

(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2009-544287

(P2009-544287A)

(43) 公表日 平成21年12月17日(2009.12.17)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G 0 4 5
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	4 B 0 2 4
A O 1 K 67/027 (2006.01)	A O 1 K 67/027	4 B 0 6 5
C 0 7 K 14/47 (2006.01)	C 0 7 K 14/47	4 C 0 8 4
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 B	4 C 0 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 93 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2009-521002 (P2009-521002)
 (86) (22) 出願日 平成19年7月19日 (2007.7.19)
 (85) 翻訳文提出日 平成21年3月5日 (2009.3.5)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2007/073895
 (87) 国際公開番号 W02008/011519
 (87) 国際公開日 平成20年1月24日 (2008.1.24)
 (31) 優先権主張番号 60/807,885
 (32) 優先日 平成18年7月20日 (2006.7.20)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/870,025
 (32) 優先日 平成18年12月14日 (2006.12.14)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

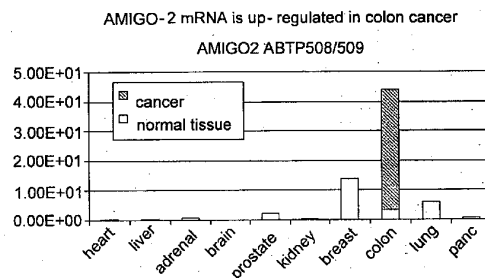
(71) 出願人 504389991
 ノバルティス アーゲー
 スイス国 ツェーハー 4002 バーゼル,
 リヒトシュトラッセ 35
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100062409
 弁理士 安村 高明
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (72) 発明者 ジャナトポー, メアリー ジェイ.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 946
 02-8097, エメリービル, ピー
 .オー. ボックス 8097

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌を処置、診断、または検出するための AM I G O - 2 インヒビター

(57) 【要約】

本発明は、とりわけ、癌を治療する方法、癌治療のための組成物、ならびに癌の診断および/または検出のための方法および組成物を提供する。特に、本発明は、AM I G O - 2 過剰発現に関連する癌の治療、診断、および検出のための組成物および方法を提供する。本発明の1つの態様では、AM I G O - 2 インヒビターおよび1つまたは複数の薬学的に許容可能なキャリアを含む組成物が提供され、このAM I G O - 2 インヒビターは、単離二本鎖RNA (dsRNA) などである。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

治療を必要とする患者における癌または癌の症状を治療する方法であって、治療有効量の AMIGO - 2 インヒビターを該患者に投与する工程を含み、該 AMIGO - 2 インヒビターは、

(a) シグナルペプチド、 LRRNT ドメイン、 LRR1 ドメイン、 LRR2 ドメイン、 LRR3 ドメイン、 LRR4 ドメイン、 LRR5 ドメイン、 LRR6 ドメイン、 LRRCT ドメイン、 Ig V - set ドメイン、および Ig ドメインからなる群より選択される AMIGO - 2 のドメイン中のエピトープに結合する抗体、

(b) 配列番号 7 ~ 16 からなる群より選択される配列の少なくとも 10 個の連続するヌクレオチドを含む単離オリゴヌクレオチド、

(c) 単離二本鎖 RNA (dsRNA)、

(d) 小分子、

(e) 模倣物、

(f) 可溶性受容体、ならびに

(g) デコイ

からなる群より選択される、方法。

【請求項 2】

前記 AMIGO - 2 インヒビターがコントロールと比較して AMIGO - 2 発現を少なくとも 20 % 阻害する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記 AMIGO - 2 インヒビターがコントロールと比較して少なくとも 20 % の癌細胞の細胞死を引き起こす、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記 AMIGO - 2 インヒビターがモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、単鎖抗体、または Fab フラグメントである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記抗体または Fab フラグメントが AMIGO - 2 の ECD 中の 1 つまたは複数のエピトープに結合する、請求項 87 に記載の方法。

【請求項 6】

前記抗体または Fab フラグメントが、本質的に配列番号 2 または配列番号 3 からなる配列中の 1 つまたは複数のエピトープに特異的に結合する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記抗体または Fab フラグメントが AMIGO - 2 の LRRNT ドメインの 1 つまたは複数のエピトープに特異的に結合する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記抗体または Fab フラグメントが AMIGO - 2 の LRR1 ドメインの 1 つまたは複数のエピトープに特異的に結合し、該エピトープが配列番号 30 および配列番号 57 からなる群より選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記抗体または Fab フラグメントが AMIGO - 2 の LRR2 ドメインの 1 つまたは複数のエピトープに特異的に結合し、該エピトープが配列番号 32、配列番号 39、および配列番号 61 からなる群より選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記抗体または Fab フラグメントが AMIGO - 2 の LRR3 ドメインの 1 つまたは複数のエピトープに特異的に結合し、該エピトープが配列番号 29、配列番号 39、配列番号 40、配列番号 56、および配列番号 58 からなる群より選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

10

20

30

40

50

前記抗体または F a b フラグメントが A M I G O - 2 の L R R 4 ドメインの 1 つまたは複数のエピトープに特異的に結合し、該エピトープが配列番号 2 6、配列番号 3 5、および配列番号 4 5 からなる群より選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 2】

前記抗体または F a b フラグメントが A M I G O - 2 の L R R 5 ドメインの 1 つまたは複数のエピトープに特異的に結合し、該エピトープが配列番号 2 5、配列番号 2 7、配列番号 3 6、および配列番号 5 3 からなる群より選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記抗体または F a b フラグメントが A M I G O - 2 の L R R 6 ドメインの 1 つまたは複数のエピトープに特異的に結合し、該エピトープが配列番号 3 1、配列番号 3 3、配列番号 4 1、配列番号 4 6、配列番号 4 7、および配列番号 6 2 からなる群より選択される、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 1 4】

前記抗体または F a b フラグメントが A M I G O - 2 の L R R C T ドメインの 1 つまたは複数のエピトープに特異的に結合し、該エピトープが配列番号 2 8、配列番号 3 4、配列番号 3 7、配列番号 3 8、配列番号 4 4、配列番号 4 9、配列番号 5 0、配列番号 5 1、配列番号 5 2、配列番号 5 4、配列番号 5 9、配列番号 6 0、および配列番号 6 2 からなる群より選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記抗体または F a b フラグメントが A M I G O - 2 の I g V - s e t ドメインの 1 つまたは複数のエピトープに特異的に結合する、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 1 6】

前記抗体または F a b フラグメントが A M I G O - 2 の I g ドメインの 1 つまたは複数のエピトープに特異的に結合する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記抗体または F a b フラグメントが A M I G O - 2 の E C D 中の 1 つまたは複数のエピトープに特異的に結合する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記抗体または F a b フラグメントが配列番号 3 ~ 6 および 2 5 ~ 6 2 からなる群より選択される 1 つまたは複数のエピトープに特異的に結合する、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 1 9】

前記患者が、肺癌、膀胱癌、腎臓癌、結腸癌、乳癌、子宮癌、卵巣癌、または膵臓癌を罹患しているか罹患しやすい、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記癌が肺癌または結腸癌である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記抗体または F a b フラグメントが、染色体安定性、腫瘍形成能、細胞増殖、細胞周期制御、癌細胞運動性、細胞接着、腫瘍形成、転移、A M I G O - 2 シグナル伝達、癌細胞生存、サイクリン産生、キナーゼ活性、基質リン酸化、足場非依存性増殖、A M I G O - 2 タンパク質の細胞膜への局在化、A M I G O - 2 と A M I G O - 1 または A M I G O - 3 の一方または両方との間の相互作用、細胞質リン酸化 A M I G O - 2 タンパク質レベル、腫瘍と間質組織との間の相互作用、および血管形成からなる群より選択される A M I G O - 2 活性を阻害する、請求項 4 に記載の方法。

40

【請求項 2 2】

前記抗体を標識する、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記標識が酵素、放射性同位体、毒素、またはフルオロフォアである、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記抗体が、A M I G O - 2 以外のポリペプチドに対して約 $1 \times 10^5 K_d$ 未満の結合

50

親和性を有する、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 25】

前記 AMIGO - 2 インヒビターが、配列番号 17 ~ 24 に記載の配列の少なくとも 19 個の連続するヌクレオチドを含む第 1 のヌクレオチド鎖、および該第 1 の鎖と実質的に相補的な配列を含む第 2 のヌクレオチド鎖を含む dsRNA 分子であり、該 dsRNA 分子が 3769 ヌクレオチド長未満である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 26】

前記 AMIGO - 2 インヒビターが、配列番号 7 ~ 16 に記載の配列の少なくとも 10 個の連続するヌクレオチドを含む単離核酸である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 27】

1 つまたは複数の化学療法、放射線療法、または手術での前記患者の治療をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 28】

前記癌の症状が、慢性咳、息切れの悪化、体重減少、過度の疲労、疼痛、喀血、血尿、無食欲、重度の発汗 (heavy sweating)、発熱、高血圧、貧血、下痢、便秘、血便、黄疸、めまい、脱力、悪寒、筋痙攣、深静脈血栓症、腹部膨隆、膨満感 (bloating)、月経不順、結腸転移、肺転移、膀胱転移、腎臓転移、乳房転移、子宮転移、卵巣転移、および膵臓転移からなる群より選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 29】

患者の AMIGO - 2 活性を調整する方法であって、該 AMIGO - 2 活性を調整するのに有効な量の AMIGO - 2 インヒビターを該患者に投与する工程を含み、該 AMIGO - 2 インヒビターが、

(a) シグナルペプチド、LRRNTドメイン、LRR1ドメイン、LRR2ドメイン、LRR3ドメイン、LRR4ドメイン、LRR5ドメイン、LRR6ドメイン、LRRCTドメイン、IgV-setドメイン、およびIgドメインからなる群より選択される AMIGO - 2 のドメイン中のエピトープに特異的に結合する抗体、

(b) 配列番号 7 ~ 16 からなる群より選択される配列の少なくとも 10 個の連続するヌクレオチドを含む単離オリゴヌクレオチド、

(c) 単離二本鎖 RNA (dsRNA)、

(d) 小分子、

(e) 模倣物、

(f) 可溶性受容体、ならびに

(g) デコイ

からなる群より選択される、方法。

【請求項 30】

前記 AMIGO - 2 活性が、染色体安定性、腫瘍形成能、細胞増殖、細胞周期制御、癌細胞運動性、細胞接着、腫瘍形成、転移、AMIGO - 2 シグナル伝達、AMIGO - 2 の下流マーカーの調整、癌細胞生存、サイクリン産生、キナーゼ活性、基質リン酸化、足場非依存性増殖、AMIGO - 2 タンパク質の細胞膜への局在化、AMIGO - 2 と AMIGO - 1 または AMIGO - 3 の一方または両方との間の相互作用、細胞質リン酸化 AMIGO - 2 タンパク質レベル、腫瘍と間質組織との間の相互作用、および血管形成からなる群より選択される、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

前記 AMIGO - 2 インヒビターが、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、単鎖抗体、または Fab フラグメントである、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 32】

AMIGO - 2 療法に感受性を示す患者を同定する方法であって、

(a) サンプル中の AMIGO - 2 発現の証拠の存在または非存在を検出する工程であって、該サンプル中の AMIGO - 2 発現の証拠の存在が、AMIGO - 2 療法の候補で

10

20

30

40

50

ある患者を示し、該サンプル中の A M I G O - 2 発現の証拠の非存在が A M I G O - 2 療法の候補ではない患者を示す、工程、

(b) 該患者が A M I G O - 2 療法の候補である場合、治療有効量の以下、すなわち

(1) シグナルペプチド、L R R N T ドメイン、L R R 1 ドメイン、L R R 2 ドメイン、L R R 3 ドメイン、L R R 4 ドメイン、L R R 5 ドメイン、L R R 6 ドメイン、L R R C T ドメイン、I g V - s e t ドメイン、および I g ドメインからなる群より選択される、A M I G O - 2 のドメイン中のエピトープに結合する抗体、

(2) 配列番号 7 ~ 1 6 からなる群より選択される配列の少なくとも 1 0 個の連続するヌクレオチドを含む単離オリゴヌクレオチド、

(3) 単離二本鎖 R N A (d s R N A)、

(4) 小分子、

(5) 模倣物、

(6) 可溶性受容体、ならびに

(7) デコイ

からなる群より選択されるインヒビターを該患者に投与する工程、

(c) 該患者が A M I G O - 2 療法の候補でない場合、該患者に伝統的な癌療法薬を投与する工程

を含む、方法。

【請求項 3 3】

前記 A M I G O - 2 発現がコントロールと比較して少なくとも 2 0 % 増加する、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 4】

A M I G O - 2 発現の証拠を A M I G O - 2 R N A レベルの測定によって検出する、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 5】

A M I G O - 2 発現の証拠を A M I G O - 2 ポリペプチドレベルの測定によって検出する、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記患者が、1 つまたは複数の肺癌、膀胱癌、腎臓癌、結腸癌、乳癌、子宮癌、卵巣癌、または膵臓癌を罹患しているか罹患しやすい、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 7】

癌細胞の成長を阻害する方法であって、該癌細胞を、コントロールと比較して少なくとも 2 0 % 該細胞の成長を阻害するのに有効な量の A M I G O - 2 インヒビターと接触させる工程を含み、該インヒビターが、

(a) シグナルペプチド、L R R N T ドメイン、L R R 1 ドメイン、L R R 2 ドメイン、L R R 3 ドメイン、L R R 4 ドメイン、L R R 5 ドメイン、L R R 6 ドメイン、L R R C T ドメイン、I g V - s e t ドメイン、および I g ドメインからなる群より選択される A M I G O - 2 のドメイン中のエピトープに結合する抗体、

(b) 配列番号 7 ~ 1 6 からなる群より選択される配列の少なくとも 1 0 個の連続するヌクレオチドを含む単離オリゴヌクレオチド、

(c) 単離二本鎖 R N A (d s R N A)、

(d) 小分子、

(e) 模倣物、

(f) 可溶性受容体、ならびに

(g) デコイ

からなる群より選択される、方法。

【請求項 3 8】

前記癌細胞が癌患者中に存在するか該癌患者に由来する、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記 A M I G O - 2 インヒビターが、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメ

10

20

30

40

50

ラ抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、単鎖抗体、またはF a bフラグメントである、請求項37に記載の方法。

【請求項40】

阻害する必要がある患者における癌細胞表現型を阻害する方法であって、該方法は、治療有効量の以下、すなわち

(a) シグナルペプチド、LRRNTドメイン、LRR1ドメイン、LRR2ドメイン、LRR3ドメイン、LRR4ドメイン、LRR5ドメイン、LRR6ドメイン、LRRCTドメイン、I g V - s e tドメイン、およびI gドメインからなる群より選択されるAMIGO-2のドメイン中のエピトープに結合する抗体、

(b) 配列番号7~16からなる群より選択される配列の少なくとも10個の連続するヌクレオチドを含む単離オリゴヌクレオチド、

(c) 単離二本鎖RNA(dsRNA)、

(d) 小分子、

(e) 模倣物、

(f) 可溶性受容体、ならびに

(g) デコイ

からなる群より選択されるAMIGO-2インヒビターを該患者に投与する工程を含む、方法。

【請求項41】

前記癌細胞表現型が、1つまたは複数の、コラーゲン中の細胞運動性、腫瘍形成能、足場非依存性様式で成長する能力、細胞生存、または細胞接着である、請求項40に記載の方法。

【請求項42】

前記癌細胞が、肺癌細胞、膀胱癌細胞、腎臓癌細胞、結腸癌細胞、乳癌細胞、子宮癌細胞、卵巣癌細胞、および膵臓癌細胞からなる群より選択される、請求項40に記載の方法。

【請求項43】

癌細胞の成長を阻害する方法であって、AMIGO-2を発現する1つまたは複数の細胞を含む癌を有する患者に1つまたは複数のAMIGO-2の下流マーカーを調整する化合物を投与する工程を含む、方法。

【請求項44】

前記1つまたは複数のAMIGO-2の下流マーカーが、c-MYC、c-Jun、FosL1、および細胞外シグナル制御キナーゼ(ERK)からなる群より選択される、請求項43に記載の方法。

【請求項45】

前記ERKがリン酸化ERKである、請求項44に記載の方法。

【請求項46】

患者中の腫瘍を検出するための方法であって、画像化剤に連結したAMIGO-2インヒビターを含む組成物を該患者に投与する工程、および該患者中の該画像化剤の局在化を検出する工程を含み、該インヒビターが、

(a) シグナルペプチド、LRRNTドメイン、LRR1ドメイン、LRR2ドメイン、LRR3ドメイン、LRR4ドメイン、LRR5ドメイン、LRR6ドメイン、LRRCTドメイン、I g V - s e tドメイン、およびI gドメインからなる群より選択されるAMIGO-2のドメイン中のエピトープに結合する抗体、

(b) 配列番号7~16からなる群より選択される配列の少なくとも10個の連続するヌクレオチドを含む単離オリゴヌクレオチド、

(c) 単離二本鎖RNA(dsRNA)、

(d) 小分子、

(e) 模倣物、

(f) 可溶性受容体、ならびに

10

20

30

40

50

(g) デコイ

からなる群より選択される、方法。

【請求項47】

前記組成物が、画像化剤に抱合した AMIGO - 2 抗体を含む、請求項46に記載の方法。

【請求項48】

前記画像化剤が、¹⁸F、⁴³K、⁵²Fe、⁵⁷Co、⁶⁷Cu、⁶⁷Ga、⁷⁷Br、⁸⁷MSr、⁸⁶Y、⁹⁰Y、⁹⁹MTc、¹¹¹In、¹²³I、¹²⁵I、¹²⁷Cs、¹²⁹Cs、¹³¹I、¹³²I、¹⁹⁷Hg、²⁰³Pb、または²⁰⁶Bi である、請求項47に記載の方法。

10

【請求項49】

癌インヒビターを同定する方法であって、該癌はコントロールと比較した AMIGO - 2 の過剰発現によって特徴づけられ、該方法は、AMIGO - 2 を発現する細胞を候補化合物と接触させる工程、および AMIGO - 2 活性が調整されるかどうかを決定する工程を含み、該 AMIGO - 2 活性の調整が癌インヒビターを示す、方法。

【請求項50】

前記候補化合物が、癌細胞中の AMIGO - 2 活性を調整するが、非癌細胞中では調整しない、請求項49に記載の方法。

【請求項51】

癌インヒビターを同定する方法であって、該癌はコントロールと比較した AMIGO - 2 の過剰発現によって特徴づけられ、該方法は、AMIGO - 2 を発現する細胞を候補化合物および AMIGO - 2 リガンドと接触させる工程、および AMIGO - 2 の下流マーカーの活性が調整されるかどうかを決定する工程を含み、該下流マーカーの調整が癌インヒビターを示す、方法。

20

【請求項52】

前記下流マーカーが、サイクリンD1、サイクリンB1、c-Myc、c-Jun、FosL1、細胞外シグナル制御キナーゼ(ERK)、血管内皮成長因子(VEGF)、ウロキナーゼ、およびポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ1(PARP1)の発現の減少からなる群より選択される、請求項51に記載の方法。

【請求項53】

前記下流マーカーの活性が、ERKリン酸化の減少またはERK発現の減少である、請求項51に記載の方法。

30

【請求項54】

前記下流マーカーの活性がPARP1切断の増加である、請求項51に記載の方法。

【請求項55】

前記候補化合物および AMIGO - 2 リガンドが、癌細胞中の AMIGO - 2 の下流マーカーの調整を誘導するが、非癌細胞では誘導しない、請求項51に記載の方法。

【請求項56】

細胞毒性薬剤または診断薬剤を、AMIGO - 2 を発現する1つまたは複数の細胞に送達させる方法であって、該方法は、

40

(a) AMIGO - 2 ポリペプチドのエピトープに特異的に結合する精製抗体に抱合した該細胞毒性薬剤または該診断薬剤を提供する工程であって、該エピトープがシグナルペプチド、LRRNTドメイン、LRR1ドメイン、LRR2ドメイン、LRR3ドメイン、LRR4ドメイン、LRR5ドメイン、LRR6ドメイン、LRRCTドメイン、IgV-setドメイン、およびIgドメインからなる群より選択されるドメイン中に存在する、工程、および

(b) 該細胞を該抗体-薬剤抱合体または該フラグメント-薬剤抱合体に曝露する工程を含む、方法。

【請求項57】

癌患者を治療する方法であって、該方法は、

50

該患者由来の癌サンプル中の A M I G O - 2 発現をコントロールサンプル中の A M I G O - 2 発現と比較する工程、

(1) A M I G O - 2 発現が該コントロールサンプルと比較して該癌サンプル中で上方制御される場合、該患者を以下、すなわち

(a) シグナルペプチド、 L R R N T ドメイン、 L R R 1 ドメイン、 L R R 2 ドメイン、 L R R 3 ドメイン、 L R R 4 ドメイン、 L R R 5 ドメイン、 L R R 6 ドメイン、 L R R C T ドメイン、 I g V - s e t ドメイン、および I g ドメインからなる群より選択される A M I G O - 2 のドメイン中のエピトープに結合する抗体、

(b) 配列番号 7 ~ 1 6 からなる群より選択される配列の少なくとも 1 0 個の連続するヌクレオチドを含む単離オリゴヌクレオチド、

(c) 単離二本鎖 R N A (d s R N A)、

(d) 小分子、

(e) 模倣物、

(f) 可溶性受容体、ならびに

(g) デコイ

からなる群より選択されるインヒビターを含む組成物で処置する工程、および

(2) A M I G O - 2 発現が該コントロールサンプルと比較して該癌サンプル中で不変であるか下方制御される場合、二次アッセイを行う工程、を含む、方法。

【請求項 5 8】

前記二次アッセイが、インヒビターの存在下および非存在下での前記癌サンプル中の A M I G O - 2 下流マーカーのレベルまたは活性を比較する工程を含み、

(1) A M I G O - 2 インヒビターの存在下での該癌サンプル中の該 A M I G O - 2 下流マーカーのレベルまたは活性が該 A M I G O - 2 インヒビターの非存在下での該癌サンプル中の該 A M I G O - 2 下流マーカーのレベルまたは活性と比較して減少する場合、該患者を、以下、すなわち

(a) シグナルペプチド、 L R R N T ドメイン、 L R R 1 ドメイン、 L R R 2 ドメイン、 L R R 3 ドメイン、 L R R 4 ドメイン、 L R R 5 ドメイン、 L R R 6 ドメイン、 L R R C T ドメイン、 I g V - s e t ドメイン、および I g ドメインからなる群より選択される A M I G O - 2 のドメイン中のエピトープに結合する抗体、

(b) 配列番号 7 ~ 1 6 からなる群より選択される配列の少なくとも 1 0 個の連続するヌクレオチドを含む単離オリゴヌクレオチド、

(c) 単離二本鎖 R N A (d s R N A)、

(d) 小分子、

(e) 模倣物、

(f) 可溶性受容体、ならびに

(g) デコイ

からなる群より選択されるインヒビターを含む組成物で処置するか、

(2) A M I G O - 2 インヒビターの存在下での該癌サンプル中の該 A M I G O - 2 下流マーカーのレベルまたは活性が該 A M I G O - 2 インヒビターの非存在下での該癌サンプル中の該 A M I G O - 2 下流マーカーのレベルまたは活性と比較して不変であるか減少する場合、該患者を伝統的な癌療法薬で処置する工程を含む、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 5 9】

前記 A M I G O - 2 下流マーカーが、サイクリン D 1、サイクリン B 1、c - M y c、c - J u n、F o s L 1、V E G F、ウロキナーゼ、および E R K からなる群より選択される、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 6 0】

前記下流マーカーの活性が、E R K リン酸化または E R K 発現である、請求項 5 7 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 6 1】

前記下流 A M I G O - 2 マーカーの活性が減少する、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 6 2】

前記二次アッセイが、インヒビターの存在下および非存在下での前記癌サンプル中の P A R P 1 切断を比較する工程を含み、

(a) A M I G O - 2 インヒビターの存在下での該癌サンプル中の P A R P 1 切断が、該 A M I G O - 2 インヒビターの非存在下での該癌サンプル中の P A R P 1 切断と比較して増加する場合、前記患者を、以下、すなわち

(1) シグナルペプチド、L R R N T ドメイン、L R R 1 ドメイン、L R R 2 ドメイン、L R R 3 ドメイン、L R R 4 ドメイン、L R R 5 ドメイン、L R R 6 ドメイン、L R R C T ドメイン、I g V - s e t ドメイン、および I g ドメインからなる群より選択される A M I G O - 2 のドメイン中のエピトープに結合する抗体；

(2) 配列番号 7 ~ 1 6 からなる群より選択される配列の少なくとも 1 0 個の連続するヌクレオチドを含む単離オリゴヌクレオチド、

(3) 単離二本鎖 R N A (d s R N A)、

(4) 小分子、

(5) 模倣物、

(6) 可溶性受容体、ならびに

(7) デコイ

からなる群より選択されるインヒビターを含む組成物で処置するか、

(b) A M I G O - 2 インヒビターの存在下での該癌サンプル中の P A R P 1 切断が、該 A M I G O - 2 インヒビターの非存在下での該癌サンプル中の P A R P 1 切断と比較して増加するか不変である場合、該患者を伝統的な癌療法薬で処置する工程を含む、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 6 3】

患者の癌を診断する方法であって、候補癌細胞中の A M I G O - 2 局在化をアッセイする工程を含み、細胞膜に局在化した A M I G O - 2 の、細胞膜を含まない該癌細胞の他の領域に局在化した A M I G O - 2 に対する比が少なくとも 2 : 1 である場合、該患者は A M I G O - 2 関連癌を有すると診断する、方法。

【請求項 6 4】

前記細胞膜に局在化した A M I G O - 2 の、細胞膜を含まない前記癌細胞の他の領域に局在化した A M I G O - 2 に対する比が少なくとも 3 : 1 である、請求項 6 3 に記載の方法。

【請求項 6 5】

前記患者が A M I G O - 2 関連癌を有すると診断される場合、

(a) シグナルペプチド、L R R N T ドメイン、L R R 1 ドメイン、L R R 2 ドメイン、L R R 3 ドメイン、L R R 4 ドメイン、L R R 5 ドメイン、L R R 6 ドメイン、L R R C T ドメイン、I g V - s e t ドメイン、および I g ドメインからなる群より選択される A M I G O - 2 のドメイン中のエピトープに結合する抗体、

(b) 配列番号 7 ~ 1 6 からなる群より選択される配列の少なくとも 1 0 個の連続するヌクレオチドを含む単離オリゴヌクレオチド、

(c) 単離二本鎖 R N A (d s R N A)、

(d) 小分子、

(e) 模倣物、

(f) 可溶性受容体、ならびに

(g) デコイ

からなる群より選択されるインヒビターを含む組成物を該患者に投与する工程をさらに含む、請求項 6 3 に記載の方法。

【請求項 6 6】

A M I G O - 2 モジュレーターを同定する方法であって、候補化合物の存在下および非

10

20

30

40

50

存在下で A M I G O - 2 を発現する 1 つまたは複数の細胞を含むサンプルにおいて A M I G O - 2 のリン酸化を比較する工程を含み、該候補化合物の非存在下での該サンプル中の A M I G O - 2 のリン酸化と比較した該候補化合物の存在下での該サンプル中の A M I G O - 2 のリン酸化の調整が、該候補化合物が A M I G O - 2 モジュレーターであることを示す、方法。

【請求項 67】

A M I G O - 2 を、免疫沈降抗体を使用して前記サンプルから単離する、請求項 66 に記載の方法。

【請求項 68】

前記免疫沈降抗体は A M I G O - 2 ポリペプチドのエピトープに特異的に結合する抗体であり、該エピトープが、シグナルペプチド、LRRNTドメイン、LRR1ドメイン、LRR2ドメイン、LRR3ドメイン、LRR4ドメイン、LRR5ドメイン、LRR6ドメイン、LRRCTドメイン、I g V - s e t ドメイン、および I g ドメインからなる群より選択されるドメイン中に存在する、請求項 67 に記載の方法。

10

【請求項 69】

前記 A M I G O - 2 リン酸化がセリン/トレオニンリン酸化である、請求項 66 に記載の方法。

【請求項 70】

前記 A M I G O - 2 リン酸化を、ホスホセリン/トレオニン抗体を使用して決定する、請求項 66 に記載の方法。

20

【請求項 71】

前記免疫沈降抗体がホスホセリン/トレオニン抗体である、請求項 67 に記載の方法。

【請求項 72】

A M I G O - 2 インヒビターおよび 1 つまたは複数の薬学的に許容可能なキャリアを含む組成物であって、該 A M I G O - 2 インヒビターが、

(a) シグナルペプチド、LRRNTドメイン、LRR1ドメイン、LRR2ドメイン、LRR3ドメイン、LRR4ドメイン、LRR5ドメイン、LRR6ドメイン、LRRCTドメイン、I g V - s e t ドメイン、および I g ドメインからなる群より選択される A M I G O - 2 のドメイン中のエピトープに結合する抗体、

(b) 配列番号 7 ~ 16 からなる群より選択される配列の少なくとも 10 個の連続するヌクレオチドを含む単離オリゴヌクレオチド、

30

(c) 単離二本鎖 RNA (d s RNA)、

(d) 小分子、

(e) 模倣物、

(f) 可溶性受容体、ならびに

(g) デコイ

からなる群より選択される、組成物。

【請求項 73】

前記組成物が、染色体安定性、腫瘍形成能、細胞増殖、細胞周期制御、癌細胞運動性、細胞接着、腫瘍形成、転移、A M I G O - 2 シグナル伝達、癌細胞生存、サイクリン産生、キナーゼ活性、基質リン酸化、足場非依存性増殖、A M I G O - 2 タンパク質の細胞膜への局在化、A M I G O - 2 と A M I G O - 1 または A M I G O - 3 の一方または両方との間の相互作用、細胞質リン酸化 A M I G O - 2 タンパク質レベル、腫瘍と間質組織との間の相互作用、および血管形成からなる群より選択される少なくとも 1 つの A M I G O - 2 活性を阻害する、請求項 72 に記載の組成物。

40

【請求項 74】

前記組成物が、癌細胞中の少なくとも 1 つの細胞表現型を誘導するが、非癌細胞では誘導しない、請求項 72 に記載の組成物。

【請求項 75】

前記組成物が癌細胞生存を阻害するか、該組成物が A M I G O - 2 の細胞質リン酸化を

50

阻害するか、血管形成または細胞増殖、セリン/トレオニンキナーゼ活性を阻害するか、E r kリン酸化を阻害するか、c J u n、c M y c、またはF o s L 1発現を阻害するか、細胞周期のG 2 / M期への細胞分裂の進行を阻害する、請求項7 2に記載の組成物。

【請求項7 6】

前記組成物が滅菌注射液である、請求項7 2に記載の組成物。

【請求項7 7】

前記A M I G O - 2インヒビターがA M I G O - 2翻訳を阻害するか、A M I G O - 2 m R N A分解を誘導する、請求項7 2に記載の組成物。

【請求項7 8】

前記A M I G O - 2インヒビターが、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、単鎖抗体、またはF a bフラグメントである、請求項7 2に記載の組成物。

10

【請求項7 9】

前記抗体またはF a bフラグメントがA M I G O - 2のL R R N Tドメインの1つまたは複数のエピトープに特異的に結合する、請求項7 8に記載の組成物。

【請求項8 0】

前記抗体またはF a bフラグメントがA M I G O - 2のL R R 1ドメインの1つまたは複数のエピトープに特異的に結合し、該エピトープが配列番号3 0および配列番号5 7からなる群より選択される、請求項7 8に記載の組成物。

【請求項8 1】

前記抗体またはF a bフラグメントがA M I G O - 2のL R R 2ドメインの1つまたは複数のエピトープに特異的に結合し、該エピトープが配列番号3 2、配列番号3 9、および配列番号6 1からなる群より選択される、請求項7 8に記載の組成物。

20

【請求項8 2】

前記抗体またはF a bフラグメントがA M I G O - 2のL R R 3ドメインの1つまたは複数のエピトープに特異的に結合し、該エピトープが配列番号2 9、配列番号3 9、配列番号4 0、配列番号5 6、および配列番号5 8からなる群より選択される、請求項7 8に記載の組成物。

【請求項8 3】

前記抗体またはF a bフラグメントがA M I G O - 2のL R R 4ドメインの1つまたは複数のエピトープに特異的に結合し、該エピトープが配列番号2 6、配列番号3 5、および配列番号4 5からなる群より選択される、請求項7 8に記載の組成物。

30

【請求項8 4】

前記抗体またはF a bフラグメントがA M I G O - 2のL R R 5ドメインの1つまたは複数のエピトープに特異的に結合し、該エピトープが配列番号2 5、配列番号2 7、配列番号3 6、および配列番号5 3からなる群より選択される、請求項7 8に記載の組成物。

【請求項8 5】

前記抗体またはF a bフラグメントがA M I G O - 2のL R R 6ドメインの1つまたは複数のエピトープに特異的に結合し、該エピトープが配列番号3 1、配列番号3 3、配列番号4 1、配列番号4 6、配列番号4 7、および配列番号6 2からなる群より選択される、請求項7 8に記載の組成物。

40

【請求項8 6】

前記抗体またはF a bフラグメントがA M I G O - 2のL R R - C Tドメインの1つまたは複数のエピトープに特異的に結合し、該エピトープが配列番号2 8、配列番号3 4、配列番号3 7、配列番号3 8、配列番号4 4、配列番号4 9、配列番号5 0、配列番号5 1、配列番号5 2、配列番号5 4、配列番号5 9、配列番号6 0、および配列番号6 2からなる群より選択される、請求項7 8に記載の組成物。

【請求項8 7】

前記抗体またはF a bフラグメントがA M I G O - 2のI g V - s e tドメインの1つまたは複数のエピトープに特異的に結合する、請求項7 8に記載の組成物。

50

【請求項 88】

前記抗体または F a b フラグメントが A M I G O - 2 の I g ドメインの 1 つまたは複数のエピトープに特異的に結合する、請求項 78 に記載の組成物。

【請求項 89】

前記抗体または F a b フラグメントが A M I G O - 2 の細胞外ドメイン (E C D) 中の 1 つまたは複数のエピトープに特異的に結合する、請求項 78 に記載の組成物。

【請求項 90】

前記抗体または F a b フラグメントが、本質的に配列番号 3 ~ 6 および 25 ~ 62 からなる群より選択される配列からなる配列中の 1 つまたは複数のエピトープに特異的に結合する、請求項 78 に記載の組成物。

10

【請求項 91】

前記抗体または F a b フラグメントが、本質的に配列番号 2 または配列番号 3 からなる配列中の 1 つまたは複数のエピトープに特異的に結合する、請求項 78 に記載の組成物。

【請求項 92】

前記抗体または F a b フラグメントが、少なくとも 1×10^8 K a の親和性で A M I G O - 2 に結合する、請求項 78 に記載の組成物。

【請求項 93】

前記 A M I G O - 2 活性が、染色体安定性、腫瘍形成能、細胞増殖、細胞周期制御、癌細胞運動性、細胞接着、腫瘍形成、転移、A M I G O - 2 シグナル伝達、癌細胞生存、サイクリン産生、キナーゼ活性、基質リン酸化、足場非依存性増殖、A M I G O - 2 タンパク質の細胞膜への局在化、A M I G O - 2 と A M I G O - 1 または A M I G O - 3 の一方または両方との間の相互作用、細胞質リン酸化 A M I G O - 2 タンパク質レベル、腫瘍と間質組織との間の相互作用、および血管形成からなる群より選択される、請求項 72 に記載の組成物。

20

【請求項 94】

前記抗体または F a b フラグメントが、癌細胞生存、A M I G O - 2 の細胞質リン酸化、または E r k リン酸化を阻害する、請求項 72 に記載の組成物。

【請求項 95】

前記組成物が、c J u n、c M y c、または F o s L 1 の発現を阻害する、請求項 72 に記載の組成物。

30

【請求項 96】

前記組成物が、細胞周期の G 2 / M 期への細胞分裂の進行を阻害する、請求項 72 に記載の組成物。

【請求項 97】

前記 A M I G O - 2 インヒビターが、配列番号 17 ~ 24 からなる群より選択される配列の少なくとも 19 個の連続するヌクレオチドを含む第 1 のヌクレオチド鎖および該第 1 の鎖と実質的に相補的な配列を含む第 2 のヌクレオチド鎖を含む d s R N A 分子であり、該 d s R N A 分子が 3769 ヌクレオチド長未満である、請求項 72 に記載の組成物。

【請求項 98】

前記 d s R N A がコントロールと比較して A M I G O - 2 翻訳を少なくとも 20 % 阻害する、請求項 97 に記載の組成物。

40

【請求項 99】

A M I G O - 2 ポリペプチドのエピトープに特異的に結合する精製抗体であって、該エピトープが、シグナルペプチド、L R R N T ドメイン、L R R 1 ドメイン、L R R 2 ドメイン、L R R 3 ドメイン、L R R 4 ドメイン、L R R 5 ドメイン、L R R 6 ドメイン、L R R C T ドメイン、I g V - s e t ドメイン、および I g ドメインからなる群より選択されるドメイン中に存在する、精製抗体。

【請求項 100】

前記抗体が、A M I G O - 2 の L R R 1 ドメインの 1 つまたは複数のエピトープに特異的に結合し、該エピトープが配列番号 30 および配列番号 57 からなる群より選択される

50

、請求項 99 に記載の精製抗体。

【請求項 101】

前記抗体が、AMIGO-2 の LRR2 ドメインの 1 つまたは複数のエピトープに特異的に結合し、該エピトープが配列番号 32、配列番号 39、および配列番号 61 からなる群より選択される、請求項 99 に記載の精製抗体。

【請求項 102】

前記抗体が、AMIGO-2 の LRR3 ドメインの 1 つまたは複数のエピトープに特異的に結合し、該エピトープが配列番号 29、配列番号 39、配列番号 40、配列番号 56、および配列番号 58 からなる群より選択される、請求項 99 に記載の精製抗体。

【請求項 103】

前記抗体が、AMIGO-2 の LRR4 ドメインの 1 つまたは複数のエピトープに特異的に結合し、該エピトープが配列番号 26、配列番号 35、および配列番号 45 からなる群より選択される、請求項 99 に記載の精製抗体。

【請求項 104】

前記抗体が、AMIGO-2 の LRR5 ドメインの 1 つまたは複数のエピトープに特異的に結合し、該エピトープが配列番号 25、配列番号 27、配列番号 36、および配列番号 53 からなる群より選択される、請求項 99 に記載の精製抗体。

【請求項 105】

前記抗体が、AMIGO-2 の LRR6 ドメインの 1 つまたは複数のエピトープに特異的に結合し、該エピトープが配列番号 31、配列番号 33、配列番号 41、配列番号 46、配列番号 47、および配列番号 62 からなる群より選択される、請求項 99 に記載の精製抗体。

【請求項 106】

前記抗体が、AMIGO-2 の LRRCT ドメインの 1 つまたは複数のエピトープに特異的に結合し、該エピトープが配列番号 28、配列番号 34、配列番号 37、配列番号 38、配列番号 44、配列番号 49、配列番号 50、配列番号 51、配列番号 52、配列番号 54、配列番号 59、配列番号 60、および配列番号 62 からなる群より選択される、請求項 99 に記載の精製抗体。

【請求項 107】

前記抗体が、配列番号 25 ~ 62 からなる群より選択される 1 つまたは複数のエピトープに特異的に結合する、請求項 99 に記載の精製抗体。

【請求項 108】

前記抗体が、本質的に配列番号 2 または配列番号 3 からなる配列中の 1 つまたは複数のエピトープに特異的に結合する、請求項 119 に記載の精製抗体。

【請求項 109】

前記抗体が、染色体安定性、腫瘍形成能、細胞増殖、細胞周期制御、癌細胞運動性、細胞接着、腫瘍形成、転移、AMIGO-2 シグナル伝達、癌細胞生存、サイクリン産生、キナーゼ活性、基質リン酸化、足場非依存性増殖、AMIGO-2 タンパク質の細胞膜への局在化、AMIGO-2 と AMIGO-1 または AMIGO-3 の一方または両方との間の相互作用、細胞質リン酸化 AMIGO-2 タンパク質レベル、腫瘍と間質組織との間の相互作用、および血管形成からなる群より選択される AMIGO-2 活性を阻害する、請求項 99 に記載の精製抗体。

