

(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2010-520280

(P2010-520280A)

(43) 公表日 平成22年6月10日 (2010.6.10)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00 H	4 C 0 8 5
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 C	4 H 0 4 5
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 L	
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 Y	
C 0 7 K 14/705 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 133 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2009-552676 (P2009-552676)	(71) 出願人	591217403
(86) (22) 出願日	平成20年2月8日 (2008.2.8)		ボード オブ リージェンツ, ザ ユニ
(85) 翻訳文提出日	平成21年11月2日 (2009.11.2)		バーシティ オブ テキサス システム
(86) 国際出願番号	PCT/US2008/001694		BOARD OF REGENTS, TH
(87) 国際公開番号	W02008/108910		E UNIVERSITY OF TEX
(87) 国際公開日	平成20年9月12日 (2008.9.12)		AS SYSTEM
(31) 優先権主張番号	60/904, 994		アメリカ合衆国 7 8 7 0 1 テキサス
(32) 優先日	平成19年3月5日 (2007.3.5)		オースティン ダブリュー. セブンス
(33) 優先権主張国	米国 (US)		ストリート 2 0 1
(31) 優先権主張番号	60/961, 046	(74) 代理人	100078282
(32) 優先日	平成19年7月18日 (2007.7.18)		弁理士 山本 秀策
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100062409
(31) 優先権主張番号	60/959, 971		弁理士 安村 高明
(32) 優先日	平成19年7月18日 (2007.7.18)	(74) 代理人	100113413
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 Notch または Numb 特異的免疫療法との相乗効果を有する、癌細胞の再生のネガティブな遺伝的制御

(57) 【要約】

本発明者らは、Notch 1、Notch 2、Notch 3、および Notch 4 からなる群より選択されるタンパク質から誘導されたペプチドに対して患者を免疫化することによって患者における癌を治療する方法を開示する。本発明者らはさらに、上記のようなペプチドおよび薬学的に受容可能なキャリアを含む組成物を開示する。加えて、本発明者らは、Numb 1、Numb 2、Numb 3、および Numb 4 からなる群より選択されるタンパク質から誘導されたペプチドに対して患者を免疫化することによって患者における癌を治療する方法を開示する。本発明者らはまた、上記のようなペプチドおよび薬学的に受容可能なキャリアを含む組成物を開示する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

Notch 1、Notch 2、Notch 3、および Notch 4 からなる群より選択されるタンパク質から誘導されたペプチドに対して患者を免疫化する工程を包む、患者における癌を治療する方法。

【請求項 2】

前記ペプチドが、

【化 6 7】

DGVNTYNC (配列番号 9), RYSRSD (配列番号 11), LLEASAD (配列番号 18),

10

LLDEYNLV (配列番号 21), MPALRPALLWALLALWLCCA (配列番号 22),

NGGVCVDGVNTYNC (配列番号 25), DGVNTYNCRCPPQWTG (配列番号 30),

RMNDGTTPLI (配列番号 32), および LKNGANR (配列番号 35)

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 3】

前記ペプチドが、Notch 1₂₇₄₋₂₈₂ (配列番号 10)、Notch 1₁₉₃₈₋₁₉₄₃ (配列番号 11)、Notch 1₁₉₃₈₋₁₉₄₆ (配列番号 12)、Notch 1₁₉₃₈₋₁₉₄₇ (配列番号 13)、Notch 1₁₉₄₀₋₁₉₄₈ (配列番号 14)、Notch 1₁₉₄₀₋₁₉₄₉ (配列番号 15)、Notch 1₁₉₄₄₋₁₉₅₅ (配列番号 16)、Notch 1₁₉₄₇₋₁₉₅₅ (配列番号 17)、Notch 1₂₁₁₁₋₂₁₂₀ (配列番号 19)、Notch 1₂₁₁₂₋₂₁₂₀ (配列番号 20)、Notch 1₂₁₁₃₋₂₁₂₀ (配列番号 21)、Notch 2₁₋₂₀ (配列番号 22)、Notch 2₇₋₁₅ (配列番号 24)、Notch 2₂₇₁₋₂₈₅ (配列番号 26)、Notch 2₂₇₁₋₂₈₆ (配列番号 27)、Notch 2₂₇₇₋₂₈₅ (配列番号 28)、Notch 2₂₇₇₋₂₈₆ (配列番号 29)、Notch 2₁₉₄₀₋₁₉₄₈ (配列番号 31)、Notch 2₁₉₄₀₋₁₉₄₉ (配列番号 32)、Notch 2₁₉₉₁₋₂₀₀₃ (配列番号 33)、Notch 2₁₉₉₅₋₂₀₀₃ (配列番号 34)、および Notch 2₁₉₉₇₋₂₀₀₃ (配列番号 35) からなる群より選択される、請求項 1 に記載の方法。

20

30

【請求項 4】

前記癌が、T細胞急性リンパ芽球性白血病およびリンパ腫 (T - ALL)、乳癌、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、肝臓癌、胃癌、明細胞腎細胞癌腫、および結腸癌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 5】

Notch 1、Notch 2、Notch 3、および Notch 4 からなる群より選択されるタンパク質から誘導されたペプチド；および

薬学的に受容可能なキャリア、
を含む、組成物。

40

【請求項 6】

前記ペプチドが、

【化68】

DGVNTYNC (配列番号 9), RYSRSD (配列番号 11), LLEASAD (配列番号 18),
 LLDEYNLV (配列番号 21), MPALRPALLWALLALWLCCA (配列番号 22),
 NGGVCVDGVNTYNC (配列番号 25), DGVNTYNCRCPPQWTG (配列番号 30),
 RMNDGTTPLI (配列番号 32), および LKNGANR (配列番号 35)

からなる群より選択される、請求項5に記載の組成物。

10

【請求項7】

前記ペプチドが、Notch1₂₇₄₋₂₈₂ (配列番号10)、Notch1₁₉₃₈₋₁₉₄₃ (配列番号11)、Notch1₁₉₃₈₋₁₉₄₆ (配列番号12)、Notch1₁₉₃₈₋₁₉₄₇ (配列番号13)、Notch1₁₉₄₀₋₁₉₄₈ (配列番号14)、Notch1₁₉₄₀₋₁₉₄₉ (配列番号15)、Notch1₁₉₄₄₋₁₉₅₅ (配列番号16)、Notch1₁₉₄₇₋₁₉₅₅ (配列番号17)、Notch1₂₁₁₁₋₂₁₂₀ (配列番号19)、Notch1₂₁₁₂₋₂₁₂₀ (配列番号20)、Notch1₂₁₁₃₋₂₁₂₀ (配列番号21)、Notch2₁₋₂₀ (配列番号22)、Notch2₇₋₁₅ (配列番号24)、Notch2₂₇₁₋₂₈₅ (配列番号26)、Notch2₂₇₁₋₂₈₆ (配列番号27)、Notch2₂₇₇₋₂₈₅ (配列番号28)、Notch2₂₇₇₋₂₈₆ (配列番号29)、Notch2₁₉₄₀₋₁₉₄₈ (配列番号31)、Notch2₁₉₄₀₋₁₉₄₉ (配列番号32)、Notch2₁₉₉₁₋₂₀₀₃ (配列番号33)、Notch2₁₉₉₅₋₂₀₀₃ (配列番号34)、およびNotch2₁₉₉₇₋₂₀₀₃ (配列番号35)からなる群より選択される、請求項5に記載の組成物。

20

【請求項8】

Numb1、Numb2、Numb3、およびNumb4からなる群より選択されるタンパク質から誘導されたペプチドに対して患者を免疫化する工程を包含する、患者における癌を治療する方法。

30

【請求項9】

前記ペプチドが、

【化69】

LWVSADGL (配列番号 37), CRDGTTRWICHCFMAVKD (配列番号 38),
 RWICHCFMAVKD (配列番号 39), RWLEEVSKSVRA (配列番号41) および
 VDDGRLASADRHTEV (配列番号 43).

からなる群より選択される、請求項8に記載の方法。

40

【請求項10】

前記ペプチドが、Numb1₈₇₋₉₅ (配列番号36)、Numb1₈₈₋₉₅ (配列番号37)、Numb1₁₃₁₋₁₄₉ (配列番号38)、Numb1₁₃₈₋₁₄₉ (配列番号39)、Numb1₁₃₉₋₁₄₇ (配列番号40)、Numb1₄₄₂₋₄₅₃ (配列番号41)、Numb1₄₄₃₋₄₅₁ (配列番号42)、Numb1₅₉₂₋₆₀₆ (配列番号43)、およびNumb1₅₉₄₋₆₀₂ (配列番号44)からなる群より選択される、請求項8に記載の方法。

【請求項11】

前記癌が、T細胞急性リンパ芽球性白血病およびリンパ腫(T-ALL)、乳癌、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、肝臓癌、胃癌、明細胞腎細胞癌腫、および結腸癌からなる群より選択される、請求項8に記載の方法。

50

【請求項 1 2】

Numb 1、Numb 2、Numb 3、および Numb 4 からなる群より選択されるタンパク質から誘導されたペプチド；ならびに

薬学的に受容可能なキャリア、を含む、組成物。

【請求項 1 3】

前記ペプチドが、

【化 7 0】

LWVSADGL (配列番号 37), CRDGTTRRWICHCFMAVKD (配列番号

10

38), RWICHCFMAVKD (配列番号 39), RWLEEVSKSVRA (配列番号 41) および

VDDGRLASADRHTEV (配列番号 43).

からなる群より選択される、請求項 1 2 に記載の組成物。

【請求項 1 4】

前記ペプチドが、Numb 1₈₇₋₉₅ (配列番号 36)、Numb 1₈₈₋₉₅ (配列番号 37)、Numb 1₁₃₁₋₁₄₉ (配列番号 38)、Numb 1₁₃₈₋₁₄₉ (配列番号 39)、Numb 1₁₃₉₋₁₄₇ (配列番号 40)、Numb 1₄₄₂₋₄₅₃ (配列番号 41)、Numb 1₄₄₃₋₄₅₁ (配列番号 42)、Numb 1₅₉₂₋₆₀₆ (配列番号 43)、および Numb 1₅₉₄₋₆₀₂ (配列番号 44) からなる群より選択される、請求項 1 2 に記載の組成物。

20

【請求項 1 5】

Notch 1、Notch 2、Notch 3、Notch 4、Numb 1、Numb 2、Numb 3、および Numb 4 からなる群より選択されるタンパク質から誘導されたペプチドに対する抗体を含む組成物を患者に投与する工程を包む、患者における癌を治療する方法。

【請求項 1 6】

前記ペプチドが、

【化 7 1】

DGVNTYNC (配列番号 9), RYSRSD (配列番号 11), LLEASAD (配列番号 18),

30

LLDEYNLV (配列番号 21), MPALRPALLWALLALWLCCA (配列番号 22),

NGGVCVDGVNTYNC (配列番号 25), DGVNTYNCRCPPQWTG (配列番号 30),

RMNDGTPLI (配列番号 32), LKNGANR (配列番号 35), LWVSADGL (配列番号

37), CRDGTTRRWICHCFMAVKD (配列番号 38), RWICHCFMAVKD (配列番号

39), RWLEEVSKSVRA (配列番号 41) および VDDGRLASADRHTEV (配列番号

40

43)

からなる群より選択される、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記ペプチドが、Notch 1₂₇₄₋₂₈₂ (配列番号 10)、Notch 1₁₉₃₈₋₁₉₄₃ (配列番号 11)、Notch 1₁₉₃₈₋₁₉₄₆ (配列番号 12)、Notch 1₁₉₃₈₋₁₉₄₇ (配列番号 13)、Notch 1₁₉₄₀₋₁₉₄₈ (配列番号 14)、Notch 1₁₉₄₀₋₁₉₄₉ (配列番号 15)、Notch 1₁₉₄₄₋₁₉₅₅ (配列番号 16)、Notch 1₁₉₄₇₋₁₉₅₅ (配列番号 17)、N

50

o t c h 1 2 1 1 1 - 2 1 2 0 (配列番号 1 9)、N o t c h 1 2 1 1 2 - 2 1 2 0 (配列番号 2 0)、N o t c h 1 2 1 1 3 - 2 1 2 0 (配列番号 2 1)、N o t c h 2 1 - 2 0 (配列番号 2 2)、N o t c h 2 7 - 1 5 (配列番号 2 4)、N o t c h 2 2 7 1 - 2 8 5 (配列番号 2 6)、N o t c h 2 2 7 1 - 2 8 6 (配列番号 2 7)、N o t c h 2 2 7 7 - 2 8 5 (配列番号 2 8)、N o t c h 2 2 7 7 - 2 8 6 (配列番号 2 9)、N o t c h 2 1 9 4 0 - 1 9 4 8 (配列番号 3 1)、N o t c h 2 1 9 4 0 - 1 9 4 9 (配列番号 3 2)、N o t c h 2 1 9 9 1 - 2 0 0 3 (配列番号 3 3)、N o t c h 2 1 9 9 5 - 2 0 0 3 (配列番号 3 4)、N o t c h 2 1 9 9 7 - 2 0 0 3 (配列番号 3 5)、N u m b 1 8 7 - 9 5 (配列番号 3 6)、N u m b 1 8 8 - 9 5 (配列番号 3 7)、N u m b 1 1 3 1 - 1 4 9 (配列番号 3 8)、N u m b 1 1 3 8 - 1 4 9 (配列番号 3 9)、N u m b 1 1 3 9 - 1 4 7 (配列番号 4 0)、N u m b 1 4 4 2 - 4 5 3 (配列番号 4 1)、N u m b 1 4 4 3 - 4 5 1 (配列番号 4 2)、N u m b 1 5 9 2 - 6 0 6 (配列番号 4 3)、および N u m b 1 5 9 4 - 6 0 2 (配列番号 4 4) からなる群より選択される、請求項 1 5 に記載の方法。

10

【請求項 1 8】

前記癌が、T細胞急性リンパ芽球性白血病およびリンパ腫(T-ALL)、乳癌、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、肝臓癌、胃癌、明細胞腎細胞癌腫、および結腸癌からなる群より選択される、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記組成物が、抗癌剤および放射性同位元素からなる群より選択される治療分子をさらに含む、請求項 1 5 に記載の方法。

20

【請求項 2 0】

前記治療分子が、前記抗体の重鎖定常領域に共有結合されている、請求項 1 9 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、一般的に、癌治療の分野に関する。より詳細には、本発明は、アップレギュレーション、過剰発現、または N o t c h、N u m b、もしくはその両方の脱抑制によって特徴付けられる癌を治療するための組成物および方法に関する。

30

【背景技術】

【0 0 0 2】

N o t c h は、多くの細胞系譜において、細胞運命特定の制御、および増殖と分化の間のバランスの維持に関与している原形質膜受容体である(1、2)。N o t c h シグナル伝達は、多くの生理学的プロセスにおいて重要であり、N o t c h の分布は種々の血液癌および固形癌に関与している。

【0 0 0 3】

最もよい例は、N o t c h の変異と、T細胞急性リンパ芽球性白血病およびリンパ腫(T-ALL)との間の連関である。T-ALL腫瘍細胞のサブセットにおいて、(7、9)染色体点座は、N o t c h 1 の 3'位をT細胞受容体J 遺伝子座に融合する。これは、短縮型 N o t c h 1 タンパク質を生じ、これは、構成的に活性かつ異常に発現される(3)。加えて、(7、9)転座とは独立した N o t c h 1 の活性化変異が、ヒトの T-ALL 症例の 5 0 % を超えて見出されてきた(4)。

40

【0 0 0 4】

異常な N o t c h シグナル伝達はまた、乳癌、膵臓癌、前立腺癌、肝臓癌、胃癌、および結腸癌を含む固形腫瘍において報告されているが、遺伝子損傷の証拠はなかった(5~7)。N o t c h は、癌の型、存在する他のシグナル伝達経路、および活性化される N o t c h 受容体の同一性に依存して、発癌性または腫瘍抑制性のいずれかの役割を果たす可能性がある。

【0 0 0 5】

50

しかしながら、乳癌を含む大部分の症例においては、Notchシグナル伝達は腫瘍増殖を促進する(8)。Notchの発癌性の役割についての1つのメカニズムは、分化を妨害し、幹細胞表現型を維持するその能力から駆動され得るというものである。幹細胞および癌細胞は、無限の増殖および未分化などの共通の特徴を共有している。さらに、幹細胞および腫瘍細胞における自己再生は、ソニックヘッジホッグ、Wnt、およびNotchを含む同様の経路によって調節されている。腫瘍細胞は、正常な幹細胞から誘導され癌は、治療に対して抵抗性がある「癌幹細胞」を有することが可能である(9)。

【0006】

胚形成における非対称的な細胞分裂の間、Notchの活性は、細胞の運命の決定因子であるNumbによって生物学的に拮抗される(11、12)。非対称的な細胞分裂は、分化した娘細胞および未分化娘細胞における幹細胞の分裂から構成される。Numbはまた、多くの成熟哺乳動物細胞においても発現されている(13)。成熟細胞は対称的に分裂し、Numbは有糸分裂において対称的に分配される。対称的な分配は、Numbが不活性であり、またはさらなる機能を有することを示唆する。Numb/Notch拮抗作用は、正常な乳房柔組織の分裂の制御と関連する。正常な乳房柔組織は、常に変わることなく、強力かつ均一なNumb染色を発現している。対照的に、腫瘍は顕著に不均一性を示し、多くの場合において、Numb免疫反応性の完全な非存在を示す(14(非特許文献1)、15(非特許文献2))。

10

【0007】

この情報およびさらなる情報に基づいて、NotchのNumb媒介調節の破壊(遮断または阻害による)は、天然に存在する乳癌の原因となる役割を果たしていると考えられる。80%の乳癌が、腫瘍細胞の50%でNumbの免疫反応性を示す。このように、すべての乳癌のほぼ半分でNumbレベルが減少している。Numb発現レベルと、攻撃性疾患の公知の指標である腫瘍悪性度およびKi67標識指標との間で、強力な逆相関が見出された(14(非特許文献1))。低レベルNumbは、MG132などのプロテアソーム阻害剤を用いる処理によって高レベルまで回復されることが報告された(14(非特許文献1))。研究された乳癌におけるNumbレベルの減少は、一般的に増加したプロテオソーム活性の結果であるとは見られなかった。プロテオソーム性分解によってもまた調節される他の細胞タンパク質の基底レベルが同じ実験条件下で影響を受けなかったからであるが、この問題はさらなる研究を必要としている。

20

30

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Pece SおよびSantolini Eら、J. Cell Biol. (2004) 167: 215~21

【非特許文献2】Stylianiou S、Clarke RBおよびBrennan K、Cancer Res. (2006) 66: 1517~25

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0009】

1つの実施形態において、本発明は、Notch1、Notch2、Notch3、およびNotch4からなる群より選択されるタンパク質から誘導されたペプチドに対して患者を免疫化することによって、患者における癌を治療する方法に関する。

40

【0010】

1つの実施形態において、本発明は、上記のようなペプチドおよび薬学的に受容可能なキャリアを含む組成物に関する。

【0011】

1つの実施形態において、本発明は、Numb1、Numb2、Numb3、およびNumb4からなる群より選択されるタンパク質から誘導されたペプチドに対して患者を免疫化することによって、患者における癌を治療する方法に関する。

50

【0012】

1つの実施形態において、本発明は、上記のようなペプチドおよび薬学的に受容可能なキャリアを含む組成物に関する。

【0013】

1つの実施形態において、本発明は、Notch1、Notch2、Notch3、Notch4、Numb1、Numb2、Numb3、およびNumb4からなる群より選択されるタンパク質から誘導されたペプチドに対する抗体を含む組成物を患者に投与することによって、患者における癌を治療する方法に関する。

【0014】

以下の図面は本明細書の一部を形成し、本発明の特定の態様をさらに実証するために含まれる。本発明は、本明細書に提示される特定の実施形態の詳細な説明と組み合わせた、これらの図面の1つ以上の参照によって、より良好に理解され得る。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】Notch1 C末端アミノ酸1902-2143 (A、B) およびNumb1 ホスチロシン結合ドメイン (PTB) (C、D) の分子モデル。(B、D) はこれらの分子の電荷を示し、赤色は正電荷を示し、青色は負電荷を示す。ペプチドNotch1-1947、Notch1-2112、およびNumb1-87の位置は(A、C) に示す。

【図2】MCF7 乳癌細胞株およびSK-OV-3 卵巣癌細胞株に対するNotch1の発現。(A、B、C) 細胞はアイソタイプ対照抗体で染色した。(D、E、F) 細胞をNotch1に対する抗体で染色した。MCF7 (A、D)、SK-OV-3 (B、E)、およびSK-LMS-1 平滑筋肉腫 (C、F)。

【図3】TAL-1の増殖の反応速度論。新鮮に単離されたTAL-1を150 IU/ml IL-2で培養した。低濃度のIL-2で大部分の細胞は最初の(fist) 8日間で死滅した。その後、生存している細胞は数が増加した。

【図4】(A) ペプチド(dNP) でパルスしていないHLA-A2-IgG二量体で染色したTAL-1を陰性二量体対照として使用した。(B) Notch1-2112ペプチドHLA-A2-IgG二量体(dNotch1-2112) で染色したTAL-1。(C) TAL-1染色Numb1-87-HLA-A2ペプチド二量体(dNumb1-87)。Bと比較して、TCRhiPerhi細胞数の3.3倍増加していることに注目のこと。(D) AES1-HLA-A2-IgGペプチド二量体で染色したTAL-1。(E-H) パーフォリンに対する抗体で染色したTAL-1。(G) Numb1-87-TCR+細胞は、最大量のパーフォリンを有する。

【図5】(A-D) TAL-2においてゲートされたすべての分析。(A) ペプチド(dNP) でパルスしていないHLA-A2-IgG二量体で染色したTAL-1を陰性二量体対照として使用した。(B) Notch1-1947ペプチドHLA-A2-IgG二量体(dNotch1-1947) で染色したTAL-2、(C) Notch1-2112-HLA-A2-IgG二量体(dNotch2112) で染色したTAL-2、(D) Numb1-87-J-ILA-A2-IgGペプチド二量体(dNumb1-87) で染色したTAL-2、(E-H) 大型サイズTAL-2の分析。(E) dNP、(F) Notch1-1947、(G) Notch1-2112、(H) Numb1-87は、TCR1aの数が3倍増加している。

【図6-1】癌細胞株でのESA、CD44、およびCD24の発現。ゲムシダピンのあるなしで培養した細胞をESAについてゲートした。CD44およびCD24を分析した。ESA⁺CD44^高CD24^低グループは比較的高く、PANC-1およびAsPC-1に対するGEM処理によるこれらのマーカーの発現の示差的な変化がなかった。BR-C系統MCF7のESA⁺CD44^高CD24^低細胞は、Cst-Csとして知られており、その集団はGEM処理に伴って増加する。(A) PANC-1; (B) MCF7; (C) SKOV-3; (D) MIA PaCa-2; (E) MCF7。

【図6-2】癌細胞株でのESA、CD44、およびCD24の発現。ゲムシダピンのあ

10

20

30

40

50

るなしで培養した細胞をESAについてゲートした。CD44およびCD24を分析した。ESA⁺CD44^高CD24^低 / - 集団は比較的高く、PANC-1およびAsPC-1に対するGEM処理によるこれらのマーカーの発現の示差的な変化がなかった。BR-C系統MCF7のESA⁺CD44^高CD24^低 / - 細胞は、Cst-Csとして知られており、その集団はGEM処理に伴って増加する。(A)PANC-1; (B)MCF7; (C)SKOV-3; (D)MIA PaCa-2; (E)MCF7。

【図6-3】癌細胞株でのESA、CD44、およびCD24の発現。ゲムシダピンのあるなしで培養した細胞をESAについてゲートした。CD44およびCD24を分析した。ESA⁺CD44^高CD24^低 / - 集団は比較的高く、PANC-1およびAsPC-1に対するGEM処理によるこれらのマーカーの発現の示差的な変化がなかった。BR-C系統MCF7のESA⁺CD44^高CD24^低 / - 細胞は、Cst-Csとして知られており、その集団はGEM処理に伴って増加する。(A)PANC-1; (B)MCF7; (C)SKOV-3; (D)MIA PaCa-2; (E)MCF7。

【図7】(A)NKG2DリガンドMICAおよびMICBを発現する細胞数はGem^耐性およびFU^耐性MIA PaCa-2において増加した。MIC-A/B⁺細胞はPTX^耐性細胞の数を増加しなかった。(B)薬物耐性陽性対照MCF-7細胞を用いると同様の結果であった。白色ピークは?ESA+細胞?を表し、黒色ピークはMIC-A/B⁺細胞を示す。MICA-A/B⁺細胞%は下線で示す。MICA-A/B⁺細胞数の増加は、薬物対生細胞あたりのMIC-A/B密度の増加と並行していなかった。

【図8】膵臓細胞株は、その数が薬物耐性集団にいて増加しているCD133⁺細胞を含む。CSCマーカー(CD44+CD24^低、CD44⁺CD133⁺、およびCD24^低CD133⁺)の発現を共有する集団はゲムシダピンをを用いる処理後に増加した。(*)は実質的に2倍より多い増加である。(白色)未処理細胞、(黒色)薬物対生細胞。MCF-7およびSKOV3はCD44、CD24、およびESAマーカーのための陽性対照として使用した。薬物対生細胞の選択およびCSC表現の細胞の定量は、材料および方法に記載されるように作成した。(A)ESA⁺CD44^高CD24^低およびCD133⁺集団は、Mia-PaCa-2、PANC-1、MCF7、およびSKOV3の全体の集団と比較して、3~5倍GEM耐性集団が増加したが、AsPC-1では増加しなかった。(B)大量のDLL4拡大細胞はCD44^低CD24^低、およびCD24^低表現型であった。(C)比較結果をCD44⁺CD133⁺表現型について観察した。(D)比較結果をCD24^低CD133⁺表現型について観察した。

【図9-1】ゲムシダピンで生存している細胞は、Mia-paca-2およびMCF-7独特な生存経路の成分を活性化している。(A)NICDおよびBcl-2発現は、未処理(UT)Mia-paca-2と比較して、Gem^耐性MIA PaCa-2において増加した。(B)NECD発現は増加し、NICD発現はMCF7細胞において減少した。2回の実験の内の1つを示す。(C、D)Gem耐性MCF-7におけるNECD発現の発現のダイアグラムは、Numb^S、Numb^L、およびBcl-2の量の減少と並行していた。各タンパク質の発現レベルは、同じゲル中で分離された同じサンプル中のアクチンレベルと比例させて標準化した。以下の式を使用して計算した：発現指数 = サンプル中の特定のタンパク質の光学密度 / 同じサンプル中のタンパク質のアクチン密度。MCF7細胞中のBcl-2の発現は10分間曝露したメンブレンから示される；MIA PaCa-2中のBcl-2は3分間のみ曝露した同じメンブレンから示される。MCF7はMIA PaCa-2よりも少ない量のBcl-2を有した。MCF7細胞中のBcl-2のE.I.は、3分間の曝露における光学密度値から計算した。タンパク質の量の決定は、比率の減算{(NECD:Numb^L)-GEM^耐性 対 NECD:Numb^L)-GEM^感受性}が2よりも高いかまたは低い；すなわち、倍数増加、または倍数減少であるという場合に、実質的であると見なした。NE、NECD; NI、NICD; N-L、Numb^L、N-S、Numb^S。

【図9-2】ゲムシダピンで生存している細胞は、Mia-paca-2およびMCF-7独特な生存経路の成分を活性化している。(A)NICDおよびBcl-2発現は、未処

10

20

30

40

50

理 (U T) M i a p a c a - 2 と比較して、 G e m 耐性 M I A P a C a - 2 において増加した。(B) N E C D 発現は増加し、 N I C D 発現は M C F 7 細胞において減少した。2 回の実験の内の 1 つを示す。(C、D) G e m 耐性 M C F - 7 における N E C D 発現の発現のダイアグラムは、 N u m b^S、 N u m b^L、および B c l - 2 の量の減少と並行していた。各タンパク質の発現レベルは、同じゲル中で分離された同じサンプル中のアクチンレベルと比例させて標準化した。以下の式を使用して計算した：発現指数 = サンプル中の特定のタンパク質の光学密度 / 同じサンプル中のタンパク質のアクチン密度。 M C F 7 細胞中の B c l - 2 の発現は 10 分間曝露したメンブレンから示される； M I A P a C a - 2 中の B c l - 2 は 3 分間のみ曝露した同じメンブレンから示される。 M C F 7 は M I A P a C a - 2 よりも少ない量の B c l - 2 を有した。 M C F 7 細胞中の B c l - 2 の E . I . は、3 分間の曝露における光学密度値から計算した。タンパク質の量の決定は、比率の減算 { (N E C D : N u m b^L) - G E M 耐性 対 N E C D : N u m b^L } - G E M 感受性 } が 2 よりも高いかまたは低い；すなわち、倍数増加、または倍数減少であるという場合に、実質的であると見なした。 N E、 N E C D ; N I、 N I C D ; N - L、 N u m b^L、 N - S、 N u m b^S。

【図 10】 (A、B) U T - M i a p a c a - 2 と比較した G e m 耐性 M I A P a C a - 2 の形態学的変化。 U T - M I A P a C a - 2 は円形状細胞であるが (A)、しかしながら、これらはゲムシタピンを用いる処理後に、長い触手を有する紡錘体形状細胞に変形する (B)。 G e m 耐性 M C F - 7 細胞中での細胞あたりの M I C A - A / B A g 細胞の低レベル発現。白色ピーク、アイソタイプ対照 A b；暗いピーク、 M I C - A / B 特異的 A b。

【図 11】 (A) S K O V 3 . A 2 細胞は、 N u m b - 1 ペプチド活性化 P B M C に対して N u m b - 1 (87 - 95) ペプチドを提示する。 N u m b - 1 ペプチドによる I F N - g 産生は、 N o t c h ペプチド活性化 P B M C によるよりも、 P B M C を 2 倍実質的に高く活性化した。 48 時間において、 I F N g の量は 2 種の N o t c h ペプチド活性化細胞株によって産生され、非特異的に I L - 2 活性化された細胞株は低くかつ同様であったことに注目のこと。 N o t c h ペプチド、 2112 - 2120 のみが、プロテオソームによる N o t c h 消化後に H L - A 2 によって提示可能である (プログラム p a p r o c . d e)。 (B) S K O V 3 における N o t c h および N u m b タンパク質発現のウェスタン分析。 N u m b^S / L は、 M C F - 7 におけるよりも S K O V 3 において有意に多い量で発現されるが、 M i a p a c a - 2 においては同様の量である。 N u m b の一部はリン酸化されている。小部分の N u m b は S e r²⁸³ がリン酸化されている。大部分の N u m b は S e r²⁶⁴ がリン酸化されている。 N E C D は m A b s - s c c 3 2 7 5 (N o t c h 分子全体を認識する)、および H 1 3 1 (N I C D の 100 および 80 k D a にそれぞれ対応する 2 つのポリペプチドを検出する) を用いて検出される。 (C) N u m b - 1 (87 - 95) ペプチド活性化細胞への N u m b - 1 (87 - 95) ペプチドの提示は、 P K C ファミリーメンバー、およびより低い程度では、 M A P K キナーゼによって媒介されるリン酸化に依存する。 P I 3 K は、ペプチド提示に関与していないようである。広範なスペクトルの P K C キナーゼ阻害剤、スタウロスポリンを用いる S K O V 3 . A 2 の処理は、指標細胞株による I F N - g を消滅させたが、 P I 3 K 阻害剤 ウォートマリン (W T) ではそうではなかった。黒記号は 24 時間測定を示し、白記号は 48 時間測定を示す。

【図 12】 M C F - 7 は未処理であるか (U T、 G e m 感受性)、またはゲムシタピン (300 n M ゲムシタピン、3 日間、続いて、100 n M ゲムシタピン、さらに 5 日間、 G e m 耐性)。 C D 24 陰性 / 低細胞の増加であって、 C D 24 低および C D 24 高細胞の M F I ではないことに注目のこと。この実験は同じ条件で反復し、データを確認した (データ示さず)。

【図 13】 癌 - 幹様細胞 (C - S t - C) は癌細胞塊を生じる。

【図 14】 オーロラ A の過剰発現によって引き起こされる発癌の提案されているメカニズム。

10

20

30

40

50

【図15A】Notchは癌細胞増殖を活性化した。

【図15B】免疫選択後のNumbの機能的修復。

【発明を実施するための形態】

【0016】

1つの実施形態において、本発明は、Notch1、Notch2、Notch3、およびNotch4からなる群より選択されるタンパク質から誘導されたペプチドに対して患者を免疫化することによって、患者における癌を治療する方法に関する。

【0017】

1つの実施形態において、本発明は、Numb1、Numb2、Numb3、およびNumb4からなる群より選択されるタンパク質から誘導されたペプチドに対して患者を免疫化することによって、患者における癌を治療する方法に関する。

10

【0018】

1つの実施形態において、本発明は、Notch1、Notch2、Notch3、Notch4、Numb1、Numb2、Numb3、およびNumb4からなる群より選択されるタンパク質から誘導されたペプチドに対する抗体を含む組成物を患者に投与することによって、患者における癌を治療する方法に関する。

【0019】

Drosophilaにおいては単一のNotch受容体および2つのリガンド(DeltaおよびSerrate)が存在している。哺乳動物においては4種の受容体および5種のリガンドが存在している。Notch1~4は、Drosophila Notchのホモログであり；Delta様-1、-3、および-4(D111、D113、D114)はDeltaのホモログであり；Jagged1およびJagged2(Jag1およびJag2)はSerrateのホモログである。

20

【0020】

各Notch受容体は、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞内ドメインからなる全長前駆体タンパク質として合成される。Notchシグナル伝達は、通常、2つの隣接する細胞間のリガンド受容体結合によって活性化される。この相互作用は、その細胞外ドメイン中で、切断部位、S2を露出して、受容体におけるコンホメーションの変化を誘導する。メタロプロテアーゼTNF転換酵素(TACE)および/またはKuzbanianによる切断後、Notch受容体は、切断部位S3において膜内タンパク質分解を受ける。セクレターゼ複合体によって媒介されるこの切断は、Notch細胞内ドメイン(N-ICD)を遊離させ、次いで、これは、核に移行してNotch標的遺伝子を活性化する。セクレターゼ機能の阻害は、Notch受容体の最終的な切断を妨害し、Notchシグナル伝達を遮断する。N-ICD切断の非存在下において、Notch標的遺伝子の転写は、DrosophilaにおけるHairlessの抑制因子(再組換えシグナル結合タンパク質jk(RBP-jk)ホモログ)によって媒介されるリプレッサー複合体によって阻害される。

30

【0021】

Drosophilaにおける最近の研究は、Hairless経路の正準の抑制因子とは独立してNotchがシグナル伝達可能であることを示唆している。しかしながら、これが脊椎動物に当てはまるか否かは明らかではない。筋原細胞株および発生しつつあるトリ神経堤からのいくつかの初期の証拠は、Notchシグナル伝達がドミナントネガティブなHairlessの抑制因子の存在下で起こり得るが、さらなる性格付けが、脊椎動物における代替的な下流の経路を確立するために必要であることを示唆している(10)。

40

【0022】

本発明のNotch1、Notch2、Notch3、およびNotch4は哺乳動物タンパク質であり、1つの実施形態において、ヒトタンパク質である。1つの実施形態において、Notch1は配列番号1で示される配列を有する。1つの実施形態において、Notch2は配列番号2で示される配列を有する。1つの実施形態において、Notc

50

h 3 は配列番号 3 で示される配列を有する。1つの実施形態において、Notch 4 は配列番号 4 で示される配列を有する。

【0023】

哺乳動物 Numb は、4 種のスプライシングアイソフォーム、Numb 1 ~ Numb 4 を有し、これらは、C 末端のプロリンリッチ領域 (PRR) における 49 アミノ酸挿入 (5 kDa) の存在または非存在に基づいて、2つの型 (Numb^L および Numb^S) に分けられる。

【0024】

1つの実施形態において、Numb 1 は配列番号 5 で示される。1つの実施形態において、Numb 2 は配列番号 6 で示される。1つの実施形態において、Numb 3 は配列番号 7 で示される。1つの実施形態において、Numb 4 は配列番号 8 で示される。

10

【0025】

本明細書で使用される「ペプチド」は、約 5 ~ 約 50 アミノ酸を含む任意のオリゴマーを指す。「ペプチド」は、ペプチドがそのペプチドのアミノ酸配列のサブ配列と少なくとも約 95% の同一性を有する場合に、タンパク質から「誘導される」。1つの実施形態において、タンパク質から誘導されたペプチドは、そのタンパク質のアミノ酸配列のサブ配列と、少なくとも約 96% の同一性、例えば、約 97% の同一性、98% の同一性、99% の同一性、99.5% の同一性、または 99.9% の同一性を有してもよい。本明細書で使用される場合、「から誘導される」とは、ペプチドがタンパク質のタンパク質分解によって産生されなければならないとは言及しないし、そのことを暗示することもない。ペプチドは、タンパク質のタンパク質分解によって、タンパク質のアミノ酸配列を考慮した化学合成、ペプチドをコードする核酸配列を発現する生物の使用によって、または当該分野において公知である他の技術によって、製造されてもよい。

