

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5560271号
(P5560271)

(45) 発行日 平成26年7月23日(2014.7.23)

(24) 登録日 平成26年6月13日(2014.6.13)

(51) Int. Cl.		F I	
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C O 7 K	16/28	(2006.01)	C O 7 K 16/28
C O 7 K	16/46	(2006.01)	C O 7 K 16/46
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N 1/15
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N 1/19

請求項の数 20 (全 72 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2011-517417 (P2011-517417)	(73) 特許権者	308031072
(86) (22) 出願日	平成21年7月8日(2009.7.8)		オンコメッド ファーマシューティカルズ
(65) 公表番号	特表2012-501626 (P2012-501626A)		インコーポレイテッド
(43) 公表日	平成24年1月26日(2012.1.26)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 レッ
(86) 国際出願番号	PCT/US2009/003995		ドウッドシティー チェサピーク ドライ
(87) 国際公開番号	W02010/005567		ブ 800
(87) 国際公開日	平成22年1月14日(2010.1.14)	(74) 代理人	100102978
審査請求日	平成24年7月6日(2012.7.6)		弁理士 清水 初志
(31) 優先権主張番号	61/112,699	(74) 代理人	100102118
(32) 優先日	平成20年11月7日(2008.11.7)		弁理士 春名 雅夫
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100160923
(31) 優先権主張番号	61/112,701		弁理士 山口 裕孝
(32) 優先日	平成20年11月7日(2008.11.7)	(74) 代理人	100119507
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 Notch1受容体結合剤およびその使用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヒトNotch1受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合性の膜近位領域に特異的に結合する単離された抗体であって、

(a) RGYWIE (SEQ ID NO:15)を含んだ重鎖CDR1、
QILPGTGRNTNYNEKFKG (SEQ ID NO:16)

を含んだ重鎖CDR2、およびFDGNYGYAMDY (SEQ ID NO:17)を含んだ重鎖CDR3; ならびに

(b) RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:18)を含んだ軽鎖CDR1、GTNNRAP (SEQ ID NO:19)を含んだ軽鎖CDR2、および

ALWYSNHVWVFGGGTKL (SEQ ID NO:20)

を含んだ軽鎖CDR3を含む、抗体。

【請求項2】

(i) Notch1のアンタゴニストであり;

(ii) Notch1の活性化を阻害し;

(iii) 膜近位領域内の切断を阻害し、かつ/または

(iv) Notch1の細胞内ドメイン(ICD)の放出を阻害する、

請求項1記載の抗体。

【請求項3】

Notch1受容体の非リガンド結合性の膜近位領域がSEQ ID NO:2を含む、請求項1または2記載の抗体。

【請求項 4】

(a) SEQ ID NO:24もしくはSEQ ID NO:14に対して少なくとも90%の配列同一性を有する重鎖可変領域; および

(b) SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:32もしくはSEQ ID NO:8に対して少なくとも90%の配列同一性を有する軽鎖可変領域を含む、請求項1~3のいずれか一項記載の抗体。

【請求項 5】

(a) SEQ ID NO:24を含む重鎖可変領域; および

(b) SEQ ID NO:28を含む軽鎖可変領域を含む、請求項4記載の抗体。

【請求項 6】

ATCC特許寄託指定番号PTA-9549として寄託されているプラスミドによりコードされるポリペプチドと同じ重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む単離された抗体。

【請求項 7】

モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、抗体断片、二重特異性抗体、単一特異性抗体、一価抗体、IgG1抗体、またはIgG2抗体である、請求項1~6のいずれか一項記載の抗体。

【請求項 8】

ATCC特許寄託指定番号PTA-9405として寄託されているハイブリドーマ細胞株により産生される抗体。

【請求項 9】

請求項8記載の抗体と同じCDRを含む、ヒト化抗体。

【請求項 10】

ヒトNotch1の細胞外ドメインの非リガンド結合性の膜近位領域への特異的な結合について請求項1~9のいずれか一項記載の抗体と競合する、単離された抗体。

【請求項 11】

請求項1~10のいずれか一項記載の抗体をコードするヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 12】

請求項11記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 13】

(a) 請求項1~10のいずれか一項記載の抗体を含むもしくは産生する;
 (b) 請求項11記載のポリヌクレオチドを含む; または
 (c) 請求項12記載のベクターを含む、
 細胞。

【請求項 14】

請求項1~10のいずれか一項記載の抗体またはポリペプチドを含む薬学的組成物。

【請求項 15】

がんを処置するための医薬の製造における、請求項1~10のいずれか一項記載の抗体の使用。

【請求項 16】

がんが、膵臓がん、乳房がん、肺がんまたは黒色腫である、請求項15記載の抗体の使用。

【請求項 17】

がんの処置が、抗体および第二の治療剤の投与を含む、請求項15または16記載の抗体の使用。

【請求項 18】

第二の治療剤が化学療法剤または第二の抗体である、請求項17記載の抗体の使用。

【請求項 19】

腫瘍の成長を阻害するための医薬の製造における、請求項1~10のいずれか一項記載の抗体の使用。

10

20

30

40

50

【請求項20】

腫瘍が、脾臓腫瘍、乳房腫瘍、肺腫瘍または黒色腫である、請求項19記載の抗体の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、ヒトNotch受容体に結合する薬剤を含む組成物ならびにがんおよび他の疾患を特徴付けるため、診断するため、および処置するために該組成物を使用する方法に関する。具体的には、本発明は、ヒトNotch1受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合性の膜近位領域に特異的に結合しかつ腫瘍成長を阻害する抗体を提供する。本発明はさらに、がんを処置する方法であって、ヒトNotch1受容体タンパク質の細胞外ドメインの非リガンド結合性の膜近位領域に特異的に結合しかつ腫瘍成長を阻害する抗体の治療的有効量を投与する段階を含む該方法を提供する。

10

【背景技術】

【0002】

背景

がんは、先進国世界における死亡の主因の一つであり、米国単独で1年あたり50万人を超える死を招いている。毎年米国では100万人超ががんを有すると診断され、全体として3人に1人超が一生の間に何らかの形のがんを発生すると推定されている。がんには200を超える種類があるが、その四つ、すなわち乳がん、肺がん、結腸直腸がん、および前立腺がんが、全ての新しい症例の半分超を占める(Jemal et al., 2003, Cancer J. Clin. 53:5-26)。

20

【0003】

がんは、正常な組織の発生および維持を制御するメカニズムの調節不全から生じ、幹細胞が中心的な役割を果たすとますます考えられている(Beachy et al., 2004, Nature 432:324)。正常な動物の発生の中に、大部分または全ての組織の細胞は、幹細胞と呼ばれる正常な前駆細胞から派生する(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) 大規模な増殖能を有し；(2) 非対称細胞分裂を行って、低下した増殖能および/または発生能を有する一つまたは複数種類の子孫を発生することができ；かつ(3) 自己複製または自己保全のために対称細胞分裂を行うことができる細胞である。幹細胞の分化による成体細胞複製の最もよく知られている例は、発生的に未熟な前駆細胞(造血幹細胞および造血前駆細胞)が分子シグナルにตอบสนองしてさまざまな血液細胞型およびリンパ球型を形成する造血系である。腸、乳管系、および皮膚の細胞を含めたその他の細胞は、各組織中の幹細胞の小集団から絶えず補充され、最近の研究では、脳を含む大部分の他の成体組織もまた幹細胞を内部に有することが示唆されている。

30

【0004】

充実性腫瘍は、不均一な細胞集団から構成される。例えば乳がんは、がん細胞と、間葉(間質)細胞、炎症細胞、および内皮細胞を含めた正常細胞との混合物である。がんの古典的モデルは、表現型が別個のがん細胞集団の全てが増殖して新しい腫瘍を生む能力を有すると考えている。古典的モデルでは、腫瘍細胞の不均一性は、環境因子と、多様な集団の腫瘍形成性細胞を生じる、がん細胞内で進行中の突然変異とが原因である。このモデルは、全ての腫瘍細胞集団がある程度の腫瘍形成能力を有するであろうという考えに基づく(Pandis et al., 1998, Genes, Chromosomes & Cancer 12:122-129; Kuukasjrvi 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)。

40

【0005】

50

観察された充実性腫瘍細胞の不均一性の代替モデルは、充実性腫瘍が「充実性腫瘍幹細胞」(または充実性腫瘍由来「がん幹細胞」)が原因であり、その細胞が続いて対称および非対称の両方の細胞分裂の繰り返しにより無秩序な発生を受けるというものである。この幹細胞モデルでは、充実性腫瘍は、独特で限定された(まれな可能性さえある)サブセットの細胞を有し、そのサブセットは、大規模に増殖し、追加の充実性腫瘍幹細胞(自己複製)と、充実性腫瘍内で腫瘍形成能力を欠如した大多数の腫瘍細胞との両方を効率的に生じる点で、普通の「幹細胞」の性質を共有する。実際に、長期生存幹細胞集団の中の突然変異は、がん幹細胞の形成を開始するおそれがあり、がん幹細胞は、腫瘍の成長および維持の基礎となり、その存在は現在の治療アプローチが失敗する一因となる。

