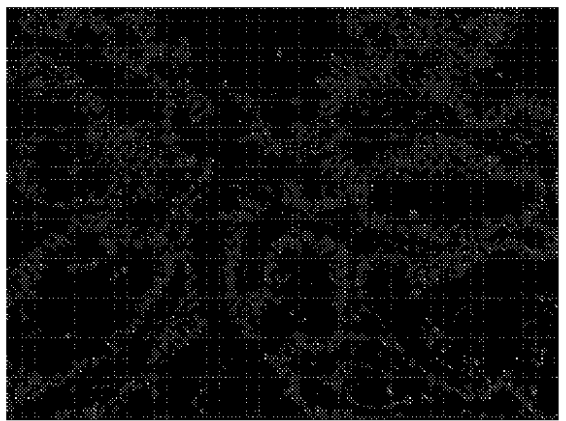


FIG. 4

【 図 5 】

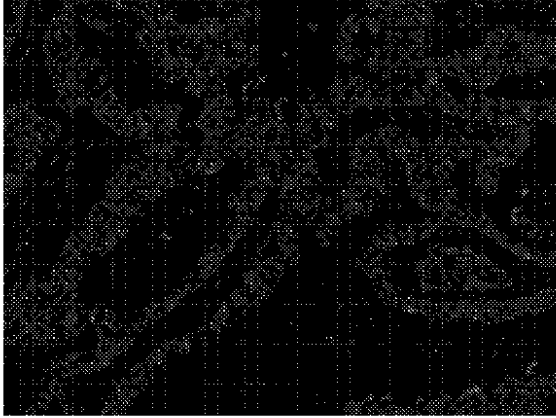


FIG. 5

【 図 6 】

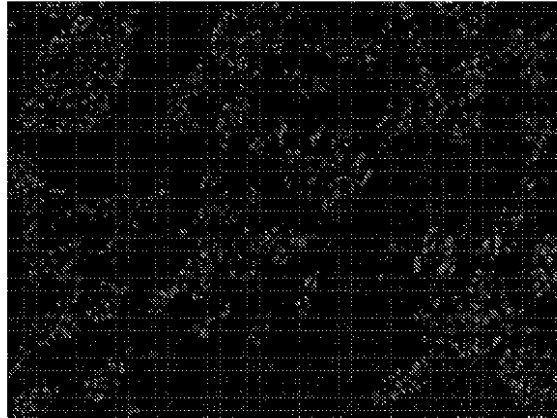


FIG. 6

【 図 7 】

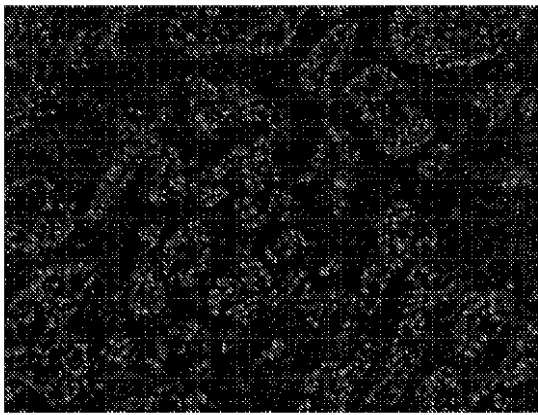


FIG. 7

【 図 8 】

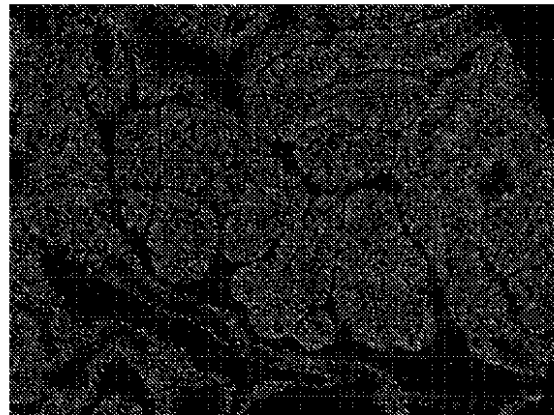


FIG. 8

【 図 9 】

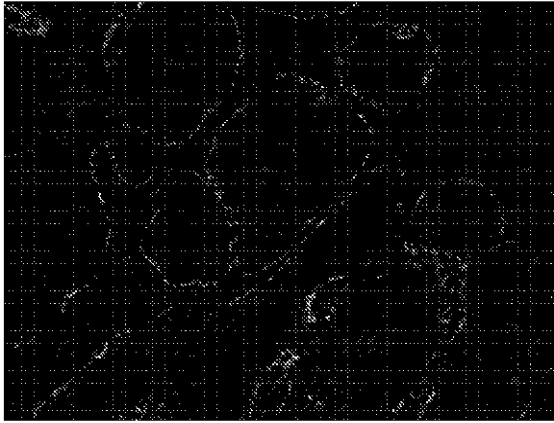


FIG. 9

【 図 1 0 】

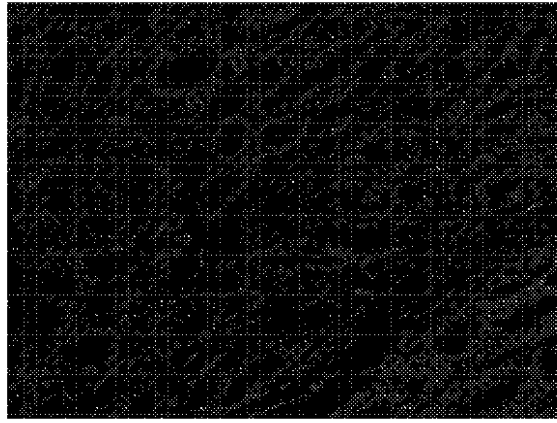


FIG. 10

【 図 1 1 】



FIG. 11

【 図 1 2 】



FIG. 12

【 図 1 3 】

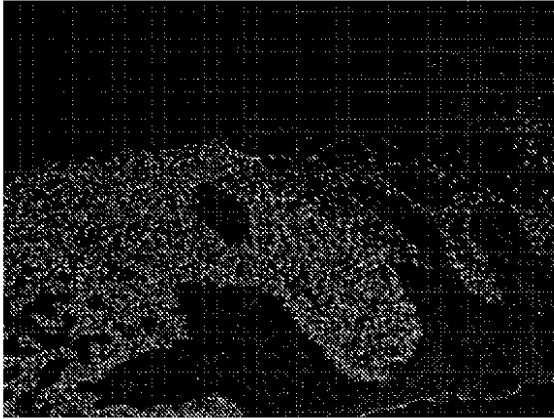


FIG. 13

【 図 1 4 】

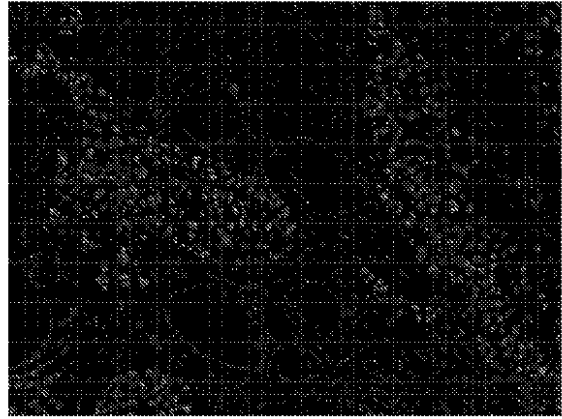


FIG. 14

【 図 1 5 】

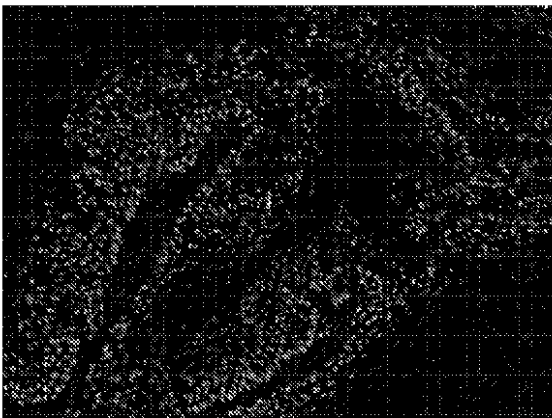


FIG. 15

【 図 1 6 】

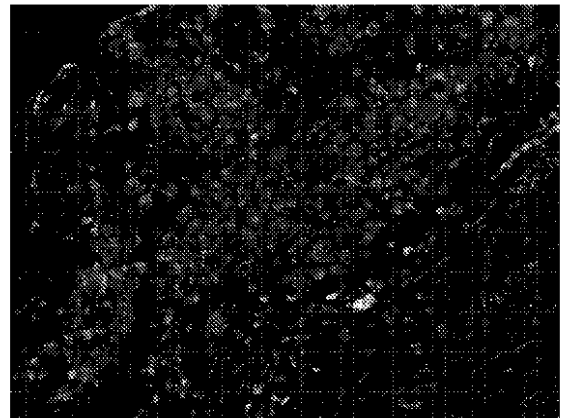


FIG. 16

【 図 1 7 】

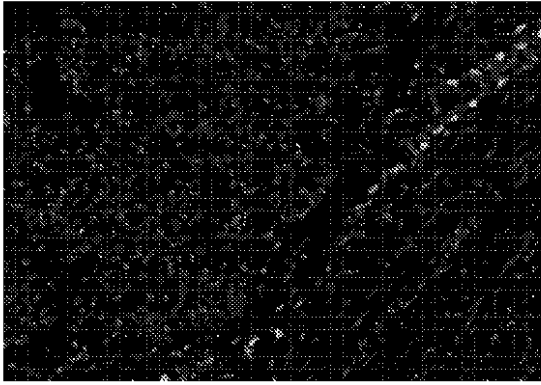


FIG. 17

【 図 1 8 】

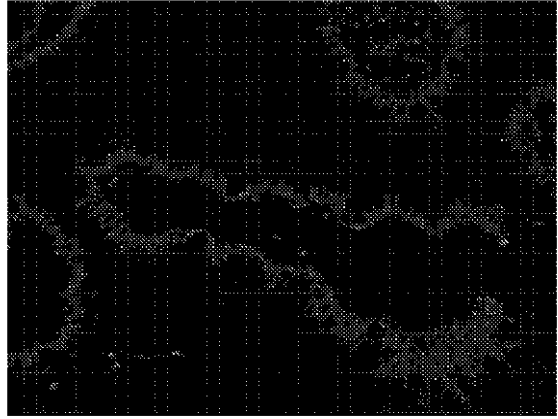


FIG. 18

【 図 1 9 】

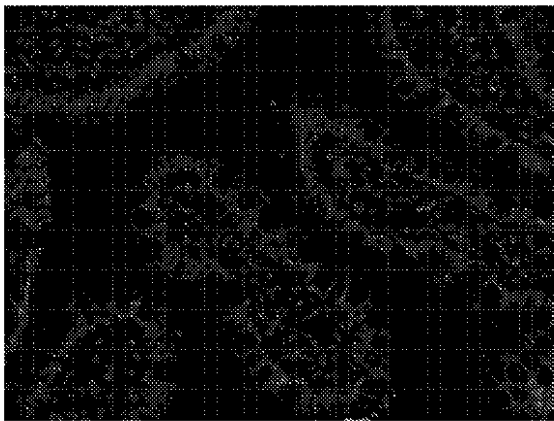


FIG. 19

【 図 2 0 】

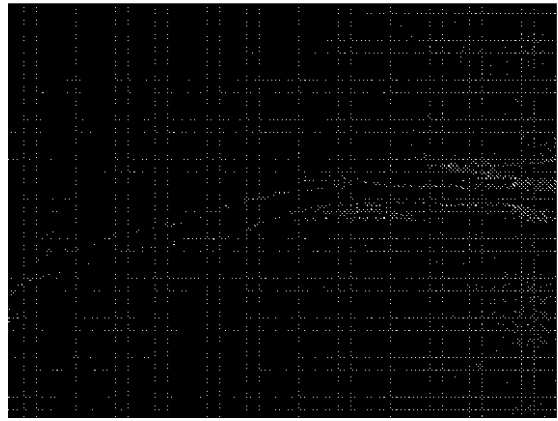


FIG. 20

【 図 2 1 】

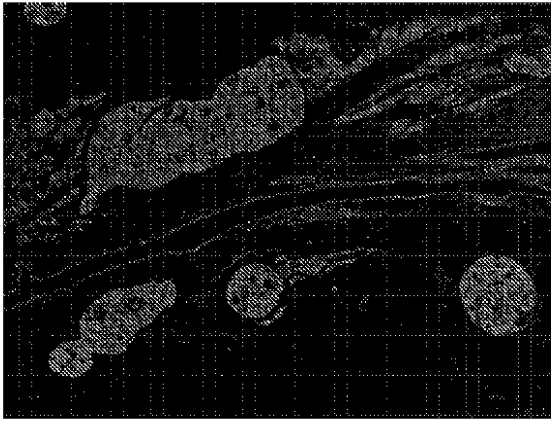


FIG. 21

【 図 2 2 】

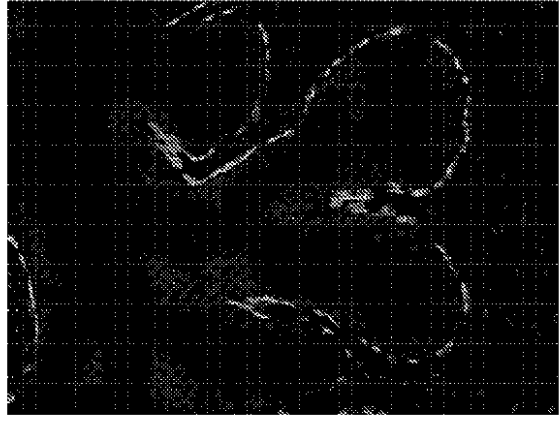


FIG. 22

【 図 2 3 】

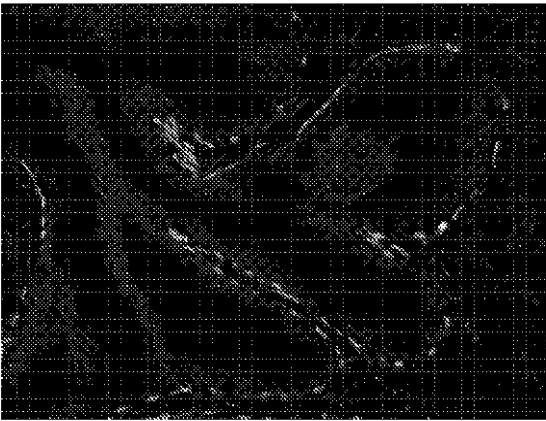


FIG. 23

【 図 2 4 】

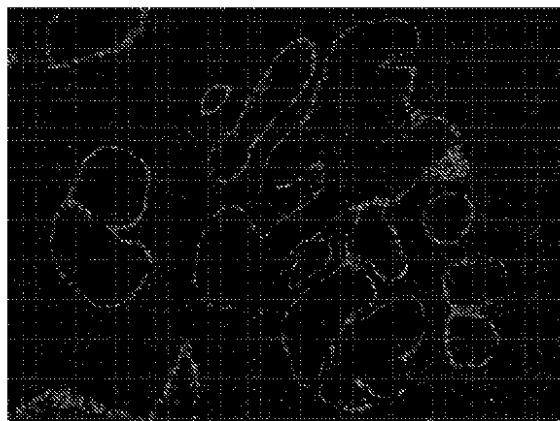


FIG. 24

【 図 2 5 】



FIG. 25

【 図 2 6 】



FIG. 26

【 図 2 7 】

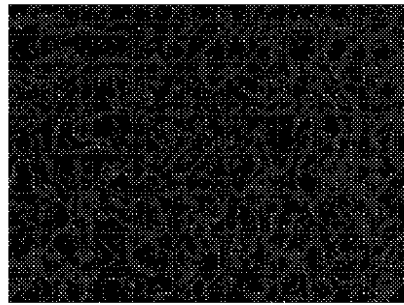


FIG. 27

【 図 2 8 】

