

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5618544号
(P5618544)

(45) 発行日 平成26年11月5日(2014.11.5)

(24) 登録日 平成26年9月26日(2014.9.26)

(51) Int.Cl.	F 1
C 12 N 15/09	(2006.01) C 12 N 15/00 Z N A A
C 07 K 16/28	(2006.01) C 07 K 16/28
C 12 N 15/02	(2006.01) C 12 N 15/00 C
C 12 P 21/02	(2006.01) C 12 P 21/02 C
C 12 P 21/08	(2006.01) C 12 P 21/08

請求項の数 16 (全 62 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2009-547285 (P2009-547285)
(86) (22) 出願日	平成20年1月24日 (2008.1.24)
(65) 公表番号	特表2010-517513 (P2010-517513A)
(43) 公表日	平成22年5月27日 (2010.5.27)
(86) 國際出願番号	PCT/US2008/000884
(87) 國際公開番号	W02008/091641
(87) 國際公開日	平成20年7月31日 (2008.7.31)
審査請求日	平成23年1月21日 (2011.1.21)
(31) 優先権主張番号	60/886,414
(32) 優先日	平成19年1月24日 (2007.1.24)
(33) 優先権主張国	米国(US)

前置審査

(73) 特許権者	308031072 オンコメッド ファーマシューティカルズ インコーポレイテッド アメリカ合衆国 カリフォルニア州 レッドウッドシティー チェサピーク ドライブ 800
(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(74) 代理人	100102118 弁理士 春名 雅夫
(74) 代理人	100160923 弁理士 山口 裕孝
(74) 代理人	100119507 弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】癌の診断および処置のための組成物および方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒトNotch1およびヒトNotch3受容体に特異的に結合する単離モノクローナル抗体であつて、

該抗体が保存されたリガンド結合領域内のエピトープに結合し、該エピトープが保存されたグルタミン酸残基を含み、

該保存されたリガンド結合領域がNotch1のアミノ酸422～432またはNotch3のアミノ酸401～411であり、該保存されたグルタミン酸残基がNotch1のアミノ酸424である、抗体。

【請求項 2】

Notchシグナル伝達のアンタゴニストである、請求項1記載の単離モノクローナル抗体。

【請求項 3】

リガンド結合を遮断する、請求項1または2記載の単離モノクローナル抗体。

【請求項 4】

キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、または抗原結合抗体断片である、請求項1～3のいずれか一項記載の単離モノクローナル抗体。

【請求項 5】

CDRアミノ酸配列CDR1 (SEQ ID NO:10)；CDR2 (SEQ ID NO:11)；およびCDR3 (SEQ ID NO:12)を含んだ重鎖可変領域ならびにCDRアミノ酸配列CDR1 (SEQ ID NO:14)；CDR2 (SEQ ID NO:15)；およびCDR3 (SEQ ID NO:16)を含んだ軽鎖可変領域を含む、請求項1～4の

10

20

いずれか一項記載の単離モノクローナル抗体。

【請求項 6】

SEQ ID NO:9の重鎖およびSEQ ID NO:13の軽鎖を含む、請求項5記載の単離モノクローナル抗体。

【請求項 7】

細胞毒素に結合される、請求項1～6のいずれか一項記載の単離モノクローナル抗体。

【請求項 8】

ヒトNotch1受容体のアミノ酸422～432内のグルタミン酸残基との特異的結合について、請求項5の抗体と競合する単離モノクローナル抗体。

【請求項 9】

10

ヒトNotch3受容体のアミノ酸401～411内のグルタミン酸残基との特異的結合について、請求項5記載の抗体と競合する単離モノクローナル抗体。

【請求項 10】

請求項1～9のいずれか一項記載の抗体と薬学的に許容されるビヒクルとを含む薬学的組成物。

【請求項 11】

癌の治療のための薬剤の製造における請求項1～9のいずれか一項記載の抗体の使用。

【請求項 12】

薬剤が少なくとも一種のさらなる治療剤と組み合わせて用いられる、請求項11記載の使用。

20

【請求項 13】

癌が乳癌である、請求項11または12記載の使用。

【請求項 14】

請求項1～6のいずれか一項記載の抗体をコードする、単離ポリヌクレオチド。

【請求項 15】

(a) ヒトNotch1受容体またはヒトNotch3受容体の保存されたグルタミン酸リガンド結合領域を含むポリペプチドで非ヒト被験体を免疫する段階と、

(b) 両方のポリペプチドと結合する抗体を同定する段階と

を含む、二種またはそれ以上のヒトNotch受容体に特異的に結合するモノクローナル抗体を作製する方法であって、該抗体が保存されたグルタミン酸リガンド結合領域内のエピトープに結合し、該エピトープが保存されたグルタミン酸残基を含み、

30

該保存されたグルタミン酸リガンド結合領域がNotch1のアミノ酸422～432またはNotch3のアミノ酸401～411であり、該保存されたグルタミン酸残基がNotch1のアミノ酸424である、方法。

【請求項 16】

(a) ヒトNotch1受容体またはヒトNotch3受容体の保存されたグルタミン酸リガンド結合領域を含むポリペプチドに対してファージライブラリをパニングする段階と、

(b) 両方のポリペプチドと結合するファージを単離する段階と

を含む、二種またはそれ以上のヒトNotch受容体に特異的に結合するモノクローナル抗体を作製する方法であって、該抗体が保存されたグルタミン酸リガンド結合領域内のエピトープに結合し、該エピトープが保存されたグルタミン酸残基を含み、

40

該保存されたグルタミン酸リガンド結合領域がNotch1のアミノ酸422～432またはNotch3のアミノ酸401～411であり、該保存されたグルタミン酸残基がNotch1のアミノ酸424である、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は腫瘍学の分野に関し、癌を診断し処置するための新規な組成物および方法を提供する。本発明は、充実性腫瘍の診断および処置のための癌幹細胞マーカーに対する抗体

50

を提供する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

癌は、先進諸国的主要な死因の一つであって、米国だけでも毎年100万人以上が癌と診察され、500,000人が死亡する。通算して、3人に2人以上が一生のうちになんらかの形の癌を発病するであろうと推測される。200種を上回る様々な種類の癌が存在し、それらのうちの四つ、すなわち乳房、肺、結腸直腸、および前立腺の癌が全ての新患の半分以上を占める(Jemal et al., 2003, Cancer J. Clin. 53:5-26)。

【0003】

乳癌は、女性において最も一般的な癌であり、女性のうち推定12%が一生のうちに発病するリスクを有する。死亡率は、早期検出および処置の改善により減少したが、未だ乳癌は中年女性の主要な死因であり、また転移性乳癌は、依然として不治の病である。症状に関しては、ほとんどの転移性乳癌患者は一つまたは二つの臓器系にしか罹患していないが、疾患が進行するとともに、通常複数の部位が侵されるようになる。転移病巣の最も一般的な部位は、皮膚および胸壁の軟組織における、ならびに腋窩および鎖骨上領域における、局所領域的再発である。遠隔転移の最も一般的な部位は骨(遠隔転移の30~40%)であり、続いて肺と肝臓である。また、新しく乳癌と診断された女性のわずか約1~5%しか診断時には遠隔転移を有さないが、局所的疾患有する患者の約50%が、結局5年以内に転移によって再発する。現在、遠隔転移が起こってからの生存期間中央値は、約3年である。

10

【0004】

乳癌を診断し病期分類をする現行の手法には、腫瘍の大きさ、リンパ節中の腫瘍の存在、および遠隔転移の存在に基づく、腫瘍 - リンパ節 - 転移(TNM)システムが含まれる(American Joint Committee on Cancer: AJCC Cancer Staging Manual. Philadelphia, Pa.: Lippincott-Raven Publishers, 5th ed., 1997, pp 171-180; Harris, J R: "Staging of breast carcinoma" in Harris, J. R., Hellman, S., Henderson, I. C., Kinne D. W. (eds.): Breast Diseases, Philadelphia, Lippincott, 1991)。これらのパラメーターは予後診断を与え、適切な治療を選択するために用いられる。腫瘍の形態的外観を評価することもできるが、同様の組織病理学的外観を有する腫瘍が有意な臨床的多様性を示す場合があるので、この方法には深刻な限界がある。最後に、細胞表面マーカーの分析を用いて、ある種の腫瘍の種類をサブクラスに分けることができる。例えば、乳癌の予後診断および処置において考慮される一つの因子は、エストロゲン受容体(ER)の存在であり、ER陽性乳癌は通常はタモキシフェンまたはアロマターゼ阻害薬などのホルモン療法剤に、ER陰性の腫瘍よりも容易に応答する。これらの分析は有用ではあるが乳腺腫瘍の臨床的挙動を部分的に予測できるだけであり、乳癌には、現在の診断機器によって検出できず、また現在の療法によって処置できない多くの表現型多様性が存在する。

20

【0005】

前立腺癌は、先進諸国の男性において最も一般的な癌であって、米国における全ての癌の新患の推定33%を占め、2番目に多い死因である(Jemal et al., 2003, CA Cancer J. Clin. 53:5-26)。前立腺特異抗原(PSA)血液検査の導入以来、前立腺癌の早期発見により劇的に生存率が改善され；診断時に局所的および局部的な段階の前立腺癌を有する患者の5年生存率は、100%に近づいている。それでも50%を上回る患者が、局所的に進行した疾患有るいは転移性の疾患を最終的に発病する(Muthuramalingam et al., 2004, Clin. Oncol. 16:505-16)。

30

【0006】

現在、根治的前立腺摘除および放射線療法が、大多数の局所的な前立腺腫瘍に対する治療的処置が提供されている。しかし、進行した症例の場合には、治療の選択肢は極めて限定される。転移性疾患については、単独の、または抗アンドロゲン剤と組み合わせた黄体形成ホルモン放出ホルモン(LHRH)アゴニストを用いるアンドロゲン除去が標準的処置である。しかし、最大限のアンドロゲン遮断をした場合でも疾患はほとんど必ず進行して、大

40

50

多数がアンドロゲン非依存性疾患を発症する。現在のところ、ホルモン無反応性前立腺癌のための一様に容認された処置は存在せず、一般に化学療法的治療法が用いられる(Muthuramalingam et al., 2004, Clin. Oncol. 16:505-16; Trojan et al., 2005, Anticancer Res. 25:551-61)。

【 0 0 0 7 】

結腸直腸癌は、3番目に一般的な癌であり、世界中の癌による死因中で4番目に多い(Weitz et al., 2005, Lancet 365:153-65)。全結腸直腸癌の約5~10%が遺伝性であって、その主要な形の一つが、家族性腺腫性ポリポーシス(FAP)であり、これは、罹患者の約80%が大腸腺腫性ポリポーシス(APC)遺伝子に生殖細胞系列突然変異を含む常染色体優性疾患である。結腸直腸癌は、周辺への成長により局所的に、および、リンパ性、血行性、腹膜横断性、および神経周囲への伝播により他の場所へ侵入する。リンパ外の併発の最も一般的な部位は肝臓であり、最も頻繁に冒される腹腔外の器官は肺である。他の血行性伝播部位には、骨、腎臓、副腎および脳が含まれる。10

【 0 0 0 8 】

結腸直腸癌用の現在の病期分類システムは、腫瘍の腸壁浸透の程度、およびリンパ節併発の存在または非存在に基づく。この病期分類システムは、三つの主なデューケス分類によって定義される：デューケスA疾患は、結腸または直腸の粘膜下組織層に限定され；デューケスB疾患は、固有筋層を通過して侵入して、結腸または直腸壁に入り込む可能性のある腫瘍を有し；およびデューケスC疾患は、任意の程度の腸壁侵入があり、局地的リンパ節転移を有する。初期段階の結腸直腸癌には外科的切除術が極めて有効であって、デューケスA患者では95%の治癒率を与えるが、デューケスB患者では治癒率は75%に減少し、デューケスC疾患で陽性リンパ節が存在すると、60%の5年以内再発可能性が予測される。デューケスC患者の外科手術後の化学療法コースによる治療は再発率を40%~50%に低下させ、これはこれらの患者に対する現在の標準ケアである。20

【 0 0 0 9 】

肺癌は世界的に最も一般的な癌であり、米国では3番目に多く診断される癌であって、最も多い癌死の原因である(Spiro et al., 2002, Am. J. Respir. Crit. Care Med. 166: 1166-96; Jemal et al., 2003, CA Cancer J. Clin. 53:5-26)。喫煙が、全ての肺癌のうち推定87%の原因と考えられ、このことにより、肺癌は、最も効果的に予防可能な疾患となっている。肺癌は小細胞肺癌(SCLC)および非小細胞肺癌(NSCLC)の二つの主要なタイプに分類され、これらがすべての肺癌の90%以上を占める。SCLCは、症例の15~20%を占め、大きな中枢気道に起源を持つこと、および細胞質をほとんど有さない小細胞のシートという組織学的組成によって特徴づけられる。SCLCはNSCLCより悪性であり、急速に成長し、早期に高頻度で転移する。NSCLCはすべての症例の80~85%を占め、組織学に基づいてさらに三つの主なサブタイプである腺癌、扁平上皮癌(類表皮癌)および大細胞未分化癌に分類される。30

【 0 0 1 0 】

肺癌は、典型的にはその進行の後期に症状を現わし、したがって生存中央値は診断後わずか6~12ヶ月であり、全体としての5年生存率はわずか5~10%に過ぎない。手術は治癒の最良の機会であるが、肺癌患者のごく一部しか手術適格ではなく、大多数は化学療法および放射線療法に頼っている。その治療の時期および用量の程度を操作する試みがなされているが、生存率は、過去15年にわたってほとんど増加していない(Spiro et al., 2002, Am. J. Respir. Crit. Care Med. 166: 1166-96)。40

【 0 0 1 1 】

これらの四つの癌は、他の多くの癌もそうであるが、異質の細胞集団から成る充実性腫瘍として存在する。例えば乳癌は、癌細胞ならびに間充織(間質)細胞、炎症細胞および内皮細胞を含む正常細胞の混合物である。いくつかの癌のモデルが、この異質性の存在について異なる説明を与える。一つのモデルである癌の古典的モデルは、表現型が異なる癌細胞集団のすべてが、増殖して新しい腫瘍を生む能力を有すると考えられている。古典的モデルでは、腫瘍細胞の異質性は、環境要因に、ならびに腫瘍形成性細胞の様々な集団をも50

たらす癌細胞内で進行中の突然変異に起因する。このモデルは、すべての腫瘍細胞の集団がある程度の腫瘍形成能力を有するという発想に基づく(Pandis et al., 1998, Genes, Chromosomes & Cancer 12:122-129; Kuukasj rvi et al., 1997, Cancer Res. 57:1597-1604; Bonsing et al., 1993, Cancer 71:382-391; Bonsing et al., 2000, Genes Chromosomes & Cancer 82: 173-183; Beerman H et al., 1991, Cytometry 12:147-54; Aubele M & Werner M, 1999, Analyt. Cell. Path. 19:53; Shen L et al., 2000, Cancer Res. 60:3884)。

【0012】

充実性腫瘍細胞に観察される異質性についての別のモデルは、腫瘍発生に対する幹細胞の影響から導出される。このモデルによれば、癌は、正常組織の発生および維持を制御する機構の調節異常に起因する(Beachy et al., 2004, Nature 432:324)。正常動物の発生中、大部分またはすべての組織の細胞は、幹細胞と呼ばれる正常な前駆体から導出される(Morrison et al., 1997, Cell 88:287-98; Morrison et al., 1997, Curr. Opin. Immunol. 9:216-21; Morrison et al., 1995, Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 11:35-71)。幹細胞は、(1) 高い増殖能を有し；(2) 非対称細胞分裂をして、増殖および／または発生能力の低下した一つまたは複数の種類の子孫を產生することができ；かつ(3) 自己複製または自己維持のための対称細胞分裂が可能な、細胞である。幹細胞の分化による成人の細胞再生の最もよく研究されている例は造血系であって、発生上未熟な前駆体(造血幹細胞および始原細胞)が、分子シグナルに応答して、様々な血液細胞型およびリンパ球細胞型を形成する。腸、乳管系および皮膚の細胞を含む他の細胞は、絶えず各組織中の少数の幹細胞から補充され、最近の研究は、脳を含む大部分の他の成人組織もまた幹細胞を包含することを示唆する。「充実性腫瘍幹細胞」(あるいは充実性腫瘍由来の「癌幹細胞」)由来の腫瘍が、その後対称および非対称の細胞分裂の両方の繰り返しを通じて、無秩序に発生する。この幹細胞モデルでは、充実性腫瘍は、別々の限定された(恐らくまれでさえある)細胞のサブセットを含み、それは広汎に増殖しあつさる充実性腫瘍幹細胞(自己複製)ならびに充実性腫瘍の大多数である腫瘍形成能力を欠く腫瘍細胞の両者を効率的に生じるという点で、正常「幹細胞」の特性を共有する。実際、長命の幹細胞集団内の突然変異が癌幹細胞の形成を開始させる可能性があり、それは腫瘍の増殖および維持の基礎となっており、その存在が現在の治療的アプローチの失敗の原因である。

【0013】

癌の幹細胞的性質は、最初に血液癌、即ち急性骨髓性白血病(AML)で明らかにされた(Lapidot et al., 1994, Nature 77:645-8)。より最近になって、悪性のヒト乳腺腫瘍が、同様に、免疫不全マウスにおける腫瘍形成能力に富む癌幹細胞の小さな別個の集団を含むことが実証された。ESA+、CD44+、CD24-/low、Lin-細胞集団は、分画されていない腫瘍細胞と比較して、腫瘍形成性細胞が50倍豊富なことが判明した(Al-Hajj et al., 2003, Proc. Nat'l Acad. Sci. 100:3983-8)。腫瘍形成性癌細胞を予測的に単離することができれば、これらの細胞の腫瘍形成能の基礎となる重要な生物学的経路の研究が可能になり、したがって癌患者のためのより良い診断分析および治療法の開発が約束される。本発明の方向性は、この目的を目指している。

【発明の概要】

【0014】

本発明は初めて、Notch受容体ファミリーのリガンド結合ドメイン内の保存されたリガンド結合領域を特定する。具体的にはリガンド結合領域は、Notch1、Notch2、およびNotch4のEGF11内ならびにNotch3のEGF10内の、リガンド結合に必要な保存されたグルタミン酸を包含し、本発明は、このリガンド結合領域と特異的に相互作用する分子、およびその分子を作出する方法を提供する。ある態様において、本発明は、少なくとも一つのNotch受容体のリガンド結合領域に特異的に結合するアンタゴニストを提供する。ある態様において、アンタゴニストは抗体である。

【0015】

ある態様において、本発明は、少なくとも一つのヒトNotch受容体のグルタミン酸リガ

10

20

30

40

50

ンド結合領域に特異的に結合する単離抗体を提供する。ある態様において、抗体はNotchシグナル伝達のアンタゴニストである。ある態様において、抗体はリガンド結合を遮断する。ある態様において、抗体はモノクローナル抗体である。ある態様において、抗体はキメラ抗体である。ある態様において、抗体はヒト化抗体である。ある態様において、抗体はヒト抗体である。ある態様において、抗体は抗体断片である。ある態様において、本発明は、少なくとも一つのヒトNotch受容体のグルタミン酸リガンド結合領域に特異的に結合する抗体を含む薬学的組成物を提供する。

【 0 0 1 6 】

ある態様において、本発明は、ヒトNotch1受容体のグルタミン酸リガンド結合領域に特異的に結合する単離抗体を提供する。ある態様において、抗体は、ヒトNotch1受容体のアミノ酸422～432（アミノ酸

PCEHAGKCINT

)内のエピトープに結合する。ある態様において、抗体はヒトNotch1受容体のアミノ酸424～425（アミノ酸EH）に特異的に結合する。ある態様において、抗体はヒトNotch1受容体のアミノ酸424（アミノ酸E）に特異的に結合する。ある態様において、抗体は、CDRアミノ酸配列CDR1（SEQ ID NO:2）；CDR2（SEQ ID NO:3）；およびCDR3（SEQ ID NO:4）を含んだ重鎖可変領域を含む。ある態様において、抗体は、CDRアミノ酸配列CDR1（SEQ ID NO:6）；CDR2（SEQ ID NO:7）；およびCDR3（SEQ ID NO:8）を含んだ軽鎖可変領域をさらに含む。ある態様において、抗体は90R21（2008年1月24日付でアメリカン・タイプ・カルチャーライブラリ・コレクション（American Type Culture Collection），Manassas, VA 20108に寄託された；ATCC寄託番号__）である。ある態様において、抗体はNotchグルタミン酸リガンド結合領域との特異的結合について、抗体90R21（ATCC寄託番号__）と競合する。

【 0 0 1 7 】

ある態様において、本発明は、ヒトNotch2受容体のグルタミン酸リガンド結合領域に特異的に結合する単離抗体を提供する。ある態様において、抗体は、ヒトNotch2受容体のアミノ酸426～436（アミノ酸

PCEHAGKCVNT

)内のエピトープに特異的に結合する。ある態様において、抗体は、ヒトNotch2受容体のアミノ酸428～429（アミノ酸EH）に特異的に結合する。ある態様において、抗体は、ヒトNotch2受容体のアミノ酸428（アミノ酸E）に特異的に結合する。

【 0 0 1 8 】

ある態様において、本発明は、ヒトNotch3受容体のグルタミン酸リガンド結合領域に特異的に結合する単離抗体を提供する。ある態様において、抗体は、ヒトNotch3受容体のアミノ酸401～411（アミノ酸

PCEHLGRCVNT

)内のエピトープに特異的に結合する。ある態様において、抗体はヒトNotch3受容体のアミノ酸403～404（アミノ酸EH）に特異的に結合する。ある態様において、抗体はヒトNotch3受容体のアミノ酸403（アミノ酸E）に特異的に結合する。ある態様において、抗体は、CDRアミノ酸配列CDR1（SEQ ID NO:10）；CDR2（SEQ ID NO:11）；およびCDR3（SEQ ID NO:12）を含んだ重鎖可変領域を含む。ある態様において、抗体は、CDRアミノ酸配列CDR1（SEQ ID NO:14）；CDR2（SEQ ID NO:15）；およびCDR3（SEQ ID NO:16）を含んだ軽鎖可変領域をさらに含む。ある態様において、抗体はSEQ ID NO:9の重鎖可変領域およびSEQ ID NO:13の軽鎖可変領域を含んだ122R5である。ある態様において、抗体はNotchグルタミン酸リガンド結合領域との特異的結合について、抗体122R5（2008年1月24日付でアメリカン・タイプ・カルチャーライブラリ・コレクション（American Type Culture Collection），Manassas, VA 20108に寄託された；ATCC寄託番号__）と競合する。

【 0 0 1 9 】

ある態様において、本発明は、ヒトNotch4受容体のグルタミン酸リガンド結合領域に特異的に結合する単離抗体を提供する。ある態様において、抗体は、ヒトNotch4受容体のアミノ酸445～455（アミノ酸

10

20

30

40

50

PCEHGGSCLNT

)内のエピトープに特異的に結合する。ある態様において、抗体はヒトNotch4受容体のアミノ酸447～448(アミノ酸EH)に特異的に結合する。ある態様において、抗体はヒトNotch4受容体のアミノ酸447(アミノ酸E)に特異的に結合する。

【0020】

ある態様において、本発明は、二種またはそれ以上のヒトNotch受容体のグルタミン酸リガンド結合領域に特異的に結合する単離抗体を提供する。ある態様において、抗体はNotchシグナル伝達のアンタゴニストである。ある態様において、抗体はリガンド結合を遮断する。ある態様において、抗体はモノクローナル抗体である。ある態様において、抗体はキメラ抗体である。ある態様において、抗体はヒト化抗体である。ある態様において、抗体はヒト抗体である。ある態様において、抗体は抗体断片である。ある態様において、本発明は、二種またはそれ以上のヒトNotch受容体のグルタミン酸リガンド結合領域に特異的に結合する抗体を含む薬学的組成物を提供する。

10

【0021】

本発明は同様に、薬学的組成物および製造品を提供する。ある態様において、薬学的組成物は本開示のアンタゴニストおよび薬学的に許容されるビヒクルを含む。ある態様において、製造品は容器およびその中に含まれる組成物を含み、この組成物は本開示のアンタゴニストまたは薬学的組成物を含む。ある態様において、製造品は、癌を処置するために組成物を使用できることを示す添付文書(package inset)をさらに含む。ある態様において、添付文書は、癌幹細胞を含む癌を処置するために組成物を使用できることを示す。

20

【0022】

さらに提供するのは、被験体において癌を処置する方法である。ある態様において、癌を処置する方法は、本開示のアンタゴニストの治療上有効量を投与する段階を含む。本発明の治療用組成物を用いて処置できる固形腫瘍の例としては、肉腫および癌腫が挙げられるが、これらに限定されない。本発明のある種の方法において、癌は乳癌、結腸直腸癌、肺癌、膵臓癌、前立腺癌、肝臓癌、卵巣癌、頭頸部癌、皮膚癌、脳癌、または血液癌を含む。ある態様において、癌は腫瘍幹細胞を含む。

【0023】

ある態様において、本発明は、少なくとも一つのヒトNotch受容体のグルタミン酸リガンド結合領域に特異的に結合する抗体の治療上有効量を患者に投与する段階を含む、癌を処置する方法を提供する。ある態様において、抗体はNotchシグナル伝達のアンタゴニストである。ある態様において、抗体はリガンド結合を遮断する。ある態様において、抗体はモノクローナル抗体である。ある態様において、抗体はキメラ抗体である。ある態様において、抗体はヒト化抗体である。ある態様において、抗体はヒト抗体である。ある態様において、抗体は抗体断片である。ある態様において、本発明は、少なくとも一つのヒトNotch受容体のグルタミン酸リガンド結合領域に特異的に結合する抗体を含む薬学的組成物を提供する。ある態様において、抗体は細胞毒性成分に結合される。ある態様において、この方法は、併用療法を達成するのに適した少なくとも一つのさらなる治療剤を投与する段階をさらに含む。ある態様において、さらなる治療剤はパクリタキセルである。ある態様において、癌は乳癌、結腸直腸癌、肺癌、膵臓癌、前立腺癌、または頭頸部癌である。

30

【0024】

さらに提供るのは、少なくとも一つのヒトNotch受容体のグルタミン酸リガンド結合領域に対する抗体を作製する方法である。ある態様において、少なくとも一つのヒトNotch受容体のグルタミン酸リガンド結合領域に特異的に結合する抗体を作製する方法は、(a)ヒトNotch受容体のグルタミン酸リガンド結合領域を含むポリペプチドで被験体を免疫する段階と、(b)被験体から該ポリペプチドを結合する抗体を回収する段階とを含む。ある態様において、ポリペプチドのグルタミン酸リガンド結合領域は

PCEHXGYCXNX

を含み、この配列中でXは非極性脂肪族アミノ酸残基であり、Yは正荷電アミノ酸残基であ

40

50

る。ある態様において、ポリペプチドのグルタミン酸リガンド結合領域は
PCEHAGRCANT

を含む。ある態様において、ポリペプチドのグルタミン酸リガンド結合領域は、ヒトNotch1のアミノ酸422～432（アミノ酸

PCEHAGKCINT

）を含む。ある態様において、ポリペプチドのグルタミン酸リガンド結合領域は、ヒトNotch2のアミノ酸426～436（アミノ酸

PCEHAGKCVNT

）を含む。ある態様において、ポリペプチドのグルタミン酸リガンド結合領域は、ヒトNotch3のアミノ酸401～411（アミノ酸

10

PCEHLGRCVNT

）を含む。ある態様において、ポリペプチドのグルタミン酸リガンド結合領域は、ヒトNotch4のアミノ酸445～455（アミノ酸

PCEHGGSCLNT

）を含む。ある態様において、被験体は齧歯類である。ある態様において、齧歯類はマウスである。ある態様において、作製される抗体はモノクローナル抗体である。ある態様において、作製される抗体はヒト抗体である。

【0025】

ある態様において、少なくとも一つのヒトNotch受容体のグルタミン酸リガンド結合領域に特異的に結合する抗体を作製する方法は、（a）ヒトNotch受容体のグルタミン酸リガンド結合領域を含むポリペプチドに対してファージライブラリをパニングする段階と、（b）該ポリペプチドを結合するファージを単離する段階とを含む。ある態様において、ポリペプチドのグルタミン酸リガンド結合領域は

20

PCEHXGYCXNX

を含み、この配列中でXは非極性脂肪族アミノ酸残基であり、Yは正荷電アミノ酸残基である。ある態様において、ポリペプチドのグルタミン酸リガンド結合領域は

PCEHAGRCANT

を含む。ある態様において、ポリペプチドのグルタミン酸リガンド結合領域は、ヒトNotch1のアミノ酸422～432（アミノ酸

PCEHAGKCINT

30

）を含む。ある態様において、ポリペプチドのグルタミン酸リガンド結合領域は、ヒトNotch2のアミノ酸426～436（アミノ酸

PCEHAGKCVNT

）を含む。ある態様において、ポリペプチドのグルタミン酸リガンド結合領域は、ヒトNotch3のアミノ酸401～411（アミノ酸

PCEHLGRCVNT

）を含む。ある態様において、ポリペプチドのグルタミン酸リガンド結合領域は、ヒトNotch4のアミノ酸445～455（アミノ酸

PCEHGGSCLNT

）を含む。ある態様において、抗体はモノクローナル抗体である。ある態様において、抗体はキメラ抗体である。ある態様において、抗体はヒト化抗体である。ある態様において、抗体はヒト抗体である。ある態様において、抗体は抗体断片である。

40

【0026】

ある態様において、本発明は、本発明の抗体をコードする単離されたポリヌクレオチドを提供する。ある態様において、ポリヌクレオチドは、少なくとも一つのヒトNotch受容体のグルタミン酸リガンド結合領域に特異的に結合する抗体の重鎖可変領域をコードする。ある態様において、ポリヌクレオチドは、少なくとも一つのヒトNotch受容体のグルタミン酸リガンド結合領域に特異的に結合する抗体の軽鎖可変領域をコードする。