【0006】

10

がんの幹細胞的性質は、血液がんである急性骨髄性白血病(AML)で最初に明らかにされた(Lapidot et al., 1994, Nature 367:645-8)。さらに最近では、悪性ヒト乳房腫瘍が、免疫不全マウスに腫瘍を形成する能力が強化された、がん幹細胞の小さな別個の集団を同様に内部に有することが実証された。ESA+、CD44+、CD24-/低、Lin-細胞集団は、未分化腫瘍細胞と比べて腫瘍形成性細胞が50倍濃縮されていることが見出された(Al-Hajj et al., 2003, PNAS 100:3983-8)。腫瘍形成がん細胞を将来的に単離できることは、これらの細胞における腫瘍形成性の根底にある重大な生物学的経路の研究を可能にし、したがって、がん患者のためのよりよい診断アッセイおよび治療法の開発を期待させる。本発明が向けられるのは、この目的である。

【0007】

20

正常幹細胞およびがん幹細胞は、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調節するいくつかの遺伝子が腫瘍形成に寄与することは驚くことではない(Reya et al., 2001, Nature 414:105-111およびTaipale & Beachy, 2001, Nature 411:349-354に概説されている)。本発明はNotch、例えば、Notch1を、がん幹細胞の維持におけるNotchシグナル伝達経路を示す、がん幹細胞のマーカーと、およびこれらの腫瘍形成性細胞の除去を介してがんを処置するための標的と特定する。

【0008】

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、隣接細胞の運命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がんに関連しており、それらでは腫瘍細胞の発生的運命を変化させて、それらの細胞を未分化の増殖状態に維持しうる(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、発がんは進行しうる(Beachy et al., 2004, Nature 432:324)。

【0009】

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、ハプロ不全によっては翅末端にV字の切り込みが起こるが、機能喪失によっては、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(Moohr, 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のなかに多数の上皮成長因子(EGF)様タンデム反復配列およびシステインリッチなNotch/LIN-12反復配列(LNR)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)。LNRおよび細胞外ドメインのおよそ103アミノ酸のさらなるC末端尾部は、本明細書において「膜近位領域」といわれる。この領域はNotch陰性調節領域(NRR)としても知られ、Notch陰性調節領域(NRR)といわれる。

【0010】

哺乳動物Notch受容体は切断を受けて成熟受容体を形成し、かつその後のリガンド結合を受けて下流のシグナル伝達を活性化する。furin様プロテアーゼは成熟中にNotch受容体

50

前駆体を切断して、非共有結合により結合した細胞外サブユニットおよび自己阻害の状態
 で結び付いた膜貫通サブユニットを含む膜近傍のヘテロ二量体を生ずる。リガンド結合は
 この阻害を解放し、ADAM型メタロプロテアーゼおよびガンマセクレターゼによるNotch受
 容体の切断を誘導し、この後者によって細胞内ドメイン(ICD)が細胞質へ放出され、それ
 を核内へ移動させて、遺伝子転写を活性化する。ADAMによる切断は膜近傍の陰性調節領域
 (NRR)内の非リガンド結合切断ドメインのなかで行われる(図1A参照)。Notch1受容体にお
 いては、この領域は大体アミノ酸番号1427から大体アミノ酸番号1732までを包含する。

【 0 0 1 1 】

四つの哺乳動物Notchタンパク質が同定されており(Notch1、Notch2、Notch3、およびNo
 tch4)、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がんを含
 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-Lasserre, 1998, Semin. Cell Dev. Biol. 9:619-25)。

【 0 0 1 2 】

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。哺乳動物では公知のNotchリガンドが5種存在している: 細胞外ドメイン
 内のDSLドメインおよびタンデムEGF様反復配列によって特徴付けられるデルタ様1 (DLL1)
 、デルタ様3 (DLL3)、デルタ様4 (DLL4)、Jagged 1およびJagged 2。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 (A Disintegrin And Metallopeptidase
 ; ディスインテグリンおよびメタロペプチダーゼ)プロテアーゼによって媒介される細胞
 外切断1回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1回を
 引き起こす。この後者の切断によってNotch細胞内ドメイン(ICD)が生じ、これが核に入り
 、そこで主要な下流エフェクタとして転写因子の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; Is
 o 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動物において存
 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 1 3 】

造血幹細胞(HSC)は、最もよく理解されている体内の幹細胞であり、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空隙に存在する稀
 有な細胞集団である。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系全体を再構成する能力の両方によって特徴付
 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は、インピト
 ロにおいておよび長期再構築アッセイにおいてリンパ性細胞も骨髄性細胞もともに生ずる
 不死化細胞株を樹立し(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ピボの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シグナル伝達はWntを介した
 HSCの自己複製に必要であるように思われる(Duncan et al., 2005, Nat. Immunol. 6:314
)。

【 0 0 1 4 】

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. Re
 s. 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動物神経系において全てのニュー

10

20

30

40

50

ーロンおよびグリア細胞をもたらす、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低下する(Nakamura et al., 2000, *J. Neurosci.* 20:283-93; Hitoshi et al., 2002, *Genes Dev.* 16:846-58)。神経幹細胞の低下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複製を調節することを示唆している。

【 0 0 1 5 】

異常なNotchシグナル伝達はいくつかのヒトがんに関与している。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)。マウスモデルにおいて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ることからも、原因としての役割が示唆される(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)。

【 0 0 1 6 】

乳腺腫瘍においてNotch1およびNotch4の両遺伝子座にマウス乳がんウイルスが頻繁に挿入されており、その結果として活性化されたNotchタンパク質断片がNotchシグナル伝達を乳がん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、ヒト乳がんにおけるNotchの役割に関するエビデンスは、乳がんにおける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がん(Zagouras et al., 1995, *PNAS* 92:6414-8)、腎細胞がん(Rae et al., 2000, *Int. J. Cancer* 88:726-32)、頭頸部扁平上皮がん(Leethanakul et al., 2000, *Oncogene* 19:3220-4)、子宮内膜がん(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唆している。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与している可能性がある(van Es & Clevers, 2005, *Trends Mol. Med.* 11:496-502)。

【 0 0 1 7 】

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、Notch1/4およびJagged1でのホモ接合性のヌル突然変異ならびにDLL4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、DLL1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*, 101:15949-54; 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., 20

10

20

30

40

50

01, 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 1 8 】

Notch1、Notch4、DLL1およびDLL4が正常乳房上皮と比べがん幹細胞において発現される遺伝子であるとの特定から、非腫瘍形成性がん細胞の大部分だけでなく、充実性腫瘍の形成および再発に関与する腫瘍形成性細胞も取り除くためにNotch経路を標的とすることが役立つものと示唆される。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経路を標的化することで、血管形成を効果的に阻害し、がんから栄養素を奪い、その除去に寄与することもできる。

10

【 0 0 1 9 】

抗Notch抗体および抗がん治療薬としてのその使用の可能性が報告されている。例えば、米国特許出願公開第2008/0131434号および同第2009/0081238号を参照されたく、これらはそれぞれその全体が参照により本明細書に組み入れられる。同様に、国際公開番号WO 2008/057144、WO 2008/076960およびWO 2008/50525を参照されたい。

【 発明の概要 】

【 0 0 2 0 】

発明の簡単な概要

本発明は、Notch1受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合性の膜近位領域に特異的に結合する薬剤、およびそれらの薬剤を含む、薬学的組成物のような、組成物を提供する。本発明はさらに、これらの薬剤でがん幹細胞を標的化する方法を提供する。いくつかの態様において、該方法は、腫瘍中のがん幹細胞の頻度を低下させる段階、腫瘍中のがん幹細胞の数を低下させる段階、腫瘍の腫瘍形成性を低下させる段階、および/または腫瘍中のがん幹細胞の数もしくは頻度を低下させることにより腫瘍の腫瘍形成性を低下させる段階を含む。本発明はまた、がんの処置においておよび/または腫瘍成長の阻害において該薬剤を使用する方法を提供する。

20

【 0 0 2 1 】

一つの局面において、本発明は、Notch1受容体(例えば、ヒトNotch1)の細胞外ドメインの非リガンド結合性の膜近位領域に特異的に結合する抗体を提供する。いくつかの態様において、Notch1受容体の非リガンド結合性の膜近位領域は、ヒトNotch1受容体の大体アミノ酸1427番目から大体アミノ酸1732番目までを含む。いくつかの態様において、Notch1受容体の膜近位領域はSEQ ID NO:2を含む。ある種の態様において、抗体は、少なくとも一つのさらなるNotch受容体ファミリーメンバーの、細胞外ドメインの非リガンド結合性の膜近位領域に特異的に結合する。

30

【 0 0 2 2 】

いくつかの態様において、抗体はNotch1のアンタゴニストである。いくつかの態様において、抗体はNotch1受容体によるシグナル伝達またはNotch1受容体の活性化を阻害する。いくつかの態様において、抗体はNotch1活性を阻害する。いくつかの態様において、抗体は膜近位領域内の切断を阻害する。ある種の態様において、抗体はNotch1受容体の切断(例えば、メタロプロテアーゼによるS2部位での切断)を阻害し、および/またはリガンド結合によるNotch1受容体の活性化を阻害する。いくつかの態様において、抗体はNotch1の細胞内ドメイン(ICD)の放出または形成を阻害する。ある種の態様において、抗体は腫瘍成長を阻害する。