【請求項 110】

AMIGO-2 ポリペプチドの 1 つまたは複数のエピトープに特異的に結合する精製抗体であって、該エピトープが配列番号 3 ~ 6 および 25 ~ 62 からなる群より選択される配列を含む、精製抗体。

【請求項 111】

請求項 99 に記載の抗体を産生する単離細胞。

【請求項 112】

請求項 99 に記載の抗体を産生するハイブリドーマ。

10

20

30

40

50

【請求項 1 1 3】

請求項 9 9 に記載の抗体を産生する非ヒトトランスジェニック動物。

【請求項 1 1 4】

配列番号 2 のポリペプチドの単離エピトープ保有フラグメントであって、該フラグメントが、配列番号 3 ~ 6 および 2 5 ~ 6 2 からなる群より選択される 1 つまたは複数のエピトープを含む、フラグメント。

【請求項 1 1 5】

配列番号 2 の約 6 個と約 2 0 個との間の連続するアミノ酸を含む、請求項 1 1 4 に記載のエピトープ保有フラグメント。

【請求項 1 1 6】

配列番号 2 の少なくとも 2 1 個の連続するアミノ酸および配列番号 2 の 5 2 2 個未満の連続するアミノ酸を含む、請求項 1 1 4 に記載のエピトープ保有フラグメント。

【請求項 1 1 7】

請求項 1 1 4 に記載の単離エピトープ保有フラグメントをコードするポリヌクレオチド。

【請求項 1 1 8】

請求項 1 1 4 に記載のエピトープ保有フラグメントでの被験体の免疫化によって得られる精製 A M I G O - 2 抗体。

【請求項 1 1 9】

配列番号 1 7 ~ 2 4 に記載の配列の少なくとも 1 9 個の連続するヌクレオチドを含む第 1 のヌクレオチド鎖および該第 1 の鎖と実質的に相補的な配列を含む第 2 のヌクレオチド鎖を含む単離 d s R N A 分子であって、該 d s R N A 分子が 3 7 6 9 ヌクレオチド長未満である、単離 d s R N A 分子。

【請求項 1 2 0】

前記第 2 のヌクレオチド鎖が前記第 1 の鎖に完全に相補的な配列を含み、前記 d s R N A 分子が 3 7 6 9 ヌクレオチド長未満である、請求項 1 1 9 に記載の単離 d s R N A 分子。

【請求項 1 2 1】

配列番号 7 ~ 1 6 に記載の配列の少なくとも 1 0 個の連続するヌクレオチドを含む単離核酸。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

発明の分野

本発明は、一般に、腫瘍学分野に関する。より具体的には、本発明は、癌の治療方法、癌治療のための組成物、ならびに癌の診断および / または検出のための方法および組成物に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

発明の背景

癌は、合衆国における死亡原因の第 2 位である。「癌」を使用して、多数の異なる癌型（すなわち、乳癌、前立腺癌、肺癌、結腸癌、膵臓癌）を説明するが、各癌型は表現型レベルおよび遺伝子レベルの両方において異なる。癌に特徴的な無秩序な成長は、1 つまたは複数の遺伝子の発現が変異によって無調節になる場合に起こり、細胞成長をもはや制御することができない。

【0 0 0 3】

遺伝子は、しばしば、2 つのクラス（癌遺伝子および腫瘍抑制遺伝子）に分類される。癌遺伝子は、その通常の機能は細胞成長を促進することであるが、特定の条件下のみでこれが起こる遺伝子である。癌遺伝子が変異を獲得し、その後制御されなくなる場合、癌遺伝子は全ての条件下で成長を促進する。しかし、癌が真に成立するためには癌が腫瘍抑制

10

20

30

40

50

遺伝子の変異も獲得しなければならないことが見出されている。腫瘍抑制因子の通常の機能は、細胞成長を停止させることである。腫瘍抑制因子の例には、p53, p16, p21, およびAPCが含まれ、その全てが正常に作用する場合、細胞が分裂して無秩序に成長するのを停止させる。腫瘍抑制因子が変異するか喪失し、細胞成長の抑制も喪失する場合、細胞は直ちに無制限に成長する。

【0004】

AMIGO-2 (Alivm1およびDEGAとしても公知)は、AMIGO (アンフォテリン誘導性遺伝子およびORF)ファミリーのメンバーである(非特許文献1)。AMIGOファミリーは細胞運動性に関与し、ファミリーメンバーは同種親和性相互作用およびヘテロ親和性相互作用の両方を有する。AMIGO-2はまた、アポトーシスを阻害し、ニューロンの生存を促進する(非特許文献2)。AMIGO-2は、胃癌で上方制御され(非特許文献3)、AMIGO-2の安定な阻害により、腫瘍細胞の染色体安定性、移動、および成長を阻害することができる。

10

【0005】

しかし、今日まで、癌ならびに他の疾患および障害におけるAMIGO-2の役割は完全に解明されていなかった。したがって、AMIGO-2を調整する組成物および方法を同定する必要がある。本発明は、これらおよび他の重要なニーズに関する。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Kuja-Panula, JCB (2003) 160 963

【非特許文献2】Ono, J Neurosci (2003) 23 5887

【非特許文献3】Rabena, Oncogene (2004) 23 5056

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0007】

発明の要旨

いくつかの態様では、本発明は、AMIGO-2モジュレーターおよび1つまたは複数の薬学的に許容可能なキャリアを含む組成物を提供する。

【0008】

1つの態様では、AMIGO-2インヒビターおよび1つまたは複数の薬学的に許容可能なキャリアを含む組成物であって、AMIGO-2インヒビターが、単離二本鎖RNA (dsRNA)、配列番号7~16からなる群より選択される配列の少なくとも10個の連続するヌクレオチドを含む単離オリゴヌクレオチド、シグナルペプチド、LRRNTドメイン、LRR1ドメイン、LRR2ドメイン、LRR3ドメイン、LRR4ドメイン、LRR5ドメイン、LRR6ドメイン、LRRCTドメイン、Ig V-setドメイン、およびIgドメインからなる群より選択されるAMIGO-2のドメイン中のエピトープに結合する抗体、小分子、模倣物、可溶性受容体、またはデコイである、組成物を特徴とする。

30

【0009】

別の態様では、本発明は、AMIGO-2ポリペプチドのエピトープに特異的に結合する精製抗体であって、エピトープが、シグナルペプチドドメイン、LRRNTドメイン、LRR1ドメイン、LRR2ドメイン、LRR3ドメイン、LRR4ドメイン、LRR5ドメイン、LRR6ドメイン、LRRCTドメイン、Ig V-setドメイン、またはIgドメイン中に存在する、精製抗体を特徴とする。

40

【0010】

さらに別の態様では、本発明は、AMIGO-2ポリペプチドのエピトープに特異的に結合する抗体を産生する単離細胞であって、エピトープが、シグナルペプチドドメイン、LRRNTドメイン、LRR1ドメイン、LRR2ドメイン、LRR3ドメイン、LRR4ドメイン、LRR5ドメイン、LRR6ドメイン、LRRCTドメイン、Ig V-s

50

e tドメイン、またはI gドメイン中に存在する、単離細胞を特徴とする。

【0011】

別の態様では、本発明は、AMIGO-2ポリペプチドのエピトープに特異的に結合する抗体を産生するハイブリドーマであって、エピトープが、シグナルペプチドドメイン、LRRNTドメイン、LRR1ドメイン、LRR2ドメイン、LRR3ドメイン、LRR4ドメイン、LRR5ドメイン、LRR6ドメイン、LRRCTドメイン、I g V - s e tドメイン、またはI gドメイン中に存在する、ハイブリドーマを特徴とする。

【0012】

さらに別の態様では、本発明は、AMIGO-2ポリペプチドのエピトープに特異的に結合する抗体を産生する非ヒトトランスジェニック動物であって、エピトープが、シグナルペプチドドメイン、LRRNTドメイン、LRR1ドメイン、LRR2ドメイン、LRR3ドメイン、LRR4ドメイン、LRR5ドメイン、LRR6ドメイン、LRRCTドメイン、I g V - s e tドメイン、またはI gドメイン中に存在する、非ヒトトランスジェニック動物を特徴とする。

10

【0013】

別の態様では、本発明は、配列番号2のポリペプチドの単離エピトープ保有フラグメントであって、フラグメントが、配列番号3～6および25～62からなる群より選択される1つまたは複数のエピトープを含む、フラグメントを特徴とする。

【0014】

さらに別の態様では、本発明は、配列番号2のポリペプチドの単離エピトープ保有フラグメントをコードするポリヌクレオチドであって、フラグメントが、配列番号3～6および25～62からなる群より選択される1つまたは複数のエピトープを含む、ポリヌクレオチドを特徴とする。

20

【0015】

さらに別の態様では、配列番号2のポリペプチドのエピトープ保有フラグメントでの被験体の免疫化によって得られる精製AMIGO-2抗体であって、フラグメントが、配列番号3～6および25～62からなる群より選択される1つまたは複数のエピトープを含む、精製AMIGO-2抗体を特徴とする。

【0016】

別の態様では、本発明は、配列番号17～24に記載の配列の少なくとも19個の連続するヌクレオチドを含む第1のヌクレオチド鎖および第1の鎖と実質的に相補的な配列を含む第2のヌクレオチド鎖を含む単離dsRNA分子であって、dsRNA分子が3769ヌクレオチド長未満である、単離dsRNA分子を特徴とする。

30

【0017】

さらに別の態様では、本発明は、配列番号17～24に記載の配列の少なくとも19個の連続するヌクレオチドを含む第1のヌクレオチド鎖および第1の鎖と完全に相補的な配列を含む第2のヌクレオチド鎖を含む単離dsRNA分子であって、dsRNA分子が3769ヌクレオチド長未満である、単離dsRNA分子を特徴とする。

【0018】

別の態様では、本発明は、配列番号7～16に記載の配列の少なくとも10個の連続するヌクレオチドを含む単離核酸を特徴とする。

40

【0019】

別の態様では、本発明は、治療を必要とする患者における癌または癌の症状を治療する方法であって、治療有効量のAMIGO-2インヒビターを患者に投与する工程を含み、インヒビターは、単離二本鎖RNA(dsRNA)、配列番号7～16からなる群より選択される配列の少なくとも10個の連続するヌクレオチドを含む単離オリゴヌクレオチド、シグナルペプチド、LRRNTドメイン、LRR1ドメイン、LRR2ドメイン、LRR3ドメイン、LRR4ドメイン、LRR5ドメイン、LRR6ドメイン、LRRCTドメイン、I g V - s e tドメイン、およびI gドメインからなる群より選択されるAMIGO-2のドメイン中のエピトープに結合する抗体、小分子、模倣物、可溶性受容体、

50

およびデコイである、方法を特徴とする。

【0020】

さらに別の態様では、本発明は、患者のAMIGO-2活性を調整する方法であって、AMIGO-2活性を調整するのに有効な量のAMIGO-2インヒビターを患者に投与する工程を含む、方法を特徴とする。

【0021】

さらに別の態様では、本発明は、AMIGO-2療法に感受性を示す患者を同定する方法であって、(a)サンプル中のAMIGO-2発現の証拠の存在または非存在を検出する工程であって、サンプル中のAMIGO-2発現の証拠の存在が、AMIGO-2療法の候補である患者を示し、サンプル中のAMIGO-2発現の証拠の非存在がAMIGO-2療法の候補ではない患者を示す、検出する工程、(b)患者がAMIGO-2療法の候補である場合、治療有効量のAMIGO-2インヒビターを含む組成物を患者に投与する工程、(c)患者がAMIGO-2療法の候補でない場合、患者に伝統的な癌療法薬を投与する工程を含む、方法を特徴とする。

10

【0022】

別の態様では、本発明は、癌細胞をコントロールと比較して少なくとも20%細胞の成長を阻害するのに有効な量のAMIGO-2インヒビターと接触させる工程を含む、癌細胞の成長を阻害する方法を特徴とする。

【0023】

別の態様では、本発明は、治療有効量のAMIGO-2インヒビターを患者に投与する工程を含む、阻害する必要がある患者において癌細胞表現型を阻害する方法を特徴とする。

20

【0024】

別の態様では、本発明は、AMIGO-2を発現する1つまたは複数の細胞を含む癌を有する患者に1つまたは複数のAMIGO-2の下流マーカーを調整する化合物を投与する工程を含む癌細胞の成長を阻害する方法を特徴とする。1つまたは複数のAMIGO-2の下流マーカーは、c-MYC、c-Jun、FosL1、および細胞外シグナル制御キナーゼ(ERK)であり得る。いくつかの実施形態では、1つまたは複数の下流マーカーの調整が、1つまたは複数の下流マーカーの発現の阻害(例えば、タンパク質またはmRNA発現の阻害)であり得る。いくつかの実施形態では、調整には、1つまたは複数のAMIGO-2の下流マーカーの活性阻害も含まれ得る。いくつかの実施形態では、ERKの調整には、ERKのリン酸化の調整が含まれる。いくつかの実施形態では、ERKの調整には、1つまたは複数のERK基質に対するERKキナーゼ活性の調整が含まれる。

30

【0025】

さらに別の態様では、本発明は、画像化剤に連結したAMIGO-2インヒビターを含む組成物を患者に投与する工程、および該患者中の該画像化剤の局在化を検出する工程を含む、患者中の腫瘍を検出する方法を特徴とする。

【0026】

別の態様では、本発明は、治療有効量のAMIGO-2インヒビターを患者に投与する工程を含む、患者の2つまたはそれを超える細胞の相互作用を阻害する方法を特徴とする。

40

【0027】

別の態様では、本発明は、細胞中でAMIGO-2抗体を発現させる方法であって、AMIGO-2抗体が、配列番号3~6および25~62からなる群より選択される配列を含むエピトープに特異的に結合する、方法を特徴とする。本方法は、細胞中でAMIGO-2抗体をコードする核酸を発現する工程を含む。

【0028】

別の態様では、本発明は、癌インヒビターを同定する方法であって、癌がコントロールと比較してAMIGO-2の過剰発現によって特徴づけられる、方法を特徴とする。本方法は、AMIGO-2を発現する細胞を候補化合物と接触させる工程、およびAMIGO

50

- 2 活性が調整されるかどうかを決定する工程を含み、A M I G O - 2 活性の調整が癌インヒビターを示す。

【0029】

別の態様では、本発明は、癌インヒビターを同定する方法であって、癌がコントロールと比較したA M I G O - 2 の過剰発現によって特徴づけられる、方法を特徴とする。本方法は、A M I G O - 2 を発現する細胞を候補化合物およびA M I G O - 2 リガンドと接触させる工程、およびA M I G O - 2 の下流マーカーの活性が調整されるかどうかを決定する工程を含み、下流マーカーの調整が癌インヒビターを示す。

【0030】

別の態様では、本発明は、A M I G O - 2 インヒビターに対する患者の感受性を決定する方法であって、患者の癌サンプル中のA M I G O - 2 の差分発現の証拠を検出する工程を含み、A M I G O - 2 の差分発現の証拠がA M I G O - 2 インヒビターに対する患者の感受性を示す、方法を特徴とする。

10

【0031】

別の態様では、本発明は、サンプルからA M I G O - 2 タンパク質を精製する方法であって、(a) 固体支持体に結合した抗A M I G O - 2 抗体を含むアフィニティマトリックスを準備する工程、(b) サンプルをアフィニティマトリックスと接触させて、アフィニティマトリックス-A M I G O - 2 タンパク質複合体を形成する工程、(c) アフィニティマトリックスA M I G O - 2 タンパク質複合体をサンプルの残りから分離する工程、および(d) アフィニティマトリックスからA M I G O - 2 タンパク質を放出させる工程を含む、方法を特徴とする。

20

【0032】

別の態様では、本発明は、細胞毒性薬剤または診断薬剤を、A M I G O - 2 を発現する1つまたは複数の細胞に送達させる方法を特徴とする。本方法は、(a) 抗A M I G O - 2 抗体またはそのフラグメントに抱合した細胞毒性薬剤または診断薬剤を提供する工程、および(b) 細胞を抗体-薬剤抱合体またはフラグメント-薬剤抱合体に曝露する工程を含む。

【0033】

別の態様では、本発明は、候補A M I G O - 2 インヒビターの有効性を決定する方法であって、A M I G O - 2 発現細胞を候補A M I G O - 2 インヒビターと接触させて、下流A M I G O - 2 マーカーのレベルまたは活性が減少するかどうかを決定する工程を含み、下流マーカーのレベルまたは活性の減少が、候補A M I G O - 2 インヒビターが有効な抗癌薬であることを示す、方法を特徴とする。

30

【0034】

さらに別の態様では、本発明は、候補A M I G O - 2 インヒビターの有効性を決定する方法であって、A M I G O - 2 発現細胞を候補A M I G O - 2 インヒビターと接触させて、P A R P 1 切断が増加するかどうかを決定する工程を含み、P A R P 1 切断の増加は、候補A M I G O - 2 インヒビターが有効な抗癌薬であることを示す、方法を特徴とする。

【0035】

さらに別の態様では、本発明は、癌がA M I G O - 2 関連癌であるかどうかを決定する方法であって、癌中のA M I G O - 2 発現をコントロール細胞中のA M I G O - 2 発現と比較する方法を含み、コントロール細胞と比較した癌細胞中の上方制御されたA M I G O - 2 発現は癌がA M I G O - 2 関連癌であることを示す、方法を特徴とする。

40

【0036】

別の態様では、本発明は、癌がA M I G O - 2 関連癌であるかどうかを決定する方法であって、癌サンプルおよびコントロールサンプルをA M I G O - 2 インヒビターと接触させる工程および癌サンプルおよびコントロールサンプル中のA M I G O - 2 下流マーカーのレベルまたは活性を比較する工程を含み、コントロールサンプルと比較した癌サンプル中のA M I G O - 2 下流マーカーのレベルまたは活性の減少は癌がA M I G O - 2 関連癌であることを示す、方法を特徴とする。

50

【0037】

別の態様では、本発明は、癌がAMIGO-2関連癌であるかどうかを決定する方法であって、癌サンプルおよびコントロールサンプルをAMIGO-2インヒビターと接触させる工程および癌サンプルおよびコントロールサンプル中のPARP1切断を比較する工程を含み、コントロールサンプルと比較した癌サンプル中のPARP1切断の増加は癌がAMIGO-2関連癌であることを示す、方法の特徴とする。

【0038】

さらに別の態様では、本発明は、癌患者を治療する方法であって、癌がAMIGO-2関連癌であるかどうかを決定する工程、患者がAMIGO-2関連癌を有する場合にAMIGO-2インヒビターを含む組成物を患者に投与する工程、および患者がAMIGO-2関連癌を持たない場合に伝統的な癌治療薬を患者に投与する工程を含む、方法の特徴とする。

10

【0039】

別の態様では、本発明は、癌患者を治療する方法であって、患者由来の癌サンプル中のAMIGO-2発現をコントロールサンプル中のAMIGO-2発現と比較し、(1)癌サンプル中のAMIGO-2発現がコントロールサンプルと比較して上方制御される場合にAMIGO-2インヒビターを含む組成物で患者を処置し、(2)癌サンプル中のAMIGO-2発現がコントロールサンプルと比較して不変であるか下方制御される場合に二次アッセイを行う工程を含む、方法の特徴とする。

【0040】

別の態様では、本発明は、患者の癌を診断する方法であって、候補癌細胞中のAMIGO-2局在化をアッセイする工程を含み、細胞膜に局在化したAMIGO-2の、細胞膜を含まない癌細胞の他の領域に局在化したAMIGO-2に対する比が少なくとも2:1である場合、AMIGO-2関連癌を有する患者であると診断する、方法の特徴とする。

20

【0041】

別の態様では、本発明は、AMIGO-2を発現する細胞を含むサンプル中のAMIGO-2活性の調整を検出する方法の特徴とする。本方法は、(a)サンプルを、AMIGO-2活性を調整するのに十分な時間AMIGO-2インヒビターと接触させる工程、(b)抗AMIGO-2抗体でAMIGO-2を免疫沈降する工程、および(c)ホスホセリン/トレオニン抗体を使用してサンプル中のAMIGO-2セリン/トレオニンリン酸化をコントロールと比較する工程を含む、方法の特徴とする。コントロールと比較したサンプル中のAMIGO-2のセリン/トレオニンリン酸化の変化は、AMIGO-2活性の調整を示す。

30

【0042】

別の態様では、本発明は、AMIGO-2を発現する細胞を含むサンプル中のAMIGO-2活性の調整を検出する方法の特徴とする。本方法は、(a)サンプル中のAMIGO-2を、AMIGO-2活性を調整するのに十分な時間過剰発現する工程、(b)抗AMIGO-2抗体でAMIGO-2を免疫沈降する工程、および(c)ホスホセリン/トレオニン抗体を使用してサンプル中のAMIGO-2セリン/トレオニンリン酸化をコントロールと比較する工程を含む。コントロールと比較したサンプル中のAMIGO-2のセリン/トレオニンリン酸化の変化は、AMIGO-2活性の調整を示す。

40

【0043】

さらに別の態様では、本発明は、AMIGO-2を発現する細胞を含むサンプル中のAMIGO-2活性の調整を検出する方法の特徴とする。本方法は、(a)サンプルを、AMIGO-2活性を調整するのに十分な時間AMIGO-2インヒビターと接触させる工程、(b)抗ホスホセリン/トレオニン抗体でAMIGO-2を免疫沈降する工程、および(c)抗AMIGO-2抗体を使用してサンプル中のリン酸化AMIGO-2レベルをコントロールと比較する工程を含む、方法の特徴とする。コントロールと比較したサンプル中のリン酸化AMIGO-2レベルの変化は、AMIGO-2活性の調整を示す。

【0044】

50

別の態様では、本発明は、AMIGO-2を発現する細胞を含むサンプル中のAMIGO-2活性の調整を検出する方法を特徴とする。本方法は、(a) AMIGO-2活性を調整するのに十分な時間サンプル中のAMIGO-2を過剰発現する工程、(b) 抗ホスホセリン/トレオニン抗体でAMIGO-2を免疫沈降する工程、および(c) 抗AMIGO-2抗体を使用してサンプル中のリン酸化AMIGO-2レベルをコントロールと比較する工程を含む。コントロールと比較したサンプル中のリン酸化AMIGO-2レベルの変化は、AMIGO-2活性の調整を示す。

【0045】

別の態様では、本発明は、AMIGO-2モジュレーターを同定する方法であって、候補化合物の存在下および非存在下でAMIGO-2を発現する1つまたは複数の細胞を含むサンプル中のAMIGO-2のリン酸化を比較する工程を含み、候補化合物の非存在下でのサンプル中のAMIGO-2のリン酸化と比較した候補化合物の存在下でのサンプル中のAMIGO-2のリン酸化の調整は、候補化合物がAMIGO-2モジュレーターであることを示す、方法。

10

【0046】

本発明のこれらおよび他の態様は、発明の詳細な説明中で説明されるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0047】

【図1】 Affymetrix GeneChip (登録商標) (Human Genome U133 Plus 2.0 Array, Affymetrix, Inc) オリゴヌクレオチドアレイから作成した遺伝子発現データ (図1A) および組織内で合成したcDNAマイクロアレイ (図1B) を示す。

20

【図2】 正常組織ならびに結腸、乳房、および前立腺の組織サンプル中の相対AMIGO-2 mRNAレベルのグラフを示す。

【図3】 癌組織および正常組織から単離したAMIGO-2 mRNA由来のオリゴヌクレオチドアレイデータ (Human Genome U133 Plus 2.0 Array, Affymetrix, Inc) のグラフを示す。正常組織型および癌組織型をx軸に沿って記載する。縦軸上の各スポットは1人の患者由来の組織サンプルを示し、縦軸上の各スポットの高さ (線形) はプローブ組の相対発現レベルを示す。黒丸は線形検出範囲内における発現レベルを有するサンプルを示す。白丸は、遺伝子がプローブ組の検出限度未満である場合のサンプルにおける遺伝子発現の上限を示す。白四角は、プローブ組が飽和した場合のサンプル中の遺伝子発現の下限を示す。

30

【図4】 y軸がlog₂ベースであること以外は、図3に示すグラフを示す。正常組織型および癌組織型を横軸に沿って記載する。癌組織名を「c__」の後に示し、正常組織名を「n__」の後に示す。「ns」は不特定の組織サブタイプを示す。

【図5】 6つの異なる細胞株から単離したAMIGO-2タンパク質を示すウェスタンブロット分析を示す。相対半定量RT-PCR Ctレベルを4つの細胞株の名称の隣に括弧書きする。

【図6】 siRNA投与後のSW620細胞中のAMIGO-2 mRNAレベルのグラフを示す。y軸は相対的スケールであり、数字は任意である。UT = 非トランスフェクション; Eg5 = siRNAターゲティングEg5 (無関係の遺伝子); ネガティブコントロール = 任意の公知の遺伝子と相同でないsiRNA配列; C315-1.2からC315-4.3はAMIGO-2 siRNAのパネルである。

40

【図7A】 siRNA投与後のColo320細胞中のAMIGO-2 mRNAレベルのグラフを示す。y軸は相対スケールであり、数字は任意である。Eg5 = siRNAターゲティングEg5 (無関係の遺伝子); ネガティブコントロール = 任意の公知の遺伝子と相同でないsiRNA配列; C315-1.2およびC315-4.3はAMIGO-2特異的siRNAである。

【図7B】 siRNA投与後のHCT116細胞中のAMIGO-2 mRNAレベルのグラフを示す。y軸は相対スケールであり、数字は任意である。Eg5 = siRNAター

50

ゲティング E g 5 (無関係の遺伝子) ; ネガティブコントロール = 任意の公知の遺伝子と相同でない s i R N A 配列 ; C 3 1 5 - 1 . 2 および C 3 1 5 - 4 . 3 は A M I G O - 2 特異的 s i R N A である。

【図 8 A】 S W 6 2 0 細胞の細胞死に及ぼす A M I G O - 2 特異的 s i R N A の影響のグラフを示す。「 P o s . コントロール」は、 E g 5 s i R N A ターゲティング E g 5 である。「 N e g . コントロール」は、任意の公知の遺伝子と相同でない s i R N A 配列である。 y 軸は、発光レベルを示し、このレベルは死細胞数と比例する。

【図 8 B】 M R C 9 細胞の細胞死に及ぼす A M I G O - 2 特異的 s i R N A の影響のグラフを示す。「 P o s . コントロール」は、 E g 5 s i R N A ターゲティング E g 5 である。「 N e g . コントロール」は、任意の公知の遺伝子と相同でない s i R N A 配列である。 y 軸は、発光レベルを示し、このレベルは死細胞数と比例する。

【図 9】 A G S 細胞中の A M I G O - 2、 P A R P、 M 3 0、 およびチュープリンタンパク質の発現およびプロセッシングに及ぼす A M I G O - 2 特異的 s i R N A の影響を示すウェスタンブロットのパネルを示す。「 P o s . コントロール」は、 E g 5 s i R N A でトランスフェクトした細胞由来の溶解物を示す。「 N e g . コントロール」は、任意の公知の遺伝子と相同でない s i R N A 配列でトランスフェクトした細胞由来の溶解物を示す。

【図 1 0 A】 S W 6 2 0 細胞中の A M I G O - 2、 E R K、 c - M y c、 およびチュープリンタンパク質の発現およびプロセッシングに及ぼす A M I G O - 2 特異的 s i R N A の影響を示すウェスタンブロットのパネルを示す。 p E R K はリン酸化 E R K タンパク質である。「 N e g . コントロール」は、図 9 中に記載のものと同様である。

【図 1 0 B】 S W 6 2 0 細胞中 c - M Y C m R N A レベルに及ぼす A M I G O - 2 特異的 s i R N A の影響のグラフを示す。「 P o s . コントロール」は、 E g 5 s i R N A ターゲティング E g 5 である。「 N e g . コントロール」は、任意の公知の遺伝子と相同でない s i R N A 配列である。 y 軸は、 q P C R によって決定した m R N A の相対発現レベルを示す。

【図 1 1】 A G S 細胞中の A M I G O - 2、 E R K、 c - M y c、 サイクリン D 1、 およびチュープリンタンパク質の発現およびプロセッシングに及ぼす A M I G O - 2 特異的 s i R N A の影響を示すウェスタンブロットのパネルを示す。 p E R K はリン酸化 E R K タンパク質である。「抗有糸分裂遺伝子」と呼ばれるレーンは、 E g 5 s i R N A でトランスフェクトした細胞由来の溶解物を示す。「 N e g . コントロール」は、任意の公知の遺伝子と相同でない s i R N A 配列でトランスフェクトした細胞由来の溶解物である。

【図 1 2】 c J u n 発現に及ぼす A M I G O - 2 調整の影響を示す。図 1 2 A は、 c J u n が A M I G O - 2 s i R N A でトランスフェクトした細胞中で下方制御されることを示すウェスタンブロットのパネルである。「 U T」は非トランスフェクションコントロールサンプルを示し、「 D h a r m N e g」は任意の公知の遺伝子と相同でないネガティブコントロール s i R N A 配列であり、 C 3 1 5 - 1 . 3 s i は A M I G O - 2 特異的 s i R N A である。図 1 2 B は、 A M I G O - 2 で安定にトランスフェクトした細胞株中で c J u n 発現が上方制御されることを示すウェスタンブロットのパネルである。図 1 2 C は、アゴニスト抗 A M I G O - 2 抗体 M A B 2 0 8 0 への A G S 細胞の曝露後の c J u n の上方制御を示すウェスタンブロットである。「 I S O」はアイソタイプコントロールを示す。

【図 1 3】 A G S 細胞および S W 6 2 0 細胞におけるサイクリン B 1 および c F o s L 1 発現に及ぼす A M I G O - 2 ノックダウンの影響を示すウェスタンブロットのパネルを示す。「 U T」は非トランスフェクションコントロールサンプルを示し、「 D h a r m N e g」は任意の公知の遺伝子と相同でないネガティブコントロール s i R N A 配列であり、 C 3 1 5 - 1 . 3 s i および C 3 1 5 - 4 . 3 s i は A M I G O - 2 特異的 s i R N A である。

【図 1 4】 c - M y c 発現に及ぼす A M I G O - 2 調整の影響を示す。図 1 4 A および 1 4 B は、 A M I G O - 2 s i R N A C 3 1 5 - 1 . 3 s i および C 3 1 5 - 4 . 3 s

10

20

30

40

50

i への SW620 細胞 (図 14 A) および AGS 細胞 (図 14 B) の曝露後の c-Myc の下方制御を示すウェスタンブロットのパネルである。「UT」は非トランスフェクション細胞培養物である。「Neg.」は、任意の公知の遺伝子と相同でない siRNA 配列でトランスフェクトしたサンプルを示す。「Eg5」は、siRNA ターゲティング Eg5 でトランスフェクトしたサンプルを示す。図 14 C は、抗 AMIGO-2 抗体 MAB2080 への細胞の曝露後の SW620 細胞および AGS 細胞の上方制御を示すウェスタンブロットを示す。

【図 15 A】AMIGO-2 モジュレーターにより一致させて下方制御した遺伝子を示す。

【図 15 B】AMIGO-2 モジュレーターにより一致させて上方制御 (図 15 B) した遺伝子を示す。

【図 16】SW620 細胞由来のホールセル溶解物中の cJUN、cFosL1、および チュープリンタンパク質に及ぼす AMIGO-2 特異的抗体 MAB2080 (A) の影響を示すウェスタンブロットのパネルを示す (上の 2 つのパネル)。下のパネル中の一連のウェスタンブロットは、細胞中の総 ERK と比較した ERK のリン酸化 (pERK) に及ぼす MAB2080 (A) の影響を示す。「I」または「アイソタイプコントロール」は、非特異的マウス IgG での SW620 細胞の処置を示す。

【発明を実施するための形態】

【0048】

詳細な説明

本願の発明者らは、とりわけ、AMIGO-2 がいくつかの癌 (肺癌および結腸癌が含まれる) で過剰発現され、正常組織では発現が制限されることを発見した。驚いたことに、AMIGO-2 の阻害によって癌細胞生存が阻害される。さらに、AMIGO-2 の阻害によって下流マーカーレベル (例えば、サイクリン D1、サイクリン B1、c-Myc、cJun、FosL1、VEGF、ウロキナーゼ、または ERK) が調整されることが見出された。したがって、本発明は、癌の治療、診断、および画像化、特に、AMIGO-2 関連癌の治療、診断、および画像化、ならびに異常な AMIGO-2 発現に関連する他の疾患および障害の治療のための方法および組成物を提供する。本発明のこれらおよび他の態様を、本出願で提供する。

【0049】

定義

本書類を通して種々の定義を使用する。ほとんどの用語は、当業者による用語に起因する意味を有する。本書類中の以下または他の場所のいずれかで具体的に定義された用語は、全体として本発明の文脈で提供された意味を有し、当業者によって典型的に理解される通りである。

【0050】

本発明の実施には、他に示されない限り、当業者の範囲内の従来の化学的方法、生化学的方法、分子生物学的方法、免疫学的方法、および薬理学的方法を使用するであろう。かかる技術は、文献中で十分に説明されている。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition (Easton, Pennsylvania Mack Publishing Company, 1990)、Methods In Enzymology (S Colowick and N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc)、および Handbook of Experimental Immunology, Vols I-IV (D M Weir and C. C. Blackwell, eds., 1986, Blackwell Scientific Publications); および Sambrook et al, Molecular Cloning A Laboratory Manual (2nd Edition, 1989) を参照のこと。

【0051】

本明細書中で使用される場合、単数形「a」、「an」、および「the」には、他で

10

20

30

40

50

明確に示さない限り、複数形が含まれる。したがって、例えば、「抗体」の言及には、2つまたはそれを超えるかかる抗体の混合物が含まれる。

【0052】

本明細書中で使用される場合、用語「約」は、値の+/-30%、+/-20%、+/-10%、または+/-5%をいう。

【0053】

本明細書中で使用される場合、アリピン1 (Alivin1) (ALI1) およびDEGAとしても公知の用語「AMIGO-2」は、Ig様ドメイン2を有する接着分子をいう。AMIGO-2のヌクレオチド配列を配列番号1 (Genbank受入番号NM_181847)として示し、AMIGO-2のアミノ酸配列を配列番号2 (Genbank受入番号NM_181847)として示す。用語「AMIGO-2」には、ホモログ(核酸およびアミノ酸の両方)も含まれる。いくつかの実施形態では、かかるAMIGO-2核酸およびアミノ酸は、未変性のAMIGO-2核酸またはアミノ酸の1つまたは複数の活性を保持する。

10

【0054】

用語「ポリペプチド」および「タンパク質」は交換可能に使用され、任意の長さのアミノ酸の重合形態をいい、コードアミノ酸および非コードアミノ酸、化学的または生化学的に修飾されたか誘導体化されたアミノ酸、および修飾ペプチド骨格を有するポリペプチドが含まれ得る。この用語には、融合タンパク質が含まれ、非相同アミノ酸配列を有する融合タンパク質、非相同および相同なリーダー配列を有する融合物(N末端メチオニン残基を含むか含まない)、免疫学的にタグ化されたタンパク質などが含まれるが、これらに限定されない。

20

【0055】

用語「個体」、「被験体」、「宿主」、および「患者」は交換可能に使用され、診断、治療、または療法を受けることが望まれる任意の被験体、特にヒトをいう。他の被験体には、ウシ、イヌ、ネコ、モルモット、ウサギ、ラット、マウス、およびウマなどが含まれ得る。いくつかの実施形態では、被験体はヒトである。

【0056】

本明細書中で使用される場合、「癌」は、原発性または転移性の癌をいう。用語「癌細胞」は、形質転換された細胞をいう。これらの細胞は癌患者から単離することができ、あるいはこれらの細胞は*in vitro*で癌性となるように形質転換された細胞であり得る。癌細胞は、多数のサンプル型(任意の組織または細胞培養株が含まれる)に由来し得る。いくつかの実施形態では、癌細胞は、過形成、腫瘍細胞、または新生物である。いくつかの実施形態では、癌細胞を、肺組織、膀胱組織、腎臓組織、結腸組織、乳房組織、子宮組織、卵巣組織、または膵臓組織から単離する。いくつかの実施形態では、癌細胞を、公的に利用可能な確立された細胞株から採取する。いくつかの実施形態では、癌細胞を、既存の患者サンプルまたは癌細胞を含むライブラリーから単離する。いくつかの実施形態では、癌細胞を単離し、次いで、異なる宿主(例えば、異種移植片)中に移植する。いくつかの実施形態では、癌細胞を移植し、SCIDマウスモデル中で使用する。いくつかの実施形態では、癌細胞は、肺癌または結腸癌である。いくつかの実施形態では、癌細胞は、胃癌以外の癌である。

30

40

【0057】

本明細書中で使用される場合、用語「形質転換された」は、その子孫によって安定に遺伝する細胞の性質の任意の変化をいう。いくつかの実施形態では、「形質転換された」は、正常な細胞の癌性細胞(cancerous cell)(腫瘍を生じることができる細胞)への変化をいう。いくつかの実施形態では、形質転換細胞は不死化される。形質転換は、多数の要因(受容体リン酸化の非存在下での受容体の過剰発現、ウイルス感染、癌遺伝子および/もしくは腫瘍抑制遺伝子の変異、ならびに/または細胞の成長および/もしくは不死化特性を変化させる任意の他の技術が含まれる)に起因し得る。

【0058】

50

「癌表現型」は、一般に、癌性細胞に特徴的な種々の生物学的現象のいずれかをいい、この現象は癌型によって変化し得る。癌表現型を、一般に、例えば、細胞の成長または増殖（例えば、無秩序な成長または増殖）、細胞周期の調節、細胞運動、細胞間相互作用、または転移などの異常によって同定する。

【0059】

本明細書中で使用される場合、用語「転移」は、癌の起源（例えば、原発性腫瘍）から離れた部位に広がった癌をいう。転移部位には、骨、リンパ節、肺、肝臓、および脳が含まれるが、これらに限定されない。

【0060】

本明細書中で使用される場合、用語「血管形成」は、患者の血管の発達をいう。

10

【0061】

本明細書中で使用される場合、用語「臨床エンドポイント」は、癌を示す測定可能な事象をいう。臨床エンドポイントには、最初の転移時期、その後の転移時期、転移物のサイズおよび/または数、腫瘍のサイズおよび/または数、腫瘍の位置、腫瘍の侵襲性、生活の質、および痛みなどが含まれるが、これらに限定されない。当業者は、臨床エンドポイントを決定および測定する能力を有すると考えられる。臨床エンドポイントの測定方法は、当業者に公知である。

【0062】

本明細書中で使用される場合、用語「サンプル」は、患者由来の生体物質をいう。本発明によってアッセイされるサンプルは、任意の特定の型に制限されない。サンプルには、制限されない例として、単一の細胞、複数の細胞、組織、腫瘍、体液、生体分子、または任意の上記の上清もしくは抽出物が含まれる。例には、生検のために取り出した組織、切除中に取り出した組織、血液、尿、リンパ組織、リンパ液、脳脊髄液、粘膜、および糞便のサンプルが含まれる。使用サンプルは、アッセイ形式、検出方法、およびアッセイされる組織、細胞、または抽出物の腫瘍の性質に基づいて変化するのであろう。サンプルの調製方法は当該分野で周知であり、使用する方法に適合するサンプルが得られるように容易に適合することができる。

20

【0063】

本明細書中で使用される場合、用語「生体分子」には、ポリペプチド、核酸、および糖類が含まれるが、これらに限定されない。

30

【0064】

本明細書中で使用される場合、用語「調整」は、細胞の内部、外部、または表面上に存在する遺伝子、タンパク質、または任意の分子の質または量の変化をいう。変化は、分子の発現またはレベルの増加または減少であり得る。用語「調整する」には、生物学的機能/活性（細胞シグナル伝達活性、細胞周期の調節、キナーゼ活性、セリン/トレオニンキナーゼ活性、細胞間相互作用活性、倍数性に影響を及ぼす活性、染色体安定性、腫瘍形成能、細胞運動性、転移、癌細胞生存、癌細胞の成長、増殖、細胞周期を介した進行、足場非依存性増殖、AMIGO-2タンパク質の細胞膜への局在化、細胞間相互作用（AMIGO-2とAMIGO-1（Genbank受入番号 NM_020703、配列番号63に記載のアミノ酸）またはAMIGO-3（Genbank受入番号 NM_198722、配列番号64に記載のアミノ酸配列）の一方または両方との間の相互作用が含まれる）、細胞質リン酸化AMIGO-2タンパク質レベル、血管形成、神経の伸長、または細胞死が含まれるが、これらに限定されない）の質または量の変化も含まれる。