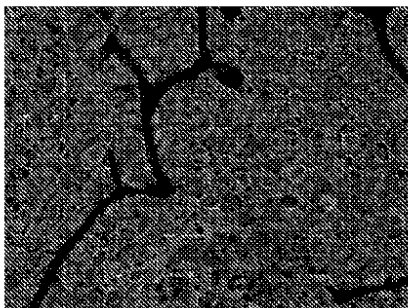


FIG. 28

【 図 3 0 】

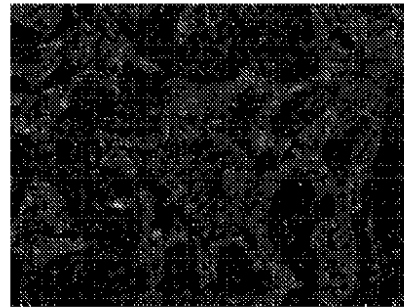


FIG. 30

【 図 2 9 】

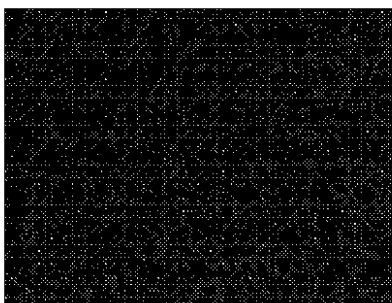


FIG. 29

【 図 3 1 】

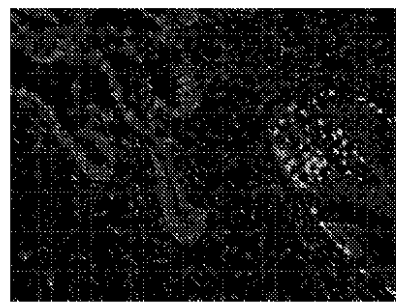


FIG. 31

【 図 3 2 】

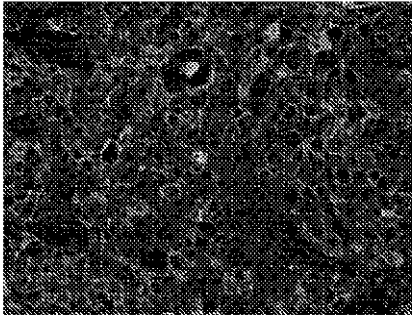


FIG. 32

【 図 3 4 】



FIG. 34

【 図 3 3 】

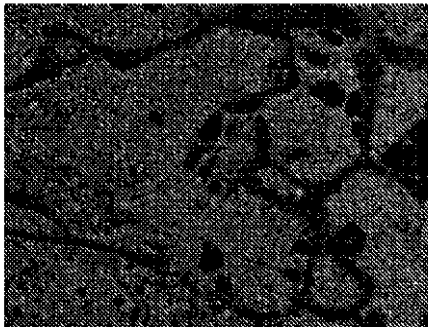


FIG. 33

【 図 3 5 】



FIG. 35

【 図 3 6 】

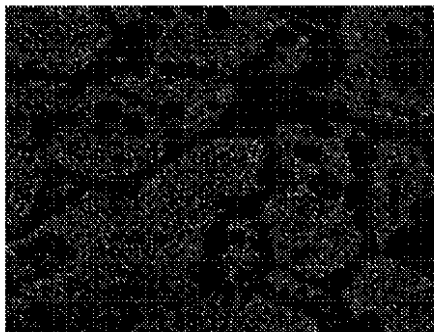


FIG. 36

【 図 3 7 】

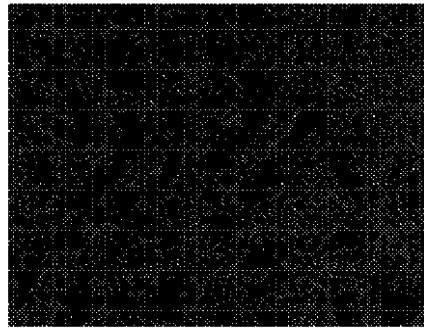


FIG. 37

【 図 3 8 】

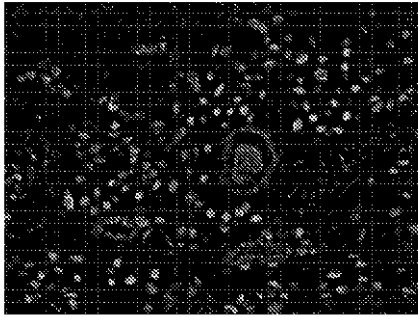


FIG. 38

【 図 4 0 】

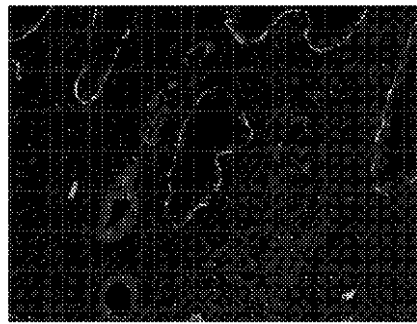


FIG. 40

【 図 3 9 】

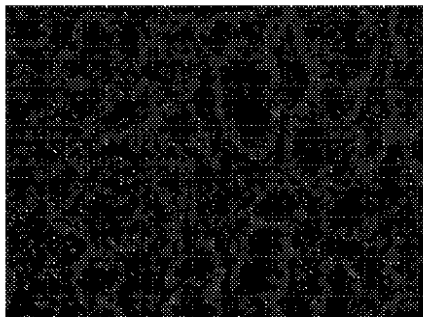


FIG. 39

【 図 4 1 】

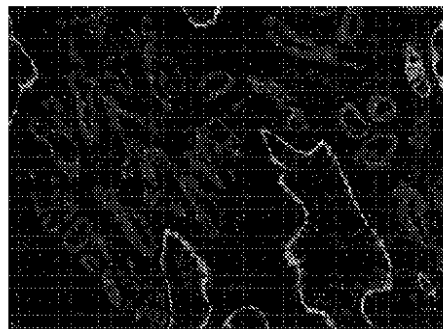


FIG. 41

【 図 4 3 】

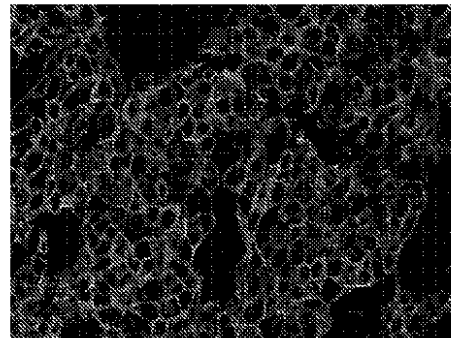


FIG. 43

【 図 4 2 】

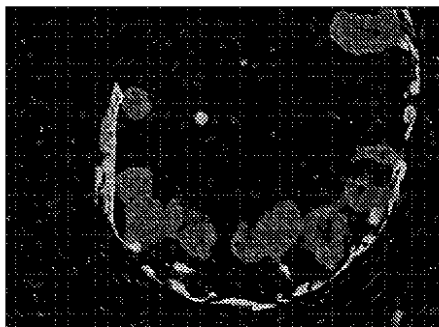


FIG. 42

【 図 4 4 】



FIG. 44

【 図 4 5 】



FIG. 45

【 図 4 6 】

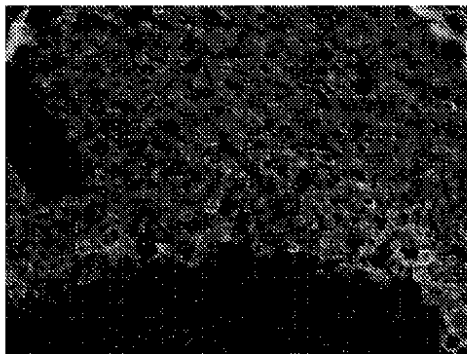


FIG. 46

【 図 4 7 】



FIG. 47

【 図 4 8 】

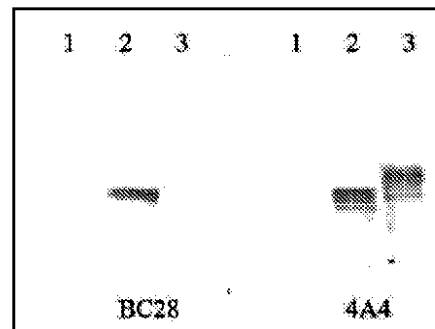


FIG. 48

【 図 49 】

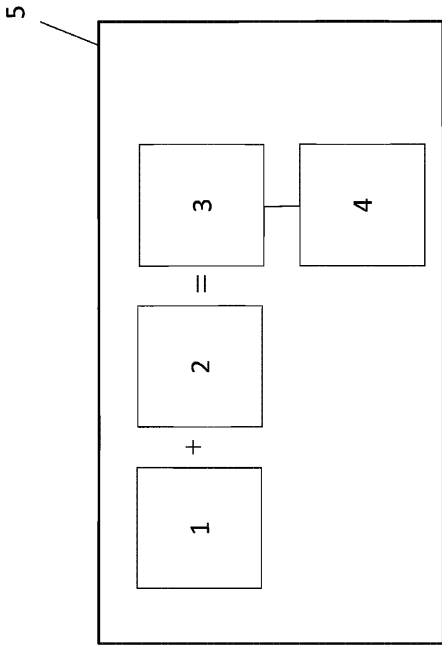


FIG. 49

【 図 50 】

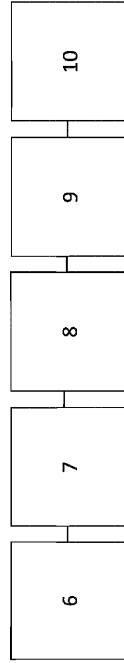


FIG. 50

【 図 51 】

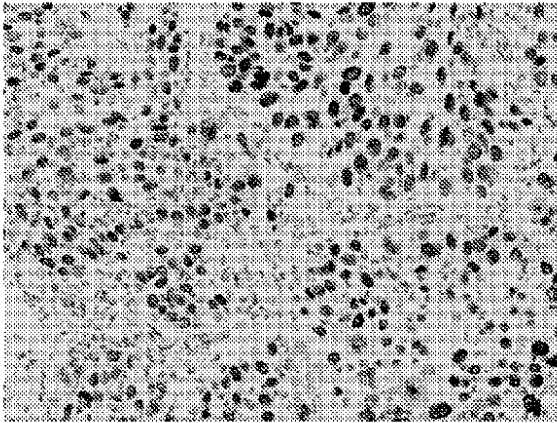


FIG. 51

【 図 52 】

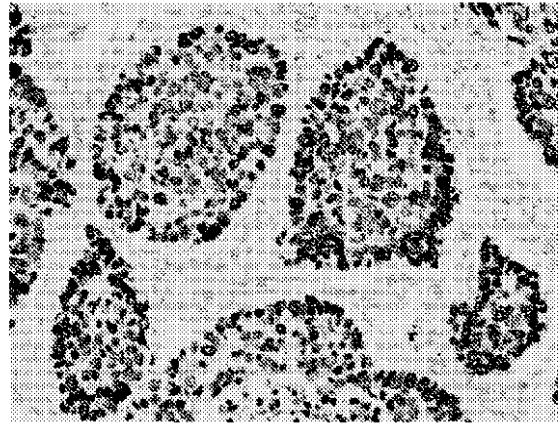


FIG. 52