[請求項1001]

少なくとも一つのヒトNotch受容体のグルタミン酸リガンド結合領域に特異的に結合す

50

る単離抗体。

[請求項1002]

Notchシグナル伝達のアンタゴニストである、請求項1001記載の抗体。

[請求項1003]

リガンド結合を遮断する、請求項1002記載の抗体。

[請求項1004]

モノクローナル抗体である、請求項1001記載の抗体。

[請求項1005]

キメラ抗体である、請求項1001記載の抗体。

[請求項1006]

ヒト化抗体である、請求項1001記載の抗体。

[請求項1007]

ヒト抗体である、請求項1001記載の抗体。

[請求項1008]

抗体断片である、請求項1001記載の抗体。

[請求項1009]

請求項1004記載の抗体を産生するハイブリドーマ。

[請求項1010]

請求項1001記載の抗体と薬学的に許容されるビヒクルとを含む薬学的組成物。

[請求項1011]

ヒトNotch1受容体のグルタミン酸リガンド結合ドメインに特異的に結合する、請求項1001記載の単離抗体。

[請求項1012]

ヒトNotch1受容体のアミノ酸422～432(アミノ酸PCEHAGKCINT)内のエピトープに特異的に結合する、請求項1011記載の単離抗体。

[請求項1013]

ヒトNotch1受容体のアミノ酸424～425(アミノ酸EH)に特異的に結合する、請求項1011記載の単離作用物質。

[請求項1014]

ヒトNotch1受容体のアミノ酸424(アミノ酸E)に特異的に結合する、請求項1011記載の単離抗体。

[請求項1015]

CDRアミノ酸配列CDR1(SEQ ID NO:2)；CDR2(SEQ ID NO:3)；およびCDR3(SEQ ID NO:4)を含んだ重鎖可変領域を含む、請求項1011記載の単離抗体。

[請求項1016]

CDRアミノ酸配列CDR1(SEQ ID NO:6)；CDR2(SEQ ID NO:7)；およびCDR3(SEQ ID NO:8)を含んだ軽鎖可変領域をさらに含む、請求項1015記載の単離抗体。

[請求項1017]

90R21(ATCC寄託番号____)である、請求項1016記載の単離抗体。

[請求項1018]

ヒトNotch2受容体のグルタミン酸リガンド結合ドメインに特異的に結合する、請求項1001記載の単離抗体。

[請求項1019]

ヒトNotch2受容体のアミノ酸426～436(アミノ酸PCEHAGKCVNT)内のエピトープに特異的に結合する、請求項1018記載の単離抗体。

[請求項1020]

ヒトNotch2受容体のアミノ酸428～429(アミノ酸EH)に特異的に結合する、請求項1018記載の単離抗体。

10

20

30

40

50

[請求項1021]

ヒトNotch2受容体のアミノ酸428（アミノ酸E）に特異的に結合する、請求項1018記載の単離抗体。

[請求項1022]

ヒトNotch3受容体のグルタミン酸リガンド結合ドメインに特異的に結合する、請求項1001記載の単離抗体。

[請求項1023]

ヒトNotch3受容体のアミノ酸401～411（アミノ酸PCEHLGRCVNT

)内のエピトープに特異的に結合する、請求項1022記載の単離抗体。

10

[請求項1024]

ヒトNotch3受容体のアミノ酸403～404（アミノ酸EH）に特異的に結合する、請求項1022記載の単離抗体。

[請求項1025]

ヒトNotch3受容体のアミノ酸403（アミノ酸E）に特異的に結合する、請求項1022記載の単離抗体。

[請求項1026]

CDRアミノ酸配列CDR1（SEQ ID NO:10）；CDR2（SEQ ID NO:11）；およびCDR3（SEQ ID NO:12）を含んだ重鎖可変領域を含む、請求項1022記載の単離抗体。

[請求項1027]

CDRアミノ酸配列CDR1（SEQ ID NO:14）；CDR2（SEQ ID NO:15）；およびCDR3（SEQ ID NO:16）を含んだ軽鎖可変領域をさらに含む、請求項1015記載の単離抗体。

20

[請求項1028]

SEQ ID NO:9の重鎖可変領域およびSEQ ID NO:13の軽鎖可変領域を含んだ122R5である、請求項1016記載の単離抗体。

[請求項1029]

ヒトNotch4受容体のグルタミン酸リガンド結合ドメインに特異的に結合する、請求項1001記載の単離抗体。

[請求項1030]

ヒトNotch4受容体のアミノ酸445～455（アミノ酸

30

PCEHGGSCLNT

)内のエピトープに特異的に結合する、請求項1029記載の単離抗体。

[請求項1031]

ヒトNotch4受容体のアミノ酸447～448（アミノ酸EH）に特異的に結合する、請求項1029記載の単離抗体。

[請求項1032]

ヒトNotch4受容体のアミノ酸447（アミノ酸E）に特異的に結合する、請求項1029記載の単離抗体。

[請求項1033]

二種またはそれ以上のヒトNotch受容体のグルタミン酸リガンド結合領域に特異的に結合する単離抗体。

40

[請求項1034]

Notchシグナル伝達のアンタゴニストである、請求項1033記載の抗体。

[請求項1035]

リガンド結合を遮断する、請求項1033記載の抗体。

[請求項1036]

モノクローナル抗体である、請求項1033記載の抗体。

[請求項1037]

キメラ抗体である、請求項1033記載の抗体。

[請求項1038]

50

ヒト化抗体である、請求項1033記載の抗体。

[請求項1039]

ヒト抗体である、請求項1033記載の抗体。

[請求項1040]

抗体断片である、請求項1033記載の抗体。

[請求項1041]

請求項1036記載の抗体を産生するハイブリドーマ。

[請求項1042]

請求項1033記載の抗体と薬学的に許容されるビヒクルとを含む薬学的組成物。

[請求項1043]

Notchグルタミン酸リガンド結合領域との特異的結合について、抗体90R21 (ATCC寄託番号)と競合する单離抗体。

10

[請求項1044]

Notchグルタミン酸リガンド結合領域との特異的結合について、抗体122R5 (ATCC寄託番号)と競合する单離抗体。

[請求項1045]

請求項1001記載の抗体の治療上有効量を患者に投与する段階を含む、癌を処置する方法。

[請求項1046]

抗体がNotchシグナル伝達のアンタゴニストである、請求項1045記載の方法。

20

[請求項1047]

抗体がモノクローナル抗体である、請求項1045記載の方法。

[請求項1048]

抗体がキメラ抗体である、請求項1045記載の方法。

[請求項1049]

抗体がヒト化抗体である、請求項1045記載の方法。

[請求項1050]

抗体がヒト抗体である、請求項1045記載の方法。

[請求項1051]

抗体が抗体断片である、請求項1045記載の方法。

30

[請求項1052]

抗体が細胞毒性成分に結合される、請求項1045記載の方法。

[請求項1053]

併用療法を達成するのに適した少なくとも一種のさらなる治療剤を投与する段階をさらに含む、請求項1045記載の方法。

[請求項1054]

さらなる治療剤がパクリタキセルである、請求項1053記載の方法。

[請求項1055]

癌が乳癌、結腸直腸癌、肺癌、膵臓癌、前立腺癌、または頭頸部癌である、請求項1045記載の方法。

40

[請求項1056]

(a) ヒトNotch受容体のグルタミン酸リガンド結合領域を含むポリペプチドで被験体を免疫する段階と、

(b) 被験体から該ポリペプチドを結合する抗体を回収する段階とを含む、少なくとも一つのヒトNotch受容体のグルタミン酸リガンド結合領域に特異的に結合する抗体を作製する方法。

[請求項1057]

ポリペプチドのグルタミン酸リガンド結合領域が、PCEHXGYCXNX

を含み、この配列中でXが非極性脂肪族アミノ酸残基であり、Yが正荷電アミノ酸残基であ

50

る、請求項1056記載の方法。

[請求項1058]

ポリペプチドのグルタミン酸リガンド結合領域が、
PCEHAGRCANT

を含む、請求項1056記載の方法。

[請求項1059]

ポリペプチドのグルタミン酸リガンド結合領域が、ヒトNotch1のアミノ酸422～432（ア
ミノ酸

PCEHAGKCINT

）を含む、請求項1056記載の方法。

10

[請求項1060]

ポリペプチドのグルタミン酸リガンド結合領域が、ヒトNotch2のアミノ酸426～436（ア
ミノ酸

PCEHAGKCVNT

）を含む、請求項1056記載の方法。

[請求項1061]

ポリペプチドのグルタミン酸リガンド結合領域が、ヒトNotch3のアミノ酸401～411（ア
ミノ酸

PCEHLGRCVNT

）を含む、請求項1056記載の方法。

20

[請求項1062]

ポリペプチドのグルタミン酸リガンド結合領域が、ヒトNotch4のアミノ酸445～455（ア
ミノ酸

PCEHGGSCLNT

）を含む、請求項1056記載の方法。

[請求項1063]

被験体が齧歯類である、請求項1056記載の方法。

[請求項1064]

齧歯類がマウスである、請求項1063記載の方法。

30

[請求項1065]

抗体がモノクローナル抗体である、請求項1056記載の方法。

[請求項1066]

抗体がヒト抗体である、請求項1056記載の方法。

[請求項1067]

(a) ヒトNotch受容体のグルタミン酸リガンド結合領域を含むポリペプチドに対してフ
ァージライブリをパニングする段階と、

(b) 該ポリペプチドを結合するファージを単離する段階と

を含む、少なくとも一つのヒトNotch受容体のグルタミン酸リガンド結合領域に特異的に
結合する抗体を作製する方法。

[請求項1068]

40

ポリペプチドのグルタミン酸リガンド結合領域が、

PCEHXGYCXNX

を含み、この配列中でXが非極性脂肪族アミノ酸残基であり、Yが正荷電アミノ酸残基であ
る、請求項1067記載の方法。

[請求項1069]

ポリペプチドのグルタミン酸リガンド結合領域が、

PCEHAGRCANT

を含む、請求項1067記載の方法。

[請求項1070]

ポリペプチドのグルタミン酸リガンド結合領域が、ヒトNotch1のアミノ酸422～432（ア
ミノ酸

50

ミノ酸PCEHAGKCINT)を含む、請求項1067記載の方法。[請求項1071]ポリペプチドのグルタミン酸リガンド結合領域が、ヒトNotch2のアミノ酸426～436（アミノ酸PCEHAGKCVNT)を含む、請求項1067記載の方法。[請求項1072]ポリペプチドのグルタミン酸リガンド結合領域が、ヒトNotch3のアミノ酸401～411（アミノ酸

10

PCEHLGRCVNT)を含む、請求項1067記載の方法。[請求項1073]ポリペプチドのグルタミン酸リガンド結合領域が、ヒトNotch4のアミノ酸445～455（アミノ酸PCEHGGSCLNT)を含む、請求項1067記載の方法。[請求項1074]抗体がモノクローナル抗体である、請求項1067記載の方法。

20

[請求項1075]抗体がキメラ抗体である、請求項1067記載の方法。[請求項1076]抗体がヒト化抗体である、請求項1067記載の方法。[請求項1077]抗体がヒト抗体である、請求項1067記載の方法。[請求項1078]抗体が抗体断片である、請求項1067記載の方法。[請求項1079]少なくとも一つのヒトNotch受容体のグルタミン酸リガンド結合領域に特異的に結合する抗体の重鎖可変領域をコードする、単離ポリヌクレオチド。

30

[請求項1080]抗体がCDRアミノ酸配列CDR1（SEQ ID NO:2）；CDR2（SEQ ID NO:3）；およびCDR3（SEQ ED NO:4）を含んだ重鎖可変領域を含む、請求項1079記載の単離ポリヌクレオチド。[請求項1081]抗体がCDRアミノ酸配列CDR1（SEQ ID NO:10）；CDR2（SEQ ID NO:11）；およびCDR3（SEQ ID NO:12）を含んだ重鎖可変領域を含む、請求項1079記載の単離ポリヌクレオチド。[請求項1082]少なくとも一つのヒトNotch受容体のグルタミン酸リガンド結合領域に特異的に結合する抗体の軽鎖可変領域をコードする、単離ポリヌクレオチドベクター。

40

[請求項1083]抗体が、CDRアミノ酸配列CDR1（SEQ ID NO:6）；CDR2（SEQ ID NO:7）；およびCDR3（SEQ ID NO:8）を含んだ軽鎖可変領域を含む、請求項1082記載の単離ポリヌクレオチドベクター。[請求項1084]抗体が、CDRアミノ酸配列CDR1（SEQ ID NO:14）；CDR2（SEQ ID NO:15）；およびCDR3（SEQ ID NO:16）を含んだ軽鎖可変領域を含む、請求項1082記載の単離ポリヌクレオチドベクター。【図面の簡単な説明】【0027】

50

【図1】ヒトNotch1 EGFリピートおよび他のNotchタンパク質由来の選択されたEGFリピートのアライメント。ヒトNotch1(hN1)由来の全36種のEGFリピートがヒトNotch2(hN2)、ヒトNotch4(hN4)、ショウジョウバエNotch(d-N1)、およびアフリカツメガエルNotch(xeN1)のEGF11；ヒトNotch3のEGF10(Notch1 EGF11の機能的等価体)；ならびに線虫(*C. elegans*)Lin12(ce_lin12)のEGF9とともに整列されている。保存アミノ酸残基は黒色で強調されている。全リガンド結合領域にわたって保存されたグルタミン酸残基(E)は、ヒトNotch1のEGF11においてのみ見られる。矢印(上部)はEの位置を示し、角括弧は保存されたリガンド結合領域を示す。

【図2】Notch1受容体グルタミン酸424のグルタミンへの突然変異誘発はリガンド結合を著しく低減する。GFPおよび野生型Notch1またはNotch1 E424QのいずれかをコトランスフェクトしたHEK 293細胞のJagged1またはDLL4タンパク質との結合のFACS解析。GFP発現はNotch1タンパク質を発現している細胞を示し(x軸)、DLL4またはJagged1タンパク質のいずれかとの結合はy軸に沿って示す。野生型Notch1を発現している細胞は、DLL4(左上の四角形)もJagged1(左下の四角形)もともに結合した。対照的に、Notch1 E424Qを発現している細胞でDLL4(右上の四角形)またはJagged1(右下の四角形)のいずれかとの任意の結合を示したものは、有意に少なかった。

【図3】Notch2受容体グルタミン酸428のグルタミンへの突然変異誘発は、リガンド結合を著しく低減する。GFPおよび野生型Notch2またはNotch2 E428QのいずれかをコトランスフェクトしたHEK 293細胞のJagged1またはDLL4タンパク質との結合のFACS解析。GFP発現はNotch2タンパク質を発現している細胞を示し(x軸)、DLL4またはJagged1タンパク質のいずれかとの結合はy軸に沿って示す。野生型Notch2を発現している細胞は、DLL4(左上の四角形)もJagged1(左下の四角形)もともに結合した。対照的に、Notch2 E428Qを発現している細胞でDLL4(右上の四角形)またはJagged1(右下の四角形)のいずれかとの任意の結合を示したものは、有意に少なかった。

【図4】Notch1の重要なリガンド結合ドメインを結合するfAbの同定。ファージディスプレイによりNotch1のリガンド結合ドメインを結合すると特定されたヒトfAbを用いた、GFPおよび野生型NotchまたはNotch1 E424QのいずれかをコトランスフェクトしたHEK 293細胞のFACS解析。GFP発現は、組換えNotch1タンパク質を発現している細胞を示し(x軸)、Notch1との結合はy軸に沿って示す。fAbは天然のヒトNotch1に強く結合する(中央)が、リガンド結合領域の中にE424Q置換を含有するNotch1には結合しない(右側)。fAbの非存在下では結合が認められなかった(左側)。

【図5】複数のNotch受容体のリガンド結合領域を結合する抗体の同定。ファージディスプレイによりNotch3のリガンド結合ドメインを結合すると特定されたヒトfAbを用いた、GFPおよび野生型Notch3、Notch1、またはNotch1 E424QをコトランスフェクトしたHEK 293細胞のFACS解析。GFP発現は組換えNotchタンパク質を発現しているトランスフェクト細胞を示した(x軸)。fAbの結合はy軸に示す。

【図6】Notch1のリガンド結合ドメインを結合する親和性成熟mAbは、Notch1とのDLL4の結合を阻害する。FACS解析から、Notch1のリガンド結合ドメインを結合する一連の親和性成熟mAbの各種成員が、DLL4とNotch1との間の結合を強力に遮断することが示された。3種の親和性成熟変種を、漸増濃度の抗体(x軸)の存在下で、DLL4とNotch1(y軸)との間の結合を遮断するその能力について試験した。90R21(黒菱形、実線)、90R22(黒丸形、破線)、および90M29(黒三角形、点線)は全てリガンド結合を乱した。

【図7】Notch3のリガンド結合ドメインを結合しかつNotchリガンドの結合を強力に遮断するfAbの同定。GFPおよびNotch3をコトランスフェクトしたHEK 293細胞とのNotchリガンド(JAG1)の結合を遮断するとファージディスプレイにより特定されたNotch3リガンド結合ドメインを結合するfAbの能力が、FACS解析により示された。GFP発現は、組換えNotch3タンパク質を発現している細胞を示し(x軸)、Notch3と可溶性ヒトJag1(h-Jag1-Fc)との間の結合はy軸に沿って示す。結合は、抗体が存在しない場合にだけ認められ(左側)、この結合は、fAbが存在する場合にはなくなつた(右側)。

【図8】Notchリガンド結合ドメインに対するモノクローナル抗体は、Notchシグナル伝達

10

20

30

40

50

を阻害する。A) Notchシグナル伝達機構の概略図。リガンド結合によって、セクレターゼ活性はNotch受容体を切断し、細胞内ドメイン（ICD）を遊離して下流のNotchシグナル伝達を活性化する。B) Notchリガンド結合ドメインに対するモノクローナル抗体は、NotchリガンドDLL4に応じてNotchシグナル伝達を阻害する。Notchシグナル伝達の指標としてのNotch ICD形成のウエスタンプロット解析から、DLL4の存在がICDの強固な形成を誘導し（-DLL4および+DLL4を比較されたい）、セクレターゼ阻害剤（DBZ）の添加がこのシグナル伝達事象を遮断したことが確認された。Notchのリガンド結合領域に対する抗体（90R21、90R22、およびR9029）も、ICDの形成を阻害した。対照的に、リガンド結合エピトープの外側でNotchを結合する抗体（13M57）および非結合性の抗体（対照mAb）は、ICDの形成にほとんどまたは全く影響を与えない。

10

【図9】Notchリガンド結合ドメインに対するモノクローナル抗体は、インビボで腫瘍増殖を阻害する。NOD/SCIDマウスに解離PE13（A）またはT3（B）乳房腫瘍細胞を注射し、これを対照抗体（黒四角形）；抗Notchリガンド結合領域抗体90R21（白丸形）；パクリタキセルと併せた対照抗体（黒三角形）；またはパクリタキセルと併せた90R21抗体（白三角形）のいずれかで処理した。90R21抗体による処理は、対照抗体処置動物と比べて腫瘍増殖を著しく低減したが、パクリタキセルとの併用では腫瘍増殖を実質的になくした。

【発明を実施するための形態】

【0028】

発明の詳細な説明

「アンタゴニスト」という用語は、Notch経路の生物学的活性を部分的にまたは完全に遮断する、阻害する、または中和する任意の分子を含み、そのような生物学的活性は腫瘍増殖の阻害を含むが、これらに限定されない。適当なアンタゴニスト分子は、具体的には、アンタゴニスト抗体もしくは抗体断片、天然のNotch受容体の断片またはアミノ酸配列変種を含む。

20

【0029】

「抗体」という用語は、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、炭水化物、ポリヌクレオチド、脂質、または上記の組み合わせなどの標的を、免疫グロブリン分子の可変領域内の少なくとも一つの抗原認識部位によって認識しあつ特異的に結合する免疫グロブリン分子を意味するために用いられる。ある態様では、本発明の抗体には、癌幹細胞マーカータンパク質に特異的に結合し、かつ、例えばリガンド結合、受容体の二量体化、癌幹細胞マーカータンパク質の発現、および／または癌幹細胞マーカータンパク質の下流のシグナル伝達を妨害するアンタゴニスト抗体が含まれる。ある態様では、開示された抗体には、癌幹細胞マーカータンパク質に特異的に結合し、かつ、例えばリガンド結合、受容体の二量体化、および／または癌幹細胞マーカータンパク質によるシグナル伝達を促進するアゴニスト抗体が含まれる。ある態様では、開示された抗体は、癌幹細胞マーカータンパク質の生物活性を妨害も促進もしないが、例えば免疫系による抗体内在化および／または認識によって、腫瘍成長を阻害する。本明細書で用いられる「抗体」という用語は、抗体が所望の生物活性を示す限り、無傷の（intact）ポリクローナル抗体、無傷のモノクローナル抗体、抗体断片（Fab、Fab'、F(ab')2、およびFv断片など）、一本鎖Fv(scFv)突然変異体、少なくとも二つの無傷の抗体から生成された二重特異性抗体などの多重特異性抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、抗体の抗原決定部分を含む融合タンパク質、および抗原認識部位を含む任意の他の修飾された免疫グロブリン分子を包含する。抗体は、それぞれ、、、、およびμと呼ばれるその重鎖定常ドメインの同一性に基づいて、五つの主要なクラスの免疫グロブリン：IgA、IgD、IgE、IgG、およびIgM、またはそのサブクラス（アイソタイプ）（例えばIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、およびIgA2）のいずれかであり得る。異なるクラスの免疫グロブリンは、異なる周知のサブユニット構造および三次元構造を有する。抗体は、裸であっても、または毒素、放射性同位元素などの他の分子に結合していてもよい。

30

【0030】

本明細書で用いられる「抗体断片」という用語は、無傷の抗体の一部を指し、かつ無傷

40

50

の抗体の抗原決定可変領域を指す。抗体断片の例には、Fab、Fab'、F(ab')2、およびFv断片、直鎖状抗体、一本鎖抗体、ならびに抗体断片から形成される多重特異性抗体が、非限定的に含まれる。

【0031】

「Fv抗体」とは、一本の重鎖可変ドメインと一本の軽鎖可変ドメインが非共有結合性の二量体を形成している二本鎖として、あるいは、二つの鎖が同様の二量体構造で会合するように、一本の重鎖可変ドメインと一本の軽鎖可変ドメインが柔軟なペプチドリンカーによって共有結合している一本鎖(scFv)として、完全な抗原認識部位および抗原結合部位を含む、最小の抗体断片を指す。この構成では、各可変ドメインの相補性決定領域(CDR)が相互作用して、Fv二量体の抗原結合特異性を規定する。あるいは、一般的に親和性はより低いが、単一の可変ドメイン(あるいはFvの半分)を用いて抗原を認識および結合することができる。10

【0032】

本明細書で用いられる「モノクローナル抗体」とは、単一の抗原決定基、即ちエピトープの極めて特異的な認識および結合に関与する、均一な抗体集団を指す。これは、異なる抗原決定基を対象とした異なる抗体を典型的に含むポリクローナル抗体とは対照的である。「モノクローナル抗体」という用語は、無傷でありかつ全長であるモノクローナル抗体、ならびに抗体断片(Fab、Fab'、F(ab')2、Fvなど)、一本鎖(scFv)突然変異体、抗体部分を含む融合タンパク質、および抗原認識部位を含む任意の他の修飾免疫グロブリン分子を包含する。さらに、「モノクローナル抗体」とは、ハイブリドーマ、ファージ選択、組換え体発現、およびトランスジェニック動物による手法を非限定的に含む、多様な手法によつて作製される抗体を指す。20

【0033】

本明細書で用いられる「ヒト化抗体」という用語は、最小の非ヒト配列を含む、特異的な免疫グロブリン鎖、キメラ免疫グロブリン、またはそれらの断片である非ヒト(例えば、マウス)抗体の形を指す。典型的には、ヒト化抗体とは、相補性決定領域(CDR)由来の残基が、所望の特異性、親和性、および能力を有する非ヒト種(例えばマウス、ラット、ウサギ、ハムスター)のCDR由来の残基により置き換えられている、ヒト免疫グロブリンである。いくつかの例では、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク領域(FR)残基が、所望の特異性、親和性および能力を有する非ヒト種由来の抗体中の対応する残基で置き換えられる。ヒト化抗体を、Fvフレームワーク領域中および/または置き換えられた非ヒト残基の中の別の残基の置換によってさらに修飾して、抗体の特異性、親和性、および/または能力を、改良し、最適化することができる。一般にヒト化抗体は、非ヒト免疫グロブリンに対応するすべてまたは実質的にすべてのCDR領域を含む、少なくとも一つ、典型的には二つまたは三つの可変ドメインの実質的にすべてを含みうる。しかし一方で、すべてまたは実質的にすべてのFR領域は、ヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のFR領域である。ヒト化抗体はまた、免疫グロブリン定常領域またはドメイン(Fc)の少なくとも一部、通常はヒト免疫グロブリンの少なくとも一部を含むことができる。米国特許第5,225,539号に、ヒト化抗体を產生するために用いられる方法の例が述べられている。30

【0034】

本明細書で用いられる「ヒト抗体」という用語は、ヒトによって產生された抗体、または当技術分野で公知の任意の技術を用いて作製された、ヒトによって產生された抗体に対応するアミノ酸配列を有する抗体を意味する。ヒト抗体のこの定義は、無傷または全長の抗体、その断片、ならびに/または、例えばマウスの軽鎖およびヒトの重鎖ポリペプチドを含む抗体などの少なくとも一つのヒト重鎖および/もしくは軽鎖ポリペプチドを含む抗体を含む。

【0035】

「ハイブリッド抗体」とは、得られる四量体が二つの異なるエピトープまたは二つの異なる抗原を認識および結合することができるように、異なる抗原決定領域を有する抗体由来の重鎖と軽鎖の対が組み合わされている免疫グロブリン分子である。50

【0036】

「キメラ抗体」という用語は、免疫グロブリン分子のアミノ酸配列が二つまたはそれ以上の種に由来する抗体を指す。典型的には、軽鎖および重鎖両方の可変領域は、所望の特異性、親和性、および能力を有する一つの哺乳動物種(例えばマウス、ラット、ウサギなど)由来の抗体の可変領域に対応し、一方、定常領域は、別の種(通常ヒト)に由来する抗体中の配列と相同であり、上記の種において免疫応答を誘発することを回避する。

【0037】

「エピトープ」または「抗原決定基」という用語は、本明細書において互換的に用いられ、かつ、特定の抗体により認識されて特異的に結合することができる抗原の部分を指す。
。抗原がポリペプチドである場合、エピトープは、連続したアミノ酸、およびタンパク質の三次元的折り畳みによって近接して並べられた非連続アミノ酸の両方から形成することができる。連続するアミノ酸から形成されているエピトープは、タンパク質が変性した場合にも典型的には維持されるが、三次元的折り畳みによって形成されたエピトープは、タンパク質が変性すると典型的には失われる。エピトープは、独特の空間配置中に典型的には少なくとも3アミノ酸、より通常は少なくとも5または8~10アミノ酸を含む。

10

【0038】

「リガンド結合領域」、「グルタミン酸リガンド結合領域」、「Notch受容体リガンド結合領域」、「Notchリガンド結合領域」、「リガンド結合ドメイン」、またはその文法的变化形は、少なくとも一つのNotch受容体のリガンド結合ドメインのEGFリピート内の保存されたグルタミン酸を含む領域をいう。ある態様において、Notchリガンド結合領域はヒトNotch1、ヒトNotch2、ヒトNotch4、ショウジョウバエNotch、およびアフリカツメガエルNotchの一つもしくは複数のEGF11中、またはリガンド-受容体相互作用に不可欠なヒトNotch3のEGF10中の保存されたグルタミン酸を含む。ある態様において、Notchリガンド結合領域はヒトNotch1のアミノ酸422~432(

20

PCEHAGKCINT

)を含む。ある態様において、Notchリガンド結合領域はヒトNotch1のアミノ酸424~425(EH)を含む。ある態様において、Notchリガンド結合領域はヒトNotch1のアミノ酸424(E)を含む。ある態様において、Notchリガンド結合領域はヒトNotch2のアミノ酸426~436(

30

PCEHAGKCVNT

)を含む。ある態様において、Notchリガンド結合領域はヒトNotch2のアミノ酸428~429(EH)を含む。ある態様において、Notchリガンド結合領域はヒトNotch2のアミノ酸428(E)を含む。ある態様において、Notchリガンド結合領域はヒトNotch3のアミノ酸401~411(

30

PCEHLGRCVNT

)を含む。ある態様において、Notchリガンド結合領域はヒトNotch3のアミノ酸403~404(EH)を含む。ある態様において、Notchリガンド結合領域はヒトNotch3のアミノ酸403(E)を含む。ある態様において、Notchリガンド結合領域はヒトNotch4のアミノ酸445~455(

40

PCEHGGSCLNT

)を含む。ある態様において、Notchリガンド結合領域はヒトNotch4のアミノ酸447~448(EH)を含む。ある態様において、Notchリガンド結合領域はヒトNotch4のアミノ酸447(E)を含む。

【0039】

抗体が、エピトープ、抗原、または受容体に「選択的に結合する」または「特異的に結合する」ということは、抗体がエピトープに対し、無関係のタンパク質を含め、別の物質とよりも高い頻度で、素早く、長い持続時間で、高い親和性で、または前記のいくつかの組み合わせで、反応または結合することを意味する。「選択的に結合する」とは、例えば、抗体が少なくとも約0.1 mMの K_D で、但しより一般的には少なくとも約1 μMの K_D で、タンパク質に結合することを意味する。「特異的に結合する」とは、抗体が、時には少なく