40

【0065】

本明細書中で使用される場合、用語「モジュレーター」は、癌に関連する1つまたは複数の生理的事象または生化学的事象を調整する組成物をいう。いくつかの実施形態では、モジュレーターは、癌に関連する1つまたは複数の生物活性を阻害する。いくつかの実施形態では、モジュレーターは、小分子、抗体、模倣物、デコイ、またはオリゴヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、モジュレーターは、リガンド結合の遮断またはリガンド結合部位の競合によって作用する。いくつかの実施形態では、モジュレーターは、

50

リガンド結合と無関係に作用する。いくつかの実施形態では、モジュレーターは、リガンド結合部位を競合しない。いくつかの実施形態では、モジュレーターは、癌に關与する遺伝子産物の発現を遮断する。いくつかの実施形態では、モジュレーターは、癌に關与する2つまたはそれを超える生体分子の物理的相互作用を遮断する。いくつかの実施形態では、本発明のモジュレーターは、細胞シグナル伝達活性、細胞周期制御、キナーゼ活性、セリン/トレオニンキナーゼ活性、細胞間相互作用活性、倍数性に影響を及ぼす活性、染色体安定性、腫瘍形成能、細胞運動性、転移、癌細胞生存、癌細胞の成長、増殖、細胞周期を介した進行、足場非依存性増殖、AMIGO-2タンパク質の細胞膜への局在化、細胞間相互作用（AMIGO-2とAMIGO-1またはAMIGO-3の一方または両方との間の相互作用が含まれる）、細胞質リン酸化AMIGO-2タンパク質レベル、血管形成、または神経の伸長からなる群より選択される1つまたは複数のAMIGO-2活性を阻害する。いくつかの実施形態では、AMIGO-2モジュレーターはAMIGO-2発現を阻害する。いくつかの実施形態では、モジュレーターは、細胞周期のG2/M期への分裂細胞の進行を阻害する。

10

【0066】

「遺伝子産物」は、遺伝子によって発現または産生された生体高分子産物である。遺伝子産物は、例えば、非スプライシングRNA、mRNA、スプライスバリエントmRNA、ポリペプチド、翻訳後修飾ポリペプチド、スプライスバリエントポリペプチドなどであり得る。テンプレートとしてRNA遺伝子産物（すなわち、RNAのcDNA）を使用して作製される生体高分子産物もこの用語に含まれる。遺伝子産物を、酵素的、組換えの、化学的、または遺伝子が未変性である細胞内で作製することができる。いくつかの実施形態では、遺伝子産物がタンパク質性である場合、遺伝子産物は生物活性を示す。いくつかの実施形態では、遺伝子産物が核酸である場合、遺伝子産物を、生物活性を示すタンパク質性遺伝子産物に翻訳することができる。

20

【0067】

本明細書中で使用される場合、「AMIGO-2活性の調整」は、例えば、作用因子（agent）のAMIGO-2ポリヌクレオチドまたはポリペプチドとの相互作用、AMIGO-2転写および/または翻訳の阻害（例えば、AMIGO-2遺伝子またはAMIGO-2遺伝子発現産物とのアンチセンスまたはsiRNAの相互作用、AMIGO-2発現を容易にする転写因子の調整による）などの結果であり得るAMIGO-2活性の増加または減少をいう。例えば、AMIGO-2活性の調整は、生物活性の増加または生物活性の減少をいう。AMIGO-2活性の調整はまた、1つまたは複数のAMIGO-2表現型の増加または減少をいう。AMIGO-2活性を、手段（AMIGO-2ポリペプチドレベルの評価またはAMIGO-2転写レベルの評価が含まれるが、これらに限定されない）によって評価することができる。AMIGO-2活性の比較を、特に、AMIGO-2下流マーカーレベルの測定、染色体安定性の測定、キナーゼ活性の測定、腫瘍形成能の測定、転移の測定、AMIGO-2シグナル伝達の測定、AMIGO-2媒介細胞接着の測定、AMIGO-2媒介癌細胞アポトーシスの測定、ERKリン酸化の測定、癌細胞の成長の測定、腫瘍形成の測定、サイクリン産生の測定、細胞増殖の測定、癌細胞の成長の測定、足場非依存性増殖の測定、細胞周期制御の測定、神経ガイダンス（neuro-
nal guidance）の測定、癌細胞運動性の測定、AMIGO-2タンパク質の細胞膜への局在化の測定、細胞間相互作用（AMIGO-2とAMIGO-1またはAMIGO-3の一方または両方との間の相互作用が含まれる）の測定、細胞質リン酸化AMIGO-2タンパク質レベルの測定、血管形成の測定、および細胞死の測定によって行うこともできる。

30

40

【0068】

いくつかの実施形態では、AMIGO-2活性の阻害は特に興味深い。本明細書中で使用される場合、用語「阻害する」は、活性または量の低減、減少、不活化、または下方制御をいう。例えば、本発明の文脈では、AMIGO-2モジュレーターは、1つまたは複数の腫瘍形成能、癌細胞運動性、細胞接着、転移、癌細胞生存、キナーゼ活性、増殖、足

50

場非依存性増殖、癌細胞運動性、A M I G O - 2 タンパク質の細胞膜への局在化、A M I G O - 2 と A M I G O - 1 または A M I G O - 3 の一方または両方との間の相互作用、神経ガイダンス、細胞質リン酸化 A M I G O - 2 タンパク質レベル、リン酸化 E R K レベル、および血管形成を阻害することができる。かかる活性の阻害は、コントロールと比較して、少なくとも 25%、少なくとも 50%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または 100% であり得る。当業者は、A M I G O - 2 調整を測定する能力を有すると考えられる。例示的アッセイの非限定的な例を以下に示す。

【0069】

したがって、本明細書中で使用される場合、用語「A M I G O - 2 の阻害」は、1つまたは複数の A M I G O - 2 媒介性生物活性の低減、減少、不活化、または下方制御をいう。「A M I G O - 2 生物活性」の阻害は、例えば、腫瘍形成能、癌細胞運動性、細胞接着、転移、癌細胞生存、キナーゼ活性、増殖、足場非依存性増殖、癌細胞運動性、A M I G O - 2 タンパク質の細胞膜への局在化、A M I G O - 2 と A M I G O - 1 または A M I G O - 3 の一方または両方との間の相互作用、神経ガイダンス、細胞質リン酸化 A M I G O - 2 タンパク質レベル、リン酸化 E R K レベル、または血管形成の低減、減少、不活化、または下方制御をいう。かかる活性の阻害は、コントロールと比較して、少なくとも 25%、少なくとも 50%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または 100% であり得る。

【0070】

いくつかの実施形態では、活性化されて A M I G O - 2 活性が増加する A M I G O - 2 活性の調整は特に興味深い。A M I G O - 2 モジュレーターは、1つまたは複数の倍数性および細胞死を阻害することができる。A M I G O - 2 活性の活性化、上方制御、または増加は、コントロールと比較して、少なくとも 125%、少なくとも 150%、少なくとも 200%、少なくとも 250%、少なくとも 300%、少なくとも 500% であり得る。例えば、細胞死を 200% 増加させる A M I G O - 2 モジュレーターは、A M I G O - 2 モジュレーターを欠くコントロールと比較して、細胞死を 2 倍に増加させる。

【0071】

本明細書中で使用される場合、用語「癌細胞における差発現」および「癌細胞で差発現されたポリヌクレオチド」は、本明細書中で交換可能に使用され、癌性でない同一細胞型の細胞と比較した場合に癌性細胞中で差発現される遺伝子に相当するか対応するポリヌクレオチドをいう（例えば、mRNA は、少なくとも約 25%、少なくとも約 50% ~ 約 75%、少なくとも約 90%、少なくとも約 1.5 倍、少なくとも約 2 倍、少なくとも約 5 倍、少なくとも約 10 倍、または少なくとも約 50 倍またはそれを超えて異なる（例えば、より高いかより低い）レベルで見出される）。比較は、例えば、組織中の細胞型をある程度識別しうる *in situ* ハイブリッド形成または別のアッセイ方法を使用する場合、可能である。その組織供給源から取り出した細胞間または *in situ* での第 1 の細胞とその組織供給源から取り出した第 2 の細胞との間の比較も行うことができるか、別法として行うことができる。いくつかの実施形態では、遺伝子は、正常細胞と比較して癌遺伝子中で上方制御される。

【0072】

癌の少なくとも 1 つの症状が緩和、終結、遅延、または防止される場合、A M I G O - 2 関連癌は、「阻害される」。本明細書中で使用される場合、癌の再発または転移が低減、遅延、遅滞、または防止される場合もまた、A M I G O - 2 関連癌は「阻害される」。

【0073】

本明細書中で使用される場合、句「A M I G O - 2 媒介性細胞接着を阻害する」は、少なくとも 1 つの細胞が A M I G O - 2 を差発現する、A M I G O - 2 モジュレーターの存在下での細胞間接着の減少、低減、または根絶をいう。この文脈では、A M I G O - 2 媒介性細胞接着を、A M I G O - 2 モジュレーターによって、A M I G O - 2 モジュレー

10

20

30

40

50

ターの非存在下でのAMIGO-2媒介性細胞接着と比較して、少なくとも25%、少なくとも50%、少なくとも75%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、100%まで減少させることができる。AMIGO-2媒介性細胞接着を、例えば、目的の細胞の標識、これらの基質に接着する非標識細胞集団とのインキュベーション、および非接着集団から接着集団を分離するための洗浄によって比較することができる。この様式では、細胞接着を、基質上に保持された標識量の測定によって決定する。アッセイ系の例には、蛍光プローブ(カルセインAM、CFMDA(5-クロロメチルフルオレセインジアセタート)、5(6)-CFDA-SE [5-(および-6)-カルボキシフルオレセインジアセタート、スクシニミジルエステル])での標識および蛍光プレートリーダーまたはフローサイトメトリーによる蛍光の測定が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0074】

本明細書中で使用される場合、句「癌細胞の成長を阻害する」は、癌細胞がAMIGO-2を発現する、AMIGO-2モジュレーターが存在下での癌細胞の成長の減少、軽減、または根絶をいう。いくつかの実施形態では、細胞は、他の正常な細胞および/または他の癌細胞と比較して、AMIGO-2を差発現する。この文脈では、細胞の成長を、AMIGO-2モジュレーターによって、AMIGO-2モジュレーターの非存在下での癌細胞成長と比較して、少なくとも25%、少なくとも50%、少なくとも75%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、100%まで減少させることができる。癌細胞成長の比較を、例えば、MTTアッセイ(例えば、Vybrant(登録商標)MTT細胞増殖アッセイキット(Invitrogen))、BrdU組み込み(例えば、Absolute-S SBIPアッセイ(Invitrogen))、細胞内ATPレベルの測定(例えば、ATP Lite(商標)-M、1,000アッセイキット(PerkinElmer))またはATP細胞生存アッセイキット(BioVision)の使用)、DiOcl8アッセイ、膜透過性色素(Invitrogen)、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ活性アッセイ(例えば、Vybrant細胞毒性アッセイ(Invitrogen))、または細胞LDH活性の測定を使用して行うことができる。

20

【0075】

本明細書中で使用される場合、句「腫瘍形成を阻害する」は、腫瘍がAMIGO-2を差発現する細胞を含む、AMIGO-2モジュレーターが存在下での腫瘍形成の減少、低減、または根絶をいう。この文脈では、腫瘍形成を、AMIGO-2モジュレーターによって、AMIGO-2モジュレーターの非存在下での腫瘍形成と比較して、少なくとも25%、少なくとも50%、少なくとも75%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、および100%まで減少させることができる。腫瘍形成の比較を、例えば、細胞ベースのアッセイ(例えば、軟寒天中のコロニー形成)、典型的には目的の細胞の動物(例えば、胸腺欠損マウスまたはラット、照射したマウスまたはラット;免疫学的に特権を与えられた部位(脳、頬袋、または眼など)への接種、同系動物の接種)への注射に依存した腫瘍形成のin vivoモデル、および定義した期間後の塊のサイズのモニタリングを使用して行うことができる。

30

40

【0076】

本明細書中で使用される場合、句「サイクリンD1を阻害する」は、AMIGO-2媒介性サイクリン産生の減少、低減、または根絶をいう。この文脈では、AMIGO-2媒介性サイクリン産生を、阻害剤によって、AMIGO-2モジュレーターの非存在下でのAMIGO-2媒介性サイクリン産生と比較して、少なくとも25%、少なくとも50%、少なくとも75%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、100%まで減少させることができる。サイクリン産生の比較を、例えば、RT-PCRまたはノーザンブロッティングによるサイクリンmRNAレベルの測定、免疫ブロッティング、免疫沈降、またはELISAによるサイクリンポリペプチドレベルの測定、機能アッセイ(例えば、CDK、p21WAF1、p27 KIP-1をターゲティングする抗体を使

50

用したサイクリン依存性キナーゼ (CDK) などのサイクリン制御因子と複合体化したサイクリンレベルを測定するための同時免疫沈降アッセイが含まれる) の使用によって行うことができ、CDKによるサイクリンのリン酸化の測定を、放射性標識および免疫沈降分析またはFRETベースの方法(例えば、CDK/サイクリンAアッセイキット(Molecular Devices))によってアッセイすることができる。

【0077】

本明細書中で使用される場合、句「サイクリンB1を阻害する」は、AMIGO-2媒介性サイクリン産生の減少、低減、または根絶をいう。この文脈では、AMIGO-2媒介性サイクリン産生を、阻害剤によって、AMIGO-2モジュレーターの非存在下でのAMIGO-2媒介性サイクリン産生と比較して、少なくとも25%、少なくとも50%、少なくとも75%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、100%まで減少させることができる。サイクリン産生の比較を、サイクリンD1についての上記の方法にしたがって行うことができる。

10

【0078】

本明細書中で使用される場合、「FosL1の阻害」は、AMIGO-2媒介性FosL1産生の減少、低減、または根絶をいう。この文脈では、AMIGO-2媒介性FosL1産生を、阻害剤によって、AMIGO-2モジュレーターの非存在下でのAMIGO-2媒介性FosL1産生と比較して、少なくとも25%、少なくとも50%、少なくとも75%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、100%まで減少させることができる。FosL1産生の比較を、例えば、RT-PCRまたはノーザンブロットングによるFosL1 mRNAレベルの測定、免疫ブロットング、免疫沈降、ELISA、または免疫組織化学によるFosL1ポリペプチドレベルの測定によって行うことができる。FosL1発現(例えば、mRNAまたはタンパク質発現)の適切な測定方法の例は、本発明の実施例中に示され、例えば、Matsuoら、(2000) Nature Genet. 24 184-187およびSahinら、(2005) Pancreas 30(2) 158-167にも記載されている。

20

【0079】

本明細書中で使用される場合、「c-Mycの阻害」は、AMIGO-2媒介性c-Myc産生の減少、低減、または根絶をいう。この文脈では、AMIGO-2媒介性c-Myc産生を、阻害剤によって、AMIGO-2モジュレーターの非存在下でのAMIGO-2媒介性c-Myc産生と比較して、少なくとも25%、少なくとも50%、少なくとも75%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、100%まで減少させることができる。c-Myc産生の比較を、例えば、RT-PCRまたはノーザンブロットングによるc-Myc mRNAレベルの測定、または免疫ブロットング、免疫沈降、ELISA、もしくは免疫組織化学によるc-Mycポリペプチドレベルの測定によって行うことができる。あるいは、またはさらに、c-Mycを、例えば、c-Myc転写因子が標的遺伝子の転写を促進する能力によって「機能的に」測定することができる。標的遺伝子は内因性遺伝子であり得るか、外因性導入遺伝子(すなわち、レポーター遺伝子)であり得る。標的遺伝子mRNAまたはタンパク質の発現の測定を、本明細書に記載の任意の方法を使用して行うことができる。いくつかの例では、レポーター遺伝子は、測定可能な活性を有する酵素(例えば、ルシフェラーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、または西洋ワサビペルオキシダーゼ)または検出可能なタンパク質(例えば、緑色蛍光タンパク質または赤色蛍光タンパク質)であり得る。c-Myc発現(例えば、mRNAまたはタンパク質発現)の適切な測定方法の例は、共に当該分野で公知であり、本発明の実施例に十分に記載されている。レポーター遺伝子発現(特に、上記の酵素または検出可能なレポーター遺伝子)のモニタリング方法は、当該分野で周知であり、例えば、Cziepluchら、(1993) Oncogene 8(10) 2833-8に記載されている。

30

40

【0080】

本明細書中で使用される場合、「c-Junの阻害」は、AMIGO-2媒介性c-Jun

50

un 産生の減少、低減、または根絶をいう。この文脈では、AMIGO-2 媒介性 c-Jun 産生を、阻害剤によって、AMIGO-2 モジュレーターの非存在下での AMIGO-2 媒介性 c-Jun 産生と比較して、少なくとも 25%、少なくとも 50%、少なくとも 75%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、100%まで減少させることができる。c-Jun 産生の比較を、例えば、RT-PCR またはノーザンブロットングによる c-Jun mRNA レベルの測定、または免疫ブロットング、免疫沈降、ELISA、もしくは免疫組織化学による c-Jun ポリペプチドレベルの測定によって行うことができる。あるいは、またはさらに、c-Jun を、例えば、c-Jun 転写因子が標的遺伝子の転写を促進する能力によって「機能的に」測定することができる。標的遺伝子は内因性遺伝子であり得るか、外因性導入遺伝子（すなわち、レポーター遺伝子）であり得る。標的遺伝子 mRNA またはタンパク質の発現の測定を、本明細書に記載の任意の方法を使用して行うことができる。c-Jun 発現（例えば、mRNA またはタンパク質発現）の適切な測定方法の例は、共に当該分野で公知であり、本発明の実施例に十分に記載されており、例えば、Kharbanda ら、(1991) Biochemistry 30 7947-7952 and Kayahara ら、(2005) Mol. Cell. Biol. 25 (9) 3784-3792 にさらに記載されている。レポーター遺伝子発現（特に、上記の酵素または検出可能なレポーター遺伝子）のモニタリング方法は、当該分野で周知であり、上に記載されている。

10

【0081】

本明細書中で使用される場合、句「ERK リン酸化を阻害する」は、AMIGO-2 媒介性 ERK リン酸化の減少、低減、または根絶をいう。この文脈では、AMIGO-2 媒介性 ERK リン酸化を、AMIGO-2 モジュレーターによって、AMIGO-2 モジュレーターの非存在下での AMIGO-2 媒介性 ERK リン酸化と比較して、少なくとも 25%、少なくとも 50%、少なくとも 75%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、100%まで減少させることができる。ERK リン酸化の比較を、当業者に公知のリン酸化アッセイを使用して評価することができる。

20

【0082】

いかなる特定の理論または作用機構にも制限されないが、ERK のリン酸化が一般にその活性化を誘導するので、句「ERK リン酸化を阻害する」は、いくつかの実施形態では、リン酸化 ERK による 1 つまたは複数の ERK 基質の AMIGO-2 媒介性リン酸化の減少、低減、または根絶をもいうことができる。ERK 基質には、IEX-I、ELK1、パキシリン、Bcl-2、SOS、または SP1 が含まれるが、これらに決して制限されない。ERK のその基質上のキナーゼ活性のモニタリング方法は当該分野で公知であり、例えば、Merchant ら、(1999) BBRC 254 454-461; Chemiac k ら、(1994) J. Biol. Chem. 269 4717-4720; Cano ら、(1995) J. Cell Sci. 108 3599-3609; Garcia ら、(2004) EMBO J. 21: 5151-5163; および Tamura ら、(2004) FEBS Lett. 569 249-255 に記載されている。

30

【0083】

本明細書中で使用される場合、句「癌細胞生存を阻害する」は、AMIGO-2 を発現する癌細胞の生存の減少または低減をいう。いくつかの実施形態では、用語「癌細胞生存を阻害する」は、AMIGO-2 を発現する癌細胞のアポトーシスへの影響をいう。いくつかの実施形態では、癌細胞は、他の正常細胞および/または他の癌細胞と比較して AMIGO-2 を差発現する。この文脈では、AMIGO-2 発現癌細胞の生存を、阻害剤によって、AMIGO-2 モジュレーターの非存在下でのおよび/または正常細胞での癌細胞生存と比較して、少なくとも 25%、少なくとも 50%、少なくとも 75%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、100%まで減少させることができる。

40

【0084】

本明細書中で使用される場合、句「AMIGO-2 シグナル伝達を阻害する」は、AM

50

I G O - 2 を含む細胞シグナル伝達カスケードの下流メンバーに及ぼす A M I G O - 2 の影響の減少、軽減、または根絶をいう。A M I G O - 2 を含む細胞シグナルカスケードは、細胞の成長および生存を媒介する経路を含む。いくつかの実施形態では、細胞の成長および生存を媒介する経路は、活性化された成長因子経路（E G F R 経路または - カテニン経路など）の下流である。いくつかの実施形態では、経路は、とりわけ、 - カテニンを安定化させる変異 - カテニン経路である。いくつかの実施形態では、A M I G O - 2 シグナル伝達の阻害により、1 つまたは複数の下流マーカーが上方制御される。いくつかの実施形態では、A M I G O - 2 シグナル伝達の阻害により、1 つまたは複数の下流マーカーが下方制御される。

【 0 0 8 5 】

A M I G O - 2 シグナル伝達の阻害を、細胞シグナル伝達経路の下流メンバーのポリペプチドレベルまたはポリヌクレオチドレベルの測定によって決定することができる。当業者は、A M I G O - 2 ポリペプチドおよび / またはポリヌクレオチドレベルを測定する能力を有すると考えられる。当業者は、A M I G O - 2 下流マーカーレベルも測定することができる。

【 0 0 8 6 】

本明細書中で使用される場合、句「細胞間相互作用を阻害する」は、A M I G O - 2 を発現する 2 つまたはそれを超える細胞の間の相互作用の低減または消失をいう。いくつかの実施形態では、細胞間の相互作用によって細胞シグナルが得られる。細胞間相互作用を、当業者に公知の多数の方法（同時培養し、例えば、異なる蛍光膜色素（P K H 2 6 および P K H 6 7 (S i g m a) が含まれる）で事前に標識した細胞の間の膜交換の観察が含まれるが、これらに限定されない）によって検出することができる。

【 0 0 8 7 】

本明細書中で使用される場合、句「増殖を阻害する」は、A M I G O - 2 媒介性増殖の低減または消失をいい、当業者に公知の多数の方法によって測定することができる。細胞増殖アッセイには、M T T アッセイ（例えば、V y b r a n t (登録商標) M T T 細胞増殖アッセイキット (I n v i t r o g e n))、B r d U 組み込みアッセイ（例えば、A b s o l u t e - S S B I P アッセイ (I n v i t r o g e n))、細胞内 A T P レベルの測定（アッセイの市販品には、A T P L i t e (商標) - M、1, 0 0 0 アッセイキット (P e r k m e l m e r) および A T P 細胞生存アッセイキット (B i o V i s i o n))、D i O c 1 8 アッセイ、膜透過性色素 (I n v i t r o g e n)、グルコース - 6 - リン酸デヒドロゲナーゼ活性アッセイ（例えば、V i b r a n t 細胞毒性アッセイ (I n v i t r o g e n))、細胞 L D H 活性の測定、ならびに ³ H - チミジン組み込みおよび細胞力価 G l o アッセイ (P r o m e g a) が含まれるが、これらに限定されない。

【 0 0 8 8 】

本明細書中で使用される場合、句「血管形成を阻害する」は、A M I G O - 2 媒介性血管形成の低減または消失をいう。血管形成を、当業者に公知の多数の方法（細胞増殖アッセイ、細胞遊走アッセイ、細胞分化アッセイ、器官培養 (e x v i v o) アッセイ、ニワトリ絨毛尿膜 (C A M) アッセイ、角膜血管形成アッセイ、マトリゲルプラグアッセイ、および S C I D マウス、ヌードマウス、または C 5 7 B L マウスにおける腫瘍容積アッセイが含まれるが、これらに限定されない）によって検出することができる。

【 0 0 8 9 】

細胞遊走アッセイには、ブラインドウェル走化性チャンパー（例えば、修飾ボイデンチャンパーアッセイ）およびファゴカイネティックトラックアッセイ (P h a g o k i n e t i c t r a c k a s s a y) が含まれるが、これらに限定されない。細胞分化アッセイには、コラーゲン、フィブリン凝塊、またはマトリゲル中での管形成およびその後の電子顕微鏡法が含まれるが、これらに限定されない。器官培養 (e x v i v o) アッセイには、ラット大動脈輪アッセイおよびニワトリ大動脈弓アッセイが含まれるが、これらに限定されない。

10

20

30

40

50

【0090】

本明細書中で使用される場合、句「細胞周期を介した進行を阻害する」は、細胞分裂の遅延または失速をいう。細胞周期の進行を、プロモデオキシウリジン (BRDU) 組み込みによってアッセイすることができる。かかるアッセイは、新規に合成されたDNAへのBRDUの組み込みによってDNA合成を受けた細胞集団を同定する。次いで、新規に合成されたDNAを、抗BRDU抗体 (Hoshinoら、, 1986, *int. J. Cancer* 38, 369; Campanaら、, 1988, *J. Immunol. Meth.* 107, 79) または他の手段を使用して検出することができる。細胞増殖を、ホスホ-ヒストンH3染色 (ヒストンH3のリン酸化によって有糸分裂を受けた細胞集団を同定する) によってアッセイすることもできる。セリン10でのヒストンH3のリン酸化を、ヒストンH3のセリン10残基のリン酸化形態に特異的な抗体を使用して検出する (Chadlee, D. N. 1995, *J. Biol. Chem.* 270: 20098-105)。細胞増殖を、 $[^3\text{H}]$ -チミジン組み込みを使用して試験することもできる (Chen, J., 1996, *Oncogene* 13: 1395-403; Jeoung, J., 1995, *J. Biol. Chem.* 270: 18367-73)。このアッセイにより、S期のDNA合成の定量的特徴づけが可能になる。このアッセイでは、DNAを合成する細胞は、新規に合成されたDNAに $[^3\text{H}]$ -チミジンを組み込みであろう。次いで、組み込みを、標準的な技術 (シンチレーションカウンター (例えば、Beckman LS 3800 液体シンチレーションカウンター) 中での放射性同位体の計数など) によって測定することができる。別の増殖アッセイは、色素アラマブルー (Biosource International から入手可能) を使用する。この色素は生細胞中で還元された場合に蛍光を発し、細胞数が間接的に測定される (Voytik-Harbin SLら、, 1998, *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 34: 239-46)。さらに別の増殖アッセイ (MTSアッセイ) は、工業用化学薬品の *in vitro* 細胞傷害性評価に基づき、可溶性テトラゾリウム塩 (MTS) を使用する。MTSアッセイは市販されており、Promega Cell Titer 96 (登録商標) Aqueous 非放射性細胞増殖アッセイ (カタログ番号G5421) が含まれる。細胞増殖を、軟寒天中のコロニー形成によってアッセイすることもできる (Sambrookら、, *Molecular Cloning, Cold Spring Harbor* (1989))。細胞増殖を、代謝活性細胞の指標としてのATPレベルの測定によってアッセイすることもできる。かかるアッセイは、市販されており、Cell Titer-Glo (商標) (Promega) が含まれる。細胞周期増殖を、フローサイトメトリーによってアッセイすることもできる (Gray JWら、(1986) *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med.* 49: 237-55)。細胞を、ヨウ化プロピジウムで染色し、フローサイトメトリーで評価して細胞周期の異なる段階での細胞蓄積を測定することができる。

【0091】

本明細書中で使用される場合、「AMIGO-2下流マーカー」は、正常または健常な組織におけるその発現レベルと比較した癌組織または癌細胞中の発現レベルの変化を示すが、AMIGO-2モジュレーターの存在下で適切に変化する遺伝子または活性である。いくつかの実施形態では、下流マーカーは、AMIGO-2を本発明のAMIGO-2モジュレーターと攪乱した場合の発現レベルの変化を示す。AMIGO-2下流マーカーには、サイクリンD1、サイクリンB1、c-Myc、VEGF、ウロキナーゼ、cjun、FosL1、またはERKが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、PARP1の切断が、AMIGO-2活性の下流マーカーである。

【0092】

本明細書中で使用される場合、句「癌細胞アポトーシスの増加」は、AMIGO-2モジュレーターの存在下でのAMIGO-2を発現する癌細胞のアポトーシスの増加をいう。この文脈では、癌細胞アポトーシスを、AMIGO-2モジュレーターによって、AMIGO-2モジュレーターの非存在下での癌細胞アポトーシスと比較して、少なくとも2

5%、少なくとも50%、少なくとも75%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、100%まで増加させることができる。いくつかの実施形態では、癌細胞は、正常細胞および/または他の癌細胞と比較してAMIGO-2を差分発現する。癌細胞アポトーシスの比較を、例えば、DNA断片化、カスパーゼ活性、ミトコンドリア膜電位の喪失、活性酸素種(ROS)産生の増加、細胞内酸性化、クロマチン凝縮、細胞表面上のホスファチジルセリン(PS)レベル、および細胞膜透過性の増加の測定によって行うことができる。

【0093】

DNA断片化を、例えば、TUNELアッセイ(末端デオキシヌクレオチドトランスフェラーゼdUTPニック末端標識)を使用して測定することができる。市販のアッセイバージョンは、広範に利用可能な、例えば、APO-BrdU(商標)TUNELアッセイキット(Invitrogen)、APO-DIRECT(商標)キット(BD Biosciences Pharmmgen)、およびApoAlert(商標)DNA断片化アッセイキット(Clontech, a Takara Bio Company)である。

10

【0094】

カスパーゼ活性を、特定のカスパーゼに特異的な蛍光発生基質、発色基質、および発光基質を介してモニタリングすることができる。市販のアッセイキットは、少なくとも1、2、3、6、7、8、および9について利用可能である(例えば、Invitrogen, Chemicon, CalBiochem, BioSource International, Biovisionを参照のこと)。

20

【0095】

ミトコンドリア膜電位の喪失を、健常に活動的なミトコンドリア中に差分的に蓄積される蛍光色素を使用して測定することができる。1つの非限定的な例は、InvitrogenのMito Tracker Redシステムである。

【0096】

活性酸素種(ROS)の産生を、蛍光色素(例えば、H2DCFDA(Invitrogen)が含まれる)を使用して測定することができる。

【0097】

細胞内酸性化を、蛍光色素または発色色素を使用して測定することができる。

30

【0098】

クロマチン凝縮を、蛍光色素(例えば、Hoechst 33342が含まれる)を使用して測定することができる。

【0099】

細胞表面上のホスファチジルセリン(PS)レベルを測定することができる。例えば、アネキシンVは、PSに対する親和性が高い。多数の市販のアッセイは、細胞表面への標識アネキシンの結合のモニタリングに適切である。

【0100】

細胞膜透過性を、色素(アポトーシス細胞に侵入することができるが、壊死細胞に侵入できない蛍光色素YO-PRO-I(Invitrogen)など)を使用して測定することができる。

40

【0101】

本明細書中で使用される場合、用語「上方制御する」は、活性または量の増加、活性化、または刺激をいう。

【0102】

本明細書中で使用される場合、用語「N末端」は、タンパク質の最初の10アミノ酸をいう。

【0103】

本明細書中で使用される場合、用語「C末端」は、タンパク質の最後の10アミノ酸をいう。

50

【0104】

本明細書中で使用される場合、用語「ドメイン」は、生体分子の既知のもしくは想定される機能に寄与する生体分子の構造部分をいう。ドメインは、その領域または一部と共存することができ、その領域の全部または一部に加えて、特定の領域と異なる生体分子の一部を組み込むこともできる。

【0105】

本明細書中で使用される場合、用語「細胞外ドメイン」は、細胞の外側または外部である分子の一部をいう。本発明の文脈では、N末端細胞外ドメインは、第1の膜貫通ドメインの直前の分子のN末端に存在する細胞外ドメインをいう。2つの膜貫通(TM)ドメインの間(例えば、TM2との3との間)の細胞外ドメインの文脈では、細胞外ドメインは、AMIGO-2の第2の膜貫通ドメインと第3の膜貫通ドメインとの間の細胞膜の外部のAMIGO-2の一部をいう。

10

【0106】

本明細書中で使用される場合、用語「リガンド結合ドメイン」は、AMIGO-2の対応する未変性配列の少なくとも1つの定量的結合活性を保持する受容体の任意の部分または領域をいう。

【0107】

用語「領域」は、生体分子の一次構造の物理的に連続した部分をいう。タンパク質の場合、領域を、タンパク質のアミノ酸配列の連続部分によって定義される。いくつかの実施形態では、「領域」は、生体分子の機能に関連する。

20

【0108】

本明細書中で使用される場合、用語「フラグメント」は、生体分子の一次構造の物理的に連続した部分をいう。タンパク質の場合、この部分を、タンパク質のアミノ酸配列の連続部分と定義し、少なくとも3~5アミノ酸、少なくとも8~10アミノ酸、少なくとも11~15アミノ酸、少なくとも17~24アミノ酸、少なくとも25~30アミノ酸、および少なくとも30~45アミノ酸をいう。オリゴヌクレオチドの場合、この部分を、オリゴヌクレオチドの核酸配列の連続する部分と定義し、少なくとも9~15ヌクレオチド、少なくとも18~30ヌクレオチド、少なくとも33~45ヌクレオチド、少なくとも48~72ヌクレオチド、少なくとも75~90ヌクレオチド、および少なくとも90~130ヌクレオチドをいう。いくつかの実施形態では、生体分子のフラグメントは生物活性を有する。本発明の文脈では、AMIGO-2ポリペプチドフラグメントは、配列番号2に示す全AMIGO-2ポリペプチド配列を含まない。いくつかの実施形態では、AMIGO-2フラグメントは、未変性AMIGO-2の1つまたは複数の活性を保持する。

30

【0109】

本明細書中で使用される場合、句「AMIGO-2関連細胞/腫瘍/サンプル」などは、非癌性および/または非転移性の細胞、サンプル、腫瘍、または他の病変と比較したAMIGO-2の差分発現によって特徴づけられる細胞、サンプル、腫瘍、または他の病変をいう。いくつかの実施形態では、AMIGO-2関連細胞、サンプル、腫瘍、または他の病変は、非転移性細胞、サンプル、腫瘍、または他の病変と比較したAMIGO-2発現の増加によって特徴づけられる。

40

【0110】

本明細書中で使用される場合、用語「抗体」は、標的タンパク質またはフラグメントに特異的なモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体、単鎖抗体、キメラ抗体、二官能性/二重特異性抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、および相補性決定領域(CDR)グラフィティング抗体をいい、抗体フラグメント(Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、Fv、キャメルボディ(camel body)、またはマイクロ抗体(micro antibody)が含まれる)も含まれる。用語「抗体」には、in vivo治療抗体遺伝子移入がさらに含まれる。

【0111】

50

本明細書中で使用する場合、用語「モノクローナル抗体」は、実質的に均一な抗体集団から得た抗体をいう。すなわち、集団を含む各抗体は、少量で存在し得る可能性のある天然に存在する変異を除いて同一である。モノクローナル抗体は、特異性が高く、単一の抗原部位に指向する。さらに、異なる決定基（エピトープ）に指向する異なる抗体を含むポリクローナル抗体調製物と対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に指向する。その特異性に加えて、モノクローナル抗体は、他の抗体によって夾雑することなく合成することができるという点で有利である。修飾語「モノクローナル」は、実質的に均一な抗体集団から得られる抗体の特徴を示し、任意の特定の方法によって抗体が産生される必要があると解釈されるべきではない。例えば、本発明で使用されるモノクローナル抗体を、Kohler et al (1975) Nature 256:495によつて最初に記載されたハイブリドーマ法によつて作製することができるか、組換えDNA法によつて作製することができる（例えば、米国特許第4816567号を参照のこと）。「モノクローナル抗体」を、例えば、Clacksonら、, Nature, 352:624-628 (1991) および Marksら、, J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991) に記載の技術を使用してファージ抗体ライブラリーから単離することもできる。

10

【0112】

本明細書中のモノクローナル抗体には、具体的には、重鎖および/または軽鎖の一部が、特定の種に由来するか特定の抗体クラスまたはサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一であるか相同する一方で、残りの鎖が別の種に由来するか別の抗体クラスまたはサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一であるか相同する、「キメラ」抗体およびかかる抗体のフラグメント（所望の生物活性を示す限り）が含まれる（米国特許第4,816,567号およびMorrissonら、, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)）。本明細書中の目的のキメラ抗体には、非ヒト霊長類（例えば、旧世界ザル、類人猿など）由来の可変ドメイン抗原結合配列およびヒト定常領域配列を含む「霊長類化」抗体が含まれる。

20

【0113】

「抗体フラグメント」は、インタクトな抗体の一部（いくつかの実施形態では、その抗原結合領域または可変領域を含む）を含む。抗体フラグメントの例には、Fab、Fab'、F(ab')₂、およびFvフラグメント、二特異性抗体、線状抗体（Zapataら、, Protein. Eng 8(10):1057-1062 [1995]）、単鎖抗体分子、ならびに抗体フラグメントから形成した多重特異性抗体が含まれる。

30

【0114】

「インタクトな」抗体は、抗原結合可変領域、軽鎖定常ドメイン（C_L）、重鎖定常ドメイン（C_{H1}、C_{H2}、およびC_{H3}）を含む抗体である。定常ドメインは、未変性配列定常ドメイン（例えば、ヒト未変性配列定常ドメイン）またはそのアミノ酸配列変異型であり得る。いくつかの実施形態では、インタクトな抗体は、1つまたは複数のエフェクター機能を有する。

【0115】

抗体「エフェクター機能」は、抗体のFc領域（未変性配列Fc領域またはアミノ酸配列変異Fc領域）に起因する生物活性をいう。抗体エフェクター機能の例には、C1q結合、補体依存性細胞傷害性、Fc受容体結合、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ADCC）、食作用、細胞表面受容体（例えば、B細胞受容体；BCR）の下方制御などが含まれる。

40

【0116】

「抗体依存性細胞媒介性細胞傷害」または「ADCC」は、一定の細胞傷害性細胞（例えば、ナチュラルキラー（NK）細胞、好中球、およびマクロファージ）上に存在するFc受容体（FcR）上に結合した分泌Igによつてこれらの細胞傷害性エフェクター細胞が抗原保有標的細胞に特異的に結合し、その後細胞毒で標細胞を死滅させることができる細胞傷害性形態をいう。抗体は、細胞傷害性細胞を「装備し」、かかる死滅に絶対に必

50

要である。ADCCの媒介のための初代細胞(NK細胞)は、FcRIIIのみを発現するのに対して、単球はFcRI、FcRII、およびFcRIIIを発現する。造血細胞上のFcR発現は、Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991)の464頁の表3中にまとめられている。目的の分子のADCC活性を評価するために、米国特許第5,500,362号または同第5,821,337号などに記載の*in vitro* ADCCアッセイを行うことができる。かかるアッセイに有用なエフェクター細胞には、末梢血単核球(PBMC)およびナチュラルキラー(NK)細胞が含まれる。あるいは、またはさらに、目的の分子のADCC活性を、*in vivo*(例えば、Clynesら、(USA)95652-656(1998)などに開示の動物モデル)で評価することができる。

10

【0117】

「ヒトエフェクター細胞」は、1つまたは複数のFcRを発現し、エフェクター機能を実施する白血球である。いくつかの実施形態では、細胞は、少なくともFcRIIIを発現し、ADCCエフェクター機能を実施する。ADCCを媒介するヒト白血球の例には、末梢血単核球(PBMC)、ナチュラルキラー(NK)細胞、単球、細胞傷害性T細胞、および好中球が含まれる。エフェクター細胞を、その未変性供給源(例えば、本明細書中に記載の血液またはPBMC)から単離することができる。