20

【0026】

1つの実施形態において、ペプチドは、DGVNTYNC (配列番号 9)、RYSRSD (配列番号 11)、LLEASAD (配列番号 18)、LLEYNLV (配列番号 21)、MPALRPALLWALLALWLCCA (配列番号 22)、NGGVCVDGVNTYNC (配列番号 25)、DGVNTYNCRCPPQWTG (配列番号 30)、RMNDGTTPLI (配列番号 32)、および LKNGANR (配列番号 35) からなる群より選択される。

30

【0027】

1つの実施形態において、上記ペプチドは、Notch 1₂₇₄₋₂₈₂ (配列番号 10)、Notch 1₁₉₃₈₋₁₉₄₃ (配列番号 11)、Notch 1₁₉₃₈₋₁₉₄₆ (配列番号 12)、Notch 1₁₉₃₈₋₁₉₄₇ (配列番号 13)、Notch 1₁₉₄₀₋₁₉₄₈ (配列番号 14)、Notch 1₁₉₄₀₋₁₉₄₉ (配列番号 15)、Notch 1₁₉₄₄₋₁₉₅₅ (配列番号 16)、Notch 1₁₉₄₇₋₁₉₅₅ (配列番号 17)、Notch 1₂₁₁₁₋₂₁₂₀ (配列番号 19)、Notch 1₂₁₁₂₋₂₁₂₀ (配列番号 20)、Notch 1₂₁₁₃₋₂₁₂₀ (配列番号 21)、Notch 2₁₋₂₀ (配列番号 22)、Notch 2₇₋₁₅ (配列番号 24)、Notch 2₂₇₁₋₂₈₅ (配列番号 26)、Notch 2₂₇₁₋₂₈₆ (配列番号 27)、Notch 2₂₇₇₋₂₈₅ (配列番号 28)、Notch 2₂₇₇₋₂₈₆ (配列番号 29)、Notch 2₁₉₄₀₋₁₉₄₈ (配列番号 31)、Notch 2₁₉₄₀₋₁₉₄₉ (配列番号 32)、Notch 2₁₉₉₁₋₂₀₀₃ (配列番号 33)、Notch 2₁₉₉₅₋₂₀₀₃ (配列番号 34)、および Notch 2₁₉₉₇₋₂₀₀₃ (配列番号 35) からなる群より選択される。

40

【0028】

1つの実施形態において、上記ペプチドは、LWVSADGL (配列番号 37)、CRDGTTRRWICHCFMAVKD (配列番号 38)、RWICHCFMAVKD (配列番号 39)、RWLEEVSKSVRA (配列番号 41)、および VDDGRLASADRHTEV (配列番号 43) からなる群より選択される。

50

【0029】

1つの実施形態において、上記ペプチドは、Numb 1₈₇₋₉₅（配列番号36）、Numb 1₈₈₋₉₅（配列番号37）、Numb 1₁₃₁₋₁₄₉（配列番号38）、Numb 1₁₃₈₋₁₄₉（配列番号39）、Numb 1₁₃₉₋₁₄₇（配列番号40）、Numb 1₄₄₂₋₄₅₃（配列番号41）、Numb 1₄₄₃₋₄₅₁（配列番号42）、Numb 1₅₉₂₋₆₀₆（配列番号43）、およびNumb 1₅₉₄₋₆₀₂（配列番号44）からなる群より選択される。

【0030】

上記ペプチドは、生理食塩水のような薬学的に受容可能なキャリアであって、とりわけ当該分野において公知であるものも含む組成物の成分であってよい。

10

【0031】

上記ペプチドは、それに対する抗体を産生するために使用することができる。モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体（一般的に「抗体」）の産生および精製のための方法は当該分野において公知である。1つの実施形態において、上記ペプチドは、抗体がペプチドに対して産生可能であるような様式でHLA-A-A2分子と共有結合される。

【0032】

一旦、産生および精製されると、ペプチドに対する抗体は、癌を治療するために患者に直接的に投与可能であり、または他の物質とともに組成物を形成して、癌を治療するために患者に投与可能である組成物を生じることが可能である。1つの実施形態において、抗体は、抗癌剤および放射性同位元素からなる群より選択される治療分子とともに組成物を形成可能である。例示的な抗癌剤としては、とりわけ、以下が挙げられるがこれらに限定されない：パクリタキセル（Bristol-Myers Squibb社からタキソール（Taxol）として市販されている）、ドキシソルピシン（商品名アドリアマイシン（Adriamycin）としてもまた公知）、ビンクリスチン（商品名オンコビン（Oncovin）、ビンカサル（Vincasar）PES、およびビンクレックス（Vincrex）として公知）、アクチノマイシンD、アルトレタミン、アスパラギナーゼ、ブレオマイシン、ブスルファン、カペシタピン、カルボプラチン、カルムスチン、クロラムブシル、シスプラチン、シクロホスファミド、シタラピン、デカルバジン、ダウノルビシン、エピルピシン、エトポシド、フルダラビン、フルオロウラシル、ゲムシタピン、ヒドロキシウレア、イダルピシン、イホスファミド、イリノテカン、ロムスチン、メルファラン、メルカプトプリン、メトトレキサート、マイトマイシン、ミトザントロン（mitozantrone）、オキサリプラチン、プロカルバジン、ステロイド、ストレプトゾシン、タキソテレ、タモゾロミド、チオグアニン、チオテバ、トムデックス、トボテカン、トレオスルファン、UFT（ウラシル-テグフル（tegufur））、ピンブラスチン、およびピンデシン。

20

30

【0033】

癌治療の当該分野において公知である放射性同位元素には、とりわけ以下が含まれるがこれらに限定されない：¹²⁵I、¹³¹I、⁹⁰Y、²²¹At、²²⁵Ac、²¹²Bi、²¹³Bi、⁹⁹Re、¹⁶⁶Ho、¹⁷⁷Lu、または¹⁵³Sm。

【0034】

抗体が治療分子とともに組成物に形成される場合、1つの実施形態において、上記治療分子は、抗体の重鎖の定常領域に共有結合される。1つの実施形態において、上記治療分子は、例えば、以下によって共有結合可能である：(i) スルフヒドリル（-SH）含有置換基を治療分子に加えること；(ii) 重鎖の定常領域にスルフヒドリル含有置換基を有する抗体を調製すること；および(iii) 抗体および治療分子を、それらのスルフヒドリル含有置換基を通して反応させ、治療分子と抗体の重鎖の定常領域の間に-S-S-結合を形成すること。

40

【0035】

1つの実施形態において、ペプチドおよび薬学的に受容可能なキャリアを含む組成物は、当該分野において公知である、アルミニウム塩、QS21、MF59、またはビノソー

50

ムなどの、アジュバントをさらに含んでもよい。

【0036】

上記ペプチドは、もしあれば、ペプチドに対する抗体の形成を誘発することを当業者が予測するような様式で、薬学的に受容可能なキャリアとともに患者に投与可能である。ワクチン接種の方法は当該分野において周知である。ペプチドの投与は、NotchまたはNumbのアプレギュレーション、過剰発現、または脱抑制によって特徴付けられる任意の癌を治療するために使用可能である。1つの実施形態において、上記癌は、T細胞急性リンパ芽球性白血病およびリンパ腫(T-ALL)、乳癌、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、肝臓癌、胃癌、明細胞腎細胞癌腫、および結腸癌からなる群より選択される。

【0037】

「ペプチドに対する免疫化」およびこの語句のバリエーションは、抗体が抗原としてのペプチドを認識する、患者の免疫系による1つ以上の抗体の作製の誘導をいう。理論によって束縛されることはないが、Notch1、Notch2、Notch3、およびNotch4からなる群より選択されるタンパク質から誘導されるペプチドに対して患者を免疫化することによって、すなわち、ペプチドに対する抗体の作製を誘導することによって、Notchのアプレギュレーション、過剰発現、または脱抑制によって特徴付けられる癌に罹患している少なくともある患者が治療可能であり、すなわち、腫瘍サイズまたは癌細胞の計数の少なくとも部分的な減少を経験することが考えられる。

【0038】

1つの実施形態において、上記ペプチドは、投与後に抗体がペプチドに対して産生可能であるような様式で、投与前にHLA-A2分子と共有結合される。

【0039】

以下の実施例は、本発明の好ましい実施形態を実証するために含まれる。以下に続く実施例において開示されている技術は、本発明の実施において十分に機能するために、本発明者によって発見された技術を表し、従って、その実施のための好ましい様式を構成すると見なされ得ることが当業者によって理解されるべきである。しかしながら、本開示に鑑みて、開示される特定の実施形態において多くの変更が行われ得、本発明の技術思想および範囲から逸脱することなく、同様のまたは類似の結果がなお得られることを、当業者は理解するべきである。

【実施例】

【0040】

(実施例1)

要約：Notchは、多くの細胞系譜において、細胞運命特定の制御、および増殖と分化の間のバランスの維持に関与している原形質膜受容体である。Notchの破壊は、種々の血液癌および固形癌に関連付けられてきた。Numbもまた、多くの成熟哺乳動物細胞において発現されている。成熟細胞は対称的に分裂し、Numbは有糸分裂において対称的に分配される。Numb媒介性Notch調節は、天然に存在する乳癌において原因となる役割を果たしていると考えられている。乳癌におけるNumbレベルの減少は、プロテオソーム性分解によって調節されている。

【0041】

本発明者らは、Numbタンパク質によるNotchの調節されないネガティブ制御がNumbのプロテオソーム性分解の結果であるならば、Numbの分解はMHC-I分子によって提示される輸送されるペプチドを生成し得ると推論している。驚くべきことに、本発明者らは、Notch1、Notch2、およびNumb1から自然に処理されたペプチドの候補をほとんど発見しなかった。ペプチドNotch1(2112-2120)およびNumb1(87-95)を特異的に認識したTDRを発現するCD8⁺T細胞は、卵巣癌患者の腹水中で提示された。これらの細胞の多くは分化しており、高レベルのパーフォリンを発現していた。

【0042】

Notch1の天然の免疫原性、特に、Numb1のそれは、腫瘍の進行の間に克服さ

10

20

30

40

50

れる免疫学的監視のメカニズムを示唆する。NotchおよびNumbからの腫瘍抗原を用いる免疫治療は、癌患者の治療のために重要であるはずである。

【0043】

緒言：Notchは、多くの細胞系譜において、細胞運命特定の制御、および増殖と分化の間のバランスの維持に関与している原形質膜受容体である(1、2)。Notchシグナル伝達は多数の生理学的プロセスにおいて重要であり、Notchの破壊は種々の血液癌および固形癌に関連付けられてきた。

【0044】

最もよい例は、Notchの変異と、T細胞急性リンパ芽球性白血病およびリンパ腫(T-ALL)との間の連関である。T-ALL腫瘍細胞のサブセットにおいて、(7、9)染色体点座は、Notch1の3'位をT細胞受容体J遺伝子座に融合する。これは、短縮型Notch1タンパク質を生じ、これは構成的に活性かつ異常に発現される(3)。加えて、(7、9)転座とは独立した、Notch1の活性化変異が、ヒトのT-ALL症例の50%を超えて見出されてきた(4)。

10

【0045】

異常なNotchシグナル伝達はまた、乳癌、膵臓癌、前立腺癌、肝臓癌、胃癌、および結腸癌を含む固形腫瘍において報告されているが、遺伝子損傷の証拠はなかった(5~7)。Notchは、癌の型、存在する他のシグナル伝達経路、および活性化されるNotch受容体の同一性に依存して、発癌性または腫瘍抑制性のいずれかの役割を果たす可能性がある。

20

【0046】

しかしながら、乳癌を含む大部分の症例においては、Notchシグナル伝達は腫瘍増殖を促進する(8)。Notchの発癌性の役割についての1つのメカニズムは、分化を妨害し、幹細胞表現型を維持するその能力から駆動され得るというものである。幹細胞および癌細胞は、無限の増殖および未分化などの共通の特徴を共有している。さらに、幹細胞および腫瘍細胞における自己再生は、ソニックヘッジホッグ、Wnt、およびNotchを含む同様の経路によって調節されている。腫瘍細胞は、正常な幹細胞から誘導され、癌は、治療に対して抵抗性がある「癌幹細胞」を有することが可能である(9)。

【0047】

Drosophilaにおいては単一のNotch受容体および2つのリガンド(DeltaおよびSerrate)が存在している。哺乳動物においては、本概説の焦点である4個の受容体および5種のリガンドが存在している。Notch1~4はDrosophila Notchのホモログであり；Delta様-1、-3、および-4(D111、D113、D114)はDeltaのホモログであり；Jagged1およびJagged2(Jag1およびJag2)はSerrateのホモログである。

30

【0048】

各Notch受容体は、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞内ドメインからなる全長前駆体タンパク質として合成される。Notchシグナル伝達は、通常、2つの隣接する細胞間のリガンド受容体結合によって活性化される。この相互作用は、その細胞外ドメイン中で、切断部位、S2を露出して、受容体におけるコンホメーションの変化を誘導する。メタロプロテアーゼTNF転換酵素(TACE)および/またはKuzbanianによる切断後、Notch受容体は、切断部位S3において膜内タンパク質分解を受ける。セクレターゼ複合体によって媒介されるこの切断は、Notch細胞内ドメイン(N-ICD)を遊離させ、次いで、これは、核に移行してNotch標的遺伝子を活性化する。セクレターゼ機能の阻害は、Notch受容体の最終的な切断を妨害し、Notchシグナル伝達を遮断する。N-ICD切断の非存在下において、Notch標的遺伝子の転写は、DrosophilaにおけるHairlessの抑制因子(再組換えシグナル結合タンパク質jk(RBP-jk)ホモログ)によって媒介されるリプレッサー複合体によって阻害される。

40

【0049】

50

*Drosophila*における最近の研究は、*Hairless*経路の正準の抑制因子とは独立して*Notch*がシグナル伝達可能であることを示唆している。しかしながら、これが脊椎動物に当てはまるか否かは明らかではない。筋原細胞株および発生しつつあるトリ神経堤からのいくつかの初期の証拠は、*Notch*シグナル伝達がドミナントネガティブな*Hairless*の抑制因子の存在下で起こり得るが、さらなる性格付けが、脊椎動物における代替的な下流の経路を確立するために必要であることを示唆している(10)。

【0050】

胚形成における非対称的な細胞分裂の間、*Notch*の活性は、細胞の運命の決定因子である*Numb*によって生物学的に拮抗される(11、12)。非対称的な細胞分裂は、分化した娘細胞および未分化娘細胞における幹細胞の分裂から構成される。*Numb*はまた、多くの成熟哺乳動物細胞においても発現されている(13)。成熟細胞は対称的に分裂し、*Numb*は有糸分裂において対称的に分配される。対称的な分配は、*Numb*が不活性であり、またはさらなる機能を有することを示唆する。*Numb/Notch*拮抗作用は、正常な乳房柔組織の分裂の制御と関連する。正常な乳房柔組織は、常に変わることなく、強力かつ均一な*Numb*染色を発現している。対照的に、腫瘍は顕著に不均一性を示し、多くの場合において、*Numb*免疫反応性の完全な非存在を示す(14、15)。

【0051】

この情報およびさらなる情報に基づいて、*Notch*の*Numb*媒介調節の破壊(遮断または阻害による)は、天然に存在する乳癌の原因となる役割を果たしていると考えられる。80%の乳癌が、腫瘍細胞の50%で*Numb*の免疫反応性を示す。このように、すべての乳癌のほぼ半分で*Numb*レベルが減少している。*Numb*発現レベルと、攻撃性疾患の公知の指標である腫瘍悪性度および*Ki67*標識指標との間で、強力な逆相関が見出された(14)。低レベル*Numb*は、*MG132*などのプロテアソーム阻害剤を用いる処理によって高レベルまで回復されることが報告された(14)。研究された乳癌における*Numb*レベルの減少は、一般的に増加したプロテオソーム活性の結果であるとは見られなかった。プロテオソーム性分解によってもまた調節される他の細胞タンパク質の基底レベルが同じ実験条件下で影響を受けなかったからであるが、この問題はさらなる研究を必要としている。

【0052】

本発明者らは、*Numb*タンパク質による*Notch*の調節されないネガティブ調節が*Numb*プロテアソーム分解の結果であるならば、*Numb*の分解は、抗原プロセッシングと関連するトランスポーター(*TAP*)によって輸送され、かつ*MHC-I*分子によって提示されるペプチドを生成し得ると推論している。これらの*MHC-I Numb*ペプチド複合体を認識するT細胞は、健常個体において寛容化または除去される可能性がある。さらに、*Notch*の分解がそのシグナル伝達のために必要とされる場合には、*N-ICD*の分解もまた、*Notch*ペプチドを生成するはずである。*Notch*フラグメントのいくつかはプロテアソームによって分解される場合、これらもまた、*MHC-I*分子によって提示される可能性がある。*Notch*および*Numb*ペプチドが寛容原性ではない場合には、このようなペプチドのための受容体を有する活性化*CD8⁺T*細胞が、癌患者の中でインビボで検出されるはずである。本研究は、この仮説に取り組むために実施した。

【0053】

材料と方法：

予測アルゴリズムを有する候補*MHC-I*結合ペプチドの同定。本発明者らは、*HLA-A*、*B*、*C*および*HLA-DR*分子を結合可能であるペプチドを同定するために以下のプログラムを使用した：(1)*HLA-A*、*B*、*C*へのペプチド結合を予測するための*BIMAS*(*Informatics and Molecular Analysis Section*)(http://bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind)(16)；(2)*PAPROC*(*Prediction Algorithm for Proteasomal Cleavages*)、*PAPROC*

10

20

30

40

50

は実験的な切断データに基づく、ヒトおよび酵母の20Sプロテアソームによる切断のための予測ツール (<http://www.paproc2.de/paproc1/paproc1.html>)、および(3)MHC-I結合ペプチドの予測のためのTEPI TOPEプログラム、このプログラムはJurgen Hammer博士(Roche)から入手可能である(www.vaccinome.com) (17、18)。

【0054】

生成されるプロテアソームの予測およびMHC-I結合ペプチドを同定するために、本発明者らは、NCBIからNotch1、Notch2、およびNumb1のアミノ酸配列をダウンロードした。これらのアクセッション番号は、それぞれ、Notch1 (NM_017617)、Notch2 (NM_024408)、およびNumb1 (P49757) である。本発明者らは、ヒトプロテオソーム野生型1、2、および3によって産生されたペプチドを同定した。

10

【0055】

ペプチド候補CD8⁺細胞エピトープを含むNotch1領域およびNumb1領域の三次元タンパク質構造モデルは、Swiss Model Programを使用してダウンロードした。Swiss Model Programは、完全に自動化されたタンパク質構造相同性モデリングプログラムであり、Expasyウェブサーバーを介して (<http://swissmodel.expasy.org/repository/>)、またはプログラムDeep View (Swiss Pdb-Viewer、<http://swissmodel.expasy.org/spdbvl>) からアクセス可能である(19)。ペプチドが配置されているNotch1領域およびNumb1領域の分子モデルは、図1(A~D)に示される(20~22)。

20

【0056】

細胞株。本発明者らは、アメリカンタイプカルチャーコレクション(American Type Culture Collection) (Rockville, MD) から入手したヒト乳癌細胞株MCF7、ヒト卵巣癌細胞株SK-OV-3、およびヒト平滑筋肉腫細胞株SK-LMS-1を使用した。すべての細胞株は、10% FCS、100単位/ml ペニシリン、および100µg/ml ストレプトマイシンを補充したRPMI 1640培地(GIBCO, Grand Island, NY)中で増殖させた。細胞は処理前に80%のコンフルエンスまで単層で増殖させた。

30

【0057】

リンパ球培養。リンパ球は、HLA-A2⁺卵巣癌患者からのヘパリン処理腹水から、Ficoll勾配遠心分離によって単離した。分離後、本発明者らは、本発明者が記載したように、1週間、10% FCSおよび300IU IL-2 (Biosource Camarillo, CA)を補充したRPMI 1640培地を用いてリンパ球を培養した(23、24)。

【0058】

合成ペプチド。以下のペプチドを本研究において使用した：Notch1 (1947-1955、RLLEASADA)、Notch1 (2112-2120、RLLEAYLV)、Numb1 (87-95、VLWVSADGL)、Glil (580-588、GLMPAQHYL)、およびAESI (128-137、LPL TPLPVGL)。これらのすべてのペプチドは、the Synthetic Antigen Core Facility of the University of Texas M.D. Anderson Cancer CenterのMartin Campbell博士によって合成された。アミノ酸は、Rainin Symphony Automated Peptide Synthesizer上で、標準的なN-(9-フルオレニル)メトキシ-カルボニルペプチドケミストリーを使用して、COOH末端から連続的な様式でカップリングを行い、高速液体クロマトグラフィーによって精製した。ペプチドの純度は95%~97%の範囲であった。ペプチドは10% DMSOを有するPBSに溶解し、本発明者らが記載するように使用するまで、1mg/mlのアリコートで-20

40

50

にて保存した(23)。

【0059】

フローサイトメトリー。腫瘍細胞上でのNotch1分子の発現を調べるために、BD Cytotfix/Cytopermで前処理し、細胞内染色のためにBD Perm/Wash (BD Bioscience Pharmingen, San Diego, CA)によって洗浄した細胞を、抗Notch1モノクローナル抗体-PE (フィコエリトリン) 標識およびPE結合体化マウスモノクローナルアイソタイプコントロール抗体 (BD Bioscience Pharmingen) で染色し、Becton Dickinson FACS Caliberを、Cell Questソフトウェア (Becton Dickinson, NJ) およびFlow-Joプログラム (Macバージョン8.11 Tree Star, Inc, OR) とともに使用して分析した(25)。

10

【0060】

本発明者らは、同じリガンドを用いるインビトロ刺激に際してCTL分化におけるTCR密度の役割を評価するために各ペプチドと反応性である高濃度/多数のT細胞受容体(TCR)を発現する細胞を同定した。101よりも高い平均蛍光密度(MFI)を有する抗原四量体/二量体を用いる細胞染色を通常含むTCR⁺集団は、3つの集団に分割し、1つは、101~102のMFI(TCR)を有する抗原パルスしたHLA-A2/IgG二量体(二量体)を用いて染色し、他のものは、102~103のMFI(TCR)を有する抗原パルスした二量体を用いて染色し、他のものは103~104のMFI(TCR)を有する抗原パルスした二量体を用いて染色した。これらの集団は、本発明者らが記載したように、それぞれ、TCR^低、TCR^中、TCR^中と称する(26)。

20

【0061】

T細胞：ペプチド-HLA-A2-IgG二量体相互作用。Notch1(1940-1948)、Notch1(2112-2120)、Numb1(87-95)、Gli1(580-588)、およびAESI(128-137)に特異的なTCRの発現は、HLA-A2-IgG-二量体(BD Bioscience Pharmingen)を使用して決定した。ペプチド負荷二量体は、本発明者らが以前に記載したように調製した(23)。この二量体でのリンパ球の染色は、以前に記載されたように実施した(24、27、28)。

30

【0062】

同じ細胞をまた、この二量体とは異なる蛍光色素：フルオレセイン イソチオシアネート(FITC)、アロフィコシアニン(APC)、およびPEに結合体化された特異的抗体を使用して、CD8抗原の発現およびパーフォリン(エフェクターポア形成酵素)の存在について染色した。対応するペプチド負荷二量体を反応する細胞は、それぞれ、Notch1-1940-TCR⁺細胞、Notch1-2112-TCR⁺、Numb1-87-TCR⁺、およびGli1-87-TCR⁺細胞と称する。ペプチドを負荷していないコントロールHLA-A2-IgG二量体を反応させた細胞はdNP-TCR⁺細胞と称する。

40

【0063】

結果：

プロテアソーム処理ペプチドの選択。候補免疫原性NumbペプチドおよびNotch1ペプチドの予備分析は、HLA-A、B、C結合予測アルゴリズムに基づいて、Notch1、Notch2、およびNumb1からのペプチドが、HLA-A、B、C分子に結合することを同定した。結果は、非常に大量のペプチドを示し、これは、いくつかのMHC-Iへの潜在的な結合因子である。非常に大量のMHC-I結合ペプチドは、ペプチド選択を困難にした。本発明者らは、以下に結合する潜在能力を有するペプチドを検索および同定した：(a) コーカサス人および中国人においてより高い頻度で発現されているHLA-A2、(b) 日本人においてより高い頻度で発現されているHLA-A2、および(c) アフリカ系米国人においてHIVに対するT細胞応答と関連していると報告されてい

50

るHLA-A33(29)。本発明者らはまた、他のHLA-A2集団におけるよりも、HLA-A2+アフリカ系米国人においてより頻度が高い(25%)HLA-A2.5への潜在的な結合因子を調べた(30)。

【0064】

自己/腫瘍(TA)-抗原の免疫優勢は、MHC-Iへの抗原の結合親和性によって常に決定されるわけではない。実際は、免疫原性ペプチドのいくつかは(C85、MART-1)、HLA-A2に対して非常に弱い結合因子である。内因性に処理される、本発明者らの免疫原性ペプチドの選択の機会を改善するために、本発明者らは、プロテオソーム消化予測分析を実施した(18)。表1の結果は、HLA分子のいずれかに結合すると予測されるもののうちで非常に少ないNotch1、Notch2、およびNumb1ペプチドのみが、内部のタンパク質のプロテアソーム消化によってもまた生成可能であることを示す。実際は、Notch1からの2種のペプチドのみ、およびNumb1からの1種のみが、結合することが予測されているこれらのMHC-I対応物と類似していた。

【0065】

【表 1】

表 1. プロテアソームはNotch1、Notch2、およびNumb1へペプチドを生成する^a

長さ HLA-	開始位置	配列	消化型 ^b	消化産物 ^c	
Notch 1					
A2.1 7	1947	RLLEASADA	1	AAKR / LLEASAD / A	10
A2.1, 2.5 8	2112	RLLDEYNLV	1	V/R / LLDEYNLV	
A24 6	1938	RYSRSDAAK	1	RYSRSD / AAKR	
A33 8	274	DGVNTYNCR	3	DGVNTYNC / R	
Cw4	なし	N/A ^d		N/A	
Notch 2					
A2.1 N/A	なし	N/A		N/A	20
A2.5 MPALRPALLWALLALWLCCA	7	ALLWALLAL 21	1, 2		
A24, 2.5 10	1940	RMNDGTTPL	3	RMNDGTTPL/	
A33 7	1995	LLKNGANR	1	EATLLL / LKNGANR	
A33 16	277	DGVNTYNCR	2	DGVNTYNCRCPPQWTG	30
14	277	DGVNTYNCR	3	NGGVC/DGVNTYNC / R	
Cw4	なし	N/A		N/A	
Numb1					
A2.1 8	87	VLWVSADGL	1	V / LWVSADGL	
A2.1, 2.5 12	443	WLEEVSKSV	2	RWLEEVSKSVRA	
A2.5 12	139	WICHCFMAV	1	RWICHCFMAVKD	40
19	139	WICHCFMAV	2	CRDGTTRRWICHCFMAVKD	
A24 N/A	なし	N/A		N/A	
A33 15	594	DGRLASADR	1	VDDGRLASADRHTEV	
Cw4 N/A	なし	N/A		N/A	

^a) MHC - 1 を結合可能であるペプチドを生成する予想プロテアソームは、プログラム 50

PAPROC (<http://www.paproc2.de/paproc1/paproc1.html>)を用いて同定した。

b) 消化型は、プログラムPAPROCによって1、2、および3と称するタンパク質分解特異性 (specificities) を示す。

c) 「/」はペプチドの消化の位置および得られた生成物を示す。

d) N/Aは「利用不可」、結合したペプチドがないことを示す。

【0066】

表1の結果は、ペプチドNotch1(2112-2120)およびNotch1(274-282)が、プロテオソームによって処理され、それぞれ、HLA-A2およびHLA-A33によって、8量体として提示されることを示す。N末端およびC末端のアンカーモチーフの位置に基づいて、Notch1(2112-2120)のみがHLA-A2と複合体を形成し得る。香味深いことに、Notch1(2112-2120)はまた、HLA-A2.1よりも低い親和性ではあるが、A2.5もまた結合し得る。それゆえに、Notch1(2112-2120)は、それぞれ、A2.1およびA2.5を発現する、コーカサス人およびアフリカ系米国人のための共通の/共有されているエピトープであり得る。

10

【0067】

完全に異なる結果をNotch2ペプチドについて得た。ペプチドNotch2(19401948)のみが、プロテアソームによって消化され、HLA-A24による10量体として提示されることが可能である。このペプチドおよびすべての他のNotch1ペプチドは、HLA-A2またはアフリカ系米国人集団における応答と関連する組織適合性遺伝子産物のいずれかによって提示不可能である。しかしながら、Notch2(1940-1948)は、プロテアソームによって生成され、HLA-A2.5によって提示されることが可能である。それゆえに、Notch2(1940-1948)は、HLA-A24とHLA-A2.5と関連して腫瘍によって提示可能である。Notch2(1940-1948)はNotch1(1947-1955)とは配列が異なっていることもまた強調されるべきである。

20

【0068】

結果はNumbについて驚くべきものであった。Numb1ペプチド(87-95)は、プロテアソームによって消化され、HLA-A2.1によって8量体として提示可能である。Numbペプチド443-451は、HLA-A2.1によって提示され、12量体として提示可能であり、従って、その免疫原性は、エキソペプチダーゼによるトリミングに依存する可能性がある。

30

【0069】

天然の免疫原性ペプチドの検出。プロテオソームによって不完全に消化されたペプチドが修復可能であるか否かに取り組むために、本発明者らは、新たな候補免疫原を操作した。Notch2(1940-1948)およびNumb(443-451)などの9アミノ酸長を超えるペプチドは、提示前にN末端およびC末端でトリミング可能である。修復を操作するために、本発明者らは、同じ最小9アミノ酸エピトープを保持し、隣接する残基を修飾した。修飾は、Notch/Numb隣接残基を、他のタンパク質からの隣接残基で置き換えることによって行った。これは、HLA-A2と関連する、最小CTLエピトープの提示を可能にする。結果は、Notch1およびNumb1からのHLA-A2結合ペプチドのみがプロテオソーム性消化後に提示可能であったことを示す(表2)。

40

【0070】

【表 2】

表 II. コアペプチドの隣接残基の修飾による、プロテアソーム生成ペプチドの修復

ペプチド	隣接	コア	隣接	
プロテアソーム消化生成物				
Notch1				
野生型	RMHHDI	VRLLEDEYNLV	RSPQL	RMHHD / 10
<i>I / VR / LLDEYNLV / RSPQL</i>				
A. N末端隣接配列の、Her-2 E75ペプチドN末端隣接配列 <i>NIQEAFAGCL</i> での置き換え				
N-隣接修飾	NIQEAFAGC	<u>L</u> RLLDEYNLV	RSPQL	
<i>NIQEAFAGC L RLLDEYNLV RSPQL</i>				
B. N末端隣接配列の、 <i>NIQEAFAGCL</i> での置き換え、次いで、コア中での置き換え： R^2 を K で				
	NIQEAFAGC	<u>L</u> KLLDEYNLV	RSPQL	
<i>NIQEAFAGC L KLLDEYNLV RSPQL</i> 20				
Numb1				
野生型	GKTGKKAVKA	VLWVSADGL	RVVDEKTK	GKTGKKA
<i>V KA V LWVSADGL RVVDEKTK</i>				
置換	(**)			
	A → P			GKTGKKA
<i>V K PVLWVSADGL RVVDEKTK</i>				
	KA → LFK			GKTGKKA
<i>V LF KVLWVSADGL RVVDEKTK</i> 30				
NおよびC末端隣接残基を <i>RMHHDI</i> および <i>RSPQL</i> でそれぞれ置き換え* プラス挿入 R 最小エピトープの開始前				
	<i>RMHHDI</i> A VR	VLWVSADGL	RSPQL	RMHHDI
<i>AV R VLWVSADGL RSPQL</i>				
(*) RMHHDI および RSPQL は上記の Notch1 ペプチドの隣接残基である。				
(**) すべての得られた残基は HLA-A2 に対して非常に低い親和性を有する。				
HLA-A2 結合スコアは：147.697 (9量体)、0.075 (10量体)、および 11.861 (10量体) である。太字および斜字体は配列中の置換を示す。				
【0071】				
これらのタンパク質のどれがインビボで抗原性であるかを同定するために、本発明者らは、ペプチド Notch1 (1947-1955)、Notch1 (2112-2120)、および Numb1 (87-95) を特異的に認識可能である TCR を発現する CD8 ⁺ T 細胞の存在を決定した。プロテオソーム性消化によって生成されることが知られている AESI ペプチド (128-137) は、インビボ免疫原性のための陰性対照として使用した。プロテオソーム性消化によっては生成されない Gli1 ペプチド (580-588) は、陰性対照として使用した。ベースライン TCR ⁺ 細胞数は dNP 二量体を用いて決定した。本発明者らは、進行した疾患を有する患者からの卵巣腫瘍関連リンパ球中で、高い、中程度、または低い親和性を有する TCR を有する CD8 ⁺ 細胞の存在を調べた。				
【0072】				
卵巣癌における Notch および Numb のタンパク質およびリガンドの存在の意義は 50				

、発癌の間に、成熟卵巣血管系と血管形成性新生血管の両方を含む、卵巣血管のサブセット中でNotchおよびNumbが発現されているという事実に起因する(31)。卵巣中でのこれらの発現は、内皮細胞と血管関連壁細胞の両方において見出された(32)。腫瘍血管形成は、Notchを含む生理学的血管形成と同じ経路の多くを含む。これは、ヒト腫瘍サンプルとマウス異種移植片の両方において示されてきた。インサイチュハイブリダイゼーションおよび定量的な(puantitative)ポリメラーゼ連鎖反応(pPCR)によって測定すると、0114 mRNAは、腎臓または乳房サンプルにおいては検出不可能であったが、ヒト明細胞腎細胞癌腫および乳癌の血管系においては高度に発現されていた。腫瘍サンプルの中では、0114発現はmRNAレベルでEGFと正の相関があった(33)。異種移植片研究において、0114を発現しないヒトMCF7細胞株が腫瘍を生じ、それらの血管系の中で高レベルのマウス0114を発現した(34)。現在、腫瘍における0114の研究は、良好なモノクローナル抗体の欠如によって妨害されている。免疫組織化学によって0114タンパク質レベルの測定を可能にする抗体を開発するための研究が進行中である。

10

20

30

40

50

【0073】

分化を調節するNotch経路の構成要素は腺癌においてより頻繁に発現されるのに対して、Deltex、Mastermindは腺腫においてより頻繁であった(35)。qPCRは、腺腫と比較して卵巣腺癌においてNotch1 mRNAが減少していることを明らかにした。Notch1細胞外タンパク質の発現は良性腫瘍および悪性腫瘍において同様であった(35)。HES-1タンパク質は、18/19卵巣癌および境界型腫瘍において強力に発現されることが見出されたが、腺腫においてはそうではなかった。従って、Notch経路の構成要素のいくつかは、腺腫と癌腫の間で示差的に発現されている(36)。

【0074】

別々の実験において、本発明者らは、AES1がSK-OV-3(卵巣癌細胞)およびSKBR3(乳癌細胞)において強力に発現されることを見出した。腫瘍細胞に対するNotchの発現を調べるために、本発明者らは、Notch1および対応するアイソタイプ対照に対する抗体を使用して、SK-OV-3、MCF7、およびSK-LMS-1悪性平滑筋肉腫を染色した。図2の結果(A~F)は、SK-OV-3およびMCF7がNotch1を発現するが、SK-LMS-IはNotch1を発現しないことを示す。

【0075】

本発明者らは、非活性化クローンの拡大を回避するために、低濃度のIL-2とともに卵巣腹水を培養した。図3は、腫瘍関連リンパ球(TAL)の増殖の反応速度論を示す。本発明者らは、CD8⁺Numb1-87-TCR⁺細胞が患者番号1からの培養腹水に存在することを見出しており、これは、Notch1-2112-TCR⁺、およびAES1-128-TCR⁺細胞よりも多い数であった(図4B~D)。Numb-TCR⁺CD8⁺細胞はパーフォリンを発現し、これは、これらの細胞がインビボで分化したことを示した(図4G)。パーフォリンの発現は、2つのシグナル:1つはTCRから、他方はIL-2から、によって成業されていることが言及されるべきである。あらゆる特異性のT細胞が、同じ量のIL-2中で培養されたので、本発明者らの結果は、パーフォリン発現の違いは、抗原による活性化に起因する。

【0076】

Notch1-TCR⁺細胞およびNumb-TCR⁺細胞が他の患者からの腹水に存在するか否かに取り組むために、本発明者らは、4例のさらなるHLA-A2⁺からの卵巣-TALを用いて実験を反復した。表3、および図5は、患者番号2、4、および5が、Notch1-2112TCR⁺、およびNumb1-87-TCR⁺CD8⁺細胞を含んでいたことを示す。Notch1-2112-TCR⁺、Numb1-87-TCR⁺細胞は、IL-2を用いる培養3週間後には、患者3からの培養腹水中でもはや検出されなかった(表3)。これは、これらの細胞が、他のT細胞集団の増殖のために、拡大しなかったかまたは希釈されたかのいずれかであることを示している。

【 0 0 7 7 】

【 表 3 】

表 III. 特異的 TCR の密度に基づく Notch1 および Numb1-TCR⁺CD8⁺ 集団

患者	TCR- 密度	HLA-A2:ペプチドについての% TCR ⁺ 細胞				
		NP	Notch1-1947	Notch1-2112	Numb1-87	
<hr/>						
	AES1					
1.	高	0.19	N.D.	0.26	0.64*	10
	0.19					
	中	0.27	N.D.	0.28	0.66*	
	0.23					
	低	0.43	N.D.	0.24	0.51	
2.	高	0.10	0.10	0.17	0.16	20
	N.D.					
	中	0.30	0.32	0.35	0.46	
	N.D.					
	低	0.85	0.99	2.09*	2.76*	
	N.D.					
3.	高	0.09	0.10	0.08	0.09	30
	N.D.					
	中	0.22	0.24	0.28	0.21	
	N.D.					
	低	0.51	0.65	0.43	0.50	
	N.D.					
4.	高	0.11	0.22	0.08	0.22	40
	N.D.					
	中	0.13	0.26	0.34*	0.26	
	N.D.					
	低	0.84	0.53	0.88	0.53	
	N.D.					
5.	高	0.11	0.14	0.17	0.27*	40
	N.D.					
	中	0.22	0.26	0.36	0.27	
	N.D.					
	低	1.98	1.98	2.52	1.84	
	N.D.					