50

とも約1 μMまたはそれ以上のK_Dで、およびある時には少なくとも約0.01 μMまたはそれ以上のK_Dで、タンパク質に結合することを意味する場合もある。同じファミリー中のタンパク質間の配列同一性のため、特異的結合は、同じタンパク質ファミリーの二種以上のタンパク質において相同なエピトープを認識する抗体を含むことができる。例えば、所与のNotch受容体（例えばNotch1）上のグルタミン酸リガンド結合領域との「特異的結合」は、その特定のNotch受容体中のNotchリガンド結合領域だけを認識する抗体を包含するだけでなく、その特定のNotch受容体のNotchリガンド結合領域および一つまたは複数の異なるNotch受容体のグルタミン酸リガンド結合領域を認識する抗体（例えばNotch1およびNotch2; Notch1およびNotch3; Notch1およびNotch4; Notch2およびNotch3; Notch2およびNotch4; Notch3およびNotch4; Notch1、Notch2およびNotch3; Notch1、Notch2およびNotch4; Notch1、Notch3、Notch4; Notch2、Notch3およびNotch4; ならびにNotch1、Notch2、Notch3およびNotch4のリガンド結合領域を認識する抗体）も包含する。異なる種中の相同タンパク質間の配列同一性のため、特異的結合は複数の種において、タンパク質、例えば癌幹細胞マーカータンパク質を認識する抗体を含むことができる。

【0040】

本明細書において、「非特異的結合」および「バックグラウンド結合」という用語は、抗体とタンパク質とのまたはペプチドとの相互作用について用いられる場合、特定の構造の存在に依存しない相互作用（即ち、抗体がエピトープなどの特定の構造ではなくタンパク質全般に結合している）を指す。

【0041】

「単離された」または「精製された」という用語は、その天然状態で通常はそれに付随する成分を実質的にまたは本質的に含まない物質を指す。純度および均一性は、典型的にはポリアクリルアミドゲル電気泳動法または高速液体クロマトグラフィーなどの分析化学技術を用いて決定される。調製物中に存在する主な種である本開示のタンパク質（例えば抗体）または核酸は、実質的に精製されている。詳細には、単離された核酸は、本来その遺伝子に隣接し、かつその遺伝子によってコードされるタンパク質以外のタンパク質をコードする、オーブンリーディングフレームから分離されている。単離された抗体は、他の非免疫グロブリンタンパク質から、および異なる抗原結合特異性を有する他の免疫グロブリンタンパク質から分離されている。これはまた、核酸またはタンパク質がいくつかの態様では少なくとも80%純粋であり、いくつかの態様では少なくとも85%純粋であり、いくつかの態様では少なくとも90%純粋であり、いくつかの態様では少なくとも95%純粋であり、そしていくつかの態様では少なくとも99%純粋であることを意味しうる。

【0042】

本明細書で用いる「癌」および「癌性」という用語は、ある細胞集団が無秩序な細胞増殖により特徴付けられる哺乳動物の生理的症状を指すかまたは説明する。癌の例には、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、および白血病が、非限定的に含まれる。そのような癌のより詳細な例には、扁平上皮癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺の腺癌、肺の扁平上皮癌、腹膜の癌、肝細胞癌、胃腸癌、膵臓癌、膠芽腫、子宮頸癌、卵巣癌、ヘパトーマ、膀胱癌、肝臓癌、乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌または子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌、肝臓癌、前立腺癌、外陰部癌、甲状腺癌、肝癌、および様々な型の頭頸部癌が含まれる。

【0043】

「増殖性障害」および「増殖性疾患」という用語は、癌などの異常な細胞増殖に関連した障害を指す。

【0044】

本明細書で使用する「腫瘍」および「新生物」とは、過度の細胞成長または増殖に起因する、前癌病変を含む良性（非癌性）病変または悪性（癌性）病変の任意の組織塊を指す。

【0045】

本明細書で使用する「転移」とは、癌が、新しい位置で同様の癌性病変の発生を伴って、身体の発生部位から他の領域へと拡張または移行するプロセスを指す。「転移性の」または「転移する」細胞とは、近傍の細胞との付着性接触を失い、疾患の原発部位から血流

10

20

30

40

50

またはリンパ液によって移動して、近傍の身体構造へと侵入する細胞である。

【0046】

「癌幹細胞」、「腫瘍幹細胞」、または「充実性腫瘍幹細胞」という用語は、本明細書で互換的に用いられ、かつ、(1) 高い増殖能を有し；(2) 非対称細胞分裂を行い、増殖能力または発生能力の低下した一つまたは複数種類の分化した後代細胞を產生することができ；かつ(3) 自己複製または自己維持のための対称細胞分裂を行うことができる、充実性腫瘍由来の細胞集団を指す。「癌幹細胞」、「腫瘍幹細胞」、または「充実性腫瘍幹細胞」のこれらの特性によって、免疫無防備状態のマウスへの累代移植の際に、これらの癌幹細胞は、腫瘍を形成できない大多数の腫瘍細胞と比較して触診可能な腫瘍を形成できる。癌幹細胞は、無秩序な様式で分化と自己複製を起こし、突然変異が生じるにつれて経時に変化することができる異常細胞型を含む腫瘍を形成する。充実性腫瘍幹細胞は、米国特許第6,004,528号によって提供される「癌幹細胞株 (cancer stem line)」とは異なる。
上記特許では、「癌幹細胞株」を、それ自体は殆ど突然変異を有さないが、細胞環境に生じる腫瘍形成性変化の結果として非対称細胞分裂ではなく対称細胞分裂を行う、ゆっくりと増殖する前駆細胞型であると定義している。したがってこの「癌幹細胞株」仮説は、高度に突然変異され急速に増殖している腫瘍細胞が主に異常な環境の結果として生じ、この異常な環境が、比較的正常な幹細胞を蓄積させてその後突然変異を起こし、これらを腫瘍細胞にすることを提唱している。米国特許第6,004,528号は、そのようなモデルを用いて癌の診断を促進できると提唱している。充実性腫瘍幹細胞モデルは、「癌幹細胞株」モデルと根本的に異なり、かつ結果として「癌幹細胞株」モデルでは与えられない有用性を示す。第1に、充実性腫瘍幹細胞は、「突然変異を免れて」はいない。米国特許第6,004,528号によって記載された「突然変異を免れた癌幹細胞株」は前癌病変と考えることができるが、一方、充実性腫瘍幹細胞は、前癌段階から後期段階癌まで腫瘍形成の原因となる突然変異をそれ自身が含みうる、癌細胞である。即ち、充実性腫瘍幹細胞(「癌幹細胞」)は、米国特許第6,004,528号の「癌幹細胞株」とは区別される高度に突然変異された細胞に含まれうる。第2に、癌をもたらす遺伝子突然変異は、環境的なものだけではなく、大部分は充実性腫瘍幹細胞内の内因性のものであり得る。充実性腫瘍幹細胞モデルは、単離された充実性腫瘍幹細胞が移植時にさらなる腫瘍を生じうることを予測しており(これにより転移が説明される)、その一方で「癌幹細胞株」モデルは、腫瘍形成性であるその異常な環境のため、移植された「癌幹細胞株」細胞が新しい腫瘍を生じさせることができないことを予測すると考えられる。確かに、解離され、表現型によって分離されたヒト充実性腫瘍幹細胞をマウスに(通常の腫瘍環境とは大きく異なる環境中へ)移植して、そこでも新しい腫瘍を形成しつづける能力は、本発明を「癌幹細胞株」モデルから区別するものである。第3に、充実性腫瘍幹細胞は、対称的分裂および非対称的分裂の両方を行う可能性が高く、したがって対称細胞分裂は絶対的な特性ではない。第4に、充実性腫瘍幹細胞は、多くの変数に依存して、急速にまたはゆっくりと分裂することができ、したがって遅い増殖速度は決定的な特性ではない。

【0047】

「癌細胞」、「腫瘍細胞」という用語、およびその文法上の等価物は、腫瘍細胞集団の大部分を含む非腫瘍形成性細胞および腫瘍形成性幹細胞(癌幹細胞)の両方を含む、腫瘍または前癌病変に由来する細胞の全集団を指す。

【0048】

本明細書で用いる「腫瘍形成性」とは、充実性腫瘍幹細胞が腫瘍を形成することを可能にする、自己複製(さらなる腫瘍形成性癌幹細胞を生ずる)および、他の全ての腫瘍細胞を產生するための増殖(分化しかつしたがって非腫瘍形成性である腫瘍細胞を生ずる)という特性を含む、充実性腫瘍幹細胞の機能的な特徴を指す。

【0049】

本明細書に用いる「幹細胞癌マーカー」、「癌幹細胞マーカー」、「腫瘍幹細胞マーカー」、または「充実性腫瘍幹細胞マーカー」という用語は、単独でまたは他の遺伝子と組み合わせたその発現レベルが、非腫瘍形成性細胞と比較して腫瘍形成性癌細胞の存在と相

10

20

30

40

50

関関係にある、一つもしくは複数の遺伝子、または該遺伝子により発現されるタンパク質、ポリペプチド、あるいはペプチドを指す。この相関関係は、遺伝子の増加したまたは減少した発現(例えば、遺伝子によってコードされるmRNAまたはペプチドの増加したまたは減少したレベル)のどちらとも関連しうる。

【0050】

本明細書に用いる「生検」または「生検組織」という用語は、試料が癌性組織を含むかどうかを判定する目的で被験体から取り出された組織または流体の試料を指す。いくつかの態様では、被験体が癌を有する疑いがあるため生検組織または流体を得て、次に該生検組織または流体を、癌の有無について検査する。

【0051】

本明細書で用いられる「被験体」という用語は、本明細書に記載の特定の処置またはプロトコールのレシピエントとなるべき、ヒト、非ヒト靈長類、齧歯類などを非限定的に含む任意の動物(例えば哺乳動物)を指す。典型的には、ヒト被験体に関して、本明細書では「被験体」と「患者」という用語を互換的に用いる。

【0052】

「薬学的に許容される」とは、ヒトを含む動物への使用が、連邦政府または州政府の監督官庁によって承認されたかまたは承認可能であること、あるいは米国薬局方または他の一般に認められた薬局方に記載されていることを指す。

【0053】

「薬学的に許容される塩」とは、薬学的に許容され、かつ親化合物の望ましい薬理活性を有する化合物の塩を指す。

【0054】

「薬学的に許容される賦形剤、担体、またはアジュバント」とは、本開示の抗体の少なくとも一つと共に被験体に投与することができ、かつ該抗体の薬理活性を破壊せず、かつ治療量の化合物を送達するのに十分な用量で投与したときに無毒である、賦形剤、担体またはアジュバントを指す。

【0055】

「薬学的に許容されるビヒクル」とは、本開示の抗体の少なくとも一つと共に投与される希釈剤、アジュバント、賦形剤または担体を指す。

【0056】

「プロドラッグ」とは、治療上有効な化合物を産生するためには身体内での変換を必要とする、治療上有効な化合物の誘導体を指す。治療上有効な親化合物へと変換されるまで、プロドラッグは薬理学的に不活性であり得る。

【0057】

「治療的有効量」という用語は、被験体または哺乳動物の疾患または障害を「処置する」のに有効な、抗体、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、有機低分子、または他の薬物の量を指す。癌の場合には、治療的有効量の薬物は、癌細胞の数を減少させること；腫瘍の大きさを縮小すること；例えば、軟組織および骨の中への癌の拡散を含む、辺縁の器官への癌細胞浸潤を阻害または停止させること；腫瘍転移を阻害および停止させること；腫瘍成長を阻害および停止させること；癌に関連した一つまたは複数の症状をある程度軽減させること；罹患率と死亡率を低下させること；生活の質を改善すること；あるいは、そのような効果の組み合わせが可能である。薬物が既存の癌細胞の増殖を防止しかつ／またはこれを死滅させるという点で、薬物を、細胞増殖抑制性および／または細胞障害性であると言ふことができる。

【0058】

本明細書に用いる「診断の提供」または「診断情報」とは、患者が疾患もしくは症状を有するかどうか判断する際に、および／あるいは、疾患または症状を表現型のカテゴリーに分類する際に、あるいは疾患または症状の予後または処置(処置全般または任意の特定の処置のいずれか)に対する予想される応答に関する重要な任意のカテゴリーに分類する際に有用な、例えば癌幹細胞の存在を含む、任意の情報を指す。同様に、診断とは、被験

10

20

30

40

50

体が症状(例えば腫瘍)を有する可能性があるかどうかの情報、被験体の腫瘍が癌幹細胞を含むかどうかの情報、例えばリスクの高い腫瘍もしくはリスクの低い腫瘍のような腫瘍の性質もしくは分類に関する情報、予後に関する情報、および／または適切な処置を選択するのに有用な情報を非限定的に含む、任意の型の診断情報を提供することを指す。処置の選択には、特定の化学療法剤または手術もしくは放射線などの他の処置様式の選択、あるいは療法を保留するか提供するかに関する選択が含まれ得る。

【0059】

本明細書に用いる「予後の提供」、「予後情報」、または「予測情報」という用語は、例えば被験体の腫瘍における癌幹細胞の存在を含む、被験体の将来の健康(例えば予期される罹患率または死亡率、癌に罹る可能性、および転移のリスク)に対する(例えば本発明の診断法によって決定されるような)癌の存在の影響に関する情報を提供することを指す。
10

【0060】

「処置する」または「処置」または「処置すること」または「軽減する」または「軽減すること」などの用語は、1) 診断された病理的症状または障害を治癒し、遅らせ、その症状を減少させ、かつ／またはその進行を停止させる治療の方策、および2) 標的とする病理的症状または障害の発生を防止しかつ／または遅延させる予防的または防止の方策の両方を指す。したがって、処置を必要とする人々には、既に障害を有する人々；障害を有しやすい人々；および障害が防止されるべき人々が含まれる。患者が下記の一つまたは複数を示せば、本発明の方法による被験体の「処置」は成功である：癌細胞の数の減少またはその完全な非存在；腫瘍サイズの縮小；例えば軟組織および骨の中への癌の拡散を含む、辺縁器官への癌細胞浸潤の阻害または非存在；腫瘍転移の阻害または非存在；腫瘍成長の阻害または非存在；特定の癌に関連する一つまたは複数の症状の軽減；罹患率および死亡率の低下；生活の質の改善；あるいは、効果のいくつかの組み合わせ。
20

【0061】

本明細書に用いられる「ポリヌクレオチド」または「核酸」という用語は、リン酸ジエステル結合によって連結された多数のヌクレオチド単位(リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチド、または関連する構造変種)から構成されるポリマーを指し、DNAまたはRNAを非限定的に含む。この用語は、4アセチルシトシン、8-ヒドロキシ-N6-メチルアデノシン、アジリジニルシトシン、プソイドイソシトシン、5(カルボキシヒドロキシルメチル)ウラシル、5-フルオロウラシル、5プロモウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル2チオウラシル、5カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、イノシン、N6イソペンテニルアデニン、1メチルアデニン、1-メチルプソイドウラシル、1メチルグアニン、1メチルイノシン、2,2-ジメチルグアニン、2メチルアデニン、2メチルグアニン、3-メチルシトシン、5メチルシトシン、N6メチルアデニン、7メチルグアニン、5メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル2チオウラシル、ベータDマンノシルキュオシン、5'メトキシカルボニルメチルウラシル、5メトキシウラシル、2メチルチオN6イソペンテニルアデニン、ウラシル5オキシ酢酸メチルエステル、5オキシ酢酸ウラシル、オキシブトキソシン、プソイドウラシル、キュオシン、2チオシトシン、5-メチル-2チオウラシル、2-チオウラシル、4チオウラシル、5-メチルウラシル、N-ウラシル5オキシ酢酸メチルエステル、5オキシ酢酸ウラシル、プソイドウラシル、キュオシン、2-チオシトシン、および2,6ジアミノプリンを含むが、これらに限定されない、DNAおよびRNAの公知の塩基アナログのいずれかを含む配列を包含する。
30
40

【0062】

「遺伝子」という用語は、ポリペプチド、前駆体、またはRNA(例えばrRNA、tRNA)の產生に必要なコード配列を含む核酸(例えばDNA)配列を指す。ポリペプチドは、全長または断片の配列の望ましい活性または機能特性(例えば酵素活性、リガンド結合、シグナル伝達、免疫原性など)を保持する限り、全長のコード配列またはコード配列の任意の部分によってコードされることができる。この用語はまた、構造遺伝子のコード領域、ならびに5'端および3'端の両方においてコード領域に隣接して位置する配列であって、遺伝子が全
50

長のmRNAの長さに対応するように、いずれかの端において約1kbまたはそれ以上の距離に及ぶものを包含する。コード領域の5'に位置しつつmRNA上に存在する配列は、5'非翻訳配列と呼ばれる。コード領域の3'即ち下流に位置しつつmRNA上に存在する配列は、3'非翻訳配列と呼ばれる。「遺伝子」という用語は、遺伝子のcDNA形態およびゲノム形態の両方を包含する。遺伝子のゲノム形態またはクローンは、「イントロン」または「介在領域」または「介在配列」と名付けられた非コード配列によって中断されたコード領域を含む。イントロンは核RNA (hnRNA)へ転写される遺伝子のセグメントであり；イントロンは、エンハンサーなどの調節エレメントを含むことができる。イントロンは、核転写産物または一次転写産物から除去され、即ち「切り出され」；したがって、イントロンはメッセンジャーRNA (mRNA)転写産物中には存在しない。mRNAは翻訳中に機能して、合成途中のポリペプチド中のアミノ酸の配列即ち順序を指定する。イントロンを含むことに加えて、遺伝子のゲノム形態は、さらにRNA転写産物上に存在する配列の5'および3'端の両方に位置する配列を含み得る。これらの配列は、「隣接」配列または「隣接」領域と呼ばれる(これらの隣接配列は、mRNA転写産物上に存在する非翻訳配列の5'または3'に位置する)。5'隣接領域は、遺伝子の転写を制御するかまたはそれに影響を及ぼすプロモーターおよびエンハンサーなどの調節配列を含むことができる。3'隣接領域は、転写の終結、転写後の切断およびポリアデニル化を指示する配列を含むことができる。

【0063】

「組換え」という用語は、細胞、核酸、タンパク質またはベクターに関して用いられる場合、異種の核酸もしくはタンパク質の導入によって、天然の核酸もしくはタンパク質の改変によって、細胞、核酸、タンパク質もしくはベクターが修飾されていること、または、細胞がそのように修飾された細胞に由来することを示す。したがって、例えば組換え細胞は、天然(非組換え)型の細胞中には見出されない遺伝子を発現し、または、過剰発現するかそうでなければ異常発現する、例えば、非天然断片もしくはスプライスバリアントとして発現する、天然の遺伝子を発現する。本明細書では、「組換え核酸」という用語は一般に、例えばポリメラーゼおよびエンドヌクレアーゼを用いる核酸の操作によって、本来はインビトロで形成される、天然には通常見出されない形式の核酸を意味する。このような様式で、異なる配列の機能的な連結が達成される。したがって、通常結合されないDNA分子のライゲーションによりインビトロで形成された、単離された直鎖状の核酸分子または発現ベクターはどちらも、本発明の目的のためには組換え体であるとみなされる。一旦組換え核酸が作製されて宿主の細胞または生物体に導入されると、これは非組換的に、即ち、インビトロ操作ではなく宿主細胞のインビオの細胞機構を用いて複製することが、理解される。しかし、そのような核酸は、一旦組換的に產生されると、その後非組換的に複製されるとても、本発明の目的に関しては依然として組換え体であるとみなされる。同様に、「組換えタンパク質」とは、組換え技術を用いて、すなわち上に記載したような組換え核酸の発現を通じて作製されたタンパク質である。

【0064】

本明細書で用いる「異種遺伝子」という用語は、その天然環境には存在しない遺伝子を指す。例えば、異種遺伝子は、ある種から別の種へ導入された遺伝子を含む。異種遺伝子はまた、何らかの方法で改変された(例えば、突然変異された、複数コピーで添加された、非天然調節配列へ連結されたなど)、生物体にとって天然である遺伝子を含む。異種遺伝子配列が、染色体中で該遺伝子配列との結合を天然には認められないDNA配列に典型的には結合しているか、または天然には認められない染色体部分(例えば通常は遺伝子が発現されない遺伝子座で発現した遺伝子)と結合しているという点で、異種遺伝子は内因性遺伝子と区別される。

【0065】

本明細書で用いる「ベクター」という用語は、DNAセグメントを一つの細胞から別の細胞へと移動させる核酸分子について用いられる。「ビヒクリ」という用語は、「ベクター」と互換的に用いられることがある。ベクターは、プラスミド、バクテリオファージ、あるいは植物または動物ウイルスに由来することが多い。

【0066】

「ライゲーション」とは、二つの二重鎖核酸断片間にリン酸ジエステル結合を形成するプロセスを指す。別段の定めのない限り、公知の緩衝液および条件を用いて、ほぼ等モル量のライゲーションされるべきDNA断片0.5ugにつき10単位のT4DNAリガーゼ(「リガーゼ」)により、ライゲーションを遂行することができる。核酸のライゲーションは、二つのタンパク質をインフレームで互いに連結させて、單一タンパク質、即ち融合タンパク質を生成する役割を果たすことができる。

【0067】

本明細書で用いる「遺伝子発現」という用語は、遺伝子中にコードされた遺伝情報を、遺伝子の「転写」を通じて(例えば、RNAポリメラーゼの酵素作用により)、RNA(例えは、mRNA、rRNA、tRNAまたはsnRNA)へ変換するプロセス、および、タンパク質をコードする遺伝子については、mRNAの「翻訳」を通じてタンパク質へ変換するプロセスを指す。遺伝子発現を、プロセス中の多くの段階で調節することができる。「アップレギュレーション」または「活性化」とは、遺伝子発現産物(例えはRNAまたはタンパク質)の産生を増加させる調節を指し、一方で「ダウンレギュレーション」または「抑制」とは、産生を減少させる調節を指す。アップレギュレーションまたはダウンレギュレーションに関係する分子(例えは転写因子)は、それぞれ「アクチベーター」および「リプレッサー」と呼ばれることが多い。

10

【0068】

「ポリペプチド」、「ペプチド」、「タンパク質」および「タンパク質断片」という用語は本明細書で互換的に用いられ、アミノ酸残基のポリマーを指す。この用語は、天然アミノ酸ポリマーおよび非天然アミノ酸ポリマーはもとより、一つまたは複数のアミノ酸残基が、対応する天然アミノ酸の人工的な化学的模倣体である、アミノ酸ポリマーにも適用される。

20

【0069】

「アミノ酸」という用語は、天然および合成のアミノ酸、ならびに天然アミノ酸と同様に機能するアミノ酸アナログおよびアミノ酸模倣体を指す。天然アミノ酸とは、遺伝暗号によってコードされたアミノ酸、ならびに後で修飾されたアミノ酸、例えはヒドロキシプロリン、-カルボキシグルタミン酸、およびD-ホスホセリンである。アミノ酸アナログは、例えは水素、カルボキシル基、アミノ基、およびR基に結合した炭素のような、天然アミノ酸と同じ基礎的化学構造を有する化合物、例えはホモセリン、ノルロイシン、メチオニンスルホキシド、メチオニンメチルスルホニウムを指す。そのようなアナログは、修飾されたR基(例えはノルロイシン)または修飾されたペプチド骨格を有することができるが、天然アミノ酸と同じ基礎的化学構造を保持する。アミノ酸模倣体とは、アミノ酸の一般的な化学構造とは異なる構造を有するが天然アミノ酸と同様に機能する化学化合物を指す。

30

【0070】

「保存的修飾変異体」は、アミノ酸および核酸配列の両方に適用される。「アミノ酸変異体」はアミノ酸配列を指す。特定の核酸配列について、保存的修飾変異体とは、同一のまたは本質的に同一のアミノ酸配列をコードする核酸を指し、あるいは、核酸がアミノ酸配列をコードしない場合には、本質的に同一の配列または関連した(例えは、本来隣接している)配列を指す。遺伝暗号の縮退のために、多数の機能的に同一の核酸が大部分のタンパク質をコードする。例えは、コドンGCA、GCC、GCGおよびGCUはすべて、アミノ酸のアラニンをコードする。したがって、コドンがアラニンを指定するすべての位置で、コードされるポリペプチドを改変することなく、該コドンを前述の対応する別のコドンに改変することができる。そのような核酸変異は「サイレントな変異」であり、これは、保存的に修飾された変異の一種である。本明細書においてあるポリペプチドをコードする全ての核酸配列は、該核酸のサイレントな変異も記載している。特定の文脈において、核酸中の各コドン(通常はメチオニンのただ一つのコドンであるAUGおよび通常はトリプトファンのただ一つのコドンであるTGGを除く)を修飾して機能的に同一の分子を得ることができること

40

50

を、当業者は認識するであろう。従って、ポリペプチドをコードする核酸のサイレントな変異は、発現産物については、記載される配列中に潜在しているが、実際のプローブ配列ではそうではない。アミノ酸配列については、改変が化学的に類似のアミノ酸によるアミノ酸置換をもたらす場合を含め、コード配列中の單一アミノ酸または数パーセントのアミノ酸を改変するか、追加するか、または欠失させる、核酸、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質の配列への個々の置換、欠失または追加が「保存的に修飾された変異体」であることを、当業者は認識するであろう。機能的に類似のアミノ酸を提供する保存的置換表が、当技術分野において周知である。そのような保存的修飾変異体は、本発明の多型変異体、異種間ホモログ、および対立遺伝子に含まれるものであって、それらを除外するものではない。典型的には、保存的置換には以下のものが含まれる：1) アラニン(A)、グリシン(G)；2) アスパラギン酸(D)、グルタミン酸(E)；3) アスパラギン(N)、グルタミン(Q)；4) アルギニン(R)、リジン(K)；5) イソロイシン(I)、ロイシン(L)、メチオニン(M)、バリン(V)；6) フェニルアラニン(F)、チロシン(Y)、トリプトファン(W)；7) セリン(S)、スレオニン(T)；および8) システイン(C)、メチオニン(M)（例えば Creighton, Proteins (1984) を参照のこと）。 10

【 0 0 7 1 】

本明細書に用いる「エピトープタグを付けた」という用語は、「エピトープタグ」に融合された癌幹細胞マーカータンパク質、あるいはそのドメイン配列またはその一部を含むキメラポリペプチドを指す。エピトープタグポリペプチドは、抗体による認識用のエピトープを提供するためには十分なアミノ酸残基を含むが、それでも癌幹細胞マーカータンパク質の活性を邪魔しない程度に十分に短い。適当なエピトープタグは、一般に少なくとも6アミノ酸残基、通常約8～約50アミノ酸残基、そして時には約10～約20アミノ酸残基を有する。一般に使用されるエピトープタグには、Fc、HA、His、およびFLAGタグが含まれる。

【 0 0 7 2 】

本発明の説明

本発明は、癌を研究、診断、特徴決定、および処置するための組成物および方法を提供する。具体的に本発明は、Notch受容体に対するアンタゴニスト（抗体を含む）と、ヒト患者において腫瘍増殖を阻害するためおよび癌を処置するためのこのようなアンタゴニストの使用方法とを提供する。ある態様において、本発明の抗体は、少なくとも一つのNotch受容体の保存されたリガンド結合領域に特異的に結合し、腫瘍増殖を阻害する。 30

【 0 0 7 3 】

本発明により、Notch受容体ファミリーのリガンド結合ドメイン内の保存されたリガンド結合領域が初めて特定される。具体的には、リガンド結合領域は、Notch1、Notch2、およびNotch4のEGF11内、ならびにリガンド結合に必要なNotch3のEGF10内の保存されたグルタミン酸を包含し、本発明は、このリガンド結合領域と特異的に相互作用してNotch受容体とのリガンドの結合を妨害する分子、およびその分子を作出する方法を提供する。ある態様において、本発明は、少なくとも一つのNotch受容体のリガンド結合領域に特異的に結合し、腫瘍細胞の増殖を阻害するアンタゴニストを提供する。ある態様において、アンタゴニストは抗体である。ある態様において、本発明は、二種またはそれ以上のNotch受容体のリガンド結合領域に特異的に結合し、腫瘍細胞の増殖を阻害する単離アンタゴニストを提供する。ある態様において、アンタゴニストは抗体である。 40

【 0 0 7 4 】

本発明は同様に、薬学的組成物および製造品を提供する。ある態様において、薬学的組成物は、本開示のアンタゴニストおよび薬学的に許容されるビヒクルを含む。ある態様において、製造品は容器およびその中に含まれる組成物を含み、この組成物は本開示のアンタゴニストまたは薬学的組成物を含む。ある態様において、製造品は、癌を処置するために組成物を使用できることを示す添付文書をさらに含む。ある態様において、添付文書は、癌幹細胞を含む癌を処置するために組成物を使用できることを示す。

【 0 0 7 5 】

10

20

30

40

50

さらに提供するのは、被験体において癌を処置する方法である。ある態様において、癌を処置する方法は、腫瘍細胞増殖を阻害するのに有効な量で本開示のアンタゴニストの治療上有効量を投与する段階を含む。本発明の治療用組成物を用いて処置できる固形腫瘍の例としては、肉腫および癌腫が挙げられるが、これらに限定されない。本発明のある種の方法において、癌は、乳癌、結腸癌、肺腺癌、前立腺癌、肺癌、頭頸部癌、直腸癌、および結腸直腸癌からなる群より選択される。ある態様において、癌は腫瘍幹細胞を含む。