【0118】

用語「Fc受容体」または「FcR」を、抗体のFc領域に結合する受容体を説明するために使用する。いくつかの実施形態では、FcRは、未変性配列のヒトFcRである。さらに、いくつかの実施形態では、FcRは、IgG抗体(受容体)に結合するFcRであり、FcRI、FcRII、およびFcRIIIサブクラスの受容体(対立遺伝子変異形(*variant*)およびこれらの受容体の選択的スプライシング形態が含まれる)が含まれる。FcRII受容体には、主にその細胞質ドメインが異なる類似のアミノ酸配列を有するFcRIIA(「活性化受容体」)およびFcRIIB(「阻害受容体」)が含まれる。活性化受容体FcRIIAは、その細胞質ドメイン中に免疫受容チロシンベース活性化モチーフ(ITAM)を含む。阻害受容体FcRIIBは、その細胞質ドメイン中に免疫受容抑制性チロシンベース阻害モチーフ(ITIM)を含む(Daron, *Annu. Rev. Immunol.* 15: 203-234 (1997)の概説を参照のこと)。FcRは、Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991); Capel et al, *Immunomethods* 4: 25-34 (1994); および de Haasら、, *J. Lab. Clin. Med.* 126: 330-41 (1995)に概説されている。他のFcR(将来的に同定されるFcRが含まれる)は、本明細書中の用語「FcR」に含まれる。この用語には、母親のIgGの胎児への輸送を担う新生児受容体FcRnも含まれる(Guyer et al, *J. Immunol.* 117: 587 (1976)およびKim et al, *Eur. J. Immunol.* 24: 2429 (1994))。

20

30

【0119】

「補体依存性細胞傷害性」または「CDC」は、補体の存在下で分子が標的を溶解する能力をいう。補体活性化経路は、同族抗原と複合体化した分子(例えば、抗体)への補体系の第1成分(C1q)の結合によって開始される。補体活性化を評価するために、例えば、Gazzano-Santoro et al, *J. Immunol. Methods* 202: 163 (1996)に記載のCDCアッセイを行うことができる。

40

【0120】

本明細書中で使用される場合、用語「エピトープ」は、ポリペプチドの抗原決定基をいう。いくつかの実施形態では、エピトープは、エピトープに固有の空間的配置で3つまたはそれを超えるアミノ酸を含み得る。いくつかの実施形態では、エピトープは、線状または高次構造のエピトープである。一般に、エピトープは、少なくとも4個、少なくとも6個、少なくとも8個、少なくとも10個、および少なくとも12個のかかるアミノ酸からなり、より通常には、少なくとも8~10個のかかるアミノ酸からなる。アミノ酸の空間

50

的配置の決定方法は当該分野で公知であり、例えば、X線結晶学および二次元核磁気共鳴が含まれる。

【0121】

句「相補性決定領域」は、未変性の免疫グロブリン結合部位の天然のFv領域の結合親和性および特異性を共に定義するアミノ酸配列をいう。例えば、Chothiaら、, J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987); Kabatら、, U.S. Dept. of Health and Human Services NIH Publication No. 91-3242 (1991)を参照のこと。句「定常領域」は、エフェクター機能を付与する抗体分子の一部をいう。本発明では、マウス定常領域を、ヒト定常領域と置換する。本発明のヒト化抗体の定常領域は、ヒト免疫グロブリンに由来する。重鎖定常領域を、以下の5つのアイソタイプから選択することができる： 、 、 、または μ 。抗体のヒト化の1つの方法は、非ヒト重鎖および軽鎖配列をヒト重鎖および軽鎖配列とアラインメントする工程と、かかるアラインメントに基づいて非ヒトフレームワークとヒトフレームワークとを選択し、置換する工程と、ヒト化配列の高次構造を予想するために分子モデリングを行う工程と、親抗体の高次構造と比較する工程とを含む。この過程の後に、ヒト化配列モデルの推定高次構造が親非ヒト抗体の非ヒトCDRの高次構造に非常に類似するまで、CDRの構造を破壊するCDR領域中の残基を繰り返し逆変異する。かかるヒト化抗体を、例えば、Ashwell受容体によって、取り込みおよびクリアランスを容易にするためにさらに誘導体化することができる。例えば、米国特許第5,530,101号および同第5,585,089(本明細書中で参考として援用される)を参照のこと。

10

20

【0122】

得られたポリペプチドが標的タンパク質に特異的な少なくとも1つの結合領域を含む限り、広範な種々の抗体/免疫グロブリンフレームワークまたは足場を使用することができる。かかるフレームワークまたは足場には、5つの主なヒト免疫グロブリンのイデオタイプまたはそのフラグメント(本明細書中の他の場所に開示のもの)が含まれ、好ましくはヒト化態様を有する他の動物種の免疫グロブリンが含まれる。ラクダにおいて同定された重鎖抗体などの単一の重鎖抗体は、これに関して特に興味深い。新規のフレームワーク、足場、およびフラグメントが当業者によって発見および開発され続けている。

30

【0123】

本発明のCDRをグラフティングすることができる非免疫グロブリン足場を使用して、非免疫グロブリンベースの抗体を生成することができる。標的に特異的な結合領域を含む限り、既知または未知の非免疫グロブリンフレームワークおよび足場を使用することができる。かかる化合物は、本明細書中で、「標的的特異的な結合領域を含むポリペプチド」として公知である。公知の非免疫グロブリンフレームワークまたは足場には、アドネクチン(フィブロネクチン)(Compound Therapeutics, Inc., Waltham, MA)、アンキリン(Molecular Partners AG, Zurich, Switzerland)、ドメイン抗体(Domantis, Ltd (Cambridge, MA)、アブリンクスnv(Zwijnaarde, Belgium))、リボカリン(アンチカリン)(Pieris Proteolab AG, Freising, Germany)、小モジュラー免疫医薬品(small modular immunopharmaceuticals)(Trubion Pharmaceuticals Inc., Seattle, WA)、マキシボディ(maxy bodies)(Avidia, Inc (Mountain View, CA))、プロテインA(Affibody AG, Sweden)、およびアフィリン(affilin)(-クリスタリンまたはユビキチン)(Scil Proteins GmbH, Halle, Germany)が含まれるが、これらに限定されない。

40

【0124】

(iii) マキシボディ/アビマー(Avimer) - Avidia

アビマーは、LRP-1などのタンパク質を含む天然のA-ドメインに由来する。これ

50

らのドメインは、タンパク質間相互作用の性質によって使用され、ヒトにおいて、250種を超えるタンパク質が構造的にA-ドメインに基づいている。アビマーは、アミノ酸リンカーによって連結した多数の異なる「A-ドメイン」単量体(2-10)からなる。例えば、米国特許出願公開第20040175756号、同第20050053973号、同第20050048512号、および同第20060008844号に記載の方法論を使用して、標的抗原に結合することができるアビマーを作製することができる。

【0125】

用語「アンタゴニスト」を、最も広い意味で使用し、本明細書中に開示の腫瘍細胞抗原の生物活性を部分的または完全に遮断、阻害、または中和する任意の分子が含まれる。類似の様式では、用語「アゴニスト」を、最も広い意味で使用し、本明細書中に開示の腫瘍細胞抗原の生物活性を模倣する任意の分子が含まれる。適切なアゴニストまたはアンタゴニスト分子には、具体的には、アゴニストまたはアンタゴニスト抗体または抗体フラグメント、腫瘍細胞抗原のフラグメントもしくはアミノ酸配列、ペプチド、アンチセンスオリゴヌクレオチド、有機小分子などが含まれる。腫瘍細胞抗原のアゴニストまたはアンタゴニストの同定方法は、目的の抗原を発現する腫瘍細胞を候補アゴニストまたはアンタゴニスト分子と接触させる工程および腫瘍細胞抗原に通常関連する1つまたは複数の生物活性の検出可能な変化を測定する工程を含むことができる。アンタゴニストは、合理的デザインまたはファージディスプレイによって生成されたペプチドでもあり得る(例えば、1998年8月13日公開のW098/35036号を参照のこと)。1つの実施形態では、選択される分子は、抗体のCDRに基づいてデザインされた「CDR模倣物」または抗体アナログであり得る。かかるペプチドのみで拮抗性を示し得るが、ペプチドを任意選択的に細胞毒性薬剤に融合してペプチドの拮抗性を付加または増強することができる。

10

20

【0126】

本明細書中で使用される場合、用語「オリゴヌクレオチド」は、一連の連結されたヌクレオチド残基をいう。オリゴヌクレオチドには、アンチセンスおよびsiRNAオリゴヌクレオチドが含まれるが、これらに限定されない。オリゴヌクレオチドは、DNA配列の一部を含み、少なくとも約10ヌクレオチド且つ約500ヌクレオチドまでを有する。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、約10ヌクレオチド~約50ヌクレオチド、約15ヌクレオチド~約30ヌクレオチド、および約20ヌクレオチド~約25ヌクレオチドを含む。オリゴヌクレオチドは、化学合成することができ、プローブとして使用することもできる。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは一本鎖である。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、二本鎖である部分を少なくとも1つ含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドはアンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)である。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドはRNA干渉オリゴヌクレオチド(RNAiオリゴヌクレオチド)である。

30

【0127】

本明細書中で使用される場合、用語「アンチセンスオリゴヌクレオチド」は、アンチセンスポリヌクレオチドがAMIGO-2ポリヌクレオチド配列とハイブリッド形成することができる場合、AMIGO-2ポリヌクレオチド配列(AMIGO-2の転写または翻訳に関連するポリヌクレオチド配列(例えば、AMIGO-2ポリヌクレオチドのプロモーター)が含まれる)に相補的なヌクレオチド配列を有する非修飾または修飾核酸をいう。in vitroまたはin vivoのいずれかでAMIGO-2ポリペプチドコードポリヌクレオチドの転写および/または翻訳を阻害することができるアンチセンスポリヌクレオチドが特に興味深い。

40

【0128】

本明細書中で使用される場合、用語「siRNAオリゴヌクレオチド」、「RNAiオリゴヌクレオチド」、「短い干渉RNA」、または「siRNA」は交換可能に使用され、RNA干渉(RNAi)としても公知の、転写後遺伝子サイレンシングを介して作用するオリゴヌクレオチドをいう。この用語は、RNA干渉「RNAi」を行うことができる二本鎖核酸分子をいう(Kreutzerら、, W000/44895号; Zerni

50

cka - Goetzら、WO01/36646号；Fire, WO99/32619号；Mello and Fire, WO01/29058号を参照のこと）。siRNA分子は、一般にRNA分子であるが、化学修飾されたヌクレオチドおよび非ヌクレオチドをさらに含む。細胞への一過性siRNA移入によってsiRNA遺伝子ターゲティング実験が行われている（リボソーム媒介性トランスフェクション、エレクトロポレーション、または微量注入などの古典的方法によって行われる）。siRNA分子は、21～23ヌクレオチドRNAであり、通常RNAiを開始する長い二本酸RNA（dsRNA）のRNアーゼIIIプロセッシング産物に類似する2～3ヌクレオチドの3'-オーバーハング末端を特徴とする。

【0129】

本明細書中で使用される場合、用語「デコイ受容体」は、AMIGO-2リガンドに結合することができるポリペプチド、模倣物、または他の高分子の、少なくとも一部を含む受容体をいう。本明細書中で使用される場合、用語「治療有効量」は、治療有効量の薬物を個体に投与する場合、個体内の癌細胞または癌細胞の転移の、1つまたは複数の臨床エンドポイント、成長、および/または生存の減少または逆転として認められる薬効が得られる薬物の量をいうことを意味する。治療有効量を、典型的には、有効成分を含まない組成物を同様の状況の個体に投与する場合に認められる効果と比較した効果によって決定する。被験体のための正確な有効量は、被験体のサイズおよび健康状態、条件の性質および範囲、投与のために選択される治療薬または治療薬の組み合わせに依存するであろう。しかし、所与の状況のための有効量は日常的な実験によって決定され、この決定は、臨床家の判断の範囲内である。

【0130】

本明細書中で使用される場合、用語「～との組み合わせ」または「～との併用」は、他の治療計画と共に本発明のAMIGO-2モジュレーターを投与することをいう。

【0131】

本明細書中で使用される場合、用語「感受性」は、AMIGO-2療法が許容可能な治療方法である患者（すなわち、陽性に応答する可能性が高い患者）をいう。いくつかの実施形態では、AMIGO-2療法に感受性を示す癌患者は、AMIGO-2療法に感受性を示さない患者と比較して高レベルのAMIGO-2を発現する。いくつかの実施形態では、AMIGO-2療法の良好な候補ではない癌患者には、その癌細胞中または癌細胞上のAMIGO-2を欠くかより低いレベルで有する腫瘍サンプルを有する癌患者が含まれる。いくつかの実施形態では、癌細胞の他の領域に局在化したAMIGO-2と比較して細胞膜に局在化したAMIGO-2の比率がより高い患者は、かかる患者が非細胞膜局在化AMIGO-2と比較して細胞膜局在化AMIGO-2の比率がより低い患者よりもAMIGO-2療法に対する感受性がより高いことを示す。いくつかの実施形態では、細胞膜に局在化したAMIGO-2の、細胞膜を含まない癌細胞の他の領域に局在化したAMIGO-2と比較した比率が少なくとも2：1であれば、患者がAMIGO-2関連癌を有し、AMIGO-2療法に感受性を示すことを示す。いくつかの実施形態では、細胞膜に局在化したAMIGO-2の、細胞膜を含まない癌細胞の他の領域に局在化したAMIGO-2と比較した比率が少なくとも3：1であれば、患者がAMIGO-2関連癌を有し、AMIGO-2療法に感受性を示すことを示す。

【0132】

本明細書中で使用される場合、用語「検出」は、活性（例えば、遺伝子発現）または生体分子（例えば、ポリペプチド）の証拠を確立、発見、または確認することを意味する。

【0133】

「未変性配列」ポリペプチドは、天然由来のポリペプチドと同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドである。かかる未変性配列ポリペプチドを、天然から単離することができるか、組換え手段または合成手段によって産生することができる。したがって、未変性配列ポリペプチドは、天然に存在するヒトポリペプチド、マウスポリペプチド、または任意の他の哺乳動物種由来のポリペプチドのアミノ酸配列を有することができる。

10

20

30

40

50

【0134】

用語「アミノ酸配列変異形」は、未変性配列ポリペプチドといくらか異なるアミノ酸配列を有するポリペプチドをいう。通常、アミノ酸配列変異形は、未変性リガンドの少なくとも1つの受容体結合ドメインまたは未変性受容体の少なくとも1つのリガンド結合ドメインまたはそのリガンド結合ドメインと少なくとも約70%、少なくとも約80%相同、または少なくとも約90%相同であろう。アミノ酸配列変異形は、未変性アミノ酸配列のアミノ酸配列内の一定の位置に置換、欠失、および/または挿入を有する。

【0135】

本明細書中で使用される場合、句「相同ヌクレオチド配列」または「相同アミノ酸配列」またはその変異形は、ヌクレオチドレベルまたはアミノ酸レベルでの少なくとも特定の比率の相同性によって特徴づけられる配列をいい、「配列同一性」と交換可能に使用される。相同ヌクレオチド配列には、タンパク質のイソ型をコードする配列が含まれる。かかるイソ型を、例えば、RNAの選択的スプライシングの結果として同一生物の異なる組織中に発現することができる。あるいは、イソ型を、異なる遺伝子によってコードすることができる。相同ヌクレオチド配列には、ヒト以外の種（哺乳動物が含まれるが、これらに限定されない）のタンパク質をコードするヌクレオチド配列が含まれる。相同ヌクレオチド配列には、本明細書中に記載のヌクレオチド配列の天然に存在する対立遺伝子異形（*variation*）および変異体も含まれるが、これらに限定されない。相同アミノ酸配列には、せいぜい50個（例えば、せいぜい1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、15、20、25、30、35、40、または50）の保存的アミノ酸置換を含み、ポリペプチドが、未変性ポリペプチドの結合能力および/または活性の少なくとも25%（例えば、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、もしくは100%またはそれを超える）を保持するアミノ酸配列が含まれる。保存的置換には、典型的には、以下の群内の置換が含まれる。すなわち、グリシンおよびアラニン；バリン、イソロイシン、およびロイシン；アスパラギン酸およびグルタミン酸；アスパラギン、グルタミン、セリン、およびトレオニン；リジン、ヒスチジン、およびアルギニン；ならびにフェニルアラニンおよびチロシン、である。

【0136】

相同アミノ酸配列には、（2つまたはそれを超えるアミノ酸の）1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個のアミノ酸セグメントまたは不連続の単一アミノ酸を欠くアミノ酸配列の欠失変異形が含まれ得る。

【0137】

いくつかの実施形態では、相同アミノ酸配列は、1つまたは複数の（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、20超）アミノ酸の挿入を含むことができる。

【0138】

いくつかの実施形態では、相同アミノ酸配列は、保存的な置換、挿入、および/または欠失を含むことができる。

【0139】

相同率または同一率を、例えば、デフォルト設定を使用し、Smith and Waterman (Adv. Appl. Math., 1981, 2, 482-489) のアルゴリズムを使用するGapプログラム (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for UNIX (登録商標), Genetics Computer Group, University Research Park, Madison WI) によって決定することができる。いくつかの実施形態では、プローブと標的との間の相同性は、約50%~約60%である。いくつかの実施形態では、核酸は、配列番号1またはその一部と約70%、約80%、約85%、約

10

20

30

40

50

90%、約92%、約94%、約95%、約97%、約98%、約99%、および約100%相同なヌクレオチドを有する。いくつかの実施形態では、ホモログは、配列番号1と同一の活性を有する。いくつかの実施形態では、ホモログは、配列番号1と同一の発現プロフィールを共有する。

【0140】

相同性は、ポリペプチドレベルでもあり得る。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号2またはその一部と約60%、約70%、約80%、約85%、約90%、約92%、約94%、約95%、約97%、約98%、約99%、および約100%相同である。いくつかの実施形態では、ホモログは、配列番号2と同一の活性を有する。いくつかの実施形態では、ホモログは、配列番号2と同一の発現プロフィールを共有する。

10

【0141】

本明細書中で使用される場合、用語「プローブ」は、種々の長さの核酸配列をいう。いくつかの実施形態では、プローブは、少なくとも約10ヌクレオチドであり且つ約6,000ヌクレオチドまでの長さを有する。いくつかの実施形態では、少なくとも12、少なくとも14、少なくとも16、少なくとも18、少なくとも20、少なくとも25、少なくとも50、または少なくとも75個の連続ヌクレオチドを含む。プローブは、同一、類似、または相補的な核酸配列の検出で使用する。より長いプローブは、通常、天然供給源または組換え供給源から得られるが、これは標的配列に対する特異性が高く、オリゴマーよりもはるかにゆっくり標的とハイブリッド形成する。プローブは、一本鎖または二本鎖であり得、ハイブリッド形成膜ベースのPCR、*in situ*ハイブリッド形成 (ISH)、蛍光*in situ*ハイブリッド形成 (FISH)、またはELISA様技術において特異性を有するようにデザインする。

20

【0142】

本明細書中で使用される場合、用語「混合」は、同一領域中に1つまたは複数の化合物、細胞、および分子などを共に組み合わせる過程をいう。この過程は例えば、1つまたは複数の化合物、細胞、または分子を混合することが可能な試験管、ペトリ皿、または任意の容器中で行いうる。

【0143】

本明細書中で使用される場合、用語「単離」は、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、または抗体が天然に存在する環境と異なる環境に存在するポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体、または宿主細胞をいう。細胞の単離方法は、当業者に周知である。単離されるポリヌクレオチド、ポリペプチド、または抗体を、一般的に、実質的に精製する。

30

【0144】

本明細書中で使用される場合、用語「実質的に精製された」は、その天然の環境から取り出され、天然に会合する他の化合物を少なくとも60%、少なくとも75%、および少なくとも90%含まない化合物 (ポリヌクレオチド、ポリペプチド、または抗体のいずれか) をいう。

【0145】

本明細書中で使用される場合、用語「結合」は、2つまたはそれを超える生体分子または化合物の間の物理的または化学的な相互作用を意味する。結合には、イオン結合、非イオン結合、水素結合、ファンデルワールス、疎水性相互作用などが含まれる。結合は直接または間接のいずれかであり得る。間接的結合は、別の生体分子または化合物を介するか、その影響に起因する。直接結合は、別の分子または化合物を介するかその影響に起因しては起こらないが、その代わりに他の実質的な化学的中間体を持たない相互作用をいう。

40

【0146】

本明細書中で使用される場合、用語「接触」は、第1の分子を第2の分子に物理的に接近させて直接または間接的に1つにすることを意味する。分子は、多数の緩衝液、塩、溶液などに存在し得る。「接触」には、例えば、ポリヌクレオチドを、核酸分子を含むビーカー、マイクロタイプレート、細胞培養フラスコ、またはマイクロアレイなどに入れることが含まれる。接触には、例えば、抗体を、ポリペプチドを含むビーカー、マイクロ

50

タイタープレート、細胞培養フラスコ、またはマイクロアレイなどに入れることが含まれる。接触は、*in vivo*、*ex vivo*、または*in vitro*で起こり得る。

【0147】

本明細書中で使用される場合、句「ストリンジェントなハイブリッド形成条件」または「ストリンジェントな条件」は、プローブ、プライマー、またはオリゴヌクレオチドがその標的配列とハイブリッド形成するが他の配列とのハイブリッド形成は最小である条件をいう。ストリンジェントな条件は配列依存性であり、環境によって異なる。より長い配列は、その適切な相補物とより高い温度で特異的にハイブリッド形成する。一般に、ストリンジェントな条件を、定義したイオン強度およびpHで特定の配列の融点(T_m)よりも約5%低くなるように選択する。 T_m は、標的配列に相補的なプローブの50%が平衡状態で標的配列とハイブリッド形成する(定義したイオン強度、pH、および核濃度下での)温度である。一般に T_m で標的配列が過剰に存在するので、平衡状態でプローブの50%がその相補物とハイブリッド形成する。典型的には、ストリンジェントな条件は、pH 7.0~8.3で塩濃度が約1.0M未満のナトリウムイオン、典型的には約0.01~1.0Mナトリウムイオン(または他の塩)であり、温度が、短いプローブ、プライマー、またはオリゴヌクレオチド(例えば、10~50ヌクレオチド)については少なくとも約30°Cであり、より長いプローブ、プライマー、またはオリゴヌクレオチドについては少なくとも約60°Cである条件であろう。ホルムアミドなどの不安定化剤を添加してストリンジェントな条件を達成することもできる。

10

【0148】

本明細書中で使用される場合、用語「中程度のストリンジェンシー条件」は、プローブ、プライマー、またはオリゴヌクレオチドがその標的配列とハイブリッド形成するが、限定された数の他の配列とハイブリッド形成する条件をいう。中程度の条件は配列依存性であり、環境によって異なる。中程度の条件当業者に周知であり、とりわけ、Maniatisら、(*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory; 2nd Edition (December 1989))に記載されている。

20

【0149】

本明細書中に記載の核酸組成物を使用して、例えば、生体サンプル(例えば、ヒト細胞の抽出物)中のmRNAまたはかかるサンプルから産生したcDNAの検出のためのプローブとしてのポリペプチドを産生し、ポリヌクレオチドのさらなるコピーを生成し、リボザイムまたはオリゴヌクレオチド(一本鎖および二本鎖)および一本鎖DNAプローブまたは三本鎖形成オリゴヌクレオチドを生成することができる。本明細書中に記載のプローブを使用して、例えば、サンプル中の本明細書中に提供したポリヌクレオチドの有無を決定することができる。ポリペプチドを使用して、癌に関連するポリペプチドに特異的な抗体を生成することができ、言い換えると、この抗体は、本明細書中により詳細に考察されるように、診断方法および予後診断方法で有用である。ポリペプチドは、本明細書中により詳細に考察されるように、治療介入のための標的としても有用である。本発明の抗体を使用して、例えば、本発明のポリペプチドを精製、検出、およびターゲティングすることもできる(*in vitro*および*in vivo*診断方法および治療方法の両方が含まれる)。例えば、抗体は、生体サンプル中の本発明のポリペプチドレベルを定量的および定性的に測定するための免疫アッセイで有用である。例えば、Harlowら、(*Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988))を参照のこと。これらおよび他の用途を、以下により詳細に記載する。

30

40

【0150】

本明細書中で使用される場合、用語「画像化剤」は、本発明の抗体、小分子、またはプローブに連結し、当業者に公知の技術を使用して検出することができる組成物をいう。本明細書中で使用される場合、用語「遺伝子発現の証拠」は、遺伝子が発現した任意の測定可能な指標をいう。

50

【0151】

用語「薬学的に許容可能なキャリア」は、治療薬（抗体またはポリペプチドなど）および他の治療薬の投与のためのキャリアをいう。この用語は、それ自体が組成物を投与した個体に有害な抗体の産生を誘導せず、過度な毒性を示さずに投与することができる任意の薬学的キャリアをいう。適切なキャリアは、ゆっくり代謝する巨大な高分子（タンパク質、ポリサッカリド、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、高分子アミノ酸、アミノ酸コポリマー、脂質凝集体、および不活性ウイルス粒子など）であり得る。かかるキャリアは、当業者に周知である。治療組成物中の薬学的に許容可能なキャリアには、水、生理食塩水、グリセロール、およびエタノールが含まれ得る。湿潤剤または乳化剤、およびpH緩衝物質などの補助剤は、かかるビヒクル中にも存在することができる。

10

【0152】

本発明の方法および組成物によって治療することができる癌の特定の例には、AMIGO-2関連癌が含まれるが、これらに限定されない。本明細書中で使用される場合、「AMIGO-2関連癌」は、非癌性細胞と比較してAMIGO-2を差分発現する細胞によって特徴づけられる癌をいう。本発明は、AMIGO-2が、とりわけ、染色体安定性、キナーゼ活性、腫瘍形成能、転移、シグナル伝達、細胞接着、アポトーシス、基質リン酸化、細胞成長、腫瘍形成、サイクリン産生、細胞増殖、細胞周期制御、癌細胞の成長、癌細胞生存、足場非依存性増殖、および血管形成、細胞遊走、細胞間相互作用において役割を果たす任意の腫瘍細胞型にも適用可能である。

20

【0153】

いくつかの実施形態では、癌は、肺癌、膀胱癌、腎臓癌、結腸癌、乳癌、子宮癌、卵巣癌、もしくは膵臓癌または癌転移である。いくつかの実施形態では、癌は、肺癌または結腸癌である。いくつかの実施形態では、癌は、胃癌以外の癌である。いくつかの実施形態では、かかる癌は、コントロールと比較して少なくとも約25%、少なくとも約50%、少なくとも約75%、少なくとも約100%、少なくとも約150%、少なくとも約200%、または少なくとも約300%のAMIGO-2の差分発現を示す。

【0154】

本発明は、AMIGO-2過剰発現に関連する疾患および障害を治療、阻害、および管理し、かかる疾患および障害の症状を治療、阻害、および管理する方法および組成物を提供する。本発明のいくつかの実施形態は、癌（癌転移、癌細胞生存、癌細胞増殖、癌細胞の成長、細胞周期制御、血管形成、および癌細胞侵襲が含まれるが、これらに限定されない）を治療、阻害、または管理する組成物を含む方法および組成物に関する。

30

【0155】

本発明は、さらに、本発明のAMIGO-2モジュレーターと組み合わせた他の有効成分を含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、本方法は、さらに、患者への1つまたは複数の従来の癌療法薬を投与する工程を含む。いくつかの実施形態では、本発明の方法は、さらに、1つまたは複数の化学療法、放射線療法、または手術を使用して患者を治療する工程を含む。

【0156】

本発明はまた、現在のまたは標準的な癌治療（手術、化学療法、放射線療法、ホルモン療法、および生物療法など）が部分的または完全に無効となった癌または他の過剰増殖細胞障害または疾患の治療、阻害、および管理のための方法および組成物を提供する。

40

【0157】

本発明はまた、癌を診断し、そして/または癌の進行を予想するための本発明のAMIGO-2モジュレーター（特に、AMIGO-2抗体）を使用した診断および/または画像化方法を提供する。いくつかの実施形態では、本発明の方法は、腫瘍および/または転移の画像化および局在化方法ならびに診断および予後診断方法を提供する。いくつかの実施形態では、本発明の方法は、AMIGO-2関連療法の適切性および/または有効性を評価する方法を提供する。

【0158】

50

A M I G O - 2 モジュールター

本発明は、とりわけ、癌の治療、診断、検出、または画像化のための A M I G O - 2 モジュールターを提供する。A M I G O - 2 モジュールターはまた、癌治療薬の調製に有用である。いくつかの実施形態では、A M I G O - 2 モジュールターは A M I G O - 2 インヒビターである。

【0159】

いくつかの実施形態では、A M I G O - 2 モジュールターは、ヌクレオチド、小分子、模倣物、デコイ、または抗体である。いくつかの実施形態では、A M I G O - 2 モジュールターは、単離二本鎖 RNA (d s RNA) ; 配列番号 7 ~ 16 からなる群より選択される配列の少なくとも 10 個の連続ヌクレオチドを含む単離オリゴヌクレオチド; シグナルペプチド、L R R N T ドメイン、L R R 1 ドメイン、L R R 2 ドメイン、L R R 3 ドメイン、L R R 4 ドメイン、L R R 5 ドメイン、L R R 6 ドメイン、L R R C T ドメイン、I g V - s e t ドメイン、および I g ドメインからなる群より選択される A M I G O - 2 のドメイン中エピトープに結合する抗体; 小分子; 模倣物; 可溶性受容体; またはデコイである。いくつかの実施形態では、A M I G O - 2 のドメイン中のエピトープに結合する抗体は、A M I G O - 2 以外のポリペプチドに特異的に結合しない。例えば、いくつかの実施形態では、抗体フラグメントは、A M I G O - 1 または A M I G O - 3 に特異的に結合しない。

10

【0160】

いくつかの実施形態では、A M I G O - 2 モジュールターは、コントロールと比較して、A M I G O - 2 活性を少なくとも 25 %、50 %、75 %、80 %、90 %、95 %、97 %、98 %、99 %、または 100 % 阻害する。いくつかの実施形態では、A M I G O - 2 モジュールターは、コントロールと比較して、L I V - 1 発現を少なくとも 25 %、50 %、75 %、80 %、90 %、95 %、97 %、98 %、99 %、または 100 % 阻害する。

20

【0161】

抗体

いくつかの実施形態では、A M I G O - 2 モジュールターは、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、単鎖抗体、または F a b フラグメントである。抗体または F a b フラグメントを、例えば、酵素、放射性同位体、またはフルオロフォアで標識することができる。いくつかの実施形態では、抗体または F a b フラグメントは、A M I G O - 2 以外のポリペプチドに特異的に結合しない。例えば、いくつかの実施形態では、抗体または F a b フラグメントは、A M I G O - 1 または A M I G O - 3 に特異的に結合しない。いくつかの実施形態では、抗体または F a b フラグメントは、A M I G O - 2 以外のポリペプチドに対して約 1×10^5 K a 未満の結合親和性を有する。いくつかの実施形態では、A M I G O - 2 モジュールターは、少なくとも 1×10^8 K a の親和性で A M I G O - 2 に結合するモノクローナル抗体である。

30

【0162】

本発明はまた、競合的結合を決定するための当該分野で公知の任意の方法 (例えば、免疫アッセイ) によって決定した場合に本発明のエピトープへの抗体の結合を競合的に阻害する抗体を提供する。いくつかの実施形態では、抗体は、エピトープへの結合を、少なくとも 95 %、少なくとも 90 %、少なくとも 85 %、少なくとも 80 %、少なくとも 75 %、少なくとも 70 %、少なくとも 60 %、または少なくとも 50 % 競合的に阻害する。

40

【0163】

いくつかの実施形態では、抗体はヒト化抗体である。ヒト化抗体は、種々の方法 (例えば、(1) ヒトフレームワークおよび定常領域への非ヒト相補性決定領域 (C D R) のグラフティング (当該分野で「ヒト化」と呼ばれる過程)、あるいは、(2) 全非ヒト可変ドメインを移植するが、表面残基の置換によってヒト様表面で「クローキング (c l o a k i n g) 」すること (当該分野で「ベニアリング (v e n e e r i n g) 」と呼ばれる過程) が含まれる) によって得られる。本発明では、ヒト化抗体には、「ヒト化」および

50

「ベニア化 (veneered)」抗体の両方が含まれるであろう。同様に、ヒト抗体を、トランスジェニック動物 (例えば、内因性免疫グロブリン遺伝子が部分的または完全に不活化されたマウス) へのヒト免疫グロブリン遺伝子座の導入によって作製することができる。攻撃誘発の際、ヒト抗体産生が認められ、これは遺伝子再編成、アセンブリ、抗体レパートリーを含むあらゆる点で、ヒトで認められる抗体と酷似する。このアプローチは、例えば、米国特許第 5,545,807 号、同第 5,545,806 号、同第 5,569,825 号、同第 5,625,126 号、同第 5,633,425 号、同第 5,661,016 号、および以下の科学論文: Marks *ら*、, *Bio/Technology* 10, 779-783 (1992); Lonberg *ら*、, *Nature* 368 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368, 812-13 (1994); Fishwild *ら*、, *Nature Biotechnology* 14, 845-51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14, 826 (1996); Lonberg and Huszar, *Intern Rev. Immunol.* 13 65-93 (1995); Jones *ら*、, *Nature* 321: 522-525 (1986); Morrison *ら*、, *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 81 6851-6855 (1984); Morrison and Oi, *Adv. Immunol.*, 44 65-92 (1988); Verhoever *ら*、, *Science* 239 1534-1536 (1988); Padlan, *Molec. Immunol.* 28: 489-498 (1991); Padlan, *Molec. Immunol.* 31 (3): 169-217 (1994); および Kettleborough, C.A. et al., *Protein Eng.* 4 (7): 773-83 (1991) (それぞれ、本明細書中で参考として援用される) に記載されている。

【0164】

本発明の抗体は、異なる機構を介して機能することができる。いくつかの実施形態では、抗体は、抗体依存性細胞傷害性 (ADCC) (抗体ターゲティング細胞への溶解攻撃) を誘発する。いくつかの実施形態では、抗体は、複数の治療機能 (例えば、抗原結合、アポトーシスの誘導、および補体依存性細胞傷害性 (CDC) が含まれる) を有する。いくつかの実施形態では、抗体を、毒素または放射性核種に抱合する。

【0165】

いくつかの実施形態では、本発明の抗体は、AMIGO-2 アンタゴニストとして作用することができる。例えば、いくつかの実施形態では、本発明は、本発明のポリペプチドを使用して受容体/リガンド相互作用を部分的または完全に破壊する抗体を提供する。いくつかの実施形態では、本発明の抗体は、本明細書中に開示のエピトープまたはその一部を結合する。いくつかの実施形態では、抗体の非存在下での活性と比較して、リガンド活性または受容体活性を少なくとも 95%、少なくとも 90%、少なくとも 85%、少なくとも 80%、少なくとも 75%、少なくとも 70%、少なくとも 60%、または少なくとも 50% 調整する抗体を提供する。

【0166】

いくつかの実施形態では、本発明は、中和抗体を提供する。中和抗体は、感染因子 (癌に関連するウイルスまたは細菌などのウイルスまたは細菌など) (例えば、JC ポリオーマウイルス、エプスタイン-バーウイルス、またはピロリ菌) に結合する。いくつかの実施形態では、中和抗体は、受容体アンタゴニストとして有効に作用することができる (すなわち、リガンド媒介性受容体活性化の生物活性の全てまたはサブセットのいずれかの阻害)。いくつかの実施形態では、抗体を、本明細書中に開示の本発明のペプチドの特異的生物学活性を含む生物学活性についてのアゴニスト、アンタゴニスト、または逆アゴニストと特定することができる。

【0167】

いくつかの実施形態では、抗体は、とりわけ、染色体安定性、キナーゼ活性、腫瘍形成能、転移、シグナル伝達、細胞接着、細胞アポトーシス、基質リン酸化、癌細胞の成長、

腫瘍形成、サイクリン産生、細胞増殖、細胞周期を介した進行（例えば、細胞周期のG2/M期への進行）、足場非依存性増殖、AMIGO-2タンパク質の細胞膜への局在化、AMIGO-2とAMIGO-1またはAMIGO-3の一方または両方との間の相互作用、および血管形成からなる群より選択される1つまたは複数のAMIGO-2活性を阻害する。

【0168】

いくつかの実施形態では、AMIGO-2抗体は、成長および生存経路（活性化EGFRおよび変異-カテニンによって媒介されるものなど）を阻害する。いくつかの実施形態では、AMIGO-2抗体は、1つまたは複数のサイクリンD1、サイクリンB1、c-Myc、c-Jun、FosL1、細胞外シグナル制御キナーゼ（ERK）、血管内皮成長因子（VEGF）、ウロキナーゼ、およびポリ（ADP-リボース）ポリメラーゼ1（PARP1）を阻害する（例えば、mRNAまたはタンパク質発現を阻害する）。VEGFおよびウロキナーゼの調節は、血管形成におけるAmigo-2の役割も示す。いくつかの実施形態では、AMIGO-2抗体は、癌細胞運動性を調整し、癌転移に影響を及ぼす。

10

【0169】

いくつかの実施形態では、AMIGO-2抗体は、最初期遺伝子および最初期遺伝子を含む経路を調節する。例えば、AMIGO-2抗体は、1つまたは複数のcFosL1、E2F1、ELK1、JNK、MEKK、SAPK1 p38、サイクリンD、c-Jun、c-fos、c-myc、JE、KC、junB、およびBTG2ならびに関連経路を調節する。

20

【0170】

本発明の抗体を、単独または他の組成物と組み合わせて使用することができる。抗体を、さらに、N末端またはC末端で異種ポリペプチドと組換え的に融合するか、ポリペプチドまたは他の組成物に化学的に抱合する（共有結合的および非共有結合的抱合が含まれる）ことができる。例えば、本発明の抗体を、検出アッセイにおける標識として有用な分子およびエフェクター分子（異種ポリペプチド、薬物、放射性核種、または毒素など）に組換え的に融合するか抱合することができる。例えば、PCT公開WO92/08495号、WO91/14438号、WO89/12624号、米国特許第5,314,995号、および欧州特許第396,387号を参照のこと。

30

【0171】

キメラ抗体およびヒト化抗体に加えて、完全なヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン遺伝子を有するトランスジェニックマウス（例えば、米国特許第6,075,181号、同第6,091,001、および同第6,114,598号（その全てが本明細書中で参考として援用される）を参照のこと）またはヒト免疫グロブリン遺伝子のファージディスプレイライブラリー（例えば、McCaffertyら、Nature, 348:552-554（1990）、Clacksonら、Nature, 352:624-628（1991）、およびMarksら、J Mol Biol., 222:581-597（1991）を参照のこと）に由来し得る。いくつかの実施形態では、抗体を産生し、scFv-ファージライブラリーによって同定することができる。抗体ファージディスプレイテクノロジーは、Morphosysなどの市販品を利用可能である。

40

【0172】

モノクローナル抗体を、Kohlerら、（1975）Nature 256:495-496の方法またはその修正形態を使用して調製することができる。典型的には、マウスを、抗原を含む溶液で免疫化する。抗原含有溶液の生理食塩水（いくつかの実施形態では、フロント完全アジュバントなどのアジュバント）への混合または乳化、および混合物または乳濁液の非経口注射によって免疫化を行うことができる。当該分野で公知の任意の免疫化方法を使用して、本発明のモノクローナル抗体を得ることができる。動物の免疫化後、脾臓（および、任意選択的に、いくつかの巨大リンパ節）を取り出し、1つの細胞に分離する。脾臓細胞を、目的の抗原でコーティングしたプレートまたはウェルへの細胞懸

50

濁液の適用によってスクリーニングすることができる。抗原に特異的な膜結合免疫グロブリンを発現するB細胞は、プレートに結合し、リンスで流されない。次いで、得られたB細胞または全ての分離脾臓細胞を、骨髄腫細胞との融合を誘導してハイブリドーマを形成させ、選択培地中で培養する。得られた細胞を、連続希釈および限界希釈によってプレートし、目的の抗原に特異的に結合する（そして無関係の抗原に結合しない）抗体の産生についてアッセイする。次いで、選択されたモノクローナル抗体（mAb）分泌ハイブリドーマを、*in vitro*（例えば、培養ボトルまたは中空系リアクター中）または*in vivo*（マウスの腹水として）のいずれかで培養する。