(*) ベースライン対照 dNP と反応性である陽性細胞 % よりも有意に高く (2 倍)、特異性対照 Notch1 (1947) - TCR⁺ 細胞よりも高い。卵巣 TAL を、300 IU IL-2 を含む培地中で 1 週間培養した。

【 0 0 7 8 】

特異的 TCR の密度に基づいて CD8⁺ 集団を特徴付けするために、本発明者らは、TCR^高 細胞、TCR^中 細胞、および TCR^低 細胞の存在を調べた。図 5 D および H は、患者 2 における有意な数の Numb1-87-TCR^低 CD8⁺ 細胞の存在を、対照、ベースライン対照と相互作用した細胞、空の二量体 (dNP-TCR⁺ 細胞)、および陰性対

照、Notch1-1947ペプチドをパルスしたHLA-A2二量体を相互作用した細胞と比較して示す。Notch-2112-TCR⁺細胞の少しの増加もまた存在した(図5CおよびG)。これらの結果は、大きなプラストサイズの集団の中で、CD8⁺細胞の別個の分析において確認した(図5Gおよび5H)。大きなプラストサイズT細胞は、活性な細胞合成を有し、分裂するリンパ球である。同様の結果は患者5でも観察され、この患者における違いは、Numb1-87-TCR^高CD8⁺細胞は、対照のdNP-HLA-A2-IgG二量体と反応性である細胞よりも2.45倍多かった。Notch1-2112TCR^中細胞もまた、ベースライン対照、dNPと反応性である細胞よりも1.63倍多く存在した(表3)。患者4においては、本発明者らは、ベースライン、NP二量体と相互作用した細胞と比較して、2.61倍多いNotch1-2112-TCR^中細胞を見出した(表3)。これらの結果は、4例すべての卵巣患者からのすべての腹水が、Notch1-2112ペプチドおよび/またはNumb1-87ペプチドのTCRを有する細胞を含んだことを示す。

10

【0079】

それゆえに、ペプチドNotch1-2112およびNumb1-87は、インビボで産生されるのみならず、卵巣癌患者の腹水中でインビボでCD8⁺細胞を活性化する。

【0080】

考察：本研究において、本発明者らは、卵巣癌患者においてCD8⁺細胞についてのインビボで天然の免疫原である、NotchおよびNumbから候補ペプチドを同定した。候補ペプチドは、HLA-A2、HLA-A24、HLA-A33、およびHLA-Cw4分子へのそれらの結合モチーフに基づいて選択した。さらなるストリンジェンシーのパラメーターとして、本発明者らは、プロテオソームによって産生される候補天然免疫原性ペプチドを同定した。第3に、プロテオソームによって産生されると同定されたペプチドとして、本発明者らは「修復可能」ペプチドのみを選択した。「修復可能」ペプチドのみが、APC中で腫瘍Agの前駆体を送達するDNAおよびRNAベクターによって発現可能である。

20

【0081】

驚くべきことに、本発明者らは、各タンパク質からの非常に少ない天然の免疫原性ペプチド、およびHLA-A2と関連して提示される各々1つのみを見出した。天然に免疫原性であるペプチドは、新規かつ感度の高い方法によって同定した。本発明者らは、TA/ペプチド負荷したA2-IgG二量体を使用し、本発明者らは、ペプチドを負荷していない陰性対照二量体を用いる染色と比較することによって、卵巣TALの認識の特異性を決定した。これらのリンパ球の分化は、パーフォリンの発現および細胞あたりのパーフォリン(MFIとして)の量を測定することによって決定した。本発明者らは、5例の患者のうち2例が、Notch1-2112に特異的なTCRを発現するCD8⁺パーフォリン細胞を活性化し、5例のうち3例が、Notch1-87に特異的なTCRを発現するCD8⁺パーフォリン細胞を活性化したことを見出した。これらのCD8⁺細胞は、腫瘍を認識するT細胞の公知の低TCR密度よりも、より高密度のTCRを発現した。本発明者らの結果は、卵巣癌免疫治療のためのNotch1-2112ペプチドおよびNumb1-87ペプチドの使用を予測する。

30

40

【0082】

NotchおよびNumbは、卵巣癌のみならず、乳癌、膵臓癌、肝臓癌、胃癌、および結腸癌においてもまた発現される(5~7、37)。特異的免疫治療標的化により、これらの分子は、これらの抗原を発現する腫瘍の除去において有効であり得る。最近、NotchおよびNumbは、癌細胞の分化および転移の潜在能力を制御することが示された。NotchおよびNumbを標的とする免疫治療は、化学療法耐性であるのみならず、患者の死亡を迅速にもたらず肝臓および膵臓の癌の治療選択にすぐになるという可能性がある。

【0083】

本研究の結果はまた、HLA-A2系に向けた免疫原性TAの選択性を示す。HLA-

50

A 2スーパータイプには、HLA-A 2 (サブタイプ1~7)に加えて、HLA-A 68.2、およびHALL 69.1が含まれる。しかしながら、プロテオソーム性消化の結果がHLA-A 2サブタイプの親和性と比較された場合には、HLA-A 2.5のみが、HLA-A 2.1と同じペプチドを提示可能であった。HLA-A 2.5は、ヒト起源と関連して、祖先の対立遺伝子と見なされている。しかしながら、HLA-A 2.5によって提示可能であるNumb 1ペプチドは、癌に対する予防を付与しないようである。HLA-A 2.5およびHKA-A 24と関連するNotch 2ペプチドのみが、ある程度の予防を付与する可能性がある。次に、Notch 1がコーカサス人における予防のために有意であるのに対して、Notch 2は、何人かのアフリカ系米国人において癌の予防のために有意であるだろうか？

10

HLA-A 2.1とのNotch 1およびNumb 1の関連性は、コーカサス人およびヒスパニックにおける癌予防のために有意である可能性がある。次に、肝臓および膵臓の癌からの予防は、最初はNumb 1により、次にはNotch 1による、免疫学的監視の冗長性に起因するのだろうか？

HLA-A 24へのペプチド結合は、提示のためにネガティブに選択した。本発明者らは、HLA-A 24への潜在的な結合と、プロテオソーム消化による産生の両方として、10量体Notch 2 (1940-1949)のみを見出した。HLA-A 24と結合したNotch 1ペプチドおよびNumb 1ペプチドのいずれもポジティブに選択されなかった。HLA-A 24産物は、東南アジア人に高頻度でプレセットされており、特に、日本において最も高頻度である(38)。

20

【0084】

異なる民族的グループの中で癌の発生率には明確に違いがある。例えば、結腸直腸癌の発生率は、世界中で少なくとも25倍の変動が存在する。その最高の発生率は北米、オーストラリア/ニュージーランド、西ヨーロッパにおいてであり、男性では、とりわけ、日本においてであり(100,000人あたり49.3人)；発生率はアフリカおよびアジアで低い傾向があり(例えば、中国は男性で100,000人あたり15.6人)、南アメリカの南部地域では中間である。胃癌については、胃癌の地理学的分布は、国の間での広い変動によって特徴付けられ；高リスク地域には、東アジア(例えば、日本-年齢標準頻度62.1)、西ヨーロッパ、ならびに中南米の地域が含まれる。発生率は、男性では、南アジア、北部および東部アフリカ、北米(例えば、年齢標準頻度はわずか7.4)、ならびにオーストラリアおよびニュージーランドにおいて低い。膵臓癌はUSAおよび日本で最高であるのに対して(それぞれ、100,000人あたり11.8人および10.9人)、アフリカおよび中国では最低である(それぞれ、100,000人あたり2.1人および6.3人)。多くの要因、例えば、食事、環境、習慣(喫煙および飲酒の履歴)、および遺伝がこの変動に寄与している。免疫遺伝は、確かに、寄与している要因の1つであり得る(39)。

30

【0085】

このような要因には、食事の成分や、名目上同じ成分の食事においては、食事の中での代謝および組織再生の経路に干渉する化合物の存在が含まれる可能性がある。

【0086】

ペプチドワクチンを用いる、Notch 1およびNumbに対する免疫療法の開発は、急速に致死的な癌を発症する高いリスクを有する集団のために有用であり得る。

40

【0087】

Parkらは、Notch-3が卵巣癌において過剰発現されていると報告した(37)。本発明者らは、HLA-A 2分子に結合し、I型プロテアソーム酵素活性によって消化されるが、II型またはIII型によってはほとんど消化されないか、全く消化されない、6種のNotch-3ペプチドを見出した。Notch-3ペプチドは、癌免疫療法の良好な標的であり得る。

【0088】

(実施例2)

50

緒言

正常な発生の間に、幹細胞再生は、周囲の幹細胞環境からのシグナルによって調節される。幹細胞集団の拡大は、特定のニッチまたは期間が形成されるときに停止する。この事象は、転移性の形質転換を暗示しない。多数の両性腫瘍が同様の理由のために拡大可能であるからである。NotchおよびHedgehogなどの、正常細胞の自己再生を調節する経路の相互の影響の解明が進行中である(40)。

【0089】

癌細胞は、活性化発癌遺伝子(例えば、Ras、Bcr-Ablなど)とともに、調節解除されたNotchおよびHedgehogを含む。化学療法および放射線療法は衆生細胞を抹殺することが期待されているが、転移は、癌幹細胞(Cst-C)の特徴を有する腫瘍細胞が、化学療法および放射線療法に耐性である腫瘍細胞の集団の中に隠れていることを示唆している。癌細胞の増殖潜在性は、正常な幹細胞の能力と非常に類似している。この潜在能力は、対称的な細部分裂、およびアンカー非依存的な細胞増殖として説明できた(41)。発癌性Ras変異が蓄積する場合に、正常な幹細胞が悪性幹細胞(癌幹細胞)に変化する可能性がある(42)。

10

【0090】

膵臓癌は、世界中で5番目に多い癌である。その非常に高い死亡率の理由は、早期診断の手段が欠けていること、初期診断の時点で切除不能であること、および切除後の迅速な再発が含まれる。外科的切除は、局所的拡大および転移のために、膵臓癌細胞においては治療の選択肢であることはまれである。進行した膵臓癌を有する患者にとって、化学療法などの治療の選択肢は限られており、ゲムシタビン(GEM)が現在の標準的な治療である(43、44)。多くの臨床試験が組み合わせ化学療法を研究したが、進行した膵臓癌患者の予後の有意な改善を提供する戦略は同定されていない。新たな治療アプローチが必要とされている(45~49)。1つのブレイクスルー点は、化学療法に抵抗性があるCst-Cを標的とすることがかもしれない。

20

【0091】

細胞表面マーカーCD44およびCD24^減(CD24^低)の発現によって特徴付けられる乳癌細胞(BR-C)は、Cst-C機能的特性を有する(50)。CD44⁺CD24⁺ESA⁺膵臓癌細胞は、免疫不全マウスにおいて腫瘍を形成する。CD44は、Cst-Cのために重要であり得る。なぜなら、CD44のレベルは、転移の間の癌細胞のホーミングと関連したからである(52)。CD133(プロミン-1)の発現は、神経St-Cと脳Cst-Cの間を区別した(53)。CD133⁺結腸癌細胞は、CD133⁻細胞とは異なり、指数関数的に増殖した(54、55)。正常な前立腺幹細胞もまた、CD133を発現するが、しかしながら、CD44⁺/2^{1高}/CD133⁺表現型を有するCD133は、Cst-C特性を有する(56)。

30

【0092】

これらの知見は、化学療法剤がCst-Cマーカーを発現する細胞を抹殺するかという疑問を惹起した。本発明者らは、GEMが、PC、BR-C、および上皮卵巣癌(BOVC)系統において、CD44⁺CD133⁺、およびCD24^低CD133⁺細胞をポジティブに選択することを見出した。GEM耐性(GEM^{耐性})PC、MIA-PaCa-2は、NECDおよびNICDの発現において、GEM^{耐性}BR-C、MCF7とは異なっていた。GEM^{耐性}細胞のDLL4活性化は、含まれる培地よりも、CD44⁺CD24^低細胞の2~3倍高い拡大を生じた。Notch⁺およびCD44⁺CD24^低細胞は、NotchおよびNumbペプチド活性化PBMCによって、およびより少ない程度では、IL-2活性化PBMCによって抹殺された。

40

【0093】

材料と方法

細胞株および材料。ヒト癌細胞株PC(MIA-PaCa-2、PANC-1、およびAsPC-1)、BR-C細胞株(MCF7)、卵巣癌(SKOV-3)は、アメリカンタイプカルチャーコレクション(American Type Culture Col

50

lection) (ATCC; Manassas, VA) から購入した。すべての細胞は、10%ウシ胎仔血清 (FCS)、100 U/L ペニシリン、および 100 μg/mL ストレプトマイシンを補充した RPMI 1640 培地中で、95% 加湿空気および 5% 二酸化炭素、37 °C で培養した。

【0094】

試薬は以下の通り購入した：塩酸ゲムシタピン (ゲムザール (Gemzar) (登録商標、Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN)、パクリタキセル (タキソール (Taxol) (登録商標、Bristol-Myers Squibb Co., Princeton, NJ)、5-フルオロウラシル (5-FU、Sigma, Saint Louis, MO)、フルオレセイン イソチオシアネート (FITC) 結合体化マウス抗ヒト上皮特異的抗原 (ESA) モノクローナル抗体 (Biomed, Foster City, CA)、アロフィコシアニン (APC) 結合体化マウス抗 CD44 モノクローナル抗体 (BD Pharmingen, San Diego, CA)、FITC 結合体化マウス抗 CD44 モノクローナル抗体 (BD Pharmingen, San Diego, CA)、R-フィコエリトリン (R-PE) 結合体化マウス抗 CD24 モノクローナル抗体 (BD Pharmingen, San Diego, CA)、FITC 結合体化マウス抗 CD24 モノクローナル抗体 (Abeam Inc., Cambridge, MA)、PE 結合体化マウス抗 MICA/B 抗体 (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN)、APC 結合体化マウス抗 CD133/2 抗体 (Miltenyi Biotec Inc., Auburn, CA) および組換えヒトデルタ様タンパク質 4 (DLL4) (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN)。

10

20

【0095】

抗癌薬物による腫瘍細胞株の増殖の阻害。IC50 は、本発明者らに記載したように、GEM、PTX、および FU との 72 時間の曝露後に、古典的な 3-(4,5-ジメチルトリアゾリル)-2,5-ジフェニル-テトラゾリウムプロミド (MTT) アッセイによって決定した (73)。

【0096】

フローサイトメトリー分析。すべての細胞は、Gem とともに、2 × IC50 ゲムシタピンで、10 日間培養した。培養細胞 (2 × 10⁵) を冷 PBS 中で洗浄し、続いて、20 μL の 1 mg/mL ヒト IgG (Sigma, Saint Louis, MO) で、氷上にて 1 時間ブロッキングした。この工程は、染色の間に免疫グロブリンの非特異的結合を阻害するために必要であった。次いで、細胞を、ESA、CD44、および CD24 に対する抗体で三重染色した。分析は、Becton Dickinson FACSCalibur および Cell Quest ソフトウェア (Becton Dickinson) を用いて実施した。細胞を ESA + 集団でゲートした。CD24 および CD44 の発現をゲートした ESA + 細胞中で本発明者らに記載したように試験した (26)。ESA +、CD44^高、および CD24^低 / - 細胞の集団は、全細胞および全 ESA + 細胞のパーセントとして計算した。すべての細胞株もまた、MICA/B および CD133 で染色し、上記のように分析した。他の実験において、MICA/B および MCF7 は、2 倍 IC50 濃度の GEM、PTX、または FU とともに、続いて、0.7 倍 IC50 濃度で 3 日間で培養し、上記のように染色および分析した。

30

40

【0097】

DLL4 による GEM Res MCF7 の刺激。GEM Res MCF7 は、0.3 μM GEM で 7 週間の培養後に得た。MCF7 は、DLL4 の存在下または非存在下で、エストラジオール、線維芽細胞増殖因子を含む培地中で 24 時間刺激した (40)。

【0098】

Notch および Numb ペプチドを用いる HLA-A2 PBMC の刺激。天然の免疫原性 Notch NICD (2112-2120) および Numb 1-PTB ドメイン ペプチド (87-95) を、本発明者らが記載したように同定した (Ishiyama

50

2007)。非接着PBMCは、本発明者らが記載したように、ペプチドパルスした自系未熟DCを用いて活性化した(26)。

【0099】

ウェスタンブロット分析。生MIA-PaCa-2、MCF7、およびSKOV-3の細胞溶解物を、培養物のトリプシン処理後に、本発明者らが記載したように(74)調製した。この手順は、死滅した細胞および死滅しかけた細胞を除外する。細胞タンパク質は、SDS-PAGEによって分離し、ポリビニリデンジフルオリドメンブレンに移した。免疫ブロッティングおよび定量を、本発明者らが記載したように実施した(74)。

【0100】

結果

PC系統Mia-PaCa-2およびPANC-1の薬物感受性は、BR-C系統MCF7のそれと同様である。抗癌薬物耐性細胞を選択するために、本発明者らは、PC系統MIA-PaCa-2、PANC-1、AsPC-1；BR-C系統、MCF7；およびEOVC系統に対するGEM、5-フルオロウラシル(5-FU)、およびパクリタキセル(PTX)の細胞毒性を定量した。3種すべての薬物が癌治療のために有効であった。GEMは、フェーズIII臨床試験において、5-FUよりも、PCに対して少し良好な臨床的利点を提供する(44、45)。PTXもまた、PCに対して試されたがしかしながら、GEMと比較して、改善を示さなかった。

10

【0101】

表1は、72時間で50%細胞増殖を阻害した薬物濃度(IC₅₀)を示す。IC₅₀の最も広い分散は、800(PANC-1)~15,200nM(AsPC-1)の範囲である5-FUについて見出された。PTXのIC₅₀は3.9~18.3nMの狭い範囲であった。多くのPTX耐性AsPC-1のIC₅₀は、多くのPTX感受性PANC-1のそれよりも4倍より大きかった。Mia-PaCa-2、PANC-1、およびMCF7は、GEMに対して同様の高い耐性を示し、それぞれ、300、350、および430nMのIC₅₀であった。AsPC-1およびSKOV-3は、GEM感受性(GEM感受性)であり、20nMでIC₅₀であった。それゆえに、Mia-PaCa-2、PANC-1、およびMCF7において、3種の薬物のIC₅₀は同様であった。

20

【0102】

【表 4 - 1】

表 I.

A. ゲムシタビン、5-フルオロウラシル、およびパクリタキセルの IC_{50}

細胞株	IC_{50} (nM)		
	GEM	5-FU	PTX
MIA-PaCa-2	300	3,700	5.3
PANC-1	350	800	3.9
AsPC-1	20	15,200	18.3
MCF7	430	1,300	4.5
SKOV-3	16	3,600	4.7

10

B. 化学療法薬物との培養後の乳癌CStCマーカーの発現

細胞株	以下で 処理	% ESA ⁺	ESA ⁺ 細胞中の % CD44 ^高 CD24			% CSt- 様-C
			CD24 ⁺	CD24 ^低	CD24 ^高	
MIA- PaCa-2	NT	24.0	0.5	41.4	10.7	9.9
	GEM	39.5	1.1	43.2	12.2	<u>17.0</u>
	PTX	33.2	1.0	23.1	21.2	7.7
	5-FU	83.0	0.2	19.8	7.1	<u>16.4</u>
PANC- 1	NT	50.8	49.9	35.5	11.3	18.1
	GEM	76.7	8.6	50.0	9.7	<u>38.3</u>
AsPC- 1	NT	98.4	25.3	56.4	17.8	55.5
	GEM	98.9	19.3	58.2	20.1	57.6
MCF7	NT	98.2	0.0	1.3	15.6	1.3
	GEM	95.4	0.3	6.3	10.2	<u>6.3</u>
SKOV- 3	NT	99.7	0.0	4.6	95.1	4.6
	GEM	97.5	0.1	51.5	46.0	<u>50.2</u>

20

30

40

【 0 1 0 3 】

【表 4 - 2】

C. NotchリガントDLL4はMCF7細胞の増殖を活性化する

処理	播種した 細胞:10 ⁶	収集した 細胞:10 ⁶	刺激指数	CD44 ^高 CD24 ^低	CD44 ^高 CD24 ^低 比率
NT	3.0	12.96	4.32	0.52 x10 ⁶ (4.0%)	3.89 (30.0%)= 7
DLL4	3.0	*18.80	6.27	0.66 x10 ⁶ (3.5%)	6.84 (36.4%)= 10
GEM	3.0	1.32	0.44	0.09 x10 ⁶ (7.1%)	0.26 (19.7%)= 2
DLL4 GEM	3.0	*2.16	0.72	0.14 x10 ⁶ (6.7%)	0.41 (19.1%)= 2

10

20

40

* D L L 4 での刺激の際に総細胞数の 4 5 % < 増加。 * * ゲムシタピンなしと比較して、ゲムシタピンを用いる選択後に、B R - C S t - C の集団の 2 . 7 ~ 2 . 8 倍の増加
【 0 1 0 4 】

【表 5】

表 -2. 細胞株中の抗原発現

細胞株	HER-2* 密度 (MFI)	Gli-1 (%) 陽性細胞	Gli-2 (%) 陽性細胞	HLA-A2
MIA-PaCa-2	2+ (75.4)	91.9	37.1	+
PANC-1	1+ (29.3)	43.9	15.9	+
AsPC-1	1+ (33.4)	74.	5.7	+
MCF7	3+ (1063.5)	13.2	8.1	+
SKOV-3	2+ (100.5)	69.9	24.8	+

30

50

E S A + C D 4 4 + C D 2 4 ^低、C D 4 4 + C D 1 3 3 + および C D 2 4 ^低 C D 1 3 3 + 細胞は、薬物に対する P C、B R - C、および E O V C の耐性を増加した。乳房腫瘍からの E S A + C D 4 4 ^高 C D 2 4 ^低 細胞は、C S t - C の機能的特徴を有している (5 0)。脳腫瘍、前立腺癌、および結腸癌からの C D 1 3 3 + 細胞は、C S t - C であると思なされている (5 3 ~ 5 6)。抗癌薬物が C S t - C 表現型を有する集団を増加させるという仮説に取り組むために、本発明者らは、G E M の存在下または非存在下で培養した P C 系統上でのこれらのマーカーの発現を試験した。表 1 C ならびに図 6 および 7 A、B は、E S A の発現が、M I A - P a C a - 2 および P A N C - 1 を除いた癌系統の大部分に

において高かったことを示す。E S A⁺細胞はG E M耐性細胞を増加した。E S A⁺ C D 4^高 C D 2 4^低 集団は、A s P C - 1を除いたすべてのG E M耐性細胞において増加した。

【0105】

E S A⁺ C D 4 4^高 C D 2 4^低 およびC D 1 3 3⁺ 集団は、M i a - P a C a - 2、P A N C - 1、M C F 7、およびS K O V 3における全体の集団と比較して、3 ~ 5倍、G E M耐性集団を増加したが、A s P C - 1においては増加しなかった(図8A)。G E Mとともに培養した生M I A - P a C a - 2細胞の形態学的外見は、円形から、紡錘型または長い触手を有する細胞に変化した(図10A、B)。これらの外見は、ヒト膵臓幹細胞の型と類似であった(57)。

10

【0106】

E S A⁺ C D 4 4^高 C D 2 4^低 集団は、G E M耐性M i a - P a C a - 2およびM C F 7で増加したので、本発明者らは、他の化学療法剤が同様の効果を有したか否かを調べた。C S t - C 集団は、G E Mおよび5 - F Uで処理されたM I A - P a C a - 2において増加したが、P T X処理では増加しなかった(図7A)。例えば、 3.0×10^6 M i a - P a C a - 2細胞から開始し、1.3、3.3、3.4、および 8.1×10^6 細胞を、G E M、P T X、5 - F U、および薬物なしでそれぞれ収集した。0.6、0.4、1.6、および 8.7×10^6 M C F - 7を、それぞれ、G E M、P T X、5 - F U、および薬物なしで、 3×10^6 M C F - 7細胞の培養後に収集した。G E Mおよび5 - F Uは、M C F 7とM i a - P a C a - 2の両方においてC S t - 様 - C 集団増加したが、P T XはM C F 7中のそれを増加した(図7B)。

20

【0107】

化学療法薬物は、薬物耐性細胞中でN K G 2 Dリガンドを発現する集団を増加する。

【0108】

薬物耐性癌細胞は、細胞免疫エフェクターに対してより感受性があるという仮説に取り組むために、本発明者らは、N K G 2 Dリガンド、M I C - Aおよび - Bの発現を定量した(58、59)。E S A⁺ M I A - P a C a - 2細胞を、M I C - A / Bについて分析した。M C F 7細胞は、C D 4 4、C D 2 4、およびM I C - A / Bを用いて分析した(図7B)。なぜなら、ほぼすべての(95%以上)M C F 7細胞がE S Aを発現したからである。

30

【0109】

M I C - A / Bは、未処理M I A - P a C a - 2の28.9%で存在した。G E M耐性および5 - F U耐性M i a - P a C a - 2細胞は、3倍より多く、M I C - A / Bの発現を有意に増加した(図7A)。多くのE S A⁺ M I A - P a C a - 2細胞は、M I C - A / Bを豊富に発現した。C S t - 様 - Cは、あらゆる抗癌薬物に対して耐性であるM C F 7の完全な集団の中で増加した。しかしながら、M I C - A / Bの発現は、C D 4 4およびC D 2 4の発現と関連しなかった。

【0110】

ゲムシタピンは、より高いN E C Dを有するM C F 1細胞、およびより高いN I C Dを有するM I A - P a C a - 2を選択する。N o t c hシグナル伝達は、正常な関西部の生存および増殖を促進する。N o t c hシグナルは、短縮型細胞内ドメイン(N I C D)によって媒介され、これは、核における転写を活性化する。N u m bは、N o t c hの分解を誘導することによってN o t c hシグナル伝達と拮抗する(60、13)。哺乳動物N u m bは4種のスプライシングアイソフォームを有し、これらは、C末端のプロリンリッチ領域(P R R)における49アミノ酸挿入(5 k D a)の存在または非存在に基づいて、2つの型(N u m b^LおよびN u m b^S)に分けられる。N u m b^LまたはN u m b^SがN o t c hの顕著なアンタゴニストであるか否かは不明である。N o t c hおよびN u m bタンパク質の発現を特徴付けするために、本発明者らは、G E Mのあるなしで培養した生M I A - P a C a - 2およびM C F 7の溶解物中でのタンパク質の定量的免疫ブロット分析を実施した(図9)。

40

50

【0111】

GEM感受性細胞と比較して、Notch細胞外ドメイン(NECD)発現は、GEM耐性MIA-PaCa-2において18%、およびMCF7において73%増加した。対照的に、MIA-PaCa-2(35%)においてはわずかに増加したが、MCF7においては39%減少した。Numb^L発現は、GEM耐性MIA-PaCa-2において50%増加したが、GEM耐性MCF7において29%減少した。対照的に、Numb^Sは、GEM耐性MIA-PaCa-2とMCF7の両方において18%減少した。結果は、GEM耐性MIA-PaCa-2細胞が機能的なNICD量を有意に増加したのに対して、MCF7は、Numb^Lの同時の減少とともにNECDを増加した。本発明者らの結果は、GEM耐性MCF7のNotchリガンドに対する感受性は、GEM耐性MIA-PaCa-2のそれよりも高いことを示す。

10

【0112】

GEM耐性におけるDLL4によるNotchシグナル伝達の活性化はCst-Cを増加させる。デルタ様タンパク質4(DLL4)は、Notch受容体の内皮性活性化リガンドである(61、62)。多くの(>90%)のGEM耐性MCF7細胞はG1(休止)期にあった。これらの実際の細胞数は時間とともに減少した。本発明者らは、可溶性DLL4を用いて、GEM耐性MCF7においてNotchシグナル伝達を活性化した。DLL4は、GEMの非存在下および存在下で増殖を活性化した。DLL4+GEMは、DLL4単独と比較して、Cst-C集団をほぼ3倍、選択的に拡大した(表1C)。多数のDLL4拡大細胞は、CD44^低CD24^低およびCD24^高表現型であった(図8B)。このような細胞は、これらの接着が乏しいので、高い転移の潜在性があると記載されてきた(63)。

20

【0113】

NotchおよびNumbペプチド活性化PBMCは、CD44^高CD24^低およびNotch⁺細胞を抹殺する。MCF7がMIC-A/B、Notch、およびNumbタンパク質を発現するという知見は、MCF7がIL-2活性化末梢血単核細胞(PBMC)ならびにNotchおよびNumbペプチド活性化PBMCに対して感受性があるか否かという疑問を惹起した。データ(示さず)は、MCF7を有する健常HLA-A2一致ドナーからの、IL-2活性化PBMCを用いる免疫選択が、NICD⁺MCF7細胞の数を36%減少したことを示す。Notch¹₁₂¹₂-²₁²₀ペプチド活性化PBMCは、NICD⁺細胞の数を50%減少したのに対し、Numb⁸₇-⁹₅ペプチド刺激PBMCは、IL-2活性化PBMCと同様の非特異的効果を媒介した。それゆえに、ペプチド活性化PBMCの一部は、HLA-2によって提示されるNotch-NICD領域からのペプチドを認識した。

30

【0114】

活性化PBMCがCst-Cの拡大を阻害したか否かを同定するために、本発明者らは、同じ活性化PBMCとともに、GEM耐性およびGEM感受性MCF7を同時培養した。データ(示さず)は、MCF7細胞が、IL-2活性化されかつNotch-¹₂¹₂-²₁²₀+IL-2活性化PBMCとの同時培養の間に、数が減少しなかったことを示す。Numb⁸₇-⁹₅+IL-2活性化PBMCは、IL-2-PBMCと比較して、MCF7およびCD44^高CD24^低MCF7の数を有意に減少した。

40

【0115】

GEM耐性MCF7が同じ免疫エフェクターに対して感受性があったか否かに取り組むために、本発明者らは実験を反復した。データ(示さず)は、GEM耐性細胞がゆっくりと増殖し、5日間で50%のみ数が増加したことを示す。免疫エフェクターとの同時培養は、MCF7増殖を完全に阻害した。対照的に、CD44^高CD24^低細胞は非常にゆっくりと増殖し、これらは、免疫エフェクターの非存在下では、53,000細胞~60,000細胞まで増加し、IL-2活性化およびIL-2プラスペプチド活性化PBMCを用いる免疫選択後には、非選択GEM耐性MCF7と比較して、2倍より多く数が有意に減少した。IL-2活性化またはペプチド活性化PBMCとの同時培養後に、GEM耐性

50

MCF7の生存の有意な違いはなかった。

【0116】

結果は、GEM耐性MCF7上でのMIC-A/B発現の増加と一貫している。活性化NKおよびCTLなどの細胞免疫エフェクター上のNKGD2受容体は、MIC-A/Bの認識によって、腫瘍の抹殺の効率を増幅する(59)。しかしながら、MCF7とMIA-Paca-2の両方のGEM耐性細胞は、MIC-A/B発現を増加し、天然の免疫単独が、それを発現しないいくつかの細胞を放置した。

【0117】

非特異的細胞性免疫はGEM耐性細胞に対して有効であるが、CSt-様-Cは脱出し得る。なぜなら、MIC-A/Bは、特に、CSt-様-C上で発現されなかったからである。CSt-様-Cを含むGEM耐性細胞は、G1停止を維持および克服するためにNotchシグナル伝達を必要とする。Notch-1²¹¹²-2¹²⁰活性化PBMCはNotch⁺細胞を除去可能である。本発明者らの結果は、CSt-様-Cに対するGEMをとりわけ含む化学療法後に、後天的な特異的かつ天然の免疫治療の見通しを支持する。

【0118】

考察

本発明者らは、いくつかのPC系統、MIA-Paca-2、PANC-1、およびASPC-1が、胸部-CSt-C表現型を有する顕著な集団を含んだことを見出した。加えて、試験したすべての系統が、結腸-CSt-Cマーカーを発現する顕著なサイズの集団を含んだ。膵臓-CSt-様-Cの表現型特徴付けは、陽性対照胸部MCF7と同時に実施した。機能的タンパク質は、しばしば、それらの組織起源とは独立して、癌細胞の特異的な特徴を提供する。

【0119】

試験したすべての細胞株の中でGEMに対して最も感受性があったASPC-1は、BR-CSt-C表現型(ESA⁺CD44^高CD24^低)の大きな集団および結腸-CSt-C表現型の小さな集団を含んだ。この表現型を有する細胞の大きな数の理由は不明である。ASPC-1が腹水から単離されたので、これはCSt-C細胞から生じ、これが腹膜後器官から腹水に侵入しかつ浮遊したという可能性があるかもしれない。

【0120】

CSt-C表現型を有する集団は、GEMまたは5-FUを用いる処理によってMIA-Paca-2において増加したが、PTXでは増加しなかった。しかしながら、CSt-Cの集団はASPC-1中では同じままであり、GEMを用いる処理には増加しなかった。この変化の欠如は、GEMのIC₅₀とは相関しなかった。本発明者らの結果は、膵臓CSt-Cが維持のために独特な経路を使用することを示した。

【0121】

GEMおよび5-FUはDNA合成の阻害剤であり、これはG0/G1およびS期での停止を誘導し、腫瘍細胞中でアポトーシスを誘発する(64、65)。PTX阻害剤は、細胞周期のG2およびM期において遮断することによって細胞分裂を阻害し、細胞質微小管を安定化する。しかしながら、G1で静止している癌細胞はGEMおよび5-FUで生き残る。なぜなら、これらの核酸合成は最小限であるからである。対照的に、PTXは、紡錘体の位置に干渉でき、対称的な細胞分裂を生じる。Numb局在化は、非対称的な細胞分裂を生じる。PTXは、CSt-Cの有糸分裂段階において、対称と非対称の両方の細胞分裂を停止できる。その後、CSt-Cは生き残り、薬物の分解後に拡大を開始する。Notch受容体は、3種のデルタの膜貫通リガンド(DLL1、2、および4)ならびに2種のSerrate(Jagged-1および2)リガンドによって活性化される(65)。DLL4によるNotch活性化は、血管形成の活性化のために顕著であると最近報告された(61、62)。Notchの過剰発現はNumb発現と拮抗し、Numb機能を抑制する(14)。それゆえに、DLL4は、CSt-様-Cの対称的な細胞分裂および迅速な拡大をブーストする。

10

20

30

40

50

【0122】

このプロセスにおけるGEMの役割は何であろうか？GEMおよび5-FUはDNAおよびRNA合成の阻害剤であり、これは、新たに合成される鎖に取り込まれる。GEMおよび5-FUはG1期の細胞には影響を与えなかった(64、66)。PTXは、微小管を安定化することによって、G₂M期をブロックする。G1で静止している癌細胞は、GEM、5-FU、およびPTXで生き残る。なぜなら、これらの核酸合成は最小限であるからである。PTXは、紡錘体の位置に干渉でき、対称的な細胞分裂を生じる(67、68)。Numb局在化は、非対称的な細胞分裂を生じる(69)。その後、CSt-Cは生き残り、薬物の分解後に拡大を開始する。Notch受容体は、3種のデルタの膜貫通リガンド(DLL1、2、および4)ならびに2種のSerrate(Jagged-1および2)リガンドによって活性化されるときに、独特なシグナルを明らかに伝達する。Notchリガンドが刺激細胞においてNECDのエンドサイトーシスを誘導することが最近報告された(70)。本発明で使用されるDLL4などの可溶性リガンドは、別の研究後に、CS-Cの増殖を活性化する際に有効性が少ないはずである(70)。

10

【0123】

GEM耐性MCF7およびMIA-Paca-2は、NECD、NICD、およびNumb^Lの密度が異なっており、MCF7は、MIA-Paca-2よりもNECDの密度を増加していた。MCF7はNICDを減少したのに対して、MIA-Paca-2はNICDを増加した。MCF7がNotch受容体の密度を増加させることによって応答するためのそれらの「周到さ」を増加させるのに対して、MIA-Paca-2は、薬物が除去されるときに転写を活性化させるためにより多くのNICDを「準備中」に保持すると提案することは魅力的である。Numb^Lの減少は「応答準備仮説」と一致している。CSt-CはGEM耐性細胞中では少数派(<30%)であったので、NotchおよびNumb活性化のメカニズムおよび経路を同定するために将来の研究が必要とされている。