【0076】

癌幹細胞およびNotch受容体

一般的な癌は、短命の成熟細胞の補充に関する増殖細胞の亜集団を含有する組織に発生する。そのような臓器において、細胞の成熟は階層的に配置されており、そのなかでは稀有な幹細胞集団がより分化した細胞を生み出し、自己再生と呼ばれる過程を通じてそれら自体を不滅にしもする (Akashi & Weissman, *Developmental Biology of Hematopoiesis*, Oxford Univ. Press, NY, 2001; Spangrude et al., 1988, *Science* 241:58-61; Baum et al., 1992, *PNAS* 89:2804-8; Morrison et al., 1995, *PNAS* 92:10302-6; Morrison et al., 1996, *Immunity* 5:207-16; Morrison et al., 1995, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 11:35-71; Morrison et al., 1997, *Dev.* 124:1929-39; Morrison & Weissman, 1994, *Immunity* 1:661; Morrison et al., 1997, *Cell* 88:287-98; Uchida et al., 2000, *PNAS* 97:14720-5; Morrison et al., 2000, *Cell* 101:499-510)。大部分の組織は幹細胞を含有する可能性が高いが、その稀少性により、これらの細胞は、その生物学的、分子的、および生化学的特性を研究するために、ほんのわずかな組織において厳密に同定され精製されているにすぎない。最も良く特徴付けのなされた幹細胞は、造血幹細胞 (HSC) と呼ばれる、造血系をもたらすものである。HSCの有用性は、癌療法において、骨髄破壊的プロトコルの後に血液リンパ系を再生するための骨髄移植にそれが広く用いられており証されている (Baum et al., *Bone Marrow Transplantation*, Blackwell Scientific Publications, Boston, 1994)。癌が発生する組織の、具体的にはそれらの組織に存在する幹細胞の細胞生物学を理解することは、癌生物学への新しい洞察を提供する。

【0077】

充実性腫瘍は、それらが生ずる組織と同様に、異種の細胞の集団から成る。これらの細胞の大多数が腫瘍形成能を欠くことが、充実性腫瘍の発生および維持もまた、増殖しかつ、さらなる腫瘍幹細胞(自己複製)および腫瘍形成能を欠くより分化した腫瘍細胞の大多数(即ち非腫瘍形成性癌細胞)の両方を効率的に生じる能力を有する幹細胞小集団(即ち腫瘍形成性癌細胞)に依存していることを示唆した。癌幹細胞の概念は、造血幹細胞(HSC)の発見の直後にまず導入され、急性骨髓性白血病(AML)において実験的に確立された(Park et al., 1971, *J. Natl. Cancer Inst.* 46:411-22; Lapidot et al., 1994, *Nature* 367:645-8; Bonnet & Dick, 1997, *Nat. Med.* 3:730-7; Hope et al., 2004, *Nat. Immunol.* 5:7 38-43)。充実性腫瘍由来の幹細胞は、より最近になって、その細胞表面受容体発現の独特的なパターンならびに培養中および異種移植片動物モデル中の自己複製および増殖特性の評価に基づいて、単離された。分画されていない腫瘍細胞と比較して50倍を上回る腫瘍形成能を有するESA+CD44+CD24-/low系列集団が発見された(AI-Hajj et al., 2003, *Proc. Nat'l. Acad. Sci.* 100:3983-8)。大量の非腫瘍形成性腫瘍細胞から腫瘍形成性癌幹細胞を単離できる能力が、マイクロアレイ分析を用いた、癌幹細胞マーカーである、非腫瘍形成性腫瘍細胞または正常な乳房上皮と比較して癌幹細胞中で差示的発現を有する遺伝子の同定につながった。本発明は、これらの同定された癌幹細胞マーカーの知識を利用して、癌を研究し、特徴決定し、診断し、処置を行う。

【0078】

正常幹細胞および癌幹細胞は、増殖能および自己複製能を共有し、したがって正常幹細胞の発生を制御する多くの遺伝子が腫瘍発生に寄与することは驚くことではない (Reya et al., 2001, *Nature* 414:105-111 and Taipale & Beachy, 2001, *Nature* 411:349-354 に概説されている)。本発明の癌幹細胞マーカーはヒトNotch受容体に関する。Notchシグナル伝達経路は胚のパターン形成、後胚期の組織維持および幹細胞生物学に関するいくつ

10

20

30

40

50

かの重要な制御因子のうちの一つである。より具体的には、Notchシグナル伝達は、隣接細胞運命 (adjacent cell) 間の側方抑制の過程に関与し、非対称細胞分裂中の細胞運命決定に重要な役割を果たす。未制御のNotchシグナル伝達は多数のヒト癌に関連しており、ここでこれは腫瘍細胞の発生的運命を変化させて、未分化の増殖状態で維持することができる (Brennan and Brown, 2003, Breast Cancer Res. 5:69)。したがって、幹細胞集団による正常な発達および組織修復を制御する恒常性維持機構を奪うことにより、発癌は進行しうる(Beachy et al., 2004, Nature 432:324)。

【 0 0 7 9 】

Notch受容体はショウジョウバエ (*Drosophila*) 変異体において最初に同定された。ショウジョウバエ Notch のハプロ不全によって翅末端 (wing margin) にV字の切り込みが起こるが、機能喪失によって、表皮細胞の運命が神経組織へと切り替わる胚致死的な「神経原性」の表現型が生じる (Moehr, 1919, Genet. 4:252; Poulson, 1937, PNAS 23:133; Poulson, 1940, J. Exp. Zool. 83:271)。Notch受容体は、大きな細胞外ドメイン内に多数の上皮増殖因子 (EGF) 様タンデムリピートおよびシスティンリッチなNotch/LIN-12リピートを含有する1回膜貫通型受容体である (Wharton et al., 1985, Cell 43:567; Kidd et al., 1986, Mol. Cell Biol. 6:3094; reviewed in Artavanis et al., 1999, Science 284: 770)。四つの哺乳類Notchタンパク質が同定されており (NOTCH1、NOTCH2、NOTCH3、および NOTCH4)、これらの受容体における突然変異は、以下に詳述するようにいくつかの癌を含むヒト病変および発達異常を必ず引き起こす (Gridley, 1997, Mol. Cell Neurosci. 9:10 3; Joutel & Tournier-Lasserve, 1998, Semin. Cell Dev. Biol. 9:619-25)。

【 0 0 8 0 】

Notch受容体はDelta, Serrated, Lag-2 (DSL) ファミリーの1回膜貫通型リガンドによって活性化される。哺乳類における公知のNotchリガンド・デルタ様1 (DII1)、デルタ様3 (DII3)、デルタ様4 (DII4)、Jagged 1、およびJagged 2は、細胞外ドメイン内のDSLドメインおよびEGF様タンデムリピートによって特徴付けられる。Notch受容体の細胞外ドメインは、典型的には隣接細胞上の、そのリガンドの細胞外ドメインと相互作用し、Notchの2回のタンパク質分解的切断、つまりADAMプロテアーゼによって媒介される細胞外切断およびガンマセクレターゼによって媒介される膜貫通ドメイン内での切断を引き起こす。この後者の切断によってNotch細胞内ドメイン (NICD) が生ずる。次いでNICDが核に入り、そこで主要な下流エフェクターとして転写因子のCBF1/Suppressor of Hairless [Su(H)]/Lag-2 (CSL) ファミリーを活性化し、Hairy and Enhancer of Split [E(spl)] ファミリーの核塩基性ヘリックス・ループ・ヘリックス転写因子の転写を増大する (Artavanis et al., 1999, Science 284:770; Brennan and Brown, 2003, Breast Cancer Res. 5:69; Iso et al., 2003, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 23:543)。ショウジョウバエにおいて同定された細胞質タンパク質 Deltex が関与する別の細胞内経路も哺乳類において存在する可能性があり (Martinez et al., 2002, Curr. Opin. Genet. Dev. 12:524-33)、このDeltex依存的経路はWnt標的遺伝子の発現を抑制するように作用しうる (Brennan et al., 1999, Curr. Biol. 9:707-710; Lawrence et al., 2001, Curr. Biol. 11:375-85)。

【 0 0 8 1 】

造血幹細胞 (HSC) は、最もよく理解されている体内的幹細胞であり、Notchシグナル伝達は、それらの正常な維持および白血病性形質転換の両方に関係している (Kopper & Hajdu, 2004, Pathol. Oncol. Res. 10:69-73)。HSCは、成人の骨髄内の間質間隙に存在する僅かな数の細胞である。これらの細胞は、独自の遺伝子発現プロファイル、ならびにより分化した始原細胞を継続的に生みだして造血システム全体を再構成する能力の両方によって、特徴づけられる。HSCおよび前駆細胞におけるNotch1シグナル伝達の構成的活性化により、インビトロにおいておよび長期再構築アッセイにおいてリンパ球細胞と骨髄性細胞の両方を生じる不死化細胞株が樹立され (Varnum-Finney et al., 2000, Nat. Med. 6: 1278-81)、Jagged 1の存在はHSCに富むヒト骨髄細胞集団の生着を高める (Karanu et al., 2000, J. Exp. Med. 192:1365-72)。つい最近、Notchシグナル伝達がインビオのHSCにおいて実証され、HSC分化の阻害に関与することが明らかにされた。さらに、Notchシグナル伝達

10

20

30

40

50

はWntを介したHSCの自己再生に必要であるように思われる(Duncan et al., 2005, *Nat. Immunol.* 6:314)。

【 0 0 8 2 】

Notchシグナル伝達経路は同様に、神経幹細胞の維持において中心的な役割を果たし、その正常な維持にも脳腫瘍にも関与している(Kopper & Hajdu, 2004, *Pathol. Oncol. Res.* 10:69-73; Purow et al., 2005, *Cancer Res.* 65:2353-63; Hallahan et al., 2004, *Cancer Res.* 64:7794-800)。神経幹細胞は発達の間に哺乳類神経系において全てのニューロンおよびグリア細胞をもたらし、つい最近では、成体脳において同定された(Gage, 2000, *Science* 287:1433-8)。Notch1、Notch標的遺伝子Hes1、3、および5、ならびにNotchシグナル伝達経路の制御因子プレセニリン1 (PS1)の欠損マウスは、胚性神経幹細胞数の減少を示す。さらに、PS1ヘテロ接合体マウスの脳において成体神経幹細胞が減少する(Nakamura et al., 2000, *J. Neurosci.* 20:283-93; Hitoshi et al., 2002, *Genes Dev.* 16:846-58)。神経幹細胞の減少はニューロンへのその未成熟な分化から生じているようであり(Hatakeyama et al., 2004, *Dev.* 131:5539-50)、Notchシグナル伝達が神経幹細胞の分化および自己再生を調節することを示唆している。10

【 0 0 8 3 】

異常なNotchシグナル伝達はいくつかのヒト癌に関与している。ヒトでのNOTCH1遺伝子は、一部のT細胞性急性リンパ芽球性白血病でNotch経路の活性化をもたらす転座遺伝子座として最初に同定された(Ellisen et al., 1991, *Cell* 66:649-61)。マウスモデルにおけるT細胞でのNotch1シグナル伝達の構成的活性化は同様にT細胞リンパ腫を生じ、このことは、その原因としての役割を示唆するものである(Robey et al., 1996, *Cell* 87:483-92; Pear et al., 1996, *J. Exp. Med.* 183:2283-91; Yan et al., 2001, *Blood* 98:3793-9; Bellavia et al., 2000, *EMBO J.* 19:3337-48)。最近、異常なNOTCH1シグナル伝達をもたらすNOTCH1の点突然変異、挿入、および欠失が、小児と成人の両方のT細胞性急性リンパ芽球性白血病/リンパ腫において高い頻度で存在していることが見出されている(Pear & Aster, 2004, *Curr. Opin. Hematol.* 11:416-33)。20

【 0 0 8 4 】

乳腺腫瘍においてNotch1およびNotch4の両遺伝子座にマウス乳癌ウイルスが頻繁に挿入されており、得られた活性化Notchタンパク質断片が、Notchシグナル伝達を乳癌に最初に結び付けるものであった(Gallahan & Callahan, 1987, *J. Virol.* 61:66-74; Brennan & Brown, 2003, *Breast Cancer Res.* 5:69; Politi et al., 2004, *Semin. Cancer Biol.* 14:341-7)。トランスジェニックマウスにおけるさらなる研究から、正常な乳腺発達の間の管分岐におけるNotchの役割が確認されており、乳房上皮細胞でのNotch4の構成的活性化型は上皮分化を阻害し、腫瘍形成を引き起こす(Jhappan et al., 1992, *Genes & Dev.* 6:345-5; Gallahan et al., 1996, *Cancer Res.* 56:1775-85; Smith et al., 1995, *Cell Growth Differ.* 6:563-77; Soriano et al., 2000, *Int. J. Cancer* 86:652-9; Uyttendaele et al., 1998, *Dev. Biol.* 196:204-17; Politi et al., 2004, *Semin. Cancer Biol.* 14:341-7)。現在、ヒト乳癌におけるNotchの役割に関する根拠は、乳癌におけるNotch受容体の発現および臨床転帰とのその相関関係に限定されている(Weijzen et al., 2002, *Nat. Med.* 8:979-86; Parr et al., 2004, *Int. J. Mol. Med.* 14:779-86)。さらに、Notch経路の過剰発現が子宮頸癌(Zagouras et al., 1995, *PNAS* 92:6414-8)、腎細胞癌(Rae et al., 2000, *Int. J. Cancer* 88:726-32)、頭頸部扁平上皮癌(Leethanakul et al., 2000, *Oncogene* 19:3220-4)、子宮内膜癌(Suzuki et al., 2000, *Int. J. Oncol.* 17:1131-9)、および神経芽細胞腫(van Limpt et al., 2000, *Med. Pediatr. Oncol.* 35:554-8)において認められており、いくつかの新生物の発生におけるNotchの潜在的な役割を示している。興味深いことに、Notchシグナル伝達は結腸のApc変異体新生細胞の未分化状態の維持に関する可能性がある(van Es & Clevers, 2005, *Trends Mol. Med.* 11:496-502)。30

。

【 0 0 8 5 】

Notch経路は同様に、増殖、移動、平滑筋分化、血管形成、および動脈-静脈分化を含む50

血管発生の複数の局面に関与している(Iso et al., 2003, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 23:543)。例えば、Notch-1/4およびJagged-1でのホモ接合性のヌル突然変異ならびにDII4のヘテロ接合性の喪失は動脈の発生および卵黄嚢血管形成における深刻な、しかし可変的な欠陥を引き起こす。さらに、DII1欠損およびNotch-2低形質のマウス胚は、血管構造の発生不良から生じる可能性が高い出血を示す(Gale et al., 2004, PNAS, 101:15 949-54; Krebs et al., 2000, Genes Dev. 14:1343-52; Xue et al., 1999, Hum. Mol. Genet. 8:723-30; Hrabe de Angelis et al., 1997, Nature 386:717-21; McCright et al., 2001, Dev. 128:491-502)。ヒトの場合、JAGGED1における突然変異は、血管障害を含む発達障害であるアラジール症候群と関係しており、NOTCH3における突然変異は、血管恒常性に欠陥のある遺伝性血管性認知症(CADASIL)に関与している(Joutel et al., 1996, Nature 383:707-10)。

【 0 0 8 6 】

Notch受容体が正常乳房上皮と比べて癌幹細胞において発現されていることが同定され、非腫瘍形成性癌細胞の大部分だけでなく固形腫瘍の形成および再発に関与する腫瘍形成性細胞の除去のためにもNotch経路が標的となることが示唆された。さらに、腫瘍の形成および維持における血管形成の重要な役割のため、Notch受容体に対する抗体によりNotch経路を標的化することで、血管形成を効果的に阻害し、癌から栄養素を奪い、その除去に寄与することもできる。

【 0 0 8 7 】

Notch受容体は、細胞外ドメイン内のいくつかのEGFリピートを含むリガンド結合ドメインを介して、そのリガンドと相互作用する。具体的には、Notch受容体ファミリーのEGFリピート11および12(Notch3ではEGF10-11)が、リガンド結合を媒介するのに必要かつ十分なドメインを規定する(Rebay et al., 1991, Cell 67:687-99; 米国特許第5,786,158号、同第6,090,922号)が、とはいえ最適な結合にはその他のEGFリピートおよびグリコシル化が必要である(Xu et al., J. Biol. Chem. 280: 30158-65)。配列比較から、ヒトNotch1、Notch2、Notch3(相同的EGF10)、およびNotch4のEGF11のなかに保存されたグルタミン酸(E)が明らかになったが、これらのタンパク質におけるその他36個のEGFドメインのいずれにおいても明らかにならなかった(図1)。さらに、このグルタミン酸は、ショウジョウバエNotchおよびアフリカツメガエルNotchのEGF11において保存されている(図1)が、この場合もやはり、その他のEGFリピートにおいて保存されておらず、X線結晶データから、折り畳まれたEGF11リピートの表面上にこのグルタミン酸が示されている(Hambly et al., 2004, Structure, 12: 217-83)。同時にこれらのデータから、EGF11によるリガンド結合でのこの保存されたグルタミン酸残基の重要な役割が示唆され、このリガンド結合領域を標的とするアンタゴニストが、以下におよび実施例に詳述するように有効な癌治療用物質として働きうることが示唆される。

【 0 0 8 8 】

本発明は、ヒトNotch受容体中の保存されたリガンド結合領域の発見を用いて、Notchシグナル伝達が介在するまたはそれによって悪化する疾患の処置のための、このリガンド結合領域に結合する作用物質を同定することを企図する。本明細書において用いる「作用物質」とは、任意のNotch受容体タンパク質のリガンド結合領域に特異的に結合する任意の分子をいう。そのような作用物質は有機小分子、無機小分子、抗体および抗体断片を含むが、これらに限定されない。

【 0 0 8 9 】

Notch受容体タンパク質にわたる、リガンド結合ドメインおよび特にグルタミン酸残基の保存から、二種以上のNotch受容体のリガンド結合領域に結合する作用物質のデザインが示唆される。ある態様において、本発明の作用物質は少なくとも一つのヒトNotch受容体に特異的に結合する。ある態様において、本発明の作用物質は少なくとも二種のヒトNotch受容体に特異的に結合する。ある態様において、本発明の作用物質は二種またはそれ以上のヒトNotch受容体に特異的に結合する。ある態様において、本発明の作用物質はヒトNotch1、Notch2、Notch3、およびNotch4に結合する。いくつもの態様において、作用物

10

20

30

40

50

質は抗体である。

【0090】

リガンド結合ドメインおよび特にグルタミン酸残基の保存から、リガンド結合領域中の少なくとも保存されたグルタミン酸に特異的に結合する作用物質のデザインが示唆される。ある態様において、本発明の作用物質は、ヒトNotch1のアミノ酸422～432 (PCEHAGKCINT

)内のエピトープに特異的に結合する。ある態様において、本発明の作用物質は、ヒトNotch1の少なくともアミノ酸424～425 (EH) に特異的に結合する。ある態様において、本発明の作用物質は、ヒトNotch1の少なくともアミノ酸424 (E) に特異的に結合する。ある態様において、本発明の作用物質は、ヒトNotch2のアミノ酸426～436 (PCEHAGKCVNT

10

)内のエピトープに特異的に結合する。ある態様において、本発明の作用物質は、ヒトNotch2の少なくともアミノ酸428～429 (EH) に特異的に結合する。ある態様において、本発明の作用物質は、ヒトNotch2の少なくともアミノ酸428 (E) に特異的に結合する。ある態様において、本発明の作用物質は、ヒトNotch3のアミノ酸401～411 (PCEHLGRCVNT

)内のエピトープに特異的に結合する。ある態様において、本発明の作用物質は、ヒトNotch3の少なくともアミノ酸403～404 (EH) に特異的に結合する。ある態様において、本発明の作用物質は、ヒトNotch3の少なくともアミノ酸403 (E) に特異的に結合する。ある態様において、本発明の作用物質は、ヒトNotch4のアミノ酸445-55 (PCEHGGSCLNT

20

)内のエピトープに特異的に結合する。ある態様において、本発明の作用物質は、ヒトNotch4の少なくともアミノ酸447～448 (EH) に特異的に結合する。ある態様において、本発明の作用物質は、ヒトNotch4の少なくともアミノ酸447 (E) に特異的に結合する。いくつかの態様において、作用物質は抗体である。

【0091】

リガンド結合ドメインおよび特にグルタミン酸残基の保存から、リガンド結合領域中の保存されたグルタミン酸を含むエピトープに特異的に結合する抗体のデザインが示唆される。ある態様において、本発明の抗体は、ヒトNotch1のアミノ酸422～432 (PCEHAGKCINT

30

)を含むエピトープに特異的に結合する。ある態様において、本発明の抗体は、ヒトNotch1のアミノ酸424～425 (EH) を含むエピトープに特異的に結合する。ある態様において、本発明の抗体は、ヒトNotch1のアミノ酸424 (E) を含むエピトープに特異的に結合する。ある態様において、本発明の抗体は、ヒトNotch2のアミノ酸426～436 (PCEHAGKCVNT

)を含むエピトープに特異的に結合する。ある態様において、本発明の抗体は、ヒトNotch2のアミノ酸428～429 (EH) を含むエピトープに特異的に結合する。ある態様において、本発明の抗体は、ヒトNotch2のアミノ酸428 (E) を含むエピトープに特異的に結合する。ある態様において、本発明の抗体は、ヒトNotch3のアミノ酸401～411 (PCEHLGRCVNT

40

)を含むエピトープに特異的に結合する。ある態様において、本発明の抗体は、ヒトNotch3のアミノ酸403～404 (EH) を含むエピトープに特異的に結合する。ある態様において、本発明の抗体は、ヒトNotch3のアミノ酸403 (E) を含むエピトープに特異的に結合する。ある態様において、本発明の抗体は、ヒトNotch4のアミノ酸445～455 (PCEHGGSCLNT

)を含むエピトープに特異的に結合する。ある態様において、本発明の抗体は、ヒトNotch4のアミノ酸447～448 (EH) を含むエピトープに特異的に結合する。ある態様において、本発明の抗体は、ヒトNotch4のアミノ酸447 (E) を含むエピトープに特異的に結合する。いくつかの態様において、抗体はモノクローナル抗体である。いくつかの態様において、抗体はキメラ抗体である。ある態様において、抗体はヒト化抗体である。ある態様におい

50

て、抗体はヒト抗体である。

【0092】

診断アッセイ

本発明は、その発現を分析することにより、癌に関連した疾患を検出、特徴決定、診断、またはモニターすることができるよう、癌幹細胞マーカーとしてNotch受容体を提供する。いくつかの態様では、癌幹細胞マーカーの発現は、例えば癌幹細胞マーカーをコードするmRNAなどのポリヌクレオチド発現によって、決定される。ポリヌクレオチドは、当業者に周知の多数の任意の手段により、検出および定量することができる。いくつかの態様では、癌幹細胞マーカーをコードするmRNAは、例えば患者の生検からの組織分画のインサイチューハイブリダイゼーションによって検出される。いくつかの態様では、RNAを組織から単離し、例えばノーザンプロット、定量的RT-PCR、またはマイクロアレイによって検出する。例えば、全RNAを組織試料から抽出し、特異的にハイブリダイズして癌幹細胞マーカーを増幅するプライマーを用いて、癌幹細胞マーカーポリヌクレオチドの発現を、RT-PCRを用いて検出することができる。10

【0093】

ある態様では、癌幹細胞マーカーの発現を、対応するポリペプチドの検出により、決定することができる。当業者に周知の多くの任意の手段により、ポリペプチドを検出し定量することができる。いくつかの態様では、例えば電気泳動、キャピラリー電気泳動、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)または薄層クロマトグラフィー(TLC)のような分析的生化学的方法を用いて、癌幹細胞マーカーポリペプチドを検出する。単離したポリペプチドを、標準技術によって配列決定することもできる。いくつかの態様では、癌幹細胞マーカータンパク質を、タンパク質に対して作製された抗体により、例えば、組織片への免疫蛍光法または免疫組織化学を用いて検出する。または、癌幹細胞マーカーに対する抗体により、例えば、ELISA、FACS、ウェスタンプロット、免疫沈降法またはタンパク質マイクロアレイを用いて、発現を検出することができる。例えば、癌幹細胞を患者の生検から単離し、FACSを用いて、癌幹細胞マーカータンパク質の発現を、蛍光標識抗体により検出することができる。別の方法では、インビボにおいて、標識抗体を用いて癌幹細胞マーカーを発現する細胞を典型的な画像システム中で検出することができる。例えば、常磁性同位体で標識された抗体を、磁気共鳴イメージング(MRI)に用いることができる。20

【0094】

本発明のいくつかの態様では、診断用分析は、例えば免疫組織化学、インサイチューハイブリダイゼーションまたはRT-PCRを用いて、腫瘍細胞中の癌幹細胞マーカーの発現の有無を決定することを含む。他の態様では、診断用分析は、例えば定量的RT-PCRを用いて癌幹細胞マーカーの発現レベルを決定することを含む。いくつかの態様では、診断用分析は、例えば正常な上皮などの対照組織と比較して、癌幹細胞マーカーの発現レベルを決定することをさらに含む。30

【0095】

癌幹細胞マーカー発現の検出を用いて、次に予後診断を提供し、治療法を選択することができる。予後診断は、癌幹細胞マーカーが表示できる任意の公知の危険表現に基づくことができる。さらに、癌幹細胞マーカーの検出を用いて、例えば検出された癌幹細胞マーカータンパク質に対する抗体による処置を含む、適切な治療法を選択することができる。ある態様では、抗体は、少なくとも1つのヒトNotch受容体の細胞外ドメインへ特異的に結合する。ある態様では、抗体は少なくとも1つのNotch受容体のEGF11内のリガンド結合領域に、特異的に結合する。40

【0096】

抗体

本発明の文脈においては、適切な抗体は、例えば以下の効果の一つまたは複数を有しうる作用物質である：癌幹細胞マーカーの発現の妨害；例えば癌幹細胞マーカーと、そのリガンド、受容体または共受容体との間の相互作用を立体的に阻害することによる、癌幹細胞シグナル伝達経路活性化の妨害； 例えればリガンドとして働くかまたは内在的なリガンド結合領域に結合する。50

ドの結合を促進することによる、癌幹細胞シグナル伝達経路の活性化；あるいは、癌幹細胞マーカーへの結合および、腫瘍細胞増殖の阻害。

【0097】

ある態様では、癌幹細胞マーカーに対する抗体は、細胞外で作用して、癌幹細胞マーカータンパク質の機能を調節する。いくつかの態様では、癌幹細胞マーカーに対する抗体の細胞外の結合は、例えば、癌幹細胞マーカーの内因性の活性化(例えばキナーゼ活性)を阻害することにより、および／または、例えば、癌幹細胞マーカーの、リガンドとの、受容体との、共受容体との、または細胞間マトリックスとの相互作用を立体的に阻害することにより、癌幹細胞マーカータンパク質のシグナル伝達を阻害することができる。いくつかの態様では、癌幹細胞マーカーに対する抗体の細胞外の結合は、例えば、癌幹細胞マーカータンパク質の内在化、または癌幹細胞マーカーの細胞表面輸送の減少などによって、癌幹細胞マーカーの細胞表面発現をダウントレギュレーションすることができる。いくつかの態様では、癌幹細胞マーカーに対する抗体の細胞外の結合は例えば、おとりのリガンドとして働いて、またはリガンド結合を増加させて、癌幹細胞マーカータンパク質のシグナル伝達を促進することができる。10

【0098】

ある態様では、癌幹細胞マーカーに対する抗体は、癌幹細胞マーカータンパク質に結合して、以下の効果の一つまたは複数を有する：腫瘍細胞の増殖を阻害する、腫瘍細胞の細胞死を引き起こす、または腫瘍細胞の転移を妨げる。ある態様では、癌幹細胞マーカーに対する抗体は、結合されている毒素、化学療法剤、放射性同位元素、または他のそのような薬剤により細胞死を引き起こす。例えば、癌幹細胞マーカーに対する抗体は毒素に結合されており、それがタンパク質内在化により、癌幹細胞マーカーを発現している腫瘍細胞中で活性化される。20

【0099】

ある態様では、癌幹細胞マーカーに対する抗体は、癌幹細胞マーカータンパク質を発現している細胞の細胞死を、抗体依存性細胞性細胞障害性(ADCC)によって媒介する。ADCCは、抗体のFc部分を認識するエフェクター細胞による細胞溶解を伴う。例えば多くのリンパ球、単球、組織マクロファージ、顆粒球、および好酸球は、Fc受容体を有しており、細胞溶解を媒介することができる(Dillman, 1994, J. Clin. Oncol. 12:1497)。

【0100】

ある態様では、癌幹細胞マーカーに対する抗体は、補体依存性細胞障害性(CDC)を活性化することによって、癌幹細胞マーカータンパク質を発現している細胞の細胞死を引き起こす。CDCは、血清補体の抗体Fc部分への結合、およびそれに続く補体タンパク質カスケードの活性化を伴い、細胞膜損傷および最終的な細胞死に帰着する。抗体の生物活性は、抗体分子の不变領域、即ちFc領域によって大部分が決定されることが知られている(Uanue and Benacerraf, Textbook of Immunology, 2nd Edition, Williams & Wilkins, p. 2 18 (1984))。異なるクラスおよびサブクラスの抗体はこの点で異なる。同じサブクラスのしかし異なる種からの抗体も同様である。ヒト抗体のうち、IgMは、最も効率的に補体と結合するクラスの抗体であり、IgG1、IgG3およびIgG2がこれに続く。しかしIgG4は、補体カスケードの活性化が全くできないようである(Dillman, 1994, J. Clin. Oncol. 12:1497; Jefferis et al., 1998, Immunol. Rev. 163:59-76)。本発明により、所望の生物活性を有するクラスの抗体が調製される。3040

【0101】

癌幹細胞に対する任意の特定の抗体が補体活性化および／またはADCCによる標的細胞溶解を媒介する能力を分析することができる。関心対象の細胞を、インビトロで成長させて標識する；抗体を、抗原抗体複合体によって活性化される血清補体または免疫細胞と一緒に、細胞培養液に加える。標的細胞の細胞溶解は、例えば溶解された細胞からの標識の放出によって検出される。実際、患者自身の血清を補体および／または免疫細胞の供給源として用いて、抗体をスクリーニングすることができる。インビトロの試験で補体を活性化することができるまたはADCCを媒介できる抗体を、次にその特定の患者で治療に用いるこ50