【 図 5 3 】

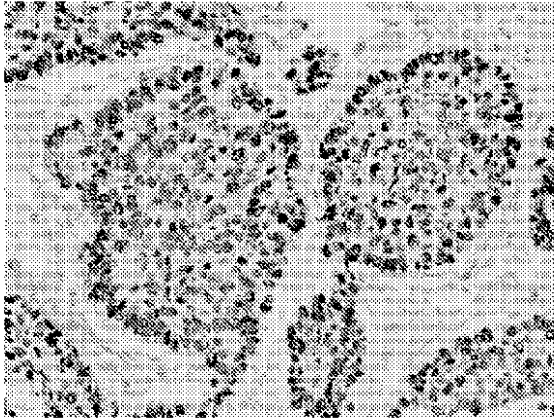


FIG. 53

【 図 5 4 】

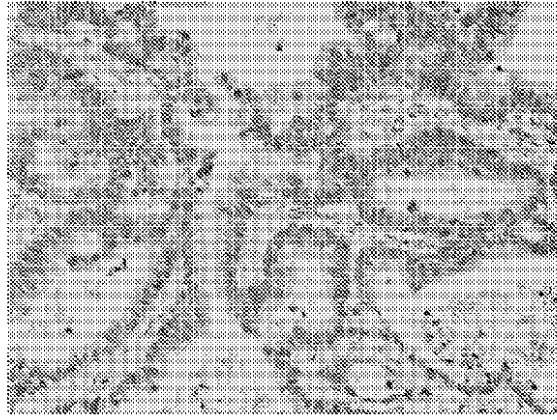


FIG. 54

【 図 5 5 】

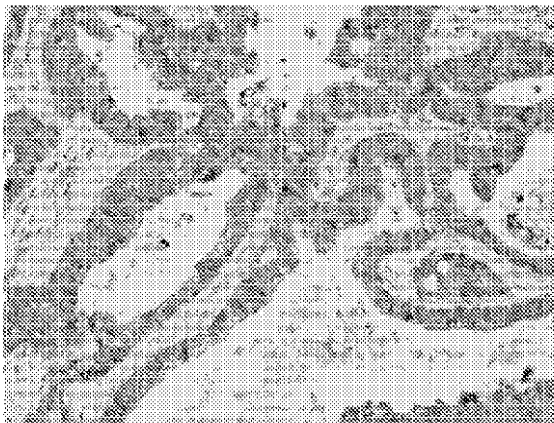


FIG. 55

【 図 5 6 】

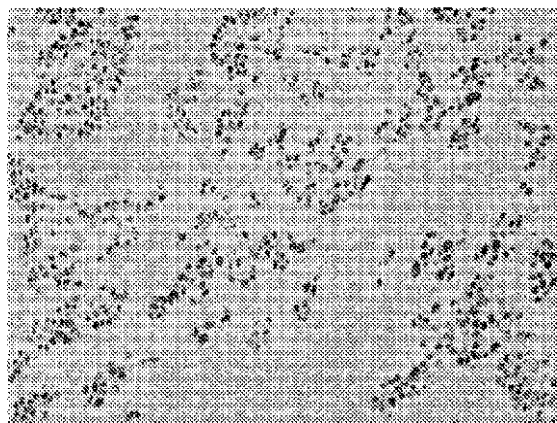


FIG. 56

【 図 5 7 】

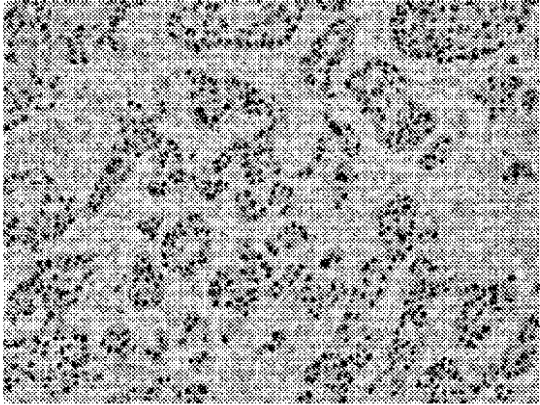


FIG. 57

【 図 5 8 】

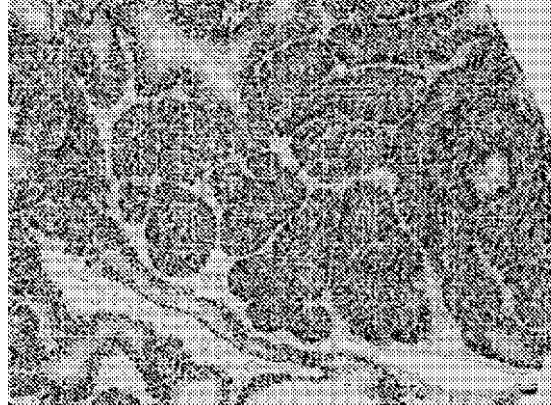


FIG. 58

【 図 5 9 】

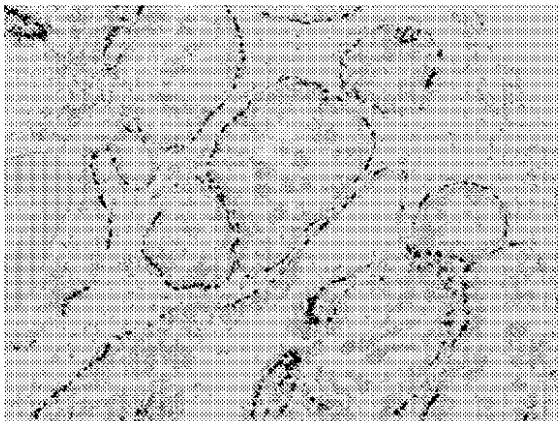


FIG. 59

【 図 6 0 】

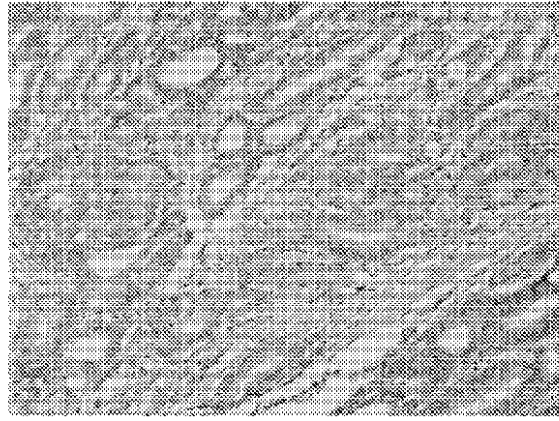


FIG. 60

【 図 6 1 】

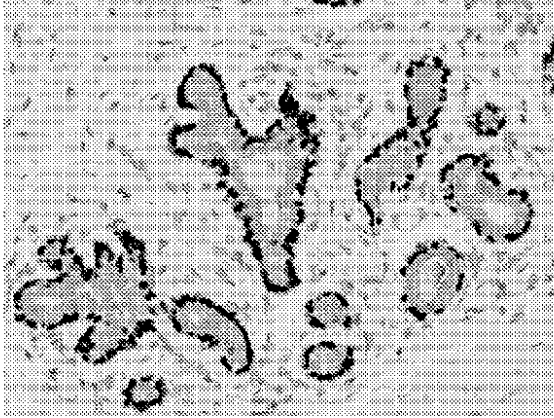


FIG. 61

【 図 6 2 】

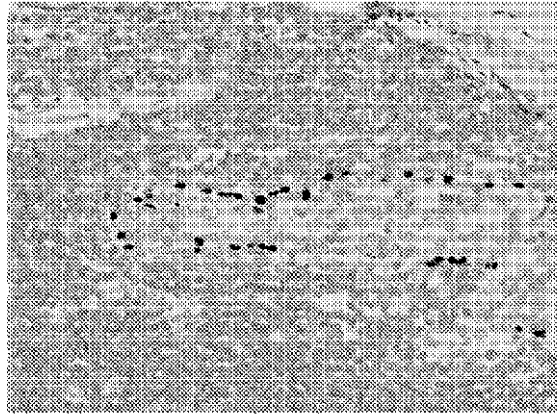


FIG. 62

【 図 6 3 】



FIG. 63

【 図 6 4 】

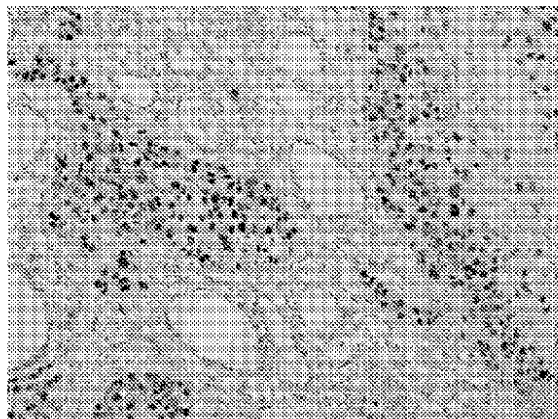


FIG. 64

【 図 6 5 】



FIG. 65

【 図 6 6 】

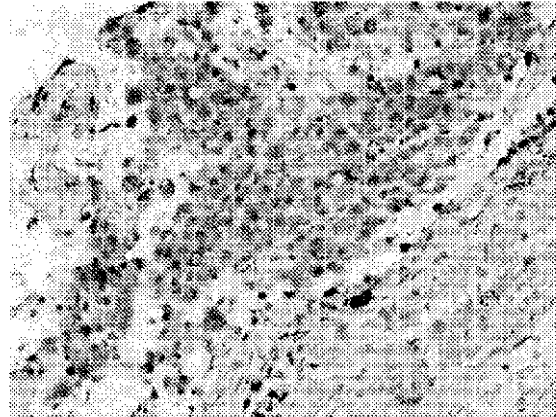


FIG. 66

【 図 6 7 】

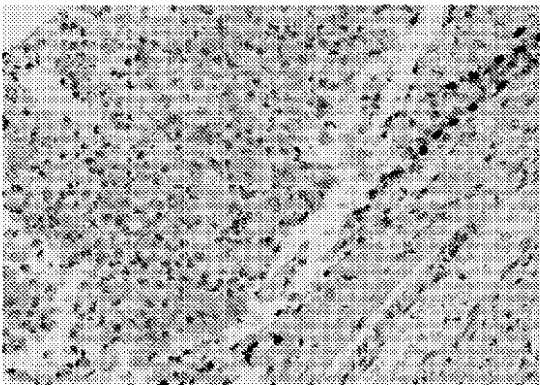


FIG. 67

【 図 6 8 】

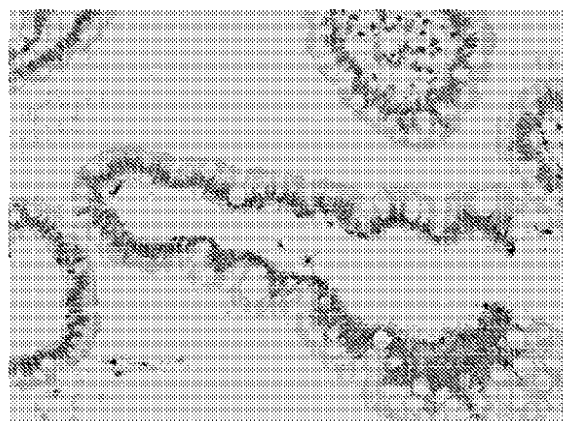


FIG. 68

【 図 6 9 】

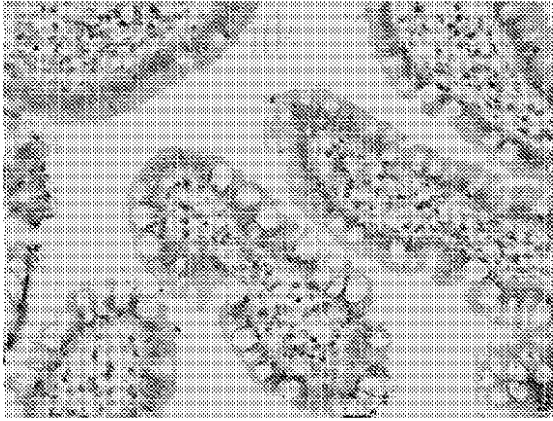


FIG. 69

【 図 7 0 】

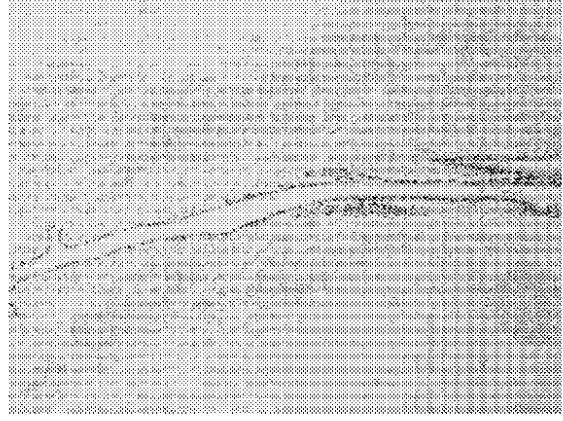


FIG. 70

【 図 7 1 】

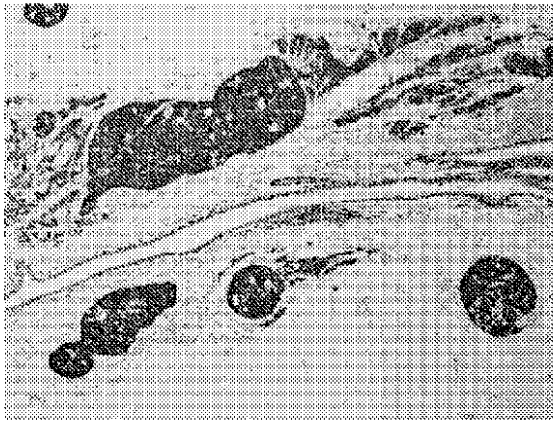


FIG. 71

【 図 7 2 】

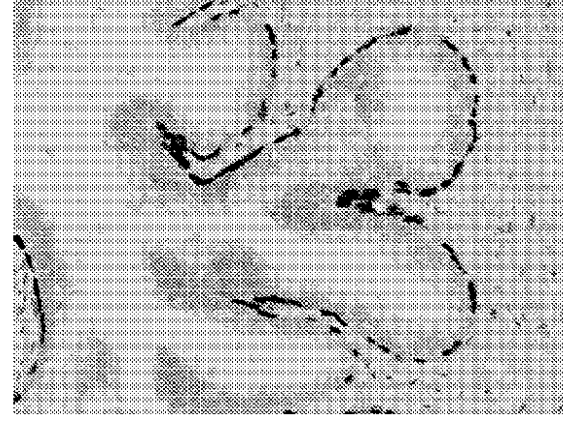


FIG. 72

【 図 7 3 】

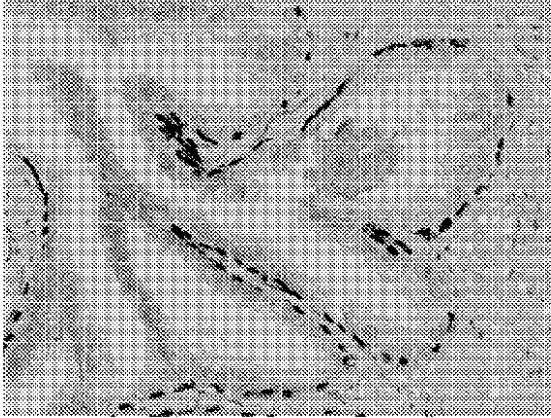


FIG. 73

【 図 7 4 】

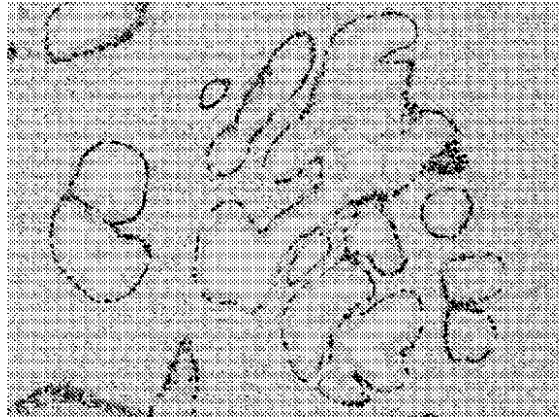


FIG. 74

【 図 7 5 】



FIG. 75

【 図 7 6 】