40

【 0 0 2 3 】

ある種の態様において、本発明は、ヒトNotch1の細胞外ドメインの非リガンド結合性の膜近位領域に結合しかつRGYWIE (SEQ ID NO:15)を含んだ重鎖CDR1、QILPGTGRNTYNEKFKG (SEQ ID NO:16)を含んだ重鎖CDR2、および/またはFDGNYGYAMDY (SEQ ID NO:17)を含んだ重鎖CDR3; ならびに/あるいは(b) RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:18)を含んだ軽鎖CDR1、GTNNRAP (SEQ ID

50

NO:19)を含んだ軽鎖CDR2、および/または
ALWYSNHWWFGGGTKL (SEQ ID NO:20)

を含んだ軽鎖CDR3を含む抗体を提供する。いくつかの態様において、抗体は(a) RGYWIE (SEQ ID NO:15)を含んだ重鎖CDR1、または1、2、3もしくは4個のアミノ酸置換を含んだその変種; (b)

QILPGTGRTNYNEKFKG (SEQ ID NO:16)

を含んだ重鎖CDR2、または1、2、3もしくは4個のアミノ酸置換を含んだその変種; および/あるいは(c) FDGNYGYAMDY (SEQ ID NO:17)を含んだ重鎖CDR3、または1、2、3もしくは4個のアミノ酸置換を含んだその変種を含む重鎖可変領域を含む。ある種の他の態様において、抗体は(a) RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:18)を含んだ軽鎖CDR1、または1、2、3もしくは4個のアミノ酸置換を含んだその変種; (b) GTNNRAP (SEQ ID NO:19)を含んだ軽鎖CDR2、または1、2、3もしくは4個のアミノ酸置換を含んだその変種; および/あるいは(c)

ALWYSNHWWFGGGTKL (SEQ ID NO:20)

を含んだ軽鎖CDR3、または1、2、3もしくは4個のアミノ酸置換を含んだその変種を含む軽鎖可変領域を含む(またはさらに含む)。いくつかの態様において、アミノ酸置換は保存的アミノ酸置換である。

【 0 0 2 4 】

いくつかの態様において、本発明は、ブダペスト条約の条件の下、2008年8月7日付でアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA, USAに寄託され、指定番号PTA-9405を割り当てられたハイブリドーマ細胞株により産生される抗体52M51を提供する。いくつかの態様において、本発明は、ブダペスト条約の条件の下、2008年10月15日付でATCCに寄託され、指定番号PTA-9549を割り当てられたDNAによってコードされる、抗体52M51のヒト化型52M51 H4L3を提供する。いくつかの態様において、本発明は、抗体52M51が結合するエピトープと同じエピトープに結合する抗体を提供する。

【 0 0 2 5 】

別の局面において、本発明は、ヒトNotch1の細胞外ドメインの非リガンド結合性の膜近位領域に特異的に結合する抗体を提供し、この抗体は、ブダペスト条約の条件の下、2008年10月15日付でATCCに寄託され、指定番号PTA-9548を割り当てられたDNAによってコードされる抗体「52R43」を含むか、それからなるか、またはそれから本質的になる。いくつかの態様において、本発明は、ヒトNotch1の細胞外ドメインの非リガンド結合性の膜近位領域への特異的な結合について52R43と競合する抗体を提供する。52R43を含む薬学的組成物、および52R43抗体の治療的有效量を投与する段階を含むがんを処置する方法も提供される。

【 0 0 2 6 】

ある種の態様において、本発明は、ヒトNotch1の細胞外ドメインの非リガンド結合性の膜近位領域への特異的な結合について、上記の態様および/または局面、ならびに本明細書中のほかの箇所に記述した他の局面/態様に記述の抗体のいずれかと(例えば、競合的結合アッセイにおいて)競合する抗体を提供する。本明細書において記述する抗体を含む薬学的組成物、および該抗体の治療的有效量を投与する段階を含むがんを処置する方法も提供される。

【 0 0 2 7 】

上記の局面または態様、ならびに本明細書中のほかの箇所に記述した他の局面および/または態様の各々のある種の態様において、抗体は組み換え抗体である。いくつかの態様において、抗体はモノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体またはヒト抗体である。ある種の態様において、抗体は抗体断片である。ある種の態様において、抗体または抗体断片は一価、単一特異性、二価、二重特異性、または多重特異性である。ある種の態様において、抗体は細胞傷害性部分に結合される。ある種の態様において、抗体は単離される。さらなる態様において、抗体は実質的に純粋である。

【 0 0 2 8 】

10

20

30

40

50

本明細書において記述する抗体を含む薬学的組成物、および本明細書において記述する抗体の治療的有効量を投与する段階を含むがんを処置する方法も提供される。ある種の態様において、薬学的組成物はさらに、薬学的に許容される担体を含む。

【0029】

別の局面において、本発明はポリペプチドを提供する。いくつかの態様において、ポリペプチドは抗体(例えば、Notch1に特異的に結合する抗体)、抗体の重鎖もしくは軽鎖、および/または抗体の断片である。いくつかの態様において、ポリペプチドは単離される。ある種の態様において、ポリペプチドは実質的に純粋である。いくつかの態様において、ポリペプチドはSEQ ID NO:8、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:28またはSEQ ID NO:32のアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、ポリペプチドはSEQ ID NO:14もしくはSEQ ID NO:24のアミノ酸配列および/またはSEQ ID NO:8、SEQ ID NO:28もしくはSEQ ID NO:32のアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、ポリペプチドはSEQ ID NO:14もしくはSEQ ID NO:24のアミノ酸配列の少なくとも一部分、および/またはSEQ ID NO:8、SEQ ID NO:28もしくはSEQ ID NO:32のアミノ酸配列の少なくとも一部分を含む。ポリペプチドを産生する細胞株と同様、ポリペプチドと薬学的に許容される媒体の両方を含む薬学的組成物がさらに提供される。

10

【0030】

いくつかの態様において、ポリペプチドは、(a) SEQ ID NO:14もしくはSEQ ID NO:24に対して少なくとも約80%の配列同一性を有するポリペプチド; および/または(b) SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:28もしくはSEQ ID NO:32に対して少なくとも約80%の配列同一性を有するポリペプチドを含む。ある種の態様において、ポリペプチドは抗体(例えば、ヒトNotch1の細胞外ドメインの非リガンド結合性の膜近位領域に特異的に結合する抗体)である。ある種の態様において、ポリペプチドは、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:28またはSEQ ID NO:32に対して少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%または約100%の配列同一性を有するポリペプチドを含む。ある種の態様において、ポリペプチドは、52M51抗体の重鎖可変領域および/または軽鎖可変領域を含む。いくつかの態様において、ポリペプチドは、ヒト化52M51抗体の重鎖可変領域および/または軽鎖可変領域を含む。いくつかの態様において、ポリペプチドは、抗体52R43の重鎖可変領域および/または軽鎖可変領域を含む。

20

【0031】

別の局面において、本発明は、上記の局面、および本明細書において記述の他の局面/態様の抗体および/またはポリペプチドのいずれかをコードするポリヌクレオチド分子を提供する。いくつかの態様において、発現ベクターはポリヌクレオチド分子を含む。他の態様において、宿主細胞は発現ベクターを含む。いくつかの態様において、宿主細胞はポリヌクレオチド分子を含む。いくつかの態様において、宿主細胞は細胞株またはハイブリドーマ細胞株である。ある種の態様において、ハイブリドーマ細胞株は52M51抗体またはヒト化52M51抗体を産生する。

30

【0032】

さらなる局面において、本発明は、上記の局面および態様、ならびに本明細書中のほかの箇所に記述した他の局面/態様に記述の抗体またはポリペプチドのいずれかの有効量と細胞を接触させる段階を含む、細胞におけるNotch1の活性を阻害する方法を提供する。ある種の態様において、細胞は腫瘍細胞である。

40

【0033】

別の局面において、本発明は、対象における腫瘍の成長を阻害する方法であって、上記の局面および態様、ならびに本明細書中のほかの箇所に記述した他の局面/態様に記述の抗体またはポリペプチドのいずれかの治療的有効量を対象に投与する段階を含む該方法を提供する。いくつかの態様において、腫瘍はがん幹細胞を含む。いくつかの態様において、該方法は抗体でがん幹細胞を標的化する段階を含む。ある種の態様において、該方法は、腫瘍中のがん幹細胞の頻度を低下させる段階、腫瘍中のがん幹細胞の数を低下させる段階、腫瘍の腫瘍形成性を低下させる段階、および/または腫瘍中のがん幹細胞の数もしくは