20

【0124】

本発明者らは、これらの細胞がどのようにして除去できるかを研究した。本発明者らの最初の顕著な知見は、GEM耐性細胞が、NKGD2リガンド、MIC-AおよびBの発現を増加したことである。MIC-A/Bの発現の増加は、NKおよびCTLおよびサイトカイン活性化リンパ球に対する癌細胞の感受性を増加させるはずである。この知見は、PCにおける腫瘍抗原ワクチンの有効性に対する最近の知見を支持するための理論的根拠を提供する(71)。

30

【0125】

本発明者らの2番目の顕著な知見は、NotchおよびNumbそれ自身が、Notch-NICDおよびNumbペプチドに特異的であるCTLによって標的化可能であることである。NICDペプチドは、シグナル伝達後に分解されたNICDから生じる。Numbペプチドは、Numbリン酸化後に生成する。このシナリオにおいて、GEM耐性腫瘍は、Numbが分解され、CS-C増殖が活性化されるときに、CTLのための標的となる。さらに、NICDは、癌細胞が「応答準備」状態にある場合、CTLのための良好な標的になる。両方の系統におけるNumbの観察された減少、およびMCF7におけるNICDの減少は、これらの試みが化学療法直後に有効であることを示唆する。CSt-Cは、照射(72)および化学療法(本研究)に対して抵抗性があることが最近報告された。自系の腫瘍抗原活性化TおよびNK細胞を用いる、進行した膵臓癌を有する患者の輸液は、このような患者の生存を延長する可能性がある。

40

【0126】

(実施例3：ヒト固形腫瘍における癌幹細胞様細胞(CSt-C))

幹細胞(St-C)は、自己再生能力と、多方向に分化する能力の両方を有する細胞である。幹細胞は、器官の生成および初期発生において必要とされるが、しかしまた、種々の組織の傷害または炎症性損傷の修復および維持の間にも必要とされる。

【0127】

ある種の遺伝子、例えば、RASの中での変異は、完全な癌表現型を有する細胞を付与

50

するために十分である。癌幹細胞 (CSt-C) は、原癌遺伝子における変異の蓄積から生じる。C-St-Cs は、自己再生が可能であり、インビボで腫瘍増殖を持続し、自己再生的分化の能力を有する、生物学的に区別できるクローンを表す。C-St-Cs は、血液癌、ならびに乳癌、脳腫瘍、前立腺癌、および結腸癌などの固形腫瘍において同定された。C-St-Cs は、放射線および多剤耐性ならびにアンカー非依存性増殖などの典型的な悪性の特徴をほとんどすべて有する。従って、古典的な治療様式は、これらの細胞を抹殺するのではなく、C-St-Cs のための栄養素が豊富なニッチを作製することである。分子標的治療の新たなストラテジーが必要である。本実施例において、本発明者は、C-St-Cs の抹殺のための適切な標的に焦点を当てる。

【0128】

10

幹細胞および癌発生の対称型 / 非対称型分裂

St-C は2つの型の分裂、対称型および非対称型を有する。親の St-C の対称型細胞分裂は、親の St-C と同じ能力を有する2つの娘細胞 St-C を生じ、St-C の数を増加する。非対称細胞分裂は、1つの同一の娘細胞 (自己再生) および分化する1つの娘細胞を生じる。非対称分裂は、細胞内および細胞外のメカニズムによって調節される。最初に、細胞の運命を決定する細胞の構成要素の非対称的分割を決定する。外部要因が、微小環境に対して、娘細胞の非対称的配置を媒介する (St-C ニッチおよびシグナルに対する曝露)。

【0129】

発生の間に観察される対称的 St-C 分裂もまた、創傷治癒および再生の間に一般的である。St-C は、胚性または初期胎児発生の間に、未分化娘細胞の St-C プールを拡大するために対称的分裂を受ける。対称的 St-C 分裂はまた、成体においても観察された。Drosophila の卵巣において、成体生殖系幹細胞は、非対称的に分裂して、ニッチの中に幹細胞の運命を有する1つの娘細胞を保持し、他方を分化させるためにニッチの外部に配置する。しかしながら、雌性生殖系は St-C は、対称的に分裂させるため、および実験操作後にさらなる St-C を再生させるために誘導することができ、ここで、1つの St-C がニッチから取り出される。

20

【0130】

哺乳動物幹細胞もまた、対称型と非対称型の細胞分裂の間でスイッチを切り換えている。神経と上皮の両方の前駆細胞は、胚性発生の間に St-C プールを拡大する主として対称的な分裂から、中期から後期の妊娠期間において分化した細胞数を拡大する主として非対称型分裂まで変化する。対称型 St-C 自己再生および拡大は、発生の柔軟性および生成の増強を付与する。しかしながら、St-C 自己再生はまた、癌の固有のリスクを含む。Drosophila 神経芽細胞は、以下の非対称型局在の結果として非対称的に分裂する：(i) 皮質細胞極性決定基 (例えば、Partner of Inscuteable (PINS) および非定型プロテインキナーゼ C (a-PKC))、(ii) 細胞運命の決定因子 (例えば、Numb および Prospero)、および (iii) 紡錘系の規則的な整列。非対称分裂を調節する機構が破壊される場合には、神経芽細胞は対称的に分裂し、腫瘍を形成する。

30

【0131】

PINS を欠く細胞クローンは腫瘍形成性である。PINS と致死性巨大幼虫因子 (LGL) の両方を欠く二重変異体細胞は、大部分が対称的分裂であり、かつ自己再生する神経芽細胞からなる脳を生成する。細胞の運命の決定因子である Numb または Prospero を欠く細胞クローンもまた腫瘍形成性であり、移植後に新たな宿主に増殖可能である。これらの腫瘍細胞は、対称様式の分裂を採用する40日間で異数体になることが示されてきた。それゆえに、対称的に分裂する能力は、新生物形質転換のための必須条件であり得る。癌は、少なくとも部分的に、対称様式の細胞分裂を採用する能力を反映し得る。

40

【0132】

非対称細胞分裂を促進する機構は、腫瘍抑制において進化の過程で保存された役割を有する。大腸腺腫様ポリポーシス (adenomatous polyposis col

50

i) (APC) 遺伝子は、*Drosophila* 精原幹細胞の非対称分裂のために必要であり、哺乳動物腸管上皮における重要な腫瘍抑制因子である。APCが腸管上皮におけるSt-Cによる非対称分裂を調節しているか否かは不明であるが、結腸直腸癌は、腸管上皮St-Cのものと顕著に類似している特性を有する。LGLのヒトホモログ、HUGL-1もまた、癌において頻りに欠失されており、マウスにおける対応する遺伝子の欠失は、中枢神経系における極性および異形成の損失に導く。Numbの損失は、乳癌において観察されるNotch経路のシグナル伝達の活性化過剰に関与し得る。これらの遺伝子産物は、細胞の極性に対するそれらの効果とは独立している種々のメカニズムを通して腫瘍形成を阻害することができるが、これらの遺伝子が一貫的に腫瘍抑制因子として機能するという事実は、非対称分裂それ自体が癌に対して防御し得ることを示唆する。

10

【0133】

対称型細胞分裂と癌の間の連関についてのさらなる証拠は、ある遺伝子産物が、哺乳動物細胞中で、対称型細胞分裂を誘導することと、発癌遺伝子として機能することの両方が可能であるという観察である。aPKCは、通常、PAR3/6-aPKC複合体の一部として、神経芽細胞の頂端皮質に局在する。aPKCの構成的に活性な改変体の神経特異的発現は、対称的に分裂している神経芽細胞の大きな増加を引き起こす。*Drosophila*における腫瘍発生性の潜在能力と一致して、aPKCはまた、ヒト肺癌における発癌遺伝子として同定されてきた。従って、非対称型分裂は、発癌を抑制する可能性がある。非対称型分裂に切り換えるためのSt-Cの調節は、癌の進行を抑制する可能性がある。

20

【0134】

NotchおよびNumbは対称型/非対称型の分裂において重要な役割を果たしている

Notchは、核における転写活性化に直接的に関与する細胞内ドメイン(NICD)を切断後に遊離する膜貫通受容体をコードしている。Notch活性化は、細胞質シグナルの迅速な活性化を通して、その特異的標的遺伝子: hairyおよびsplit 3のエンハンサー(Hes3)ならびにソニックヘッジホッグ(Sonic hedgehog)(Shh)の発現の誘導によって、神経St-Cの生存を促進する。Notchリガンド、デルタ様4(DLL4)は細胞死を迅速に阻害する。Notchリガンドに曝露された細胞は、Notchリガンドへの曝露の延長後、ニューロン、星状細胞、および突起細胞を生成する潜在能力を保持する。DLL4によって分裂されるように刺激された細胞は、未成熟状態の正常脳の柔組織中で長時間生存し、プロ生存分子のアップレギュレーションを示唆する。

30

【0135】

NotchアンタゴニストNumbは、Notchの量を減少し、Notchシグナルへの娘細胞の応答を修飾する(Notch^高細胞はシグナルを受容し、隣接細胞にそのシグナルを伝達できるのに対し、Notch^低細胞はNotchシグナルを受容することのみができる)。Notchシグナル伝達の阻害は、哺乳動物の非対称型分裂の調節に関与しているようである。齧歯類皮質の発生における未分化の神経前駆細胞は、神経発生のために運命付けられた前駆体に、Numbを非対称的に分配する。従って、筋細胞におけるNumbの非対称的分離は、制御の一般的な様式であり得る。神経芽細胞の非対称型分裂からの層間剥離の間、Numbおよびいくつかの他のタンパク質は、固有の決定因子として、基底皮質半月(crescent)に同時局在化される。これらのタンパク質は、基底娘細胞またはグングリオン母細胞に分割され、これらは、1回以上分裂し、2つのニューロンまたはニューロンおよびグリア細胞を生じる。タンパク質が分割される頂端娘細胞は、神経芽細胞の特性を維持しており、数回のさらなる細胞分裂のラウンドを受けることが可能である。

40

【0136】

N末端ホスホチロシン結合(PTB)ドメインは、膜にNumbを補充する。Numb-PTBドメインは、NIP(Numb相互作用タンパク質)と特異的に相互作用し

50

、これは、細胞質ゾルから、原形質膜までNum bを補充する固有の膜タンパク質である。Num b - P T Bドメインはまた、ユビキチン化およびmNum bの分解のためのE3リガーゼとして働くLN X (Num b Xのリガンド)と相互作用し得る。哺乳動物Num b (mNum b)は4つのスプライシングアイソフォームを有する。これらは、C末端のプロリンリッチ領域 (P R R)における50アミノ酸挿入物の存在または非存在に基づいて2つの型に分けられる。長いP R Rドメインを有するヒトアイソフォーム (Num b - P R R^L)は、中枢神経系 (C N S)における初期の神経発生の際の分化に影響を与えることなく、細胞の増殖を促進する。短いP R Rドメインを有するアイソフォーム (Num b - P R R^S)は、幹細胞の増殖を阻害し、ニューロンの分化を促進する。Num b - P R R^Sは、Not chの量を減少し、Num b - Lよりも強力なNot chシグナル伝達の活性と拮抗する。対照的に、Num bのネガティブ調節であるユビキチン化は、電荷を有するデカペプチドを含むP T B^L改変体を標的とする。

10

【0137】

本発明者らは、乳房M C F - 7、膵臓M i a p a c a - 2、および卵巣S K O V 3系統におけるNum b LおよびNum b Sの発現の独特のレベルを見出した。Num bの発現は、C - S t - Cの対称型/非対称型分裂の潜在性、およびその癌活性化に対する関連性の指標であり得る。この問題に取り組むためにさらなる研究が必要である。

【0138】

多能性因子が標的とするポリコーム基タンパク質標的遺伝子

ポリコーム基 (P c G) タンパク質は、クロマチン構造の後成的修飾を通して後生動物発生の際に細胞の同一性を維持している転写リプレッサーである。P c Gタンパク質は、胚性幹細胞 (E - S t - C)において発生遺伝子を転写的に抑制し、その発現は、さもなくば分化を促進する。P c G結合クロマチンは、ヒストンH3のL y s 2 7 (K^{2 7})においてトリメチル化されており、転写的にサイレントである。8量体結合転写因子 - 4 (O C T 4)、S R Y関連ハイモビリティグループ (H M G) - ボックスタンパク質 - 2 (S O X 2)、およびホメオドメイン含有転写因子、N A N O G遺伝子はP c G標的であり、クロマチン修飾因子が、E S f - C細胞における発生経路を直接的に抑制するためにこれらの3つの多能性調節因子と協調的に作用し得る。O C T 4は、成体多能性S t - C、ならびにいくつかのヒトおよびラット腫瘍細胞において発現されるが、しかしながら、これらのS t - Cの正常に分化した娘細胞においては発現されない。O c t 4遺伝子を発現する成体細胞は、潜在的に多能性S t - Cであり、発癌プロセスの開始と関連性がある。S O X 2は、転写の調節およびクロマチン構造に関連している。S O X 2は、線維芽細胞増殖因子 - 4 (F g f 4)のエンハンサーD N A配列上にO C T 4または遍在性O C T 1タンパク質のいずれかとの三成分複合体を形成することによって、内部細胞塊 (I C M)およびその子孫または誘導体細胞の調節に関与している。N a n o gは、マウスE s t - Cの細胞再生および多能性のための白血病阻害因子 (L I F)非依存性能力を付与する。N a n o gは、N K遺伝子ファミリーのメンバーとの相同性により、E N K (初期胚特異的N K)として最初に記載された。N a n o g m R N Aは、始原生殖細胞および胚性幹細胞において存在する。S t e l l aそれ自体を多能性のマーカーとして考慮したにも関わらず、N a n o gタンパク質はS t e l l a陽性マウス始原生殖細胞においては見出されない。生殖細胞におけるN a n o gの機能は、それらが成熟するにつれて進行的に消失する。N n a o gは分化を促進する遺伝子の転写を抑制し得る。

20

30

40

【0139】

多くの発生の遺伝子と関連するクロマチンコンホメーションは、H3における阻害性メチル化K^{2 7}と、活性化メチル化K⁴ヒストンの両方からなる「ビバレントドメイン」から構成される。これらの二価ドメインは分化した細胞においては失われており、これらがE S細胞の発生学的な柔軟性を維持する際に重要な役割を果たすことを示唆している。従って、O C T 4、S O X 2、およびN A N O Gは、多能性状態における鍵となる発生的調節因子をサイレンシングするために、P c Gタンパク質と協調して作用し得る。

【0140】

50

PcGによる遺伝子不活性化は、種々のPcGタンパク質の2つの複合体の共同を必要とする：(i)ポリコム抑制複合体1(PCR)はクロマチンに結合し、公知の遺伝子活性化タンパク質複合体の効果を遮断する、(ii)PCR2はPCR1を遺伝子を標的とするように導く。ZesteのエンハンサーについてのE(Z)として公知であるPCR2成分の1つは、メチル(CH₃)基をK²⁷に付加する能力を有し、これは、クロマチンのH3の末端のテールに位置している。ヒストン修飾は、その修飾に依存して、遺伝子の活性を調節し、それらをオンまたはオフのいずれかに切り換える際に、主要な役割を果たす。PCR2の場合において、CH₃付加は、不活性化される遺伝子にPCR1を誘引することによって、遺伝子をオフに切り換える。PCRのメチル化活性は、PCR1結合のために必要とされる。

10

【0141】

ショウジョウバエE(z)タンパク質のヒト等価物であるEZH2の発現は、局在化した腫瘍または正常組織におけるよりも、前立腺癌および乳癌の転移においてはるかに高い。癌組織におけるEZH2の発現は、黒色腫、乳癌、前立腺癌、子宮内膜癌、および胃癌の乏しい予後および悪性の潜在性、例えば、高い増殖、伝播、および侵襲と相関することが報告された。E(Z)タンパク質の産生を遮断することは、前立腺癌細胞の増殖を阻害した。EZH2は、腫瘍抑制遺伝子またはその場所にアンカーされた細胞を維持するタンパク質を作製する遺伝子を阻害し得る。EZH2の過剰発現およびPCR改変体の形成は、未分化細胞ならびに癌細胞において起こる。EZH2によって媒介されるヒストンメチル化は、それらの多能性発生状態において幹細胞を維持することを補助する。

20

【0142】

癌は脱分化によって得られる癌幹様細胞から引き起こされ得る

1)多能性因子は、成熟細胞から幹様細胞を作製するために必要とされる。

【0143】

いくつかの癌は、幹細胞であることを伴う、脱分化された癌細胞から引き起こすことができる。OCT4、SOX2、およびNanogに加えて、c-mycおよびKlf4もまた、Est-C表現型の長期間の維持、および培養中でのEst-Cの迅速な増殖に寄与する。成体マウス線維芽細胞からの多能性幹細胞の誘導は、Oct4、Sox2、c-Myc、およびKlf4を導入することによって実証され、これは、成熟細胞が特別な状況下で未成熟に戻り得ること、次いで、ある癌細胞は幹細胞であることを維持し得ることを示唆する。これらの因子はいかにして互いに影響を与えるのであろうか?Oct4の発現の増加は、マウスEst-Cに余分の胚期の外胚葉および中胚葉への分化を引き起こすのに対して、Nanogの発現の増加は、自己再生および未分化状態の維持を増強する。Oct4の発現の減少は、マウスEst-Cに栄養外胚葉への分化を引き起こす。これは、Oct4およびNanogが独立して操作し、それらの主要な機能は胚性細胞分化の抑制であり得ることを示す。両方のタンパク質からの合わせたシグナルは、原始外胚葉の再生および多能性に導く。8量体およびsoxエレメントは、マウスおよびヒトのNanog転写のアプレギュレーションのために必要とされる。OCT4、SOX2、およびNanogはさらなる転写因子とともに協働作用する。これらは必須であるが、多能性細胞状態の詳細のためには十分ではない。Oct4およびNanogの発現の上流制御の特徴付けが非常に重要である。

30

40

【0144】

2)癌細胞は幹細胞であることを獲得し得る。

【0145】

癌細胞は、通常は、長い生存、遠くでの転移、および抗癌剤耐性で定義される、悪性の潜在性を有する。Cst-Csは、乳癌、脳腫瘍、前立腺癌、および結腸癌において報告された。乳癌、膵臓癌、および卵巣癌は上皮起源であるので、これらは、上皮マーカーESAを発現する。試験されたある膵臓癌(PC)系統はCst-Cに特徴的な表現型：CD44+CD24^低/-を発現したが、すべての膵臓癌(PC)系統で発現されるわけではない。驚くべきことに、ESA+CD44+CD24^低/-集団はゲムシタピン(G

50

EM) または 5 - フルオロウラシル (FU) を伴う培養後に増加した。DNA および RNA 合成阻害剤 GEM および 5 - FU は、最も有効な抗癌薬物の中に含まれる。薬物および照射による C - S t - C s のポジティブ選択は、2 つの仮説に対するサポートをもたらす。第 1 に、C - S t - C s は耐性集団において富化されており、なぜなら、これらは、高レベルの抗アポトーシス性分子を発現し、同時に G 1 休止状態であるからである。第 2 に、紡錘体の位置の変化、すなわち、脱分化の後、ゆっくりとかつ「非対称的に」耐性細胞が分裂することである。これらの仮説は図 1 3 に要約されている。

【 0 1 4 6 】

C - S t - C の根絶

すべての研究は、C - S t - C が化学療法および放射線療法に耐性であることに同意している。C - S t - C を根絶するための第 1 の試みは、対称型細胞分裂を促進する遺伝子経路を負に調節することである。上記に列挙したすべての遺伝子およびタンパク質の機能はアンタゴニスト的な遺伝子産物によって負に調節可能である。

10

【 0 1 4 7 】

1 つの可能性は、癌細胞の中での N o t c h のアンタゴニストの発現にある (図 2)。N u m b またはその P T B ドメインをコードする m R N A は、ネガティブ鎖 R N A ベクターから腫瘍細胞中で発現可能である。このようなベクターは、ニューキャスル病ウイルスまたはセンダイウイルスに基づく。不運にも、近年の鳥インフルエンザへの関心がこの試みの魅力を制限している。

20

【 0 1 4 8 】

代替案は、活性化経路を正に制御するタンパク質の分解である。哺乳動物オーロラ A は、いくつかの癌におけるその過剰発現、特定の細胞株における増殖を促進するその能力、ならびにレベルの減少が複数の中心体の増殖、有糸分裂の遅延、およびアポトーシスに導くという事実により、発癌遺伝子と呼ばれている。提案するメカニズムを以下に説明する。オーロラ - A は、M I A - P a C a - 2 を含む P C 系統において過剰発現され、経路：M A P K - E R K - E T S 2 によって活性化される。哺乳動物オーロラ - A がいかにして幹細胞の非対称型分裂および自己再生を調節することは不明であり、これが、P C 発癌に関与し、R a s - または M y c - シグナルと協働する。最近の研究は、U B リガーゼ E 3 S e 1 1 0 の減少が、延長されかつ持続されたオーロラ - A シグナルを可能にし、その標的は、癌細胞の自己再生を促進することを見出している。癌細胞における U b - リガーゼが助けとなり得る。図 1 4 を参照のこと。

30

【 0 1 4 9 】

第 2 の試みは、非対称型分裂を阻害するために、P K C および a P K C のより特異的な小分子阻害剤を開発することである。このような阻害剤は、異なる状況において重要である。タキソールは微小管の重合に影響を与える。いくつかのタキソール耐性細胞が紡錘糸を再配置するという可能性がある。タキソールで処理された卵巣および P C は C D 4 4 + C D 2 4 低細胞の数を増加させた。

【 0 1 5 0 】

第 3 の試みは、一見無関係な研究から得られる。E Z H 2 タンパク質は、活性特異的腫瘍免疫治療によって標的とされた。H L A - A 2 4 様式によって限定される E Z H 2 のペプチド配列を認識する C T L を同定した。E Z H 2 を用いるワクチン試験は、前立腺癌の患者および脳腫瘍の患者において進行中である。疑問は、高発現 E Z H 2 が、高いターンオーバー速度を生じるか否かである。このシナリオにおいてのみ、E Z H 2 に焦点を当てた免疫療法が C S t - C を根絶する。図 1 7 A ~ 1 7 B を参照のこと。

40

【 0 1 5 1 】

本発明者らは、N u m b および N o t c h それ自体が、活性化 C T L による C s t - C の根絶のための適切な標的であると考えている。N o t c h リガンドによる増殖を活性化する C s t - C は、N u m b を分解し、提示する。

【 0 1 5 2 】

N u m b ペプチドは H L A - A、B、C に結合する。これらの複合体は、N u m b ペプ

50

チド特異的CTLによって認識および根絶が可能である。代替としては、休止状態にあるCst-CはNotchを分解する。腫瘍によって提示されるNotchペプチド-HLA、ABC複合体は、Notchペプチド特異的CTLの標的中のCst-Cを形質転換する。

【0153】

結論

自己再生と多能性の両方の能力として規定されたSt-Cの増殖および分化は、対称型/非対称型細胞分裂によって調節される。Notchシグナル伝達経路は、これらの分裂のバランスを取る。Numbは、Notchシグナル伝達の抑制を通してのみならず、固有の予想される決定因子としてのそのアイソフォームを通してもまた、幹細胞分裂において重要な役割を果たしている。NotchおよびMunbの発現はCst-Cの転移の潜在能力を示し得る。抗癌薬物は、Cst-Cを選択または誘導する。CST-Cは、維持および拡大するために、多能性因子およびPcGタンパク質を必要とする。それゆえに、Numb、Notch、PKC、aPKC、およびEZH2は、化学療法および放射線療法後にSt-C根絶のための適切な標的であるはずである。

10

【0154】

本明細書で開示され、特許請求されるすべての組成物および方法は、本開示に鑑みて、過度の実験なしで、作製および実行が可能である。本発明の組成物および方法は、好ましい実施形態によって説明されてきたが、本発明の概念、技術思想、および範囲から逸脱することなく、本明細書に記載された方法の工程でまたはその工程の順番で、バリエーションがその組成物および方法に適用され得ることは、当業者には明白である。より詳細には、化学的と生理学的の両方で関連している特定の薬剤は、同じまたは類似の結果を達成される場合、本明細書に記載された薬剤の代わりに置換されてもよいことは明白である。すべてのこのような置換物および修飾は当業者に明らかであり、添付の特許請求の範囲によって定義されるような本明細書の技術思想、範囲、および概念の中にはいると見なされる。

20

【0155】

(参考文献)

以下の参考文献は、これらが、本明細書に示されたものに対する補遺的な、実験手順または他の詳細を提供するという程度まで、参照として本明細書に具体的に組み込まれる。

30

【0156】

【化 1】

1. Artavanis-Tsakonas S, Rand MD and Lake RJ: Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 284: 770-6, 1999.
2. Mumm JS, Schroeter EH and Saxena MT et al: A ligand-induced extracellular cleavage regulates gamma-secretase-like proteolytic activation of Notch1. *Mol.Cell* 5: 197-206,2000.
3. Ellisen L W, Bird J and West DC et al: TAN-1, the human homolog of the *Drosophila* notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell* 66: 649-61, 1991. 10
4. Weng AP, Ferrando AA and Lee W et al: Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science* 306: 269-71,2004.
5. Radtke F and Raj K: The role of Notch in tumorigenesis: oncogene or tumour suppressor? *Nat.Rev.Cancer*. 3: 756-67,2003.
6. Leong KG and Karsan A: Recent insights into the role of Notch signaling in tumorigenesis. *Blood* 107: 2223-33, 2006. 20
7. Capobianco AJ, Zagouras P, Blaumueller CM, Artavanis-Tsakonas S and Bishop JM: Neoplastic transformation by truncated alleles of human NOTCH1/TAN1 and NOTCH2. *Mol.Cell.Biol.* 17: 6265-73, 1997.
8. Nickoloff BJ, Osborne BA and Miele L: Notch signaling as a therapeutic target in cancer: a new approach to the development of cell fate modifying agents. *Oncogene* 22; 6598-608, 2003.
9. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF and Weissman IL: Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414: 105-11,2001. 30
10. Martinez Arias A, Zecchini V and Brennan K: CSL-independent Notch signalling: a checkpoint in cell fate decisions during development? *Curr.Opin.Genet.Dev.* 12: 524-33,2002.
11. Guo M, Jan L Y and Jan YN: Control of daughter cell fates during asymmetric division: interaction of Numb and Notch. *Neuron* 17: 27-41, 1996.

【 0 1 5 7 】

【化 2】

12. Rhyu MS, Jan L Y and Jan YN: Asymmetric distribution of numb protein during division of the sensory organ precursor cell confers distinct fates to daughter cells. *Cell* 76: 477-91, 1994.
13. Santolini E, Puri C and Salcini AE et al: Numb is an endocytic protein. *J .Cell Biol.* 151: 1345-52, 2000.
14. Pece S, Serresi M and Santolini E et al: Loss of negative regulation by Numb over Notch is relevant to human breast carcinogenesis. *J .Cell Biol.* 167: 215-21, 2004. 10
15. Stylianou S, Clarke RB and Brennan K: Aberrant activation of notch signaling in human breast cancer. *Cancer Res.* 66: 1517-25, 2006.
16. Gomez-Nunez M, Pinilla-Ibarz J and Dao T et al: Peptide binding motif predictive algorithms correspond with experimental binding of leukemia vaccine candidate peptides to HLA-A*0201 molecules. *Leuk.Res.* 2006.
17. Bian H, Reidhaar-Olson JF and Hammer J: The use of bioinformatics for identifying class II-restricted T-cell epitopes. *Methods* 29: 299-309, 2003. 20
18. Nussbaum AK, Kuttler C, Hadelers KP, Rammensee HG and Schild H: P AProC: a prediction algorithm for proteasomal cleavages available on the WWW. *Immunogenetics* 53: 87-94, 2001.
19. Kopp J and Schwede T: The SWISS-MODEL Repository: new features and functionalities. *Nucleic Acids Res.* 34: 0315-8, 2006.
20. Zwahlen C, Li SC, Kay LE, Pawson T and Forman-Kay JD: Multiple modes of peptide recognition by the PTB domain of the cell fate determinant Numb. *EMBO J.* 19: 1505-15, 2000. 30
21. Ehebauer MT, Chirgadze DY, Hayward P, Martinez Arias A and Blundell TL: High-resolution crystal structure of the human Notch1 ankyrin domain. *Biochem.J.* 392: 13-20, 2005.
22. Hambleton S, Yaleyev NY and Muranyi A et al: Structural and functional properties of the human notch-1 ligand binding region. *Structure* 12: 2173-83, 2004.
23. Weijzen S, Rizzo P and Braid M et al: Activation of Notch-1 signaling maintains the neoplastic phenotype in human Ras-transformed cells. *Nat.Med.* 8: 979-86, 2002. 40
24. Fisk B, Blevins TL, Wharton JT and Ioannides CG: Identification of an immunodominant peptide of HER-2/neu protooncogene recognized by ovarian tumor-specific cytotoxic T lymphocyte lines. *J.Exp.Med.* 181: 2109-17, 1995.

【 0 1 5 8 】

【化 3】

25. Frischmann U and Muller W: Nine fluorescence parameter analysis on a four-color fluorescence activated flow cytometer. *Cytometry A*. 69: 124-6, 2006.
26. Kawano K, Efferson CL and Peoples GE et al: Sensitivity of undifferentiated, high-TCR density CD8⁺ cells to methylene groups appended to tumor antigen determines their differentiation or death. *Cancer Res*. 65: 2930-7, 2005.
27. Fahmy TM, Bieler JG, Edidin M and Schneck JP: Increased TCR avidity after T cell activation: a mechanism for sensing low-density antigen. *Immunity* 14: 135-43, 2001. 10
28. Fahmy TM, Bieler JG and Schneck JP: Probing T cell membrane organization using dimeric MHC-Ig complexes. *J.Immunol.Methods* 268: 93-106, 2002.
29. Frahm N, Korber BT and Adams CM et al: Consistent cytotoxic-T-lymphocyte targeting of immunodominant regions in human immunodeficiency virus across multiple ethnicities. *J.Virol*. 78: 2187-200, 2004.
30. Ellis JM, Henson V, Slack R, Ng J, Hartzman RJ and Katovich Hurley C: Frequencies of HLA-A2 alleles in five U.S. population groups. Predominance Of A*02011 and identification of HLA-A *0231. *Hum.Immunol*. 61: 334-40, 2000. 20
31. Li JL and Harris AL: Notch signaling from tumor cells: a new mechanism of angiogenesis. *Cancer.Cell*. 8: 1-3, 2005.
32. Rehman AO and Wang CY: Notch signaling in the regulation of tumor angiogenesis. *Trends Cell Biol*. 16: 293-300, 2006.
33. Patel NS, Li JL, Generali D, Poulsom R, Cranston DW and Harris AL: Up-regulation of delta-like 4 ligand in human tumor vasculature and the role of basal expression in endothelial cell function. *Cancer Res*. 65: 8690-7, 2005. 30
34. Mailhos C, Modlich U, Lewis J, Harris A, Bicknell Rand Ish-Horowicz D: Delta4, an endothelial specific notch ligand expressed at sites of physiological and tumor angiogenesis. *Differentiation* 69: 135-44, 2001.
35. Hainaud P, Contreres JO and Villemain A et al: The Role of the Vascular Endothelial Growth Factor-Delta-like 4 Ligand/Notch4-Ephrin B2 Cascade in Tumor Vessel Remodeling and Endothelial Cell Functions. *Cancer Res*. 66: 8501-10, 2006. 40
36. Hopper O, Zwahlen D, Fey MF and Aebi S: The Notch pathway in ovarian carcinomas and adenomas. *Br.J.Cancer* 93: 709-18, 2005.
37. Park JT, Li M and Nakayama K et al: Notch3 gene amplification in ovarian cancer. *Cancer Res*. 66: 6312-8, 2006.

【 0 1 5 9 】

【化 4】

38. Sette A and Sidney J: Nine major HLA class I supertypes account for the vast preponderance of HLA-A and -B polymorphism. *Immunogenetics* 50: 201-12, 1999.
39. Parkin DM, Bray F, Ferlay J and Pisani P: Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer.J.Clin.* 55: 74-108, 2005.
40. Androutsellis-Theotokis A, Leker RR, Soldner F, et al. Notch signalling regulates stem cell numbers in vitro and in vivo. *Nature* 2006;442:823-6. 10
41. Bao S, Wu Q, McLendon RE, et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 2006;444:756-60.
42. Morrison SJ, Kimble J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature* 2006;441:1068-74.
43. Rothenberg ML, Moore MJ, Cripps MC, et al. A phase II trial of gemcitabine in patients with 5-FU-refractory pancreas cancer. *Ann Oncol* 1996;7:347-53.
44. Burris HA 3rd, Moore MJ, Andersen J, et al. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol* 1997;15:2403-13. 20
45. Berlin JD, Catalano P, Thomas JP, Kugler JW, Haller DG, Benson AB 3rd. Phase III study of gemcitabine in combination with fluorouracil versus gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic carcinoma: Eastern Cooperative Oncology Group Trial E2297. *J Clin Oncol* 2002;20:3270-5.
46. Rocha Lima CM, Green MR, Rotche R, et al. Irinotecan plus gemcitabine results in no survival advantage compared with gemcitabine monotherapy in patients with locally advanced or metastatic pancreatic cancer despite increased tumor response rate. *J Clin Oncol* 2004;22:3776-83. 30
47. Van Cutsem E, van de Velde H, Karasek P, et al. Phase III trial of gemcitabine plus tipifarnib compared with gemcitabine plus placebo in advanced pancreatic cancer. *J Clin Oncol* 2004;22:1430-8.
48. Bramhall SR, Rosemurgy A, Brown PD, Bowry C, Buckels JA. Marimastat Pancreatic Cancer Study Group: Marimastat as first-line therapy for patients with unresectable pancreatic cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol* 2001;19:3447-55. 40
49. Moore MJ, Hamm J, Dancey J, et al. Comparison of gemcitabine versus the matrix metalloproteinase inhibitor BAY 12-9566 in patients with advanced or metastatic adenocarcinoma of the pancreas: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol* 2003;21:3296-302.

【化5】

50. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:3983-8.
51. Li C, Heidt DG, Dalerba P, et al. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res* 2007;67:1030-7.
52. Krause DS, Lazarides K, von Andrian UH, Van Etten RA. Requirement for CD44 in homing and engraftment of BCR-ABL-expressing leukemic stem cells. *Nat Med* 2006;12:1175-80. 10
53. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 2003;63:5821-8.
54. Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 2007;445:111-5.
55. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 2007;445:106-10. 20
56. Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res* 2005;65:10946-51.
57. Tai MH, Chang CC, Kiupel M, et al. Oct4 expression in adult human stem cells: evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2005;26:495-502.
58. Gasser S, Orsulic S, Brown EJ, Raulet DH. The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. *Nature* 2005;436:1186-90. 30
59. Skov S, Pedersen MT, Andresen L, Straten PT, Woetmann A, Odum N. Cancer cells become susceptible to natural killer cell killing after exposure to histone deacetylase inhibitors due to glycogen synthase kinase-3-dependent expression of MHC class I-related chain A and B. *Cancer Res* 2005;65:11136-45.
60. Berdnik D, Torok T, Gonzalez-gaitan M, Knoblich JA. The endocytic protein alpha-Adaptin is required for numb-mediated asymmetric cell division in *Drosophila*. *Dev Cell* 2002;3:221-31. 40
61. Noguera-Troise I, Daly C, Papadopoulos NJ, et al. Blockade of Dll4 inhibits tumour growth by promoting non-productive angiogenesis. *Nature* 2006;444:1032-7.
62. Ridgway J, Zhang G, Wu Y, et al. Inhibition of Dll4 signalling inhibits tumour growth by deregulating angiogenesis. *Nature* 2006;444:1083-7.