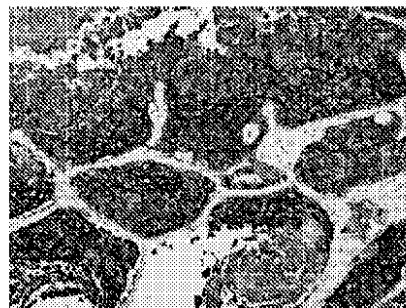


FIG. 76

【 図 7 7 】

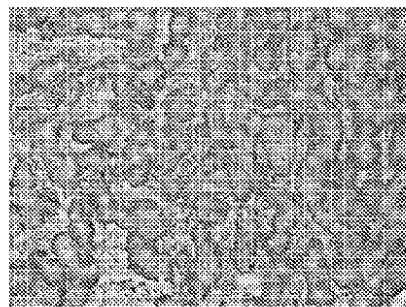


FIG. 77

【 図 7 8 】

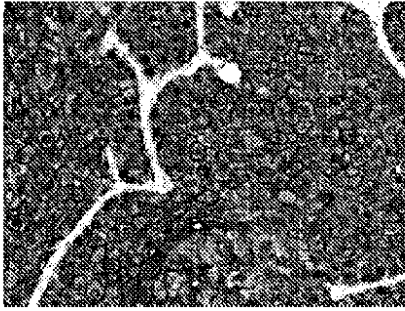


FIG. 78

【 図 8 0 】

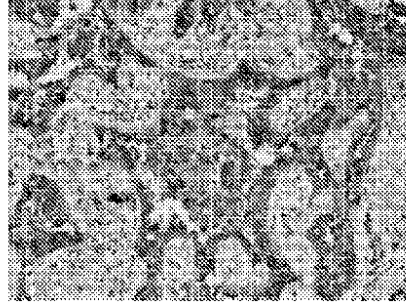


FIG. 80

【 図 7 9 】



FIG. 79

【 図 8 1 】

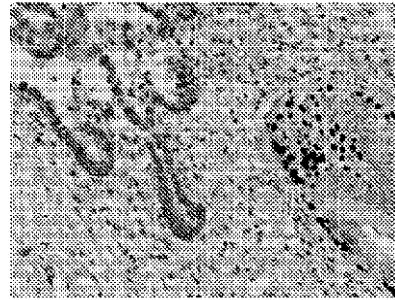


FIG. 81

【 図 8 2 】

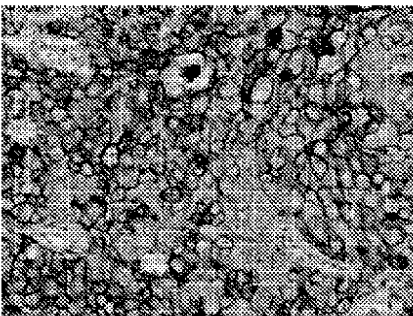


FIG. 82

【 図 8 4 】

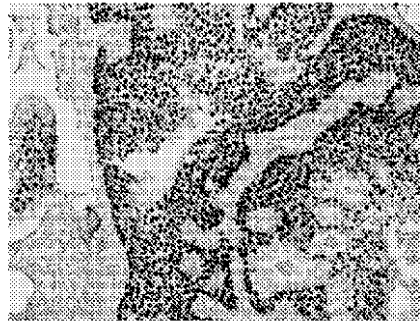


FIG. 84

【 図 8 3 】

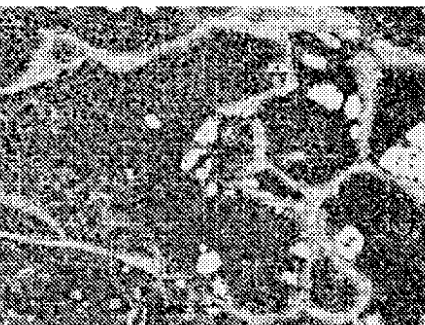


FIG. 83

【 図 8 5 】

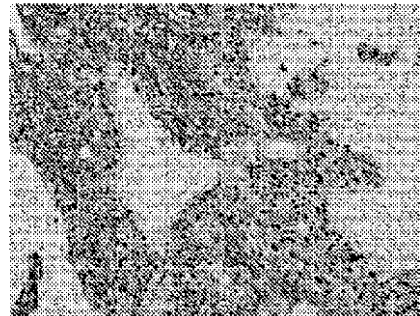


FIG. 85

【 図 8 6 】

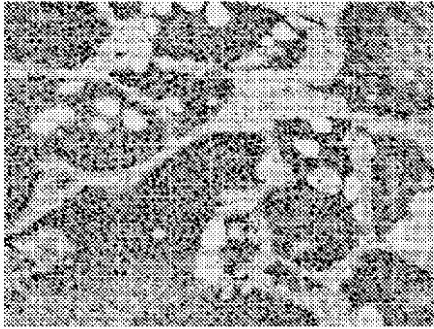


FIG. 86

【 図 8 7 】

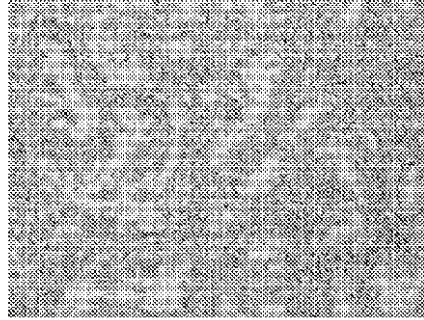


FIG. 87

【 図 8 8 】

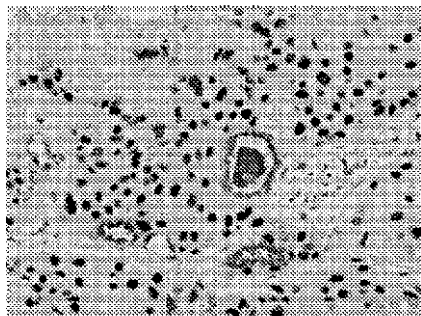


FIG. 88

【 図 9 0 】

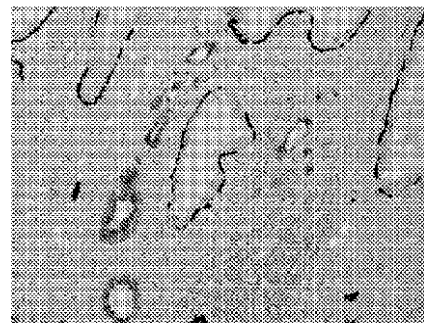


FIG. 90

【 図 8 9 】

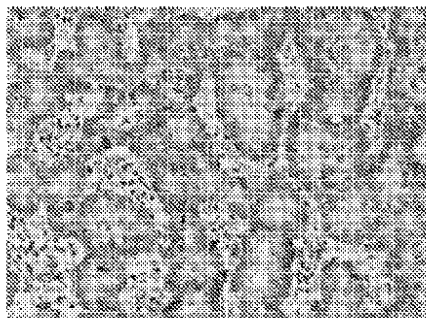


FIG. 89

【 図 9 1 】

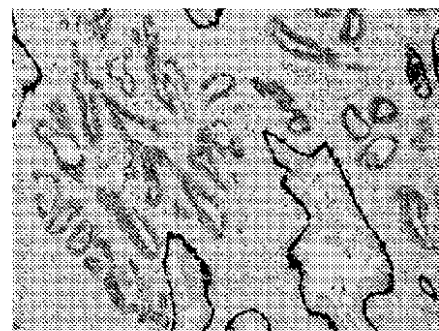


FIG. 91

【 図 9 2 】



FIG. 92

【 図 9 3 】

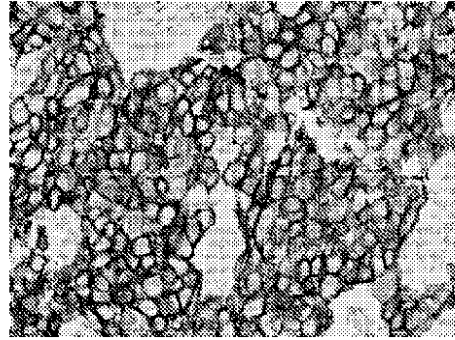


FIG. 93

【 図 9 4 】

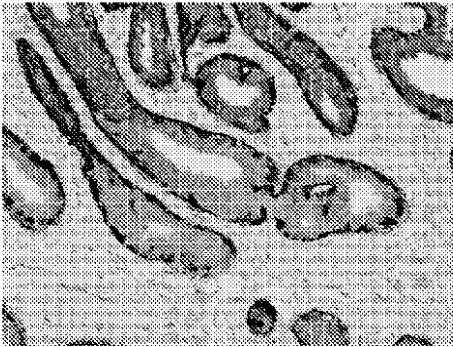


FIG. 94

【 図 9 5 】

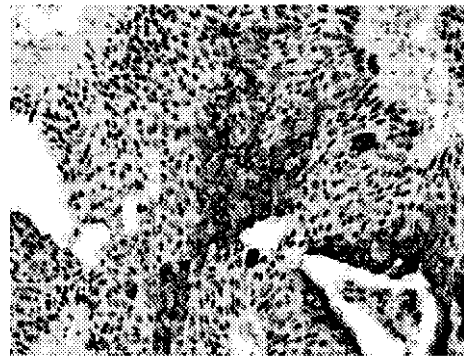


FIG. 95

【図 9 6】

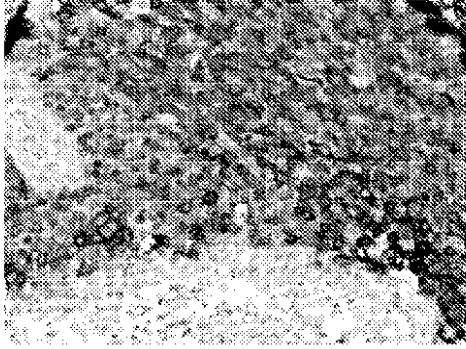


FIG. 96

【図 9 7】



FIG. 97

【図 9 8】

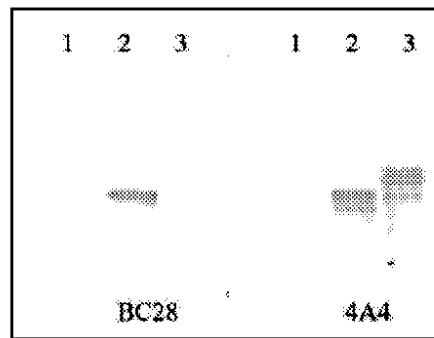


FIG. 98

【配列表】