とができる。

【0102】

ある態様では、癌幹細胞マーカーに対する抗体は、血管形成を阻害する細胞死を引き起こすことができる。血管形成は、既存の血管から新しい血管が形成されるプロセスであり、例えば胚発生、創傷治癒の間の、および排卵に応答した、正常な成長に必要な基本的プロセスである。 $1 \sim 2\text{mm}^2$ を上回る充実性腫瘍の成長もまた、栄養源および酸素を供給するために血管形成を必要とし、それがなければ腫瘍細胞は死滅する。ある態様では、癌幹細胞マーカーに対する抗体は、例えば内皮細胞、平滑筋細胞を含む、癌幹細胞マーカーを発現する血管細胞または血管の構築に必要な細胞間マトリックス成分を標的とする。ある態様では、癌幹細胞マーカーに対する抗体は、血管細胞の補充、構築、維持、または生存に必要な成長因子シグナル伝達を阻害する。

10

【0103】

癌幹細胞マーカーに対する抗体は、本明細書に記載される診断および治療方法での用途が見出される。ある態様では、例えば患者の組織生検、胸水または血液試料などの生体試料中の癌幹細胞マーカータンパク質の発現を検出するために、本発明の抗体を用いる。組織生検を切片にし、例えば免疫蛍光法または免疫組織化学を用いて、タンパク質を検出することができる。さらに試料から個々の細胞を単離し、次に固定したまたは生きた細胞で、FACS分析によってタンパク質発現を検出することができる。ある態様では、抗体をタンパク質アレイ上で用いて、癌幹細胞マーカーの発現を、例えば腫瘍細胞上で、細胞溶解物中で、または他のタンパク質試料中で検出することができる。ある態様では、インビトロの細胞ベースの分析法、インビボの動物モデルなどにおいて抗体を腫瘍細胞と接触させることにより、本発明の抗体を用いて腫瘍細胞の成長を阻害する。ある態様では、癌幹細胞マーカーに対して治療的有効量の抗体を投与することによって、抗体を用いて患者の癌を処置する。

20

【0104】

本発明の抗体は、当技術分野で公知の任意の従来手段により調製することができる。例えば、キーホールリンペットヘモシニアン(KLH)、血清アルブミンなどに任意で結合され、滅菌食塩水で希釈され、アジュバント(例えば、完全または不完全フロイントアジュバント)と組み合わせて安定した乳剤に形成された、関連の抗原(精製されたペプチド断片、全長の組換えタンパク質、融合タンパク質など)の複数回の皮下または腹腔内注射によって、動物(例えばウサギ、ラット、マウス、ロバなど)を免疫することにより、ポリクローナル抗体を調製することができる。次に、そのように免疫された動物の血液、腹水などからポリクローナル抗体を回収する。集めた血液を凝結させ、血清をデカントし、遠心分離によって透明にして、抗体価を分析する。ポリクローナル抗体を血清または腹水から、アフィニティクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析などを含む当技術分野の標準的方法によって精製することができる。

30

【0105】

モノクローナル抗体を、Kohler and Milstein (1975) Nature 256:495によって記載されたハイブリドーマ法を用いて調製することができる。ハイブリドーマ法を用いて、マウス、ハムスターまたは他の適当な宿主動物を、上述のように免疫し、免疫に用いた抗原に特異的に結合する抗体のリンパ球による産生を誘発させる。リンパ球はまた、インビトロで免疫することもできる。免疫化に続いてリンパ球を単離し、例えば、ポリエチレングリコールを用いて適当なミエローマ細胞株と融合させてハイブリドーマ細胞を形成させ、それらを次に、融合していないリンパ球およびミエローマ細胞から分離して、選択することができる。免疫沈降、免疫プロッティング、またはインビトロの結合分析(例えばラジオイムノアッセイ(RIA)、酵素結合免疫吸着分析(ELISA))によって決定される、選択された抗原に特異的に指向されたモノクローナル抗体を產生するハイブリドーマを、次に標準的方法(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, 1986)を用いるインビトロの培養で、またはインビボで動物中の腹水癌として、増殖させることができる。次に、モノクローナル抗体を、ポリクローナル抗体について上述したように

40

50

、培養培地または腹水から精製することができる。

【0106】

または、モノクローナル抗体を、米国特許第4,816,567号に記載されている組換えDNA法を用いて作製することができる。モノクローナル抗体をコードするポリヌクレオチドを、成熟B細胞またはハイブリドーマ細胞から、抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子を特異的に増幅するオリゴヌクレオチドプライマーを用いるRT-PCRなどによって単離し、それらの配列を従来の手続きを用いて決定する。単離された重鎖および軽鎖をコードするポリヌクレオチドを、次に、適当な発現ベクター中へクローニングし、それを、さもなくば免疫グロブリンタンパク質を産生することのない大腸菌(*E. coli*)細胞、サルのCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞またはミエローマ細胞などの宿主細胞へトランスフェクションすれば、宿主細胞はモノクローナル抗体を産生する。さらに、所望の種の組換えモノクローナル抗体またはその断片を、所望の種のCDRを発現するファージディスプレイライブラリから、記載されたように(McCafferty et al., 1990, *Nature*, 348:552-554; Clackson et al., 1991, *Nature*, 352:624-628; およびMarks et al., 1991, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597)単離することができる。10

【0107】

モノクローナル抗体をコードするポリヌクレオチドを、組換えDNA技術を用いる多数の異なる手法で修飾して、別の抗体を生成することができる。いくつかの態様では、例えばマウスモノクローナル抗体の軽鎖および重鎖の定常領域を、1) キメラ抗体を生成するために、例えばヒト抗体の定常領域と、あるいは2) 融合抗体を生成するために非免疫グロブリンポリペプチドと、置換することができる。いくつかの態様では、定常領域を切り詰めるかまたは除去して、モノクローナル抗体の所望の抗体断片を生成する。可変領域の部位特異的または高密度突然変異生成を用いて、モノクローナル抗体の特異性、親和性などを最適化することができる。20

【0108】

本発明のいくつかの態様では、癌幹細胞マーカーに対するモノクローナル抗体は、ヒト化抗体である。ヒト化抗体は、非ヒト(例えばマウス)抗体からの最小の配列を可変領域内に含む抗体である。そのような抗体を治療的に用いて、ヒト被験体に投与したときの抗原性およびHAMA(ヒト抗マウス抗体)応答を低下させる。実際には、ヒト化抗体は、典型的には非ヒト配列が最小であるか存在しないヒト抗体である。ヒト抗体は、ヒトによって產生された抗体、またはヒトによって產生された抗体に対応するアミノ酸配列を有する抗体である。30

【0109】

当技術分野で公知の様々な技術を用いて、ヒト化抗体を产生することができる。ヒト抗体のCDRを、所望の特異性、親和性、および能力を有する非ヒト抗体(例えばマウス、ラット、ウサギ、ハムスターなど)のCDRと置換することにより、抗体をヒト化することができる(Jones et al., 1986, *Nature*, 321:522-525; Riechmann et al., 1988, *Nature*, 332:323-327; Verhoeyen et al., 1988, *Science*, 239:1534-1536)。Fvフレームワーク領域中および/または置き換えられた非ヒト残基内のさらなる残基の置換によって、ヒト化抗体をさらに修飾し、抗体特異性、親和性、および/または能力を改善し、最適化することができる。40

【0110】

さらに、完全(fully)ヒト抗体を、当技術分野で公知の様々な技術を用いて直接調製することができる。標的抗原に向けられた抗体を产生する、インビトロで免疫された、または免疫された個人から単離された、不死化ヒトBリンパ球を生成することができる(Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p.77 (1985); Boemer et al., 1991, *J. Immunol.*, 147 (1):86-95; および米国特許第5,750,373号を参照のこと)。さらに、ヒト抗体を、ヒト抗体を発現するファージライブラリから選択することができる(Vaughan et al., 1996, *Nat. Biotech.*, 14:309-314; Sheets et al., 1998, *Proc. Nat'l. Acad. Sci.*, 95: 6157-6162; Hoogenboom and Winter, 1991, *J. Mol. Biol.* 50

, 227:381; Marks et al., 1991, J. Mol. Biol., 222:581)。免疫されると、内在的免疫グロブリン産生が存在しない状態でヒト抗体の完全なレパートリーを产生することができる、ヒト免疫グロブリン遺伝子座を含む遺伝子組換えマウス中で、ヒト抗体を作製することもまた可能である。この手法は、米国特許第5,545,807 ; 5,545,806 ; 5,569,825 ; 5,625,126 ; 5,633,425 ; および5,661,016号に記載されている。

【0111】

本発明はまた、特異的に癌幹細胞マーカーを認識する二重特異性抗体を包含する。二重特異性抗体は、少なくとも二つの異なるエピトープを特異的に認識し、結合することができる抗体である。異なるエピトープは、同じ分子内(例えば同じ癌幹細胞マーカーポリペプチド)に存在しても良いし、あるいは異なる分子の上に存在して、例えば抗体は、癌幹細胞マーカー、ならびに、例えば、1) T細胞受容体(例えばCD3)またはFc受容体(例えばCD64、CD32、もしくはCD16)などの、白血球上のエフェクター分子、あるいは2) 詳細に下に記載する細胞障害性作用物質の両方を特異的に認識し結合することができる。二重特異性抗体は、無傷の抗体または抗体断片でよい。

【0112】

例示的な二重特異性抗体は二つの異なるエピトープに結合することができ、その内の少なくとも一つは本発明のポリペプチドに由来する。または、免疫グロブリン分子の抗抗原アームを、T細胞受容体分子(例えばCD2、CD3、CD28またはB7)、またはIgGへのFc受容体などの、白血球上の引き金分子に結合するアームと組み合わせて、細胞の防衛機構を特定の抗原を発現する細胞へ集中させるようにすることができる。さらに二重特異性抗体を用いて、細胞障害性作用物質を、特定の抗原を発現する細胞に指向させることもできる。これらの抗体は、抗原を結合するアーム、およびEOTUBE、DPTA、DOTAまたはTETAなどの、細胞障害性作用物質または放射性核種キレート剤を結合するアームを所持する。二重特異性抗体を作製するための技術は、当技術分野において一般的なものである(Millstein et al., 1983, Nature 305:537-539; Brennan et al., 1985, Science 229:81; Suresh et al., 1986, Methods in Enzymol. 121:120; Traunecker et al., 1991, EMBO J. 10:3655-3659; Shalaby et al., 1992, J. Exp. Med. 175:217-225; Kostelnik et al., 1992, J. Immunol. 148:1547-1553; Gruber et al., 1994, J. Immunol. 152:5368; および米国特許第5,731,168号)。2以上の価数を有する抗体もまた意図する。例えば、三重特異性抗体を調製することができる(Tutt et al., J. Immunol. 147:60 (1991))。

【0113】

ある態様では、例えば腫瘍浸透性を増大させるための抗体断片が提供される。抗体断片の產生のための様々な技術が公知である。従来から、これらの断片は、無傷の抗体のタンパク質消化によって導出されている(例えば、Morimoto et al., 1993, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117; Brennan et al., 1985, Science, 229:81)。ある態様では、抗体断片は組換えによって產生される。Fab、Fv、およびscFv抗体断片を、すべて大腸菌または他の宿主細胞で発現させ、分泌させることができ、したがって、これらの断片の大量產生が可能である。そのような抗体断片を、上に議論した抗体ファージライブリから単離することもできる。抗体断片はまた、例えば米国特許第5,641,870号に記載されているように直鎖状抗体であってもよく、またそれは單一特異性、もしくは二重特異性であってよい。抗体断片產生のための他の技術は、当業者には明白であろう。

【0114】

本発明によれば、本技術を、本発明のポリペプチドに特異的な一本鎖抗体の產生に適合させることができる(米国特許第4,946,778号参照)。さらに、本方法を、Fab発現ライブルイ(Huse, et al., Science 246:1275-1281 (1989))の構築に適合させて、Notch2受容体、またはその誘導体、断片、もしくはホモログに対して所望の特異性を有するモノクローナルFab断片の迅速かつ有効な同定を可能にすることができます。本発明のポリペプチドに対するイディオタイプを含む抗体断片を、(a) 抗体分子のペプシン消化によって產生されるF(ab')2断片；(b) F(ab')2断片のジスルフィド架橋を還元することによって生成されるFab断片；(c) 抗体分子のパパインおよび還元剤による処理によって生成されるFab断片、お

10

20

30

40

50

より(d) Fv断片を非限定的に含む、当技術分野の技術によって產生することができる。

【0115】

特に抗体断片の場合には、その血清半減期を増大させるために抗体を修飾することがさらに望ましい可能性がある。これは例えば、抗体断片中の適当な領域の突然変異による、抗体断片中へのサルベージ受容体結合エピトープの組み込みにより、あるいは、ペプチドタグにエピトープを組み入れて、それを次に抗体断片のいずれかの端にまたは中間に(例えばDNAまたはペプチド合成によって)融合することにより、行うことができる。

【0116】

ヘテロ結合抗体もまた、本発明の範囲内である。ヘテロ結合抗体は、共有結合した二つの抗体から成る。そのような抗体は、例えば免疫細胞が望ましくない細胞を標的とするように提唱された(米国特許第4,676,980号)。架橋剤を必要とする方法を含む、合成タンパク質化学で公知の方法を用いて、抗体を、インビトロで調製することができると考えられる。例えば、ジスルフィド交換反応を用いて、またはチオエテール結合を形成させて、免疫毒素を構築することができる。この目的に適している試薬の例には、イミノチオラートおよびメチル-4-メルカプトブチルイミダートが含まれる。

10

【0117】

本発明の目的のためには、修飾抗体が、抗体とヒトNotch2のポリペプチドとの会合を提供する任意の型の可変領域を含むことができる事が認識されよう。この点で、可変領域は、液性応答の開始および所望の腫瘍に関連する抗原に対する免疫グロブリンの生成を誘起することができる、任意の型の哺乳動物からなるかまたは由来するものであってよい。このように、修飾抗体の可変領域は、例えばヒト、マウス、非ヒト靈長類(例えばカニクイザル、マカクなど)またはオオカミ起源であり得る。いくつかの態様では、修飾された免疫グロブリンの可変および定常領域の両方がヒト由来である。他の態様では、適合性を有する抗体(通常非ヒト供給源に由来する)の可変領域を操作するかまたは特異的に調整して、結合特性を改善するかまたは分子の免疫原性を減少させることができる。この点に関して、移入されたアミノ酸配列を含めることにより、本発明に役立つ可変領域をヒト化するかまたはそうでなければ改変することができる。

20

【0118】

重鎖および軽鎖の両方の可変ドメインを、一つまたは複数のCDRの少なくとも一部の置き換えによって、また必要な場合には、部分的なフレームワーク領域の置き換えおよび配列変更によって改変する。CDRは、フレームワーク領域が由来する抗体と同じクラスまたはさらに同じサブクラスの抗体に由来し得るが、CDRが異なるクラスの抗体、好ましくは異なる種からの抗体に由来することが想定される。一つの可変ドメインの抗原結合能を別の可変ドメインに移すためには、CDRの全てを、供与側の可変領域からの完全なCDRで置き換えることは必要でない可能性がある。むしろ、抗原結合部位の活性を維持するのに必要な残基を移すことのみが必要な可能性がある。米国特許第5,585,089号、第5,693,761号および第5,693,762号で述べられた説明を考慮すれば、型通りの実験作業を行って、または試行錯誤によって、減少した免疫原性を有する機能的な抗体を得ることは、十分に当業者の能力内のことであろう。

30

【0119】

可変領域の改変にかかわらず、本発明の修飾抗体が、天然または未改変の定常領域を含むほぼ同じ免疫原性の抗体と比較した場合に、腫瘍局在化の増大または血清半減期の減少などの望ましい生化学的特性を提供するように、抗体または、一つもしくは複数の定常領域ドメインの少なくとも何分の一かが除去されたかさもなくば改変されたその免疫反応性断片を含むことを、当業者は認識するであろう。いくつかの態様では、修飾抗体の定常領域は、ヒト定常領域を含む。本発明に適合する定常領域の修飾は、一つまたは複数のドメインにおける一つまたは複数のアミノ酸の追加、欠失、または置換を含む。即ち、本明細書に開示される修飾抗体は、三つの重鎖定常ドメイン(CH1、CH2またはCH3)の一つまたは複数の、および/または軽鎖定常部(CL)の、改変または修飾を含むことができる。本発明のいくつかの態様では、一つまたは複数のドメインが部分的にまたは完全に欠失された、

40

50

修飾定常領域を意図する。いくつかの態様では、修飾抗体は、CH2ドメイン全体が除かれたドメイン欠失構築物または変異体(CH2構築物)を含む。いくつかの態様では、除去される定常領域ドメインは、短いアミノ酸スペーサー(例えば10残基の)と置換され、それは通常は定常領域(この場合は存在しない)によって与えられる分子的柔軟性のいくらかを提供する。

【 0 1 2 0 】

それらの形状の他に、定常領域がいくつかのエフェクター機能を媒介することが当技術分野において公知である。例えば、抗体への補体C1成分の結合は、補体系を活性化する。補体の活性化は、細胞病原体のオプソニン化および溶解に重要である。補体の活性化はまた炎症反応を刺激し、自己免疫過敏症に関係し得る。さらに、抗体は、Fc領域を介して細胞に結合し、この時抗体Fc領域上のFc受容体結合部位が、細胞上のFc受容体(FcR)へ結合している。IgG (受容体)、IgE (受容体)、IgA (受容体)およびIgM (μ受容体)を含む、種々のクラスの抗体に特異的な多数のFc受容体が存在する。細胞表面上のFc受容体への抗体の結合は、抗体に覆われた粒子の飲み込みおよび破壊、免疫複合体の除去、抗体に覆われた標的細胞の溶解(抗体依存性細胞媒介細胞障害性、またはADCCと呼ばれる)、炎症伝達因子の放出、胎盤通過および免疫グロブリン産生の制御を含む、キラー細胞による多くの重要で多様な生体応答を引き起す。様々なFc受容体および受容体部位がある程度研究されてきたが、それらの位置、構造、および機能に関して、依然として多く未知である。

【 0 1 2 1 】

本発明の範囲を限定するわけではないが、本明細書に記載するように修飾された定常領域を含む抗体は改変されたエフェクター機能を提供し、それが次に、投与された抗体の生物学的プロファイルに影響を与えると考えられる。例えば、定常領域ドメインの欠失または不活性化(点突然変異または他の手段による)は、循環している修飾抗体のFc受容体への結合を減少させ、そのために腫瘍への局在化を増大させる可能性がある。他の場合では、本発明に適合した定常領域の修飾は、補体結合を調節し、したがって血清半減期および結合された細胞毒素の非特異的結合を減少させると考えられる。定常領域のさらに他の修飾を用いて、ジスルフィド結合またはオリゴ糖部分を除去することができ、これによって、増大した抗原特異性または抗体柔軟性により、局在化を促進することができる。同様に、本発明による定常領域の修飾を、完全に当業者の範囲内の周知の生化学的技術または遺伝子操作技術を用いて容易に行うことができる。

【 0 1 2 2 】

修飾抗体を操作して、CH3ドメインをそれぞれの修飾抗体のヒンジ領域へ直接融合させることができることに留意されたい。他の構築物では、ヒンジ領域と修飾されたCH2および / またはCH3ドメインの間にペプチドスペーサーを与えることが望ましい。例えば、CH2ドメインが欠失され、残りのCH3ドメイン(修飾されたまたは未修飾の)がヒンジ領域に5~20個のアミノ酸スペーサーで連結された、適合性を有する構築物を発現することができる。そのようなスペーサーを付加することにより、例えば定常ドメインの調節エレメントを、遊離状態でアクセス可能に保つこと、またはヒンジ領域が柔軟なままであることを保証してもよい。しかし、アミノ酸スペーサーは、ある場合には免疫原性を有することが判明しており、構築物に対する望ましくない免疫応答を誘発する場合があることが認識されるべきである。従って、構築物に加える任意のスペーサーは、比較的非免疫原性でなければならず、あるいは修飾抗体の望ましい生化学特質が維持される場合は全体を除くことさえしなければならない。

【 0 1 2 3 】

定常領域ドメイン全体の欠失の他に、部分的欠失または少数のもしくは単一のアミノ酸の置換によっても、本発明の抗体を提供することができる事が認識されよう。例えば、CH2ドメインの選択された区域の単一のアミノ酸の突然変異が、実質的にFc結合を減少させ、それによって腫瘍の局在化を増大させるのに十分である可能性がある。同様に、一つまたは複数の定常領域ドメインの、調節されるべきエフェクター機能(例えば補体CLQ結合

10

20

30

40

50

)を制御する部分を単に欠失させることが望ましい可能性がある。定常領域のそのような部分的欠失は、当該定常領域ドメインに関連する他の望ましい機能をそのままにしておく一方で、抗体の選択された特性(血清半減期)を改善する可能性がある。さらに、上に示唆されるように、開示された抗体の定常領域は、一つまたは複数のアミノ酸の突然変異または置換によって修飾され、その結果生ずる構築物のプロファイルを向上させる可能性がある。この点で、修飾抗体の構成および免疫原プロファイルを実質的に維持する一方で、保存された結合部位(例えばFc結合活性)によって提供される活性を妨害することが可能である。ある態様は、定常領域へ一つまたは複数のアミノ酸を追加して、エフェクター機能のような望ましい特性を増強することまたはより多くの細胞毒素もしくは炭水化物接着を提供することを含む。そのような態様では、選択された定常領域ドメインに由来する特異的配列を、挿入するかまたは複製することが望ましい可能性がある。

10

【0124】

本発明はさらに、本明細書に述べるキメラ抗体、ヒト化抗体、およびヒト抗体、またはそれらの抗体断片に実質的に相同の変異体および等価物に関する。これらは、例えば、保存的置換突然変異、即ち一つまたは複数のアミノ酸の類似のアミノ酸による置換を含むことができる。例えば、保存的置換とは、例えば一つの酸性アミノ酸を別の酸性アミノ酸と、一つの塩基性アミノ酸を別の塩基性アミノ酸と、または一つの中性アミノ酸を別の中性アミノ酸と置換するなどの、あるアミノ酸を同じ一般クラスの別のアミノ酸と置換することを指す。保存的アミノ酸置換によって何が意図されるかは、当技術分野において周知である。

20

【0125】

本発明はまた、細胞障害剤に結合された抗体を含む免疫結合体に関する。細胞障害剤には、化学療法剤、成長阻害剤、毒素(例えば、細菌、真菌、植物、または動物由来の酵素活性を有する毒素、あるいはそれらの断片)、放射性同位体(即ち、放射性結合体)などが含まれる。そのような免疫結合体の生成に有用な化学療法剤には、例えば、メトトレキセート、アドリアマイシン、ドキソルビシン、メルファラン、マイトマイシンC、クロラムブシル、ダウノルビシンまたは他のインターフェラート剤が含まれる。酵素活性を有する毒素およびそれらの用いることができる断片には、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、エキソトキシンA鎖、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシンA鎖、-サルシン、シナアブラギリ(*Aleurites fordii*)タンパク質、ジアンシンタンパク質、アメリカヤマゴボウ(*Phytolaca americana*)タンパク質(PAPI、PAPIIおよびPAP-S)、ニガウリ(*Momordica charantia*)阻害剤、クルシン、クロチン、サボンソウ(*Sapaponaria officinalis*)阻害剤、ゲロニン、ミトゲリン(*mitogellin*)、リストリクトシン、フェノマイシン(*phenomycin*)、エノマイシン(*enomycin*)およびトリコテシン(*tricothecenes*)が含まれる。いくつかの態様では、抗体を、多くの周知のキレート化剤のいずれかを用いて、あるいは直接標識して、⁹⁰Y、¹²⁵I、¹³¹I、¹²³I、¹¹¹In、¹⁰⁵Rh、¹⁵³Sm、⁶⁷Cu、⁶⁷Ga、¹⁶⁶Ho、¹⁷⁷Lu、¹⁸⁶Reおよび¹⁸⁸Reなどの放射性同位元素に結合させることができる。他の態様では、開示された組成物は、薬剤、プロドラッグ、またはインターフェロンなどのリンホカインに結合された抗体を含むことができる。抗体と細胞障害剤の結合体を、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオール)プロピオネート(SPDP)、イミノチオラン(IT)、イミドエステルの二官能基誘導体(ジメチルアジプイミダートHCLなどの)、活性エステル(ジスクシンイミジルスペラートなどの)、アルデヒド(グルタルアルデヒドなどの)、ビス-アジド化合物(ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミンなどの)、ビス-ジアゾニウム誘導体(ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミンなどの)、ジイソシアネート(トリレン2,6-ジイソシアネートなどの)、およびビス活性フッ素化合物(1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼンなどの)などの、様々な二官能基性タンパク質カップリング剤を用いて、作製する。抗体と一つまたは複数の小分子毒素(例えばカリケアマイシン、マイタンシノイド(maytansinoids)、トリコテン(trichothene)、およびCC1065など、およびこれらの毒素の毒素活性を有する誘導体)との接合体もまた、用いることができる。いくつかの態様では、修飾抗体は、他の免疫的に活性を有するリガンド(例えば抗体またはその断片)と複合体を形成す

30

40

50

ることができ、その結果生じる分子は、新生細胞およびT細胞などのエフェクター細胞の両方へ結合する。

【0126】

有用な量を得る方法にかかわらず、本発明の抗体を、多数の結合形(すなわち免疫結合体)または非結合形の中の任意の一つの形で用いることができる。または、本発明の抗体を非結合形即ち「裸の」形で用いて、補体依存性細胞障害性(CDC)および抗体依存性細胞性細胞障害性(ADCC)を含む被験体の自然の防御機構を利用して、悪性細胞を除去することができる。どの結合または非結合修飾抗体を用いるかという選択は、癌の種類および病期、補助療法(例えば化学療法または外部放射線)、および患者の症状に依存する。当業者が本明細書の教示を考慮して、容易にそのような選択をすることができる事が認識されよう。10

【0127】

当技術分野で公知の任意の方法により、本発明の抗体の免疫特異的結合を分析することができる。用いることができる免疫分析には、BIAcore分析、FACS分析、免疫蛍光法、免疫細胞化学、ウエスタンプロット、放射免疫定量法、ELISA、「サンドイッチ」免疫分析、免疫沈降分析、沈降反応、ゲル内拡散沈降反応、免疫拡散分析、凝集反応分析、補体結合分析、免疫放射定量分析、蛍光免疫分析、およびプロテインA免疫分析などの技術を用いる、競合的および非競合的分析システムが非限定的に含まれる。そのような分析は、当技術分野において決まったものであり、周知である(例えば、Ausubel et al, eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol.1, John Wiley & Sons, Inc., New York を参照のこと; その全体は参考により本明細書に組み入れられる)。20

【0128】

いくつかの態様では、ELISAを用いて、癌幹細胞マーカーに対する抗体の免疫特異性を決定する。ELISA分析は、抗原を調製する工程、96ウェルのマイクロタイタープレートのウェルを抗原でコーティングする工程、酵素(例えば西洋ワサビペルオキシダーゼまたはアルカリリフォスファターゼ)の基質などの検知可能な化合物に結合された癌幹細胞マーカーに対する抗体をウェルに加える工程、ある期間インキュベートして抗原の存在を検出する工程を含む。いくつかの態様では、癌幹細胞マーカーに対する抗体を検知可能な化合物に結合させずに、癌幹細胞マーカーに対する抗体を認識する二次結合抗体をウェルに加える。いくつかの態様では、抗原でウェルをコーティングする代わりに、癌幹細胞マーカーに対する抗体をウェルにコーティングし、コーティングされたウェルへ抗原を加えた後で、検知可能な化合物に結合された二次抗体を加えることができる。当業者は、検出されたシグナルを増加させるために調節することができるパラメーター、並びに当技術分野で公知のELISAの他の変形について、認識可能であろう(例えば、Ausubel et al, eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol.1, John Wiley & Sons, Inc., New York at 11.2.1を参照のこと)。30

【0129】

癌幹細胞マーカー抗原への抗体の結合親和性および抗体抗原相互作用の解離速度を、競合的結合分析により決定することができる。競合的結合分析の一つの例は、漸増量の未標識の抗原の存在下での、標識(例えば³Hまたは¹²⁵I標識)された抗原またはその断片もしくは変異体と、関心対象の抗体とのインキュベーション、それに続く標識抗原に結合した抗体の検出を含む放射免疫定量法である。抗体の癌幹細胞マーカーに対する親和性および結合の解離速度を、データからスキャチャードプロット分析により決定することができる。いくつかの態様では、BIAcore動力学分析を用いて、抗体の癌幹細胞マーカーに対する結合速度と解離速度を決定する。BIAcore動力学分析は、表面上に癌幹細胞マーカー抗原を固定されたチップに対する、抗体の結合と解離を分析する工程を含む。40

【0130】

ポリヌクレオチド

ある態様において、本発明はまた、ヒトNotch受容体に対する抗体またはその断片を含むポリペプチドをコードする、単離されたポリヌクレオチドを包含する。したがって、「50

ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド」という用語は、ポリペプチドに対するコード配列のみを含むポリヌクレオチド、ならびに追加のコード配列および／または非コード配列を含むポリヌクレオチドを包含する。本発明のポリヌクレオチドは、RNAの形またはDNAの形であり得る。DNAはcDNA、ゲノムDNA、および合成DNAを含み、二重鎖または一本鎖でよく、また一本鎖である場合は、コード鎖または非コード(アンチセンス)鎖であってもよい。

【0131】

本発明はさらに、上述のポリヌクレオチドの、例えば、断片、アナログおよび誘導体をコードする変異体に関する。ポリヌクレオチドの変異体は、そのポリヌクレオチドの天然に存在する対立遺伝子変異体またはポリヌクレオチドの天然には存在しない変異体であり得る。ある態様では、ポリヌクレオチドは、開示したポリペプチドをコードする配列の天然対立遺伝子変異体であるコード配列を有することができる。当技術分野で公知であるように、対立遺伝子変異体は、ポリヌクレオチド配列の別の形であって、一つまたは複数のヌクレオチドの置換、欠失、または追加を有し、それはコードされるポリペプチドの機能を実質的に改変しない。