【0161】

【化6】

63. Kobayashi H, Boelte KC, Lin PC. Endothelial cell adhesion molecules and cancer progression. *Curr Med Chem*. 2007;14(4):377-86
64. Bellone G, Carbone A, Busso V, Scirelli T, Buffolino A, Smirne C, Novarino A, Bertetto O, Tosetti L, Emanuelli G. Antagonistic interactions between gemcitabine and 5-fluorouracil in the human pancreatic carcinoma cell line Capan-2. *Cancer Biol Ther*. 2006 Oct;5(10):1294-303 10
65. Le Borgne R. Regulation of Notch signalling by endocytosis and endosomal sorting. *Curr Opin Cell Biol*. 2006, 18(2):213-22.
66. Tolis C, Peters GJ, Ferreira CG, Pinedo HM, Giaccone G. Cell cycle disturbances and apoptosis induced by topotecan and gemcitabine on human lung cancer cell lines. *Eur J Cancer* 1999;35:796-807.
67. Bowman SK, Neumuller RA, Novatchkova M, Du Q, Knoblich JA. The Drosophila NuMA Homolog Mud regulates spindle orientation in asymmetric cell division. *Dev Cell*. 2006 Jun;10(6):731-42. 20
68. Betschinger J, Mechtler K, Knoblich JA. Asymmetric segregation of the tumor suppressor brat regulates self-renewal in Drosophila neural stem cells. *Cell*. 2006 Mar 24;124(6):1241-53.
69. Smith CA, Lau KM, Rahmani Z, Dho SE, Brothers G, She YM, Berry DM, Bonneil E, Thibault P, Schweisguth F, Le Borgne R, McGlade CJ. aPKC-mediated phosphorylation regulates asymmetric membrane localization of the cell fate determinant Numb. *EMBO J*. 2007 24;26(2):468-80 30
70. Nichols JT, Miyamoto A, Olsen SL, D'Souza B, Yao C, Weinmaster G. DSL ligand endocytosis physically dissociates Notch1 heterodimers before activating proteolysis can occur. *J Cell Biol*. 2007 Feb 12;176(4):445-58.
71. Yanagimoto H, Mine T, Yamamoto K, Satoi S, Terakawa N, Takahashi K, Nakahara K, Honma S, Tanaka M, Mizoguchi J, Yamada A, Oka M, Kamiyama Y, Itoh K, Takai S. Immunological evaluation of personalized peptide vaccination with gemcitabine for pancreatic cancer. *Cancer Sci*. 2007 Feb 12 40
72. Phillips TM, McBride WH, Pajonk F. The response of CD24(-/low)/CD44+ breast cancer-initiating cells to radiation. *J Natl Cancer Inst*. 2006 98(24):1777-85.
73. Efferson CL, Tsuda N, Kawano K, Nistal-Villan E, Sellappan S, Yu D, Murray JL, Garcia-Sastre A, Ioannides CG. Prostate tumor cells infected with a recombinant

【0162】

【化7】

- influenza virus expressing a truncated NS1 protein activate cytolytic CD8⁺ cells to recognize noninfected tumor cells. *J Virol.* 2006 Jan;80(1):383-94.
74. Castilleja A, Carter D, Efferson CL, Ward NE, Kawano K, Fisk B, Kudelka AP, Gershenson DM, Murray JL, O'Brian CA, Ioannides CG. Induction of tumor-reactive CTL by C-side chain variants of the CTL epitope HER-2/neu protooncogene (369-377) selected by molecular modeling of the peptide: HLA-A2 complex. *J Immunol.* 2002, 169(7):3545-54. 10
75. Lee CY, Andersen RO, Cabernard C, Manning L, Tran KD, Lanskey MJ, Bashirullah A, Doe CQ. *Drosophila* Aurora-A kinase inhibits neuroblast self-renewal by regulating aPKC/Numb cortical polarity and spindle orientation. *Genes Dev.* 2006 Dec 15;20(24):3464-74.
76. Miyamoto A, Lau R, Hein PW, Shipley JM, Weinmaster G. Microfibrillar proteins MAGP-1 and MAGP-2 induce Notch1 extracellular domain dissociation and receptor activation. *J Biol Chem.* 2006 Apr 14;281(15):10089-97. 20

【0163】

【化 8】

配列表

<110> Ioannides, Constantin G.
Eich, Raymund F.

<120> N o t c hまたはN u m b 特異的免疫療法との相乗効果を有する、癌細胞の再生のネガティブな遺伝的制御

<130> 4002.000910, MDA07-057

<160> 44

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 2556
<212> PRT
<213> ヒト

<400> 1

Met Pro Pro Leu Leu Ala Pro Leu Leu Cys Leu Ala Leu Leu Pro Ala
1 5 10 15 20

Leu Ala Ala Arg Gly Pro Arg Cys Ser Gln Pro Gly Glu Thr Cys Leu
20 25 30

Asn Gly Gly Lys Cys Glu Ala Ala Asn Gly Thr Glu Ala Cys Val Cys
35 40 45

Gly Gly Ala Phe Val Gly Pro Arg Cys Gln Asp Pro Asn Pro Cys Leu
50 55 60 30

Ser Thr Pro Cys Lys Asn Ala Gly Thr Cys His Val Val Asp Arg Arg
65 70 75 80

Gly Val Ala Asp Tyr Ala Cys Ser Cys Ala Leu Gly Phe Ser Gly Pro
85 90 95

Leu Cys Leu Thr Pro Leu Asp Asn Ala Cys Leu Thr Asn Pro Cys Arg
100 105 110

Asn Gly Gly Thr Cys Asp Leu Leu Thr Leu Thr Glu Tyr Lys Cys Arg
115 120 125 40

Cys Pro Pro Gly Trp Ser Gly Lys Ser Cys Gln Gln Ala Asp Pro Cys
130 135 140

Ala Ser Asn Pro Cys Ala Asn Gly Gly Gln Cys Leu Pro Phe Glu Ala
145 150 155 160

【 0 1 6 4 】

50

【化9】

Ser Tyr Ile Cys His Cys Pro Pro Ser Phe His Gly Pro Thr Cys Arg
165 170 175

Gln Asp Val Asn Glu Cys Gly Gln Lys Pro Gly Leu Cys Arg His Gly
180 185 190

Gly Thr Cys His Asn Glu Val Gly Ser Tyr Arg Cys Val Cys Arg Ala
195 200 205

10

Thr His Thr Gly Pro Asn Cys Glu Arg Pro Tyr Val Pro Cys Ser Pro
210 215 220

Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Thr Cys Arg Pro Thr Gly Asp Val Thr
225 230 235 240

His Glu Cys Ala Cys Leu Pro Gly Phe Thr Gly Gln Asn Cys Glu Glu
245 250 255

20

Asn Ile Asp Asp Cys Pro Gly Asn Asn Cys Lys Asn Gly Gly Ala Cys
260 265 270

Val Asp Gly Val Asn Thr Tyr Asn Cys Arg Cys Pro Pro Glu Trp Thr
275 280 285

Gly Gln Tyr Cys Thr Glu Asp Val Asp Glu Cys Gln Leu Met Pro Asn
290 295 300

Ala Cys Gln Asn Gly Gly Thr Cys His Asn Thr His Gly Gly Tyr Asn
305 310 315 320

30

Cys Val Cys Val Asn Gly Trp Thr Gly Glu Asp Cys Ser Glu Asn Ile
325 330 335

Asp Asp Cys Ala Ser Ala Ala Cys Phe His Gly Ala Thr Cys His Asp
340 345 350

Arg Val Ala Ser Phe Tyr Cys Glu Cys Pro His Gly Arg Thr Gly Leu
355 360 365

40

Leu Cys His Leu Asn Asp Ala Cys Ile Ser Asn Pro Cys Asn Glu Gly
370 375 380

Ser Asn Cys Asp Thr Asn Pro Val Asn Gly Lys Ala Ile Cys Thr Cys
385 390 395 400

Pro Ser Gly Tyr Thr Gly Pro Ala Cys Ser Gln Asp Val Asp Glu Cys
405 410 415

【0165】

50

【化 1 0】

Ser Leu Gly Ala Asn Pro Cys Glu His Ala Gly Lys Cys Ile Asn Thr
 420 425 430

Leu Gly Ser Phe Glu Cys Gln Cys Leu Gln Gly Tyr Thr Gly Pro Arg
 435 440 445

Cys Glu Ile Asp Val Asn Glu Cys Val Ser Asn Pro Cys Gln Asn Asp
 450 455 460

10

Ala Thr Cys Leu Asp Gln Ile Gly Glu Phe Gln Cys Ile Cys Met Pro
 465 470 475 480

Gly Tyr Glu Gly Val His Cys Glu Val Asn Thr Asp Glu Cys Ala Ser
 485 490 495

Ser Pro Cys Leu His Asn Gly Arg Cys Leu Asp Lys Ile Asn Glu Phe
 500 505 510

20

Gln Cys Glu Cys Pro Thr Gly Phe Thr Gly His Leu Cys Gln Tyr Asp
 515 520 525

Val Asp Glu Cys Ala Ser Thr Pro Cys Lys Asn Gly Ala Lys Cys Leu
 530 535 540

Asp Gly Pro Asn Thr Tyr Thr Cys Val Cys Thr Glu Gly Tyr Thr Gly
 545 550 555 560

Thr His Cys Glu Val Asp Ile Asp Glu Cys Asp Pro Asp Pro Cys His
 565 570 575

30

Tyr Gly Ser Cys Lys Asp Gly Val Ala Thr Phe Thr Cys Leu Cys Arg
 580 585 590

Pro Gly Tyr Thr Gly His His Cys Glu Thr Asn Ile Asn Glu Cys Ser
 595 600 605

Ser Gln Pro Cys Arg His Gly Gly Thr Cys Gln Asp Arg Asp Asn Ala
 610 615 620

40

Tyr Leu Cys Phe Cys Leu Lys Gly Thr Thr Gly Pro Asn Cys Glu Ile
 625 630 635 640

Asn Leu Asp Asp Cys Ala Ser Ser Pro Cys Asp Ser Gly Thr Cys Leu
 645 650 655

Asp Lys Ile Asp Gly Tyr Glu Cys Ala Cys Glu Pro Gly Tyr Thr Gly

【 0 1 6 6】

50

【化 1 1】

	660						665						670									
	Ser	Met	Cys	Asn	Ile	Asn	Ile	Asp	Glu	Cys	Ala	Gly	Asn	Pro	Cys	His						
			675					680					685									
	Asn	Gly	Gly	Thr	Cys	Glu	Asp	Gly	Ile	Asn	Gly	Phe	Thr	Cys	Arg	Cys						
		690					695					700										
	Pro	Glu	Gly	Tyr	His	Asp	Pro	Thr	Cys	Leu	Ser	Glu	Val	Asn	Glu	Cys						10
		705				710					715											
	Asn	Ser	Asn	Pro	Cys	Val	His	Gly	Ala	Cys	Arg	Asp	Ser	Leu	Asn	Gly						
				725						730					735							
	Tyr	Lys	Cys	Asp	Cys	Asp	Pro	Gly	Trp	Ser	Gly	Thr	Asn	Cys	Asp	Ile						
				740					745					750								
	Asn	Asn	Asn	Glu	Cys	Glu	Ser	Asn	Pro	Cys	Val	Asn	Gly	Gly	Thr	Cys						20
			755					760					765									
	Lys	Asp	Met	Thr	Ser	Gly	Tyr	Val	Cys	Thr	Cys	Arg	Glu	Gly	Phe	Ser						
		770					775					780										
	Gly	Pro	Asn	Cys	Gln	Thr	Asn	Ile	Asn	Glu	Cys	Ala	Ser	Asn	Pro	Cys						
		785				790					795					800						
	Leu	Asn	Gln	Gly	Thr	Cys	Ile	Asp	Asp	Val	Ala	Gly	Tyr	Lys	Cys	Asn						30
				805						810					815							
	Cys	Leu	Leu	Pro	Tyr	Thr	Gly	Ala	Thr	Cys	Glu	Val	Val	Leu	Ala	Pro						
			820						825					830								
	Cys	Ala	Pro	Ser	Pro	Cys	Arg	Asn	Gly	Gly	Glu	Cys	Arg	Gln	Ser	Glu						
			835					840					845									
	Asp	Tyr	Glu	Ser	Phe	Ser	Cys	Val	Cys	Pro	Thr	Gly	Trp	Gln	Ala	Gly						
		850					855					860										
	Gln	Thr	Cys	Glu	Val	Asp	Ile	Asn	Glu	Cys	Val	Leu	Ser	Pro	Cys	Arg						
		865				870					875				880							
	His	Gly	Ala	Ser	Cys	Gln	Asn	Thr	His	Gly	Gly	Tyr	Arg	Cys	His	Cys						
				885						890					895							
	Gln	Ala	Gly	Tyr	Ser	Gly	Arg	Asn	Cys	Glu	Thr	Asp	Ile	Asp	Asp	Cys						

【 0 1 6 7】

50

【化 1 9】

2480		2485		2490	
Pro Val Asp Asn Thr Pro Ser His Gln Leu Gln Val Pro Glu His					
2495		2500		2505	
Pro Phe Leu Thr Pro Ser Pro Glu Ser Pro Asp Gln Trp Ser Ser					
2510		2515		2520	
Ser Ser Pro His Ser Asn Val Ser Asp Trp Ser Glu Gly Val Ser					
2525		2530		2535	
Ser Pro Pro Thr Ser Met Gln Ser Gln Ile Ala Arg Ile Pro Glu					
2540		2545		2550	
Ala Phe Lys					
2555					
<210> 2					
<211> 2471					
<212> PRT					
<213> 匕卜					
<400> 2					
Met Pro Ala Leu Arg Pro Ala Leu Leu Trp Ala Leu Leu Ala Leu Trp					
1		5		10	15
Leu Cys Cys Ala Ala Pro Ala His Ala Leu Gln Cys Arg Asp Gly Tyr					
		20		25	30
Glu Pro Cys Val Asn Glu Gly Met Cys Val Thr Tyr His Asn Gly Thr					
		35		40	45
Gly Tyr Cys Lys Cys Pro Glu Gly Phe Leu Gly Glu Tyr Cys Gln His					
		50		55	60
Arg Asp Pro Cys Glu Lys Asn Arg Cys Gln Asn Gly Gly Thr Cys Val					
65		70		75	80
Ala Gln Ala Met Leu Gly Lys Ala Thr Cys Arg Cys Ala Ser Gly Phe					
		85		90	95
Thr Gly Glu Asp Cys Gln Tyr Ser Thr Ser His Pro Cys Phe Val Ser					
		100		105	110
Arg Pro Cys Leu Asn Gly Gly Thr Cys His Met Leu Ser Arg Asp Thr					
		115		120	125

10

20

30

40

【 0 1 7 5】

50

【化 2 0】

Tyr Glu Cys Thr Cys Gln Val Gly Phe Thr Gly Lys Glu Cys Gln Trp
 130 135 140

Thr Asp Ala Cys Leu Ser His Pro Cys Ala Asn Gly Ser Thr Cys Thr
 145 150 155 160

Thr Val Ala Asn Gln Phe Ser Cys Lys Cys Leu Thr Gly Phe Thr Gly
 165 170 175

10

Gln Lys Cys Glu Thr Asp Val Asn Glu Cys Asp Ile Pro Gly His Cys
 180 185 190

Gln His Gly Gly Thr Cys Leu Asn Leu Pro Gly Ser Tyr Gln Cys Gln
 195 200 205

Cys Pro Gln Gly Phe Thr Gly Gln Tyr Cys Asp Ser Leu Tyr Val Pro
 210 215 220

20

Cys Ala Pro Ser Pro Cys Val Asn Gly Gly Thr Cys Arg Gln Thr Gly
 225 230 235 240

Asp Phe Thr Phe Glu Cys Asn Cys Leu Pro Gly Phe Glu Gly Ser Thr
 245 250 255

Cys Glu Arg Asn Ile Asp Asp Cys Pro Asn His Arg Cys Gln Asn Gly
 260 265 270

30

Gly Val Cys Val Asp Gly Val Asn Thr Tyr Asn Cys Arg Cys Pro Pro
 275 280 285

Gln Trp Thr Gly Gln Phe Cys Thr Glu Asp Val Asp Glu Cys Leu Leu
 290 295 300

Gln Pro Asn Ala Cys Gln Asn Gly Gly Thr Cys Ala Asn Arg Asn Gly
 305 310 315 320

Gly Tyr Gly Cys Val Cys Val Asn Gly Trp Ser Gly Asp Asp Cys Ser
 325 330 335

40

Glu Asn Ile Asp Asp Cys Ala Phe Ala Ser Cys Thr Pro Gly Ser Thr
 340 345 350

Cys Ile Asp Arg Val Ala Ser Phe Ser Cys Met Cys Pro Glu Gly Lys
 355 360 365

【 0 1 7 6】

50

【化 2 1】

Ala Gly Leu Leu Cys His Leu Asp Asp Ala Cys Ile Ser Asn Pro Cys
370 375 380

His Lys Gly Ala Leu Cys Asp Thr Asn Pro Leu Asn Gly Gln Tyr Ile
385 390 395 400

Cys Thr Cys Pro Gln Gly Tyr Lys Gly Ala Asp Cys Thr Glu Asp Val
405 410 415

10

Asp Glu Cys Ala Met Ala Asn Ser Asn Pro Cys Glu His Ala Gly Lys
420 425 430

Cys Val Asn Thr Asp Gly Ala Phe His Cys Glu Cys Leu Lys Gly Tyr
435 440 445

Ala Gly Pro Arg Cys Glu Met Asp Ile Asn Glu Cys His Ser Asp Pro
450 455 460

20

Cys Gln Asn Asp Ala Thr Cys Leu Asp Lys Ile Gly Gly Phe Thr Cys
465 470 475 480

Leu Cys Met Pro Gly Phe Lys Gly Val His Cys Glu Leu Glu Ile Asn
485 490 495

Glu Cys Gln Ser Asn Pro Cys Val Asn Asn Gly Gln Cys Val Asp Lys
500 505 510

30

Val Asn Arg Phe Gln Cys Leu Cys Pro Pro Gly Phe Thr Gly Pro Val
515 520 525

Cys Gln Ile Asp Ile Asp Asp Cys Ser Ser Thr Pro Cys Leu Asn Gly
530 535 540

Ala Lys Cys Ile Asp His Pro Asn Gly Tyr Glu Cys Gln Cys Ala Thr
545 550 555 560

Gly Phe Thr Gly Val Leu Cys Glu Glu Asn Ile Asp Asn Cys Asp Pro
565 570 575

40

Asp Pro Cys His His Gly Gln Cys Gln Asp Gly Ile Asp Ser Tyr Thr
580 585 590

Cys Ile Cys Asn Pro Gly Tyr Met Gly Ala Ile Cys Ser Asp Gln Ile
595 600 605

【 0 1 7 7 】

50

【化 2 2】

Asp Glu Cys Tyr Ser Ser Pro Cys Leu Asn Asp Gly Arg Cys Ile Asp
610 615 620

Leu Val Asn Gly Tyr Gln Cys Asn Cys Gln Pro Gly Thr Ser Gly Val
625 630 635 640

Asn Cys Glu Ile Asn Phe Asp Asp Cys Ala Ser Asn Pro Cys Ile His
645 650 655

10

Gly Ile Cys Met Asp Gly Ile Asn Arg Tyr Ser Cys Val Cys Ser Pro
660 665 670

Gly Phe Thr Gly Gln Arg Cys Asn Ile Asp Ile Asp Glu Cys Ala Ser
675 680 685

Asn Pro Cys Arg Lys Gly Ala Thr Cys Ile Asn Gly Val Asn Gly Phe
690 695 700

20

Arg Cys Ile Cys Pro Glu Gly Pro His His Pro Ser Cys Tyr Ser Gln
705 710 715 720

Val Asn Glu Cys Leu Ser Asn Pro Cys Ile His Gly Asn Cys Thr Gly
725 730 735

Gly Leu Ser Gly Tyr Lys Cys Leu Cys Asp Ala Gly Trp Val Gly Ile
740 745 750

Asn Cys Glu Val Asp Lys Asn Glu Cys Leu Ser Asn Pro Cys Gln Asn
755 760 765

30

Gly Gly Thr Cys Asp Asn Leu Val Asn Gly Tyr Arg Cys Thr Cys Lys
770 775 780

Lys Gly Phe Lys Gly Tyr Asn Cys Gln Val Asn Ile Asp Glu Cys Ala
785 790 795 800

Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gln Gly Thr Cys Phe Asp Asp Ile Ser Gly
805 810 815

40

Tyr Thr Cys His Cys Val Leu Pro Tyr Thr Gly Lys Asn Cys Gln Thr
820 825 830

Val Leu Ala Pro Cys Ser Pro Asn Pro Cys Glu Asn Ala Ala Val Cys
835 840 845

【 0 1 7 8 】

50

【化 2 3】

Lys Glu Ser Pro Asn Phe Glu Ser Tyr Thr Cys Leu Cys Ala Pro Gly
850 855 860

Trp Gln Gly Gln Arg Cys Thr Ile Asp Ile Asp Glu Cys Ile Ser Lys
865 870 875 880

Pro Cys Met Asn His Gly Leu Cys His Asn Thr Gln Gly Ser Tyr Met
885 890 895

10

Cys Glu Cys Pro Pro Gly Phe Ser Gly Met Asp Cys Glu Glu Asp Ile
900 905 910

Asp Asp Cys Leu Ala Asn Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Met Asp
915 920 925

Gly Val Asn Thr Phe Ser Cys Leu Cys Leu Pro Gly Phe Thr Gly Asp
930 935 940

20

Lys Cys Gln Thr Asp Met Asn Glu Cys Leu Ser Glu Pro Cys Lys Asn
945 950 955 960

Gly Gly Thr Cys Ser Asp Tyr Val Asn Ser Tyr Thr Cys Lys Cys Gln
965 970 975

Ala Gly Phe Asp Gly Val His Cys Glu Asn Asn Ile Asn Glu Cys Thr
980 985 990

Glu Ser Ser Cys Phe Asn Gly Gly Thr Cys Val Asp Gly Ile Asn Ser
995 1000 1005

30

Phe Ser Cys Leu Cys Pro Val Gly Phe Thr Gly Ser Phe Cys Leu
1010 1015 1020

His Glu Ile Asn Glu Cys Ser Ser His Pro Cys Leu Asn Glu Gly
1025 1030 1035

Thr Cys Val Asp Gly Leu Gly Thr Tyr Arg Cys Ser Cys Pro Leu
1040 1045 1050

40

Gly Tyr Thr Gly Lys Asn Cys Gln Thr Leu Val Asn Leu Cys Ser
1055 1060 1065

Arg Ser Pro Cys Lys Asn Lys Gly Thr Cys Val Gln Lys Lys Ala
1070 1075 1080

【 0 1 7 9】

50

【化 2 4】

Glu Ser Gln Cys Leu Cys Pro Ser Gly Trp Ala Gly Ala Tyr Cys
 1085 1090 1095

Asp Val Pro Asn Val Ser Cys Asp Ile Ala Ala Ser Arg Arg Gly
 1100 1105 1110

Val Leu Val Glu His Leu Cys Gln His Ser Gly Val Cys Ile Asn
 1115 1120 1125

Ala Gly Asn Thr His Tyr Cys Gln Cys Pro Leu Gly Tyr Thr Gly
 1130 1135 1140

Ser Tyr Cys Glu Glu Gln Leu Asp Glu Cys Ala Ser Asn Pro Cys
 1145 1150 1155

Gln His Gly Ala Thr Cys Ser Asp Phe Ile Gly Gly Tyr Arg Cys
 1160 1165 1170

Glu Cys Val Pro Gly Tyr Gln Gly Val Asn Cys Glu Tyr Glu Val
 1175 1180 1185

Asp Glu Cys Gln Asn Gln Pro Cys Gln Asn Gly Gly Thr Cys Ile
 1190 1195 1200

Asp Leu Val Asn His Phe Lys Cys Ser Cys Pro Pro Gly Thr Arg
 1205 1210 1215

Gly Leu Leu Cys Glu Glu Asn Ile Asp Asp Cys Ala Arg Gly Pro
 1220 1225 1230

His Cys Leu Asn Gly Gly Gln Cys Met Asp Arg Ile Gly Gly Tyr
 1235 1240 1245

Ser Cys Arg Cys Leu Pro Gly Phe Ala Gly Glu Arg Cys Glu Gly
 1250 1255 1260

Asp Ile Asn Glu Cys Leu Ser Asn Pro Cys Ser Ser Glu Gly Ser
 1265 1270 1275

Leu Asp Cys Ile Gln Leu Thr Asn Asp Tyr Leu Cys Val Cys Arg
 1280 1285 1290

Ser Ala Phe Thr Gly Arg His Cys Glu Thr Phe Val Asp Val Cys
 1295 1300 1305

【 0 1 8 0】

10

20

30

40

50

【化 2 5】

Pro	Gln	Met	Pro	Cys	Leu	Asn	Gly	Gly	Thr	Cys	Ala	Val	Ala	Ser	
	1310					1315					1320				
Asn	Met	Pro	Asp	Gly	Phe	Ile	Cys	Arg	Cys	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	
	1325					1330					1335				
Gly	Ala	Arg	Cys	Gln	Ser	Ser	Cys	Gly	Gln	Val	Lys	Cys	Arg	Lys	
	1340					1345					1350				10
Gly	Glu	Gln	Cys	Val	His	Thr	Ala	Ser	Gly	Pro	Arg	Cys	Phe	Cys	
	1355					1360					1365				
Pro	Ser	Pro	Arg	Asp	Cys	Glu	Ser	Gly	Cys	Ala	Ser	Ser	Pro	Cys	
	1370					1375					1380				
Gln	His	Gly	Gly	Ser	Cys	His	Pro	Gln	Arg	Gln	Pro	Pro	Tyr	Tyr	
	1385					1390					1395				
Ser	Cys	Gln	Cys	Ala	Pro	Pro	Phe	Ser	Gly	Ser	Arg	Cys	Glu	Leu	
	1400					1405					1410				20
Tyr	Thr	Ala	Pro	Pro	Ser	Thr	Pro	Pro	Ala	Thr	Cys	Leu	Ser	Gln	
	1415					1420					1425				
Tyr	Cys	Ala	Asp	Lys	Ala	Arg	Asp	Gly	Val	Cys	Asp	Glu	Ala	Cys	
	1430					1435					1440				
Asn	Ser	His	Ala	Cys	Gln	Trp	Asp	Gly	Gly	Asp	Cys	Ser	Leu	Thr	
	1445					1450					1455				30
Met	Glu	Asn	Pro	Trp	Ala	Asn	Cys	Ser	Ser	Pro	Leu	Pro	Cys	Trp	
	1460					1465					1470				
Asp	Tyr	Ile	Asn	Asn	Gln	Cys	Asp	Glu	Leu	Cys	Asn	Thr	Val	Glu	
	1475					1480					1485				
Cys	Leu	Phe	Asp	Asn	Phe	Glu	Cys	Gln	Gly	Asn	Ser	Lys	Thr	Cys	
	1490					1495					1500				40
Lys	Tyr	Asp	Lys	Tyr	Cys	Ala	Asp	His	Phe	Lys	Asp	Asn	His	Cys	
	1505					1510					1515				
Asp	Gln	Gly	Cys	Asn	Ser	Glu	Glu	Cys	Gly	Trp	Asp	Gly	Leu	Asp	
	1520					1525					1530				

【 0 1 8 1】

【化 2 6】

Cys Ala Ala Asp Gln Pro Glu Asn Leu Ala Glu Gly Thr Leu Val
 1535 1540 1545

Ile Val Val Leu Met Pro Pro Glu Gln Leu Leu Gln Asp Ala Arg
 1550 1555 1560

Ser Phe Leu Arg Ala Leu Gly Thr Leu Leu His Thr Asn Leu Arg
 1565 1570 1575

10

Ile Lys Arg Asp Ser Gln Gly Glu Leu Met Val Tyr Pro Tyr Tyr
 1580 1585 1590

Gly Glu Lys Ser Ala Ala Met Lys Lys Gln Arg Met Thr Arg Arg
 1595 1600 1605

Ser Leu Pro Gly Glu Gln Glu Gln Glu Val Ala Gly Ser Lys Val
 1610 1615 1620

20

Phe Leu Glu Ile Asp Asn Arg Gln Cys Val Gln Asp Ser Asp His
 1625 1630 1635

Cys Phe Lys Asn Thr Asp Ala Ala Ala Ala Leu Leu Ala Ser His
 1640 1645 1650

Ala Ile Gln Gly Thr Leu Ser Tyr Pro Leu Val Ser Val Val Ser
 1655 1660 1665

Glu Ser Leu Thr Pro Glu Arg Thr Gln Leu Leu Tyr Leu Leu Ala
 1670 1675 1680

30

Val Ala Val Val Ile Ile Leu Phe Ile Ile Leu Leu Gly Val Ile
 1685 1690 1695

Met Ala Lys Arg Lys Arg Lys His Gly Ser Leu Trp Leu Pro Glu
 1700 1705 1710

Gly Phe Thr Leu Arg Arg Asp Ala Ser Asn His Lys Arg Arg Glu
 1715 1720 1725

40

Pro Val Gly Gln Asp Ala Val Gly Leu Lys Asn Leu Ser Val Gln
 1730 1735 1740

Val Ser Glu Ala Asn Leu Ile Gly Thr Gly Thr Ser Glu His Trp
 1745 1750 1755

【 0 1 8 2】

50

【化 2 7】

Val	Asp	Asp	Glu	Gly	Pro	Gln	Pro	Lys	Lys	Val	Lys	Ala	Glu	Asp	
	1760					1765					1770				
Glu	Ala	Leu	Leu	Ser	Glu	Glu	Asp	Asp	Pro	Ile	Asp	Arg	Arg	Pro	
	1775					1780					1785				
Trp	Thr	Gln	Gln	His	Leu	Glu	Ala	Ala	Asp	Ile	Arg	Arg	Thr	Pro	
	1790					1795					1800				
Ser	Leu	Ala	Leu	Thr	Pro	Pro	Gln	Ala	Glu	Gln	Glu	Val	Asp	Val	
	1805					1810					1815				
Leu	Asp	Val	Asn	Val	Arg	Gly	Pro	Asp	Gly	Cys	Thr	Pro	Leu	Met	
	1820					1825					1830				
Leu	Ala	Ser	Leu	Arg	Gly	Gly	Ser	Ser	Asp	Leu	Ser	Asp	Glu	Asp	
	1835					1840					1845				
Glu	Asp	Ala	Glu	Asp	Ser	Ser	Ala	Asn	Ile	Ile	Thr	Asp	Leu	Val	10
	1850					1855					1860				
Tyr	Gln	Gly	Ala	Ser	Leu	Gln	Ala	Gln	Thr	Asp	Arg	Thr	Gly	Glu	
	1865					1870					1875				
Met	Ala	Leu	His	Leu	Ala	Ala	Arg	Tyr	Ser	Arg	Ala	Asp	Ala	Ala	
	1880					1885					1890				
Lys	Arg	Leu	Leu	Asp	Ala	Gly	Ala	Asp	Ala	Asn	Ala	Gln	Asp	Asn	30
	1895					1900					1905				
Met	Gly	Arg	Cys	Pro	Leu	His	Ala	Ala	Val	Ala	Ala	Asp	Ala	Gln	
	1910					1915					1920				
Gly	Val	Phe	Gln	Ile	Leu	Ile	Arg	Asn	Arg	Val	Thr	Asp	Leu	Asp	
	1925					1930					1935				
Ala	Arg	Met	Asn	Asp	Gly	Thr	Thr	Pro	Leu	Ile	Leu	Ala	Ala	Arg	40
	1940					1945					1950				
Leu	Ala	Val	Glu	Gly	Met	Val	Ala	Glu	Leu	Ile	Asn	Cys	Gln	Ala	
	1955					1960					1965				
Asp	Val	Asn	Ala	Val	Asp	Asp	His	Gly	Lys	Ser	Ala	Leu	His	Trp	
	1970					1975					1980				

【 0 1 8 3】

【化 2 8】

Ala Ala Ala Val Asn Asn Val Glu Ala Thr Leu Leu Leu Leu Lys
1985 1990 1995

Asn Gly Ala Asn Arg Asp Met Gln Asp Asn Lys Glu Glu Thr Pro
2000 2005 2010

Leu Phe Leu Ala Ala Arg Glu Gly Ser Tyr Glu Ala Ala Lys Ile
2015 2020 2025

10

Leu Leu Asp His Phe Ala Asn Arg Asp Ile Thr Asp His Met Asp
2030 2035 2040

Arg Leu Pro Arg Asp Val Ala Arg Asp Arg Met His His Asp Ile
2045 2050 2055

Val Arg Leu Leu Asp Glu Tyr Asn Val Thr Pro Ser Pro Pro Gly
2060 2065 2070

20

Thr Val Leu Thr Ser Ala Leu Ser Pro Val Ile Cys Gly Pro Asn
2075 2080 2085

Arg Ser Phe Leu Ser Leu Lys His Thr Pro Met Gly Lys Lys Ser
2090 2095 2100

Arg Arg Pro Ser Ala Lys Ser Thr Met Pro Thr Ser Leu Pro Asn
2105 2110 2115

Leu Ala Lys Glu Ala Lys Asp Ala Lys Gly Ser Arg Arg Lys Lys
2120 2125 2130

30

Ser Leu Ser Glu Lys Val Gln Leu Ser Glu Ser Ser Val Thr Leu
2135 2140 2145

Ser Pro Val Asp Ser Leu Glu Ser Pro His Thr Tyr Val Ser Asp
2150 2155 2160

Thr Thr Ser Ser Pro Met Ile Thr Ser Pro Gly Ile Leu Gln Ala
2165 2170 2175

40

Ser Pro Asn Pro Met Leu Ala Thr Ala Ala Pro Pro Ala Pro Val
2180 2185 2190

His Ala Gln His Ala Leu Ser Phe Ser Asn Leu His Glu Met Gln
2195 2200 2205

【 0 1 8 4】

50

【化 2 9】

Pro	Leu	Ala	His	Gly	Ala	Ser	Thr	Val	Leu	Pro	Ser	Val	Ser	Gln	
	2210					2215					2220				
Leu	Leu	Ser	His	His	His	Ile	Val	Ser	Pro	Gly	Ser	Gly	Ser	Ala	
	2225					2230					2235				
Gly	Ser	Leu	Ser	Arg	Leu	His	Pro	Val	Pro	Val	Pro	Ala	Asp	Trp	
	2240					2245					2250				
Met	Asn	Arg	Met	Glu	Val	Asn	Glu	Thr	Gln	Tyr	Asn	Glu	Met	Phe	
	2255					2260					2265				
Gly	Met	Val	Leu	Ala	Pro	Ala	Glu	Gly	Thr	His	Pro	Gly	Ile	Ala	
	2270					2275					2280				
Pro	Gln	Ser	Arg	Pro	Pro	Glu	Gly	Lys	His	Ile	Thr	Thr	Pro	Arg	
	2285					2290					2295				
Glu	Pro	Leu	Pro	Pro	Ile	Val	Thr	Phe	Gln	Leu	Ile	Pro	Lys	Gly	
	2300					2305					2310				
Ser	Ile	Ala	Gln	Pro	Ala	Gly	Ala	Pro	Gln	Pro	Gln	Ser	Thr	Cys	
	2315					2320					2325				
Pro	Pro	Ala	Val	Ala	Gly	Pro	Leu	Pro	Thr	Met	Tyr	Gln	Ile	Pro	
	2330					2335					2340				
Glu	Met	Ala	Arg	Leu	Pro	Ser	Val	Ala	Phe	Pro	Thr	Ala	Met	Met	
	2345					2350					2355				
Pro	Gln	Gln	Asp	Gly	Gln	Val	Ala	Gln	Thr	Ile	Leu	Pro	Ala	Tyr	
	2360					2365					2370				
His	Pro	Phe	Pro	Ala	Ser	Val	Gly	Lys	Tyr	Pro	Thr	Pro	Pro	Ser	
	2375					2380					2385				
Gln	His	Ser	Tyr	Ala	Ser	Ser	Asn	Ala	Ala	Glu	Arg	Thr	Pro	Ser	
	2390					2395					2400				
His	Ser	Gly	His	Leu	Gln	Gly	Glu	His	Pro	Tyr	Leu	Thr	Pro	Ser	
	2405					2410					2415				
Pro	Glu	Ser	Pro	Asp	Gln	Trp	Ser	Ser	Ser	Ser	Pro	His	Ser	Ala	
	2420					2425					2430				

10

20

30

40

【 0 1 8 5】

50

【化 3 0】

Ser Asp Trp Ser Asp Val Thr Thr Ser Pro Thr Pro Gly Gly Ala
2435 2440 2445

Gly Gly Gly Gln Arg Gly Pro Gly Thr His Met Ser Glu Pro Pro
2450 2455 2460

His Asn Asn Met Gln Val Tyr Ala
2465 2470

10

<210> 3
<211> 2321
<212> PRT
<213> ヒト

<400> 3

Met Gly Pro Gly Ala Arg Gly Arg Arg Arg Arg Arg Arg Pro Met Ser
1 5 10 15

Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Val Arg Ala Leu Pro Leu Leu Leu Leu
20 25 30