2016516008000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成27年10月27日(2015.10.27)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2016516008000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US14/19705

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER	
IPC(B) - G01N 33/574; C12N 5/16, 5/22; A61K 39/395; C07K 16/28 (2014.01) USPC - 435/6.15, 7.1, 7.21, 7.23, 326, 330; 424/130.1; 530/300 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) IPC(B): G01N 33/574; C12N 5/07, 5/16, 5/22; A61K 39/395; C07H 21/02; C07K 16/28 (2014.01) USPC: 435/4, 6.15, 7.1, 7.2, 7.21, 7.23, 69.1, 71.1, 320.1, 326, 330; 424/130.1, 133.1; 536/23.1; 530/300	
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) MicroPatent (US-G, US-A, EP-A, EP-B, WO, JP-bib, DE-C-B, DE-A, DE-T, DE-U, GB-A, FR-A); Google; Google Scholar; PubMed; 'p40 (delta-swkrNp63)', 'antibody', 'antibody fragment', 'Biocare Medical', 'automated stainer', 'detect, cancer', 'predict recurrence'	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages
X — Y	US 6476206 B1 (SIDRANSKY, D et al.) November 05, 2002; figures 3, 6a; column 2, lines 6-10, 25-39; column 3, lines 38-39; column 7, lines 39-41; column 9, lines 7-15; column 9, lines 19-23; column 9, lines 26-34; column 9, lines 41-46; column 11, lines 10-22; column 11, lines 45-49; column 13, lines 51-52; column 14, lines 30-31; column 16, lines 49-53; Tables 1-2; column 18, lines 19-20; column 18, lines 29-32; column 18, line 61 to column 19, line 1; column 19, lines 4-9; column 19, lines 14-15; SEQ ID NO: 2, 18