【0132】

ある態様では、ポリヌクレオチドは、例えば宿主細胞からのポリペプチドの発現および分泌を助けるポリヌクレオチド(例えば、細胞からのポリペプチドの輸送を制御するための分泌配列として機能するリーダー配列)に同一のリーディングフレーム中で融合された成熟ポリペプチドのコード配列を含む。リーダー配列を有するポリペプチドは前駆体タンパク質であり、宿主細胞によってリーダー配列が切断されて、成熟型のポリペプチドが形成される。ポリヌクレオチドはまた、成熟タンパク質に追加の5'アミノ酸残基が加わったものであるプロタンパク質もコードすることができる。プロ配列を有する成熟タンパク質がプロタンパク質であり、タンパク質の不活性型である。プロ配列が切断されると、活性成熟タンパク質が残る。

【0133】

ある態様では、ポリヌクレオチドは、例えばコードされたポリペプチドの精製を可能にするマークー配列に同一のリーディングフレーム中で融合された、成熟ポリペプチドのコード配列を含む。細菌宿主の場合、例えばマークー配列は、pQE-9ベクターによって提供されるヘキサヒスチジンタグでよく、マークーに融合された成熟ポリペプチドの精製を提供する。または、哺乳動物宿主(例えばCOS-7細胞)を用いる場合は、マークー配列はインフルエンザヘマグルチニンタンパク質に由来するヘマグルチニン(HA)タグでよい。

【0134】

ある態様では、本発明は、ヒトNotch受容体に対する抗体またはその断片を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと、少なくとも80%同一、少なくとも85%同一、少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、およびいくつかの態様では、少なくとも96%、97%、98%、または99%同一のヌクレオチド配列を有する、単離された核酸分子を提供する。

【0135】

参照ヌクレオチド配列に対して少なくとも例えれば95%「同一の」ヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドとは、ポリヌクレオチド配列が、参照ヌクレオチド配列の100ヌクレオチド当たり最大5%の点突然変異を含むことができることを除いて、ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列が参照配列と同一であることを意味する。言いかえれば、参照ヌクレオチド配列と少なくとも95%同一のヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドを得るためにには、参照配列のヌクレオチドの5%以下を欠失させるか、または別のヌクレオチドで置き換えるか、あるいは参照配列中の総ヌクレオチドの5%以下の数のヌクレオチドを参照配列に挿入することができる。参照配列のこれらの突然変異は、参照ヌクレオチド配列のアミノ末端またはカルボキシ末端の位置で、またはそれらの末端位置の間の任意の位置で、参照配列中のヌクレオチドの間に個々に点在するか、あるいは参照配列内の一つまたは複数の連続する基に生じることができる。

【0136】

10

20

30

40

50

実際問題として、任意の特定の核酸分子が、参照配列と少なくとも80%同一、少なくとも85%同一、少なくとも90%同一、およびいくつかの態様では、少なくとも95%、96%、97%、98%、または99%同一であるかどうかを、従来通りに、Bestfitプログラム(Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711)などの公知のコンピュータープログラムを用いて決定することができる。Bestfitは、Smith and Waterman, Advances in Applied Mathematics 2: 482-489 (1981)の局部相同アルゴリズムを用いて、二つの配列間の相同性の最良の区分を見つける。Bestfitまたは他の配列アラインメントプログラムを用いて、特定の配列が本発明による参照配列と例えれば95%同一であるかどうかを判断する場合には、参照ヌクレオチド配列の全長にわたって同一性パーセントを計算し、参照配列中のヌクレオチド総数の5%以内のホモロジーの間隙を許容するようにパラメーターが設定される。

【0137】

ポリヌクレオチド変異体は、コード領域、非コード領域、または両方に改変を含むことができる。いくつかの態様では、ポリヌクレオチド変異体は、サイレントな置換、付加、または欠失を產生するが、コードされたポリペプチドの特性または活性を変更しない改変を含む。いくつかの態様では、遺伝コードの縮退によるサイレントな置換により、ヌクレオチド変異体が产生される。ポリヌクレオチド変異体は、様々な理由のために、例えは、特定の宿主のコドン発現を最適化する(ヒトmRNA中のコドンを大腸菌のような細菌宿主に好まれるものへ変更する)ために产生することができる。

【0138】

ポリペプチド

本発明のポリペプチドは、ヒトNotch受容体に対する抗体またはその断片を含む組換えポリペプチド、天然ポリペプチド、または合成ポリペプチドであり得る。本発明のいくつかのアミノ酸配列を、タンパク質の構造または機能に対する有意な影響なしに変化させることは、当技術分野において認識されるべきである。したがって、本発明にはさらに、実質的な活性を示すポリペプチドの変異体、またはヒトNotch受容体タンパク質に対する抗体もしくはその断片の領域を含むポリペプチドの変異体が含まれる。そのような突然変異体には、欠失、挿入、逆位、反復、および型の置換が含まれる。

【0139】

ポリペプチドおよびアナログをさらに修飾して、通常はタンパク質の一部ではない追加の化学的部分を含ませることができる。それらの誘導体化された部分は、タンパク質の溶解度、生物学的半減期または吸収を改善することができる。その部分はまた、タンパク質の任意の所望の副作用を低減させるかまたは除去することなどができる。それらの部分についての概要は、REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 20th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (2000) 中に認められる。

【0140】

本明細書に記載される単離されたポリペプチドを、当技術分野で公知の任意の適當な方法により生成することができる。そのような方法は、直接タンパク質合成法から、単離されたポリペプチド配列をコードするDNA配列の構築および適切な形質変換宿主中でのその配列の発現まで、様々である。いくつかの態様では、組換え技術を用いて、関心対象の野生型タンパク質をコードするDNA配列を単離するかまたは合成することによりDNA配列を構築する。任意で部位特異的突然変異誘発により配列に突然変異を起こさせて、その機能的類似物を作ることができる。Zoeller et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 81:5662-5666 (1984) および米国特許第4,588,585号を参照のこと。

【0141】

いくつかの態様では、関心対象のポリペプチドをコードするDNA配列を、オリゴヌクレオチド合成機を用いる化学合成によって構築する。所望のポリペプチドのアミノ酸配列に基づき、関心対象の組換えポリペプチドを产生する宿主細胞中で好まれるコドンを選択して、そのようなオリゴヌクレオチドを設計することができる。標準的方法を適用して、関

10

20

30

40

50

心対象の単離されたポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド配列を合成することができる。例えば、完全なアミノ酸配列を用いて、逆翻訳された遺伝子を構築することができる。さらに、特定の単離されたポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むDNAオリゴマーを合成することができる。例えば、所望のポリペプチドの一部ずつをコードするいくつかの小さなオリゴヌクレオチドを合成し、次にライゲーションすることができる。個々のオリゴヌクレオチドは通常、相補的組み立てのために、5'または3'突出部を含む。

【0142】

(合成、部位特異的変異誘発、または別 の方法により)組み立てられたら、特定の単離された関心対象のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を発現ベクターに挿入し、所望の宿主中でのタンパク質発現に適した発現制御配列に機能的に連結される。ヌクレオチド配列決定、制限酵素マッピング、および適当な宿主中における生物学的活性を持つポリペプチドの発現により、適切な組み立てを確認することができる。当技術分野において周知のように、トランスフェクションされた遺伝子を宿主中で高レベルで発現させるためには、その遺伝子を、選択された発現宿主中で機能する転写および翻訳の発現制御配列に機能的に連結しなければならない。

【0143】

組換え発現ベクターを用いて、癌幹細胞マーカー・ポリペプチド融合体をコードするDNAを増幅および発現させることができる。組換え発現ベクターとは、哺乳動物、微生物、ウイルスまたは昆虫の遺伝子に由来する適当な転写または翻訳の調節エレメントに機能的に連結された、癌幹細胞マーカー・ポリペプチド融合体または生物学的に同等なアナログをコードする、合成のまたはcDNA由来のDNA断片を有する、複製可能なDNA構築物である。転写ユニットは、一般に(1)遺伝子発現において調節的役割を有する遺伝子エレメント、例えば転写プロモーターまたはエンハンサー、(2)mRNAへ転写されてタンパク質に翻訳される構造配列またはコード配列、および(3)以下に詳述される適切な転写および翻訳の開始および終止配列の集合を含む。そのような調節エレメントは、転写を制御するオペレーター配列を含むことができる。通常は複製開始点によって与えられる宿主中の複製能、および形質変換体の認識を促進するための選択遺伝子を、さらに組込むことができる。DNA領域は、それらが互いに機能的に関連している場合には、機能的に連結されている。例えば、ポリペプチドの分泌に関与する前駆体として発現される場合には、シグナルペプチド(分泌リーダー)のDNAは、ポリペプチド用のDNAに機能的に連結されており；プロモーターは、それが配列の転写を制御する場合は、コード配列に機能的に連結されており；またはリボソーム結合部位は、翻訳を可能にするように配列されている場合には、コード配列に機能的に連結されている。一般に、機能的に連結されているとは連續的であることを意味し、分泌リーダーの場合には、連續的であることおよびリーディングフレーム中にあることを意味する。酵母発現系で用いることを意図した構造エレメントは、宿主細胞による翻訳されたタンパク質の細胞外分泌を可能にするリーダー配列を含む。または、組換えタンパク質がリーダー配列または輸送配列なしで発現される場合、それはN末端メチオニン残基を含み得る。この残基を任意で次に、発現された組換え型タンパク質から切断し、最終生産物を提供することができる。

【0144】

発現制御配列および発現ベクターの選択は、宿主の選択に依存する。種々様々の発現宿主/ベクターの組み合わせを使用することができる。真核生物宿主のための有用な発現ベクターには、例えば、SV40、ウシパピローマウイルス、アデノウイルス、およびサイトメガロウイルス由来の発現制御配列を含むベクターが含まれる。細菌の宿主のための有用な発現ベクターには、pCR1、pBR322、pMB9およびそれらの誘導体を含む、大腸菌(Escherichia coli)由来のプラスミドなどの公知の細菌のプラスミド、M13およびフィラメント状一本鎖DNAファージなどのより広い宿主範囲のプラスミドが含まれる。

【0145】

癌幹細胞マーカー・タンパク質の発現に適した宿主細胞には、適切なプロモーターの制御

10

20

30

40

50

下の、原核生物、酵母、昆虫または高等真核細胞が含まれる。原核生物には、グラム陰性またはグラム陽性生物、例えば大腸菌または桿菌が含まれる。高等真核細胞には、下記に述べる哺乳動物由来の確立された細胞株が含まれる。無細胞翻訳系を使用することもできよう。細菌、真菌、酵母、および哺乳動物細胞の宿主での使用のための適切なクローニングおよび発現ベクターについてはPouwels et al. (Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, N. Y., (1985))に記載されており、関連する開示は、参照により本明細書に組み入れられる。

【0146】

様々な哺乳動物または昆虫の細胞培養系も、組換えタンパク質を発現するために有利に使用される。組換えタンパク質は一般に正確に折り畳まれ、適切に修飾され、かつ完全に機能的であるので、哺乳動物細胞におけるそのようなタンパク質の発現を行うことが可能である。適当な哺乳動物宿主細胞株の例には、Gluzman (Cell 23:175 1981)に記載されているサル腎細胞のCOS-7系、ならびに、例えばL細胞、C127、3T3、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)、HeLa、およびBHK細胞株を含む、適切なベクターを発現することができる他の細胞株が含まれる。哺乳動物発現ベクターは、例えば複製開始点、発現されるべき遺伝子に連結された適当なプロモーターおよびエンハンサーなど、および他の5'または3'隣接非転写配列、ならびに例えば必要なりボソーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライシングドナーおよびアクセプター部位などの5'または3'非翻訳配列、および転写終結配列などの非転写エレメントを含むことができる。昆虫細胞における異種タンパク質產生用のバキュロウイルスシステムが、Luckow and Summers, Bio/Technology 6:47 (1988)によって概説されている。

【0147】

形質変換宿主によって產生されたタンパク質は、任意の適当な方法により精製することができる。そのような標準的方法には、クロマトグラフィー(例えばイオン交換、親和性、およびサイズ分別カラムクロマトグラフィー)、遠心分離、溶解度の差異、またはタンパク質精製のための任意の他の標準技術によるものが含まれる。ヘキサヒスチジン、マルトース結合ドメイン、インフルエンザ被覆配列、およびグルタチオン-S-トランスフェラーゼなどのアフィニティタグをタンパク質に付着させて適切なアフィニティカラムを通すことにより、容易な精製が可能になる。単離されたタンパク質を、タンパク質分解、核磁気共鳴、およびX線結晶学などの技術を用いて、物理的に特性決定することができる。

【0148】

例えば、培養培地へ組換えタンパク質を分泌する系由来の上清を、市販のタンパク質濃縮フィルター、例えばAmiconまたはMillipore Pellicon限外濾過ユニットを用いて、最初に濃縮することができる。濃縮工程の次に、濃縮物を適当な精製マトリックスに供することができる。または、陰イオン交換樹脂、例えば側鎖ジエチルアミノエチル(DEAE)基を有するマトリックスまたは基質を使用することができる。マトリックスは、アクリルアミド、アガロース、デキストラン、セルロース、またはタンパク質精製に一般に使用される他の種類であってよい。または、陽イオン交換工程を採用することもできる。適当な陽イオン交換体には、スルホプロピル基またはカルボキシメチル基を含む様々な不溶性マトリックスが含まれる。最後に、疎水性RP-HPLC材、例えば側鎖メチルまたは他の脂肪族基を有するシリカゲルを使用する、一つまたは複数の逆相高速液体クロマトグラフィー(RP-HPLC)の工程を利用して、癌幹細胞タンパク質-Fc組成物をさらに精製することができる。前記の精製工程のうちのいくつかまたはすべてを色々な組み合わせで使用して、均質な組換え型タンパク質を提供することができる。

【0149】

細菌培養物中に產生された組換えタンパク質を、例えば最初の細胞沈殿物からの抽出、それに続く一つまたは複数の濃縮、塩析、水性イオン交換またはサイズ排除クロマトグラフィーの工程により単離することができる。高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を最終の精製工程に採用することができる。組換えタンパク質の発現に使用した微生物細胞を、凍結融解の繰り返し、超音波処理、機械的破壊、または細胞溶解剤の使用を含む任意の便利

10

20

30

40

50

な方法によって破壊することができる。

【0150】

腫瘍細胞増殖の阻害

本発明は、癌幹細胞マーカーを発現している腫瘍形成性細胞の成長を、本明細書に記載した癌幹細胞マーカーに対する抗体を用いて阻害するための方法を提供する。ある態様では、癌幹細胞マーカーを発現している腫瘍形成性細胞の成長を阻害する方法は、細胞を、癌幹細胞マーカーに対する抗体とインビトロで接触させる工程を含む。例えば、癌幹細胞マーカーを発現する不死化された細胞株または癌細胞株を、発現された癌幹細胞マーカーに対する抗体を加えた培地中で培養して、細胞成長を阻害する。ある態様では、例えば組織生検、胸水、または血液試料などの患者の試料から、腫瘍幹細胞を含む腫瘍細胞を単離し、癌幹細胞マーカーに対する抗体を加えた培地中で培養して、細胞成長を阻害する。

10

【0151】

いくつかの態様では、癌幹細胞マーカーを発現している腫瘍形成性細胞の成長を阻害する方法は、細胞と、癌幹細胞マーカーに対する抗体とをインビトロで接触させる工程を含む。ある態様では、腫瘍形成性細胞と癌幹細胞マーカーに対する抗体とを接触させる工程を動物モデル中で行う。例えば、癌幹細胞マーカーを発現している異種移植片を、癌幹細胞マーカーに対する抗体を投与された免疫無防備状態のマウス(例えばNOD/SCIDマウス)中で成長させて、腫瘍成長を阻害する。いくつかの態様では、例えば組織生検、胸水、または血液試料などの患者の試料から、癌幹細胞マーカーを発現する癌幹細胞を単離して、免疫無防備状態のマウスに注入し、次にそのマウスに癌幹細胞マーカーに対する抗体を投与して、腫瘍細胞成長を阻害する。いくつかの態様では、癌幹細胞マーカーに対する抗体を、動物中への腫瘍形成性細胞の導入と同時に、または直後に投与して、腫瘍成長を防止する。いくつかの態様では、癌幹細胞マーカーに対する抗体を、腫瘍形成性細胞が所定の大きさに成長した後に治療剤として投与する。

20

【0152】

薬学的組成物

本発明は、さらに癌幹細胞マーカーを標的とする抗体を含む薬学的組成物を提供する。これらの薬学的組成物は、腫瘍細胞増殖の阻害およびヒト患者の癌の治療に用いることができる。

【0153】

30

製剤は、貯蔵および使用のために、精製された本発明の抗体を薬学的に許容されるビヒクル(例えば、担体、賦形剤)と組み合わせることにより調製される(Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Edition Mack Publishing, 2000)。適当な薬学的に許容されるビヒクルには、リン酸、クエン酸、および他の有機酸などの無毒な緩衝剤；塩化ナトリウムなどの塩；アスコルビン酸およびメチオニンを含む酸化防止剤；保存剤(例えば、オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；ヘキサメトニウムクロリド；ベンザルコニウムクロリド；ベンゼトニウムクロリド；フェノール；ブチルまたはベンジルアルコール；メチルまたはプロピルパラベンなどのアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサンノール；3-ペントノール；およびm-クレゾール)；低分子量ポリペプチド(例えば、約10より少ないアミノ酸残基)；血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリンなどのタンパク質；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニンまたはリジンなどのアミノ酸；单糖類、二糖類、グルコース、マンノースまたはデキストリンなどの炭水化物；EDTAのようなキレート剤；ショ糖、マンニトール、トレハロース、またはソルビトールなどの糖；ナトリウムなどの塩形成性対イオン；金属複合体(例えばZn-タンパク質複合体)；およびTWEENまたはポリエチレングリコール(PEG)などの非イオン性界面活性剤が非限定的に含まれる。

40

【0154】

本発明の薬学的組成物を、任意の数の方法で局所処置または全身処置のために投与することができる。投与は、(腔および直腸への送達を含む粘膜などへの)局所的投与、例えば

50

経皮貼付剤、軟膏、ローション、クリーム、ゲル、液滴、坐剤、スプレー、液体および散剤など；肺内投与(例えば噴霧器によるものを含む、散剤またはエアロゾルの吸入または通気による；気管内、鼻腔内、表皮、および経皮的投与)；経口的投与；または静脈内、動脈内、皮下、腹腔内または筋肉内の注射または注入を含む非経口的投与；あるいは頭蓋内(例えば、髄膜下または脳室内)投与でよい。

【0155】

治療製剤は、単回投与剤形であってよい。そのような製剤には、経口、非経口、または直腸内投与のためのまたは吸入器による投与のための、錠剤、ピル、カプセル剤、散剤、果粒剤、水または非水性溶媒中の溶液または懸濁液、あるいは坐剤が含まれる。錠剤などの固体組成物では、主要な有効成分が薬学的担体と混合されている。従来の錠剤化成分には、本発明の化合物またはその無毒な薬学的に許容される塩の均一混合物を含む固体の予備処方組成物を形成するための、コーンスターク、ラクトース、ショ糖、ソルビトール、タルク、ステアリン酸、ステアリン酸マグネシウム、リン酸二カルシウム、またはゴム、および他の希釈剤(例えば水)が含まれる。固体予備処方組成物を、次に上述の型の単回投与剤形へ細分する。新規組成物の錠剤やピルなどをコーティングするか、そうでなければ調合して持続作用の長所を与える剤形を提供することができる。例えば、錠剤またはピルは、外部成分によって覆われた内部組成物を含むことができる。さらに、分解に抵抗するよう働いて、内部成分にそのまま胃を通過させるかまたはその放出を遅らせることができる腸溶層によって、二つの成分を分離することができる。そのような腸溶層またはコーティングには様々な材料を用いることができるが、そのような材料は、多くのポリマー酸、および、ポリマー酸とセラック、セチルアルコールおよび酢酸セルロースのような物質との混合物を含む。

10

【0156】

薬学的製剤には、リポソームと複合体化された本発明の抗体が含まれる(Epstein, et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688; Hwang, et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030; ならびに米国特許第4,485,045号および第4,544,545号)。循環時間が増大されたリポソームが米国特許第5,013,556号に開示されている。いくつかのリポソームを、ホスファチジルコリン、コレステロール、およびPEG誘導体化ホスファチジルエタノールアミン(PEG-PE)を含む脂質組成物を用いた逆相蒸発によって生成することができる。規定の孔径のフィルターを通してリポソームを押し出すことにより、所望の直径を有するリポソームを得る。

20

【0157】

抗体をマイクロカプセル中に封入することもできる。そのようなマイクロカプセルは、例えばコアセルベーション技術または界面重合法によって、例えばヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチン-マイクロカプセルおよびポリ(メチルメタクリレート)マイクロカプセルが、コロイド状薬物送達システム(例えばリポソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子およびナノカプセル)中に、またはRemington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing (2000)に記載されているマイクロエマルジョン中にそれぞれ調製される。

30

【0158】

さらに、徐放性製剤を調製することができる。徐放性製剤の適当な例には、抗体を含む固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスが含まれ、そのマトリックスは、成形された物品(例えばフィルムまたはマイクロカプセル)の形をしている。徐放性マトリックスの例には、ポリエステル、ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)またはポリ(ビニルアルコール)などのヒドロゲル、ポリラクチド(米国特許第3,773,919号)、L-グルタミン酸と7エチル-L-グルタメートのコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、LUPRON DEPOT (商標)(乳酸-グリコール酸コポリマーおよび酢酸ロイプロリドからなる注射可能なミクロスフェア)などの分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、ショ糖酢酸イソ酪酸エステル、およびポリD-(-)-3-ヒドロキシ酪酸が含まれる。

40

【0159】

50

処置および併用療法

ある態様では、処置には本発明の抗体と化学療法剤または複数の異なる化学療法剤のカクテルとの組み合わせ投与が伴う。抗体による処置を、化学療法剤の投与の前に、それと同時に、またはその後に行ってもよい。本発明が意図する化学療法には、ドキソルビシン、5-フルオロウラシル、シトシンアラビノシド(「Ara-C」)、シクロホスファミド、チオテバ、プスルファン、サイトキシン、タキソール、メトレキセート、シスプラチン、メルファラン、ビンプラスチンおよびカルボプラチンなどの、当技術分野において公知である、市販の化学物質または薬物が含まれる。組み合わせ投与には、単一の薬学的製剤によるまたは別々の製剤を用いた同時投与、あるいは、いずれかの順序であるが通常は全ての活性薬剤がそれらの生物活性を同時に発揮できるような期間内での、連続投与が含まれ得る。そのような化学療法剤の調製および服薬スケジュールを、メーカーの指示に従って、あるいは、熟練した開業医が経験的に決定して用いることができる。そのような化学療法の調製および服薬スケジュールは、Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992) にも記載されている。

【0160】

他の態様では、処置には本発明の抗体と放射線療法とを組み合わせた投与を伴う。抗体による処置を、放射線療法の適用の前に、それと同時に、またはその後に行うことができる。そのような放射線療法の任意の処方スケジュールを、熟練した開業医が決定して用いることができる。

【0161】

他の態様では、処置には、本発明の抗体と、EGF受容体(EGFR)(Erbilux(登録商標))、erbB2受容体(HER2)(Herceptin(登録商標))、および血管内皮増殖因子(VEGF)(Avastin(登録商標))に結合する抗体を非限定的に含む、追加の腫瘍関連抗原に対する他の抗体との組み合わせ投与を伴い得る。さらに処置は、一つまたは複数のサイトカインの投与を含むことができ、また癌細胞の外科的除去、または治療する医師によって必要と認められる任意の他の療法を一緒にを行うことができる。

【0162】

疾患の処置については、本発明の抗体の適切な用量は、処置するべき疾患の種類、疾患の重症度および経過、疾患の反応性、治療または予防のどちらの目的で抗体を投与するのか、以前の療法、患者の病歴、および治療医の判断による全てによって決まる。一度に、または、数日間～数か月間継続する一連の処置にわたって、または、治癒が達成されるか病態の低減が達成される(例えば腫瘍の大きさの減少)まで、抗体を投与することができる。患者の体内の薬物蓄積の測定値から最適な投薬スケジュールを計算することができるが、これは個々の抗体の相対的効能に応じて変動する。投与する医師は、最適な用量、投薬方法、および反復回数を容易に決定することができる。一般に用量は、体重kg当たり0.01 μg～100mgであり、1日、1週間、1ヶ月、または1年間に1回または複数回与えることができる。処置する医師は、体液または組織中の薬物の測定された滞留時間および濃度に基づいて、投薬の反復回数を決定することができる。

【0163】

本発明は、本明細書に記載された抗体を含み、本明細書に記載された方法を実施するために用いることができるキットを提供する。ある態様では、キットは、一つまたは複数の容器中に少なくとも一つの癌幹細胞マーカーに対する精製された抗体を含む。いくつかの態様では、キットは、すべての対照、分析を行なうための説明書、および結果の分析および呈示のための任意の必要なソフトウェアを含めて、検出分析を行なうために必要および/または十分な構成要素のすべてを含む。本発明の開示された抗体が、当技術分野において周知の確立されたキット形式の一つに容易に組み入れられうることを、当業者は容易に認識するであろう。

【0164】

本開示の態様を、次の実施例を参照してさらに明確にすることができる。実施例は、本開示の抗体の調製および本開示の抗体を用いるための方法を詳述する。本開示の範囲から

10

20

30

40

50

逸脱することなく、材料と方法の両方に多くの改変を行うことは、当業者には明白であろう。同一のまたは同様の部分を指すために、可能な限り図面の全体にわたって同じ符番を用いる。本明細書および添付の特許請求の範囲において用いられる場合、単数形の「1つの(a)」、「または(or)」および「その(the)」は、文脈上明らかに他の指示がない限り、複数の指示対象を含む。すなわち、例えば「抗体(an antibody)」に対する言及は、複数のそのような抗体または1つもしくは複数の抗体および当業者に公知のその等価物を含む。さらに、本明細書において使用される、成分の量、反応条件、純度、ポリペプチド長およびポリヌクレオチド長などを表す全ての数は、特に明記のない限り「約」という用語によって修飾される。したがって、本明細書および特許請求の範囲において記載されている数値パラメーターは、本発明の所望の特性に応じて変化しうる概算値である。本明細書に記載の様々な態様および選択肢はすべて、任意のおよびすべてのバリエーションで組み合わせることができる。

10

【0165】

実施例

実施例1

保存されたNotch受容体リガンド結合領域の規定

本実施例はNotch受容体ファミリー内の保存されたリガンド結合領域の発見について記載する。このリガンド結合領域は、リガンド結合に必要な、EGF11内の保存されたグルタミン酸、またはその等価物を含む。

20

【0166】

Notch受容体は、細胞外ドメイン内の36個のEGFリピートのうちの二つを含むリガンド結合ドメインを介してそのリガンドと相互作用する。具体的には、Notch受容体ファミリーのEGFリピート11および12(Notch3ではEGF10-11)が、リガンド結合を媒介するのに必要かつ十分なドメインを規定する(Rebay et al., 1991, Cell 67:687-99; 米国特許第5,786,158号、同第6,090,922号)。しかしながら、最適な結合にはEGF11-12内でなどの、グリコシル化およびさらなるEGFリピートの関与が必要である(Xu et al., J. Biol. Chem. 280: 30158-65)。

【0167】

リガンド結合に必要なEGF11-12ドメイン内の領域をさらに規定するために、Notch受容体のEGFリピート間の配列比較を行った。この解析から、ヒトNotch1、Notch2、Notch3(相同的のEGF10)およびNotch4のEGF11のなかに保存されたグルタミン酸(E)が明らかになったが、これらのタンパク質におけるその他36個のEGFリピートのいずれにおいても明らかにならなかった(図1)。さらに、このグルタミン酸はショウジョウバエNotchおよびアフリカツメガエルNotchの両方のEGF11において保存されているが、この場合もやはり、その他のEGFリピートにおいては保存されていないことも、線虫Notchの単一のEGFリピート(EGF9)において保存されていることも分かった(図1)。X線結晶データから、折り畳まれたEGF11リピートの表面上にこのグルタミン酸が示されており(Hambleton et al., 2004, Structure, 12: 217-83)、すなわち、同時にこれらのデータから、EGF11によるリガンド結合でのこの保存されたグルタミン酸残基の重要な役割が示唆される。

30

【0168】

そのような役割を実証するため、標準的な組換えDNA技術を用いてNotch1のEGF11中のグルタミン酸424を荷電の異なるグルタミン(Q)と交換し、Notch受容体リガンドを結合する突然変異受容体(E424Q)の能力を試験した。完全長の野生型Notch1またはNotch1 E424QをGFPとともにHEK 293細胞にコトランスクレクトした。トランスクレクションから24時間後、Jagged1タンパク質またはDLL4タンパク質のいずれかを細胞に添加し、FACSを用いて結合を評価した。GFP発現はNotch1タンパク質を発現している細胞の印となった(図2、x軸)。野生型Notch1を発現している細胞はDLL4(図2、左上の四角形)もJagged1(図2、左下の四角形)もともに結合した。対照的に、Notch1 E424Qを発現している細胞の方が有意に少なかったことから、DLL4(図2、右上の四角形)またはJagged1(図2、右下の四角形)のいずれかとのいくつかの結合が示された。

40

50

【0169】

ヒトNotch2受容体での類似の実験において、標準的な組換えDNA技術を用いてEGF11のグルタミン酸428を荷電の異なるグルタミン(Q)と交換し、Notch受容体リガンドを結合する突然変異受容体(E428Q)の能力を試験した。野生型Notch2を発現している細胞はDLL4(図3、左上の四角形)もJagged1(図3、左下の四角形)もともに結合した。対照的に、Notch2 E428Qを発現している細胞の方が有意に少なかったことから、DLL4(図3、右上の四角形)またはJagged1(図3、右下の四角形)のいずれかとのいくらかの結合が示された。