20

Leu Ala Gly Pro Gly Ala Ala Ala Pro Pro Cys Leu Asp Gly Ser Pro
35 40 45

Cys Ala Asn Gly Gly Arg Cys Thr Gln Leu Pro Ser Arg Glu Ala Ala
50 55 60

Cys Leu Cys Pro Pro Gly Trp Val Gly Glu Arg Cys Gln Leu Glu Asp
65 70 75 80

30

Pro Cys His Ser Gly Pro Cys Ala Gly Arg Gly Val Cys Gln Ser Ser
85 90 95

Val Val Ala Gly Thr Ala Arg Phe Ser Cys Arg Cys Pro Arg Gly Phe
100 105 110

Arg Gly Pro Asp Cys Ser Leu Pro Asp Pro Cys Leu Ser Ser Pro Cys
115 120 125

40

Ala His Gly Ala Arg Cys Ser Val Gly Pro Asp Gly Arg Phe Leu Cys
130 135 140

Ser Cys Pro Pro Gly Tyr Gln Gly Arg Ser Cys Arg Ser Asp Val Asp
145 150 155 160

Glu Cys Arg Val Gly Glu Pro Cys Arg His Gly Gly Thr Cys Leu Asn

【 0 1 8 6】

50

【化 3 2】

				405						410						415	
Cys	Gln	Cys	Gly	Arg	Gly	Tyr	Thr	Gly	Pro	Arg	Cys	Glu	Thr	Asp	Val		
			420					425					430				
Asn	Glu	Cys	Leu	Ser	Gly	Pro	Cys	Arg	Asn	Gln	Ala	Thr	Cys	Leu	Asp		
		435					440					445					
Arg	Ile	Gly	Gln	Phe	Thr	Cys	Ile	Cys	Met	Ala	Gly	Phe	Thr	Gly	Thr		
	450					455					460						
Tyr	Cys	Glu	Val	Asp	Ile	Asp	Glu	Cys	Gln	Ser	Ser	Pro	Cys	Val	Asn		
465					470					475					480		
Gly	Gly	Val	Cys	Lys	Asp	Arg	Val	Asn	Gly	Phe	Ser	Cys	Thr	Cys	Pro		
				485					490						495		
Ser	Gly	Phe	Ser	Gly	Ser	Thr	Cys	Gln	Leu	Asp	Val	Asp	Glu	Cys	Ala		
			500					505					510				
Ser	Thr	Pro	Cys	Arg	Asn	Gly	Ala	Lys	Cys	Val	Asp	Gln	Pro	Asp	Gly		
		515					520					525					
Tyr	Glu	Cys	Arg	Cys	Ala	Glu	Gly	Phe	Glu	Gly	Thr	Leu	Cys	Asp	Arg		
	530					535					540						
Asn	Val	Asp	Asp	Cys	Ser	Pro	Asp	Pro	Cys	His	His	Gly	Arg	Cys	Val		
545					550					555					560		
Asp	Gly	Ile	Ala	Ser	Phe	Ser	Cys	Ala	Cys	Ala	Pro	Gly	Tyr	Thr	Gly		
				565					570					575			
Thr	Arg	Cys	Glu	Ser	Gln	Val	Asp	Glu	Cys	Arg	Ser	Gln	Pro	Cys	Arg		
			580					585						590			
His	Gly	Gly	Lys	Cys	Leu	Asp	Leu	Val	Asp	Lys	Tyr	Leu	Cys	Arg	Cys		
		595					600					605					
Pro	Ser	Gly	Thr	Thr	Gly	Val	Asn	Cys	Glu	Val	Asn	Ile	Asp	Asp	Cys		
		610				615					620						
Ala	Ser	Asn	Pro	Cys	Thr	Phe	Gly	Val	Cys	Arg	Asp	Gly	Ile	Asn	Arg		
625					630					635					640		
Tyr	Asp	Cys	Val	Cys	Gln	Pro	Gly	Phe	Thr	Gly	Pro	Leu	Cys	Asn	Val		

10

20

30

40

【 0 1 8 8 】

50

【化 3 3】

				645						650						655			
Glu	Ile	Asn	Glu	Cys	Ala	Ser	Ser	Pro	Cys	Gly	Glu	Gly	Gly	Ser	Cys				
			660					665							670				
Val	Asp	Gly	Glu	Asn	Gly	Phe	Arg	Cys	Leu	Cys	Pro	Pro	Gly	Ser	Leu				
		675					680						685						
Pro	Pro	Leu	Cys	Leu	Pro	Pro	Ser	His	Pro	Cys	Ala	His	Glu	Pro	Cys				
	690					695				700									
Ser	His	Gly	Ile	Cys	Tyr	Asp	Ala	Pro	Gly	Gly	Phe	Arg	Cys	Val	Cys				
705					710					715					720				
Glu	Pro	Gly	Trp	Ser	Gly	Pro	Arg	Cys	Ser	Gln	Ser	Leu	Ala	Arg	Asp				
				725					730						735				
Ala	Cys	Glu	Ser	Gln	Pro	Cys	Arg	Ala	Gly	Gly	Thr	Cys	Ser	Ser	Asp				
			740					745					750						
Gly	Met	Gly	Phe	His	Cys	Thr	Cys	Pro	Pro	Gly	Val	Gln	Gly	Arg	Gln				
		755					760					765							
Cys	Glu	Leu	Leu	Ser	Pro	Cys	Thr	Pro	Asn	Pro	Cys	Glu	His	Gly	Gly				
	770					775					780								
Arg	Cys	Glu	Ser	Ala	Pro	Gly	Gln	Leu	Pro	Val	Cys	Ser	Cys	Pro	Gln				
785					790					795					800				
Gly	Trp	Gln	Gly	Pro	Arg	Cys	Gln	Gln	Asp	Val	Asp	Glu	Cys	Ala	Gly				
				805					810					815					
Pro	Ala	Pro	Cys	Gly	Pro	His	Gly	Ile	Cys	Thr	Asn	Leu	Ala	Gly	Ser				
			820					825					830						
Phe	Ser	Cys	Thr	Cys	His	Gly	Gly	Tyr	Thr	Gly	Pro	Ser	Cys	Asp	Gln				
		835					840					845							
Asp	Ile	Asn	Asp	Cys	Asp	Pro	Asn	Pro	Cys	Leu	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys				
	850					855					860								
Gln	Asp	Gly	Val	Gly	Ser	Phe	Ser	Cys	Ser	Cys	Leu	Pro	Gly	Phe	Ala				
865					870					875					880				
Gly	Pro	Arg	Cys	Ala	Arg	Asp	Val	Asp	Glu	Cys	Leu	Ser	Asn	Pro	Cys				

【 0 1 8 9】

50

【化 3 4】

															885																890																895
															Gly	Pro	Gly	Thr	Cys	Thr	Asp	His	Val	Ala	Ser	Phe	Thr	Cys	Thr	Cys																	
																			900											910																	
															Pro	Pro	Gly	Tyr	Gly	Gly	Phe	His	Cys	Glu	Gln	Asp	Leu	Pro	Asp	Cys																	
																	915					920								925																	
															Ser	Pro	Ser	Ser	Cys	Phe	Asn	Gly	Gly	Thr	Cys	Val	Asp	Gly	Val	Asn																	
																930					935					940																					
															Ser	Phe	Ser	Cys	Leu	Cys	Arg	Pro	Gly	Tyr	Thr	Gly	Ala	His	Cys	Gln																	
															945					950					955					960																	
															His	Glu	Ala	Asp	Pro	Cys	Leu	Ser	Arg	Pro	Cys	Leu	His	Gly	Gly	Val																	
																			965					970						975																	
															Cys	Ser	Ala	Ala	His	Pro	Gly	Phe	Arg	Cys	Thr	Cys	Leu	Glu	Ser	Phe																	
																	980						985					990																			
															Thr	Gly	Pro	Gln	Cys	Gln	Thr	Leu	Val	Asp	Trp	Cys	Ser	Arg	Gln	Pro																	
																	995					1000						1005																			
															Cys	Gln	Asn	Gly	Gly	Arg	Cys	Val	Gln	Thr	Gly	Ala	Tyr	Cys	Leu																		
																1010					1015					1020																					
															Cys	Pro	Pro	Gly	Trp	Ser	Gly	Arg	Leu	Cys	Asp	Ile	Arg	Ser	Leu																		
																1025					1030					1035																					
															Pro	Cys	Arg	Glu	Ala	Ala	Ala	Gln	Ile	Gly	Val	Arg	Leu	Glu	Gln																		
																1040					1045					1050																					
															Leu	Cys	Gln	Ala	Gly	Gly	Gln	Cys	Val	Asp	Glu	Asp	Ser	Ser	His																		
																1055					1060					1065																					
															Tyr	Cys	Val	Cys	Pro	Glu	Gly	Arg	Thr	Gly	Ser	His	Cys	Glu	Gln																		
																1070					1075					1080																					
															Glu	Val	Asp	Pro	Cys	Leu	Ala	Gln	Pro	Cys	Gln	His	Gly	Gly	Thr																		
																1085					1090					1095																					
															Cys	Arg	Gly	Tyr	Met	Gly	Gly	Tyr	Met	Cys	Glu	Cys	Leu	Pro	Gly																		
																1100					1105					1110																					
															Tyr	Asn	Gly	Asp	Asn	Cys	Glu	Asp	Asp	Val	Asp	Glu	Cys	Ala	Ser																		

【 0 1 9 0 】

50

【化 3 9】

2015			2020			2025									
Gly	Pro	Arg	Ser	Pro	Pro	Gly	Pro	His	Gly	Leu	Gly	Pro	Leu	Leu	
2030						2035					2040				
Cys	Pro	Pro	Gly	Ala	Phe	Leu	Pro	Gly	Leu	Lys	Ala	Ala	Gln	Ser	
2045						2050					2055				
Gly	Ser	Lys	Lys	Ser	Arg	Arg	Pro	Pro	Gly	Lys	Ala	Gly	Leu	Gly	10
2060						2065					2070				
Pro	Gln	Gly	Pro	Arg	Gly	Arg	Gly	Lys	Lys	Leu	Thr	Leu	Ala	Cys	
2075						2080					2085				
Pro	Gly	Pro	Leu	Ala	Asp	Ser	Ser	Val	Thr	Leu	Ser	Pro	Val	Asp	
2090						2095					2100				
Ser	Leu	Asp	Ser	Pro	Arg	Pro	Phe	Gly	Gly	Pro	Pro	Ala	Ser	Pro	20
2105						2110					2115				
Gly	Gly	Phe	Pro	Leu	Glu	Gly	Pro	Tyr	Ala	Ala	Ala	Thr	Ala	Thr	
2120						2125					2130				
Ala	Val	Ser	Leu	Ala	Gln	Leu	Gly	Gly	Pro	Gly	Arg	Ala	Gly	Leu	
2135						2140					2145				
Gly	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Gly	Cys	Val	Leu	Ser	Leu	Gly	Leu	Leu	30
2150						2155					2160				
Asn	Pro	Val	Ala	Val	Pro	Leu	Asp	Trp	Ala	Arg	Leu	Pro	Pro	Pro	
2165						2170					2175				
Ala	Pro	Pro	Gly	Pro	Ser	Phe	Leu	Leu	Pro	Leu	Ala	Pro	Gly	Pro	
2180						2185					2190				
Gln	Leu	Leu	Asn	Pro	Gly	Thr	Pro	Val	Ser	Pro	Gln	Glu	Arg	Pro	
2195						2200					2205				
Pro	Pro	Tyr	Leu	Ala	Val	Pro	Gly	His	Gly	Glu	Glu	Tyr	Pro	Val	
2210						2215					2220				
Ala	Gly	Ala	His	Ser	Ser	Pro	Pro	Lys	Ala	Arg	Phe	Leu	Arg	Val	
2225						2230					2235				
Pro	Ser	Glu	His	Pro	Tyr	Leu	Thr	Pro	Ser	Pro	Glu	Ser	Pro	Glu	

【 0 1 9 5 】

【化 4 1】

Arg Gly Arg Cys His Ile Gln Ala Ser Gly Arg Pro Gln Cys Ser Cys
 130 135 140

Met Pro Gly Trp Thr Gly Glu Gln Cys Gln Leu Arg Asp Phe Cys Ser
 145 150 155 160

Ala Asn Pro Cys Val Asn Gly Gly Val Cys Leu Ala Thr Tyr Pro Gln
 165 170 175

10

Ile Gln Cys His Cys Pro Pro Gly Phe Glu Gly His Ala Cys Glu Arg
 180 185 190

Asp Val Asn Glu Cys Phe Gln Asp Pro Gly Pro Cys Pro Lys Gly Thr
 195 200 205

Ser Cys His Asn Thr Leu Gly Ser Phe Gln Cys Leu Cys Pro Val Gly
 210 215 220

20

Gln Glu Gly Pro Arg Cys Glu Leu Arg Ala Gly Pro Cys Pro Pro Arg
 225 230 235 240

Gly Cys Ser Asn Gly Gly Thr Cys Gln Leu Met Pro Glu Lys Asp Ser
 245 250 255

Thr Phe His Leu Cys Leu Cys Pro Pro Gly Phe Ile Gly Pro Gly Cys
 260 265 270

Glu Val Asn Pro Asp Asn Cys Val Ser His Gln Cys Gln Asn Gly Gly
 275 280 285

30

Thr Cys Gln Asp Gly Leu Asp Thr Tyr Thr Cys Leu Cys Pro Glu Thr
 290 295 300

Trp Thr Gly Trp Asp Cys Ser Glu Asp Val Asp Glu Cys Glu Ala Gln
 305 310 315 320

Gly Pro Pro His Cys Arg Asn Gly Gly Thr Cys Gln Asn Ser Ala Gly
 325 330 335

40

Ser Phe His Cys Val Cys Val Ser Gly Trp Gly Gly Thr Ser Cys Glu
 340 345 350

Glu Asn Leu Asp Asp Cys Ile Ala Ala Thr Cys Ala Pro Gly Ser Thr
 355 360 365

【 0 1 9 7 】

50

【化 4 2】

Cys Ile Asp Arg Val Gly Ser Phe Ser Cys Leu Cys Pro Pro Gly Arg
 370 375 380

Thr Gly Leu Leu Cys His Leu Glu Asp Met Cys Leu Ser Gln Pro Cys
 385 390 395 400

His Gly Asp Ala Gln Cys Ser Thr Asn Pro Leu Thr Gly Ser Thr Leu
 405 410 415

Cys Leu Cys Gln Pro Gly Tyr Ser Gly Pro Thr Cys His Gln Asp Leu
 420 425 430

Asp Glu Cys Leu Met Ala Gln Gln Gly Pro Ser Pro Cys Glu His Gly
 435 440 445

Gly Ser Cys Leu Asn Thr Pro Gly Ser Phe Asn Cys Leu Cys Pro Pro
 450 455 460

Gly Tyr Thr Gly Ser Arg Cys Glu Ala Asp His Asn Glu Cys Leu Ser
 465 470 475 480

Gln Pro Cys His Pro Gly Ser Thr Cys Leu Asp Leu Leu Ala Thr Phe
 485 490 495

His Cys Leu Cys Pro Pro Gly Leu Glu Gly Gln Leu Cys Glu Val Glu
 500 505 510

Thr Asn Glu Cys Ala Ser Ala Pro Cys Leu Asn His Ala Asp Cys His
 515 520 525

Asp Leu Leu Asn Gly Phe Gln Cys Ile Cys Leu Pro Gly Phe Ser Gly
 530 535 540

Thr Arg Cys Glu Glu Asp Ile Asp Glu Cys Arg Ser Ser Pro Cys Ala
 545 550 555 560

Asn Gly Gly Gln Cys Gln Asp Gln Pro Gly Ala Phe His Cys Lys Cys
 565 570 575

Leu Pro Gly Phe Glu Gly Pro Arg Cys Gln Thr Glu Val Asp Glu Cys
 580 585 590

Leu Ser Asp Pro Cys Pro Val Gly Ala Ser Cys Leu Asp Leu Pro Gly
 595 600 605

Ala Phe Phe Cys Leu Cys Pro Ser Gly Phe Thr Gly Gln Leu Cys Glu
 610 615 620

【 0 1 9 8 】

10

20

30

40

50

【化 4 3】

Val Pro Leu Cys Ala Pro Asn Leu Cys Gln Pro Lys Gln Ile Cys Lys
625 630 635 640

Asp Gln Lys Asp Lys Ala Asn Cys Leu Cys Pro Asp Gly Ser Pro Gly
645 650 655

Cys Ala Pro Pro Glu Asp Asn Cys Thr Cys His His Gly His Cys Gln
660 665 670

10

Arg Ser Ser Cys Val Cys Asp Val Gly Trp Thr Gly Pro Glu Cys Glu
675 680 685

Ala Glu Leu Gly Gly Cys Ile Ser Ala Pro Cys Ala His Gly Gly Thr
690 695 700

Cys Tyr Pro Gln Pro Ser Gly Tyr Asn Cys Thr Cys Pro Thr Gly Tyr
705 710 715 720

20

Thr Gly Pro Thr Cys Ser Glu Glu Met Thr Ala Cys His Ser Gly Pro
725 730 735

Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Asn Pro Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Cys
740 745 750

Thr Cys Pro Pro Ser His Thr Gly Pro Gln Cys Gln Thr Ser Thr Asp
755 760 765

Tyr Cys Val Ser Ala Pro Cys Phe Asn Gly Gly Thr Cys Val Asn Arg
770 775 780

30

Pro Gly Thr Phe Ser Cys Leu Cys Ala Met Gly Phe Gln Gly Pro Arg
785 790 795 800

Cys Glu Gly Lys Leu Arg Pro Ser Cys Ala Asp Ser Pro Cys Arg Asn
805 810 815

Arg Ala Thr Cys Gln Asp Ser Pro Gln Gly Pro Arg Cys Leu Cys Pro
820 825 830

40

Thr Gly Tyr Thr Gly Gly Ser Cys Gln Thr Leu Met Asp Leu Cys Ala
835 840 845

Gln Lys Pro Cys Pro Arg Asn Ser His Cys Leu Gln Thr Gly Pro Ser
850 855 860

Phe His Cys Leu Cys Leu Gln Gly Trp Thr Gly Pro Leu Cys Asn Leu
865 870 875 880

【 0 1 9 9 】

50

【化 4 4】

Pro Leu Ser Ser Cys Gln Lys Ala Ala Leu Ser Gln Gly Ile Asp Val
 885 890 895

Ser Ser Leu Cys His Asn Gly Gly Leu Cys Val Asp Ser Gly Pro Ser
 900 905 910

Tyr Phe Cys His Cys Pro Pro Gly Phe Gln Gly Ser Leu Cys Gln Asp
 915 920 925

10

His Val Asn Pro Cys Glu Ser Arg Pro Cys Gln Asn Gly Ala Thr Cys
 930 935 940

Met Ala Gln Pro Ser Gly Tyr Leu Cys Gln Cys Ala Pro Gly Tyr Asp
 945 950 955 960

Gly Gln Asn Cys Ser Lys Glu Leu Asp Ala Cys Gln Ser Gln Pro Cys
 965 970 975

20

His Asn His Gly Thr Cys Thr Pro Lys Pro Gly Gly Phe His Cys Ala
 980 985 990

Cys Pro Pro Gly Phe Val Gly Leu Arg Cys Glu Gly Asp Val Asp Glu
 995 1000 1005

Cys Leu Asp Gln Pro Cys His Pro Thr Gly Thr Ala Ala Cys His
 1010 1015 1020

Ser Leu Ala Asn Ala Phe Tyr Cys Gln Cys Leu Pro Gly His Thr
 1025 1030 1035

30

Gly Gln Trp Cys Glu Val Glu Ile Asp Pro Cys His Ser Gln Pro
 1040 1045 1050

Cys Phe His Gly Gly Thr Cys Glu Ala Thr Ala Gly Ser Pro Leu
 1055 1060 1065

Gly Phe Ile Cys His Cys Pro Lys Gly Phe Glu Gly Pro Thr Cys
 1070 1075 1080

Ser His Arg Ala Pro Ser Cys Gly Phe His His Cys His His Gly
 1085 1090 1095

40

Gly Leu Cys Leu Pro Ser Pro Lys Pro Gly Phe Pro Pro Arg Cys
 1100 1105 1110

Ala Cys Leu Ser Gly Tyr Gly Gly Pro Asp Cys Leu Thr Pro Pro
 1115 1120 1125

【 0 2 0 0 】

50

【化 4 5】

Ala	Pro	Lys	Gly	Cys	Gly	Pro	Pro	Ser	Pro	Cys	Leu	Tyr	Asn	Gly	
1130						1135					1140				
Ser	Cys	Ser	Glu	Thr	Thr	Gly	Leu	Gly	Gly	Pro	Gly	Phe	Arg	Cys	
1145						1150					1155				
Ser	Cys	Pro	His	Ser	Ser	Pro	Gly	Pro	Arg	Cys	Gln	Lys	Pro	Gly	
1160						1165					1170				
Ala	Lys	Gly	Cys	Glu	Gly	Arg	Ser	Gly	Asp	Gly	Ala	Cys	Asp	Ala	
1175						1180					1185				
Gly	Cys	Ser	Gly	Pro	Gly	Gly	Asn	Trp	Asp	Gly	Gly	Asp	Cys	Ser	
1190						1195					1200				
Leu	Gly	Val	Pro	Asp	Pro	Trp	Lys	Gly	Cys	Pro	Ser	His	Ser	Arg	
1205						1210					1215				
Cys	Trp	Leu	Leu	Phe	Arg	Asp	Gly	Gln	Cys	His	Pro	Gln	Cys	Asp	
1220						1225					1230				
Ser	Glu	Glu	Cys	Leu	Phe	Asp	Gly	Tyr	Asp	Cys	Glu	Thr	Pro	Pro	
1235						1240					1245				
Ala	Cys	Thr	Pro	Ala	Tyr	Asp	Gln	Tyr	Cys	His	Asp	His	Phe	His	
1250						1255					1260				
Asn	Gly	His	Cys	Glu	Lys	Gly	Cys	Asn	Thr	Ala	Glu	Cys	Gly	Trp	
1265						1270					1275				
Asp	Gly	Gly	Asp	Cys	Arg	Pro	Glu	Asp	Gly	Asp	Pro	Glu	Trp	Gly	
1280						1285					1290				
Pro	Ser	Leu	Ala	Leu	Leu	Val	Val	Leu	Ser	Pro	Pro	Ala	Leu	Asp	
1295						1300					1305				
Gln	Gln	Leu	Phe	Ala	Leu	Ala	Arg	Val	Leu	Ser	Leu	Thr	Leu	Arg	
1310						1315					1320				
Val	Gly	Leu	Trp	Val	Arg	Lys	Asp	Arg	Asp	Gly	Arg	Asp	Met	Val	
1325						1330					1335				
Tyr	Pro	Tyr	Pro	Gly	Ala	Arg	Ala	Glu	Glu	Lys	Leu	Gly	Gly	Thr	
1340						1345					1350				
Arg	Asp	Pro	Thr	Tyr	Gln	Glu	Arg	Ala	Ala	Pro	Gln	Thr	Gln	Pro	
1355						1360					1365				

10

20

30

40

【 0 2 0 1】

50

【化 4 6】

Leu Gly 1370	Lys Glu Thr Asp 1375	Ser 1375	Leu Ser Ala Gly Phe 1380	Val Val Val	
Met Gly 1385	Val Asp Leu Ser 1390	Arg 1390	Cys Gly Pro Asp His 1395	Pro Ala Ser	
Arg Cys 1400	Pro Trp Asp Pro 1405	Gly 1405	Leu Leu Leu Arg Phe 1410	Leu Ala Ala	10
Met Ala 1415	Ala Val Gly Ala 1420	Leu 1420	Glu Pro Leu Leu Pro 1425	Gly Pro Leu	
Leu Ala 1430	Val His Pro His 1435	Ala 1435	Gly Thr Ala Pro Pro 1440	Ala Asn Gln	
Leu Pro 1445	Trp Pro Val Leu 1450	Cys 1450	Ser Pro Val Ala Gly 1455	Val Ile Leu	20
Leu Ala 1460	Leu Gly Ala Leu 1465	Leu 1465	Val Leu Gln Leu Ile 1470	Arg Arg Arg	
Arg Arg 1475	Glu His Gly Ala 1480	Leu 1480	Trp Leu Pro Pro Gly 1485	Phe Thr Arg	
Arg Pro 1490	Arg Thr Gln Ser 1495	Ala 1495	Pro His Arg Arg Arg 1500	Pro Pro Leu	
Gly Glu 1505	Asp Ser Ile Gly 1510	Leu 1510	Lys Ala Leu Lys Pro 1515	Lys Ala Glu	30
Val Asp 1520	Glu Asp Gly Val 1525	Val 1525	Met Cys Ser Gly Pro 1530	Glu Glu Gly	
Glu Glu 1535	Ala Glu Glu Thr 1540	Gly 1540	Pro Pro Ser Thr Cys 1545	Gln Leu Trp	
Ser Leu 1550	Ser Gly Gly Cys 1555	Gly 1555	Ala Leu Pro Gln Ala 1560	Ala Met Leu	
Thr Pro 1565	Pro Gln Glu Ser 1570	Glu 1570	Met Glu Ala Pro Asp 1575	Leu Asp Thr	40
Arg Gly 1580	Pro Asp Gly Val 1585	Thr 1585	Pro Leu Met Ser Ala 1590	Val Cys Cys	
Gly Glu 1595	Val Gln Ser Gly 1600	Thr 1600	Phe Gln Gly Ala Trp 1605	Leu Gly Cys	

【 0 2 0 2】

【化 4 7】

Pro	Glu	Pro	Trp	Glu	Pro	Leu	Leu	Asp	Gly	Gly	Ala	Cys	Pro	Gln	
	1610					1615					1620				
Ala	His	Thr	Val	Gly	Thr	Gly	Glu	Thr	Pro	Leu	His	Leu	Ala	Ala	
	1625					1630					1635				
Arg	Phe	Ser	Arg	Pro	Thr	Ala	Ala	Arg	Arg	Leu	Leu	Glu	Ala	Gly	
	1640					1645					1650				
Ala	Asn	Pro	Asn	Gln	Pro	Asp	Arg	Ala	Gly	Arg	Thr	Pro	Leu	His	
	1655					1660					1665				
Ala	Ala	Val	Ala	Ala	Asp	Ala	Arg	Glu	Val	Cys	Gln	Leu	Leu	Leu	
	1670					1675					1680				
Arg	Ser	Arg	Gln	Thr	Ala	Val	Asp	Ala	Arg	Thr	Glu	Asp	Gly	Thr	
	1685					1690					1695				
Thr	Pro	Leu	Met	Leu	Ala	Ala	Arg	Leu	Ala	Val	Glu	Asp	Leu	Val	
	1700					1705					1710				20
Glu	Glu	Leu	Ile	Ala	Ala	Gln	Ala	Asp	Val	Gly	Ala	Arg	Asp	Lys	
	1715					1720					1725				
Trp	Gly	Lys	Thr	Ala	Leu	His	Trp	Ala	Ala	Ala	Val	Asn	Asn	Ala	
	1730					1735					1740				
Arg	Ala	Ala	Arg	Ser	Leu	Leu	Gln	Ala	Gly	Ala	Asp	Lys	Asp	Ala	
	1745					1750					1755				30
Gln	Asp	Asn	Arg	Glu	Gln	Thr	Pro	Leu	Phe	Leu	Ala	Ala	Arg	Glu	
	1760					1765					1770				
Gly	Ala	Val	Glu	Val	Ala	Gln	Leu	Leu	Leu	Gly	Leu	Gly	Ala	Ala	
	1775					1780					1785				
Arg	Glu	Leu	Arg	Asp	Gln	Ala	Gly	Leu	Ala	Pro	Ala	Asp	Val	Ala	
	1790					1795					1800				
His	Gln	Arg	Asn	His	Trp	Asp	Leu	Leu	Thr	Leu	Leu	Glu	Gly	Ala	
	1805					1810					1815				40
Gly	Pro	Pro	Glu	Ala	Arg	His	Lys	Ala	Thr	Pro	Gly	Arg	Glu	Ala	
	1820					1825					1830				
Gly	Pro	Phe	Pro	Arg	Ala	Arg	Thr	Val	Ser	Val	Ser	Val	Pro	Pro	
	1835					1840					1845				

【 0 2 0 3】

10

20

30

40

50

【化 4 8】

His Gly Gly Gly Ala Leu Pro Arg Cys Arg Thr Leu Ser Ala Gly
 1850 1855 1860

Ala Gly Pro Arg Gly Gly Gly Ala Cys Leu Gln Ala Arg Thr Trp
 1865 1870 1875

Ser Val Asp Leu Ala Ala Arg Gly Gly Gly Ala Tyr Ser His Cys
 1880 1885 1890

Arg Ser Leu Ser Gly Val Gly Ala Gly Gly Gly Pro Thr Pro Arg
 1895 1900 1905

Gly Arg Arg Phe Ser Ala Gly Met Arg Gly Pro Arg Pro Asn Pro
 1910 1915 1920

Ala Ile Met Arg Gly Arg Tyr Gly Val Ala Ala Gly Arg Gly Gly
 1925 1930 1935

Arg Val Ser Thr Asp Asp Trp Pro Cys Asp Trp Val Ala Leu Gly
 1940 1945 1950

Ala Cys Gly Ser Ala Ser Asn Ile Pro Ile Pro Pro Pro Cys Leu
 1955 1960 1965

Thr Pro Ser Pro Glu Arg Gly Ser Pro Gln Leu Asp Cys Gly Pro
 1970 1975 1980

Pro Ala Leu Gln Glu Met Pro Ile Asn Gln Gly Gly Glu Gly Lys
 1985 1990 1995

Lys

<210> 5
 <211> 651
 <212> PRT
 <213> ㄷ ㄸ

<400> 5

Met Asn Lys Leu Arg Gln Ser Phe Arg Arg Lys Lys Asp Val Tyr Val
 1 5 10 15

Pro Glu Ala Ser Arg Pro His Gln Trp Gln Thr Asp Glu Glu Gly Val
 20 25 30

Arg Thr Gly Lys Cys Ser Phe Pro Val Lys Tyr Leu Gly His Val Glu

【 0 2 0 4】

10

20

30

40

50

【化 5 0】

275	280	285	
Pro Phe Lys Arg Gln Leu Ser Leu Arg Ile Asn Glu Leu Pro Ser Thr 290	295	300	
Met Gln Arg Lys Thr Asp Phe Pro Ile Lys Asn Ala Val Pro Glu Val 305	310	315	10
Glu Gly Glu Ala Glu Ser Ile Ser Ser Leu Cys Ser Gln Ile Thr Asn 325	330	335	
Ala Phe Ser Thr Pro Glu Asp Pro Phe Ser Ser Ala Pro Met Thr Lys 340	345	350	
Pro Val Thr Val Val Ala Pro Gln Ser Pro Thr Phe Gln Ala Asn Gly 355	360	365	
Thr Asp Ser Ala Phe His Val Leu Ala Lys Pro Ala His Thr Ala Leu 370	375	380	20
Ala Pro Val Ala Met Pro Val Arg Glu Thr Asn Pro Trp Ala His Ala 385	390	395	
Pro Asp Ala Ala Asn Lys Glu Ile Ala Ala Thr Cys Ser Gly Thr Glu 405	410	415	
Trp Gly Gln Ser Ser Gly Ala Ala Ser Pro Gly Leu Phe Gln Ala Gly 420	425	430	30
His Arg Arg Thr Pro Ser Glu Ala Asp Arg Trp Leu Glu Glu Val Ser 435	440	445	
Lys Ser Val Arg Ala Gln Gln Pro Gln Ala Ser Ala Ala Pro Leu Gln 450	455	460	
Pro Val Leu Gln Pro Pro Pro Pro Thr Ala Ile Ser Gln Pro Ala Ser 465	470	475	40
Pro Phe Gln Gly Asn Ala Phe Leu Thr Ser Gln Pro Val Pro Val Gly 485	490	495	
Val Val Pro Ala Leu Gln Pro Ala Phe Val Pro Ala Gln Ser Tyr Pro 500	505	510	
Val Ala Asn Gly Met Pro Tyr Pro Ala Pro Asn Val Pro Val Val Gly			