	Relevant to claim No. 1, 2, 5, 6, 9, 10, 13/1, 13/2, 13/5, 13/6, 13/9, 13/10, 14/1, 14/2, 14/5, 14/6, 14/9, 14/10, 25, 54/25, 55/25, 56/55/25, 57/25, 60/57/25, 61/25, 62/61/25, 63/25, 71/25, 72/25, 73/25, 74/25, 75/25, 78/72/25, 81/25, 82/81/25, 83/81/25, 85/81/25, 88/81/25, 109/25, 110/109/25, 111/110/109/25, 112/109/25, 113 --- 3, 4, 7, 8, 11, 12, 13/3, 13/4, 13/7, 13/8, 13/11, 13/12, 14/3, 14/4, 14/7, 14/8, 14/11, 14/12, 27, 33-35, 38, 39, 54/47, 55/47, 56/55/47, 58/57/25, 59/58/57/25, 60/57/25, 64/25, 65/25, 66/25, 67/65/25, 68/66/25, 69/1-69/12, 69/25, ... Next Page ...
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>	
* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 12 May 2014 (12.05.2014)	Date of mailing of the international search report 23 MAY 2014
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US14/19705

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	... Continued from Previous Supplemental Page Continued from Previous Page ... 70/69/1-70/12, 70/69/25, 70/69/4/47, 75/47, 76/25, 77/72/25, 79/72/25, 80/72/25, 84/81/25, 85/81/26, 86/81/25, 87/81/25, 96-98