50

は頻度を低下させることにより腫瘍の腫瘍形成性を低下させる段階を含む。いくつかの態様において、該方法はNotch1受容体の活性を阻害する段階および/または腫瘍の成長を阻害する段階を含む。ある種の態様において、腫瘍は、乳房腫瘍、結腸直腸腫瘍、肝臓腫瘍、腎臓腫瘍、肺腫瘍、膵臓腫瘍、卵巣腫瘍、前立腺腫瘍および頭頸部腫瘍からなる群より選択される。

【0034】

別の局面において、本発明は、対象におけるがんを処置する方法を提供する。いくつかの態様において、該方法は、上記の局面および/または態様、ならびに本明細書中のほかの箇所に記述した他の局面/態様に記述の抗体またはポリペプチドのいずれかの治療的有効量を対象に投与する段階を含む。いくつかの態様において、処置されるがんは、乳房がん、結腸直腸がん、肝がん、腎臓がん、肝臓がん、肺がん、膵臓がん、消化器がん、黒色腫、卵巣がん、前立腺がん、子宮頸がん、膀胱がん、グリア芽腫、および頭頸部がんである。上記の局面または態様、ならびに本明細書中のほかの箇所に記述した他の局面および/または態様の各々のある種の態様において、がんを処置する方法は腫瘍成長を阻害する段階を含む。

10

【0035】

さらなる局面において、本発明は、対象における腫瘍の成長を阻害する方法であって、ヒトNotch1の細胞外ドメインの非リガンド結合性の膜近位領域に特異的に結合する抗体の治療的有効量を対象に投与する段階を含み、結合によりNotch1の活性を阻害する、該方法を提供する。

20

【0036】

さらなる局面において、本発明は、腫瘍中のがん幹細胞の頻度または数を低下させることによりがん幹細胞を含む腫瘍の腫瘍形成性を低下させる方法であって、Notch1の活性を阻害する抗体の有効量と腫瘍を接触させる段階を含む該方法を提供する。

【0037】

上記の局面および/または態様、ならびに本明細書において記述する他の局面または態様の各々のある種の態様において、該方法はさらに、少なくとも一つのさらなる抗がん剤および/または治療剤を対象に投与する段階を含む。上記の局面または態様、ならびに本明細書中のほかの箇所に記述した他の局面および/または態様の各々のある種の態様において、抗体またはポリペプチドはがんのためのさらなる処置と組み合わせて対象に投与される。ある種の態様において、がんのためのさらなる処置は放射線療法、化学療法、および/またはさらなる抗体治療薬を含む。ある種の態様において、化学療法はタキソール、イリノテカン、ゲムシタピンおよび/またはオキサリプラチンを含む。ある種の態様において、さらなる抗体治療薬は、第二のヒトNotch受容体(例えば、Notch2)またはヒトNotch受容体リガンド(例えば、DLL4またはJAG1)に特異的に結合する抗体である。ある種の態様において、さらなる抗体治療薬は、VEGFに特異的に結合する抗体である。ある種の態様において、処置される対象はヒトである。

30

【0038】

本発明はさらに、Notch1受容体の細胞外ドメインの膜近位領域に結合しかつNotch1受容体のリガンド活性化を遮断する抗体の治療的有効量をヒトに投与する段階を含む、がん幹細胞を含むがんががん幹細胞による一種または複数種のNotch受容体の過剰発現によって特徴付けられない、ヒトにおけるがんを処置する方法を提供する。

40

【0039】

本発明はさらに、(a) Notch1受容体に結合しかつNotch受容体を過剰発現するがん幹細胞の成長を阻害する第一の抗体、および(b) Notch受容体に結合しかつNotch受容体のリガンド活性化を遮断する第二の抗体の治療的有効量をヒトに投与する段階を含む、ヒトにおけるがんを処置する方法を提供する。

【0040】

本発明はまた、Notch1受容体のリガンド活性化を遮断する抗体の治療的有効量を投与する段階を含む、乳房がん、結腸がん、膵臓がん、前立腺がん、肺がん、直腸がんおよび結

50

腸直腸がんからなる群より選択される、がんを処置する別の方法を提供する。

【0041】

本発明はさらに、Notch1に結合しかつNotch1受容体のリガンド活性化を遮断するヒト化抗体；ヒト化抗体および薬学的に許容される担体を含む組成物；ならびに細胞傷害剤と結合されたヒト化抗体を含む免疫結合体を提供する。

【0042】

さらに、本発明は、ヒト化抗体をコードする単離されたポリヌクレオチド；核酸を含むベクター；核酸またはベクターを含む宿主細胞；ならびに核酸が発現されるように核酸を含んだ宿主細胞を培養する段階を含むおよび、任意で、宿主細胞培養物から(例えば、宿主細胞の培地から)ヒト化抗体を回収する段階をさらに含む、ヒト化抗体を産生する工程を提供する。

10

【0043】

本発明はさらに、一つまたは複数のカリケアマイシン分子に結合されたNotchに結合する抗体を含む免疫結合体、およびNotchを発現するがん、例えば、がん幹細胞がNotchを過剰発現するがんを処置するためのそのような結合体の使用に関する。

【0044】

本発明の治療用組成物、例えば、Notch1受容体の細胞外ドメインの膜近位領域に結合する抗体を用いて処置できる充実性腫瘍の例としては、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫、滑膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸がん、膵臓がん、乳房がん、卵巣がん、前立腺がん、扁平上皮がん、基底細胞がん、腺がん、汗腺がん、脂腺がん、乳頭がん、乳頭腺がん、嚢胞腺がん、髄様がん、気管支がん、腎細胞がん、肝細胞腫、胆管がん、絨毛がん、精上皮腫、胎生期がん、ウィルムス腫瘍、子宮頸がん、精巣腫瘍、肺がん、小細胞肺がん、膀胱がん、上皮がん、神経膠腫、星細胞腫、髄芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聴神経腫、乏突起膠腫、髄膜腫、黒色腫、神経芽細胞腫、および網膜芽腫のような肉腫およびがん腫が挙げられるが、これらに限定されることはない。

20

【0045】

本発明の局面または態様がマーカッシュ群または代替物に関するその他の群分けにより記述されている場合、本発明は、記載されている群全体をまとめて包含するだけでなく、個別に群の各要素も、主群のなかで可能なあらゆる下位群も包含し、群の要素の一つまたは複数を欠いた主群も包含する。本発明は、主張する発明における群の要素のいずれかの一つまたは複数の明示的な除外も想定する。

30

[本発明1001]

ヒトNotch1受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合性の膜近位領域に特異的に結合しかつ腫瘍成長を阻害する単離された抗体。

[本発明1002]

少なくとも一つのさらなるNotch受容体の、細胞外ドメインの非リガンド結合性の膜近位領域に特異的に結合する、本発明1001の抗体。

[本発明1003]

Notch1のアンタゴニストである、本発明1001または1002の抗体。

40

[本発明1004]

Notch1の活性化を阻害する、本発明1001～1003のいずれかの抗体。

[本発明1005]

膜近位領域内の切断を阻害する、本発明1001～1004のいずれかの抗体。

[本発明1006]

膜近位領域内のS2部位での切断を阻害する、本発明1001～1005のいずれかの抗体。

[本発明1007]

Notch1の細胞内ドメイン(ICD)の放出を阻害する、本発明1001～1006のいずれかの抗体

50

[本発明1008]IgA、IgD、IgE、IgGまたはIgM抗体である、本発明1001～1007のいずれかの抗体。[本発明1009]IgG1抗体である、本発明1001～1007のいずれかの抗体。[本発明1010]IgG2抗体である、本発明1001～1007のいずれかの抗体。[本発明1011]モノクローナル抗体である、本発明1001～1010のいずれかの抗体。[本発明1012]キメラ抗体である、本発明1001～1011のいずれかの抗体。

10

[本発明1013]ヒト化抗体である、本発明1001～1012のいずれかの抗体。[本発明1014]ヒト抗体である、本発明1001～1012のいずれかの抗体。[本発明1015]抗体断片である、本発明1001～1014のいずれかの抗体。[本発明1016]一価抗体である、本発明1001～1015のいずれかの抗体。[本発明1017]Notch1受容体の非リガンド結合性の膜近位領域がSEQ ID NO:2を含む、本発明1001～1016のいずれかの抗体。

20

[本発明1018]RGYWIE (SEQ ID NO:15)を含んだ重鎖CDR1、
QILPGTGRTNYNEKFKG (SEQ ID NO:16)
を含んだ重鎖CDR2、およびFDGNYGYAMDY (SEQ ID NO:17)を含んだ重鎖CDR3を含む、本発明1001～1017のいずれかの抗体。[本発明1019]RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:18)を含んだ軽鎖CDR1、GTNNRAP (SEQ ID NO:19)を含んだ軽鎖CDR2、およびALWYSNHWVFGGGTKL (SEQ ID NO:20)

30

を含んだ軽鎖CDR3をさらに含む、本発明1018の抗体。[本発明1020]RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:18)を含んだ軽鎖CDR1、GTNNRAP (SEQ ID NO:19)を含んだ軽鎖CDR2、およびALWYSNHWVFGGGTKL (SEQ ID NO:20)を含んだ軽鎖CDR3を含む、本発明1001～1017のいずれかの抗体。[本発明1021]ヒトNotch1の細胞外ドメインの非リガンド結合性の膜近位領域に特異的に結合する単離された抗体であって、RGYWIE (SEQ ID NO:15)を含んだ重鎖CDR1、QILPGTGRTNYNEKFKG (SEQ ID NO:16)