【 0 2 0 6】

【化 5 2】

Lys Lys Ala Val Lys Ala Val Leu Trp Val Ser Ala Asp Gly Leu Arg
85 90 95

Val Val Asp Glu Lys Thr Lys Asp Leu Ile Val Asp Gln Thr Ile Glu
100 105 110

Lys Val Ser Phe Cys Ala Pro Asp Arg Asn Phe Asp Arg Ala Phe Ser
115 120 125

10

Tyr Ile Cys Arg Asp Gly Thr Thr Arg Arg Trp Ile Cys His Cys Phe
130 135 140

Met Ala Val Lys Asp Thr Gly Glu Arg Leu Ser His Ala Val Gly Cys
145 150 155 160

Ala Phe Ala Ala Cys Leu Glu Arg Lys Gln Lys Arg Glu Lys Glu Cys
165 170 175

20

Gly Val Thr Ala Thr Phe Asp Ala Ser Arg Thr Thr Phe Thr Arg Glu
180 185 190

Gly Ser Phe Arg Val Thr Thr Ala Thr Glu Gln Ala Glu Arg Glu Glu
195 200 205

Ile Met Lys Gln Met Gln Asp Ala Lys Lys Ala Glu Thr Asp Lys Ile
210 215 220

Val Val Gly Ser Ser Val Ala Pro Gly Asn Thr Ala Pro Ser Pro Ser
225 230 235 240

30

Ser Pro Thr Ser Pro Thr Ser Asp Ala Thr Thr Ser Leu Glu Met Asn
245 250 255

Asn Pro His Ala Ile Pro Arg Arg His Ala Pro Ile Glu Gln Leu Ala
260 265 270

Arg Gln Gly Ser Phe Arg Gly Phe Pro Ala Leu Ser Gln Lys Met Ser
275 280 285

40

Pro Phe Lys Arg Gln Leu Ser Leu Arg Ile Asn Glu Leu Pro Ser Thr
290 295 300

Met Gln Arg Lys Thr Asp Phe Pro Ile Lys Asn Ala Val Pro Glu Val
305 310 315 320

【 0 2 0 8 】

50

【化 5 4】

Gly Thr Cys Pro Val Asp Pro Phe Glu Ala Gln Trp Ala Ala Leu Glu
 565 570 575

Asn Lys Ser Lys Gln Arg Thr Asn Pro Ser Pro Thr Asn Pro Phe Ser
 580 585 590

Ser Asp Leu Gln Lys Thr Phe Glu Ile Glu Leu
 595 600

10

<210> 7
 <211> 640
 <212> PRT
 <213> ヒト
 <400> 7

Met Asn Lys Leu Arg Gln Ser Phe Arg Arg Lys Lys Asp Val Tyr Val
 1 5 10 15

Pro Glu Ala Ser Arg Pro His Gln Trp Gln Thr Asp Glu Glu Gly Val
 20 25 30

20

Arg Thr Gly Lys Cys Ser Phe Pro Val Lys Tyr Leu Gly His Val Glu
 35 40 45

Val Asp Glu Ser Arg Gly Met His Ile Cys Glu Asp Ala Val Lys Arg
 50 55 60

Leu Lys Ala Thr Gly Lys Lys Ala Val Lys Ala Val Leu Trp Val Ser
 65 70 75 80

30

Ala Asp Gly Leu Arg Val Val Asp Glu Lys Thr Lys Asp Leu Ile Val
 85 90 95

Asp Gln Thr Ile Glu Lys Val Ser Phe Cys Ala Pro Asp Arg Asn Phe
 100 105 110

Asp Arg Ala Phe Ser Tyr Ile Cys Arg Asp Gly Thr Thr Arg Arg Trp
 115 120 125

40

Ile Cys His Cys Phe Met Ala Val Lys Asp Thr Gly Glu Arg Leu Ser
 130 135 140

His Ala Val Gly Cys Ala Phe Ala Ala Cys Leu Glu Arg Lys Gln Lys
 145 150 155 160

Arg Glu Lys Glu Cys Gly Val Thr Ala Thr Phe Asp Ala Ser Arg Thr

【 0 2 1 0 】

50

【化 5 7】

<211> 592

<212> PRT

<213> ヒト

<400> 8

Met Asn Lys Leu Arg Gln Ser Phe Arg Arg Lys Lys Asp Val Tyr Val
 1 5 10 15

Pro Glu Ala Ser Arg Pro His Gln Trp Gln Thr Asp Glu Glu Gly Val
 20 25 30

10

Arg Thr Gly Lys Cys Ser Phe Pro Val Lys Tyr Leu Gly His Val Glu
 35 40 45

Val Asp Glu Ser Arg Gly Met His Ile Cys Glu Asp Ala Val Lys Arg
 50 55 60

Leu Lys Ala Thr Gly Lys Lys Ala Val Lys Ala Val Leu Trp Val Ser
 65 70 75 80

20

Ala Asp Gly Leu Arg Val Val Asp Glu Lys Thr Lys Asp Leu Ile Val
 85 90 95

Asp Gln Thr Ile Glu Lys Val Ser Phe Cys Ala Pro Asp Arg Asn Phe
 100 105 110

Asp Arg Ala Phe Ser Tyr Ile Cys Arg Asp Gly Thr Thr Arg Arg Trp
 115 120 125

30

Ile Cys His Cys Phe Met Ala Val Lys Asp Thr Gly Glu Arg Leu Ser
 130 135 140

His Ala Val Gly Cys Ala Phe Ala Ala Cys Leu Glu Arg Lys Gln Lys
 145 150 155 160

Arg Glu Lys Glu Cys Gly Val Thr Ala Thr Phe Asp Ala Ser Arg Thr
 165 170 175

Thr Phe Thr Arg Glu Gly Ser Phe Arg Val Thr Thr Ala Thr Glu Gln
 180 185 190

40

Ala Glu Arg Glu Glu Ile Met Lys Gln Met Gln Asp Ala Lys Lys Ala
 195 200 205

Glu Thr Asp Lys Ile Val Val Gly Ser Ser Val Ala Pro Gly Asn Thr
 210 215 220

【 0 2 1 3 】

50

【化 5 8】

Ala Pro Ser Pro Ser Ser Pro Thr Ser Pro Thr Ser Asp Ala Thr Thr
225 230 235 240

Ser Leu Glu Met Asn Asn Pro His Ala Ile Pro Arg Arg His Ala Pro
245 250 255

Ile Glu Gln Leu Ala Arg Gln Gly Ser Phe Arg Gly Phe Pro Ala Leu
260 265 270

Ser Gln Lys Met Ser Pro Phe Lys Arg Gln Leu Ser Leu Arg Ile Asn
275 280 285

Glu Leu Pro Ser Thr Met Gln Arg Lys Thr Asp Phe Pro Ile Lys Asn
290 295 300

Ala Val Pro Glu Val Glu Gly Glu Ala Glu Ser Ile Ser Ser Leu Cys
305 310 315 320

Ser Gln Ile Thr Asn Ala Phe Ser Thr Pro Glu Asp Pro Phe Ser Ser
325 330 335

Ala Pro Met Thr Lys Pro Val Thr Val Val Ala Pro Gln Ser Pro Thr
340 345 350

Phe Gln Gly Thr Glu Trp Gly Gln Ser Ser Gly Ala Ala Ser Pro Gly
355 360 365

Leu Phe Gln Ala Gly His Arg Arg Thr Pro Ser Glu Ala Asp Arg Trp
370 375 380

Leu Glu Glu Val Ser Lys Ser Val Arg Ala Gln Gln Pro Gln Ala Ser
385 390 395 400

Ala Ala Pro Leu Gln Pro Val Leu Gln Pro Pro Pro Pro Thr Ala Ile
405 410 415

Ser Gln Pro Ala Ser Pro Phe Gln Gly Asn Ala Phe Leu Thr Ser Gln
420 425 430

Pro Val Pro Val Gly Val Val Pro Ala Leu Gln Pro Ala Phe Val Pro
435 440 445

Ala Gln Ser Tyr Pro Val Ala Asn Gly Met Pro Tyr Pro Ala Pro Asn
450 455 460

10

20

30

40

【 0 2 1 4 】

50

【化 5 9】

Val Pro Val Val Gly Ile Thr Pro Ser Gln Met Val Ala Asn Val Phe
465 470 475 480

Gly Thr Ala Gly His Pro Gln Ala Ala His Pro His Gln Ser Pro Ser
485 490 495

Leu Val Arg Gln Gln Thr Phe Pro His Tyr Glu Ala Ser Ser Ala Thr
500 505 510

10

Thr Ser Pro Phe Phe Lys Pro Pro Ala Gln His Leu Asn Gly Ser Ala
515 520 525

Ala Phe Asn Gly Val Asp Asp Gly Arg Leu Ala Ser Ala Asp Arg His
530 535 540

Thr Glu Val Pro Thr Gly Thr Cys Pro Val Asp Pro Phe Glu Ala Gln
545 550 555 560

20

Trp Ala Ala Leu Glu Asn Lys Ser Lys Gln Arg Thr Asn Pro Ser Pro
565 570 575

Thr Asn Pro Phe Ser Ser Asp Leu Gln Lys Thr Phe Glu Ile Glu Leu
580 585 590

<210> 9
<211> 8
<212> PRT
<213> ヒト

30

<400> 9

Asp Gly Val Asn Thr Tyr Asn Cys
1 5

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> ヒト

<400> 10

Asp Gly Val Asn Thr Tyr Asn Cys Arg
1 5

40

<210> 11
<211> 6
<212> PRT
<213> ヒト

<400> 11

【 0 2 1 5 】

50

【化 6 0】

Arg Tyr Ser Arg Ser Asp
1 5

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> ヒト

<400> 12

10

Arg Tyr Ser Arg Ser Asp Ala Ala Lys
1 5

<210> 13
<211> 10
<212> PRT
<213> ヒト

<400> 13

Arg Tyr Ser Arg Ser Asp Ala Ala Lys Arg
1 5 10

<210> 14
<211> 9
<212> PRT
<213> ヒト

<400> 14

20

Ser Arg Ser Asp Ala Ala Lys Arg Leu
1 5

<210> 15
<211> 10
<212> PRT
<213> ヒト

<400> 15

30

Ser Arg Ser Asp Ala Ala Lys Arg Leu Leu
1 5 10

<210> 16
<211> 12
<212> PRT
<213> ヒト

<400> 16

40

Ala Ala Lys Arg Leu Leu Glu Ala Ser Ala Asp Ala
1 5 10

<210> 17

【 0 2 1 6】

50

【化 6 1】

<211> 9
 <212> PRT
 <213> ヒト

<400> 17

Arg Leu Leu Glu Ala Ser Ala Asp Ala
 1 5

<210> 18
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> ヒト

<400> 18

Leu Leu Glu Ala Ser Ala Asp
 1 5

<210> 19
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> ヒト

<400> 19

Val Arg Leu Leu Asp Glu Tyr Asn Leu Val
 1 5 10

<210> 20
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> ヒト

<400> 20

Arg Leu Leu Asp Glu Tyr Asn Leu Val
 1 5

<210> 21
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> ヒト

<400> 21

Leu Leu Asp Glu Tyr Asn Leu Val
 1 5

<210> 22
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> ヒト

<400> 22

【 0 2 1 7 】

10

20

30

40

50

【化 6 2】

Met Pro Ala Leu Arg Pro Ala Leu Leu Trp Ala Leu Leu Ala Leu Trp
 1 5 10 15

Leu Cys Cys Ala
 20

<210> 23
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> ヒト
 <400> 23

10

Met Pro Ala Leu Arg Pro Ala Leu Leu Trp Ala Leu Leu Ala Leu Trp
 1 5 10 15

Leu Cys Cys Ala
 20

<210> 24
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> ヒト
 <400> 24

20

Ala Leu Leu Trp Ala Leu Leu Ala Leu
 1 5

<210> 25
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> ヒト
 <400> 25

30

Asn Gly Gly Val Cys Val Asp Gly Val Asn Thr Tyr Asn Cys
 1 5 10

<210> 26
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> ヒト
 <400> 26

40

Asn Gly Gly Val Cys Val Asp Gly Val Asn Thr Tyr Asn Cys Arg
 1 5 10 15

<210> 27
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> ヒト

【 0 2 1 8 】

50

【化 6 3】

<400> 27

Asn Gly Gly Val Cys Val Asp Gly Val Asn Thr Tyr Asn Cys Arg Cys
1 5 10 15

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> ヒト

10

<400> 28

Asp Gly Val Asn Thr Tyr Asn Cys Arg
1 5

<210> 29

<211> 10

<212> PRT

<213> ヒト

<400> 29

20

Asp Gly Val Asn Thr Tyr Asn Cys Arg Cys
1 5 10

<210> 30

<211> 16

<212> PRT

<213> ヒト

<400> 30

Asp Gly Val Asn Thr Tyr Asn Cys Arg Cys Pro Pro Gln Trp Thr Gly
1 5 10 15

30

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> ヒト

<400> 31

Arg Met Asn Asp Gly Thr Thr Pro Leu
1 5

40

<210> 32

<211> 10

<212> PRT

<213> ヒト

<400> 32

Arg Met Asn Asp Gly Thr Thr Pro Leu Ile
1 5 10

【 0 2 1 9 】

50

【化 6 4】

<210> 33
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> ヒト
 <400> 33

Glu Ala Thr Leu Leu Leu Lys Asn Gly Ala Asn Arg
 1 5 10

10

<210> 34
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> ヒト
 <400> 34

Leu Leu Leu Lys Asn Gly Ala Asn Arg
 1 5

<210> 35
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> ヒト
 <400> 35

20

Leu Lys Asn Gly Ala Asn Arg
 1 5

<210> 36
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> ヒト
 <400> 36

30

Val Leu Trp Val Ser Ala Asp Gly Leu
 1 5

<210> 37
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> ヒト
 <400> 37

40

Leu Trp Val Ser Ala Asp Gly Leu
 1 5

<210> 38
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> ヒト

【 0 2 2 0】

50

【化 6 5】

<400> 38

Cys	Arg	Asp	Gly	Thr	Thr	Arg	Arg	Trp	Ile	Cys	His	Cys	Phe	Met	Ala
1				5					10					15	

Val Lys Asp

<210> 39

<211> 12

<212> PRT

<213> ヒト

10

<400> 39

Arg	Trp	Ile	Cys	His	Cys	Phe	Met	Ala	Val	Lys	Asp
1				5					10		

<210> 40

<211> 9

<212> PRT

<213> ヒト

20

<400> 40

Trp	Ile	Cys	His	Cys	Phe	Met	Ala	Val
1				5				

<210> 41

<211> 12

<212> PRT

<213> ヒト

30

<400> 41

Arg	Trp	Leu	Glu	Glu	Val	Ser	Lys	Ser	Val	Arg	Ala
1				5					10		

<210> 42

<211> 9

<212> PRT

<213> ヒト

<400> 42

Trp	Leu	Glu	Glu	Val	Ser	Lys	Ser	Val
1				5				

40

<210> 43

<211> 15

<212> PRT

<213> ヒト

<400> 43

【 0 2 2 1】

50

【化 6 6】

Val Asp Asp Gly Arg Leu Ala Ser Ala Asp Arg His Thr Glu Val
1 5 10 15

<210> 44
<211> 9
<212> PRT
<213> ヒト

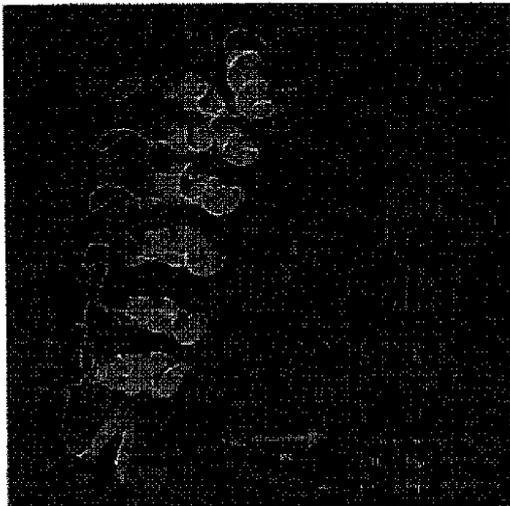
<400> 44

10

Asp Gly Arg Leu Ala Ser Ala Asp Arg
1 5

【図 1 A】

A



【図 1 B】

B



【図 1 C】



【図 1 D】



【 図 2 】

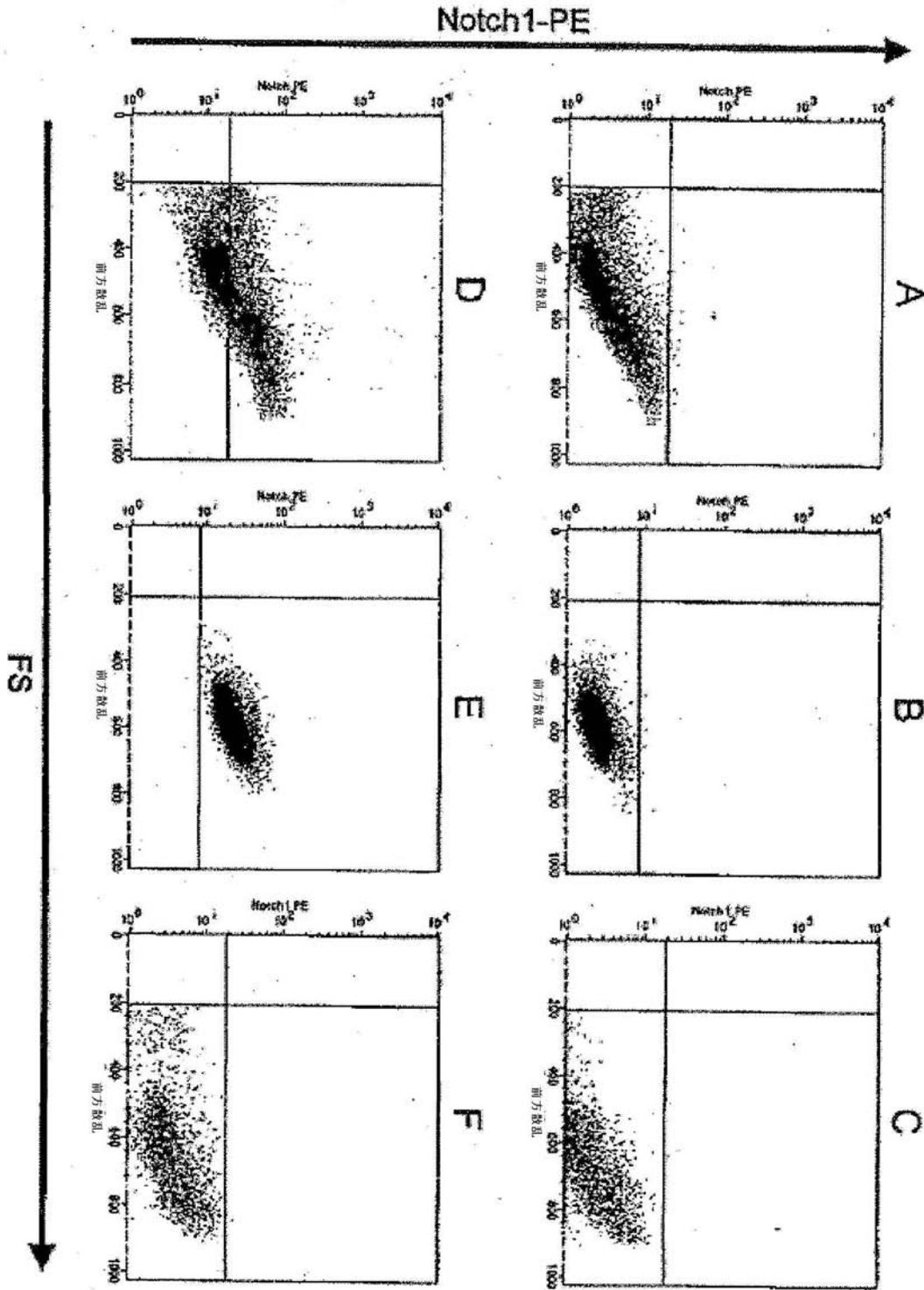


Figure 2

【 図 3 】

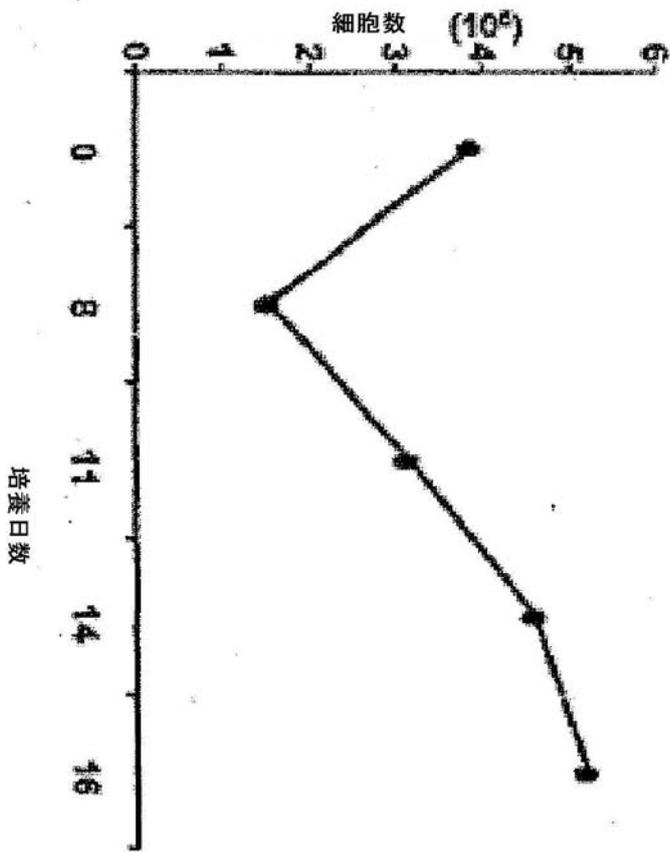
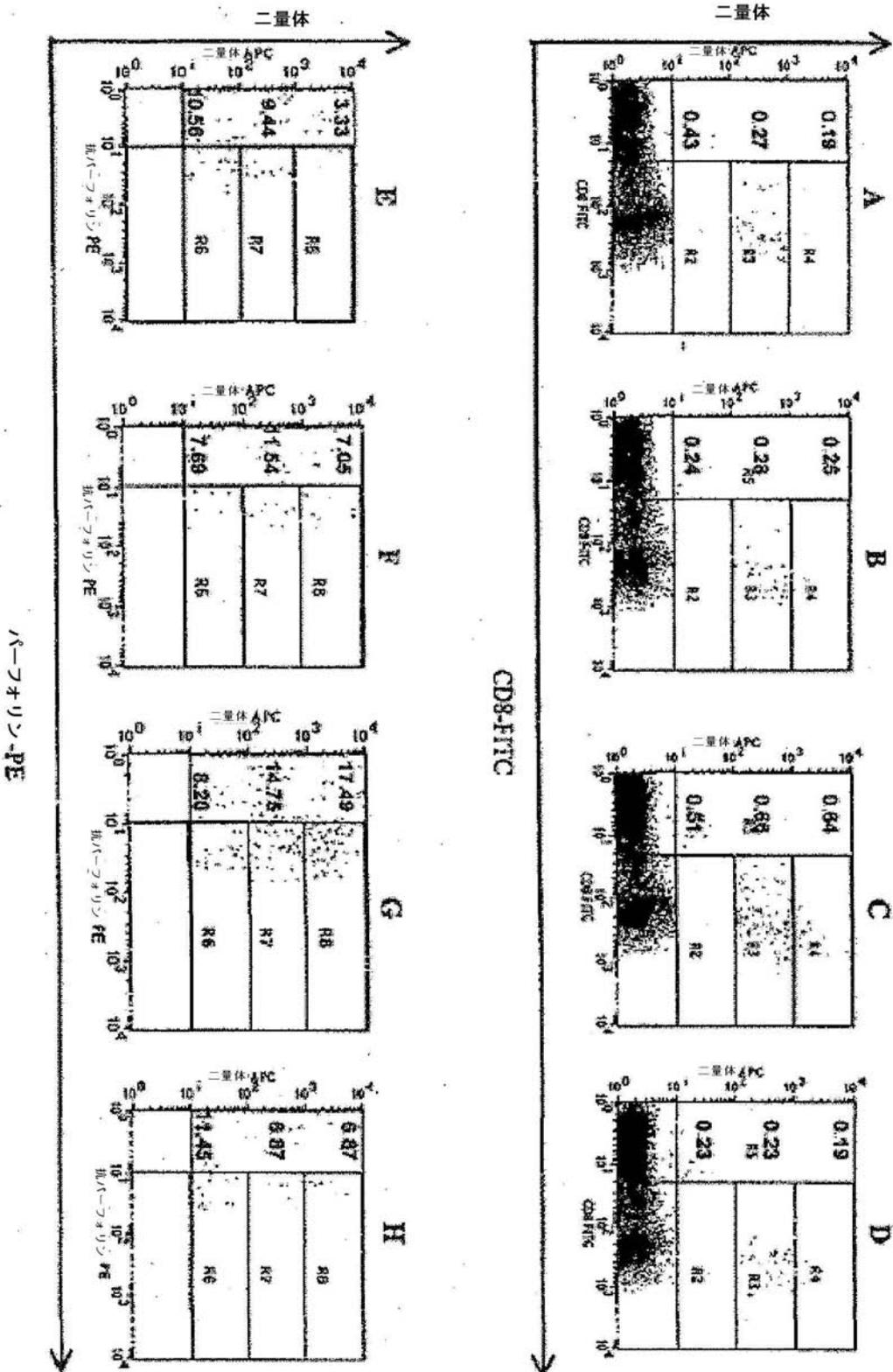


Figure 3

TAL-1

【図 4】

Figure 4



【 図 5 】

Figure 5

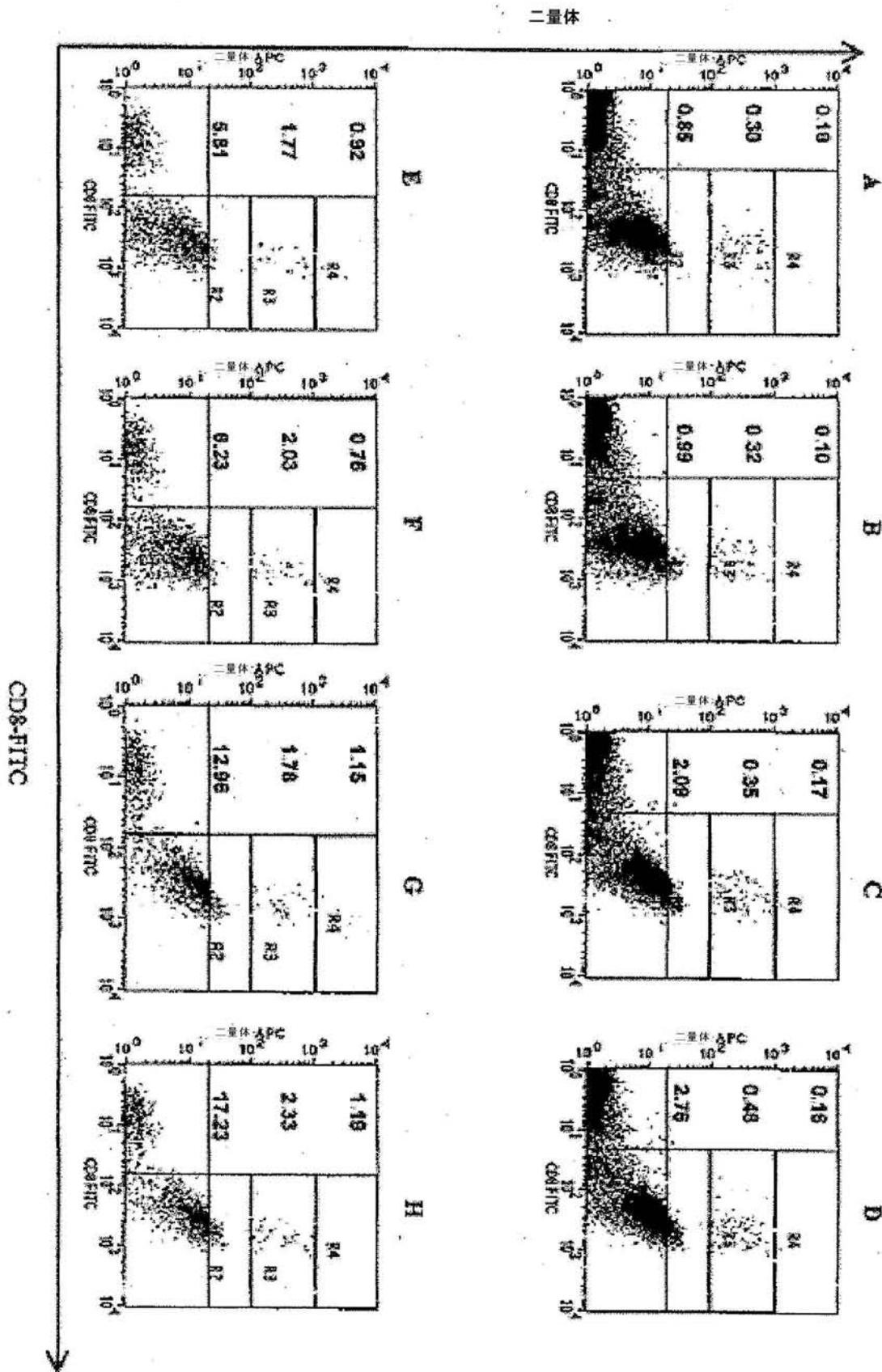


表 11

Figure 6

【 6 - 1 】

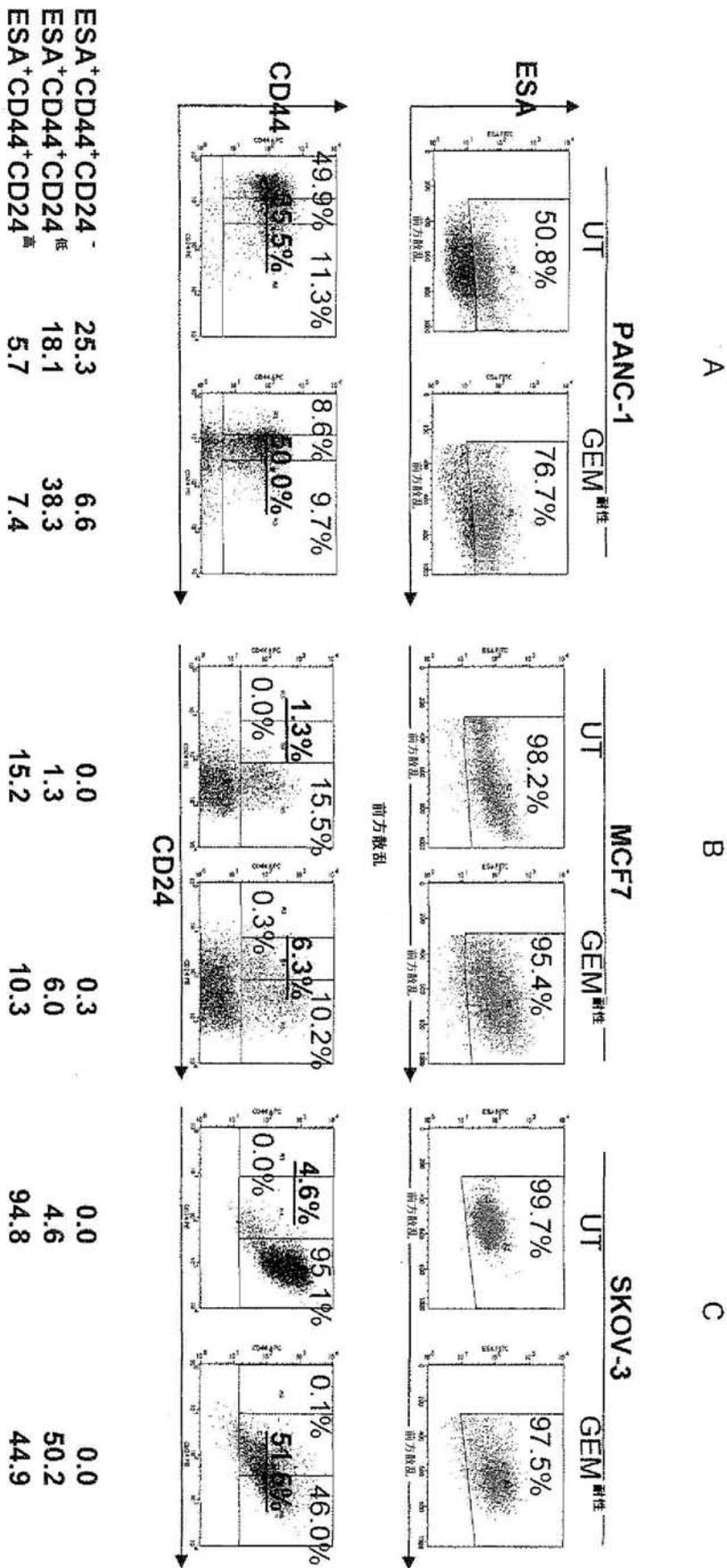
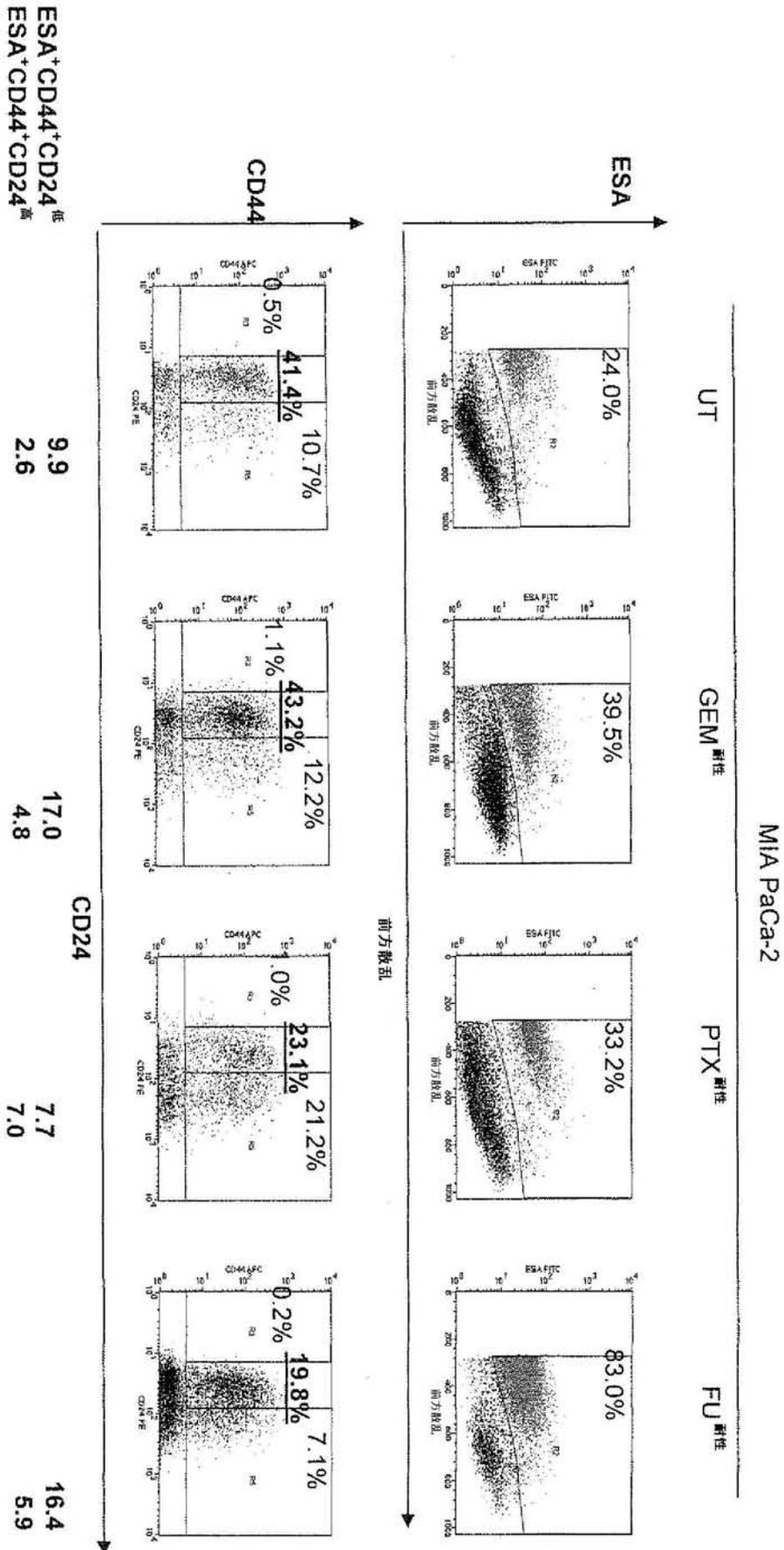