【0170】

Notch1 EGF11によるリガンド結合でのグルタミン酸424およびNotch2 EGF11によるリガンド結合でのグルタミン酸428の必要性をさらに評価するため、この保存されたグルタミン酸においてさらなる突然変異を作出する。標準的な組換えDNA技術を用いて、EGF11中のこの保存されたグルタミン酸を、例えば、アルギニンおよびアスパラギンを含め、他の荷電の異なるアミノ酸と、および荷電の等しいアミノ酸、アスパラギン酸と交換する。次いで完全長の突然変異Notch受容体をGFPとともにHEK 293細胞にコトランスクレクトし、上記のようにFACSによってリガンドJagged1およびDLL4との結合を評価する。ヒトNotch4のEGF11リピートでのおよびヒトNotch3のEGF10リピートでのこの保存されたグルタミン酸の必要性を同様に評価する。

10

【0171】

同様の突然変異誘発実験を用いて、ヒトNotch受容体におけるリガンド結合領域を規定するうえで他のアミノ酸の必要性を判定する。例えば、ある態様において、この保存されたグルタミン酸の周りのアミノ酸において個別の突然変異を作出し、リガンド結合に及ぼすこれらの突然変異の影響を評価する。このように、保存されたグルタミン酸残基を含むEGF11内の保存されたNotch受容体リガンド結合領域を規定する。

20

【0172】

実施例2

Notch受容体リガンド結合領域を標的とする抗体

保存されたNotch受容体リガンド結合領域の同定に基づき、EGF11(Notch3のEGF10)中の保存されたグルタミン酸残基を標的とするアンタゴニストを、Notch受容体シグナル伝達によって促進される、癌を含め、疾患に対する治療用物質として作製する。ある態様において、Notchグルタミン酸リガンド結合領域を特異的に認識する抗体を作製した。

30

【0173】

抗原產生

ある態様において、ヒトNotch受容体のEGF11(またはNotch3のEGF10)の組換えポリペプチド断片を抗体產生用の抗原として作製する。標準的な組換えDNA技術を用いて、例えば、Notch1のアミノ酸411～446をコードするポリヌクレオチドを単離する。このポリヌクレオチドをヒトFc-タグのN末端側にインフレームでライゲーションし、昆虫細胞におけるバキュロウイルス媒介性の発現のために移入プラスミドベクターにクローニングする。標準的なトランスクレクション、感染および細胞培養プロトコルを用いて、対応するNotch1 EGF11ポリペプチドを発現する、組換え昆虫細胞を產生する(O'Reilly et al., *Baculo virus expression vectors: A Laboratory Manual*, Oxford: Oxford University Press (1994))。

40

【0174】

ある態様において、保存されたグルタミン酸の周りのグルタミン酸リガンド結合ドメインのポリペプチドを作製する。いくつかの態様において、特定のヒトNotch受容体の配列を用いてポリペプチドを作製する。例えば、いくつかの態様において、Notch1 EGF11由來のポリペプチド

PCEHAGKCINT

を用いて、リガンド結合領域を標的とする抗体を作製することができる。いくつかの態様において、Notch2 EGF11由來のポリペプチド

PCEHAGKCVNT

50

を用いて、リガンド結合領域を標的とする抗体を作製することができる。いくつかの態様において、Notch3 EGF10由来のポリペプチド

PCEHLGRCVNT

を用いて、リガンド結合領域を標的とする抗体を作製することができる。いくつかの態様において、Notch4 EGF11由来のポリペプチド

PCEHGGSCLNT

を用いて、リガンド結合領域を標的とする抗体を作製することができる。ある態様において、複数のNotch受容体のグルタミン酸リガンド結合領域を認識する抗体を作製することを目指して最大数のNotch受容体間の最大数のアミノ酸を含有するようおよび非保存アミノ酸を荷電適合により最適化してポリペプチドを作製する。ある態様において、Notch受容体リガンド結合領域を標的とする抗体を作製するためにたらされるポリペプチドは

NPCEHXGYCXNX

であり、ここでXは非極性脂肪族アミノ酸残基であり、Yは正荷電アミノ酸残基である。いくつかの態様において、ポリペプチド

QPCEHAGRCANT

を用いてリガンド結合ドメインを標的とする抗体を作製する。

【 0 1 7 5 】

免疫

抗原の作製後、標準的な技術を用いて、マウス (n=3) を精製Notchグルタミン酸リガンド結合領域抗原タンパク質または合成ペプチドのいずれかで免疫する。個別のマウス由來の血液を初回免疫からおよそ70日後に、ELISAおよびFACS解析を用い抗原認識についてスクリーニングする（以下に詳述する）。最も高い抗体力値を有する動物二匹を最終の抗原追加免疫のために選択し、その後、脾臓細胞をハイブリドーマ産生のために単離する。ハイブリドーマ細胞を96ウェルプレート中に1ウェルあたり細胞1個でプレーティングし、各ウェルからの上清を抗原タンパク質に対するELISAおよびFACS解析によってスクリーニングする。高い抗体力値を有するいくつかのハイブリドーマを選択し、静的フラスコ培養においてスケールアップする。プロテインAまたはプロテインGアガロースクロマトグラフィーを用いて、ハイブリドーマ上清から抗体を精製する。精製されたモノクローナル抗体を再び、FACSによって試験し、アイソタイプしてIgGおよびIgM抗体を選択する。

【 0 1 7 6 】

FACS解析

天然のNotchリガンド結合領域を認識する、ハイブリドーマ・クローンによって產生されるモノクローナル抗体を選択するため、FACS解析を用いる。HEK293細胞にNotch1、Notch2、Notch3、またはNotch4の完全長のcDNAクローンをコードする発現ベクターおよびトランسفエクションマーカーGFPをコードする発現ベクターをコトランسفエクトする。トランسفエクションから24時間～48時間後、細胞を懸濁状態で回収し、抗Notchグルタミン酸リガンド結合領域抗体または対照IgGとともに氷上でインキュベートして、バックグラウンドの抗体結合を検出する。細胞を洗浄し、蛍光性発色団に結合された抗マウス二次抗体で一次抗体を検出する。次いで標識細胞をFACSにより選別して、一つまたは複数の天然の細胞表面Notch受容体タンパク質の細胞表面発現を特異的に認識する抗Notchグルタミン酸リガンド結合抗体を同定する。

【 0 1 7 7 】

Notchグルタミン酸リガンド結合領域に対して作製された抗体がNotchとそのリガンドJagged1およびDLL4との間の相互作用を妨害する能力を次いで測定する。完全長のNotchタンパク質を発現するHEK 293細胞を、抗Notchグルタミン酸リガンド結合領域抗体または対照抗体の存在下においてDLL4-FcまたはJagged1-Fcのいずれかとともにインキュベートする。Notch受容体を発現する細胞とのFc融合タンパク質の結合を、PE結合ヤギ抗Fc抗体およびフローサイトメトリーにより検出する。したがってDLL4またはJagged1とのNotchの結合を阻害する抗Notchグルタミン酸リガンド結合領域抗体の能力を蛍光強度の変化により測定する。

10

20

30

40

50

【0178】

キメラ抗体

Notchリガンド結合領域を特異的に認識するモノクローナル抗体を同定した後に、これらの抗体を修飾して、齧歯類抗体を治療剤として用いる場合の、ヒト抗マウス抗体(HAMA)免疫応答を克服する。選択されたモノクローナル抗体の重鎖および軽鎖の可変領域を、ハイブリドーマ細胞からRT-PCRによって単離して、哺乳動物発現ベクター中で、ヒトIgG₁の重鎖と 軽鎖の定常領域にそれぞれインフレームでライゲーションする。または、同じプラスミド上にヒトIgG₁重鎖および 軽鎖定常領域遺伝子を含む、TCAE 5.3などのヒトIg発現ベクターを用いる(Preston et al., 1998, Infection & Immunity 66:4137-42)。キメラ抗体産生のために、次にキメラ重鎖および軽鎖をコードする発現ベクターを、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞へ同時トランスフェクションする。キメラ抗体の免疫反応性および親和性を、ELISAおよびFACSによって親のマウス抗体と比較する。

【0179】

ヒト化抗体

キメラ抗体治療用物質はそれでも抗原性があり、ヒト抗キメラ抗体 (HACA) 免疫反応を生ずることが多いので、抗Notchリガンド結合領域に対するキメラ抗体はさらにヒト化を受けることができる。ヒト化抗体を作製するため、上記のキメラ抗体重鎖および軽鎖可変ドメインの三つの短い超可変配列、または相補性決定領域 (CDR) を組換えDNA技術により、それぞれ、ヒト重鎖および軽鎖配列の可変ドメインフレームワークの中へ遺伝子操作し、次いでCHO細胞での発現のために哺乳類発現ベクターにクローニングする。ヒト化抗体の免疫反応性および親和性をELISAおよびFACSにより親のキメラ抗体と比較する。さらに、可変領域の部位特異的突然変異誘発または高密度突然変異誘発を用いて、ヒト化抗体の特異性、親和性などを最適化することができる。

【0180】

ヒト抗体

ある態様において、Notchグルタミン酸リガンド結合領域を特異的に認識するヒト抗体を、ファージディスプレイを用いて単離した。ヒト抗体可変ドメインを含有する合成抗体ライブラリを、特定のNotch受容体由来のリガンド結合領域タンパク質または上記に詳述のリガンド領域に汎用のポリペプチドのいずれかを用いることによってNotchリガンド結合領域の特異的な、かつ高親和性の認識についてパニングする。いくつかの態様において、保存されたグルタミン酸において突然変異があるおよびないポリペプチドを使用する；突然変異したグルタミン酸残基を有するペプチドを用いて、リガンド結合に必要なグルタミン酸のほかの領域を認識する抗体を除くと、残る抗体は野生型の合成ペプチドだけを認識する。次いでグルタミン酸を含有するペプチドとの結合のための抗体の最適化を目的にユニークな隣接制限部位を介して、ライブラリ中のCDRカセットを特異的に交換する。次いで最適化されたヒト可変領域を、CHO細胞におけるヒト抗体の発現のためにヒトIgG₁重鎖および 軽鎖を含有するIg発現ベクターにクローニングする。

【0181】

ある態様において、ファージディスプレイにより、Notch1内のリガンド結合ドメインに結合する特異的fAbが同定された。ある態様において、ファージディスプレイにより、Notch3内のリガンド結合ドメインに結合する特異的fAbが同定された。ある態様において、Notch3とNotch1の両方のリガンド結合ドメインに結合するfAbが発見された。ある態様において、ヒトfAbファージライブラリ由来の 2×10^{13} 個のFabディスプレイスファージ粒子を、完全長の組換えタンパク質を発現する細胞または受動的に固定化された組換えタンパク質断片とともにインキュベートし、非特異的なファージを洗い流し、次いで特異的なファージを低pH(細胞)またはDTT(組換えタンパク質)のいずれかで溶出した。溶出された産物を用いてTG1 F+細菌に感染させ、ヘルパーファージで救出し、次にFabディスプレイをIPTG (0.25 mM) で誘導した。この救出ラウンド1の産物を表1に示したようにラウンド2、3、4、および5でのさらなる選択の出発点とした。

【0182】

10

20

30

40

50

【表1】

fAb	選択抗原*				
	R1	R2	R3	R4	R5
抗-Notch1	hNotch1(EGF10-15)Fc	hNotch1(EGF10-15)Fc	細胞	細胞	細胞
抗-Notch3	mNotch3(EGF9-14)Fc	mNotch3(EGF9-14)Fc	mNotch3(EGF9-14)Fc		

* 注釈: h、ヒト; m、マウス

【0183】

Notch1の場合、ファージディスプレイライブリを細胞上のNotch1の断片（EGF10-15、アミノ酸375-601）および完全長のNotch1との結合についてパニングした。アミノ酸置換（置換E424Q）を導入し、Notchリガンド結合領域を破壊したこのNotch1の断片版に結合するその能力についてfAbを調べた。リードのfAbは選択抗原にだけ結合し、Notch1(E424Q)に結合しなかった。

10

【0184】

リードのNotch1 fAbがNotch1のリガンド結合領域に特異的であったことを確認するため、HEK293細胞にGFPおよび野生型の完全長Notch1またはアミノ酸置換E424Qを含有するNotch1のいずれかをコトランスクレクトした。図4に示すように、リードのNotch1 fAbはNotch1発現細胞との強固な結合を示すが、E424Qアミノ酸置換を有するNotch1タンパク質を過剰発現する細胞に結合できなかった。

【0185】

20

高親和性mAbを同定するため、Notch1のリガンド結合領域に特異的なNotch1リードfAbの親和性成熟を行った。これをファージディスプレイの使用により達成して、親のfAbよりもNotch1に対し高い親和性をもたらす一連の代替的軽鎖を同定した。親和性成熟によって90R21、90R22および90R29抗Notch1リガンド結合ドメイン抗体が同定された。90R21重鎖はCDR1 (SEQ ID NO:2)；CDR2 (SEQ ID NO:3)およびCDR3 (SEQ ID NO:4)を含め、SEQ ID NO:1のアミノ酸を含む。90R21軽鎖はCDR1 (SEQ ID NO:6)；CDR2 (SEQ ID NO:7)およびCDR3 (SEQ ID NO:8)を含め、SEQ ID NO:5のアミノ酸を含む。90R21を2008年1月24日付でATCCに寄託した（寄託番号__）。

【0186】

30

Notch3の場合、Notch1の場合と同じ手法を用いて、ファージディスプレイライブリを（Notch3のアミノ酸403を含む）Notch3内の類似のエピトープとの結合についてパニングした。ヒトタンパク質の選択では、E403Qエピトープを結合するfAbが得られず、したがってマウスタンパク質の選択を用いた。リードのfAbである122R5は選択抗原に対してヒトおよびマウスNotch3だけを結合し、Notch3(E403Q)を結合しなかった。122R5重鎖はCDR1 (SEQ ID NO:10)；CDR2 (SEQ ID NO:11)およびCDR3 (SEQ ID NO:12)を含め、SEQ ID NO:9のアミノ酸を含む。122R5軽鎖はCDR1 (SEQ ID NO:14)；CDR2 (SEQ ID NO:15)およびCDR3 (SEQ ID NO:16)を含め、SEQ ID NO:13のアミノ酸を含む。fAb 122R5はまた、Notch1に結合するが、しかしNotch1(E424Q)には結合しない能力を示し、複数のNotchファミリーメンバーの重要なリガンド結合領域に結合する抗体を同定することが可能なことを示した（図5）。

40

【0187】

K_D決定

Biacore LifescienceのBiacore 2000システム（GE Healthcare）を用いてある種の抗Notchグルタミン酸リガンド結合領域抗体のK_Dを決定した。具体的には、精製された抗Notch1グルタミン酸リガンド結合領域抗体をHBS-P (0.01 M HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.05% v/v Surfactant P20) の入ったPBSに25から0.20 nMまで2倍刻みで連続的に希釈した。各希釈液をCM5 Biacoreチップ上に固定されたNotch1グルタミン酸リガンド結合領域タンパク質（EGF10-15）に対して試験した。結合および解離速度を測定し、Biaevaluationソフトウェアプログラムを用いてK_D値を決定した。下記表中のNBは、K_Dによって測定した場合、notch-リガンド（-様リガンド）親和性定数よりも少なくとも10倍弱い結合親和性を

50

意味する。

【0188】

【表2】

Ab	hNotch1 (nM)	hNotch2 (nM)**	hNotch3 (nM)	hNotch4 (nM)	mNotch1 (nM)
90R21	<0.1	NB	NB	NB	0.25
122R5	4.25	NB	<0.1	NB	

【0189】

実施例3

抗Notchグルタミン酸リガンド結合領域抗体を評価するインビトロアッセイ法

10

本実施例では、Notch受容体グルタミン酸リガンド結合領域に対して作製された抗体が細胞増殖、Notch経路活性化および細胞毒性に及ぼす活性を試験するための代表的なインビトロアッセイ法について記載する。

【0190】

結合アッセイ法

NotchとのNotchリガンドの結合を阻害する重要なリガンド結合領域に特異的な抗体の能力を評価した。ある態様において、Notch1とのDLL4の結合を阻害するNotch1リガンド結合領域に特異的な親和性成熟済のモノクローナル抗体のパネルの能力をFACS解析により決定した(図6)。ヒトNotch1を安定的にトランスフェクトしたHEK293細胞を漸増濃度の90R21、90R22および90R29抗体の存在下において可溶性DLL4-fc融合タンパク質とともにインキュベートした。全3種のモノクローナル抗体は、DLL4とNotch1過剰発現細胞との間の結合を遮断した。さらに、Notch3内の類似のエピトープ(Notch 3のアミノ酸403を含む)に結合すると特定された個別のfAbもNotch3とのNotchリガンドの結合を強力に遮断した(図7)。GFPおよび完全長のNotch3をコトランスフェクトしたHEK293細胞をfAbの非存在下(Abなし)または存在下(122R03 E1)において可溶性ヒトJag1-fc融合タンパク質とともにインキュベートした。fAbはJag1とNotch3過剰発現細胞との間の結合を遮断した。これらのデータから、この重要なリガンド結合領域に対する抗体はNotch受容体とのNotchリガンドの結合に強く影響を及ぼすことが示唆される。

20

【0191】

増殖分析

30

種々の癌細胞株によるNotch受容体の発現をTaqman分析を用いて定量する。Notchを発現すると同定された細胞株を、96ウェル組織培養マイクロプレートに、ウェル当たり細胞 10^4 個の密度で播種し、24時間展開させる。続いて、細胞をさらに12時間、2%FCSを含む新鮮なDMEM中で培養し、その時点で抗Notchリガンド結合領域または対照抗体を $10 \mu\text{mol/L}$ のBrdUの存在下で培養培地に加える。BrdUで標識した後に、培養培地を除去し、細胞をエタノール中において30分間室温で固定し、ペルオキシダーゼ結合抗BrdUモノクローナル抗体(クローンBMG 6H8、Fab断片)と90分間反応させる。テトラメチルベンジンを含む溶液中で基質を発色させ、15分間後に 1mol/L の H_2SO_4 25 μl によって停止させる。呈色反応を、自動ELISAプレートリーダー(UV Microplate Reader; Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA)で450nmフィルターを用いて測定する。全ての実験を三つ組で行う。対照抗体と比較した抗Notchリガンド結合領域抗体が細胞増殖を阻害する能力を決定する。

40

【0192】

経路活性化の分析

ある態様において、Notchリガンド結合領域に対する抗体がNotchシグナル伝達経路の活性化を遮断する能力をインビトロにおいて測定する。抗生物質および10% FCSを補充したDMEM中で培養したHEK293細胞に、(1) DLL4リガンドに応じたNotchシグナル伝達レベルを測定するためにホタルルシフェラーゼレポーター遺伝子の上流にHes1プロモーターを含有するHes1-Lucレポーターベクター(Jarriault et al., 1995, Nature 377:355-8); (2) トランスフェクション効率に関する内部対照としてウミシイタケ(Renilla)ルシフェラーゼレポーター(Promega; Madison, WI); および(3) 完全長Notch受容体をコードする発現ベ

50

クターを同時トランスフェクトする。次いでトランスフェクトした細胞を、Notchリガンド結合領域に対する抗体の存在下または不在下で、10 μg/ml DLL4-Fcタンパク質と共にインキュベートする。トランスフェクションから48時間後に、ルシフェラーゼレベルをデュアルルシフェラーゼアッセイキット(Promega; Madison, WI)を用いて測定し、ホタルルシフェラーゼ活性をウミシイタケルシフェラーゼ活性に対して標準化する。抗体がDLL4誘導性のNotch経路活性化を阻害する能力をこのようにして測定する。

【0193】

ある態様において、Notchリガンド結合領域に対する抗体がNotchシグナル伝達を遮断する能力をリガンド刺激に応じたNotch切断の阻害によって測定した。Notch1を安定的に発現するHeLa細胞を、抗生物質および10% FCSを補充したDMEM中で培養した。次いで細胞を10 10 μg/mlの可溶性DLL4-Fcタンパク質の存在下、Notchリガンド結合ドメインに対するモノクローナル抗体、対照抗体、リガンド結合領域のほかのNotch1結合領域に対する抗体(13 M57)およびセクレターゼ阻害剤DBZの存在下または非存在下においてインキュベートした。細胞を収集し、リガンド誘導性のシグナル伝達に応じて生じたNotchの切断された細胞内ドメイン(ICD)を認識する抗体を用いたウエスタンプロットによって細胞溶解物を解析した(図8A)。図8Bに示されるように、リガンド結合領域に対する抗体(90R21、90R 20 22および90R29)は、セクレターゼ阻害剤DBZと同様、Notchリガンドに応じたNotch ICDの形成を阻止した。対照的に、13M57および対照抗体ではDLL4に応じたICDの形成に影響がなかった。

【0194】

補体依存性細胞障害性の分析

ある態様では、1つまたは複数のNotch受容体を発現している癌細胞株または免疫無防備状態のマウス中で異種移植片として継代された患者試料から単離された癌幹細胞(詳細に下に記載する)を用いて、Notchリガンド結合領域に対する抗体によって媒介される補体依存性細胞障害性(CDC)を測定する。細胞を、抗生物質および5% FBSを追加した200 μlのRPMI 1640培養培地に10⁶細胞/mlで懸濁する。懸濁した細胞を次に、Notch2に対する抗体または対照抗体を含む200 μlの血清または熱不活性化血清と、三つ組で混合する。細胞混合物を37℃で1~4時間5% CO₂中でインキュベートする。次に、処理した細胞を回収し、培養培地で希釈した100 μlのFITC標識アネキシンVに再懸濁し、10分間室温でインキュベートする。HBSSで希釈した100 μlのヨウ化プロピジウム溶液(25 μg/ml)を加えて室温で5分間インキュベートする。細胞を回収して培養培地に再懸濁し、フローサイトメトリーによって解析する。FITC染色した細胞のフローサイトメトリーによって全細胞数が得られ、全細胞数に占める割合としての死細胞によるヨウ化プロピジウムの取込みは、熱不活性化した血清および対照抗体と比較した、血清およびNotch2に対する抗体の存在下での細胞死を測定するために用いられる。抗Notchリガンド結合領域抗体が補体依存性細胞障害性を媒介する能力をこのように決定する。

【0195】

抗体依存性細胞障害の分析

ある態様では、1つまたは複数のNotch受容体を発現している癌細胞株、または免疫無防備状態のマウス中で異種移植片として継代された患者試料から単離された癌幹細胞(詳細に下に記載する)を用いて、Notchリガンド結合領域に対する抗体によって媒介される抗体依存性細胞性細胞障害性(ADCC)を測定する。細胞を、抗生物質および5% FBSを追加した、フェノールレッドを含まないRPMI 1640培養培地200 μlに、10⁶細胞/mlで懸濁する。エフェクター細胞として使用するために、末梢血単核細胞(PBMC)をヘパリン化末梢血からFico II-Paque密度勾配遠心分離により単離する。次に96ウェルプレート中、少なくとも一種のNotch EGF11抗体または対照抗体の存在下で、標的細胞(T)とPBMCエフェクター細胞(E)とを、25:1、10:1および5:1のE/T比率で混合する。対照には、抗体の存在下における、標的細胞単独およびエフェクター細胞単独のインキュベーションが含まれる。細胞混合物を、5% CO₂中37℃で1~6時間インキュベートする。次に、細胞溶解の際に放出される安定な細胞質の酵素である放出された乳酸脱水素酵素(LDH)を、比色分析(CytoTox96 Non-radi 40 50

oactive Cytotoxicity Assay; Promega; Madison, WI)により測定する。490nmでの吸光度データを標準96ウェルプレートリーダーで集め、バックグラウンドを補正する。特異的細胞障害性の割合を次の式によって計算する：%細胞障害性 = $100 \times (\text{実験でのLDH放出} - \text{エフェクターの自発的LDH放出}) / (\text{標的の最大LDH放出} - \text{標的の自発的LDH放出})$ 。Notchリガンド結合領域に対する抗体が抗体依存性細胞性細胞障害性を媒介する能力をこのように決定する。

【0196】

実施例4

抗Notchリガンド結合領域抗体を用いる、インビボにおける腫瘍成長の防止

この実施例は、異種移植片モデル中の腫瘍成長を防止するための、抗Notchリガンド結合領域抗体の使用について説明する。本実施例はまた、Notch標的遺伝子発現の抗Notchリガンド結合領域抗体処置の効果を記載する。

【0197】

ある態様では、マウス中で異種移植片として継代されてきた患者試料(充実性腫瘍生検または胸水)からの腫瘍細胞を、実験動物へと再継代するために調製した。腫瘍組織を無菌条件下で取り出し、小片へ切断して、殺菌した刃を用いて完全に刻み、酵素消化および機械的破壊によって単細胞懸濁物を得た。具体的には、胸水細胞または得られた腫瘍片を、培養培地中で超純粋コラゲナーゼIII (1mL当たり200~250単位のコラゲナーゼ)と混合し、10mLピペットにより15~20分毎に上下にピペッティングしながら37°Cで3~4時間インキュベートした。消化された細胞を45µMのナイロンメッシュによって濾過し、RPMI/20% FBSで洗浄し、HBSSで二回洗浄した。次に、解離された腫瘍細胞をNOD/SCIDマウスの乳房脂肪パッドへ皮下注射して、腫瘍成長を誘発した。

【0198】

ある態様では、実験動物への注入の前に、解離された腫瘍細胞を細胞表面マーカーに基づいて腫瘍形成性細胞と非腫瘍形成性細胞へ最初に分別する。具体的には、上述のように解離された腫瘍細胞を、2%熱不活性化仔ウシ血清(HICS)を含むHepes緩衝生理食塩水(HBSS)で2回洗浄し、100µl当たり 10^6 細胞で再懸濁する。抗体を加え、細胞を20分間氷上でインキュベートし、続いてHBSS/2% HICSで2回洗浄する。抗体には、抗ESA (Biomedica, Foster City, CA)、抗CD44、抗CD24、および系列マーカーの抗CD2、抗CD3、抗CD10、抗CD16、抗CD18、抗CD31、抗CD64、および抗CD140b(Linと総称する；PharMingen, San Jose, CA)が含まれる。抗体を蛍光色素に直接結合させて、これらのマーカーを発現する細胞を陽性選択するか陰性選択する。H2Kd+細胞に対する選択を行うことによりマウス細胞を除去し、生死判別(viability)色素7AADを用いて死細胞を除去する。フローサイトメトリーをFACS Vantage(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)で行う。側方散乱および前方散乱のプロファイルを用いて、細胞塊を除去する。単離されたESA+、CD44+、CD24-/low、Lin-腫瘍形成性細胞を、次にNOD/SCIDマウスへ皮下注射して、腫瘍成長を誘発させる。

【0199】

ある態様において、抗Notchリガンド結合領域抗体を、インビボで乳房腫瘍の増殖を低減するその能力について解析した。NOD/SCIDマウスの右乳房脂肪体に解離PE13(図9A)またはT3(図9B)乳房腫瘍細胞(動物1匹につき細胞50,000個；1処置群につき動物10匹)を皮下注射した。T3細胞はエストロゲンペレットの移植と併せて注射した。細胞注射から2日後に処置を開始した。動物を4つの処置群：対照抗体；抗Notchリガンド結合領域抗体90R21；パクリタキセルと併せて対照抗体；およびパクリタキセルと併せて90R21に分けた。抗体を週2回10mg/kgで投与し、パクリタキセルを週1回10mg/kgで投与した。90R21による処置は55日後に対照抗体処置動物と比べて腫瘍増殖を著しく低減した一方、90R21およびパクリタキセルによる併用処置はT3腫瘍増殖を実質的になくした(図9)。

【0200】

ある態様において、抗Notchリガンド結合領域抗体を、UM-C9結腸腫瘍の増殖を低減するその能力について解析する。6~8週齢NOD/SCIDマウスの右側腹部に解離UM-C9細胞(動物1匹につき10,000個)を皮下注射する。腫瘍細胞注射の翌日、動物に実験の期間中、1週間

10

20

30

40

50

につき2回10 mg/kgの抗Notchリガンド結合領域抗体 (n=10) またはPBS (n=10) を腹腔内 (i.p.) 注射する。増殖が検出されるまで腫瘍増殖を毎週モニターし、増殖の時点の後、腫瘍増殖を週2回測定する。腫瘍増殖を低減するNotchリガンド結合領域抗体の能力をこのようにして決定する。

【0201】

ある態様において、抗Notchリガンド結合領域抗体による処置中にNotch標的遺伝子の発現を追跡した。6~8週齢NOD/SCIDマウスの右側腹部に解離OM-C9細胞（動物1匹につき10,000個）を皮下注射する。腫瘍細胞注射の翌日、動物に実験の期間中、1週間につき2回10 mg/kgの抗Notchリガンド結合領域抗体 (n=10) またはPBS (n=10) を腹腔内 (i.p.) 注射する。増殖が検出されるまで腫瘍増殖を毎週モニターし、増殖の時点の後、腫瘍増殖を毎週測定する。実験の終わりに、腫瘍細胞を処置動物および対照動物から切除し、定量的RT-PCRを用いてNotch標的遺伝子の発現を決定する。具体的には、標準的なプロトコルを用いて凍結結腸腫瘍サンプルから総RNAを抽出する。各遺伝子のためにデザインしたプライマーおよびプローブとともに標準的な逆転写酵素および定量的なPCR条件を用いて、総RNA 100 ngにて遺伝子発現解析を三つ組で行う。GUSBを内部対照として用いComparative Ct Methodによってデータを解析する (Applied Biosystems User Bulletins on Relative Quantitation of Gene Expressionを参照のこと)。3つのNotch標的遺伝子ATOH1、HES1、およびHEY1の発現に及ぼす抗Notchリガンド結合領域抗体の効果をこのようにして決定する。