【0173】

米国特許第5,545,403号、同第5,545,405号および同第5,998,144号（それぞれ本明細書中で参考として援用される）に開示のように、発現のためのハイブリドーマの使用の代替法として、CHOまたは骨髄腫細胞株などの細胞株中で抗体を産生することができる。簡潔に述べれば、細胞株を、軽鎖および重鎖をそれぞれ発現することができるベクターでトランスフェクトする。個別のベクターへの2つのタンパク質のトランスフェクションにより、キメラ抗体を産生することができる。Immunol. 147:8; BancherEAUら、(1991) Clin. Immunol. Spectrum 3:8; および BancherEAUら、(1991) Science 251:70（全てが本明細書中で参考として援用される）。

【0174】

当該分野で公知の技術（ファージディスプレイライブラリー（Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marksら、, J. Mol. Biol., 222:581 (1991)）が含まれる）を使用して、ヒト抗体を産生することもできる。Coleら、およびBoernerら、の技術はまた、ヒトモノクローナル抗体の調製のために利用可能である（Coleら、, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985) および Boernerら、, J. Immunol., 147(1):86-95 (1991)）。ヒト化抗体を、種々の方法（例えば、(1) ヒトフレームワークおよび定常領域への非ヒト相補性決定領域（CDR）のグラフトニング（当該分野で「ヒト化」と呼ばれる過程）、あるいは、(2) 全非ヒト可変ドメインを移植するが、表面残基の置換によってヒト様表面での「クローキング」すること（当該分野で「ベニアリング（veneering）」と呼ばれる過程）が含まれる）によって行うことができる。本発明では、ヒト化抗体には、「ヒト化」および「ベニア化（veneered）」抗体の両方が含まれるであろう。同様に、ヒト抗体を、トランスジェニック動物（例えば、内因性免疫グロブリン遺伝子が部分的または完全に不活化されたマウス）へのヒト免疫グロブリン遺伝子座の導入によって作製することができる。攻撃誘発の際、ヒト抗体産生が認められ、これは遺伝子再編成、アセンブリ、抗体レパートリーを含むあらゆる点で、ヒトで認められる抗体と酷似する。このアプローチは、例えば、米国特許第5,545,807号、同第5,545,806号、同第5,569,825号、同第5,625,126号、同第5,633,425号、同第5,661,016号、および以下の科学論文：Marksら、, Bio/Technology 10, 779-783 (1992); Lonbergら、, Nature 368 856-859 (1994); Morrison, Nature 368, 812-813 (1994); Fishwildら、, Nature Biotechnology 14, 845-51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14, 826 (1996); Lonberg and Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13 65-93 (1995); Jonesら、, Nature 321:522-525 (1986); Morrisonら、, Proc. Natl. Acad. Sci, U.S.A., 81:6851-6855 (1984); Morrison and Oi, Adv. Immunol., 44 65-92 (1988); Verhoeyerら、, Science 239 1534-1536 (1988); Pad

10

20

30

40

50

lan, Molec. Immun. 28: 489 - 498 (1991); Padlan, Molec. Immunol. 31(3): 169 - 217 (1994); および Kettleborough, C. A. et al., Protein Eng. 4(7): 773 - 83 (1991) (それぞれ、本明細書中で参考として援用される)に記載されている。完全にヒト化された抗体を、Morphosys (Martinsried/Planeegg, Germany)などの供給者を使用したスクリーニングアッセイで同定することができる。

【0175】

ヒト抗体を、ヒト免疫グロブリン遺伝子座を含むように操作したトランスジェニック動物を使用して産生することもできる。例えば、WO98/24893号は、動物が内因性重鎖および軽鎖の遺伝子座の不活化によって機能的な内因性免疫グロブリンを産生しない、ヒトIg遺伝子座を有するトランスジェニック動物を開示している。WO91/10741号はまた、抗体が霊長類定常領域および/または可変領域を有し、内因性免疫グロブリンコード遺伝子座が置換または不活化された、免疫原に対する免疫応答を備えうるトランスジェニック非霊長類哺乳動物宿主を開示する。WO96/30498号は、哺乳動物中の免疫グロブリン遺伝子座を修飾する(定常領域または可変領域の全部または一部を置換して、修飾抗体分子を形成するなど)ためのCre/Lox系の使用を開示している。WO94/02602号は、不活化内因性Ig遺伝子座および機能的ヒトIg遺伝子座を有する非ヒト哺乳動物宿主を開示している。米国特許第5,939,598号は、マウスが内因性重鎖を欠き、1つまたは複数の外因性定常領域を含む外因性免疫グロブリン遺伝子座を発現する、トランスジェニックマウスの作製方法を開示している。本発明の抗体を、米国特許第5,766,886号(本明細書中で参考として援用される)に考察されたヒト操作技術を使用して産生することもできる。

10

20

30

【0176】

上記のトランスジェニック動物を使用して、選択された抗原分子に対する免疫応答を生成することができる。抗体産生細胞を動物から取り出し、これを使用してヒトモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを産生することができる。免疫化プロトコールおよびアジュバントなどは、当該分野で公知であり、例えば、WO96/33735号に記載のように、例えば、トランスジェニックマウスの免疫化で使用される。モノクローナル抗体を、対応するタンパク質の生物活性または生理学的影響を阻害または中和する能力について試験することができる。

【0177】

本発明の抗体を、Fangら、(2005), Nat. Biotechnol. 23, 584 - 590の考察のように、in vivo治療抗体遺伝子移入によって被験体に投与することができる。例えば、MAb重鎖配列と軽鎖コード配列との間に配置されたポリペプチドの酵素非依存性同時翻訳自己切断を媒介するペプチドを含む多シストロン性発現カセットを送達するための組換えベクターを生成することができる。発現により、化学量論量の両MAb鎖が得られる。いくつかの実施形態では、酵素非依存性同時翻訳自己切断を媒介するペプチドは、口蹄病由来2Aペプチドである。

40

【0178】

抗体のフラグメントは、全長抗体の所望の親和性を保持する限り、本発明の方法での使用に適切である。したがって、抗AMIGO-2抗体のフラグメントは、AMIGO-2に結合する能力を保持する。かかるフラグメントを、対応する全長抗AMIGO-2抗体に類似する性質によって特徴づける(すなわち、フラグメントは、ヒト細胞表面上に発現したヒトAMIGO-2抗原に特異的に結合するであろう)。

【0179】

いくつかの実施形態では、抗体は、AMIGO-2の細胞外ドメイン中の1つまたは複数のエピトープに特異的に結合する。いくつかの実施形態では、抗体は、1つまたは複数のAMIGO-2関連生物活性を調整する。いくつかの実施形態では、抗体は、とりわけ、1つまたは複数のキナーゼ活性、腫瘍形成能、転移、AMIGO-2シグナル伝達、A

50

M I G O - 2 媒介性細胞接着、癌細胞アポトーシス、E R K リン酸化 細胞成長、腫瘍形成、サイクリン産生、細胞増殖、細胞周期を介した進行、足場非依存性増殖、A M I G O - 2 タンパク質の細胞膜への局在化、A M I G O - 2 と A M I G O - 1 または A M I G O - 3 の一方または両方との間の相互作用、および血管形成を阻害する。

【 0 1 8 0 】

いくつかの実施形態では、抗体は、シグナルペプチドドメイン、L R R N T ドメイン、L R R 1 ドメイン、L R R 2 ドメイン、L R R 3 ドメイン、L R R 4 ドメイン、L R R 5 ドメイン、L R R 6 ドメイン、L R R C T ドメイン、I g V - s e t ドメイン、および A M I G O - 2 の I g ドメインからなる群より選択されるドメイン中の1つまたは複数の A M I G O - 2 エピトープに特異的に結合するモノクローナル抗体または F a b フラグメントである。シグナルペプチドドメインは配列番号2の約アミノ酸1~33であり、L R R - N 末端 (L R R - N T) ドメインは配列番号2の約アミノ酸41~60であり、L R R 1 ドメインは配列番号2の約アミノ酸69~92であり、L R R 2 ドメインは約アミノ酸94~116であり、L R R 3 ドメインは約アミノ酸118~140であり、L R R 4 ドメインは約アミノ酸142~164であり、L R R 5 ドメインは約167~191であり、L R R 6 ドメインは約アミノ酸193~216であり、L R R - C 末端 (L R R - C T) ドメインは約アミノ酸222~282であり、I g V - s e t ドメインは約293~388であり、A M I G O - 2 の I g ドメインは V - s e t ドメイン内に存在し、約アミノ酸303~365である。いくつかの実施形態では、抗体は、A M I G O - 2 のシグナルペプチド中の1つまたは複数のエピトープに特異的に結合するモノクローナル抗体である。1つの実施形態では、抗体は、A M I G O - 2 エピトープではないエピトープに特異的に結合しない。例えば、1つの実施形態では、抗体は、A M I G O - エピトープまたは A M I G O - 3 エピトープに特異的に結合しない。

10

20

【 0 1 8 1 】

いくつかの実施形態では、A M I G O - 2 モジュレーターは、A M I G O - 2 の L R R N T ドメインの1つまたは複数のエピトープに特異的に結合するモノクローナル抗体または F a b フラグメントである。

【 0 1 8 2 】

いくつかの実施形態では、A M I G O - 2 モジュレーターは、A M I G O - 2 の L R R 1 ドメインの1つまたは複数のエピトープに特異的に結合するモノクローナル抗体または F a b フラグメントである。いくつかの実施形態では、L R R 1 エピトープは、配列番号30および配列番号57からなる群より選択される。

30

【 0 1 8 3 】

いくつかの実施形態では、A M I G O - 2 モジュレーターは、A M I G O - 2 の L R R 2 ドメインの1つまたは複数のエピトープに特異的に結合するモノクローナル抗体または F a b フラグメントである。いくつかの実施形態では、L R R 2 エピトープは、配列番号32、配列番号39、および配列番号61からなる群より選択される。

【 0 1 8 4 】

いくつかの実施形態では、A M I G O - 2 モジュレーターは、A M I G O - 2 の L R R 3 ドメインの1つまたは複数のエピトープに特異的に結合するモノクローナル抗体または F a b フラグメントである。いくつかの実施形態では、L R R 3 エピトープは、配列番号29、配列番号39、配列番号40、配列番号56、および配列番号58からなる群より選択される。

40

【 0 1 8 5 】

いくつかの実施形態では、A M I G O - 2 モジュレーターは、A M I G O - 2 の L R R 4 ドメインの1つまたは複数のエピトープに特異的に結合するモノクローナル抗体または F a b フラグメントである。いくつかの実施形態では、L R R 4 エピトープは、配列番号26、配列番号35、および配列番号45からなる群より選択される。

【 0 1 8 6 】

いくつかの実施形態では、A M I G O - 2 モジュレーターは、A M I G O - 2 の L R R

50

5ドメインの1つまたは複数のエピトープに特異的に結合するモノクローナル抗体またはFabフラグメントである。いくつかの実施形態では、LR5エピトープは、配列番号25、配列番号27、配列番号36、および配列番号53からなる群より選択される。

【0187】

いくつかの実施形態では、AMIGO-2モジュレーターは、AMIGO-2のLR6ドメインの1つまたは複数のエピトープに特異的に結合するモノクローナル抗体またはFabフラグメントである。いくつかの実施形態では、LR6エピトープは、配列番号31、配列番号33、配列番号41、配列番号46、配列番号47、および配列番号62からなる群より選択される。

【0188】

いくつかの実施形態では、AMIGO-2モジュレーターは、AMIGO-2のLRCTドメインの1つまたは複数のエピトープに特異的に結合するモノクローナル抗体またはFabフラグメントである。いくつかの実施形態では、LRCTエピトープは、配列番号28、配列番号34、配列番号37、配列番号38、配列番号44、配列番号49、配列番号50、配列番号51、配列番号52、配列番号54、配列番号59、配列番号60、および配列番号62からなる群より選択される。

【0189】

いくつかの実施形態では、AMIGO-2モジュレーターは、AMIGO-2のIgV-setドメインの1つまたは複数のエピトープに特異的に結合するモノクローナル抗体またはFabフラグメントである。

【0190】

いくつかの実施形態では、AMIGO-2モジュレーターは、AMIGO-2のIgドメインの1つまたは複数のエピトープに特異的に結合するモノクローナル抗体またはFabフラグメントである。

【0191】

いくつかの実施形態では、AMIGO-2モジュレーターは、AMIGO-2の細胞外ドメイン(ECD)中の1つまたは複数のエピトープに特異的に結合するモノクローナル抗体またはFabフラグメントである。いくつかの実施形態では、AMIGO-2モジュレーターは、本質的に配列番号3からなる配列中の1つまたは複数のエピトープに特異的に結合するモノクローナル抗体またはFabフラグメントである。

【0192】

本発明の適切な抗体は、線状もしくは高次構造のエピトープまたはその組み合わせを認識することができる。いくつかの実施形態では、本発明の抗体は、配列番号3~6および25~62からなる群より選択されるAMIGO-2の抗原領域のエピトープに結合する。いくつかの実施形態では、AMIGO-2モジュレーターは、本質的に配列番号3からなる配列中の1つまたは複数のエピトープに特異的に結合するモノクローナル抗体またはFabフラグメントである。いくつかの実施形態では、抗体は、配列番号3からなる群より選択される配列を有するエピトープに特異的である。

【0193】

これらのペプチドは1つのエピトープを必ずしも正確にマッピングしなくてもよいが、免疫原性を示さないAMIGO-2配列も含むことができると理解すべきである。

【0194】

本発明の抗体が結合することができる他の潜在的エピトープの予想方法は当業者に周知であり、以下が含まれるが、これらに限定されない。Kyte-Doolittle分析(Kyte, J. and Doolittle, R. F., J. Mol. Biol. (1982) 157: 105-132)、Hopp and Woods分析(Hopp, T. P. and Woods, K. R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1981) 78: 3824-3828; Hopp, T. J. and Woods, K. R., Mol. Immunol. (1983) 20: 483-489; Hopp, T. J., J. Immunol. Methods (1986) 88: 1-18.)、Jameso

10

20

30

40

50

n - Wolf 分析 (Jameson , B . A . and Wolf , H . , Comput . Appl . Biosci . (1988) 4 : 181 - 186 .)、および Emini 分析 (Emini , E . A . , Schlieff , W . A . , Colonna , R . J . and Wimmer , E . , Virology (1985) 140 : 13 - 20 .)。いくつかの実施形態では、潜在的なエピトープを、理論上の細胞外ドメインの決定によって同定する。TMpred (K . Hofmann & W . Stoffel (1993) TMBase - A database of membrane spanning proteins segments Biol . Chem . Hoppe - Seyler 374 , 166 を参照のこと) または TMHMM (A . Krogh , B . Larsson , G . von Heijne , and E . L . L . Sonnhammer . Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model : Application to complete genomes . Journal of Molecular Biology , 305 (3) 567 - 580 , January 2001) などの分析アルゴリズムを使用して、かかる予想を行うことができる。SignalP 3.0 (Bednstein et al , (2004) J . Mol . Biol . 2004 Jul 16 ; 340 (4) : 783 - 95) などの他のアルゴリズムを使用して、シグナルペプチドの存在を予想し、これらのペプチドが全長タンパク質から切断される場所を予想することができる。細胞の外側のタンパク質の一部は、抗体相互作用の標的としての役割を果たすことができる。

10

20

【 0195 】

1) 抗体が結合活性の閾値を示す場合、および / または 2) 抗体が既知の関連するポリペプチド分子と有意に交差反応しない場合、抗体を、「特異的に結合する」と定義する。当業者は、抗体の結合親和性を、例えば、Scatchard 分析 (Scatchard , Ann . NY Acad . Sci . 51 : 660 - 672 , 1949) によって容易に決定することができる。いくつかの実施形態では、本発明の抗体は、その標的エピトープまたは模倣デコイに、AMIGO - 2 ファミリーの他の公知のメンバー (例えば、AMIGO - 1 および AMIGO - 3) よりも標的癌関連ポリペプチドに対して少なくとも 1 . 5 倍、2 倍、5 倍、10 倍、100 倍、 10^3 倍、 10^4 倍、 10^5 倍、 10^6 倍、またはそれを超えて結合する。

30

【 0196 】

いくつかの実施形態では、抗体は、 10^{-4} M 以下、 10^{-7} M 以下、 10^{-9} M 以下の高親和性、またはナノモル以下の親和性 (0 . 9、0 . 8、0 . 7、0 . 6、0 . 5、0 . 4、0 . 3、0 . 2、0 . 1 nM またはさらに低い濃度) で結合する。いくつかの実施形態では、AMIGO - 2 に対する抗体の結合親和性は、少なくとも 1×10^6 Ka である。いくつかの実施形態では、AMIGO - 2 に対する抗体の結合親和性は、少なくとも 5×10^6 Ka、少なくとも 1×10^7 Ka、少なくとも 2×10^7 Ka、少なくとも 1×10^8 Ka、またはそれを超える。本発明の抗体を、本発明のポリペプチドに対するその結合親和性に関して説明するか特定することもできる。いくつかの実施形態では、結合親和性には、 5×10^{-2} M 未満、 10^{-2} M、 5×10^{-3} M、 10^{-3} M、 5×10^{-4} M、 10^{-4} M、 5×10^{-5} M、 10^{-5} M、 5×10^{-6} M、 10^{-6} M、 5×10^{-7} M、 10^{-7} M、 5×10^{-8} M、 10^{-8} M、 5×10^{-9} M、 10^{-9} M、 5×10^{-10} M、 10^{-10} M、 5×10^{-11} M、 10^{-11} M、 5×10^{-12} M、 10^{-12} M、 5×10^{-13} M、 10^{-13} M、 5×10^{-14} M、 10^{-14} M、 5×10^{-15} M、または 10^{-15} M、またはそれ未満の Ka を有する結合親和性が含まれる。

40

【 0197 】

いくつかの実施形態では、本発明の抗体は、例えば、標準的なウェスタンブロット分析を使用して、抗体が AMIGO - 2 ポリペプチドに結合するが、公知の関連ポリペプチドに結合しない場合、公知の関連ポリペプチドに結合しない (Ausubel ら、 , Cur

50

rent Protocols in Molecular Biology, 1994)。公知の関連ポリペプチドの例には、AMIGOファミリーの他のメンバー（例えば、AMIGO-1およびAMIGO-3）が含まれるが、これらに限定されない。

【0198】

いくつかの実施形態では、本発明の抗体は、AMIGO-2のオルソログ、ホモログ、パラログ、もしくは変異形、またはその組み合わせおよびサブコンビネーション(subcombination)に結合する。いくつかの実施形態では、本発明の抗体は、AMIGO-2のオルソログに結合する。いくつかの実施形態では、本発明の抗体は、AMIGO-2のホモログに結合する。AMIGO-2のホモログは、公知のAMIGO-2関連タンパク質(AMIGO-1およびAMIGO-3が含まれる)をいう。いくつかの実施形態では、本発明の抗体は、AMIGO-2のパラログに結合する。いくつかの実施形態では、本発明の抗体は、AMIGO-2の変異形に結合する。いくつかの実施形態では、本発明の抗体は、AMIGO-2のオルソログ、ホモログ、パラログ、もしくは変異形、またはその組み合わせおよびサブコンビネーションに結合しない。

10

【0199】

いくつかの実施形態では、AMIGO-2ポリペプチドに特異的に結合する抗体集団を単離するために、抗体を公知の関連ポリペプチドに対してスクリーニングすることができる。例えば、ヒトAMIGO-2ポリペプチドに特異的な抗体は、適切な緩衝液条件下で不溶性マトリックスに接着したAMIGOタンパク質(AMIGO-2を除く)を含むカラムを通過するであろう。かかるスクリーニングにより、密接に関連するポリペプチドに交差反応性を示さないポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を単離可能である(Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988; Current Protocols in Immunology, Cooligan et al (eds.), National Institutes of Health, John Wiley and Sons, Inc., 1995)。特異的抗体のスクリーニングおよび単離は、当該分野で周知である(Fundamental Immunology, Paul (eds.), Raven Press, 1993; Getzoffら、, Adv. in Immunol. 43: 1-98, 1988; Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Goding, J.W. (eds.), Academic Press Ltd., 1996; Benjaminら、, Ann. Rev. Immunol. 2: 67-101, 1984を参照のこと)。かかるアッセイの代表例には以下が含まれる。同時免疫電気泳動(concurrent immunoelectrophoresis)、放射免疫アッセイ(RIA)、放射免疫沈降、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、ドットプロットおよびウェスタンプロットアッセイ、阻害または競合アッセイ、およびサンドイッチアッセイ。

20

30

【0200】

いくつかの実施形態では、本発明の抗体は、配列番号63(AMIGO-1)および配列番号64(AMIGO-3)からなる群より選択される配列内のエピトープに特異的に結合しない。いくつかの実施形態では、抗体またはFabフラグメントは、AMIGO-1またはAMIGO-3と交差反応しない。

40

【0201】

本発明はまた、標的タンパク質に特異的なSMIPまたは結合ドメイン免疫グロブリン融合タンパク質である抗体を提供する。これらの構築物は、抗体エフェクター機能を実施するのに必要な免疫グロブリンドメインに融合した抗原結合ドメインを含む一本鎖ポリペプチドである。例えば、WO03/041600号、米国特許出願公開第20030133939号および米国特許出願公開第20030118592号を参照のこと。

【0202】

いくつかの実施形態では、本発明の抗体は中和抗体である。いくつかの実施形態では、

50

抗体はターゲティング抗体である。いくつかの実施形態では、抗体は、標的結合の際に内在化される。いくつかの実施形態では、抗体は、標的結合の際に内在化されるようにならないが、その代わりに表面上に保持される。

【0203】

いくつかの実施形態では、中和抗体は、いかなるエフェクター機能も持たないであろう。あるいは、中和抗体は、エフェクター機能を有することができる。

【0204】

本発明の抗体を、目的の腫瘍細胞抗原への結合の際に迅速に内在化される能力または結合後に細胞表面上に残存する能力についてスクリーニングすることができる。いくつかの実施形態では、例えば、いくつかの免疫複合体型の構築では、毒素部分の放出に内在化が必要な場合、抗体が内在化できることが望ましいかもしれない。あるいは、抗体を使用してADCCまたはCDCを促進する場合、抗体が細胞表面上に残存することがより望ましいかもしれない。スクリーニング方法を使用して、これらの挙動型を識別することができる。例えば、細胞を、約1 µg/mLの濃度のヒトIgG1（コントロール抗体）または本発明の抗体の1つと氷上（内在化を遮断するための0.1%アジ化ナトリウムを含む）または37（アジ化ナトリウムなし）で3時間インキュベートする場合、細胞を保有する腫瘍細胞抗原を使用することができる。次いで、細胞を、冷却染色緩衝液（PBS + 1%BSA + 0.1%アジ化ナトリウム）で洗浄し、ヤギ抗ヒトIgG-FITCにて氷上で30分間染色する。相乗平均蛍光強度（MFI）を、FACS Caliburによって記録する。アジ化ナトリウムの存在下にて氷上で本発明の抗体とインキュベートした細胞とアジ化ナトリウムの非存在下にて37で観察した細胞との間でMFIの相違が認められない場合、抗体は、内在化ではなく細胞表面上に結合したままである抗体であると考えられるであろう。しかし、アジ化ナトリウムの非存在下にて37で細胞をインキュベート場合に表面染色可能抗体の減少が見出された場合、抗体は、内在化することができる抗体と考えられるであろう。

10

20

【0205】

抗体抱合体

いくつかの実施形態では、本発明の抗体は抱合されている。いくつかの実施形態では、抱合抗体は、癌療法、癌診断、または癌性細胞の画像化に有用である。

【0206】

診断への適用のために、抗体を、典型的には、検出可能部分で標識するであろう。多数の標識が利用可能であり、一般に、以下のカテゴリーに分類することができる。

30

【0207】

(a) 放射性核種（以下で考察したものなど）。抗体を、例えば、Current Protocols in Immunology, Volumes 1 and 2, Coligenら、, Ed. Wiley-Interscience, New York, N.Y., Pubs. (1991)に記載の技術を使用して放射性同位体で標識することができる。例えば、シンチレーションカウンティングを使用して放射能を測定することができる。

【0208】

(b) 蛍光標識（希土類キレート（ユウロピウムキレート）またはフルオレセインおよびその誘導体、ローダミンおよびその誘導体、ダンシル、リサミン、フィコエリトリン、およびテキサスレッドなど）を利用可能である。蛍光標識を、例えば、Current Protocols in Immunology（前出）に開示の技術を使用して抗体に抱合することができる。蛍光光度計を使用して蛍光を定量することができる。

40

【0209】

(c) 種々の酵素-基質標識を利用可能であり、米国特許第4,275,149号は、これらのいくつかの概説を示す。酵素は、一般に、発色基質の化学変化を触媒し、これを種々の技術を使用して測定することができる。例えば、酵素は、基質の変色を触媒し、これを分光光度法で測定することができる。あるいは、酵素は、基質の蛍光または化学発光

50

を変化させることができる。蛍光の変化を定量する技術は、上に記載している。化学発光基質は、化学反応によって電子的に励起されるようになり、次いで、発色し、これを（化学発光分析計（chemiluminometer）を使用して）測定することができるか、蛍光受容体にエネルギーを供与することができる。酵素標識の例には、ルシフェラーゼ（例えば、ホタルルシフェラーゼおよび細菌ルシフェラーゼ、米国特許第4,737,456号）、ルシフェリン、2,3-ジヒドロフタラジンジオン、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ウレアーゼ、ペルオキシダーゼ（西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRPO）など）、アルカリホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、サッカリドオキシダーゼ（例えば、グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、およびグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ）、複素環オキシダーゼ（heterocyclic oxidase）（ウリカーゼおよびキサンチンオキシダーゼなど）、ラクトペルオキシダーゼ、およびマイクロペルオキシダーゼなどが含まれる。抗体への酵素の抱合技術は、O'Sullivanら、Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay, in Methods in Enzym. (ed J. Langone & H. Van Vunakis), Academic press, New York, 73 147-166 (1981)に記載されている。

10

【0210】

抗体を、in vivo診断アッセイに使用することもできる。いくつかの実施形態では、免疫シンチオグラフィ（immunosciintigraphy）を使用して局在化することができるように抗体を放射性核種で標識する。便宜上、本発明の抗体をキット中に提供することができる（すなわち、一定量の試薬の診断アッセイを実施するための説明書との組み合わせを包装する）。抗体を酵素で標識する場合、キットは、酵素が必要とする基質および補因子（例えば、検出可能な発色団またはフルオロフォアが得られる基質前駆体）を含むことができる。さらに、安定剤および緩衝液（例えば、ブロック緩衝液または溶解緩衝液）などの他の添加物を含めることができる。種々の試薬の相対量を広範囲にわたって変化させて、アッセイの感受性を実質的に最適にする溶液中の試薬濃度を得ることができる。特に、試薬を、通常凍結乾燥された乾燥粉末（溶解時に適切な濃度を有する試薬溶液が得られる賦形剤が含まれる）として提供することができる。

20

30

【0211】

いくつかの実施形態では、抗体を、1つまたは複数のマイタンシン分子（例えば、約1~約10個のマイタンシン分子/抗体分子）に抱合する。マイタンシンを、例えば、May-SS-Meに変換することができ、これを、May-SH3に還元し、修飾抗体と反応させて（Chaririら、Cancer Research 52:127-131 (1992)）、マイタンシノイド-抗体免疫複合体を生成することができる。いくつかの実施形態では、抱合体は、高度に強力なマイタンシン誘導體DM1（N2'-デアセチル-N2'-（3-メルカプト-1-オキソプロピル）-マイタンシン）（例えば、2002年12月12日公開のWO02/098883号）（IC50は約10-11Mである）（概説については、Payne (2003) Cancer Cell 3:207-212を参照のこと）またはDM4（N2'-デアセチル-N2'-（4-メチル-4-メルカプト-1-オキソペンチル）-マイタンシン）（例えば、2004年12月2日公開のWO2004/103272号）であり得る。

40

【0212】

いくつかの実施形態では、抗体抱合体は、1つまたは複数のカリチアマイシン分子に抱合した抗腫瘍細胞抗原抗体を含む。抗生物質のカリチアマイシンファミリーは、ピコモル以下の濃度で二本鎖DNA分解物を産生することができる。使用することができるカリチアマイシンの構造アナログには、1I、2I、3I、N-アセチル-1I、PSAG、およびI1が含まれるが、これらに限定されない（Hinmanら、Cancer Research 53:3336-3342 (1993)およびLodeら、Ca

50

ncer Research 58:2925-2928(1998))。米国特許第5,714,586号、同第5,712,374号、同第5,264,586号、および同第5,773,001号(それぞれ、本明細書中で参考として援用される)も参照のこと。

【0213】

いくつかの実施形態では、多数の癌中で過剰発現される酵素によって、抗体を、その活性形態で放出することができるプロドラッグと抱合する。例えば、活性成分(active component)がプラスミンによって抱合体から放出される、ドキシソルピシンのプロドラッグ形態を使用して、抗体抱合体を作製することができる。プラスミンは、多数の癌組織で過剰産生されることが公知である(Decy et al, (2004) FASEB Journal 18(3):565-567を参照のこと)。

10

【0214】

いくつかの実施形態では、抗体を、酵素活性毒素およびそのフラグメントと抱合する。いくつかの実施形態では、毒素には、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性フラグメント、外毒素A鎖(緑膿菌由来)、シュードモナス外毒素、リシンA鎖、アプリンA鎖、モデシンA鎖(modeccin A chain)、 α -サルシン(alpha-sarcin)、シナアブラギリタンパク質、ジアンチンタンパク質、ヨウシュヤマゴボウ(Phytolacca americana)タンパク質、(PAPI、PAPII、およびPAP-S)、リボヌクレアーゼ(Rnase)、デオキシリボヌクレアーゼ(Dnase)、ヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質、ニガウリインヒビター、クルシン(curcin)、クロチン、サパオナリア・オフィシナリス(sapaonararia officinalis)インヒビター、ゲロニン、ミトゲリン(mitogellin)、レストレクトシン(restrictocin)、フェノマイシン(phenomycin)、ネオマイシン、およびトリコテセン(tricothecene)が含まれるが、これらに限定されない。例えば、1993年10月28日公開のWO93/21232号を参照のこと。いくつかの実施形態では、毒素は、本来備わっている免疫原性が低く、癌性細胞が毒素に耐性を示すようになる機会を減少させる作用機構(例えば、細胞増殖抑制機構に対する細胞障害機構)を備えている。

20

【0215】

いくつかの実施形態では、本発明の抗体と免疫調節薬との間で抱合体を作製する。例えば、いくつかの実施形態では、免疫刺激性オリゴヌクレオチドを使用することができる。これらの分子は強力な免疫原であり、抗原特異的抗体応答を誘発することができる(Datta et al, (2003) Ann N.Y. Acad. Sci 1002:105-111を参照のこと)。さらなる免疫調節化合物には、幹細胞成長因子(「S1因子」など)、リンホトキシン(腫瘍壊死因子(TNF)など)、造血因子(インターロイキンなど)、コロニー刺激因子(CSF)(顆粒球-コロニー刺激因子(G-CSF)または顆粒球マクローファージ刺激因子(GM-CSF)など)、インターフェロン(IFN)(インターフェロン、または)、エリスロポエチン、およびトロンボポエチンが含まれ得る。

30

【0216】

いくつかの実施形態では、放射性抱合抗体(radiolabeled antibodies)を提供する。いくつかの実施形態では、かかる抗体を、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{47}Sc 、 ^{59}Fe 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{75}Se 、 ^{77}As 、 ^{89}Sr 、 ^{90}Y 、 ^{99}Mo 、 ^{105}Rh 、 ^{109}Pd 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{142}Pr 、 ^{143}Pr 、 ^{149}Pm 、 ^{153}Sm 、 ^{161}Th 、 ^{166}Ho 、 ^{169}Er 、 ^{177}Lu 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{189}Re 、 ^{194}Ir 、 ^{198}Au 、 ^{199}Au 、 ^{211}Pb 、 ^{212}Pb 、 ^{213}Bi 、 ^{58}Co 、 ^{67}Ga 、 $^{80\text{m}}\text{Br}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{103\text{m}}\text{Rh}$ 、 ^{109}Pt 、 ^{161}Ho 、 $^{189\text{m}}\text{Os}$ 、 ^{192}Ir 、 ^{152}Dy 、 ^{211}At 、 ^{212}Bi 、 ^{223}Ra 、 ^{219}Rn 、 ^{215}Po 、 ^{211}Bi 、 ^{225}Ac 、 ^{221}Fr 、 ^{217}At 、 ^{213}Bi 、 ^{255}Fm 、ならびにその組み合わせおよびサブコンビネーションを

40

50

使用して作製することができる。いくつかの実施形態では、ホウ素原子、ガドリニウム原子、またはウラニウム原子を、抗体に抱合する。いくつかの実施形態では、ホウ素原子は ^{10}B であり、ガドリニウム原子は ^{157}Gd であり、ウラニウム原子は ^{235}U である。

【0217】

いくつかの実施形態では、放射性核種抱合体は、20 keVと10,000 keVとの間のエネルギーを有する放射性核種を有する。放射性核種は、1000 keV未満のエネルギーを有するAuger放射体、20 keVと5000 keVとの間のエネルギーを有するP放射体、または2000 keVと10,000 keVとの間のエネルギーを有するまたは「a」放射体であり得る。

10

【0218】

いくつかの実施形態では、線、線、または陽電子放射同位体である放射性核種を含む診断放射性抱合体を提供する。いくつかの実施形態では、放射性核種は、20 keVと10,000 keVとの間のエネルギーを有する。いくつかの実施形態では、放射性核種は、 ^{18}F 、 ^{51}Mn 、 $^{52\text{m}}\text{Mn}$ 、 ^{52}Fe 、 ^{55}Co 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{68}Ga 、 ^{72}As 、 ^{75}Br 、 ^{76}Br 、 $^{82\text{m}}\text{Rb}$ 、 ^{83}Sr 、 ^{89}Zr 、 $^{94\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{51}Cr 、 ^{57}Co 、 ^{58}Co 、 ^{59}Fe 、 ^{67}Ga 、 ^{75}Se 、 ^{97}Ru 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{114\text{m}}\text{In}$ 、 ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{13}Li 、および ^{197}Hg からなる群より選択される。

20

【0219】

いくつかの実施形態では、本発明の抗体を、感光剤または画像化剤である診断薬剤に抱合する。感光化合物は、色素源または色素などの化合物を含むことができる。画像化剤は、例えば、常磁性イオンであり得、このイオンは、クロム(III)、マンガン(II)、鉄(III)、鉄(II)、コバルト(II)、ニッケル(II)、銅(II)、ネオジム(III)、サマリウム(III)、イッテルビウム(III)、ガドリニウム(III)、バナジウム(II)、テルビウム(III)、ジスプロシウム(III)、ホルミウム(III)、およびエルビウム(III)からなる群より選択される金属を含む。画像化剤は、X線技術またはコンピュータ断層撮影法で使用される放射線不透過化合物(radio-opaque compound)(ヨウ素、イリジウム、バリウム、ガリウム、およびタリウム化合物など)でもあり得る。放射線不透過化合物を、バリウム、ジ

アトリゾアート、ヨード化ケシ油、クエン酸ガリウム、イオカルミン酸、イオセタム酸、ヨードミド、イオジパミド、ヨードキサム酸、イオグラミド(iogulamide)、イオヘキソール、イオパミドール、イオパノ酸、イオプロセム酸、イオセファム酸、イオセル酸、イオスラミドメグルミン、イオセメチン酸(iosemetic acid)、イオタスル、イオテトル酸、イオタラム酸、イオトロクス酸、イオキサゲル酸、イオキソトリゾ酸、イポダート、メグルミン、メトリザミド、メトリゾアート、プロピリオドン、および塩化第一タリウムからなる群より選択することができる。いくつかの実施形態では、診断免疫複合体は、本発明の抗体と抱合されるガス充填リボソームなどの超音波増強剤を含むことができる。診断免疫複合体を、種々の手順(術中、内視鏡的、または血管内の腫瘍または癌診断および検出方法が含まれるが、これらに限定されない)のために使用する

30

40

【0220】

いくつかの実施形態では、種々の二官能性タンパク質カップリング剤(N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルチオール)プロピオナート(SPDP)、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート、イミノチオラン(IT)、イミドエステルの二官能性誘導体(アジピド酸ジメチル塩酸塩など)、活性エステル(スベリン酸ジスクシンイミジルなど)、アルデヒド(グルタルアルデヒドなど)、ビス-アジド化合物(ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサジアミンなど)、ビス-ジアゾニウム誘導体(ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミンなど)、ジイソシアナート(トリエン2,6-ジイソシアナートなど)、およびビス-活性フ

50

ッ素化合物（1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼンなど）など）を使用して、抗体抱合体を作製する。例えば、リシン免疫毒素を、V i t e t t aら、S c i e n c e 238:1098(1987)に記載のように調製することができる。14C標識1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレントリアミン五酢酸(MX-DTPA)は、抗体へのラジオヌクレオチドの抱合のための例示的キレート剤である。WO94/11026号を参照のこと。リンカーは、細胞中の細胞傷害性薬剤の放出を容易にする「切断可能なリンカー」であり得る。例えば、酸不安定性リンカー、ペプチダーゼ感受性リンカー、ジメチルリンカー、またはジスルフィド含有リンカー(Charira, Cancer Research 52:127-131(1992))を使用することができる。薬剤を、炭水化物部分を介して、本発明の抗体とさらに連結することができる。

10

【0221】

いくつかの実施形態では、本発明の抗体および細胞毒性薬剤を含む融合タンパク質を、例えば、組換え技術またはペプチド合成によって作製することができる。いくつかの実施形態では、細胞毒性薬剤と抱合した抗腫瘍抗原抗体を含むかかる免疫複合体を、患者に投与する。いくつかの実施形態では、結合する免疫複合体および/または腫瘍細胞抗原タンパク質を細胞に内在化し、それにより結合した癌細胞の死滅における免疫複合体の治療有効性が増加する。いくつかの実施形態では、細胞毒性薬剤は、癌細胞中の核酸をターゲティングするか緩衝する。かかる細胞毒性薬剤の例には、メイタンシノイド、カリチアマイシン、リボヌクレアーゼ、およびDNAエンドヌクレアーゼが含まれる。

20

【0222】

いくつかの実施形態では、抗体を、腫瘍プレターゲットングで使用するために「受容体」(例えば、ストレプトアビジン)に抱合し、この抗体-受容体抱合体を患者に投与し、その後透徹薬を使用して非結合抱合体を循環から除去し、次いで、細胞毒性薬剤(例えば、ラジオヌクレオチド)に抱合する「リガンド」(例えば、アビジン)を投与する。

【0223】

いくつかの実施形態では、抗体を細胞傷害性分子と抱合し、これを標的細胞リソソーム(Lysosome)内に放出する。例えば、薬物モノメチルアウリスタチンE(MMAE)を、パリン-シトルリン結合を介して抱合することができ、これを、抗体抱合体の内在化後にタンパク質分解性リソソーム酵素カテプシンBによって切断する(例えば、2003年4月3日公開のWO03/026577号を参照のこと)。いくつかの実施形態では、切断可能な部分としてのヒドラジン機能性を含む酸不安定性リンカーを使用して、MMAEを抗体に結合することができる(例えば、2002年11月11日公開のWO02/088172号を参照のこと)。

30

【0224】

抗体依存性酵素媒介性プロドラッグ療法(ADEPT)

いくつかの実施形態では、プロドラッグ(例えば、ペプチジル化学療法薬、WO81/01145号を参照のこと)を活性な抗癌薬に変換するプロドラッグ活性化酵素への抗体の抱合によって、本発明の抗体をADEPTで使用することができる。例えば、WO88/07378号および米国特許第4,975,278号を参照のこと。

【0225】

いくつかの実施形態では、ADEPTに有用な免疫複合体の酵素成分には、プロドラッグをそのより活性な細胞傷害性形態に変換するような方法でプロドラッグに作用することができる任意の酵素が含まれる。