40

を含んだ重鎖CDR2、および/またはFDGNYGYAMDY (SEQ ID NO:17)を含んだ重鎖CDR3を含む、抗体。[本発明1022]RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:18)を含んだ軽鎖CDR1、GTNNRAP (SEQ ID NO:19)を含んだ軽鎖CDR2、および/またはALWYSNHWVFGGGTKL (SEQ ID NO:20)を含んだ軽鎖CDR3をさらに含む、本発明1021の抗体。[本発明1023]ヒトNotch1の細胞外ドメインの非リガンド結合性の膜近位領域に特異的に結合する単離

50

された抗体であって、RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:18)を含んだ軽鎖CDR1、GTNNRAP (SEQ ID NO:19)を含んだ軽鎖CDR2、および/または ALWYSNHWVFGGGTKL (SEQ ID NO:20)を含んだ軽鎖CDR3を含む、抗体。

[本発明1024]

ヒトNotch1の細胞外ドメインの非リガンド結合性の膜近位領域に特異的に結合する単離された抗体であって、

(a) RGYWIE (SEQ ID NO:15)を含んだ重鎖CDR1、QILPGTGRTNYNEKFKG (SEQ ID NO:16)を含んだ重鎖CDR2、およびFDGNYGYAMDY (SEQ ID NO:17)を含んだ重鎖CDR3; ならびに/あるいは

(b) RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:18)を含んだ軽鎖CDR1、GTNNRAP (SEQ ID NO:19)を含んだ軽鎖CDR2、および ALWYSNHWVFGGGTKL (SEQ ID NO:20)を含んだ軽鎖CDR3を含む、抗体。

[本発明1025]

ヒトNotch1の細胞外ドメインの非リガンド結合性の膜近位領域に特異的に結合する単離された抗体であって、(a) RGYWIE (SEQ ID NO:15)を含んだ重鎖CDR1、または1、2、3もしくは4個のアミノ酸置換を含んだその変種; (b)

QILPGTGRTNYNEKFKG (SEQ ID NO:16)を含んだ重鎖CDR2、または1、2、3もしくは4個のアミノ酸置換を含んだその変種; および (c) FDGNYGYAMDY (SEQ ID NO:17)を含んだ重鎖CDR3、または1、2、3もしくは4個のアミノ酸置換を含んだその変種を含む重鎖可変領域を含む、抗体。

[本発明1026]

(a) RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:18)を含んだ軽鎖CDR1、または1、2、3もしくは4個のアミノ酸置換を含んだその変種; (b) GTNNRAP (SEQ ID NO:19)を含んだ軽鎖CDR2、または1、2、3もしくは4個のアミノ酸置換を含んだその変種; および/あるいは(c)

ALWYSNHWVFGGGTKL (SEQ ID NO:20)を含んだ軽鎖CDR3、または1、2、3もしくは4個のアミノ酸置換を含んだその変種を含む軽鎖可変領域をさらに含む、本発明1025の抗体。

[本発明1027]

ヒトNotch1の細胞外ドメインの非リガンド結合性の膜近位領域に特異的に結合する単離された抗体であって、(a) RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:18)を含んだ軽鎖CDR1、または1、2、3もしくは4個のアミノ酸置換を含んだその変種; (b) GTNNRAP (SEQ ID NO:19)を含んだ軽鎖CDR2、または1、2、3もしくは4個のアミノ酸置換を含んだその変種; および/あるいは(c)

ALWYSNHWVFGGGTKL (SEQ ID NO:20)を含んだ軽鎖CDR3、または1、2、3もしくは4個のアミノ酸置換を含んだその変種を含む軽鎖可変領域を含む、抗体。

[本発明1028]

アミノ酸置換が保存的アミノ酸置換である、本発明1025～1027のいずれかの抗体。

[本発明1029]

ヒトNotch1の細胞外ドメインの非リガンド結合性の膜近位領域に特異的に結合する単離された抗体であって、該膜近位領域内における、ATTC特許寄託番号PTA-9405として寄託されたハイブリドーマ細胞株により産生される抗体52M51が結合するエピトープと同じエピトープに結合する、抗体。

[本発明1030]

ヒトNotch1の細胞外ドメインの非リガンド結合性の膜近位領域に特異的に結合しかつNotch1 ICDの形成を阻害する単離された抗体であって、腫瘍成長を阻害する、抗体。

[本発明1031]

10

20

30

40

50

ヒトNotch1の細胞外ドメインの非リガンド結合性の膜近位領域への特異的な結合について本発明1001～1030のいずれかの抗体と競合する、単離された抗体。

[本発明1032]

ヒトNotch1の細胞外ドメインの非リガンド結合性の膜近位領域への特異的な結合について本発明1001～1030のいずれかの抗体と競合的結合アッセイにおいて競合する、単離された抗体。

[本発明1033]

ヒトNotch1の細胞外ドメインの非リガンド結合性の膜近位領域への特異的な結合について抗体52M51と競合する単離された抗体。

[本発明1034]

ヒトNotch1の細胞外ドメインの非リガンド結合性の膜近位領域に特異的に結合する単離された抗体であって、(a) SEQ ID NO:14もしくはSEQ ID NO:24に対して少なくとも90%の配列同一性を有する重鎖可変領域；および/または(b) SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:28もしくはSEQ ID NO:32に対して少なくとも90%の配列同一性を有する軽鎖可変領域を含む、抗体。

[本発明1035]

重鎖可変領域がSEQ ID NO:14もしくはSEQ ID NO:24に対して少なくとも95%の配列同一性を有し；かつ/または(b) 軽鎖可変領域がSEQ ID NO:8、SEQ ID NO:28もしくはSEQ ID NO:32に対して少なくとも95%の配列同一性を有する、本発明1034の抗体。

[本発明1036]

以下を含む、単離されたポリペプチド：

(a) SEQ ID NO:14もしくはSEQ ID NO:24のアミノ酸配列を有するポリペプチド；および/または

(b) SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:28もしくはSEQ ID NO:32のアミノ酸配列を有するポリペプチド。

[本発明1037]

抗体である、本発明1036のポリペプチド。

[本発明1038]

SEQ ID NO:14のアミノ酸配列を有するポリペプチドおよびSEQ ID NO:8のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む、本発明1036のポリペプチド。

[本発明1039]

SEQ ID NO:24のアミノ酸配列を有するポリペプチドおよびSEQ ID NO:28のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む、本発明1036のポリペプチド。

[本発明1040]

SEQ ID NO:24のアミノ酸配列を有するポリペプチドおよびSEQ ID NO:32のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む、本発明1036のポリペプチド。

[本発明1041]

ATCC特許寄託指定番号PTA-9549として寄託されているプラスミドによりコードされるポリペプチドと同じ重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む抗体。

[本発明1042]

ATCC特許寄託指定番号PTA-9405として寄託されているハイブリドーマ細胞株により産生される抗体。

[本発明1043]

本発明1036または1037のポリペプチドを含む、ヒトNotch1に特異的に結合する抗体。

[本発明1044]

以下を含む、ヒトNotch1に特異的に結合する抗体：

SEQ ID NO:14もしくはSEQ ID NO:24を含んだポリペプチド；および

SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:28もしくはSEQ ID NO:32を含んだポリペプチド。

[本発明1045]

本発明1001～1044のいずれかの抗体またはポリペプチドおよび薬学的に許容される担体

10

20

30

40

50

を含む薬学的組成物。

[本発明1046]

本発明1001～1044のいずれかの抗体またはポリペプチドおよび少なくとも一つのさらなる抗がん剤を含む薬学的組成物。

[本発明1047]

本発明1001～1044のいずれかの抗体またはポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む単離されたポリヌクレオチド分子。

[本発明1048]

本発明1047のポリヌクレオチド分子を含む発現ベクター。

[本発明1049]

本発明1048の発現ベクターを含む宿主細胞。

[本発明1050]

本発明1047のポリヌクレオチド分子を含む宿主細胞。

[本発明1051]

ATCC特許寄託指定番号PTA-9405として寄託されているハイブリドーマ細胞株。

[本発明1052]

本発明1001～1044のいずれかの抗体を産生する細胞株。

[本発明1053]

本発明1001～1044のいずれかの抗体またはポリペプチドと細胞とを接触させる段階を含む、細胞におけるNotch1の活性を阻害する方法。

[本発明1054]

細胞が腫瘍細胞である、本発明1053の方法。

[本発明1055]

本発明1001～1044のいずれかの抗体またはポリペプチドの治療的有効量を対象に投与する段階を含む、対象における腫瘍の成長を阻害する方法。

[本発明1056]

本発明1001～1044のいずれかの抗体またはポリペプチドの治療的有効量を対象に投与する段階を含む、対象におけるがん幹細胞を含む腫瘍の腫瘍形成性を低下させる方法であって、該腫瘍中のがん幹細胞の頻度または数が該抗体またはポリペプチドの投与によって低下する、方法。