Figure 6

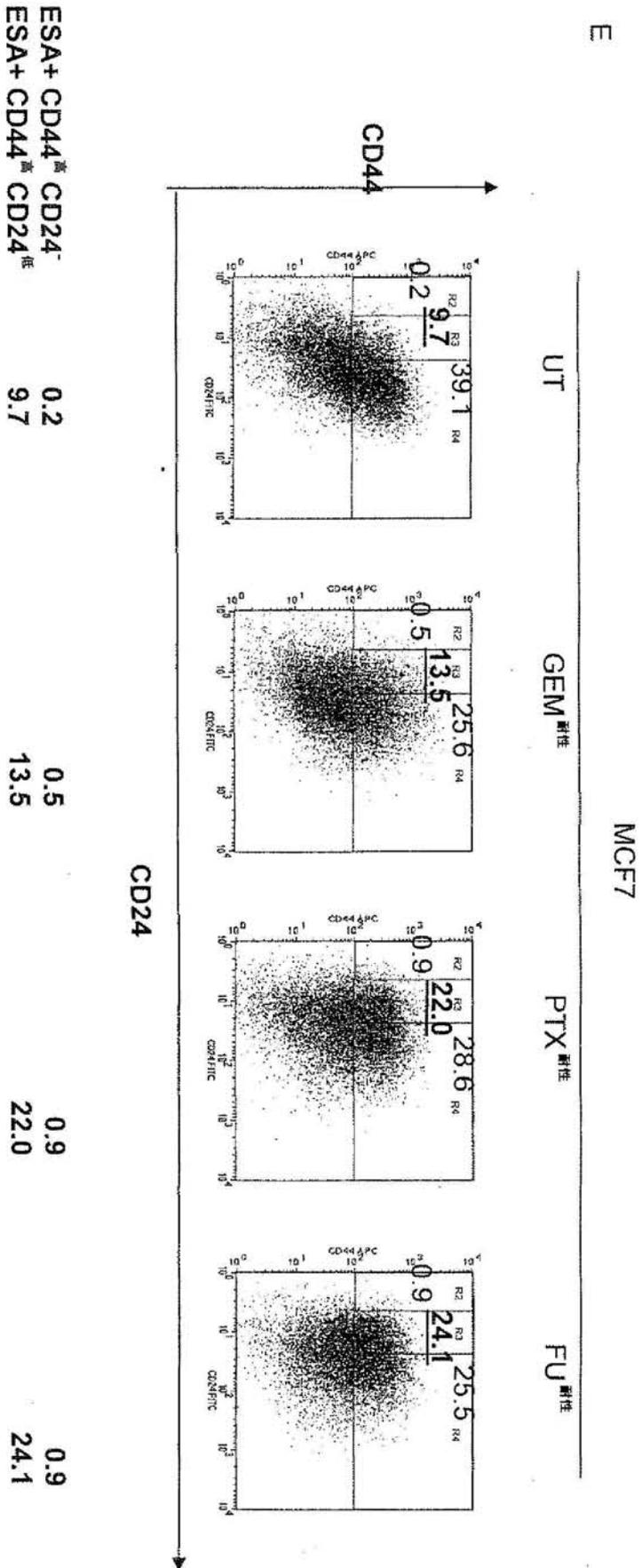
D



【 6 - 2 】

Figure 6

E



【 6 - 3 】

Figure 7

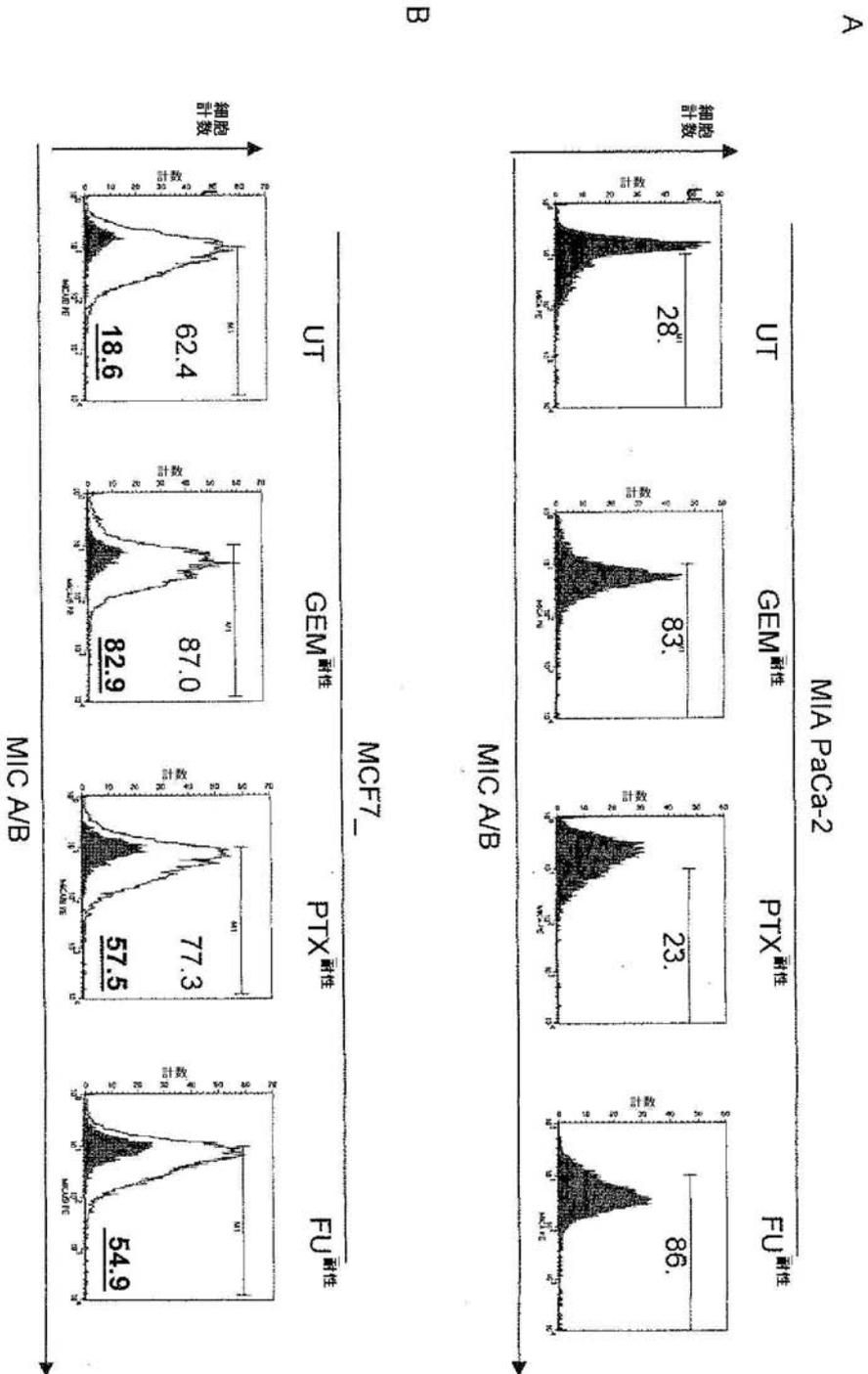


Figure 8

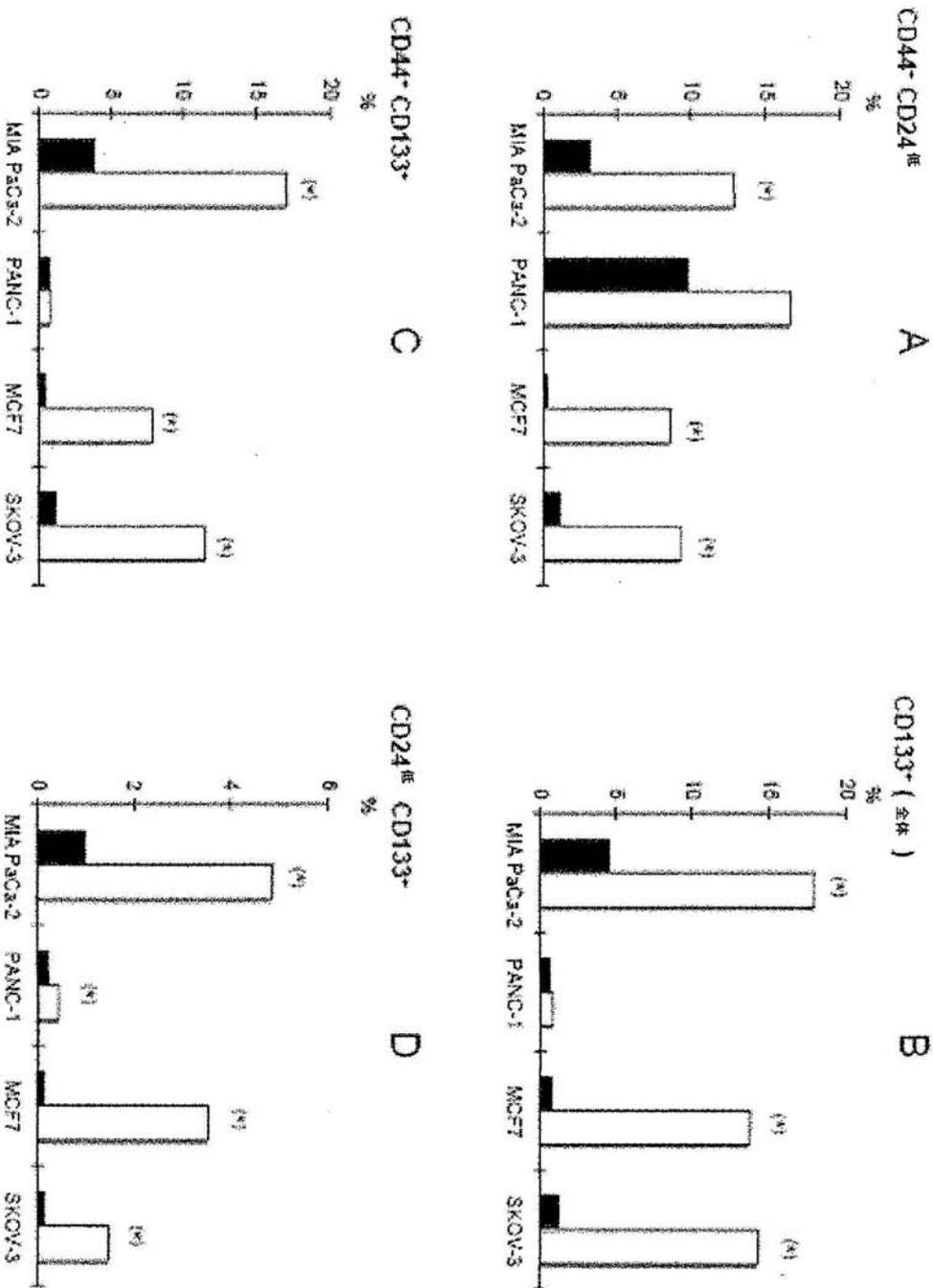
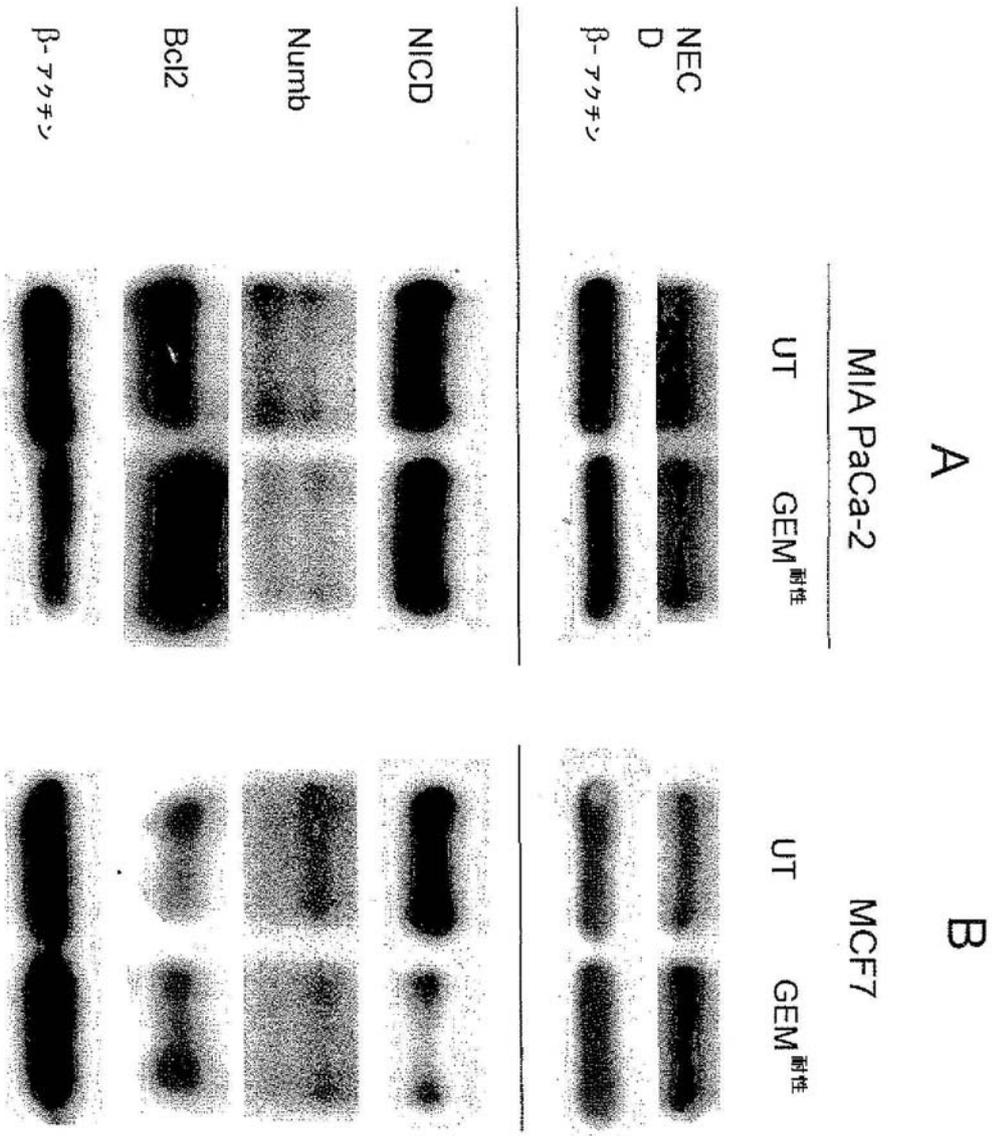
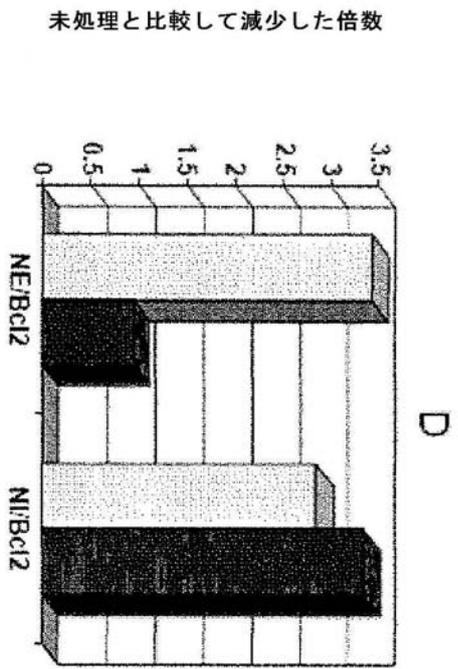
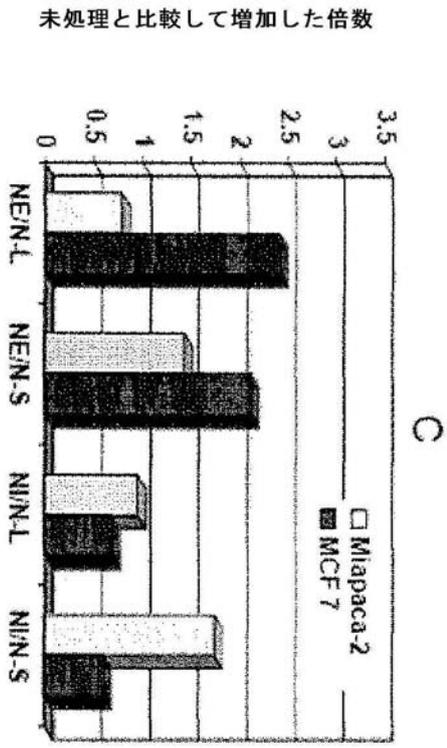


Figure 9



【 9 - 1 】

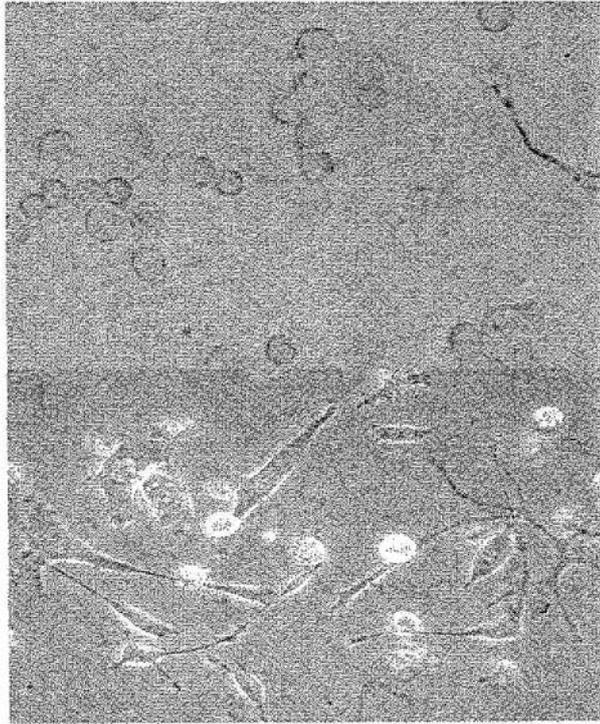
Figure 9



【図 9 - 2】

【図 10】
Figure 10

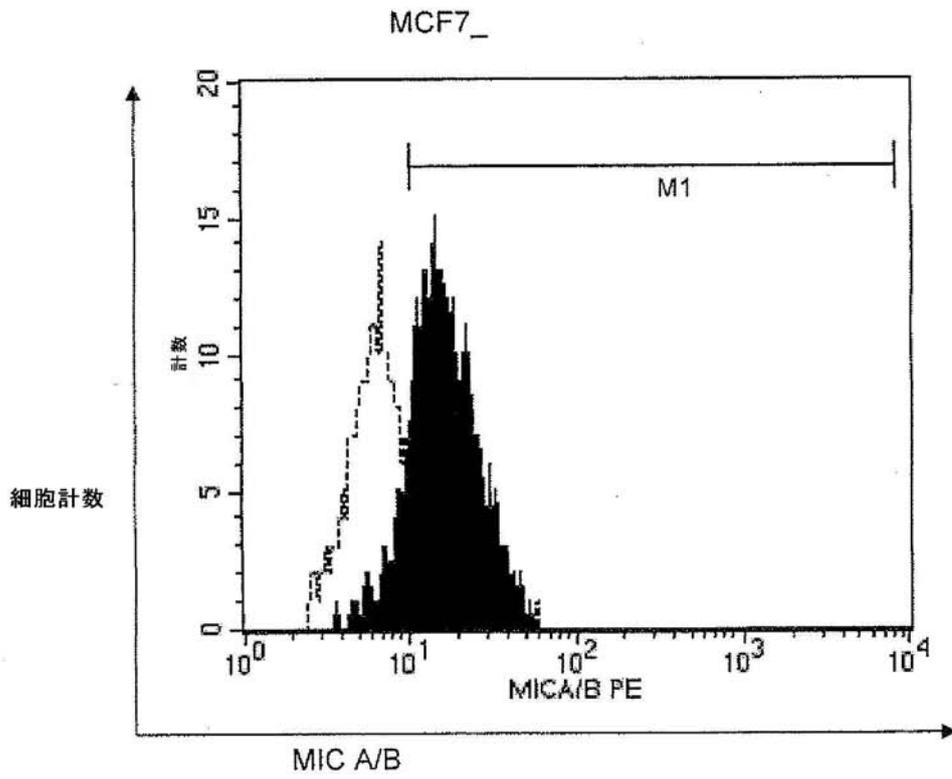
A



B

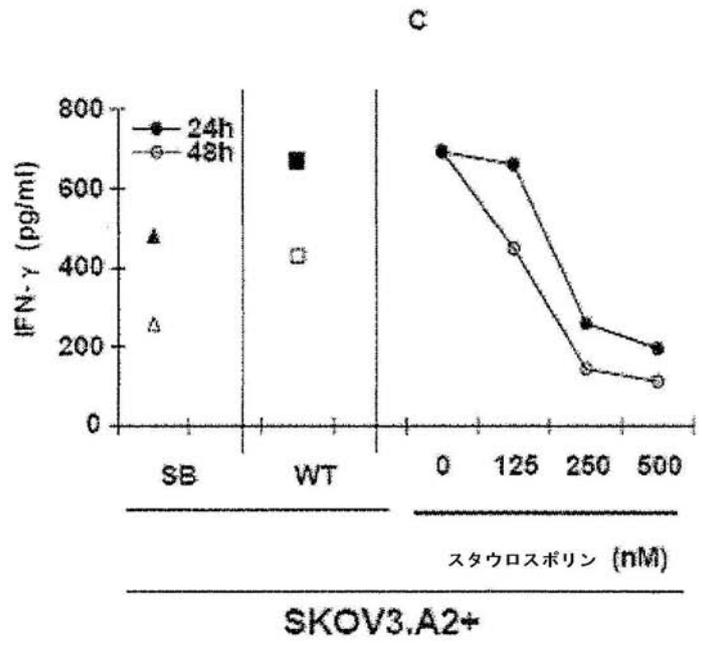
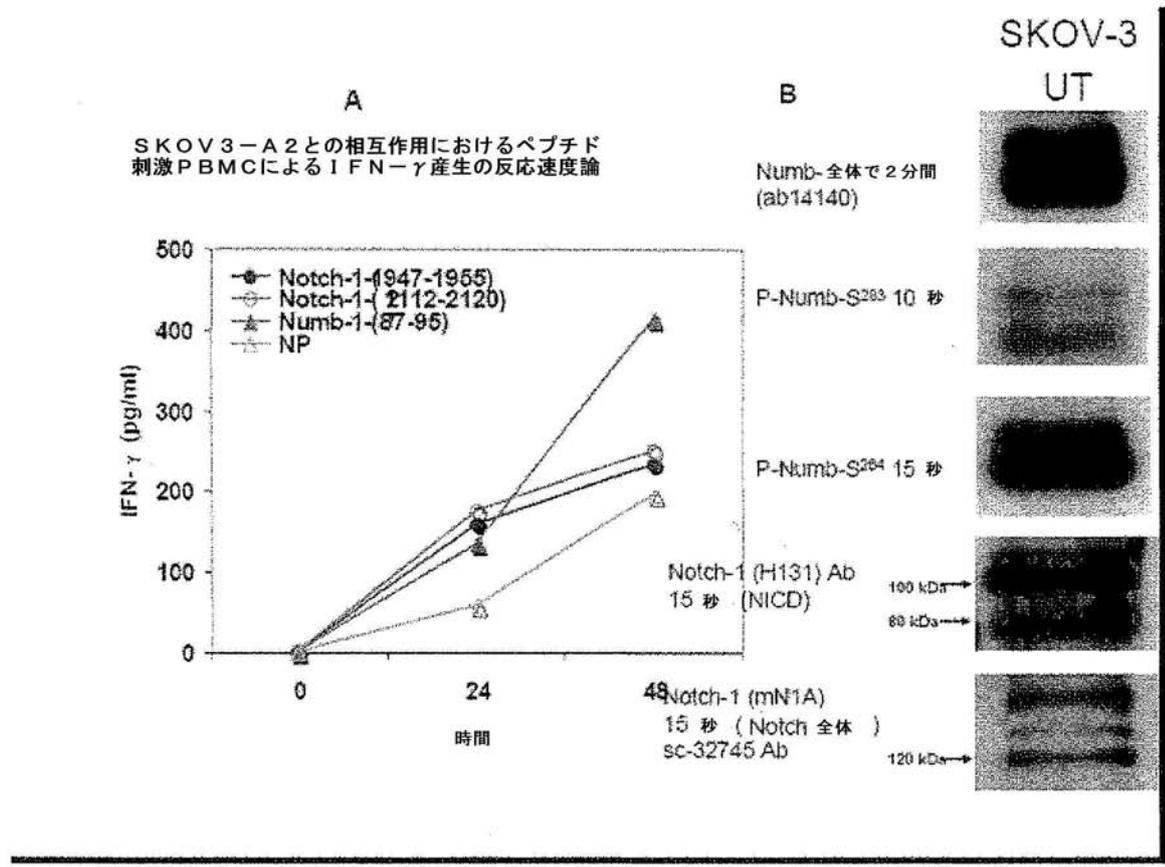


C



【 図 1 1 】

Figure 11



【 図 1 2 】

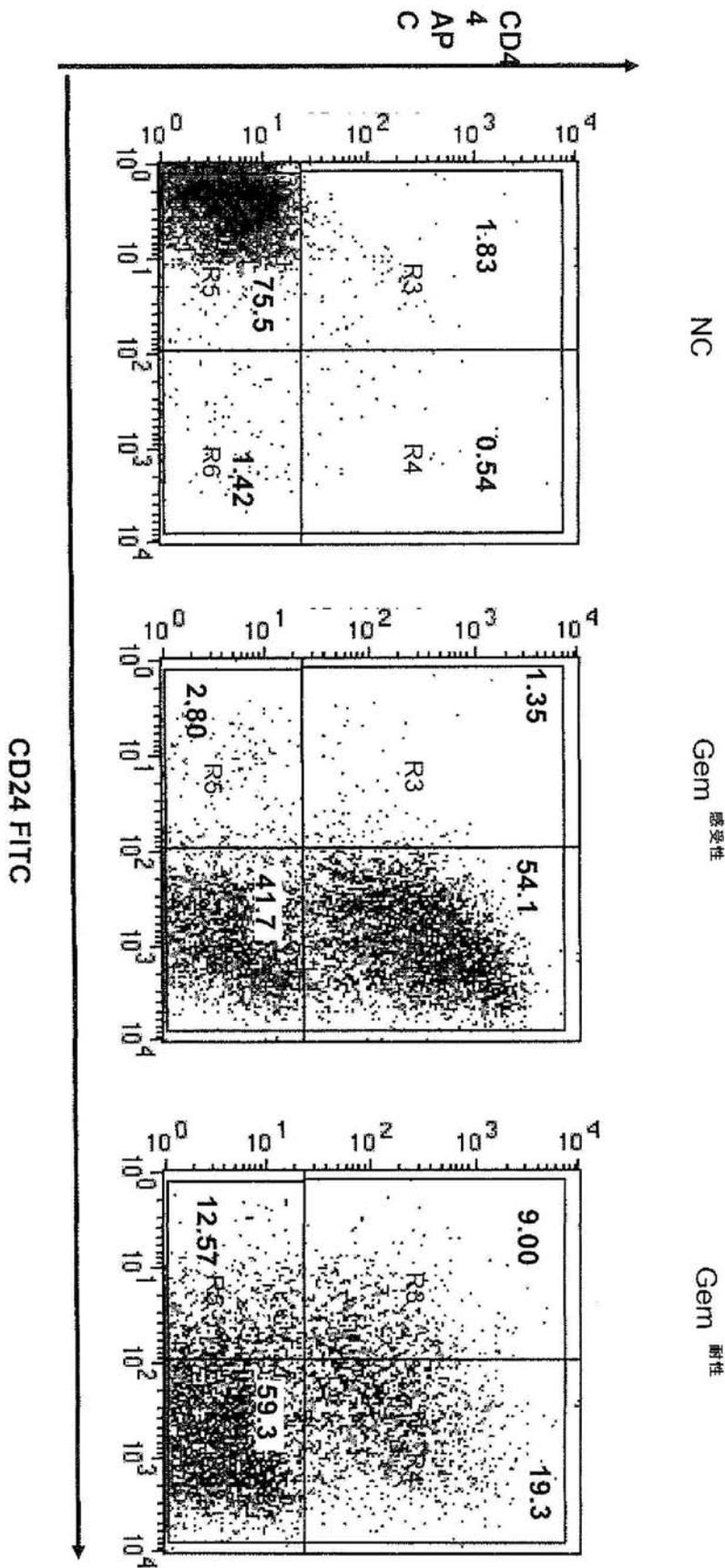
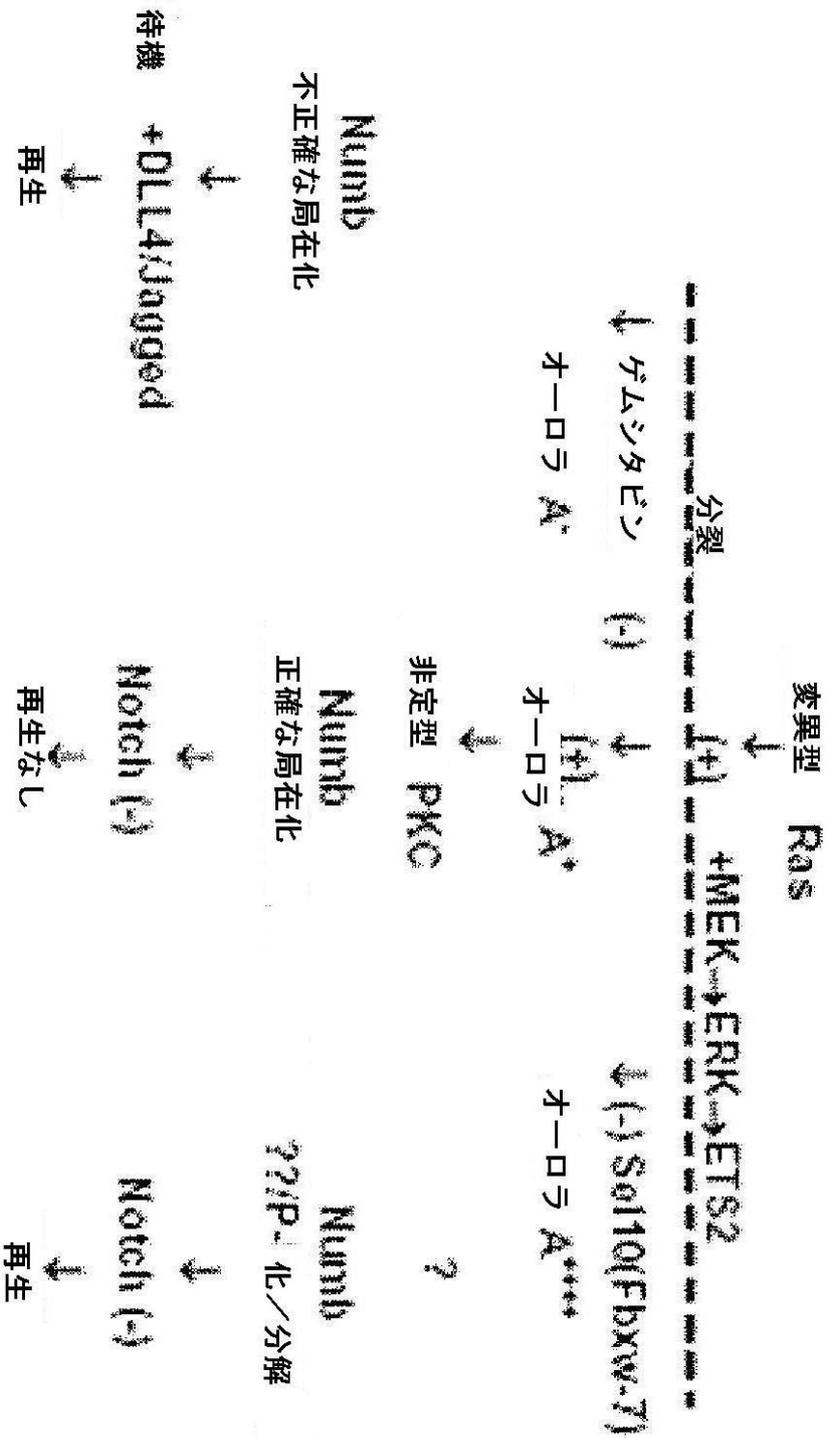
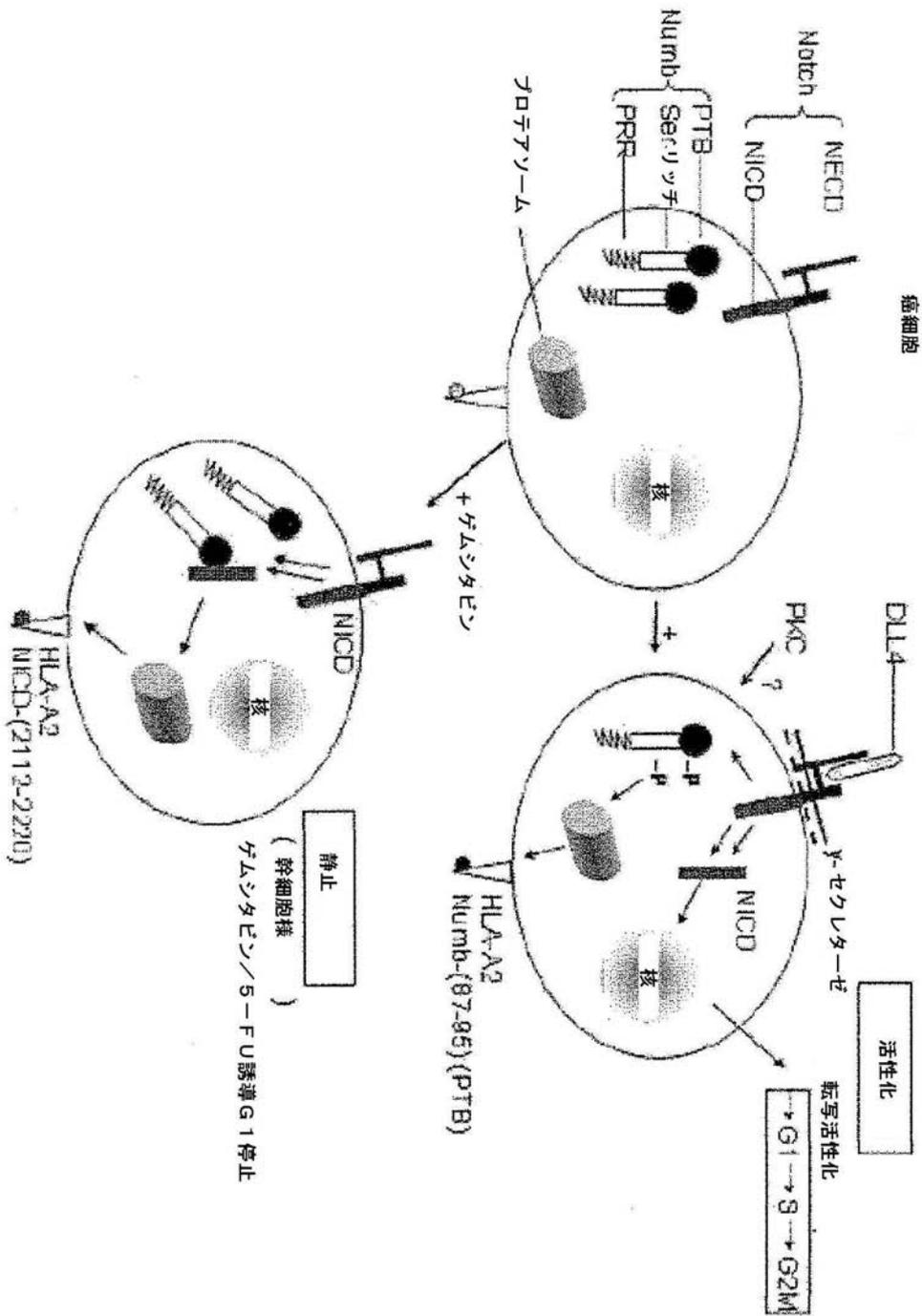


Figure 14



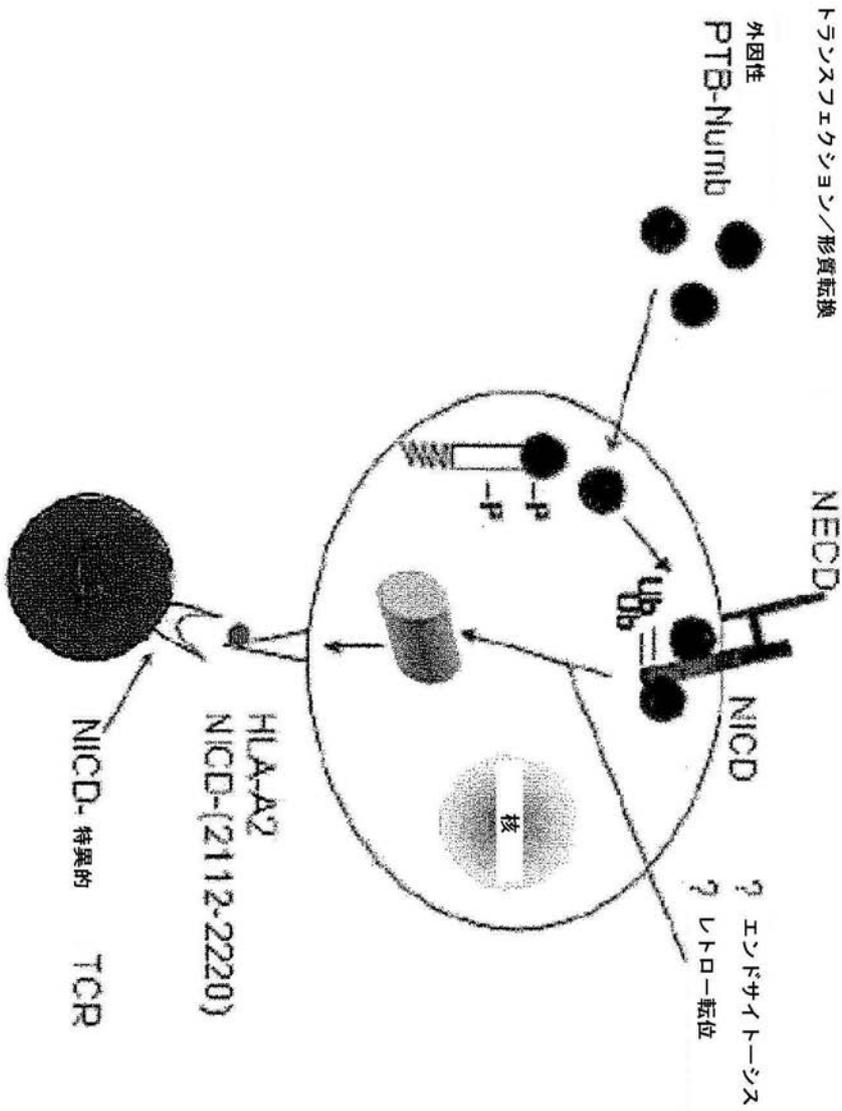
【 図 1 4 】

Figure 15A



【 図 15 A 】

Figure 15B



【 図 1 5 B 】

【 配 列 表 】

2010520280000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2008/001694

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K39/00 A61P35/00 A61K39/395 C07K16/28 C07K16/18		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/054434 A (HEALTH RESEARCH INC [US]; COIGNET LIONEL J [US]) 16 June 2005 (2005-06-16) page 2, line 27 - page 3, line 11 page 6, line 22 - page 7, line 2 example 2 claims 1-9	5
A	US 2006/154250 A1 (MORRIS DAVID W [US] ET AL) 13 July 2006 (2006-07-13) paragraphs [0153], [0256] - [0262]; claims 18,19,21,59,76; example 11; sequence 726	1-7
A	WO 98/57621 A (UNIV COLUMBIA [US]; KITAJEWSKI JAN [US]; UYTENDAELE HENDRIK [US]) 23 December 1998 (1998-12-23) claims 29-33, 39, 56-58, 60, 61	
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "Z" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 16 July 2008		Date of mailing of the international search report 30/09/2008
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Noë, Veerle

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2008/001694

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>WO 2006/037462 A (IFOM FOND ISTITUTO FIRCI DI ONCOLOGIA [IT]; DI FIORE PIER PAOLO [IT]; SALVATO) 13 April 2006 (2006-04-13) page 32, line 6 - page 33, line 17 claims 27, 29, 70 page 58, line 6 - page 59, line 25 page 6, paragraph 2</p>	
A	<p>JANG M-S ET AL: "NOTCH SIGNALING AS A TARGET IN MULTIMODALITY CANCER THERAPY" CURRENT OPINION IN MOLECULAR THERAPEUTICS, CURRENT DRUGS, LONDON, GB, vol. 2, no. 1, 1 February 2000 (2000-02-01), pages 55-65, XP009013844 ISSN: 1464-8431 page 60, column 1, last paragraph - column 2, paragraph 1</p>	1-7
P, X	<p>ISHIYAMA SATOSHI ET AL: "Novel natural immunogenic peptides from Numb1 and Notch1 proteins for CD8(+) cells in ovarian ascites" INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY, vol. 30, no. 4, April 2007 (2007-04), pages 889-898, XP008093788 ISSN: 1019-6439 the whole document</p>	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2008/001694

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/US2008/001694**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:
Although claims 1-4, 8-11, 15-20 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.
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:

see additional sheet

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.:

1 - 7 (partially)

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 Application No. PCT/US2008 /001694

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-7 (partially)

Method for treating a cancer comprising immunizing the patient against a peptide derived from Notch 1.

2. claims: 1-7 (partially)

Method for treating a cancer comprising immunizing the patient against a peptide derived from Notch 2.

3. claims: 1,4,5 (partially)

Method for treating a cancer comprising immunizing the patient against a peptide derived from Notch 3.

4. claims: 1,4,5 (partially)

Method for treating a cancer comprising immunizing the patient against a peptide derived from Notch 4.

5. claims: 8-14

Method for treating a cancer comprising immunizing the patient against a peptide derived from Numb1, Numb2, Numb3 or Numb4.

6. claims: 15-20 (partially)

Method for treating a cancer comprising administering to the patient a composition comprising an antibody against a peptide derived from Notch1.

7. claims: 15-20 (partially)

Method for treating a cancer comprising administering to the patient a composition comprising an antibody against a peptide derived from Notch2.

8. claims: 15,18-20 (partially)

Method for treating a cancer comprising administering to the patient a composition comprising an antibody against a peptide derived from Notch3.

International Application No. PCT/US2008 /001694

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

9. claims: 15,18-20 (partially)

Method for treating a cancer comprising administering to the patient a composition comprising an antibody against a peptide derived from Notch4.

10. claims: 15-20 (partially)

Method for treating a cancer comprising administering to the patient a composition comprising an antibody against a peptide derived from Numb1.

11. claims: 15,18-20 (partially)

Method for treating a cancer comprising administering to the patient a composition comprising an antibody against a peptide derived from Numb2.

12. claims: 15,18-20 (partially)

Method for treating a cancer comprising administering to the patient a composition comprising an antibody against a peptide derived from Numb3.

13. claims: 15,18-20 (partially)

Method for treating a cancer comprising administering to the patient a composition comprising an antibody against a peptide derived from Numb4.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2008/001694

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005054434 A	16-06-2005	AU 2004294563 A1	16-06-2005
		BR PI0416934 A	16-01-2007
		CA 2546017 A1	16-06-2005
		EP 1709150 A2	11-10-2006
		JP 2007512348 T	17-05-2007
US 2006154250 A1	13-07-2006	NONE	
WO 9857621 A	23-12-1998	AU 8162898 A	04-01-1999
WO 2006037462 A	13-04-2006	AU 2005291613 A1	13-04-2006
		CA 2581041 A1	13-04-2006
		EP 1802971 A2	04-07-2007
		JP 2008514209 T	08-05-2008
		US 2008188405 A1	07-08-2008

フロントページの続き

(51) Int.Cl. F I テーマコード(参考)
 A 6 1 P 37/04
 C 0 7 K 14/705 Z N A

(31)優先権主張番号 60/959,946

(32)優先日 平成19年7月18日(2007.7.18)

(33)優先権主張国 米国(US)

(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, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, 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, AO, 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 イオアニデス, コンスタンティン ジー.
 アメリカ合衆国 テキサス 77025, ヒューストン, タータン レーン 4062

(72)発明者 エイク, レイマンド エフ.
 アメリカ合衆国 テキサス 77042, ヒューストン, リッチモンド 10333, スイート 1100

Fターム(参考) 4C085 AA03 AA13 AA14 AA26 BB11 CC21 CC32 DD61 DD88
 4H045 AA10 AA30 BA10 CA41 DA50 DA86 EA28