40

【0226】

ADEPTに有用な酵素には、リン酸塩含有プロドラッグの遊離薬への変換に有用なアルカリホスファターゼ;硫酸塩含有プロドラッグの遊離薬への変換に有用なアリアルスルファターゼ;非毒性5-フルオロシトシンの抗癌薬(5-フルオロウラシル)への変換に有用なシトシンデアミナーゼ;ペプチド含有プロドラッグの遊離薬への変換に有用なセラチアプロテアーゼ、サーモリシン、スプチリシン、カルボキシペプチダーゼ、およびカテプシン(カテプシンBおよびLなど)などのプロテアーゼ;D-アミノ酸置換基を含むプ

50

ロドラッグの変換に有用なD-アラニルカルボキシペプチダーゼ；グリコシル化プロドラッグの遊離薬への変換に有用な - ガラクトシダーゼおよびノイラミニダーゼなどの炭水化物切断酵素；3-ラクタムで誘導体化した薬物の遊離薬への変換に有用な - ラクタマーゼ；ならびにそのアミン窒素でフェノキシアセチル基またはフェニルアセチル基にてそれぞれ誘導体化された薬物の遊離薬への変換に有用なペニシリンVアミダーゼまたはペニシリンGアミダーゼなどのペニシリンアミダーゼが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、当該分野で「アブザイム」としても公知の酵素活性を有する抗体を使用して、本発明のプロドラッグを遊離活性薬に変換することができる（例えば、M a s s e y , N a t u r e 3 2 8 : 4 5 7 - 4 5 8 (1 9 8 7) を参照のこと）。アブザイムの腫瘍細胞集団への送達のために、抗体-アブザイム抱合体を本明細書に記載のように調製することができる。

10

【0227】

いくつかの実施形態では、ADEPT酵素を、当該分野で周知の技術（上記で考察のヘテロ二官能性架橋試薬の使用など）によって抗体に共有結合することができる。いくつかの実施形態では、本発明の酵素の少なくとも機能活性部分に連結した本発明の抗体の少なくとも抗原結合領域を含む融合タンパク質を、当該分野で周知の組換えDNA技術を使用して構築することができる（例えば、Neuberger et al, Nature 312:604-608(1984)）。

【0228】

いくつかの実施形態では、細胞傷害性様式よりもむしろ細胞増殖抑制性様式で作用する抗体の同定を、非処置コントロール培養物と比較した処置標的細胞培養物の生存率の測定によって行うことができる。生存率を、Cell Titer - Blue（登録商標）細胞生存率アッセイまたはCell Titer - Glo（登録商標）発光細胞生存率アッセイ（Promega、カタログ番号はそれぞれG8080およびG5750）などの当該分野で公知の方法を使用して検出することができる。いくつかの実施形態では、上記手段によって測定したところ、処置によって、いかなる細胞死の証拠もないコントロール培養物と比較して細胞数が減少する場合、潜在的に細胞増殖抑制性を示す抗体と見なす。

20

【0229】

いくつかの実施形態では、当該分野で公知のアッセイを使用してADCCを促進する抗体を同定するために、in vitroスクリーニングアッセイを行うことができる。1つの例示的アッセイは、in vitroADCCアッセイである。⁵¹Cr標識標的細胞を調製するために、腫瘍細胞株を、組織培養プレート中で成長させ、滅菌10mM EDTAを含むPBSを使用して回収した。剥離細胞を、細胞培養培地で2回洗浄する。細胞（ 5×10^6 ）を、 $200 \mu\text{Ci}$ の⁵¹Cr（New England Nuclear / DuPont）にて時折混合しながら37℃で1時間標識する。標識細胞を、細胞培養培地で3回洗浄し、次いで、 1×10^5 細胞/mLの濃度に再懸濁する。細胞を、オプソニン化しないで使用するか、アッセイ前にPBM Cで100ng/mLおよび1.25ng/mLの試験抗体、またはNKアッセイで20ng/mLおよび1ng/mLの試験抗体とのインキュベーションによってオプソニン化する。末梢血単核球を、正常な健常ドナーからのヘパリン上の血液回収によって調製し、同体積のリン酸緩衝化生理食塩水（PBS）で希釈する。次いで、血液を、LYMPHOCYTE SEPARATION MEDIUM（登録商標）（LSM: Organon Teknika）上に重層し、製造者の説明書に従って遠心分離する。単核球を、LSM-血漿界面から回収し、PBSで3回洗浄する。エフェクター細胞を、細胞培養培地中に最終濃度 1×10^7 細胞/mLに懸濁する。LSMによる精製後、ナチュラルキラー（NK）細胞を、製造者の説明書にしたがってNK細胞単離キットおよび磁性カラム（Miltenyi Biotech）を使用したネガティブ選択によってPBM Cから単離する。単離NK細胞を回収し、洗浄し、 2×10^6 細胞/mLの濃度に細胞培養培地中に再懸濁した。NK細胞の同一性を、フローサイトメトリー分析によって確認する。マイクロタイプレート（最終体積100μL）の列に沿った細胞培養培地中でのエフェクター（PBM CまたはNK）細胞の2倍の

30

40

50

連続希釈によって種々のエフェクター：標的比を調製する。エフェクター細胞の濃度は、P B M C については $1.0 \times 10^7 / \text{mL} \sim 2.0 \times 10^4 / \text{mL}$ の範囲であり、NK については $2.0 \times 10^6 / \text{mL} \sim 3.9 \times 10^3 / \text{mL}$ の範囲である。エフェクター細胞の滴定後、 $100 \mu\text{L}$ の ^{51}Cr 標識した 1×10^5 細胞 / mL の標的細胞（オプソニン化または非オプソニン化）を、プレートの各ウェルに添加する。これにより、最初のエフェクター：標的比は、P B M C については 100：1 となり、NK 細胞については 20：1 となる。全アッセイを二連で行い、各プレートは、自発的溶解（エフェクター細胞なし）および総溶解（標的細胞 + $100 \mu\text{L}$ 1% ドデシル硫酸ナトリウム、1N 水酸化ナトリウム）の両方についてコントロールを含む。プレートを、37 で 18 時間インキュベートし、その後に細胞培養上清を、上清回収システム（Skatron Instrument, Inc.）を使用して回収し、Minaxi auto-gamma 5000 series ガンマカウンター（Packard）にて 1 分間計数する。次いで、結果を、以下の式を使用して細胞傷害率として示す：細胞傷害率 = (サンプル cpm - 自発的溶解) / (総溶解 - 自発的溶解) $\times 100$ 。

【0230】

CDC を促進する抗体を同定するために、当業者は、当該分野で公知のアッセイを行うことができる。1 つの例示的アッセイは、In Vitro CDC アッセイである。異なる濃度の試験抗体の非存在下または存在下でのヒト（または別の供給源）補体含有血清との腫瘍細胞抗原発現細胞のインキュベーションによって、in vitro で CDC 活性を測定することができる。次いで、細胞傷害性を、ALAMAR BLUE（登録商標）を使用した生細胞の定量によって測定する（Gazzano-Santoro, J. Immunol. Methods 202 163-171 (1997)）。コントロールアッセイを、抗体を使用しないでを行い、抗体を使用するが熱失活血清を使用して行い、そして / または問題の腫瘍細胞抗原を発現しない細胞を使用して行う。あるいは、赤血球を、腫瘍抗原または腫瘍抗原由来のペプチドでコーティングし、次いで、赤血球溶解の観察によって CDC をアッセイすることができる（例えば、Karjalainen and Mantyjärvi, Acta Pathol Microbiol Scand [C]. 1981 Oct; 89 (5): 315-9 を参照のこと）。

【0231】

細胞死を誘導する抗体を選択するために、例えば、PI、トリパンブルー、または 7AAD 取り込みによって示される膜完全性の喪失を、コントロールと比較して評価することができる。1 つの例示的アッセイは、腫瘍抗原発現細胞を使用した PI 取り込みアッセイである。このアッセイにしたがって、腫瘍細胞抗原発現細胞を、10% 熱失活 FBS（Hyclone）および 2 mM L-グルタミンを捕捉したダルベッコ改変イーグル培地（D-MEM）：ラム F-12（50：50）中で培養する（したがって、補体および免疫エフェクター細胞の非存在下でアッセイを行う）。腫瘍細胞を、 $3 \times 10^6 / \text{皿}$ の密度で $100 \times 20 \text{ mm}$ 皿に播種し、一晚接着させる。次いで、培地を除去し、新鮮な培地のみまたは $10 \mu\text{g} / \text{mL}$ の適切なモノクローナル抗体を含む培地と置換する。細胞を、3 日間インキュベートする。各処置後、単層を PBS で洗浄し、トリプシン処理によって剥離する。次いで、細胞を、1200 rpm にて 4 で 5 分間遠心分離し、ペレットを、3 mL の氷冷 Ca^{2+} 結合緩衝液（10 mM HEPES、pH 7.4、140 mM NaCl、2.5 mM CaCl_2 ）に再懸濁し、細胞クランプの除去のために 35 mm のストレイナーで覆った 12×75 チューブ（1 mL / チューブ、3 チューブ / 処置群）に等分する。次いで、チューブに、PI（ $10 \mu\text{g} / \text{mL}$ ）を入れる。サンプルを、FACSCAN（商標）フローサイトメーターおよび FACSCONVERT（商標）CellQuest ソフトウェア（Becton Dickinson）を使用して分析することができる。PI 取り込みによって決定した、統計的に有意な細胞死レベルを誘導する抗体を、細胞死誘導抗体として選択することができる。

【0232】

PET 画像化剤として ^{18}F -アネキシンを使用して、アポトーシス活性について抗体

を *in vivo* でスクリーニングすることもできる。この手順では、アネキシン V を、¹⁸F で放射性標識し、観察しながら抗体投与後に試験動物に投与する。アポトーシス過程で起こる最も初期の事象の 1 つは、細胞膜の内側から外側の表面へのホスファチジルセリンの外転 (*ever sion*) (アネキシンに接近可能である) である。次いで、動物を、PET 画像化に供する (Yagle et al, J Nucl Med. 2005 Apr; 46 (4): 658 - 66 を参照のこと)。標準的なプロトコールにしたがって、動物を屠殺して各器官または組織を取り出し、アポトーシスマーカーについて分析することができる。

【0233】

いくつかの実施形態では、癌を遺伝子発現産物の過剰発現によって特徴づけることができる一方で、本出願は、腫瘍抗原過剰発現癌であると見なされない癌の治療方法をさらに提供する。癌中の腫瘍抗原発現を決定するために、種々の診断/予後診断アッセイが利用可能である。いくつかの実施形態では、遺伝子発現産物の過剰発現を、IHC によって分析することができる。腫瘍生検由来のパラフィン包埋組織切片を、IHC アッセイに供し、以下の腫瘍抗原タンパク質染色強度基準に従った。

10

【0234】

スコア 0 : 染色が認められないか、10%未満の腫瘍細胞で膜染色が認められる。

【0235】

スコア 1 + : 10%を超える腫瘍細胞で、かすかに/わずかに認められる膜染色が検出される。細胞は、その膜の一部のみが染色される。

20

【0236】

スコア 2 + : 10%を超える腫瘍細胞で、弱い~中程度の完全な膜染色が認められる。

【0237】

スコア 3 + : 10%を超える腫瘍細胞で、中程度から強い完全な膜染色が認められる。

【0238】

いくつかの実施形態では、腫瘍抗原過剰発現評価についてスコア 0 または 1 + の腫瘍を、腫瘍抗原を過剰発現しないと特徴づけることができるのに対して、スコア 2 + または 3 + の腫瘍を、腫瘍抗原を過剰発現すると特徴づけることができる。

30

【0239】

いくつかの実施形態では、AMIGO - 2 は、正常細胞と比較して癌細胞中で有意に上方制御されないが、癌細胞と正常細胞で AMIGO - 2 発現に対する依存性が異なる。いくつかの実施形態では、AMIGO - 2 調整は、腫瘍 - 間質相互作用に影響を及ぼす。いくつかの実施形態では、AMIGO - 2 の阻害は、腫瘍 - 間質相互作用を調整する。

【0240】

あるいは、またはさらに、INFORM (商標) (Ventana, Ariz. から販売) または PATHVISION (商標) (Vysis, Ill) などの FISH アッセイを、ホルマリン固定パラフィン包埋腫瘍組織に対して行って、腫瘍中の腫瘍抗原過剰発現の範囲 (存在する場合) を決定することができる。

40

【0241】

さらに、ポリマーへの共有結合性抱合によって抗体を化学修飾して、例えば、その循環半減期を増加させることができる。各抗体分子を、1 つまたは複数の (すなわち、1、2、3、4、5、またはそれを超える) ポリマー分子に付着させることができる。ポリマー分子を、いくつかの実施形態では、リンカー分子によって抗体に付着させる。ポリマーは、一般に、合成ポリマーまたは天然に存在するポリマー (例えば、任意選択的に置換された直鎖または分岐鎖のポリアルケン、ポリアルケニレン、またはポリオキシアルキレンポリマー、または分岐もしくは非分岐ポリサッカリド (例えば、ホモ - またはヘテロ - ポリサッカリド)) であり得る。いくつかの実施形態では、ポリマーは、ポリオキシエチレンポリオールおよびポリエチレングリコール (PEG) である。PEG は、室温で水溶性で

50

あり、一般式： $R(O-CH_2-CH_2)_nO-R$ （式中、Rは水素または保護基（アルキル基またはアルカノール基）であり得る）を有する。いくつかの実施形態では、保護基は、1個と8個との間の炭素を有する。いくつかの実施形態では、保護基はメチルである。記号nは、1と1,000との間または2と500との間の整数である。いくつかの実施形態では、PEGの平均分子量は、1000と40,000との間、2000と20,000との間、または3,000と12,000との間である。いくつかの実施形態では、PEGは、少なくとも1つのヒドロキシル基を有する。いくつかの実施形態では、ヒドロキシは、末端ヒドロキシ基である。いくつかの実施形態では、このヒドロキシル基は、インヒビター上の遊離アミノ基と反応するように活性化される。しかし、反応基の型および量を変化させて本発明の共有結合的に抱合したPEG/抗体を得ることができる。ポリマー、そのペプチドへの付着方法は、米国特許第4,766,106号、同第4,179,337号、同第4,495,285号、および同第4,609,546号（それぞれ、本明細書中で参考として援用される）に示されている。

【0242】

安全性の研究

本発明の抗体を、安全性および毒物学的特徴について試験することができる。これらの研究のためのガイドラインを、USDA CBER部門によって発行された文書「Points to Consider in the Manufacture and Testing of Monoclonal Antibody Products for Human Use」（Docket No 94D-0259, February 28, 1997）（本明細書中で参考として援用される）中に見出すことができる。一般に、候補抗体を、多数のヒト組織サンプルおよび/または単離ヒト細胞型を使用した前臨床研究でスクリーニングして、非標的組織結合および交差反応性を評価すべきである。これらのヒト組織研究から満足な結果が得られた後、種々の動物種由来の組織サンプルおよび単離細胞のパネルをスクリーニングして、一般的な毒物学研究での使用に適切な種を同定することができる。交差反応性動物種が同定されない場合、他のモデル型が適切であると見なすことができる。これらの他のモデルには、ヒト腫瘍細胞をげっ歯類宿主に移植する移植片モデルなどの研究または毒物学研究のために選択した動物種中の対応する腫瘍細胞抗原を認識する代理モノクローナル抗体の使用が含まれ得る。これらの代替モデル型由来のデータは第1の近似値であり、慎重に高等種に進行させるべきであると認識されるべきである。

【0243】

候補ネイキッド抗体（naked antibody）のために、簡潔な許容性を調査する研究を行うことができる。これらの研究では、候補分子の治療指数を、任意の用量依存性薬力学的効果の観察によって特徴づけることができる。広範な用量を使用すべきである（例えば、0.1mg/kg~100mg/kg）。腫瘍細胞抗原数の間の相違、交差反応性動物標的に対する候補抗体の親和性、および抗体結合後の細胞応答の相違を、治療指数の評価で考慮すべきである。候補抗体をヒトで試験する場合の初期用量群（guild）の考慮を補助するために、適切な動物モデルで薬力学研究および薬物動態学研究も行うべきである。

【0244】

候補免疫複合体のために、抱合体の安定性研究をin vivoで行わなければならない。任意選択的に、免疫複合体の各成分に対して薬力学研究および薬物動態学研究を行い、候補免疫複合体由来の任意の分解産物の成り行きを決定すべきである。適切な動物モデルにおいても上記のように薬力学研究および薬物動態学研究を行い、初期用量群の考察を補助すべきである。薬物をネイキッド抗体での前処置と組み合わせて投与する場合、安全性研究デザインをさらに考慮しなければならない。ネイキッド抗体のみを使用して安全性研究を行わなければならない。且つ免疫複合体の最終用量がこの治療レジメンの型より低いことに留意して、免疫複合体を使用して研究をデザインしなければならない。

【0245】

10

20

30

40

50

放射性免疫複合体について、動物の組織分布研究を行って生体分布データを決定すべきである。さらに、照射した放射能の総線量の代謝低下を、取得した初期および後期の時点の両方を使用して計算すべきである。放射性免疫複合体を、血清または血漿を使用した *in vitro* での安定性について試験することができ、遊離放射性核種、放射性免疫複合体、および標識された非抗体化合物の比率を測定するための方法を開発すべきである。

【0246】

オリゴヌクレオチド

いくつかの実施形態では、AMIGO-2モジュレーターはオリゴヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、AMIGO-2モジュレーターは、配列番号7~24からなる群より選択される配列を含むオリゴヌクレオチドである。

10

【0247】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、アンチセンスまたはRNAiオリゴヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、AMIGO-2遺伝子または遺伝子発現産物の領域、ドメイン、部分、またはセグメントと相補的である。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、約5~約100ヌクレオチド、約10~約50ヌクレオチド、約12~約35、および約18~約25ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、AMIGO-2遺伝子または遺伝子発現産物の領域、部分、ドメイン、またはセグメントと少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%相同である。いくつかの実施形態では、AMIGO-2遺伝子または遺伝子発現産物の少なくとも15、20、25、30、35、40、50、または100個の連続するヌクレオチドにわたって実質的に配列が相同する。いくつかの実施形態では、AMIGO-2遺伝子または遺伝子発現産物の全配列にわたって実質的に配列が相同する。いくつかの実施形態では、AMIGO-2遺伝子または遺伝子発現産物の少なくとも15、20、25、30、35、40、50、または100個の連続するヌクレオチドにわたって全配列が同一である。いくつかの実施形態では、AMIGO-2遺伝子またはその遺伝子産物の全長にわたって全配列が同一である。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、中程度またはストリンジェントなハイブリッド形成条件下で配列番号1のヌクレオチド配列を有する核酸分子に結合する。

20

30

【0248】

いくつかの実施形態では、AMIGO-2モジュレーターは二本鎖RNA(dsRNA)分子であり、RNAi(RNA干渉)を介して作用する。いくつかの実施形態では、1つのdsRNA鎖は、AMIGO-2遺伝子の領域、部分、ドメイン、またはセグメントと少なくとも50%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%相同である。いくつかの実施形態では、AMIGO-2遺伝子の少なくとも15、20、25、30、35、40、50、100、200、300、400、500、または1000個の連続するヌクレオチドにわたって実質的に配列が相同する。いくつかの実施形態では、AMIGO-2遺伝子の全長にわたって実質的に配列が相同する。

40

【0249】

いくつかの実施形態では、AMIGO-2モジュレーターは、二本鎖RNA(dsRNA)分子であり(RNAi(RNA干渉)を介して作用する)、dsRNAの一方または両方の鎖は、AMIGO-2遺伝子の領域、部分、ドメイン、またはセグメントと部分的に相補的である(例えば、少なくとも50%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%)。いくつかの実施形態では、dsRNAの一方または両方は、AMIGO-2遺伝子の領域、部分、ドメイン、またはセグメントと完全に相補的であ

50

る。配列「相補性」は、その水素結合特性の結果としての特定の窒素含有塩基間の化学的親和性をいう（すなわち、アデニンおよびウラシル（または、DNAまたは修飾RNAの場合、チミン）を相互に併置し、グアニンおよびシトシンを相互に併置する場合に逆平行二重鎖を形成することができるような塩基配列を有する2つの核酸鎖の性質）。したがって、完全に相補的な配列は、ヌクレオチド配列が逆平行二重鎖を形成する場合に塩基配列の完全な1対1の対応（すなわち、アデニン対ウラシルおよびグアニン対シトシン）を有する2つの配列であろう。

【0250】

いくつかの実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドを、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）で使用する。この配列は、ゲノム配列またはcDNA配列に基づく（またはこれからデザインする）ことができ、これを使用して特定の細胞または組織中の同一であるか、類似するか、相補的であるDNAまたはRNAの存在を増幅、確認、または検出する。

10

【0251】

小分子

いくつかの実施形態では、AMIGO-2モジュレーターは小分子である。本明細書中で使用される場合、用語「小分子」は、分子量が約10キログルトン未満である有機または無機非ポリマー化合物をいう。小分子の例には、ペプチド、オリゴヌクレオチド、有機化合物、および無機化合物などが含まれる。いくつかの実施形態では、小分子は、約9、約8、約7、約6、約5、約4、約3、約2、または約1キログルトン未満の分子量を有する。

20

【0252】

模倣物

いくつかの実施形態では、AMIGO-2モジュレーターは模倣物である。本明細書中で使用される場合、用語「模倣物」は、ペプチド活性を模倣する化合物いうために使用される。模倣物是非ペプチドであるが、非ペプチド結合によって連結したアミノ酸を含むことができる。1997年6月10日発行の米国特許第5,637,677号およびその特許出願（全てが、本明細書中で参考として援用される）は、模倣物の産生に関する詳細なガイダンスを含む。簡潔に述べれば、AMIGO-2の三次元構造と特異的に相互作用するペプチドの三次元構造を、ペプチドではない分子によって再現する。いくつかの実施形態では、AMIGO-2模倣物は、AMIGO-2の模倣物またはAMIGO-2のリガンドの模倣物である。

30

【0253】

デコイ受容体

いくつかの実施形態では、AMIGO-2モジュレーターは、AMIGO-2受容体の少なくとも一部を含むデコイ受容体である。いくつかの実施形態では、デコイ受容体は、天然のAMIGO-2受容体とAMIGO-2リガンドを競合する。いくつかの実施形態では、デコイ受容体を標識して、定量、定性決定（qualification）、および/または視覚化を容易にする。他の実施形態では、さらに、デコイ受容体および/またはデコイ受容体-AMIGO-2複合体の単離および/または分離を容易にする部分を含む。いくつかの実施形態では、AMIGO-2受容体リガンドとの結合の際、デコイ受容体により、（未変性AMIGO-2受容体と比較して）シグナルが増加する。いくつかの実施形態では、デコイ受容体は、AMIGO-2リガンドの捕捉およびシグナル伝達AMIGO-2受容体との相互作用の防止によって機能する非シグナル伝達分子である。いくつかの実施形態では、デコイ受容体は、抗体または抗体フラグメントと融合したAMIGO-2受容体の少なくとも一部を含む。

40

【0254】

癌の治療/防止方法

本発明は、治療有効量の1つまたは複数の本発明のAMIGO-2モジュレーターを被験体に投与する工程を含む、被験体の癌または癌の症状を治療および/または防止する方法を提供する。いくつかの実施形態では、癌は、AMIGO-2の過剰発現に関連する癌

50

である。いくつかの実施形態では、癌は、肺癌、膀胱癌、腎臓癌、結腸癌、乳癌、子宮癌、卵巣癌、または膵臓癌である。いくつかの実施形態では、癌は肺癌または結腸癌である。いくつかの実施形態では、被験体を、癌を有するか癌を罹患しやすいと診断した。いくつかの実施形態では、被験体を、胃癌以外の癌を有するか癌を罹患しやすいと診断した。

【0255】

癌の症状は当業者に周知であり、乳房のしこり、乳頭の変化、乳房嚢胞、乳房痛、死亡、体重減少、脱力、過度の疲労、摂食困難 (d i f f i c u l t y e a t i n g)、無食欲、慢性咳、息切れの悪化、喀血、血尿、血便、嘔気、嘔吐、肝臓転移、肺転移、骨転移、腹部膨隆、膨満感 (b l o a t i n g)、腹腔内の液体、腔出血、便秘、腹部膨隆、結腸の穿孔、急性腹膜炎 (感染、発熱、痛み)、痛み、吐血、重度の発汗 (h e a v y s w e a t i n g)、発熱、高血圧、貧血、下痢、黄疸、めまい、悪寒、筋痙攣、結腸転移、肺転移、膀胱転移、肝臓転移、骨転移、腎臓転移、および膵臓転移、および嚥下困難 (d i f f i c u l t y s w a l l o w i n g) などが含まれるが、これらに限定されない。

10

【0256】

調整化合物の治療有効量は、医化学者に周知の手順に従って経験的に決定することができ、治療有効量は、とりわけ、患者の年齢、容態の重症度、および所望の最終的な薬学的処方物に依存するであろう。本発明のモジュレーターを、例えば、吸入または座剤によって投与するか、腔組織、直腸組織、尿道組織、口腔組織、および舌下組織の洗浄などによって粘膜組織に投与するか、経口、局所、鼻腔内、腹腔内、非経口、静脈内、リンパ管内、腫瘍内、筋肉内、間質、動脈内、皮下、眼内、滑液嚢内、経上皮、および経皮に投与することができる。いくつかの実施形態では、インヒビターを、洗浄、蛍光、または動脈内に投与する。他の適切な導入方法には、再充填可能なデバイスまたは生分解性デバイスおよび遅延放出または徐放性重合体デバイスも含まれ得る。上記で考察するように、本発明の治療組成物を、他の公知の抗癌薬または他の公知の抗骨疾患治療レジメンとの併用療法の一部として投与することもできる。

20

【0257】

本発明は、さらに、患者における A M I G O - 2 関連生物活性を調整する方法を提供する。本方法は、1つまたは複数の A M I G O - 2 生物活性を調整するのに有効な量の A M I G O - 2 モジュレーターを患者に投与する工程を含む。A M I G O - 2 生物活性の適切な測定アッセイは、上または以下に記載されている。

30

【0258】

本発明はまた、1つまたは複数の A M I G O - 2 モジュレーターを患者に投与する工程を含む、阻害を必要とする患者の癌細胞成長を阻害する方法を提供する。A M I G O - 2 関連細胞成長の適切な測定アッセイは当業者に公知であり、上または以下に記載されている。

【0259】

本発明はまた、1つまたは複数の A M I G O - 2 の下流マーカーを調整する化合物を1つまたは複数の A M I G O - 2 を発現する細胞を含む癌を有する患者に投与することによる、(例えば、かかる方法を必要とする患者における)癌細胞成長を阻害する方法を提供する。1つまたは複数の A M I G O - 2 の下流マーカーを、c - M Y C、c - J u n、F o s L 1、または細胞外シグナル制御キナーゼ (E R K) からなる群より選択することができる。E R K の調整は、E R K のリン酸化または1つまたは複数のその基質の E R K によるリン酸化の調整であり得る (上記を参照のこと)。本方法は、任意選択的に、A M I G O - 2 を発現する1つまたは複数の細胞 (例えば、A M I G O - 2 m R N A または A M I G O - 2 タンパク質) を含む癌を有すると患者を同定する工程を含むことができる。

40

【0260】

本発明は、さらに、必要とする患者における癌を阻害する方法を提供する。本方法は、患者が本明細書中に記載の A M I G O - 2 療法の候補であるかどうかを決定する工程および患者が A M I G O - 2 療法の候補である場合に治療有効量の1つまたは複数の A M I G

50

0-2モジュレーターを患者に投与する工程を含む。患者がAMIGO-2療法の候補でない場合、患者を、従来の癌治療法を使用して処置する。

【0261】

本発明は、さらに、癌を有すると診断されるか疑われる患者における癌を阻害する方法を提供する。本方法は、治療有効量の1つまたは複数のAMIGO-2モジュレーターを患者に投与する工程を含む。

【0262】

本発明はまた、治療有効量のAMIGO-2モジュレーターを患者に投与する工程を含む、患者の2つまたはそれを超える細胞の相互作用を阻害する方法を提供する。AMIGO-2関連細胞相互作用の適切な測定アッセイは当業者に公知であり、上または以下に記載されている。

10

【0263】

本発明はまた、治療有効量の1つまたは複数のAMIGO-2モジュレーターを患者に投与する工程を含む、患者の癌の1つまたは複数の症状を調整する方法を提供する。

【0264】

本発明は、さらに、治療有効量のAMIGO-2モジュレーターを患者に投与する工程を含む、阻害を必要とする患者の細胞成長を阻害する方法を提供する。細胞成長の適切な測定アッセイは当業者に公知であり、上または以下に記載されている。

【0265】

本発明はまた、治療有効量のAMIGO-2モジュレーターを患者に投与する工程を含む、癌細胞の遊走を阻害する必要がある患者の癌細胞の遊走を阻害する方法を提供する。AMIGO-2関連細胞遊走の適切な測定アッセイは当業者に公知であり、上または以下に記載されている。

20

【0266】

本発明は、さらに、治療有効量のAMIGO-2モジュレーターを患者に投与する工程を含む、癌細胞の接着を阻害する必要がある患者の癌細胞の接着を阻害する方法を提供する。AMIGO-2関連細胞接着の適切な測定アッセイは当業者に公知であり、上または以下に記載されている。

【0267】

本発明はまた、治療有効量のAMIGO-2モジュレーターを患者に投与する工程を含む、血管形成を阻害する必要がある患者の血管形成を阻害する方法を提供する。血管形成の適切な測定アッセイは当業者に公知であり、上または以下に記載されている。

30

【0268】

本発明はまた、癌を発症しやすいか、癌転移しているか、転移していたので、回帰または再発に感受性を示す患者を予防的に処置する方法を提供する。本方法は、特に、例えば、癌または転移腫瘍の家族歴を有するか、癌転移に対する遺伝的素因を示す高リスクの個体で有用である。いくつかの実施形態では、腫瘍はAMIGO-2関連腫瘍である。さらに、本方法は、外科的切除によって除去されたか、従来の癌治療を使用して処置されたAMIGO-2関連腫瘍を有していた患者のAMIGO-2関連腫瘍の再発を防止するのに有用である。

40

【0269】

本発明はまた、治療有効量のAMIGO-2モジュレーターを患者に投与する工程を含む、癌の進行および/または癌進行の原因を阻害する方法を提供する。

【0270】

いくつかの実施形態では、抗癌治療を必要とする患者を、化学療法および/または放射線療法と併せて本発明のAMIGO-2モジュレーターで処置する。例えば、AMIGO-2モジュレーターの投与後、患者を、治療有効量の抗癌照射で治療することもできる。いくつかの実施形態では、AMIGO-2モジュレーターと組み合わせて化学療法による治療を行う。いくつかの実施形態では、AMIGO-2モジュレーターを、化学療法および放射線療法と組み合わせて投与する。

50

【0271】

治療方法は、単一または複数の用量の1つまたは複数のAMIGO-2モジュレーターを患者に投与する工程を含む。いくつかの実施形態では、AMIGO-2モジュレーターを、薬学的に許容可能なキャリアまたは希釈剤と組み合わせて、滅菌され、無発熱物質であり、AMIGO-2モジュレーターを含む注射用薬学的組成物として投与する。

【0272】

いくつかの実施形態では、本発明の治療レジメンを、癌のための従来の治療レジメン（手術、放射線療法、ホルモン除去療法（hormone ablation）、および/または化学療法が含まれるが、これらに限定されない）と共に使用する。本発明のAMIGO-2モジュレーターを、従来の癌治療の前、同時、または後に投与することができる。いくつかの実施形態では、2つまたはそれを超える異なるAMIGO-2モジュレーターを、患者に投与する。

10

【0273】

いくつかの実施形態では、AMIGO-2モジュレーターの患者への投与量は、とりわけ、1つまたは複数の染色体不安定性、キナーゼ活性、腫瘍形成能、転移、AMIGO-2シグナル伝達、細胞接着、癌細胞生存、ERKリン酸化、癌細胞の成長、腫瘍形成、サイクリン産生、細胞増殖、細胞周期を介した進行、足場非依存性増殖、AMIGO-2タンパク質の細胞膜への局在化、AMIGO-2とAMIGO-1またはAMIGO-3の一方または両方との間の相互作用、細胞質リン酸化AMIGO-2タンパク質レベル、および血管形成の阻害に有効である。いくつかの実施形態では、AMIGO-2モジュレーターの患者への投与量は、アポトーシスによる癌細胞死の増加に有効である。

20

神経系に関連する疾患および障害の治療方法

本発明はまた、治療有効量のAMIGO-2モジュレーターを患者に投与する工程を含む、治療を必要とする患者の神経系の疾患または障害を治療する方法を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、1つまたは複数のアルツハイマー病、パーキンソン病、癲癇、多発性硬化症、ハンチントン病、脊髄損傷、卒中、顔面神経損傷、糖尿病関連神経損傷、および網膜変性の治療方法を提供する。

【0274】

下流遺伝子発現の攪乱方法

いくつかの実施形態では、本発明は、1つまたは複数の遺伝子の攪乱方法を提供する。いくつかの実施形態では、本方法は、AMIGO-2を過剰発現する細胞をAMIGO-2モジュレーターと接触させる工程を含む。いくつかの実施形態では、1つまたは複数の遺伝子の発現を、治療有効量のAMIGO-2モジュレーターの患者への投与後に*in vivo*で攪乱する。いくつかの実施形態では、AMIGO-2モジュレーターは、BNIP3L、FAM46C、LOC339988、SATB1、C11orf21、FAM3B、UCP2、FNDC3A、DRE1、PPIC、ASS、KIAA1718、ALDH6A1、LR8、ADAMTSL2、LIPC、FZD10、COL4A2、TPP1、SERPIN1、ADCY9、AZGP1、USH1C、RAB40B、SMOC2、RRAGD、NUDT21、C14orf1、TPP1、RPS6KB1、KIAA0657、QPRT、RFK、KCNH2、PAQR8、SEPT6、LOC285758、EFNA1、LGALS8、ATP10D、ERBB3、CHST13、FLJ25476、MCF2L、FLJ10159、RAB13、ZNF261、USH1C、OSTM1、BMPR2、IPO9、ZNF226、HRASLS3、ERBB3、PROS1、ALDH6A1、PPT2、TFF3、C21orf86、LRRRC8B、BAZ2B、HIP1、RNASE4、FAM46C、STARD10、KLF13、BACE1、FCGRT、QPCT、KCTD14、FRAS1、FAM63B、SPON2、IQWD1、BMPR2、TXNIP、ZBTB4、DDAH2、ZNF420、LGALS8、NEU1、FUCA1、GRN、C20orf194、SEPT6、ASPSCR1、KLHDC5、GRN、STARD10、MGC12981、C14orf1、EPB41、ALDH2、ARHGEF10L、FNDC3A、CYP2R1、PAQR8、R

30

40

50

NF38、KIAA1327、ALS2CR3、EPS8L3、BACE1、SEPT6、IL27RA、DTX3L、CBPIN、ZNF627、Clorf85、AZGP1、GRN、SUOX、PSMB8、ARHGAP1、DACH1、COL4A2、PLEKHB1、SEC14L1、C2orf7、TPD52L1、PGM2、C14orf4、ZNF286、CAMK2D、PSME1、ZNF268、TRAF5、SEPT6、MGC45474、WIPI-2、CAMK2D、ZBED1、SEC24A、GGTL3、TRIM4、PPM1H、JMJD1A、DOK4、RPS6KB1、PSAP、EXOC7、C6orf80、RERE、ZNF641、MXRA7、RAC1、NDST1、JAG2、ZNF329、SEPT6、KLHDC5、STXBP1およびUBE2L3、ならびにその組み合わせおよびサブコンビネーションからなる群より選択される1つまたは複数の遺伝子の発現を阻害する。

10

【0275】

併用療法

いくつかの実施形態において、本発明は、癌に対する有効性をさらに改善するための2つまたはそれを超えるAMIGO-2モジュレーターを含む組成物を提供する。いくつかの実施形態では、AMIGO-2モジュレーターはモノクローナル抗体である。2つまたはそれを超えるAMIGO-2抗体を含む組成物を、癌を罹患しているか癌にかかりやすいヒトまたは哺乳動物に投与することができる。1つまたは複数の抗体を、別の治療薬（細胞毒性薬剤または癌化学療法薬など）と共に投与することもできる。治療薬が治療効果を発揮する期間が重複する限り、2つまたはそれを超える治療薬を同時または同一経路で投与する同時投与は必要ない。異なる日または週に投与する場合、同時または連続投与が意図される。

20

【0276】

いくつかの実施形態では、異なる抗体の組み合わせ投与（すなわち、「カクテル」）が意図される。かかる抗体カクテルは、異なるエフェクター機構を活用するか細胞傷害性抗体を免疫エフェクター機能性に依存する抗体と直接組み合わせた抗体を含むので、一定の利点を有し得る。組成物中のかかる抗体は、相乗的治療効果を示すことができる。

【0277】

細胞毒性薬剤は、細胞の機能を阻害または防止し、そして/または細胞を破壊する物質をいう。本用語は、放射性同位体（例えば、 ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{90}Y 、および ^{186}Re ）、化学療法薬、および毒素（細菌、真菌、植物、または動物を起源とする酵素活性毒素または合成毒素など）、またはそのフラグメントを含むことが意図される。非細胞毒性薬剤は、細胞機能を阻害または防止せず、そして/または細胞破壊を起こさない物質をいう。非細胞毒性薬剤には、細胞傷害性となるように活性化することができる薬剤が含まれ得る。非細胞毒性薬剤には、ビーズ、リポソーム、マトリックス、または粒子（例えば、米国特許出願公開第2003/0028071号および同第2003/0032995号（本明細書中で参考として援用される）を参照のこと）が含まれ得る。かかる薬剤を、本発明の抗体と抱合、カップリング、連結、または会合することができる。

30

【0278】

いくつかの実施形態では、従来の癌治療薬を、本発明の組成物と共に投与する。従来の癌治療薬には、以下が含まれる。

40

【0279】

- a) 癌化学療法薬、
- b) さらなる薬剤、
- c) プロドラッグ。

【0280】

癌化学療法薬には、アルキル化剤（カルボプラチンおよびシスプラチンなど）；ナイトロジェンマスタードアルキル化剤；ニトロソ尿素アルキル化剤（カルムスチン（BCNU）など）；代謝拮抗物質（メトトレキサートなど）；フォリン酸；プリンアナログ代謝拮抗物質；メルカプトプリン；ピリミジンアナログ代謝拮抗物質（フルオロウラシル（5 -

50

F U) およびゲムシタピン (ジェムザール (登録商標)) など) ; ホルモン抗新生物薬 (ゴセレリン、ロイプロリド、およびタモキシフェンなど) ; 天然抗新生物薬 (アルデスロイキン、インターロイキン - 2、ドセタキセル、エトボシド (V P - 1 6)、インターフェロン、パクリタキセル (タキソール (登録商標))、およびトレチノイン (A T R A) など) ; 抗生物質天然抗新生物薬 (プレオマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、ドキシソルピシン、ダウノマイシン、およびマイトマイシン (マイトマイシン C が含まれる) など) ; およびピンカルカロイド天然抗新生物薬 (ビンブラスチン、ピンクリスチン、ピンデシンなど) ; ヒドロキシ尿素 ; アセグラトン、アドリアマイシン、イフォスファミド、エノシタピン、エピチオスタノール、アクラルピシン、アンシタピン、ニムスチン、塩酸プロカルバジン、カルボコン、カルボプラチン、カルモフル、クロモマイシン A 3、抗腫瘍性多糖類、抗腫瘍性血小板因子、シクロホスファミド (サイトトキシン (登録商標))、シゾフィラン、シタラビン (シトシンアラビノシド)、ダカルバジン、チオイノシン、チオテパ、テガフル、ドラスタチン、ドラスタチンアナログ (オーリスタチン (a u r i s t a t i n) など)、C P T - 1 1 (イリノテカン)、ミトザントロン (m i t o z a n t r o n e)、ピノレルピン、テニボシド、アミノプテリン、カルミノマイシン (c a r m i n o m y c i n)、エスペラミシン (例えば、米国特許第 4 , 6 7 5 , 1 8 7 号を参照のこと)、ネオカルチノスタチン、O K - 4 3 2、プレオマイシン、フルツロン、プロクスウリジン、プスルファン、ホンパン、ペプロマイシン、ベスタチン (ウベニメクス (登録商標))、インターフェロン - 、メピチオスタン、ミトブロニトール、メルファラン、ラミニンペプチド、レンチナン、カワラタケ抽出物、テガフル / ウラシル、エストラムスチン (エストロゲン / メクロレタミン) が含まれるが、これらに限定されない。