[本発明1057]

腫瘍または腫瘍細胞が、乳房腫瘍、結腸直腸腫瘍、肝臓腫瘍、腎臓腫瘍、肺腫瘍、膵臓腫瘍、卵巣腫瘍、前立腺腫瘍、および頭頸部腫瘍からなる群より選択される、本発明1055または1056の方法。

[本発明1058]

本発明1001～1044のいずれかの抗体またはポリペプチドの治療的有効量を対象に投与する段階を含む、対象におけるがんを処置する方法。

[本発明1059]

がんが、乳房がん、結腸直腸がん、肝がん、腎臓がん、肝臓がん、肺がん、膵臓がん、消化器がん、黒色腫、卵巣がん、前立腺がん、子宮頸がん、膀胱がん、グリア芽腫、および頭頸部がんからなる群より選択される、本発明1058の方法。

[本発明1060]

少なくとも一つのさらなる抗がん剤/治療剤を対象に投与する段階をさらに含む、本発明1055～1059のいずれかの方法。

[本発明1061]

さらなる抗がん剤が、タキソール、イリノテカン、ゲムシタピンおよびオキサリプラチンからなる群より選択される、本発明1060の方法。

[本発明1062]

抗がん剤がさらなる抗体治療薬である、本発明1060の方法。

[本発明1063]

10

20

30

40

50

さらなる抗体治療薬が、第二のNotch受容体に特異的に結合する抗体を含む、本発明1062の方法。

[本発明1064]

さらなる抗体治療薬が、VEGFに特異的に結合する抗体を含む、本発明1062の方法。

[本発明1065]

さらなる抗体治療薬が、Notch受容体リガンドに特異的に結合する抗体を含む、本発明1062の方法。

[本発明1066]

Notch受容体リガンドがDLL4である、本発明1065の方法。

[本発明1067]

Notch受容体リガンドがJAG1である、本発明1065の方法。

[本発明1068]

抗体が細胞傷害性部分に結合されている、本発明1055～1067のいずれかの方法。

[本発明1069]

抗体が放射線療法とともに投与される、本発明1055～1068のいずれかの方法。

[本発明1070]

抗体が化学療法とともに投与される、本発明1055～1059のいずれかの方法。

[本発明1071]

ヒトNotch1の細胞外ドメインの非リガンド結合性の膜近位領域に特異的に結合する抗体の治療的有効量を対象に投与する段階を含む、対象における腫瘍の成長を阻害する方法であって、該結合によりNotch1の活性が阻害される、方法。

[本発明1072]

腫瘍が、乳房腫瘍、結腸直腸腫瘍、肝臓腫瘍、腎腫瘍、肺腫瘍、膵臓腫瘍、卵巣腫瘍、前立腺腫瘍、および頭頸部腫瘍からなる群より選択される、本発明1071の方法。

[本発明1073]

対象がヒトである、本発明1071または1072の方法。

[本発明1074]

抗体がNotch1のアンタゴニストである、本発明1071～1073のいずれかの方法。

[本発明1075]

抗体がIgG1抗体である、本発明1071～1073のいずれかの方法。

[本発明1076]

抗体がIgG2抗体である、本発明1071～1074のいずれかの方法。

[本発明1077]

抗体がモノクローナル抗体である、本発明1071～1076のいずれかの方法。

[本発明1078]

抗体がキメラ抗体である、本発明1071～1077のいずれかの方法。

[本発明1079]

抗体がヒト化抗体である、本発明1071～1078のいずれかの方法。

[本発明1080]

抗体がヒト抗体である、本発明1071～1078のいずれかの方法。

[本発明1081]

抗体が抗体断片である、本発明1071～1080のいずれかの方法。

[本発明1082]

抗体が細胞傷害剤に結合されている、本発明1071～1081のいずれかの方法。

[本発明1083]

併用療法を実施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、本発明1071～1082のいずれかの方法。

[本発明1084]

Notch1の活性を阻害する抗体の有効量と腫瘍とを接触させる段階を含む、腫瘍中のがん幹細胞の頻度または数を低下させることによりがん幹細胞を含む腫瘍の腫瘍形成性を低下

10

20

30

40

50

させる方法。

【図面の簡単な説明】

【0046】

【図1A】Notchシグナル伝達を阻害する、Notchの膜近位領域を標的化する抗体の同定。(A) Notch受容体および52M抗原領域の概略図。52M抗原は、受容体の成熟中にフリリンによる切断およびリガンド結合後にADAM (A Disintegrin and Metalloprotease; ディスインテグリンおよびメタロプロテアーゼ)プロテアーゼによる切断を受けるNotch1受容体の領域を含む。それに続く -セクレターゼによるプロセッシングが、核内での遺伝子転写を活性化するNotchの細胞内ドメイン(ICD)の放出を引き起こす。

【図1B】Notchシグナル伝達を阻害する、Notchの膜近位領域を標的化する抗体の同定。(B) 可溶性Notchリガンド(hDLL4-fc)およびNotch1受容体抗体の存在下で培養されたNotch1-Hela細胞に由来するルシフェラーゼレベル(y軸)。hDLL4-Fc有りおよび無しの非トランスフェクト(NT)細胞の結果をx軸の左端に示してある。52M Notch1受容体抗体をx軸に沿って示し、Notch -セクレターゼ阻害剤(GSI)のDBZ、および抗DLL4抗体の21M18と比較してある。Notch1受容体抗体52M51、52M63、52M74および52M80は全て、ルシフェラーゼ活性の減少によって示されるようにNotchシグナル伝達を顕著に阻害した。

【図1C】Notchシグナル伝達を阻害する、Notchの膜近位領域を標的化する抗体の同定。(C) 可溶性Notchリガンド(hDLL4-fc)およびNotch1受容体抗体の存在下で培養されたNotch1-Hela細胞に由来するルシフェラーゼレベル(y軸)。hDLL4-Fc有りおよび無しの非トランスフェクト(NT)細胞の結果をx軸の左端に示してある。52M51マウスハイブリドーマ由来抗体およびヒト化変種52M51-H4/L3を、図のように種々の濃度でx軸に沿って示してある。親マウス抗体52M51もヒト化変種とともに、ルシフェラーゼ活性の減少によって示されるようにNotchシグナル伝達を顕著に阻害した。

【図1D】Notchシグナル伝達を阻害する、Notchの膜近位領域を標的化する抗体の同定。(D) Notch1を発現するHela細胞の、リガンドを介した刺激後のICD形成のウエスタンブロット分析。DLL4リガンドの非存在下(-DLL4)でわずかなICDが産生されるが、DLL4の存在によって形成が刺激される。抗体52M51、52M63、52M74および52M80はDLL4の存在にもかかわらずICD形成をバックグラウンドレベルにまで低下させる。

【図2A】Notch1受容体抗体52M51は腫瘍形成をインビボで阻害する。(A) C8結腸腫瘍細胞を注射されたNOD/SCIDマウスを、対照抗体(四角形)または抗Notch1抗体52M51(三角形)で処置し、腫瘍体積(y軸、 mm^3)を全時間(x軸、日数)にわたって測定した。52M51抗体による処置は、対照と比べて腫瘍成長を顕著($p=0.0006$)に阻害した。

【図2B】Notch1受容体抗体52M51は腫瘍形成をインビボで阻害する。(B) 対照(左) vs 52M51(右)処置マウスに関する48および55日目に測定された(A)の動物由来の各腫瘍体積測定値。直線は、各実験群の平均を定めている。

【図2C】Notch1受容体抗体52M51は腫瘍形成をインビボで阻害する。(C) PE13乳房腫瘍細胞を注射されたNOD/SCIDマウスを、対照抗体(黒四角形)、または図1Bに示されるようにNotchシグナル伝達を阻害しない抗Notch1抗体52M1(黒三角形)および52M2(灰色丸形)で処置した。腫瘍体積(y軸、 mm^3)を全時間(x軸、日数)にわたって測定した。52M1および52M2による処置は、対照処置動物と比べた場合、腫瘍成長に効果を及ぼすことができなかった。

【図2D】Notch1受容体抗体52M51は腫瘍形成をインビボで阻害する。(D) PE13乳房腫瘍細胞を注射されたNOD/SCIDマウスを、対照抗体(四角形)、または図1Bに示されるようにNotchシグナル伝達を阻害しない抗Notch1抗体52M8(三角形)で処置した。腫瘍体積(y軸、 mm^3)を全時間(x軸、日数)にわたって測定した。52M8による処置は、対照処置動物と比べた場合、腫瘍成長に効果を及ぼすことができなかった。

【図3A】抗Notch1受容体抗体52R43は腫瘍形成をインビボで阻害する。(A) M2黒色腫瘍細胞を注射されたNOD/SCIDマウスを、対照抗体(四角形)または抗Notch1抗体52R43(丸形)で処置し、腫瘍体積(y軸、 mm^3)を全時間(x軸、日数)にわたって測定した。