X — A	US 2009/0191190 A1 (BARGHORN, S et al.) April 08, 2014; abstract; paragraph [0103]; SEQ ID NO: 2, 4, 9, 11, 18, 20	15-22, 23/1, 23/22, 24/23/21, 24/23/22, 30, 36, 49/19, 49/20, 49/25, 49/26, 49/47, 50/15, 50/17, 50/25, 50/47, 51/15, 51/17, 51/25, 51/47, 52/15, 52/17, 53/15, 53/17, 54/15, 54/17, 55/15, 55/17, 56/55/15, 56/55/17, 57/15, 57/17, 57/19, 57/20, 58/57/15, 58/57/17, 58/57/19, 58/57/20, 59/58/57/15, 59/58/57/17, 59/58/19, 59/58/20, 60/57/15, 60/57/17, 60/57/19, 60/57/20, 61/15, 61/17, 61/19, 61/20, 62/61/15, 62/61/17, 62/61/19, 62/61/20, 63/15, 63/17, 63/19, 63/20, 64/15, 64/17, 64/19, 64/20, 65/15, 65/17, 65/19, 65/20, 66/15, 66/17, 66/19, 66/20, 67/65/15, 67/65/17, 67/19, 67/20, 68/66/15, 68/66/17, 68/66/19, 68/66/20, 69/15, 69/17, 69/19, 69/20, 70/69/15, 70/69/17, 70/69/19, 70/69/20, 71/15, 71/17, 71/19, 71/20, 72/15, 72/17, 72/19, 72/20, 73/15, 73/17, 73/19, 73/20, 74/15, 74/17, 74/19, 74/20, 75/15, 75/17, 75/19, 75/20, 76/15, 76/17, 76/19, 76/20, 77/72/15, 77/72/17, 77/72/19, 77/72/20, 78/72/15, 78/72/17, 78/72/19, 78/72/20, 79/72/15, 79/72/17, 79/72/19, 79/72/20, 80/72/15, 80/72/17, 80/72/19, 80/72/20, 81/15, 81/17, 81/19, 81/20, 82/81/15, 82/81/17, 82/81/19, 82/81/20, 83/81/15, 83/81/17, 83/81/19, 83/81/20, 84/81/15, 84/81/17, 84/81/19, 84/81/20, 85/81/15, 85/81/17, 85/81/19, 85/81/20, 86/81/15, 86/81/17, 86/81/19, 86/81/20, 87/81/15, ... Next Page ...