10

20

30

40

50

【 0 2 8 1 】

癌患者の治療薬として使用されるさらなる薬剤には、E P O、G - C S F、ガンシクロビル ; 抗生物質、ロイプロリド ; メペリジン ; ジドブジン (A Z T) ; インターロイキン 1 ~ 1 8 (変異体およびアナログが含まれる) ; インターフェロンまたはサイトカイン (インターフェロン、および) など ; ホルモン (黄体形成ホルモン形成ホルモン (L H R H) およびアナログならびに性腺刺激ホルモン放出ホルモン (G n R H) など) ; 成長因子 (トランスフォーミング成長因子 - (T G F -)、線維芽細胞成長因子 (F G F)、神経成長因子 (N G F)、成長ホルモン放出因子 (G H R F)、上皮成長因子 (E G F)、線維芽細胞成長因子相同因子 (F G F H F)、肝細胞成長因子 (H G F)、およびインスリン成長因子 (I G F) など) ; 腫瘍壊死因子 - および (T N F - および) ; 浸潤阻害因子 - 2 (I I F - 2) ; 骨形成タンパク質 1 ~ 7 (B M P 1 ~ 7) ; ソマトスタチン ; サイモシン - 1 ; - グロブリン ; スーパーオキシドジムスターゼ (S O D) ; 補体因子 ; 抗血管形成因子 ; 抗原性物質 ; およびプロドラッグが含まれる。

【 0 2 8 2 】

いくつかの実施形態では、1つまたは複数の A M I G O - 2 モジュレーターを、1つまたは複数の従来の癌免疫療法薬と併せて投与することができる。免疫療法薬には、免疫系を刺激する (例えば、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、および好中球の産生または活性を刺激する) ことを目的とする免疫療法薬 (インターフェロン、顆粒球 - 単球コロニー刺激因子 (G M - C S F)、インターロイキン - 1 2、またはインターロイキン - 2 など) が含まれ得る。免疫療法薬には、癌治療に有用な1つまたは複数のワクチン薬も含まれ得る。例えば、1つまたは複数の A M I G O - 2 モジュレーターを、所与の癌または癌抗原 (例えば、M A G E 抗原) のペプチド、ポリペプチド、またはウイルスベクターワクチンと共に (例えば、同時、ほぼ同時、または患者の全治療ストラテジーの1構成要素として) 投与することができる。1つまたは複数の A M I G O - 2 モジュレーターを、特定の癌または癌抗原をターゲティングする1つまたは複数のモノクローナル抗体治療薬 (例えば、薬剤) と共に投与することもできる。例えば、リツキシマブ (I D E C - C 2 B 8) - 一定の B 細胞悪性疾患中に存在する C D 2 0 抗原をターゲティングするキメラ抗体 - は、免疫エフェクター細胞 (例えば、単球、マクロファージ、またはナチュラルキラ

ー細胞)上のFc受容体に結合し、これらの免疫エフェクター細胞によって腫瘍細胞の破壊を促進する(抗体依存性細胞媒介性毒性とも呼ばれる、上記を参照のこと)。本明細書中に記載のように、特定の腫瘍細胞または腫瘍細胞抗原に結合する抗体を使用して、補体依存性細胞傷害性応答を誘発することもできる。

【0283】

いくつかの実施形態では、1つまたは複数のAMIGO-2モジュレーターを、1つまたは複数の癌のための細胞周期ターゲティング薬と併せて投与することができる。細胞周期ターゲティング薬には、細胞周期の特異的タンパク質メディエーター(例えば、サイクリン依存性キナーゼ)をターゲティングするもの(ロスコピチンまたはフラボピリドールなど)が含まれ得る。細胞周期ターゲティング薬(例えば、化合物)には、細胞周期の特定の時期に分裂細胞(例えば、癌細胞)を停止させる薬剤(タキソール、スタウロスポリン、UCN-01、ロスコピチン、またはビンブラスチンなどであるが、決してこれらに限定されない)も含まれ得る。

10

【0284】

いくつかの実施形態では、1つまたは複数のAMIGO-2モジュレーターおよび1つまたは複数のさらなる薬剤を、同時に投与する。他の実施形態では、1つまたは複数のAMIGO-2モジュレーターを最初に投与し、1つまたは複数のさらなる薬剤を2番目に投与する。いくつかの実施形態では、1つまたは複数のさらなる薬剤を最初に投与し、AMIGO-2モジュレーターを2番目に投与する。1つまたは複数のAMIGO-2モジュレーターを、以前施されたまたは現在施される療法と置き換えるか増強することができる。例えば、1つまたは複数のAMIGO-2モジュレーターでの治療の際、1つまたは複数のさらなる薬剤の投与を停止するか減少させることができる(例えば、より低いレベルで投与することができる)。他の実施形態では、以前の療法の投与を維持する。いくつかの実施形態では、1つまたは複数のAMIGO-2モジュレーターのレベルが治療効果を得るのに十分なレベルに到達するまで以前の療法を維持するであろう(例えば、所与の患者の至適投薬量を決定する場合)。2つの療法を組み合わせることもできる。

20

【0285】

いくつかの実施形態では、1つまたは複数のAMIGO-2モジュレーターを被験体(例えば、ヒト患者)に投与して、同時投与される1つまたは複数の薬剤のレベルまたは投薬量を相殺することができる。例えば、第1の療法(例えば、タキソールなどの1つまたは複数のさらなる薬剤)の投薬量が患者に有毒であるか許容度が低い場合、1つまたは複数のAMIGO-2モジュレーターを投与する場合に投薬量を低下させることができる。1つまたは複数のAMIGO-2モジュレーターの投与により、毒性または許容度の低い副作用を伴わずに第1の療法の治療効果と等価またはより高い治療効果が得られる。

30

【0286】

プロドラッグは、親薬物と比較して腫瘍細胞に対して細胞傷害性が低いか細胞傷害性が無く、酵素的に活性化するか活性なまたはより活性の高い親形態に変換することができる薬学的に活性な物質の前駆体または誘導体をいう。例えば、Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" Biochemical Society Transactions, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986) および Stellaら, "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," Directed Drug Delivery, Borchardtら, (ed.), pp. 247-267, Humana Press (1985) を参照のこと。プロドラッグには、リン酸塩含有プロドラッグ、チオリン酸塩含有プロドラッグ、硫酸塩含有プロドラッグ、ペプチド含有プロドラッグ、D-アミノ酸改変プロドラッグ、グリコシル化プロドラッグ、 β -ラクタム含有プロドラッグ、任意選択的に置換されたフェノキシアセトアミド含有プロドラッグまたは任意選択的に置換されたフェニルアセトアミド含有プロドラッグ、5-フルオロシトシンおよびより活性の高い細胞傷害性遊離薬に変換することができる他の5-フルオロウリジンプロドラッグが含まれるが

40

50

、これらに限定されない。本明細書中で使用するためのプロドラッグ形態に誘導体化することができる細胞傷害薬の例には、上記の化学療法薬が含まれるが、これらに限定されない。

【0287】

臨床的態様

いくつかの実施形態では、本発明の方法および組成物は、肺癌、膀胱癌、腎臓癌、結腸癌、乳癌、子宮癌、卵巣癌、または膵臓癌、および癌転移に特に有用である。いくつかの実施形態では、癌は肺癌または結腸癌である。

【0288】

薬学的組成物

本発明はまた、1つまたは複数のAMIGO-2モジュレーターおよび薬学的に許容可能なキャリアを含む薬学的組成物を提供する。いくつかの実施形態では、薬学的組成物を、注射液（溶液または懸濁液）として調整し、注射前の溶液、懸濁液、または液体ビヒクルに溶かすのに適した固体形態を調製することもできる。リポソームは、薬学的に許容可能なキャリアの定義に含まれる。薬学的に許容可能な塩は、薬学的組成物中に存在することもできる（例えば、無機酸塩（塩酸塩、臭化水素酸塩、リン酸塩、および硫酸塩など）および有機酸塩（酢酸塩、プロピオン酸塩、マロン酸塩、および安息香酸塩など）。薬学的に許容可能な賦形剤の徹底的な考察は、Remington The Science and Practice of Pharmacy (1995) Alfonso Gennaro, Lippincott, Williams, & Wilkmsで得られる。

10

20

【0289】

AMIGO-2の検出方法

本発明はまた、AMIGO-2の検出方法を提供する。いくつかの実施形態では、AMIGO-2は、患者または患者サンプル中に存在する。いくつかの実施形態では、本方法は、1つまたは複数のAMIGO-2モジュレーターを含む組成物を患者に投与する工程および患者中の画像化剤の局在化を検出する工程を含む。いくつかの実施形態では、患者サンプルは癌細胞を含む。いくつかの実施形態では、AMIGO-2モジュレーターを、画像化剤に連結するか、検出可能に標識する。いくつかの実施形態では、AMIGO-2モジュレーターは、画像化剤と抱合したAMIGO-2抗体であり、これを患者に投与して、1つまたは複数の腫瘍を検出するか、AMIGO-2療法に対する患者の感受性を決定する。標識抗体は、細胞上の高密度の受容体に結合し、それにより、腫瘍細胞上に蓄積されるであろう。標準的な画像化技術を使用して、腫瘍部位を検出することができる。

30

【0290】

本発明はまた、AMIGO-2モジュレーターを含む組成物をサンプルと接触させる工程およびサンプル中のAMIGO-2モジュレーターの存在を検出する工程を含む、AMIGO-2を発現または過剰発現する細胞または腫瘍を画像化/検出する方法を提供する。いくつかの実施形態では、サンプルは患者サンプルである。いくつかの実施形態では、患者サンプルは癌細胞を含む。いくつかの実施形態では、AMIGO-2モジュレーターを、画像化剤に連結するか、検出可能に標識する。

40

【0291】

本発明はまた、患者、細胞、またはサンプル中に存在するAMIGO-2量を定量する方法を提供する。本方法は、1つまたは複数の抗体、プローブ、または小分子を患者またはサンプルに投与する工程およびサンプル中に存在するAMIGO-2量を検出する工程を含む。いくつかの実施形態では、抗体、プローブ、または小分子を、画像化剤に連結するか、検出可能に標識する。かかる情報は、例えば、腫瘍がAMIGO-2に関連するかどうか、したがって、特定の治療を使用または回避すべきかどうかを示す。いくつかの実施形態では、当業者に周知の標準的技術を使用して、腫瘍細胞を含むと考えられるサンプルを得、標識抗体、プローブ、オリゴヌクレオチド、および小分子と接触させる。任意の結合しない標識抗体、プローブ、オリゴヌクレオチド、または小分子の除去後、細胞に結

50

合した標識抗体、プローブ、オリゴヌクレオチド、または模倣物の量、あるいは非結合物として除去された抗体、ペプチド、オリゴヌクレオチド、または模倣物の量を決定する。この情報は、AMIGO-2の存在量に直接関連する。

【0292】

当業者に周知の手順を使用して、画像化を行うことができる。例えば、ラジオシンチグラフィ、核磁気共鳴画像法(MRI)、またはコンピュータ断層撮影法(CTスキャン)によって画像化を行うことができる。画像化剤のために最も一般的に使用される放射性標識には、放射性要素およびインジウムが含まれる。CTスキャンによる画像化は、鉄キレートなどの重金属を使用することができる。MRIスキャンは、ガドリニウムまたはマンガンのキレートを使用することができる。さらに、酸素、窒素、鉄、炭素、またはガリウムの陽電子放射体を使用して、陽電子放出断層撮影(PET)が可能であり得る。

10

【0293】

いくつかの実施形態では、AMIGO-2モジュレーターはAMIGO-2抗体である。いくつかの実施形態では、モジュレーターを、画像化剤に連結するか、検出可能に標識する。いくつかの実施形態では、画像化剤は、 ^{18}F 、 ^{43}K 、 ^{52}Fe 、 ^{57}Co 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{77}Br 、 ^{87}MSr 、 ^{86}Y 、 ^{90}Y 、 ^{99}MTC 、 ^{111}In 、 ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{127}Cs 、 ^{129}Cs 、 ^{131}I 、 ^{132}I 、 ^{197}Hg 、 ^{203}Pb 、または ^{206}Bi である。

【0294】

検出方法は、当業者に周知である。例えば、ポリヌクレオチドの検出方法には、PCR、ノーザンブロットング、サザンブロットング、RNA保護、およびDNAハイブリッド形成(in situハイブリッド形成が含まれる)が含まれるが、これらに限定されない。ポリペプチドの検出方法には、ウェスタンブロットング、ELISA、酵素活性アッセイ、スロットブロットング、ペプチド質量フィンガープリンティング、電気泳動、免疫化学、および免疫組織化学が含まれるが、これらに限定されない。検出方法の他の例には、放射免疫アッセイ(RIA)、化学発光免疫アッセイ、蛍光免疫アッセイ、時間分解蛍光免疫アッセイ(TR-FIA)、二色蛍光顕微鏡法、または免疫クロマトグラフィアッセイ(ICA)(全て当業者に周知)が含まれるが、これらに限定されない。本発明のいくつかの実施形態では、PCR法を使用してポリヌクレオチド発現を検出し、ELISAテクノロジーを使用してポリペプチド産生を検出する。

20

30

【0295】

細胞毒性薬剤または診断薬剤の細胞への送達方法

本発明はまた、AMIGO-2を発現する1つまたは複数の細胞に細胞毒性薬剤または診断薬剤を送達する方法を提供する。いくつかの実施形態では、本方法は、細胞毒性薬剤または診断薬剤に抱合した本発明のAMIGO-2モジュレーターを細胞と接触させる工程を含む。

【0296】

癌患者の予後を決定する方法

本発明はまた、AMIGO-2関連癌を有する患者の予後を決定する方法を提供する。いくつかの実施形態では、本方法は、細胞膜に局在化したAMIGO-2の癌細胞レベルの、癌細胞の他の領域に局在化したAMIGO-2レベルに対する比を決定する工程を含む。いくつかの実施形態では、細胞膜に局在化したAMIGO-2レベルが細胞膜を含まない癌細胞の他の領域に局在化したAMIGO-2レベルよりも高い患者は、患者がAMIGO-2関連癌を有し、且つAMIGO-2療法に感受性を示すことを示す。いくつかの実施形態では、細胞膜に局在化したAMIGO-2の、細胞膜を含まない癌細胞の他の領域に局在化したAMIGO-2と比較した比が少なくとも2:1であることは、患者がAMIGO-2関連癌を有し、且つAMIGO-2療法に感受性を示すことを示す。いくつかの実施形態では、細胞膜に局在化したAMIGO-2の、細胞膜を含まない癌細胞の他の領域に局在化したAMIGO-2に対する比が少なくとも3:1であることは、患者がAMIGO-2関連癌を有し、且つAMIGO-2療法に感受性を示すことを示す。

40

50

【0297】

A M I G O - 2 療法に対する感受性を決定する方法

本発明はまた、A M I G O - 2 療法に対する患者の感受性を決定する方法を提供する。本方法は、患者または患者サンプル中のA M I G O - 2 の差分発現の証拠の存在または非存在を検出する工程を含む。いくつかの実施形態では、患者またはサンプル中のA M I G O - 2 の差分発現の証拠の存在は、A M I G O - 2 療法に感受性を示す患者を示す。いくつかの実施形態では、患者またはサンプル中のA M I G O - 2 の差分発現の証拠の非存在は、A M I G O - 2 療法の候補ではない患者を示す。いくつかの実施形態では、A M I G O - 2 は、正常細胞と比較して癌細胞中で有意に上方制御されないが、癌細胞と正常細胞でA M I G O - 2 発現に対する依存性が異なる。いくつかの実施形態では、A M I G O - 2 調整は、腫瘍-間質相互作用に影響を及ぼす。いくつかの実施形態では、A M I G O - 2 の阻害は、腫瘍と間質組織との間の相互作用を阻害する。

10

【0298】

いくつかの実施形態では、治療方法は、画像化剤に連結したA M I G O - 2 モジュレーターを含む組成物を必要とする患者に投与し、患者中の遺伝子または遺伝子産物の証拠の存在または非存在を検出することを含む、A M I G O - 2 療法に感受性を示す患者を最初に同定する工程を含む。いくつかの実施形態では、治療方法は、さらに、患者がA M I G O - 2 療法の候補である場合に患者に1つまたは複数のA M I G O - 2 モジュレーターを投与する工程および患者がA M I G O - 2 療法の候補でない場合、患者を従来の癌治療で処置する工程を含む。

20

【0299】

いくつかの実施形態では、1つまたは複数のA M I G O - 2 モジュレーターを単独で投与するか、患者が癌を有するか癌に感受性を示す場合に他の抗癌薬と組み合わせて投与する。

【0300】

癌の進行を評価する方法

本発明はまた、第1の時点での生体サンプル中のA M I G O - 2 の発現産物レベルを第2の時点の同一の発現産物レベルと比較する工程を含む、患者の癌の進行を評価する方法を提供する。第1の時点と比較した第2の時点での発現産物レベルの変化は、癌の進行を示す。

30

【0301】

スクリーニング方法

本発明はまた、抗癌薬のスクリーニング方法を提供する。本方法は、A M I G O - 2 を発現する細胞を候補化合物と接触させる工程およびA M I G O - 2 関連生物活性が調整されたかどうかを決定する工程を含む。いくつかの実施形態では、1つまたは複数の染色体不安定性、キナーゼ活性、腫瘍形成能、癌細胞の成長、癌細胞生存、腫瘍形成、癌細胞増殖、転移、細胞遊走、基質リン酸化、サイクリン産生、血管形成、細胞増殖、細胞周期制御、シグナル伝達、細胞間接着、細胞-細胞膜相互作用、細胞-細胞外基質相互作用、足場非依存性増殖、A M I G O - 2 タンパク質の細胞膜への局在化、A M I G O - 2 とA M I G O - 1 またはA M I G O - 3 の一方または両方との間の相互作用、およびA M I G O - 2 発現の阻害は、抗癌薬であることを示す。いくつかの実施形態では、本発明の方法によって同定された抗癌薬を、治療方法および/または診断方法において必要とする患者に投与する。

40

【0302】

いくつかの実施形態では、本発明は、例えば、下流マーカーの活性またはレベルを調整する能力について推定モジュレーターをスクリーニングすることによって抗癌薬（特に、抗転移癌薬）をスクリーニングする方法を提供する。いくつかの実施形態では、サイクリンD1、サイクリンB1、c - M y c、c - J u n、細胞外シグナル制御キナーゼ（E R K）、血管内皮成長因子（V E G F）、ウロキナーゼ、およびポリ（A D P - リボース）ポリメラーゼ1（P A R P 1）のレベルを減少させる候補薬を、抗癌薬と同定する。

50

【0303】

いくつかの実施形態では、本発明は、AMIGO-2モジュレーターを同定する方法を提供する。いくつかの実施形態では、本方法は、候補化合物の存在下および非存在下でAMIGO-2を発現する1つまたは複数の細胞を含むサンプル中のAMIGO-2のリン酸化を比較する工程を含む。いくつかの実施形態では、候補化合物の非存在下でのサンプル中のAMIGO-2のリン酸化と比較した候補化合物の存在下でのサンプル中のAMIGO-2のリン酸化の調整は、候補化合物がAMIGO-2モジュレーターであることを示す。

【0304】

いくつかの実施形態では、免疫沈降抗体を使用して、AMIGO-2をサンプルから単離する。いくつかの実施形態では、免疫沈降抗体は、本発明の抗AMIGO-2抗体である。いくつかの実施形態では、AMIGO-2リン酸化はセリン/トレオニンリン酸化である。いくつかの実施形態では、AMIGO-2リン酸化を、ホスホセリン/トレオニン抗体を使用して検出および/または定量する。いくつかの実施形態では、免疫沈降抗体は、ホスホセリン/トレオニン抗体である。

10

【0305】

AMIGO-2調整の検出方法

いくつかの実施形態では、本発明は、細胞中のAMIGO-2活性の調整を検出する方法を提供する。いくつかの実施形態では、本方法は、AMIGO-2を発現する細胞を含むサンプルをAMIGO-2活性の調整に十分な時間AMIGO-2インヒビターと接触させる工程、およびホスホセリン/トレオニン抗体を使用してサンプル中のAMIGO-2セリン/トレオニンリン酸化をコントロールと比較する工程を含む。いくつかの実施形態では、コントロールと比較したサンプルの細胞中のAMIGO-2のセリン/トレオニンリン酸化の変化は、AMIGO-2活性の調整を示す。いくつかの実施形態では、AMIGO-2リン酸化はセリン/トレオニンリン酸化である。いくつかの実施形態では、AMIGO-2リン酸化を、ホスホセリン/トレオニン抗体を使用して検出および/または定量する。いくつかの実施形態では、免疫沈降抗体は、ホスホセリン/トレオニン抗体である。

20

【0306】

いくつかの実施形態では、本発明は、AMIGO-2を過剰発現する細胞を含むサンプル中のAMIGO-2活性の調整を検出する方法を提供する。いくつかの実施形態では、本方法は、AMIGO-2活性の調整に十分な時間細胞中でAMIGO-2を過剰発現する工程、AMIGO-2を本発明のAMIGO-2抗体で免疫沈降する工程、およびホスホセリン/トレオニン抗体を使用してサンプル中のAMIGO-2セリン/トレオニンリン酸化をコントロールと比較する工程を含む。いくつかの実施形態では、コントロールと比較したサンプル中のAMIGO-2のセリン/トレオニンリン酸化の変化は、AMIGO-2活性の調整を示す。

30

【0307】

いくつかの実施形態では、本方法は、AMIGO-2活性の調整に十分な時間サンプルをAMIGO-2インヒビターと接触させる工程、AMIGO-2を抗ホスホセリン/トレオニン抗体で免疫沈降する工程、および本発明の抗体を使用して、サンプル中のリン酸化AMIGO-2レベルをコントロールと比較する工程を含む。いくつかの実施形態では、コントロールと比較したサンプル中のリン酸化AMIGO-2レベルの変化は、AMIGO-2活性の調整を示す。

40

【0308】

いくつかの実施形態では、本方法は、AMIGO-2活性の調整に十分な時間サンプル中でAMIGO-2を過剰発現する工程、AMIGO-2を抗ホスホセリン/トレオニン抗体で免疫沈降する工程、および本発明のAMIGO-2抗体を使用して、サンプル中のリン酸化AMIGO-2レベルをコントロールと比較する工程を含む。いくつかの実施形態では、コントロールと比較したサンプル中のリン酸化AMIGO-2レベルの変化は、

50

AMIGO - 2 活性の調整を示す。

【0309】

AMIGO - 2 の精製方法

いくつかの実施形態では、本発明は、AMIGO - 2 を含むサンプルからAMIGO - 2 タンパク質を精製する方法を提供する。本方法は、固体支持体に結合した本発明のAMIGO - 2 抗体を含むアフィニティマトリックスを準備する工程、サンプルをアフィニティマトリックスと接触させてアフィニティマトリックス - AMIGO - 2 タンパク質複合体を形成する工程、サンプルの残存物からアフィニティマトリックス - AMIGO - 2 タンパク質複合体を分離する工程、およびアフィニティマトリックスからAMIGO - 2 タンパク質を放出させる工程を含む。

10

【0310】

キット

いくつかの実施形態では、本発明は、AMIGO - 2 の差分発現と関連する遺伝子または遺伝子産物の画像化および/または検出のためのキットを提供する。本発明のキットは、検出可能な抗体、小分子、オリゴヌクレオチド、デコイ、模倣物、またはプローブ、および本発明の方法の実施のための説明書を含む。任意選択的に、キットはまた、1つまたは複数の以下を含むことができる。コントロール（ポジティブおよび/またはネガティブ）、コントロール用の容器、正および/または負の結果の代表例の写真または描写。

【0311】

本明細書中に記載の各特許、特許出願、受入番号、および刊行物は、その全体が本明細書中で参考として援用される。

20

【0312】

本明細書中に記載の修正形態に加えて、本発明の種々の修正形態は、上記説明を考慮して当業者に明らかであろう。かかる修正形態は、添付の実施形態の範囲内であることも意図される。本発明を、以下の実施例でさらに証明するが、これらは例示のみを目的とし、本発明の範囲を制限することを意図しない。

【実施例】

【0313】

(実施例1) AMIGO - 2 発現はいくつかの癌組織で上方制御される

mRNAを、レーザー捕捉顕微切断 (laser capture microdissected) (LCM) された結腸癌組織、乳癌組織、および前立腺癌組織から単離し、mRNAを、各正常細胞のプール (図1A; RSM = 基準標準混合物 (reference standard mix)) または各組織サンプル内の癌細胞に隣接する正常細胞 (図1B) と比較した。Affymetrix (登録商標) GeneChips (登録商標) (Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA) (図1A) または癌組織から作製したcDNAライブラリーを使用して組織内で生成したアレイ (図1B) のいずれかに対するオリゴヌクレオチドアレイ分析によってサンプルを試験した。図1Aおよび1B中の各表について、患者の番号を示し、その後癌と正常サンプルとの間の相対発現を示す。(「%GE2X」および「>=2X」は2倍上方制御を示し、「%LE.5X」および「<=2x」は2倍下方制御を示す)。両チップ組は、AMIGO - 2 が結腸癌中で上方制御されることを証明した。組織内チップを使用して行った実験は、AMIGO - 2 が乳癌および前立腺癌中でも上方制御されることを示した。これらの組織中での上方制御は、Affymetrix実験では認められなかった。

30

40

【0314】

逆転写カップリングポリメラーゼ連鎖反応 (Reverse-transcription-coupled polymerase chain reaction) (RT-PCR) を使用して、正常組織サンプルおよび癌組織サンプル中の相対AMIGO - 2 mRNAレベルも試験した (図2)。正常組織のパネルならびに結腸、乳房、および前立腺LCM (レーザー捕捉解剖) 解剖したサンプルのプール (8人の患者/プール) を、半定量RT-PCR (GeneAmp (登録商標), Applied Biosystem

50

s, Foster City, CA) によって比較した。2つのプライマー組を試験し、類似の結果(「ABTP 508/509」と呼ばれるプライマー組由来のデータを図2に示す)を得た。試験した正常組織のうち、乳房および肺は、最も高い相対発現を示した。結腸癌は、正常結腸の5倍の上方制御および正常乳房の数倍の上方制御を示した。

【0315】

Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affymetrix, Inc.)を使用した癌組織および正常組織中のAMIGO-2 mRNA発現のオリゴヌクレオチドアレイ分析のグラフを、図3および4に示す。正常組織型および癌組織型を、横軸に沿って示す。図4では、癌組織を、「c_」でラベルし(例えば、「c_breast_duct」は、乳癌組織サンプルを示す)正常組織を「n_」でラベルする。組織型を、既知である場合、組織の型およびサブタイプに関してさらにラベリングする。例えば、「c_breast_duct」は、乳房の管に局在化した乳癌由来の癌組織である。外科的除去の際にサブタイプが明確でなかったか未知であった場合、ラベルには、「非特定」を示す「ns」が含まれる。図3および4の縦軸上の各スポットは、1人の患者由来の組織サンプルを示し、縦軸上の最も高い各スポット(線形)は、プローブ組の相対発現レベルを示す。図3は線形分析を示す一方で、図4中のデータを、log₂スケールで示す。黒丸は線形検出範囲内における発現レベルを有するサンプルを示す。白丸は、遺伝子がプローブ組の検出限度未満である場合のサンプルにおける遺伝子発現の上限を示す。白四角は、プローブ組が飽和した場合のサンプル中の遺伝子発現の下限を示す。分析の実施前に、各プローブ組を、サンプルの巨大で多様な組にわたるその構成性プローブの挙動の分析によって校正した。この校正によって各プローブの相対感受性およびプローブ組応答がプローブ間で線形である強度の範囲を測定した。この範囲未満の強度を「非検出」と呼ぶ一方で、この範囲を超える強度を「飽和」と呼ぶ。サンプル間のハイブリッド形成および標識効率の変動により、校正の適用後に各アレイを規準化した。これにより、遺伝子発現に関する範囲の上限および下限が得られ、これはサンプルによっていくらか異なった。

【0316】

(実施例2)免疫組織化学により、AMIGO-2が結腸癌および肺癌で発現することが明らかとなる

組織切片を脱パラフィン処理し、Ventana Discovery instrument (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ)にて抗原回収(antigen retrieval)を行った。標準的な細胞馴化を行い、次いで、細胞を一次抗体と60分間インキュベートした。ウサギ抗ヒトAMIGO-2抗体(Chiron, Emeryville, CA)およびウサギIgGブリードコントロール(Chiron, Emeryville, CA)を、10μg/mlで使用した。Ventana Universal Secondary Reagent (Ventana Medical Systems, Inc.)およびその後Ventana DAB Map Kit (Ventana Medical Systems, Inc.)を検出のために使用した。VentanaヘマトキシリンおよびBluing試薬(Ventana Medical Systems, Inc.)を対比染色のために使用し、切片をアルコールで段階的に脱水し、キシレン中で清浄化し、合成封入剤を使用してカバースリップをのせた。

【0317】

染色は、AMIGO-2が腫瘍細胞および腫瘍間質で発現することを示す。腫瘍周辺の間質組織中のAMIGO-2発現は、腫瘍自体における発現と等価またはより高いことが認められた。これは、AMIGO-2が腫瘍成長の支持に必要な脈管化に重要であり得ることを示す。

【0318】

(実施例3)AMIGO-2タンパク質レベルは異なる細胞株中で変化する

タンパク質溶解物を異なる細胞株の細胞ペレットから作製し、溶解物を、AMIGO-

10

20

30

40

50

2 を特異的に認識するが A M I G O - 1 タンパク質や A M I G O - 3 タンパク質を認識しない市販の A M I G O - 2 抗体 (R & D S y s t e m s , I n c . , M i n n e a p o l i s , M N の M A B 2 0 8 0) を使用した免疫沈降に供した。細胞株は、胃癌株 (A G S)、2 つの結腸癌株 (S W 6 2 0 および H T 2 9)、2 つの結腸直腸株 (C o l o 3 2 0 および H C T 1 1 6)、および胚細胞株 (2 9 3 - C M V I I) を含んでいた (図 5)。免疫沈降によって捕捉されたタンパク質を、アクリルアミドゲル電気泳動によって分離し、次いで、組織内で生成した抗 A M I G O - 2 抗体を使用したウェスタン分析に供した (図 5)。結腸細胞株および胃細胞株において 2 つのバンド (約 6 3 k D および約 9 0 k D) が認められた。より高い分子量の産物は、A M I G O - 2 のグリコシル化形態、リン酸化形態、または多量体形態であり得る。相対半定量的 R T - P C R C t レベルを決定し、図 5 中の 4 つの細胞株の名称の隣に括弧書きで示す。C t 値は、一定サイクル数の P C R 後の検出閾値を示す。より高い C t 値は、c D N A の検出により多数のサイクルが必要であることを示し、したがって、より低い m R N A レベルであることを示す。試験した全ての細胞株は、A M I G O - 2 m R N A について陽性であったが、タンパク質の検出能力は m R N A の減少に伴って低下した。図 5 は、A M I G O - 2 が結腸癌細胞株において有意なレベルで発現することを示す。

10

20

30

40

50

【 0 3 1 9 】

(実施例 4) 機能アッセイ

s i R N A のパネルを、S W 6 2 0 細胞 (A M I G O - 2 を発現する結腸癌細胞株) において A M I G O - 2 m R N A をノックダウンする能力について試験した (図 6)。図 6 で試験した s i R N A 配列を、表 3 に示す。図 6 に示す A M I G O - 2 s i R N A は全て A M I G O - 2 m R N A レベルをいくらか低下させるが、s i R N A 薬である C 3 1 5 - 1 . 3 および C 3 1 5 - 4 . 3 は m R N A レベルの低下に最も有効なようであった。

【 0 3 2 0 】

C o l o 3 2 0 細胞および H C T 1 1 6 細胞においてはウェスタンプロット分析によって A M I G O - 2 タンパク質レベルは検出できなかったが (図 5 を参照のこと)、A M I G O - 2 特異的 s i R N A である C 3 1 5 - 1 . 3 および C 3 1 5 - 4 . 3 はこれらの細胞株において A M I G O - 2 m R N A レベルを低下させ (図 7 A および 7 B)、これは、C o l o 3 2 0 細胞および H C T 1 1 6 細胞における正の m R N A 発現と一致した。

【 0 3 2 1 】

A M I G O - 2 ノックダウンの機能的結果を、いくつかの方法によって試験した。市販のキット (T o x i L i g h t (登録商標) , C a m b r e x C o r p o r a t i o n , E a s t R u t h e r f o r d , N J) を使用して、結腸細胞株 S W 6 2 0 における A M I G O - 2 ノックダウンの際の細胞死の程度を評価した。非トランスフェクションサンプルおよびネガティブコントロールサンプルでは細胞死がほとんど認められなかった一方で、ポジティブコントロール遺伝子および A M I G O - 2 のノックダウン (2 つの異なる s i R N A 試薬による) は、有意な毒性を示した (図 8 A)。M R C 9 細胞における A M I G O - 2 ノックダウンの機能的結果も試験した。ネガティブコントロール s i R N A で処置した細胞においてより低い量の細胞死が認められたが、C H I R 3 1 5 - 1 . 3 S I s i R N A で処置した M R C 9 細胞で有意且つ再現可能な量の細胞死が認められた (図 8 B)。

【 0 3 2 2 】

A M I G O - 2 ノックダウンの機能的結果を、胃癌細胞株 A G S における P A R P 切断および M 3 0 発現に及ぼす s i R N A である C H I R 3 1 5 - 1 . 3 S I および C H I R 3 1 5 - 4 . 3 S I の影響の試験によっても試験した。P A R P 切断および M 3 0 産生は、アポトーシスのメディエーターであるカスパーゼ活性を示す。細胞を、s i R N A と 4 8 時間インキュベートし、次いで、細胞溶解物を、ウェスタンプロットによって、A M I G O - 2、P A R P、M 3 0、およびチューブリンの発現およびプロセッシングについて分析した。ポジティブコントロールおよび s i R N A 処置サンプルにおいて P A R P 切断が増加し、M 3 0 発現も増加した。これは、これらの細胞株のアポトーシスの増加を示す (

図9)。予想通り、各*siRNA*への曝露後にAMIGO-2タンパク質レベルは減少した(図9、上のパネル)。PARP切断およびM30発現に及ぼす*siRNA*であるCHIR315-1.3SIおよびCHIR315-4.3SIの影響も、結腸癌細胞株SW620において試験した。SW620細胞を、AMIGO-2特異的*siRNA*(またはコントロール*siRNA*)と72時間インキュベートし、細胞溶解物を、上記のようにウェスタンブロットによって分析した。CHIR315-1.3SIで処置したSW620においてPARP切断が検出され、*siRNA*処置の結果としてこれらの細胞中でアポトーシスが起ることを示した。

【0323】

他のアッセイを使用して、種々の細胞株(AGS、SW620、HT29、A549、およびColo320癌細胞株; 184B5およびHMEC非発癌性乳房上皮細胞株; およびMRC9正常ヒト肺線維芽細胞株が含まれる)におけるAMIGO-2ノックダウンの機能的結果も試験した。2つの異なるAMIGO-2*siRNA*であるC315-1.3*si*およびC315-4.3*si*を使用して実験を行った。AMIGO-2ノックダウンも、全試験で確認した。これらの実験結果を以下に示す。

10

【0324】

Sub-G1 DNAアッセイを使用して、フローサイトメトリーによって細胞死を測定した。AGS、SW620、A549、およびColo320癌細胞においてAMIGO-2*siRNA*でのトランスフェクション後に細胞死の増加が検出され、HT29での増加は小さく、184B5またはHMEC細胞では検出されなかった。MRC9細胞についてはデータを報告しなかった。

20

【0325】

アポトーシスアッセイも使用して、PARP切断および/またはM30産生の検出によって細胞死を測定した。AGSおよびSW620癌細胞においてAMIGO-2*siRNA*であるC315-1*si*およびC315-4*si*でのトランスフェクション後に死細胞の増加が検出されたが、A549細胞では検出されなかった。HT29、Colo320、184B5、HMEC、またはMRC9細胞株についてはデータを報告しなかった。

【0326】

製造者の説明書にしたがってToxiLight(登録商標)アッセイ(Cambrex Corporation、East Rutherford、NJ)も使用して、細胞死を測定した。

30

【0327】

細胞を、96ウェル皿中で1日後に約80~95%コンフルエントとなる密度でプレートした。オリゴヌクレオチドを、OptiMEM(商標)中で2 μ Mに希釈した。次いで、オリゴヌクレオチド-OptiMEM(商標)を、アッセイで使用される特定の細胞型に対して最適となるように選択した送達ビヒクルに添加した。次いで、オリゴ/送達ビヒクル混合物を、細胞上で血清を含む培地でさらに希釈した。*siRNA*オリゴヌクレオチドの最終濃度は、50nMであった。

【0328】

オリゴヌクレオチドを、上記のように調製した。細胞を、37 $^{\circ}$ Cで約4時間から一晩トランスフェクトし、トランスフェクション混合物を、新鮮な培地と交換した。トランスフェクション細胞をトリプシン処理し、48時間または72時間後にプレートに結合したままの全細胞を計数した。

40

【0329】

SW620およびA549癌細胞株においてAMIGO-2*siRNA*でのトランスフェクション後に細胞死の増加が検出されたが、MRC9細胞では検出されなかった。AGS、HT29、Colo320、184B5、またはHMEC細胞株についてはデータを報告しなかった。

【0330】

細胞力価グロー(glow)(ATP測定、Promega)アッセイを使用して、足

50

場依存性細胞成長を測定した。24時間後、細胞を、3000~5000細胞/ウェルにて96ウェルプレートにプレートした。種々の時点(24時間、48時間、72時間、96時間、120時間のトランスフェクション後)で、細胞を溶解し、製造者の説明書にしたがって、細胞力価グロ-を使用してアッセイした。細胞力価グロ-アッセイの産生量(output)により、相対細胞数に比例する蛍光が得られる。足場依存性細胞成長の減少は、AGS、SW620、HT29、Colo320、A549、およびMRC9細胞で認められたが、184B5またはHMEC細胞で認められなかった。

【0331】

軟寒天アッセイを使用して、足場依存性細胞成長を測定した。最初に非組織培養物処置プレートをポリ-HEMAでコーティングして細胞のプレートへの付着を防止することによって軟寒天アッセイを行った。トリプシンおよび培地での2回の洗浄を使用して非トランスフェクション細胞を回収した。血球計を使用して細胞を計数し、 10^4 細胞/ml培地に再懸濁した。50 μ lのアリコート、ポリHEMAコーティングした96ウェルプレートに入れ、トランスフェクトした。

【0332】

トランスフェクションの翌日に、細胞をトリプシン処理し、再懸濁し、計数した。細胞を、約500細胞/100 μ l/ウェルに希釈し、深いウェルブロック(最大体積=1ml/ウェル、三連、標準的配置)に移した。細胞を、以下の2つのプレート中に入れた。アッセイについてはCorning #7007 Ultra Low Adherent U-plate、プレーティング効率のチェックにはCorning #3799)。Seaplaque GTGアガロース3%を電子レンジ中での1分間の加熱によって融解した。完全に融解した時点で、約10mlを予め加温した50mlポリプロピレンチューブ(Falcon #35-2070)に注ぎ、60のヒートブロック中で少なくとも10分間インキュベートした。約18.6mlの完全培地を、50mlポリプロピレンチューブに添加し、約37の水浴中でインキュベートした。Multimek(商標)ピペッターを使用して、アガロースを96ウェルプレート中の細胞に分注した。約18.6mlの加温培地を10mlのアガロースに注ぎ、穏やかに反転させて十分に混合した。プレートを約4で20~30分間インキュベートして、アガロースを迅速に固化させた。アガロースが固化した後、100 μ l完全培地を細胞上に添加した。0日目のプレーティング効率を測定するために、約25 μ l/ウェルAlamar Blueを添加し、37で一晩インキュベートした。次いで、プレートを、18~24時間後に、TECANプレートリーダーにて530ex/590emで読み取った。アッセイプレートを37で7日間インキュベートし、その後Alamar Blue(25 μ l/ウェル)で発色させた。