【図3B】抗Notch1受容体抗体52R43は腫瘍形成をインビボで阻害する。(B) Lu24肺腫瘍

10

20

30

40

50

細胞を注射されたNOD/SCIDマウスを、対照抗体(四角形)または抗Notch1抗体52R43(丸形)で処置し、腫瘍体積(y軸、 mm^3)を全時間(x軸、日数)にわたって測定した。

【図3C】抗Notch1受容体抗体52R43は腫瘍形成をインビボで阻害する。(C) PN8脾臓腫瘍細胞を注射されたNOD/SCIDマウスを、対照抗体(四角形)または抗Notch1抗体52R43(丸形)で処置し、腫瘍体積(y軸、 mm^3)を全時間(x軸、日数)にわたって測定した。

【図3D】抗Notch1受容体抗体52R43は腫瘍形成をインビボで阻害する。(D) T1乳房腫瘍細胞を注射されたNOD/SCIDマウスを、対照抗体(四角形)、抗Notch1抗体52R43(黒丸形)、タキソール(三角形)または52R43およびタキソール(白丸形)で処置し、腫瘍体積(y軸、 mm^3)を全時間(x軸、日数)にわたって測定した。

【発明を実施するための形態】

10

【0047】

発明の詳細な説明

本発明は、一種または複数種のヒトNotch受容体に結合する、抗体のようなポリペプチドを含むが、これらに限定されない、新規の薬剤を提供する。Notch結合剤はヒトNotch受容体のアンタゴニストを含む。関連したポリペプチドおよびポリヌクレオチド、Notch結合剤を含む組成物、ならびにNotch結合剤を作出する方法も提供される。腫瘍成長を阻害するおよび/またはがんを処置する方法のような、新規のNotch結合剤を使用する方法がさらに提供される。

【0048】

本発明はさらに、ヒトNotch1受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合性の膜近位領域に特異的に結合しかつインビボで腫瘍成長を阻害する分子(例えば、抗体)を特定する。リガンド結合に必要なかつ十分な、Notchのリガンド結合領域は、EGF反復配列11および12と特定されており、Notch受容体のこの領域がNotchシグナル伝達および腫瘍形成に重要であることを示唆している(Rebay et al., 1991, Cell 67:687; Lei et al., 2003, Dev. 130:6411, Hambleton et al., 2004, Structure 12:2173)。予想外にも、ヒトNotch受容体の細胞外ドメインのリガンド結合ドメインの外側に結合する抗体は、インビボで腫瘍細胞成長を阻害することが分かっている(全体が参照により本明細書に組み入れられる、米国特許出願公開第2008/0131434号を参照のこと)。したがって、ヒトNotch受容体 - Notch1、Notch2、Notch3およびNotch4の一種または複数種の細胞外ドメインのリガンド結合ドメインの外側に結合する抗体は、潜在的ながん治療薬として価値がある。

20

30

【0049】

モノクローナル抗体52M51を含めて、Notch1の細胞外ドメインの膜近位領域に特異的に結合するモノクローナル抗体が現在では特定されている(実施例1)。ヒト化52M51抗体も作出されている(実施例2)。52M51および52M51のヒト化変種を含めて、いくつかの抗体は、リガンド結合領域の外側の領域でNotch1に結合するにもかかわらず、リガンド誘導性のNotch1シグナル伝達を阻害する(実施例3ならびに図1BおよびC)。Notch細胞内ドメイン(ICD)の形成を阻害するいくつかの抗体の能力も現在では実証されている(実施例3および図1D)。52M51は異種移植モデルにおいてインビボで腫瘍細胞成長を阻害することが分かっている(実施例5ならびに図2AおよびB)。さらに、別の抗体52R43は複数の異種移植モデルにおいてインビボで腫瘍細胞成長を阻害することも分かっている(実施例7および図3A~D)。

40

【0050】

定義

本明細書において用いられるNotch受容体の「アンタゴニスト」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か、阻害するか、または中和する任意の分子を含む用語である。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または抗体断片を含む。「アンタゴニスト」という用語は、Notch受容体の発現を部分的にまたは完全に遮断するか、阻害するか、または中和する任意の分子を含むよう本明細書において用いられる。

【0051】

「抗体」という用語は、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

50

部位を通じて、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、または前記の組み合わせなどのような、標的を認識しかつその標的に特異的に結合する免疫グロブリン分子を意味するように用いられる。本明細書において用いられる場合、この用語は、抗体が所望の生物学的活性を示す限り、インタクトなポリクローナル抗体、インタクトなモノクローナル抗体、抗体断片(Fab、Fab'、F(ab')₂、およびFv断片のような)、単鎖Fv(scFv)変異体、少なくとも二つのインタクトな抗体から作出された二重特異性抗体のような多重特異性抗体、一価抗体または単一特異性抗体、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、ならびに抗原認識部位を含むその他任意の修飾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と称されるそれらの重鎖定常ドメインの素性に基づいて、免疫グロブリンの5つの主なクラス: 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)のいずれかであることができる。免疫グロブリンの異なるクラスは、異なる周知のサブユニット構造および三次元立体配置を有する。抗体は、裸であるかまたは毒素、放射性同位体などのような他の分子に結合されることができる。

10

【0052】

本明細書において用いられる場合、「抗体断片」という用語は、インタクトな抗体の一部をいい、かつインタクトな抗体の抗原決定可変領域をいう。抗体断片の例としては、Fab、Fab'、F(ab')₂、およびFv断片、直鎖状抗体、単鎖抗体、ならびに抗体断片から形成された多重特異性抗体が挙げられるが、これらに限定されることはない。

20

【0053】

「Fv抗体」は、一つの重鎖および一つの軽鎖の可変ドメインが非共有結合的な二量体を形成する二つの鎖としてか、または二つの鎖が同様の二量体構造として結合するように、一つの重鎖および一つの軽鎖の可変ドメインが柔軟なペプチドリッカーで共有結合的に連結される一つの鎖(scFv)としてかのいずれかで、完全な抗原認識および抗原結合部位を含む最小限の抗体断片をいう。この立体配置では、各々の可変ドメインの相補性決定領域(CDR)が相互作用し、Fv二量体の抗原結合特異性を規定する。または、一般により低い親和性ではあるが、一つの可変ドメイン(またはFvの半分)を用いて、抗原を認識しかつ抗原に結合することができる。

【0054】

本明細書において用いられる「モノクローナル抗体」は、一つの抗原決定基またはエピトープの極めて特異的な認識および結合に関わる、均質な抗体集団をいう。これは、異なる抗原決定基に対して作製された異なる抗体を典型的に含むポリクローナル抗体と対照的である。「モノクローナル抗体」という用語は、インタクトでかつ全長のモノクローナル抗体と抗体断片(例えばFab、Fab'、F(ab')₂、Fv)、単鎖(scFv)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その他任意の修飾免疫グロブリン分子の両方を包含する。さらに、「モノクローナル抗体」は、ハイブリドーマ、ファージ選択、組み換え発現、およびトランスジェニック動物によるものを含むがこれらに限定されない、任意のいくつかの方法で作出されたそのような抗体をいう。

30

【0055】

本明細書において用いられる場合、「ヒト化抗体」という用語は、最小限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、またはその断片である非ヒト(例えば、マウス)抗体の形態をいう。典型的には、ヒト化抗体は、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/または能力を有する非ヒト種(例えば、マウス、ラット、ウサギ、ハムスターなど)のCDR由来の残基で置き換えられているヒト免疫グロブリンである。場合によって、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/または能力を有する非ヒト種由来の抗体中の対応する残基と置き換えられている。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内のいずれかの追加の残基の置換によってさらに修飾し、抗体の特異性、親和性、および/または能力を洗練および最適化することができる。一般に、ヒ

40

50

ト化抗体は、非ヒト免疫グロブリンに対応するCDR領域の全てまたは実質的に全てを含む一方で、FR領域の全てまたは実質的に全てがヒト免疫グロブリンコンセンサス配列の領域である少なくとも一つ、典型的には二つまたは三つの可変ドメインの実質的に全てを含むと考えられる。ヒト化抗体は、免疫グロブリン定常領域またはドメイン(Fc)、典型的には、ヒト免疫グロブリンの定常領域またはドメインの少なくとも一部を含むこともできる。ヒト化抗体を作出するのに用いられる方法の例は、参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第5,225,539号に記述されている。

【0056】

抗体の「可変領域」は、単独または組み合わせのいずれかの、抗体軽鎖の可変領域または抗体重鎖の可変領域をいう。重鎖および軽鎖の可変領域は各々、超可変領域としても知られる三つの相補性決定領域(CDR)によって連結された、四つのフレームワーク領域(FR)からなる。各鎖中のCDRは、FRによって近接してともに保持され、そして他の鎖由来のCDRとともに、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する。CDRを決定するには少なくとも二つの技術がある：(1) 種間配列変動に基づくアプローチ(すなわち、Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda Md.); および(2) 抗原-抗体複合体の結晶学的研究に基づくアプローチ(A I-lazikani et al., 1997, J. Molec. Biol. 273:927-948)。さらに、CDRを決定するために当技術分野においてこれらの二つのアプローチの組み合わせが用いられることもある。