【0202】

実施例5

20

抗Notchリガンド結合領域抗体を用いる、腫瘍のインピボでの処置

この実施例は、異種移植片モデル中の癌を処置するための、抗Notchリガンド結合領域抗体の使用について説明する。ある態様では、マウス中の異種移植片として継代された患者試料(充実性腫瘍生検または胸水)からの腫瘍細胞を、実験動物へと再継代するために調製する。腫瘍組織を取り出し、小片へ切断して、殺菌した刃を用いて完全に刻み、酵素消化および機械的破壊によって単細胞懸濁物を得る。次に、解離された腫瘍細胞を、NOD/SCIDマウスの、乳腺腫瘍については乳房脂肪パッドへ、非乳腺腫瘍については横腹へ皮下注射して、腫瘍成長を誘発させる。または、ESA+、CD44+、CD24-/low、Lin-の腫瘍形成性腫瘍細胞を、詳細に上述したように単離して注入する。

【0203】

30

腫瘍細胞注入後、動物の腫瘍成長をモニターする。腫瘍が平均約150~200mmの大きさに達したら、抗体処理を開始する。各動物に、100 µgのNotchリガンド結合領域抗体または対照抗体を、毎週2回~5回、合計6週間腹腔内投与する。この6週間の間、毎週2回、腫瘍の大きさを評価する。対照抗体と比較してNotchリガンド結合領域抗体がさらなる腫瘍成長を防止するかまたは腫瘍の大きさを減少させる能力を、このように決定する。

【0204】

抗体処理の終了時点で、さらなる分析のために腫瘍を回収する。いくつかの態様では、腫瘍の一部を免疫蛍光法によって解析し、腫瘍への抗体の浸透および腫瘍応答を評価する。抗Notchリガンド結合領域で処理されたマウスおよび対照抗体で処理されたマウスから回収された各腫瘍の一部を液体窒素中で新鮮なまま凍結し、O.C.T.に包埋し、クライオスタット上で10 µm切片として切断して、スライドガラスに載せる。いくつかの態様では、各腫瘍の一部をホルマリン固定し、パラフィン包埋し、ミクロトーム上で10 µm切片として切断してスライドガラスに載せる。切片を後固定し、注入された抗体を特異的に認識する発色団標識抗体とインキュベートして、腫瘍生検中に存在する抗Notchリガンド結合領域抗体または対照抗体を検出する。さらに、種々の腫瘍および腫瘍に補充された (tumor-recruited) 細胞の型を検出する抗体、例えば、血管内皮細胞を検出するための抗VEカドヘリン(CD144)または抗PECAM-1 (CD31) 抗体、血管平滑筋細胞を検出するための抗平滑筋

アクチン抗体、増殖中の細胞を検出するための抗Ki67抗体、死滅中の細胞を検出するためのTUNEL分析、Notchシグナル伝達を検出するための抗細胞内ドメイン(ICD) Notch断片抗体などを使用して、例えば血管形成、腫瘍成長および腫瘍形態に対する抗体処理の効果

40

50

を評価することができる。

【0205】

ある態様では、腫瘍細胞の遺伝子発現に対する抗Notchリガンド結合領域抗体処理の効果もまた評価する。実験抗体で処理されたおよび対照抗体で処理されたマウスから回収された各腫瘍の一部から全RNAを抽出し、定量的RT-PCRのために用いる。Notch受容体、Notch受容体リガンド、Notchシグナル伝達経路の構成要素、ならびに以前に同定された追加の癌幹細胞マーカー(例えばCD44)の発現レベルを、内部対照としてのハウスキーピング遺伝子GAPDHと比較して分析する。Notchリガンド結合領域抗体処理による腫瘍細胞遺伝子発現の変化をこのように決定する。

【0206】

さらに、腫瘍中の癌幹細胞の存在に対する、抗Notchリガンド結合領域抗体処理の効果を評価する。実験抗体または対照抗体で処理したマウスからの腫瘍試料を、小片へ切断して、殺菌した刃を用いて完全に刻み、酵素消化および機械的破壊によって単細胞懸濁物を得る。解離された腫瘍細胞を次に、FACS分析により、腫瘍形成性癌幹細胞の存在について、ESA+、CD44+、CD24-/low、Lin-表面細胞マーカーの発現に基づいて、上記に詳述したように分析する。

【0207】

抗Notch EGF11抗体処理後のESA+、CD44+、CD24-/low、Lin-発現に基づいて単離された細胞の腫瘍形成能を、次に評価することができる。実験抗体処理マウスまたは対照抗体処理マウスから単離されたESA+、CD44+、CD24-/low、Lin-癌幹細胞を、NOD/SCIDマウスの乳房脂肪パッドへ再度皮下注入する。一貫した腫瘍形成に必要な注入細胞数に基づく癌幹細胞の腫瘍形成能を次に決定する。

【0208】

実施例6

抗Notchリガンド結合領域抗体を用いたヒト癌の処置

この実施例は、Notch受容体またはNotch受容体リガンドの発現が検出された癌幹細胞および/または腫瘍細胞を含む腫瘍を標的とするためにNotch受容体リガンド結合領域に対する抗体を用いて癌を処置するための方法について説明する。癌幹細胞マーカー発現の存在を、最初に腫瘍生検から決定することができる。癌と診断された患者由来の生検から、無菌条件下で腫瘍細胞を取り出す。いくつかの態様では、組織生�検を液体窒素中で新鮮なまま凍結し、O.C.T.に包埋し、クライオスタット上で10 μm切片に切断して、スライドガラスに載せる。いくつかの態様では、組織生検をホルマリン固定し、パラフィン包埋して、ミクロトーム上で10 μm切片に切断してスライドガラスに載せる。切片を抗Notchリガンド結合領域抗体と共にインキュベートして、タンパク質発現を検出する。

【0209】

癌幹細胞の存在も決定することができる。組織生検試料を、小片へ切断して、殺菌した刃を用いて完全に刻み、細胞を酵素消化し、機械的に破壊して、単細胞懸濁物を得る。次に、解離された腫瘍細胞を抗ESA、抗CD44、抗CD24、抗Lin、および抗Notchリガンド抗体と共にインキュベートして癌幹細胞を検出し、ESA+、CD44+、CD24-/low、Lin-、Notchリガンド+腫瘍幹細胞の存在を、上記に詳述したようにフローサイトメトリーによって決定する。

【0210】

Notch受容体またはNotch受容体リガンドを発現していると診断された腫瘍を有する癌患者を、抗Notchリガンド結合領域抗体で処置する。ある態様では、上述のように產生されたヒト化またはヒトモノクローナル抗Notchリガンド結合領域抗体を精製し、注入に適した薬学的ビヒクルと共に製剤化する。いくつかの態様では、少なくとも10週間にわたり少なくとも毎月一回、Notchリガンド結合領域抗体で患者を処置する。いくつかの態様では、少なくとも約14週間にわたり少なくとも毎週一回、Notchリガンド結合領域抗体で患者を処置する。抗体の各投与は、薬学的に有効な用量であるべきである。いくつかの態様では、約2~約100mg/mlの抗Notchリガンド結合領域抗体を投与する。いくつかの態様では、

10

20

30

40

50

約5～約40mg/mlの抗Notchリガンド結合領域抗体を投与する。抗体を、標準放射線療法レジメン、あるいはオキサリプラチン、フルオロウラシル、ロイコボリンまたはストレプトゾシンなどの化学療法剤の一つまたは複数を用いる化学療法レジメンの前に、それと同時に、またはその後に投与することができる。患者をモニターして、そのような処置が抗腫瘍応答をもたらしたかどうかを、例えば、腫瘍の退縮、新しい腫瘍の発生率の低下、腫瘍抗原発現の低下、癌幹細胞数の減少、または疾患予後を評価する他の手段に基づいて決定する。

【 0 2 1 1 】

本発明の他の態様は、本明細書の考察および本明細書に開示された本発明の実施から、当業者に明白であろう。明細書および実施例は単に例示的なものとして考えられるべきであって、本発明の真の範囲および趣旨は、添付の特許請求の範囲によって明らかにされるものとする。本明細書で引用された全ての刊行物、特許、および特許出願は、その全文が参考により本開示に組み入れられる。10

【 0 2 1 2 】

SEQ ID NO: 1 (90R21 重鎖)

MKHLWFFLLLVAAPRWLSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGYGSNTY
YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARISQQAVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSEST
AALGCLVKDYFPEPVTWSNNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFQGTQTYTCNVVDHKPSNTKVDKTVER
KCCVECPAPPVAGPSVFLFPKPDKTLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST
FRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTPPMULDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 2 (90R21 重鎖 CDR1)

GFTFSNYGMS

SEQ ID NO: 3 (90R21 重鎖 CDR2)

SISGYGSNTYYADSVKG

10

SEQ ID NO: 4 (90R21 重鎖 CDR3)

ISQQAV

SEQ ID NO: 5 (90R21 輕鎖)

MAWALLLLTLLTQGTGSAQSAQTSQPVSGSPGQSITISCTGTSSDIGGYQYVSWYQQHPGKAPKLMYYVSNRPSG
VSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDADYYCQSADSSSVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLPFPPSSEELQANKATLVC
LISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

SEQ ID NO: 6 (90R21 輕鎖 CDR1)

TGTSSDIGGYQYVS

20

SEQ ID NO: 7 (90R21 輕鎖 CDR2)

YVSNRPSG

SEQ ID NO: 8 (90R21 輕鎖 CDR3)

QSADSSSW

SEQ ID NO: 9 (122R5 重鎖)

MKHLWFFLLLVAAPRWLSQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNAIHWVRQAPGKGLEWVSAISSYGSHTY
YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPGFQFSFTFMDIWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSR
STSESTAALGCLVKDYFPEPVTWSNNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFQGTQTYTCNVVDHKPSNTKV
DKTVERKCCVECPAPPVAGPSVFLFPKPDKTLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMULDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

30

SEQ ID NO: 10 (122R5 重鎖 CDR1)

GFTFSDNAIH

SEQ ID NO: 11 (122R5 重鎖 CDR2)

AISSYGSHTYYADSVKG

SEQ ID NO: 12 (122R5 重鎖 CDR3)

PGFQFSFTFMDI

SEQ ID NO: 13 (122R5 輕鎖)

MAWALLLLTLLTQGTGSAQDIETQPPSVVAPGQTARISCGDALGSKYASWYQQKPGQAPVLVIYDDKNRPSGIPE
RFSGNSGNTATLTISGTQAEDADYYCQSWDGKSKEVFGGTKLTVLGQPKAAPSVTLPFPPSSEELQANKATLVC
LISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

40

SEQ ID NO: 14 (122R5 輕鎖 CDR1)

SGDALGSKYAS

SEQ ID NO: 15 (122R5 軽鎖 CDR2)

DDKNRPSG

SEQ ID NO: 16 (122R5 軽鎖 CDR3)

QSWDGKSKV

SEQ ID NO: 17 (90R21 重鎖 DNA)

ATGAAGCCTCTGGTTTCCCTGCTGCCGCTCCACGGTGGGTGCTGCTGAAGTCCAGCTGCTCGAGAGC
GGAGGAGGGCTCGTCAGCCCCGGAGGGAGCCTCAGACTGCTTGCGCCGCTCTGGATTCACTTTCAAACATATGGG
ATGAGCTGGTTAGACAGGCTCCTGGCAAGGGCCTCGAGTGGTTAGTAGTATCAGCGGATATGGTAGCAACACTTAT
TACGCAGATTCTGTGAAGGGCGGTTTACCATCAGTAGGGATAACAGCAAGAACACCCTTATCTGCAAATGAATTCA
CTGAGAGCCGAGGATAACGCCGTTACTATTGCGCCCGATCTCCAGCAGGCCGTCTGGGGCAGGGCACCCCTCGT
ACAGTCAGCTCA

10

SEQ ID NO: 18 (90R21 軽鎖 DNA)

ATGGCCTGGCTCTGCTCCTCACCCTCCACTCAGGGCACAGGATCCTGGCTCAGTCTGCCCTCACCCAGCCT
GCTTCCCGTGTCAAGGTTCCCTGGCCAGTCATAACCAATTCTGCACCGGGACATCATCCGATATTGGAGGATACCA
TACGTGAGTTGGTACCAAGCAACACCCCGTAAGGCCAAAACCTCATGATCTACTACGTGCCAATAGACCTTCAGGA
GTTTCTAATCGCTTAGCGGGAGCAAGAGTGGCAACACCGCATCACTCACTATTAGGACTCCAGGCAGAGGACGAA
GCAGATTATTACTGTCAGAGCGCCACAGTTCTGGTGGTGGACTAAGTTA

20

SEQ ID NO: 19 (122R5 重鎖 DNA)

ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCAGATGGTCCTGCGAAGTGAATTGGTGGAAAGC
GGCGCGGCCCTGGTGCACCGGGCGGCAGCCTCGCTGAGCTGCGCCGCTCCGGATTACCTCTCTGATAATGCT
ATTCAATTGGTGCACCGCCAGGCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGTGAGCGTATCTCTTATGGTAGCGGTACCTAT
TATCGGGATAGCGTGAAGGCCGTTTACCATTTACGTGATAATTGAAAAACACCCTGTATCTGCAAATGAACAGC
CTGCGTGCAGAAGATAACGCCGTGTATTATTGCGCGCTGGTTTCAGTTTCTTTACTTTATGGATATTGG
GCCAAGGCACCCCTGGTACGGTTAGCTCA

SEQ ID NO: 20 (122R5 軽鎖 DNA)

ATGGCCTGGCTCTGCTCCTCACCCTCCACTCAGGGCACAGGATCCTGGCTGATATGAACTGACCCAGCCG
CCTTCAGTGAGCGTTGCACCGGGTCAAGCCGCGTATCTCGTGTAGCGCGATGCTCTGGTTCAAGTATGCTCT
TGGTACCGAGAAACCCGGCAGGCAGGCGCAGTTCTGTGATTTATGATGATAAGAATCGCCCTCAGGCATCCGGAA
CGCTTGTGGATCCAACAGCGGCAACACCGCGACCCCTGACCAATTAGCGGCACCTCAGGCAGAAGACGAAGCGGATTAT
TATTGCCAGTCTGGGATGGTAAGTCTAAGGTTGTGTTGGCGCGGCACGAAGTTA

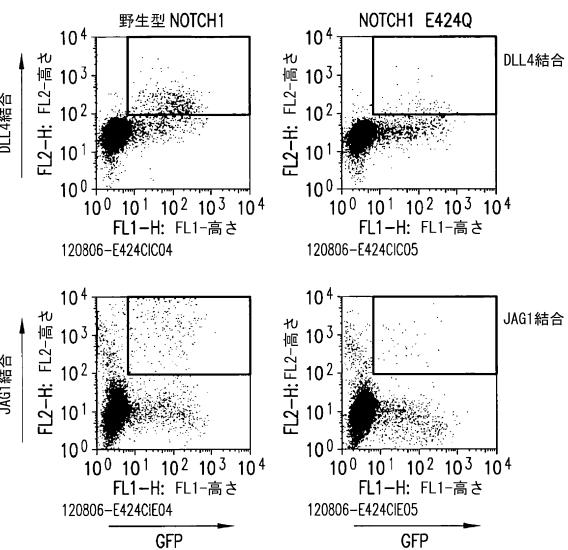
【図1】

Notch1受容体のEGFリピートおよび他のNotchタンパク質由来の選択されたEGFリピートのアライメント

SEQ ID No. 29	hN1-EGF1	1 - -RCSPCG- - -ET-DLNGK- - -PEAAN-GTE - -AGVCGGARYP- GPRCE-
SEQ ID No. 30	hN1-EGF2	1 - -DPNPGC- - -SIPCKVAGTCHVVRDRR-GVADYAVSACALERS- GPLGLLT
SEQ ID No. 31	hN1-EGF3	1 - -PLDNACL- - -TIPPNNGGT- - -COLLT-LTE-MKRNPPPS- GKSQQ
SEQ ID No. 32	hN1-EGF4	1 - -ADPCA- - -SIPDANGCQ- C - -LP-FEASVICH-OPSPS- GPTQRQ
SEQ ID No. 33	hN1-EGF5	1 - -DVNECG- - -QXPGLDR-GGT- - -CINE- - -VSEVROVORATHI- GPNCE-
SEQ ID No. 34	hN1-EGF6	1 - -RPYVPGS- - -PSPDONGT- - -CRPTG-D-VTHEAQLPCT- GCONCE
SEQ ID No. 35	hN1-EGF7	1 - -ENTIDDCPN- - -OKNGA- CVDG- - -VNTWVCRPPENI- GYCT-
SEQ ID No. 36	hN1-EGF8	1 - -EDVDEQL- - -MPNAQNCGT- CINT- H- -HGVNCVQVNTI- GEODS
SEQ ID No. 37	hN1-EGF9	1 - -ENIDDC- - -AS- AACFCGAT- CHDR- - -VISPVCEPFPF- GLLOH
SEQ ID No. 38	hN1-EGF10	1 - -LNDACI- - -SIPONEGSN- - -CDTNP-VNGKAATCPSVYI- GPACS
SEQ ID No. 39	hN1-EGF11	1 - -QNDDEC- - -SLG-ANPC-FAK- CINT- - -LESPEECOOLP- GPRCE-
SEQ ID No. 40	hN2-EGF11	1 - -EDNDEC- - -AMANSNPCE-FAK- QVNT- - -DGAPPH-CEOLKGVA- GPRCE-
SEQ ID No. 41	hN3-EGF10	1 - -QNDDEC- - -SIG-ANPC-HLR- CINT- - -QGSPLCOCPGPVYI- GPRCE-
SEQ ID No. 42	hN4-EGF11	1 - -QDLECLM- - -AQQQPSPC- GBS- CLNT- - -PGSPNLUOPPSVYI- GSRC
SEQ ID No. 43	xh1-EGF11	1 - -QDVEEC- - -SLG-ANPC-FAK- CINT- - -LCSPPONCPDPSVYI- GPRCE
SEQ ID No. 44	d-h1-EGF12	1 - -DIDECA- - -DOG- SPCEHNL- CINT- - -PGSYRCNCSCSOFI- GPRCE-
SEQ ID No. 45	ce_h1-EGF9	1 - -DFH-CENDGT- CMHTS-DHSP- VCOOKNFIT- GKRCE
SEQ ID No. 46	hN1-EGF12	1 - -TINDEC- - -VS-NP-CONDAT- CLD- - -IGEPICDOPVPE- GVRCE
SEQ ID No. 47	hN1-EGF13	1 - -VNTQEC- - -AS- SPQCNH- CLD- - -INERQCEPCTST- GHLCQ
SEQ ID No. 48	hN1-EGF14	1 - -YDNECA- - -SIPCKNGAK- CUDG- - -PNTTIVCVCYESTYL- GTHCE
SEQ ID No. 49	hN1-EGF15	1 - -VOIDEC- - -DP- DPCNG- IS- CUDG- - -VATPTCILCPSPVYI- GHHC
SEQ ID No. 50	hN1-EGF16	1 - -TNINEC- - -SOP- CR- CGT- CUDR- - -HGYCFCQASVYI- GSNC
SEQ ID No. 51	hN1-EGF17	1 - -INLDCC- - -AS- SPC- DSgt- CLD- - -IDGYVCAECPVYI- GSNC
SEQ ID No. 52	hN1-EGF18	1 - -INIDEC- - -AG- ANPC-NGT- CEDG- - -INGPTCOPPEPVYI- DPTEL
SEQ ID No. 53	hN1-EGF19	1 - -SEMECN- - -SIPCVG- A- CROS- LNSG-YCOCOPPSVYI- GTNC
SEQ ID No. 54	hN1-EGF20	1 - -INNNEC- - -SIPCVNGT- CKDM- - -TSG-YVTCIRE-PSVYI- GPNC
SEQ ID No. 55	hN1-EGF21	1 - -TNINCA- - -SIPNQNGT- CDDG- - -VAGY- DYESPSCVCPG- QOCTCE
SEQ ID No. 56	hN1-EGF22	1 - -VVLAPCA- - -SPSCNG- IS- CROSE- DYESPSCVCPG- QOCTCE
SEQ ID No. 57	hN1-EGF23	1 - -VDTNEV- - -LSP- CR- GAS- CONT- - -HGYCFCQASVYI- GRNCE
SEQ ID No. 58	hN1-EGF24	1 - -TOIDCC- - -RP- NPNCNGS- CTDC- - -INTAAQDLPSPFR- CTFC
SEQ ID No. 59	hN1-EGF25	1 - -EDINECA- - -SDP- CRNGAN- CTDC- - -VDSMTCTOPA- PSF- GHCE
SEQ ID No. 60	hN1-EGF26	1 - -NNTPDCTESS- - -CHNGT- CVDG- - -INSPIOLUPP- PFI- GSYCQ
SEQ ID No. 61	hN1-EGF27	1 - -HDVNECO- - -SOP- CL- CGGT- CDDG- - -CGSYRCITCPG- SYI- GPNC
SEQ ID No. 62	hN1-EGF28	1 - -NLVH- KCD- - -SSPKCNGK- CATH- T- -QYRCCEPPS- QI- GLYCD
SEQ ID No. 63	hN1-EGF29	1 - -VPSVSEVA- AQRQGV- DVARL- C- GL- CVOA- - -GNTHR- CDOA- SYI- GSYCE
SEQ ID No. 64	hN1-EGF30	1 - -DLVDECS- - -PSP- CONGAT- CTDY- - -LOGYSCKV- VAYI- GVNS
SEQ ID No. 65	hN1-EGF31	1 - -EEIDEC- - -SIP- CONGNT- CUDL- - -PNTYKQSPPRETO- GH- CE
SEQ ID No. 66	hN1-EGF32	1 - -INVDDCNPV- D- - -PVSRSPKCF- HNGT- CVDG- - -VGGSYCTCP- P- BV- GRCCE
SEQ ID No. 67	hN1-EGF33	1 - -GDVNECL- - -SNPODARTQ- TQVOR- - -VNDPH- DECR- G- T- GRCE
SEQ ID No. 68	hN1-EGF34	1 - -SVLNGK- - -GPK- CNGT- CAVAS- TAR- BICK- CP- GAF- E- GATCE
SEQ ID No. 69	hN1-EGF35	1 - -NDART- CG- - -SLR- CNGT- CTSGP- RSP- - -TOLQGFT- GPEC
SEQ ID No. 70	hN1-EGF36	1 - -FPASSPLCLG- - -GPK- CNGT- CEP- TS- ESPFTR- CLOPAKEN- GLC

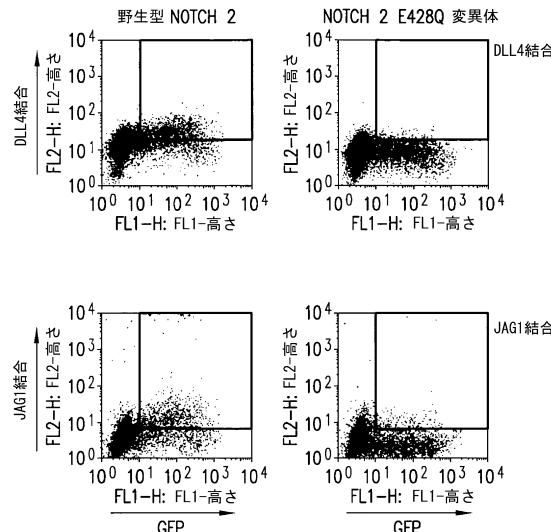
【図2】

Notch1受容体グルタミン酸424のグルタミンへの突然変異誘発はリガンド結合を著しく低減する



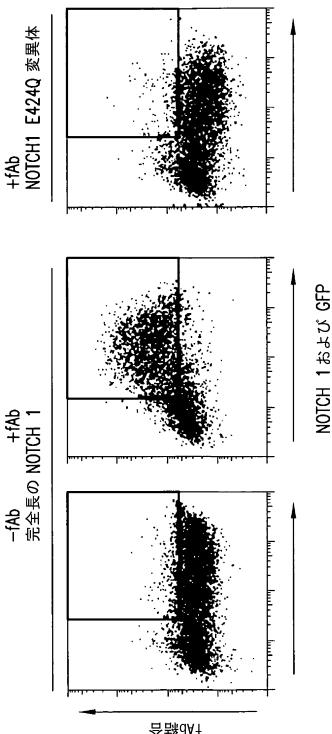
【図3】

Notch2受容体グルタミン酸428のグルタミンへの突然変異誘発はリガンド結合を著しく低減する



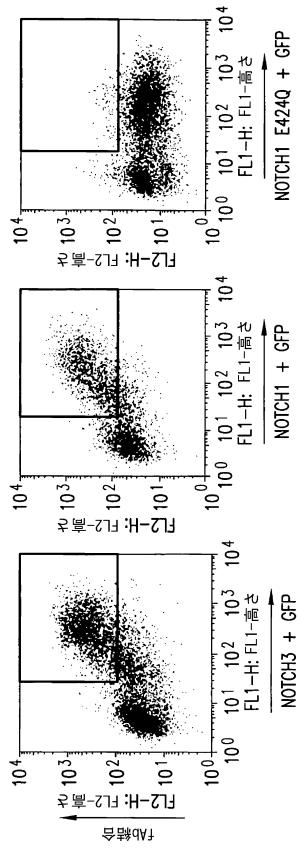
【図4】

Notch1の重要なリガンド結合ドメインを結合するfAbの同定



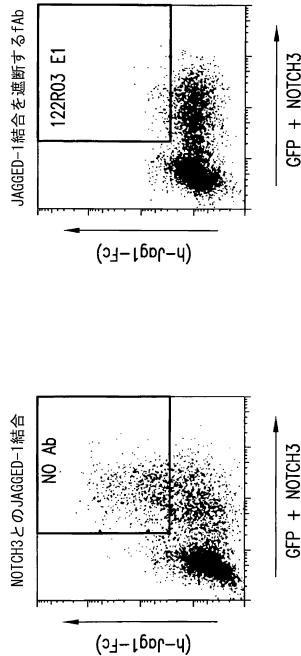
【図5】

複数のNotch受容体のリガンド結合領域を結合する抗体の同定



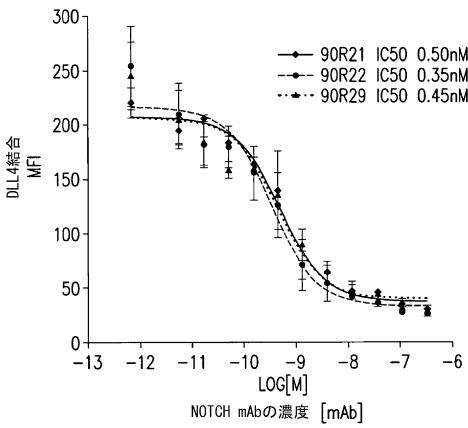
【図7】

Notch3のリガンド結合ドメインを結合しかつNotchリガンドの結合を強力に遮断するFabの同定



【図6】

Notch1のリガンド結合ドメインを結合する親和性成熟mAbはNotch1とのDLL4の結合を阻害する



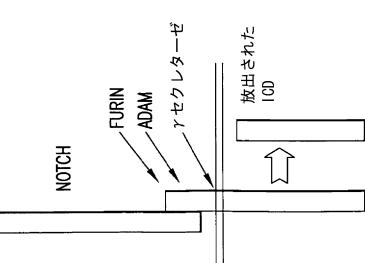
【図8】

Notchリガンド結合ドメインに対するモノクローナル抗体はNotchシグナル伝達を阻害する

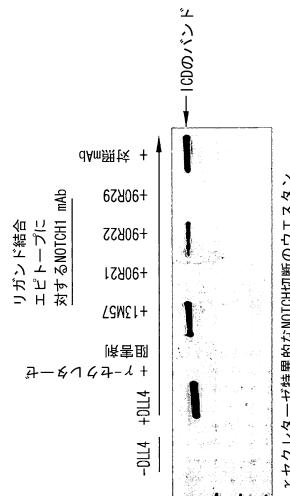
Notchリガンド結合ドメインに対するモノクローナル抗体はNotchシグナル伝達を阻害する
リガンド結合エピトープに対するNOTCH mAbは基準的なNOTCHシグナル伝達を阻害する

Notchリガンド結合ドメインに対するモノクローナル抗体はNotchシグナル伝達を阻害する

DLL4 (NOTCHリガンド)の結合はNOTCHのプロセッシングおよび細胞内ドメインの放出をもたらす



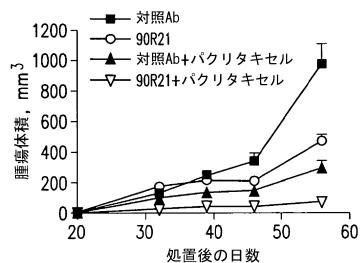
A



B

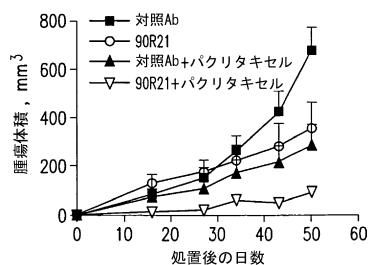
【図9】

NOTCHリガンド結合ドメインに対する
モノクローナル抗体はインビボで
腫瘍増殖を阻害する



A

NOTCHリガンド結合ドメインに対する
モノクローナル抗体はインビボで
腫瘍増殖を阻害する



B

【配列表】

0005618544000001.app

 フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00

(74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100130845
弁理士 渡邊 伸一

(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥

(72)発明者 ガーニー オースティン
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サンフランシスコ ダイヤモンド ストリート 496

(72)発明者 サトウ アーロン
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 バーリングゲーム アルベマール ウェイ 1636

(72)発明者 フィットブルーンズ モーリーン
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サンマテオ 第42 アベニュー 632

審査官 鳥居 敬司

(56)参考文献 特表平08-502170 (JP, A)
特表2002-526109 (JP, A)
The American Journal of Human Genetics, 2006年, Vol.79, pp.169-173
Oncogene, 2003年, Vol.22, pp.6598-6608

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 12 N 15 / 00 - 15 / 90
C 07 K 16 / 00 - 16 / 46
MEDLINE / BIOSIS / EMBASE / WPIDS / WPIX / Capulus (STN)
JSTPLus / JMEDPLus / JST7580 (JDreamIII)
GenBank / EMBL / DDBJ / GeneSeq
UniProt / GeneSeq