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US14/19705

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	... Continued from Previous Page Continued from Previous Page ... 87/81/17, 87/81/19, 87/81/20, 88/81/15, 88/81/17, 88/81/19, 88/81/20, 93, 95, 99, 109/15, 109/17, 109/19, 109/20, 110/109/15, 110/109/17, 110/109/19, 110/109/20, 111/110/109/15 111/110/109/17, 111/110/109/19, 111/110/109/20, 112/109/15, 112/109/17, 112/109/19, 112/109/20 — 31, 32, 52/25, 53/25, 53/47, 94, 95
X — Y — A	BROWN, AF. Tissue-Preserving Antibody Cocktails To Differentiate Primary Squamous Cell Carcinoma, Adenocarcinoma, And Small Cell Carcinoma Of Lung. Arch. Pathol. Lab. Med. Epub. 04 January 2013, Vol. 137, No. 9: pages 1274-1281; abstract; page 1276, column 1, paragraph 4 to column 2, paragraph; page 1276, column 2, paragraph 4; Tables 1-4; page 1279, column 1, paragraph 5 to page 1280, column 1, paragraphs 1, 3; figures 1-5.	26, 37, 40-46, 57/26, 58/57/26, 60/57/26, 61/26, 62/61/26, 63/26, 69/26, 70/69/26, 81/26, 82/81/26, 83/81/26, 84/81/26, 86/81/26, 87/81/26, 88/81/26, 89, 90, 92, 100-108, 109/26, 110/109/26, 111/110/109/26, 112/109/26 — 27-29, 33-35, 38, 39, 58/57/25, 59/58/57/26, 63/26, 64/26, 65/26, 66/26, 67/65/26, 68/66/26, 79/72/25, 79/72/47, 80/72/25, 80/72/47, 84/81/25, 85/81/26, 86/81/25, 86/81/26, 86/81/47, 87/81/25, 87/81/26, 87/81/47, 91, 96-98 31
Y	BISHOP, JA et al. P40 (delta-Np63) Is Superior To P63 For The Diagnosis Of Pulmonary Squamous Cell Carcinoma. Mod. Pathol. March 2012, Vol. 25, No. 3: pages 405-415; abstract; page 407, column 1, paragraph 1; page 407, column 1, paragraph 3 to column 2, paragraph 3; page 408, column 2, paragraph 2; page 409, column 1, paragraph 3 to column 2, paragraph 1; figure 4; Table 2.	28, 29, 47, 48, 54/57, 55/47, 56/55/47, 57/47, 58/57/47, 59/58/57/25, 59/58/57/26, 59/58/57/47, 60/57/47, 61/47, 62/61/47, 63/47, 64/47, 65/47, 66/47, 67/65/47, 68/66/47, 69/47, 72/47, 73/47, 74/47, 75/47, 76/47, 77/72/25, 77/72/47, 79/72/47, 80/72/47, 81/47, 82/81/47, 83/81/47, 84/81/47, 85/81/47, 86/81/47, 87/81/47, 88/81/47, 91 109/47, 110/109/47, 111/110/109/47, 112/109/47 ... Next Page ...

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US14/19705

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CHOPRA, N et al. Inducing Protective Antibodies Against Ring-Infected Erythrocyte Surface Peptide Antigen Of Plasmodium Falciparum Using Immunostimulating Complex (Iscoms) Delivery. Med Microbiol. Immunol. November 2000. Vol. 189, No. 2: pages 75-83; abstract; Table 2, pages 81, paragraph 3.	3, 4, 7, 8, 11, 12, 13/3, 13/4, 13/7, 13/8, 13/11, 13/12, 14/3, 14/4, 14/7, 14/8, 14/11, 14/12, 69/3, 69/4, 69/7, 69/8, 69/11, 69/12, 70/69/3, 70/69/4, 70/69/7, 70/69/11, 70/69/12
Y	CALBIOCHEM-NOVABIOCHEM. INTERNATIONAL. p40 (Ab-1) Cat# PC373 [datasheet]. U.S.A. 2000; page 1, column 1, paragraph 4.	61/47, 62/61/47
Y	ABCAM. Understanding Secondary Antibodies: Fragment Antigen Binding Antibodies And Isotopes. U.S.A. 2012; page 2, paragraph 3; page 2, Top figure; paragraph 3; page 4, paragraph 7.	64/26, 64/47
Y	BIOCARE MEDICAL. Double-Stain 2 [datasheet]. U.S.A. 02 March 2011; page 1, column 1, paragraph 6.	65/25, 66/25, 67/65/25, 68/66/25
Y	EP 2402370 A1 (JOUHANNEAUD, A) January 04, 2012; paragraphs [0001], [0167], [0168], [0175], [0176]	69/1-69/12, 69/25, 69/26, 69/47, 70/69/1-70/69/12, 70/69/25, 70/69/26, 70/69/47
Y	YAMAGUCHI, K. et al. Circulating Antibodies To P40AIS In The Sera Of Respiratory Tract Cancer Patients. Int. J. Cancer. 20 November 2000. Vol. 89, No. 6: pages 524-528; page 526, column 2, paragraph 2.	76/25, 76/47
Y	US 2006/0148063 A1 (FAUZZI, JA et al.) July 06, 2006; paragraphs [007], [0035], [0130], [09131]	84/81/25, 84/81/26, 84/81/47
Y	VAIDYANATHAN, P. Aperio-Definis Digital Pathology Solutions [Presentation]. July 7, 2011. Aperio Webinar. <http://www.aperio.com/sites/default/files/events/070611_Spectrum_Plus_ppt_for_webinar_on_Integration.pd>; page 4, paragraphs 2-3, page 2, paragraph 4; pages 7-8.	79/72/25, 79/72/47, 80/72/25, 80/72/47, 86/81/25, 86/81/26, 86/81/47, 87/81/25, 87/81/26, 87/81/47
A	US 8338576 B2 (PARALKAR, VM et al.) December 25, 2012; SEQ ID NO: 11	9, 20, 30-32, 50/25, 50/47, 51/25, 51/47, 52/25, 52/47, 53/47, 93-95
A	US 7674605 B2 (LIN, RH et al.) March 09, 2010; SEQ ID NO: 12	9, 20, 30-32, 50/25, 50/47, 51/25, 51/47, 52/25, 52/47, 53/47, 93-95

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
A 6 1 K 51/00 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	Y
A 6 1 K 49/00 (2006.01)	A 6 1 K 49/02	A
	A 6 1 K 49/00	A
	A 6 1 K 49/00	C

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, 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, LT, 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

(72) 発明者 タチャ, デイビッド

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 5 8 3, サン ラモン, ショー プレイス 7 3

(72) 発明者 チ, ウェイミン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 5 5 3, マルティネス, ディアブロ ウェイ 4 3 7

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA41 CA04 CA20 DA02 GA11 HA15
 4B063 QA01 QA19 QQ03 QQ79 QR48 QS33 QX02
 4B065 AA91X AB01 BA01 CA25 CA44 CA46
 4C085 HH03 HH07 HH11 KA03 KA27 KA28 KA29 KB82 LL18
 4H045 AA11 AA20 AA30 BA15 BA16 BA17 CA40 DA76 EA20 EA50
 FA74 GA26

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2016516008A5	公开(公告)日	2017-04-06
申请号	JP2015560386	申请日	2014-02-28
[标]申请(专利权)人(译)	保科医疗LLC		
申请(专利权)人(译)	保科医疗, 有限责任公司		
[标]发明人	タチャデイビッド チウェイミン		
发明人	タチャ, デイビッド チ, ウエイミン		
IPC分类号	C07K16/32 C12N15/09 C12N5/10 C12Q1/02 G01N33/574 G01N33/53 A61K51/00 A61K49/00		
CPC分类号	C07K16/18 C07K16/28 C07K16/32 C07K2317/21 C07K2317/24 C07K2317/34 C07K2317/565 G01N33/5017 G01N33/574 G01N33/57423 G01N33/57484 G01N33/57488 G01N33/577		
FI分类号	C07K16/32.ZNA C12N15/00.A C12N5/10 C12Q1/02 G01N33/574.A G01N33/53.D G01N33/53.Y A61K49/02.A A61K49/00.A A61K49/00.C		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA41 4B024/CA04 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/GA11 4B024/HA15 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QS33 4B063/QX02 4B065/AA91X 4B065/AB01 4B065/BA01 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/HH03 4C085/HH07 4C085/HH11 4C085/KA03 4C085/KA27 4C085/KA28 4C085/KA29 4C085/KB82 4C085/LL18 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA15 4H045/BA16 4H045/BA17 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA26		
代理人(译)	夏木森下 饭田TakashiSatoshi 石川大介 山本健作		
优先权	61/770956 2013-02-28 US		
其他公开文献	JP6445467B2 JP2016516008A		

摘要(译)

本发明涉及用于检测癌症的抗p40抗体, 试剂盒, 混合物和抗p40抗体。
本发明的一般实施方案可包括识别p40的单克隆抗体, 其制备方法, 免疫组织化学中的用途等。在实施方案中, 抗p40抗体克隆例如抗p40抗体克隆BC28可以通过用对应于人p40蛋白氨基酸子集的一种或多种肽免疫Balb / C小鼠来获得1-17。。。