【0333】

SW620、A549、およびMRC9細胞において足場依存性細胞成長の減少が認められた。AGS、HT29、およびColo320細胞についてはデータを報告しなかった。このアッセイは、MRC9、184B5、およびHMEC細胞の試験に適切でない。なぜなら、この正常細胞型は典型的には足場依存様式で成長しないからである。AMIGO-2モジュレーターを使用した癌細胞株におけるコロニー形成の阻害は、AMIGO-2が転移表現型の産生および/または維持に重要であることを示す。

【0334】

機能的に関連する下流マーカーに及ぼすC315-1.3siおよびC315-4.3si siRNAによるAMIGO-2ノックダウンの影響を、SW620細胞およびAGS細胞において試験した。細胞を、siRNAと24時間インキュベートし、次いで、細胞溶解物をウェスタンブロットによって分析した。抗AMIGO-2抗体RBA d70(Chiron, Emeryville, CA)を使用して、AMIGO-2タンパク質を検出した。ローディングコントロールとしてチューブリンを使用した。両siRNAにより、SW620細胞およびAGS細胞においてAMIGO-2タンパク質レベルが減少した(図10Aおよび11)。SW620細胞では、C315-1.3siは、C315

10

20

30

40

50

- 4.3 si よりも有効に AMIGO - 2 タンパク質レベルを低下させるようであった (図 10 A)。SW620 細胞における c - myc mRNA に及ぼす AMIGO - 2 ノックダウンの影響も、C315 - 1.3 si および C315 - 4.3 si siRNA を使用して試験した。細胞を、siRNA と 72 時間インキュベートし、次いで、mRNA を単離し、分析のために調製した。cMyc mRNA は、ポジティブコントロール siRNA および両 AMIGO - 2 特異的 siRNA によって低下し、AMIGO - 2 が転写レベルで c - myc 発現に影響を及ぼすことを示した (図 10 B)。両細胞株において両 siRNA によってリン酸化 ERK も減少したが、SW620 細胞では、C315 - 1.3 si は C315 - 4.3 si よりもリン酸化を減少させるようであった (それぞれ、図 10 および 11)。両細胞株において c - myc、cFosL1、および cJun も両 siRNA によって低下した (図 11、12 A、14 A、および 14 B)。両 AMIGO - 2 特異的 siRNA でトランスフェクトした AGS 細胞においてサイクリン D1 発現も減少した (図 11)。C315 - 1.3 si でトランスフェクトした SW620 細胞および AGS 細胞においてサイクリン B1 および cFosL1 レベルが減少した (図 13)。抗 AMIGO - 2 抗体である MAB2080 (AMIGO - 2 のアゴニストとして作用する) に曝露した SW620 細胞は、ウェスタンブロットによって決定したところ、cMyc (図 14 C)、cJun (図 12 C)、FosL1、およびホスホ - ERK の上方制御が示された (図 16)。MAB2080 と接触した AGS 細胞も、cMyc (図 14 C) および cJun (図 12 C) の上方制御を示した。さらに、AMIGO - 2 で安定にトランスフェクトした Rat1 細胞は、cJun 発現の上方制御を示した (図 12 B)。c - Myc、サイクリン B1、cFosL1、および cJun 発現における AMIGO - 2 の見かけ上の役割により、AMIGO - 2 が最初期遺伝子の調節に関与することが示唆される。これらの所見およびサイクリン遺伝子発現に及ぼす AMIGO - 2 下方制御の影響 (上記を参照のこと) は、細胞周期制御における AMIGO - 2 の役割を支持する。

10

20

30

40

50

【0335】

Affymetrix 実験を実施して、遺伝子発現に及ぼす AMIGO - 2 siRNA の影響を試験した (図 15 A および 15 B)。これらの結果により、AMIGO - 2 下方制御に関連する cFosL1 およびサイクリン B1 の下方制御が確認され、これは、細胞の成長および生存における AMIGO - 2 の役割と一致した。

【0336】

(実施例 5) AMIGO - 2 は血管形成を阻害する

AMIGO - 2 ノックダウンは、ウロキナーゼおよび VEGF (共に血管形成に関与する) の発現を阻害する。AMIGO - 2 発現は、正常な血管で認められており、これは、この遺伝子が血管形成で役割を果たすことを支持する (上記の実施例 2 を参照のこと)。また、AMIGO - 2 のような神経のガイダンスおよび運動性に関与する多数の遺伝子も血管形成に関与する。

【0337】

(実施例 6) AMIGO - 2 抗体

【0338】

【表 1】

表1: AMIGO-2抗体のリポドをターゲットにする抗体

販売者	カタログ番号	特異性	Eitrop	種
Chiron	RbA	ヒト	ECD	Rb
Chiron	RbB	ヒト	ECD	Rb
Abcam	ab16762	81% ヒト	TGDASADDRKAGKRVV (配列番号 5)	Rb
R&D Systems	MAB2080	ヒト	組換え ECD (配列番号 3)	マウス
R&D Systems	MAB2374	ヒト	組換え ECD (配列番号 3)	ラット
R&D Systems	AF2080	ヒト	組換え ECD (配列番号 3)	ヤギ
Chiron	C3606	ヒト	CIAMNKQRLNETVDVTI (配列番号 6)	Rb
Chiron	C3607	ヒト	CIAMNKQRLNETVDVTI (配列番号 6)	Rb

(実施例 7) AMIGO - 2 アンチセンスオリゴヌクレオチド

【 0 3 3 9 】

【 表 2 】

表2: AMIGO-2をターゲットングするアンチセンスRNA

サブ名	元の名称	配列	配列番号
CHIR315-1	NM_181847:P0314	GTCTGTCCGTGTCTGTCACCTCTTG	7
CHIR315-2	NM_181847:P0750	ATGACGAAGAATTAGGGTGTTCAGC	8
CHIR315-3	NM_181847:P0857	TGGAATACAGCAITTTTCACCGTCT	9
CHIR315-4	NM_181847:P0900	GTGATTGTGTAAAGCAGAAGCACT	10
CHIR315-5	NM_181847:P1160	AAGGAGTACAGGGAACAGTCACAGA	11
CHIR315-6	NM_181847:P1507	AACGAGGGCTTCTATAACCAGACT	12
CHIR315-7	NM_181847:P1571	ACAGTTTCATTTAACAGGCGTTGCT	13
CHIR315-8	NM_181847:P1817	GTTCATCAGCGGAGGCATCACTAG	14
CHIR315-9	NM_181847:P2526	GGTCTAAAACGGTAATTTGGCTGA	15
CHIR315-10	NM_181847:P3219	AGTTTCAGAGAGGGTACTTGATTGC	16

10

(実施例 8) A M I G O - 2 s i R N A

【 0 3 4 0 】

【 表 3 】

表3: AMIGO-2mRNAをターゲットングするsiRNA(鎖鎖)

サブ名	元の名称	配列	配列番号
CHIR315-1SI	Qiagen	UAG AUG UUU CUU AUA ACC GAA	17
CHIR315-2SI	Qiagen	AAC UGU GGA CGU CAC AAU AAA	18
CHIR315-1.2SI		UAG CAU CAU CAC AGA CCU AUA	19
CHIR315-1.3SI	Dharmacon-1 D-018701-01 (pre-val)	GAA UAA GCA ACG CCU GUU AUU	20
CHIR315-2.3SI	Dharmacon-2 D-018701-02 (pre-val)	GCU CAG UGA UGG AUU UUA AUU	21
CHIR315-3.2SI		AAC UGU GGA CGU CAC AAU AAA	22
CHIR315-3.3SI	Dharmacon-3 D-018701-03 (pre-val)	CCG AUG GAU UUG UAU GUU GUU	23
CHIR315-4.3SI	Dharmacon-4 D-018701-04 (pre-val)	GCA CUC GCG UCA GGU ACU UUU	24

20

(実施例 9) A M I G O - 2 エピトープ

【 0 3 4 1 】

【表 4】

エピトープ	AMIGO-2のアミノ酸	ドメイン	配列番号
LTQFPMDLY	177-185	LRR5	25
LLYNNHISY	147-155	LRR4	26
GLSQLOKLY	163-171	LRR5	27
YLIIGNPFVC	224-232	LRR-CT	28
CLDLSSNKL	121-129	LRR3	29
LKRRLDSY	69-77	LRR1	30
ELMFLDVSY	193-201	LRR6	31
LILRHNNIT	98-106	LRR2	32
LAELMFLDV	191-199	LRR6	33
YSLLVFWYR	237-245	LRR-CT	34
LKVLEVLLL	140-148	LRR4	35
YLSGNFLTQ	171-179	LRR5	36
LYSLLVFWY	236-244	LRR-CT	37
LLQDSFMNC	274-282	LRR-CT	38
FSTTPNLKC	113-121	LRR2-LRR3	39
DLSSNKLKTV	123-132	LRR3	40
KLAELMFLDV	190-199	LRR6	41
CLIMITVTV	25-33	シグナルペプチド	42
LLCLLMITV	23-31	シグナルペプチド	43
IYLHGPNFV	223-231	LRR-CT	44
KVLEVLLLY	141-149	LRR4	45
RPSPMPMH	204-212	LRR6	46
NLVPGKQLR	213-221	LRR6	47
GAVVRPGCR	13-21	シグナルペプチド	48
RHSRQVLLL	267-275	LRR-CT	49
LRGIYLGHN	220-228	LRR-CT	50
YRRHFSSVM	244-252	LRR-CT	51
RRHFSSVMD	245-254	LRR-CT	52
GRFKLAELM	187-195	LRR5	53
NPFVCDCSL	228-236	LRR-CT	54
LPTLLGAVV	8-16	シグナルペプチド	55
TPNLKCLDL	116-124	LRR3	56
RLIKRLDSY	68-77	LRR1	57
KNAVFQELK	133-141	LRR3	58
SLLVFWYRR	238-246	LRR-CT	59
RRIFSSVMD	245-253	LRR-CT	60
LRHNNITSI	100-108	LRR2	61
VPGKQLRGI	215-223	LRR6-LRRCT	62

10

20

30

(実施例 10) 正常組織における AMIGO-2 発現

上記のように、正常組織切片を調製し、ウサギ抗 AMIGO-2 またはコントロールのプレブリード (prebleed) 抗体で染色した。染色は、AMIGO-2 が種々の正常なヒト組織 (副腎、乳房、子宮頸管、肺、腎臓、肝臓、卵巣、膵臓、前立腺、骨格筋、皮膚、脾臓、精巣、結腸、および子宮が含まれる) 中、特に、肺、子宮頸管、心臓、および肝臓の間質細胞小集団 (例えば、血管およびマクロファージ) 中で発現することを示した。これらの組織における AMIGO-2 タンパク質発現レベルは、Affymetrix 実験 (上記を参照のこと) によって決定したところ、対応する mRNA 発現レベルと相関し、AMIGO-2 が正常組織、特に、増殖性組織 (例えば、精巣、皮膚、卵巣、膵臓、および結腸) 中で広範に発現することを示した。

40

【0342】

本発明をその特定の実施形態に関して説明しているが、当業者は、本発明の精神および範囲を逸脱することなく種々の変更形態を実施することができ、等価物を構成することができる。さらに、特定の状況、材料、合成物、過程、工程段階、または工程に適合させるために、本発明の目的、精神、および範囲に対する多数の修正形態を実施することができる。かかる修正形態は全て、本発明の範囲内であることが意図される。

。

【 図 1 】

差分比一致情報 (Differential Ratio Concordance Information)						
比	患者型	Num Pats	% GE 2X	% GE 3X	% GE 5X	% LE 5X
	結腸の転移性対原発性	5	0	0	0	0
	結腸の原発性対正常 (RSM)	8	50	25	12	0
	結腸の転移性対正常 (RSM)	27	70	56	33	0
	乳房の原発性対正常 (RSM)	50	4	0	0	74
	前立腺の原発性対正常 (RSM)	21	5	0	0	57
	前立腺の原発性対正常	15	7	0	0	33

FIG. 1A

SPOTID	CHIPNUM	CC	遺伝子	結腸癌		乳房		前立腺癌							
				PatNum	>=2X	PatNum	>=2X	PatNum	>=2X						
34006	7	結腸癌	AMIGO2	75	5.3	1.3	2.7	33	18.2	6.5	0	36	5.6	2.8	2.8
38681	8	結腸癌	AMIGO2	76	27.6	7.8	1.3	33	15.2	6.7	0	36	33.3	10.0	2.8
54486	11	正常のみ	AMIGO2	75	0	0	0	33	0	0	0	36	0	0	0

FIG. 1B

【 図 2 】

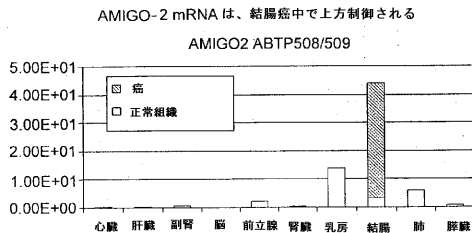


FIG. 2

【 図 3 】

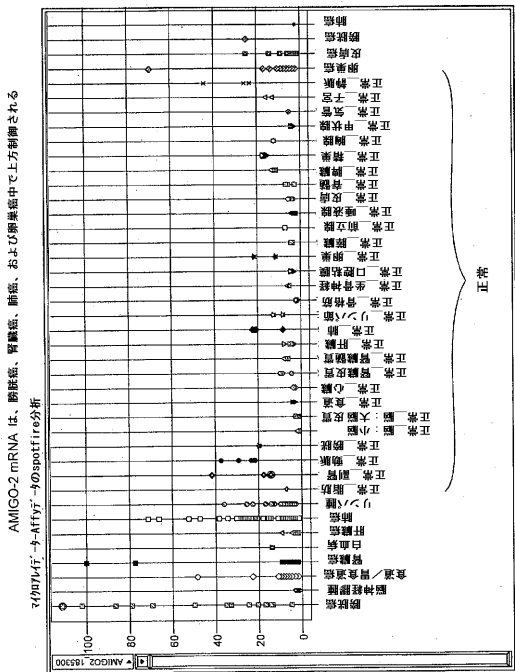


FIG. 3

【 図 4 】

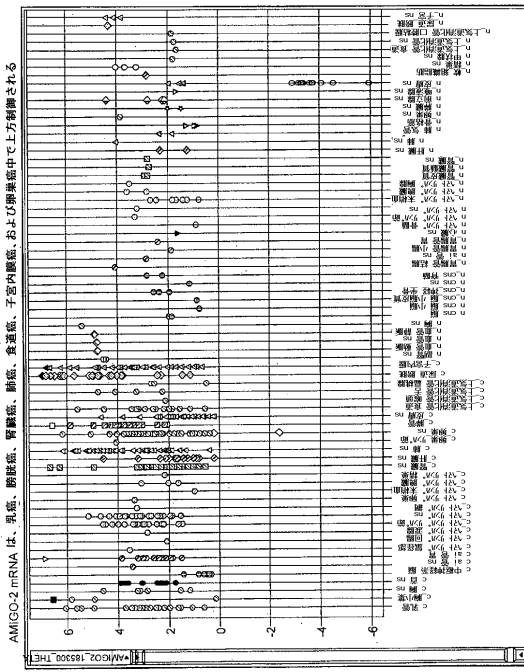


FIG. 4

【 図 5 】

AMIGO-2タンパク質は癌細胞株中で種々の程度に発現する

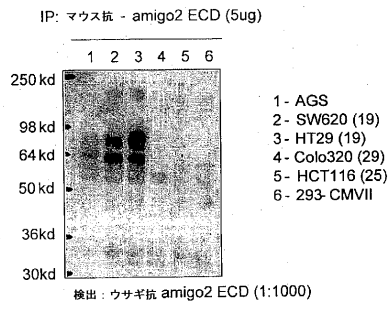


FIG. 5

【 図 6 】

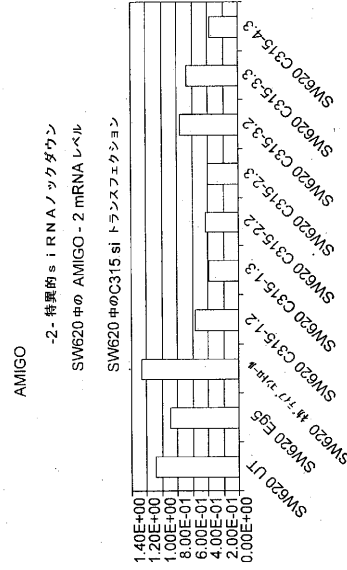


FIG. 6

【 図 7 A 】

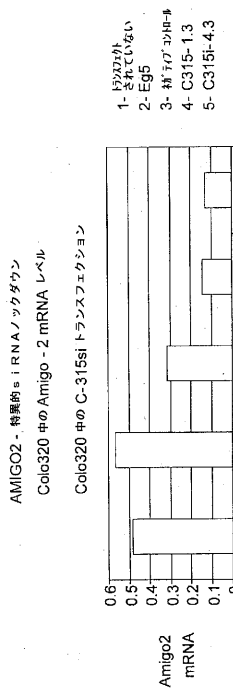


FIG. 7A

【 図 7 B 】

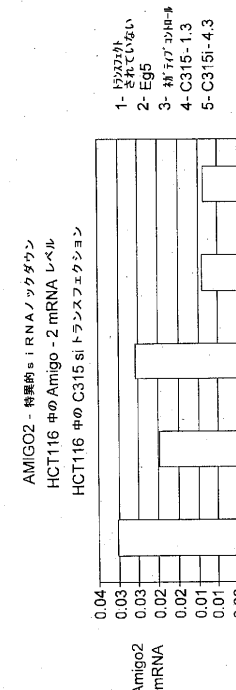
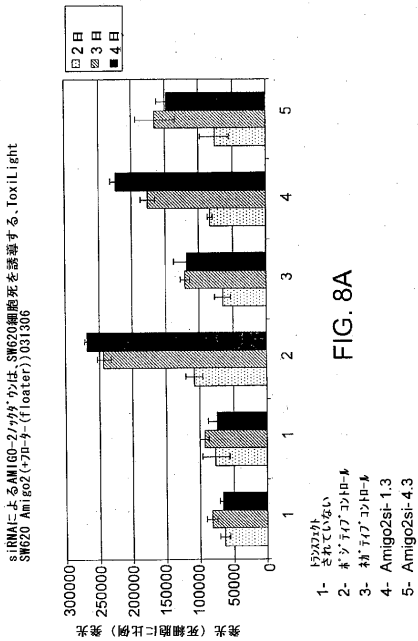
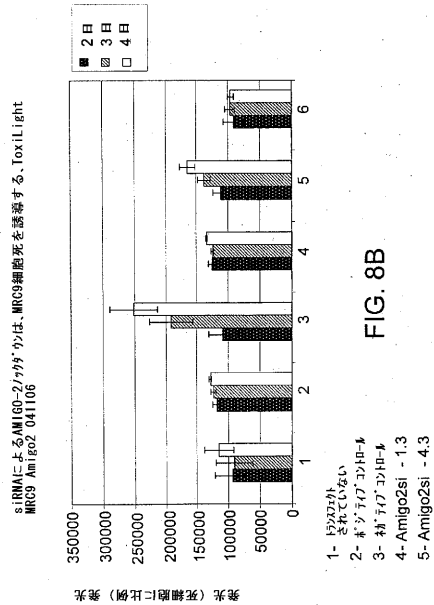


FIG. 7B

【 図 8 A 】

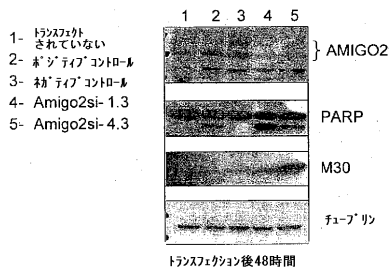


【 図 8 B 】

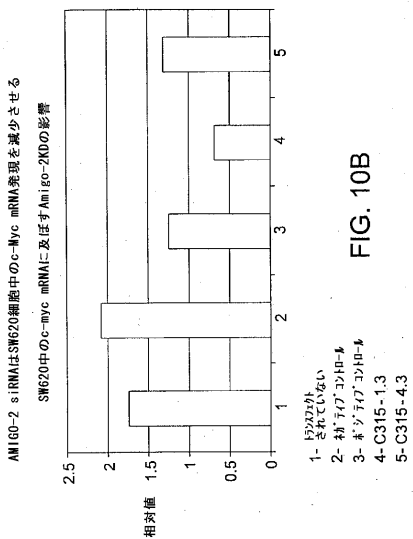


【 図 9 】

AMIGO-2 siRNAはAGS細胞中のAmigo-2タンパク質発現を誘導し、7β-トキシを誘導する

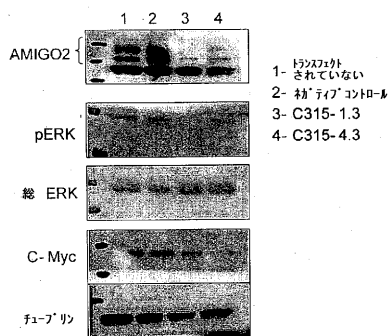


【 図 10 B 】



【 図 10 A 】

AMIGO-2 siRNAはSW620細胞中のAMIGO-2タンパク質発現を減少させ、c-MycおよびpERK発現を阻害する



【 図 1 1 】

AMIGO-2 siRNAはAGS細胞中のAMIGO-2タンパク質発現を減少させ、c-Myc、サイクリンD1、およびpERK発現を阻害する

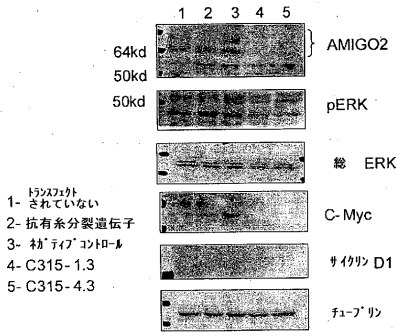


FIG. 11

【 図 1 2 】

Amigo-2は、c-Junの発現の上流である

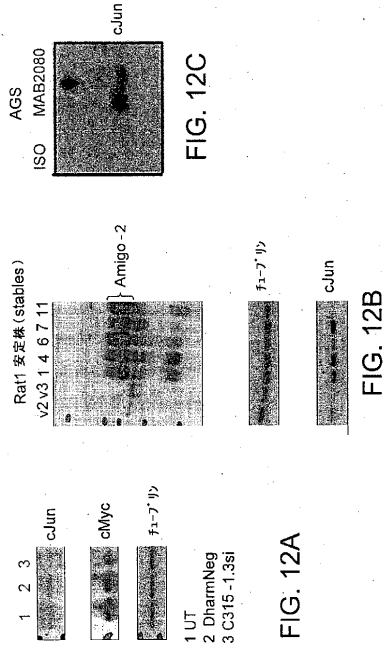


FIG. 12C

FIG. 12B

FIG. 12A

【 図 1 3 】

Amigo-2はcFosL1およびサイクリンB1の発現を下方制御する

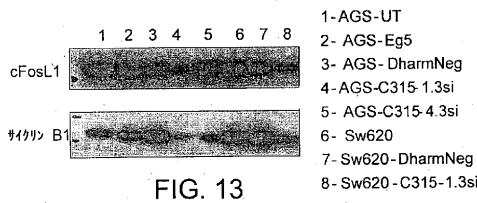


FIG. 13

【 図 1 4 】

Amigo-2はc-Mycの発現の上流である

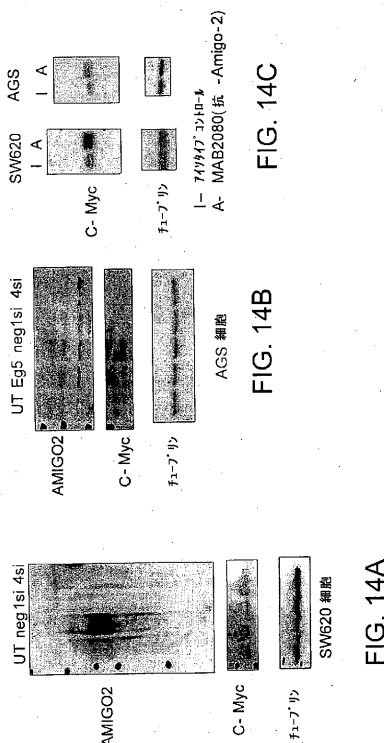


FIG. 14C

FIG. 14B

FIG. 14A

【 図 15 A 】

2つのAmigo-2 siRNAによって調節される遺伝子

説明	遺伝子URL	OMIMURL	siRNA CHR315 1,361	siRNA CHR315 4,361
discoidin, Dimeric (DCL1) の含有	DCLD2	609956	-5.8	-7.8
discoidin, Dimeric (DCL1) の含有	DCLD2	609956	-5.8	-6.2
Ig様1のV2を有する接着分子	AMIG2		-4.8	5.6
遺伝子のファミリー1184	FLJ11184		-3.3	-3.6
IRS様タンパク質	IRS1	138515	-4.5	-3.9
ホドリン様タンパク質22kDa	CAV1	601047	-4.1	-4.2
精子特異的抗原2	SSFA2	118990	-4.0	-3.8
SF21の含有	SF21		-2.9	-4.8
核内輸送因子2様タンパク質2	NXT2	300320	-3.9	-3.7
上皮膜タンパク質	EMP1	602333	-3.3	-4.2
シグナル伝達	MIRN21		-2.8	-4.6
シグナル伝達 (解母)	GOL11B		-3.0	-4.4
シグナル伝達 (解母)	HG1		-3.2	-4.0
ホドリン様タンパク質22kDa	CAV1	601047	-3.5	-3.6
シグナル伝達 (解母)	SF21		-2.7	-4.2
細胞内輸送因子2様タンパク質	CAMP		-4.0	2.8
シグナル伝達 (解母)	HEPLS	603966	-4.0	2.8
シグナル伝達 (解母)	SEPH1	600253	-4.3	-2.3
シグナル伝達 (解母)	CAV2	601048	-2.7	-3.7
シグナル伝達 (解母)	GOL11B		-3.7	-2.7
核内輸送因子2様タンパク質2	NXT2	300320	-3.4	-3.0
シグナル伝達 (解母)	CDN8	602368	-4.3	-2.1
CTPS	CTPS	123860	-3.1	-3.1
シグナル伝達 (解母)	FLJ20516		-3.1	-2.9
シグナル伝達 (解母)	ANKK3	106490	-2.1	-3.4
シグナル伝達 (解母)	CGCB9		-2.3	-3.4
シグナル伝達 (解母)	DCP2		-3.2	-2.7
シグナル伝達 (解母)	PLCH2		-3.4	-2.6
シグナル伝達 (解母)	DKLF57	607890	-2.7	-2.9
シグナル伝達 (解母)	JAG1	601820	-2.5	-3.1
シグナル伝達 (解母)	KCNJ3	604433	-2.1	-3.5
シグナル伝達 (解母)	C11orf121		-2.0	-3.6
シグナル伝達 (解母)	CGI37		-3.4	2.1
シグナル伝達 (解母)	ELK2	601023	-2.4	-3.6
シグナル伝達 (解母)	ENR3	602824	-2.1	-3.3
シグナル伝達 (解母)	AP1S3		-2.1	-3.2
シグナル伝達 (解母)	VIM	183060	-3.2	-2.2
シグナル伝達 (解母)	GRPEL1	606173	-2.3	-3.0
シグナル伝達 (解母)	NOL5A		-2.5	-2.4
シグナル伝達 (解母)	TMEM33		-2.2	-3.1
シグナル伝達 (解母)	PPP2R1B	603113	-3.2	-2.0
シグナル伝達 (解母)	UBES2		-2.4	-2.8
シグナル伝達 (解母)	THBS1	188050	-2.4	-2.9
シグナル伝達 (解母)	THBS1	188050	-2.4	-2.2
シグナル伝達 (解母)	DCP2		-2.6	-2.6
シグナル伝達 (解母)	JAG1	601820	-2.3	-2.8
シグナル伝達 (解母)	NBE1	602059	-2.2	-2.8
シグナル伝達 (解母)	EXOSC8	605019	-2.2	-2.1
シグナル伝達 (解母)	LYAR		-2.6	-2.1
シグナル伝達 (解母)	MITN	605484	-2.8	-2.1
シグナル伝達 (解母)	JAG1	601820	-2.1	-2.8
シグナル伝達 (解母)	GCN4	184430	-2.4	-2.4
シグナル伝達 (解母)	VIL2	123900	-2.4	-2.4
シグナル伝達 (解母)	GAL	137035	-2.4	2.8
シグナル伝達 (解母)	C10orf3		-2.6	-2.2
シグナル伝達 (解母)	CCNH1	123838	-2.4	-2.2

FIG. 15A

【 図 15 B 】

2つのAmigo-2 siRNAによって調節される遺伝子

遺伝子記号	説明	遺伝子URL	OMIMURL	siRNA CHR315 1,361	siRNA CHR315 4,361
BNIP3L	BCL2L2のファミリー18のメンバータンパク質	BNIP3L	605268	6.7	11.0
FAM46C	糖鎖形成 (glucosyl transferase) を有するファミリーのメンバー	FAM46C		6.1	4.6
LOC359866	糖鎖形成 (glucosyl transferase) を有するファミリーのメンバー	LOC359866		5.9	4.4
SATB1	特異的タンパク質結合因子 (特異的タンパク質結合因子)	SATB1	602075	5.4	3.7
C11orf21	糖鎖形成 (glucosyl transferase) を有するファミリーのメンバー	C11orf21		5.4	4.5
FAM3B	糖鎖形成 (glucosyl transferase) を有するファミリーのメンバー	FAM3B	606017	5.3	3.6
UCP2	非共役タンパク質 (GTPase) のファミリー	UCP2	601883	6.9	2.6
FNDCC3A	シグナル伝達 (解母) の含有	FNDCC3A		4.0	4.6
DRE1	シグナル伝達 (解母)	DRE1		4.9	3.1
PPIC	シグナル伝達 (解母)	PPIC	123842	4.7	3.2
ASS	シグナル伝達 (解母)	ASS	603470	4.5	3.4
KAAT118	シグナル伝達 (解母)	KAAT118		3.1	4.5
ALDH5A1	シグナル伝達 (解母)	ALDH5A1	603178	4.7	2.7
LRR	シグナル伝達 (解母)	LRR		4.7	2.3
ADAMTSL2	シグナル伝達 (解母)	ADAMTSL2		4.2	2.9
LIPC	シグナル伝達 (解母)	LIPC	151570	4.5	2.6
FZD10	シグナル伝達 (解母)	FZD10	605147	3.0	3.8
COL4A2	シグナル伝達 (解母)	COL4A2	120990	3.6	3.1
TPP1	シグナル伝達 (解母)	TPP1	607398	3.3	3.4
SEPRIN1	シグナル伝達 (解母)	SEPRIN1	172900	4.3	2.3
ADCY9	シグナル伝達 (解母)	ADCY9	603302	3.3	3.3
AZGP1	シグナル伝達 (解母)	AZGP1	194460	3.4	3.1
USH1C	シグナル伝達 (解母)	USH1C	605242	2.8	3.9
RAB40B	シグナル伝達 (解母)	RAB40B		3.8	2.5
SMOC2	シグナル伝達 (解母)	SMOC2	607223	3.7	2.9
RRAGD	シグナル伝達 (解母)	RRAGD	605298	3.4	2.9
NUD121	シグナル伝達 (解母)	NUD121	604978	2.4	3.9
C14orf1	シグナル伝達 (解母)	C14orf1	604576	3.1	3.2
TPP1	シグナル伝達 (解母)	TPP1	607398	3.0	3.2
RPS6KB1	シグナル伝達 (解母)	RPS6KB1	608938	3.8	2.4
KIAA0657	シグナル伝達 (解母)	KIAA0657		2.9	3.6
OPRT	シグナル伝達 (解母)	OPRT	606248	3.0	3.1
RFK	シグナル伝達 (解母)	RFK		3.5	2.6
KCNH2	シグナル伝達 (解母)	KCNH2	152427	3.0	3.0
PAQR8	シグナル伝達 (解母)	PAQR8	607789	3.5	2.6
SEPT6	シグナル伝達 (解母)	SEPT6		3.3	2.7
LOC285758	シグナル伝達 (解母)	LOC285758		3.6	2.4
EPNA1	シグナル伝達 (解母)	EPNA1	191164	3.0	2.8
LGALS8	シグナル伝達 (解母)	LGALS8	606092	2.9	3.1
ATP10D	シグナル伝達 (解母)	ATP10D		3.1	2.7
ERBB3	シグナル伝達 (解母)	ERBB3	190151	3.4	2.3
CHST13	シグナル伝達 (解母)	CHST13		2.2	3.5
FLJ25478	シグナル伝達 (解母)	FLJ25478		3.2	2.3
MCF2L	シグナル伝達 (解母)	MCF2L	606499	3.2	2.5
FLJ10159	シグナル伝達 (解母)	FLJ10159		3.4	2.3
RAI13	シグナル伝達 (解母)	RAI13	602972	3.0	2.6
ZNF281	シグナル伝達 (解母)	ZNF281	300061	3.2	2.4
USH1C	シグナル伝達 (解母)	USH1C	605242	2.8	3.1

FIG. 15B

【 図 16 】

c-JUN, pERK, およびFosL1発現に及ぼすAMIGO-2 MAB2080の影響

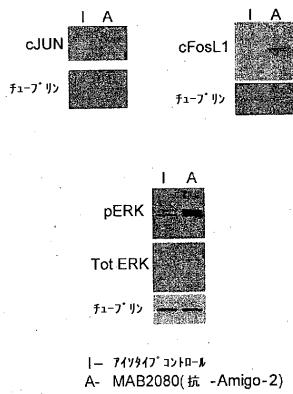


FIG. 16

【配列表】

2009544287000001.xml

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2007/073895

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
- a. type of material
- a sequence listing
- table(s) related to the sequence listing
- b. format of material
- on paper
- in electronic form
- c. time of filing/furnishing
- contained in the international application as filed
- filed together with the international application in electronic form
- furnished subsequently to this Authority for the purpose of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2007/073895

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>RABENAU K E ET AL: "DEGA/AMIGO-2, a leucine-rich repeat family member, differentially expressed in human gastric adenocarcinoma: effects on ploidy, chromosomal stability, cell adhesion/migration and tumorigenicity" ONCOGENE, BASINGSTOKE, HANTS, GB, vol. 23, no. 29, 24 June 2004 (2004-06-24), pages 5056-5067, XP002995776 ISSN: 0950-9232 the whole document</p>	1-121
Y	<p>CHEN ET AL: "AMIGO and friends: An emerging family of brain-enriched, neuronal growth modulating, type I transmembrane proteins with leucine-rich repeats (LRR) and cell adhesion molecule motifs" BRAIN RESEARCH REVIEWS, ELSEVIER, XX, vol. 51, no. 2, August 2006 (2006-08), pages 265-274, XP005508488 ISSN: 0165-0173 the whole document</p>	1-121
A	<p>KUJA-PANULA J ET AL: "AMIGO, a transmembrane protein implicated in axon tract development, defines a novel protein family with leucine-rich repeats" THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY, ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS, US, vol. 160, no. 6, 17 March 2003 (2003-03-17), pages 963-973, XP003011304 ISSN: 0021-9525</p>	

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.1

Although claims 1-65 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box II.1

Claims Nos.: -

Rule 39.1(iv) PCT - Method for treatment of the human or animal body by surgery

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2007/073895**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2007/073895

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004003165 A	08-01-2004	AU 2003261102 A1	19-01-2004
		CA 2491083 A1	08-01-2004
		EP 1572952 A2	14-09-2005
		JP 2006508641 T	16-03-2006
WO 2004055055 A	01-07-2004	AU 2003285385 A1	09-07-2004
		EP 1578797 A1	28-09-2005
		JP 2006525784 T	16-11-2006

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 E	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 T	4 H 0 4 5
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 31/7105	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 P 35/04 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/04	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 M	
G 0 1 N 33/60 (2006.01)	G 0 1 N 33/50 Z	
G 0 1 N 33/577 (2006.01)	G 0 1 N 33/60 A	
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/577 B	
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	G 0 1 N 33/15 Z	
	G 0 1 N 33/574 A	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, 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, IS, JP, KE, KG, KM, 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, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 チャン, ビビアン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 6 0 2 - 8 0 9 7, エメリービル, ピー.オー. ボックス 8 0 9 7

(72)発明者 ユー, クオイング

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 6 0 2 - 8 0 9 7, エメリービル, ピー.オー. ボックス 8 0 9 7

(72)発明者 ファニデイ, アブダラ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 6 0 8 - 2 9 1 6, エメリービル, ホートン ストリート 4 5 6 0

Fターム(参考) 2G045 AA26 BB24 CB01 DA14 DA36 DA78 FB02 FB03 FB08 FB09
 4B024 AA01 AA12 BA61 CA01 CA11 DA02 GA05 HA11 HA17 HA20
 4B065 AA90X AA90Y AB01 AB04 AC14 BA02 CA24 CA25 CA44 CA46
 4C084 AA02 BA03 CA62 DC50 NA14 ZB262 ZC022
 4C085 AA13 AA14 AA16 BB01 CC02 CC05 DD23
 4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB26 ZC02
 4H045 AA10 AA11 BA10 BA14 BA15 BA16 BA17 CA40 DA50 DA86
 EA28 EA51 FA74

专利名称(译)	AMIGO-2抑制剂用于治疗，诊断或检测癌症		
公开(公告)号	JP2009544287A	公开(公告)日	2009-12-17
申请号	JP2009521002	申请日	2007-07-19
[标]申请(专利权)人(译)	瑞士商诺华公司		
申请(专利权)人(译)	诺华公司		
[标]发明人	ジャナトポーメアリージェイ チャンビビアン ユークオイング ファニデアブダラ		
发明人	ジャナトポー, メアリー ジェイ. チャン, ビビアン ユー, クオイング ファニデイ, アブダラ		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/28 A01K67/027 C07K14/47 C12N5/10 A61K39/395 A61K31/7088 A61K31/7105 A61K38/00 A61P35/00 A61P35/04 A61P43/00 G01N33/53 G01N33/50 G01N33/60 G01N33/577 G01N33/15 G01N33/574		
CPC分类号	A61P35/00 A61P35/04 A61P43/00 C07K16/2803 C12N15/113 G01N33/574 G01N2333/4703 Y10T436 /143333		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/28 A01K67/027 C07K14/47 C12N5/00.B A61K39/395.E A61K39/395.T A61K31/7088 A61K31/7105 A61K37/02 A61P35/00 A61P35/04 A61P43/00.111 G01N33/53.M G01N33 /50.Z G01N33/60.A G01N33/577.B G01N33/15.Z G01N33/574.A		
F-TERM分类号	2G045/AA26 2G045/BB24 2G045/CB01 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/DA78 2G045/FB02 2G045 /FB03 2G045/FB08 2G045/FB09 4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/BA61 4B024/CA01 4B024/CA11 4B024/DA02 4B024/GA05 4B024/HA11 4B024/HA17 4B024/HA20 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065 /AB01 4B065/AB04 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/BA03 4C084/CA62 4C084/DC50 4C084/NA14 4C084/ZB262 4C084/ZC022 4C085 /AA13 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/BB01 4C085/CC02 4C085/CC05 4C085/DD23 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZB26 4C086 /ZC02 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/BA14 4H045/BA15 4H045/BA16 4H045/BA17 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA86 4H045/EA28 4H045/EA51 4H045/FA74		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/807885 2006-07-20 US 60/870025 2006-12-14 US		
其他公开文献	JP2009544287A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明尤其提供，方法，用于治疗癌症的组合物治疗，以及用于治疗癌症来治疗癌症的诊断和/或检测的方法和组合物。特别地，本发明提供了用于治疗，诊断和检测与AMIGO-2过表达相关的癌症的组合物和方法。在本发明的一个方面，提供了包含AMIGO-2抑制剂和一种或多种药学上可接受的载体的组合物，其中AMIGO-2抑制剂是分离的双链RNA (dsRNA) 等。它是。

AMIGO-2 mRNA is up-regulated in colon cancer

AMIGO2 ABTP508/509