【0057】

本明細書において用いられる「ヒト抗体」という用語は、ヒトによって産生された抗体、または当技術分野において公知の任意の技術を用いて作出された、ヒトによって産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には、インタクトなもしくは全長の抗体、その断片、および/または、例えば、マウス軽鎖およびヒト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/または軽鎖ポリペプチドを含む抗体が含まれる。

【0058】

「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いう。典型的には、軽鎖および重鎖の両方の可変領域は、所望の特異性、親和性および/または能力を有する、一つの哺乳動物種(例えば、マウス、ラット、ウサギなど)に由来する抗体の可変領域に対応するが、定常領域は、その種での免疫反応の誘発を回避するために別の種(通常はヒト)に由来する抗体中の配列と相同である。キメラ抗体という用語は一価、二価および多価の抗体を含む。

【0059】

「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、特定の抗体により認識され特異的に結合されうる抗原のその部分をいう。抗原がポリペプチドである場合、エピトープは連続的なアミノ酸からも、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的なアミノ酸からも形成されうる。連続的なアミノ酸から形成されたエピトープ(直鎖状エピトープともいわれる)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(立体配座エピトープともいわれる)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、典型的には、独特の空間的配置の中に少なくとも3アミノ酸、より一般的には、少なくとも5アミノ酸または8~10アミノ酸を含む。

【0060】

抗体がエピトープまたは受容体に「選択的に結合する」または「特異的に結合する」ことは、抗体が、関連のないタンパク質を含めて、別の物質とよりもエピトープまたは受容体と高頻度に、迅速に、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」または「特異的に結合する」とは、例えば、抗体が約0.1 mMまたはそれ以下、時には約1 μ Mまたはそれ以下、時には約0.1 μ Mまたはそれ以下および時には約0.01 μ Mまたはそれ以下の K_D でタンパク質に結合することを意味する。異なる種における相同タンパク質間の配列同一性のため、

10

20

30

40

50

特異的結合は、二種以上の種においてNotch受容体を認識する抗体を含むことができる。ある種の態様において、第一の標的に特異的に結合する抗体または結合部分は、第二の標的に特異的に結合してもしなくてもよいことが理解されよう。したがって、「特異的結合」とは、排他的な結合、すなわち単一の標的との結合を(含むことができるが)必ずしも必要としない。一般的に、しかし必ずというわけではないが、結合への言及は特異的結合を意味する。

【0061】

抗体間の競合は、被験免疫グロブリンが、共通の抗原との参照抗体の特異的結合を阻害するアッセイによって判定される。多くのタイプの競合的結合アッセイ、例えば、固相直接的または間接的放射免疫アッセイ(RIA)、固相直接的または間接的酵素免疫アッセイ(EI 10 A)、サンドイッチ競合アッセイ(Stahli et al., *Methods in Enzymology* 9:242-253 (1983)参照); 固相直接的ビオチン-アビジンEIA法(Kirkland et al., *J. Immunol.* 137:3614-3619 (1986)参照); 固相直接的標識アッセイ、固相直接的標識サンドイッチアッセイ(Harlow and Lane, 「Antibodies, A Laboratory Manual」, Cold Spring Harbor Press (1988)参照); ¹²⁵I標識を用いる固相直接標識RIA法(Morel et al., *Molec. Immunol.* 25(1):7-15 (1988)参照); 固相直接ビオチン-アビジンEIA法(Cheung et al., *Virology* 176:546-552 (1990)); および直接標識RIA法(Moldenhauer et al., *Scand. J. Immunol.* 32:77-82 (1990))が公知である。典型的には、このようなアッセイでは、固体表面に結合された精製抗原またはこれらのいずれかを持つ細胞、非標識被験免疫グロブリンおよび標識参照免疫グロブリンの使用が必要になる。競合的阻害は、被験免疫グロブリンの存在下で固体表面または細胞に結合された標識の量を判定することによって測定される。通常、被験免疫グロブリンは過剰に存在する。競合アッセイによって同定される抗体(競合抗体)には、参照抗体と同一のエピトープに結合する抗体、および、参照抗体が結合するエピトープに対して、立体障害が生じるのに十分な近さにある隣接エピトープに結合する抗体などがある。通常、競合抗体が過剰に存在すると、共通抗原との参照抗体の特異的結合が少なくとも50%または75%阻害されるであろう。

【0062】

「単離された」または「精製された」という用語は、その天然の状態では通常それに付随する構成要素を実質的にまたは本質的に含まない材料をいう。純度および均質性は典型的には、ポリアクリルアミドゲル電気泳動または高性能液体クロマトグラフィーなどの分析化学的技術を用いて決定される。調製物中に存在する優勢な種であるタンパク質(例えば、抗体)または核酸は、実質的に精製されている。特に、いくつかの態様において、遺伝子を含む単離された核酸は、天然ではその遺伝子に隣接しかつその遺伝子に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読み取り枠から分離されている。単離された抗体は、その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持つその他の免疫グロブリンタンパク質から分離されている。それは、核酸またはタンパク質が少なくとも85%純粋、少なくとも95%純粋、およびいくつかの態様においては、少なくとも99%純粋であることを意味することもできる。

【0063】

本明細書において用いられる場合、「がん」および「がん性」という用語は、細胞の集団が無秩序な細胞成長によって特徴付けられる、哺乳動物における生理学的状態をいうかまたは記述する。がんの例としては、がん腫、リンパ腫、芽腫、肉腫、および白血病が挙げられるが、これらに限定されることはない。そのようながんのさらに詳細な例としては、扁平上皮がん、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺がん、肺扁平上皮がん、腹膜がん、肝細胞がん、消化器がん、膵臓がん、膠芽腫、子宮頸がん、卵巣がん、肝臓がん、膀胱がん、肝細胞腫、乳房がん、結腸がん、結腸直腸がん、子宮内膜がんまたは子宮がん、唾液腺がん、腎臓がん、肝臓がん、前立腺がん、外陰部がん、甲状腺がん、肝がんおよびさまざまな種類の頭頸部がんが挙げられる。

【0064】

本明細書において用いられる「腫瘍」および「新生物」は、前がん性病変を含む良性(

10

20

30

40

50

非がん性)または悪性(がん性)のいずれかの、過剰な細胞の成長または増殖から結果として生じる組織の任意の塊をいう。

【0065】

「増殖性障害」および「増殖性疾患」という用語は、がんなどの異常な細胞増殖と関連する障害をいう。

【0066】

本明細書において用いられる「転移」とは、身体の出現部位から他の領域にがんが拡散または移動し、新たな場所での類似のがん性病変の発生を伴う過程をいう。「転移」または「転移性」細胞は、隣接する細胞との接着性接触を失い、疾患の原発部位から血流またはリンパを介して移動し、隣接する身体構造に浸潤する細胞である。

10

【0067】

「がん幹細胞」または「腫瘍幹細胞」または「充実性腫瘍幹細胞」という用語は、本明細書において互換的に用いられ、(1) 高い増殖能を有し; (2) 増殖能または発生能の低下した一つまたは複数の種類の分化した子孫を生じるために非対称細胞分裂が可能であり; 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である、充実性腫瘍由来の細胞集団をいう。「がん幹細胞」または「腫瘍幹細胞」または「充実性腫瘍幹細胞」のこれらの特性は、腫瘍を形成できない大部分の腫瘍細胞と比べ、免疫不全マウスへの連続移植によって触知可能な腫瘍を形成する能力をそれらのがん幹細胞に付与する。がん幹細胞は、自己複製 vs 分化を無秩序に起こして、突然変異を生じながら経時的に変化する異常な細胞型を伴う腫瘍を形成する。

20

【0068】

「がん細胞」または「腫瘍細胞」という用語は、腫瘍細胞集団の大半を含む、非腫瘍形成性細胞と腫瘍形成性幹細胞(がん幹細胞)の両方を含む腫瘍に由来する細胞の全集団をいう。

【0069】

本明細書において用いられる場合「腫瘍形成性の」とは、自己複製(さらなる腫瘍形成性のがん幹細胞を生ずる)および他の全ての腫瘍細胞を作出する増殖(分化した、すなわち、非腫瘍形成性の腫瘍細胞を生ずる)という特性を含め、充実性腫瘍幹細胞が腫瘍を形成することを可能にする、充実性腫瘍幹細胞の機能的な特徴をいう。

【0070】

本明細書において用いられる場合、腫瘍の「腫瘍形成性」は、免疫不全マウスへの連続移植によって触知可能な腫瘍を形成する腫瘍由来の細胞の無作為試料の能力をいう。

30

【0071】

本明細書において用いられる場合、「幹細胞がんマーカー」、「がん幹細胞マーカー」、「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、単独でのまたは他の遺伝子との組み合わせでの発現レベルが、非腫瘍形成性の細胞と比べて腫瘍形成性のがん細胞の存在と相関する、遺伝子、または遺伝子によって発現されるタンパク質、ポリペプチドもしくはペプチドをいう。この相関は、遺伝子発現の増加または減少(例えば、遺伝子によってコードされるmRNAまたはペプチドレベルの増加または減少)のいずれかに関係する。

40

【0072】

「がん幹細胞遺伝子シグネチャー」または「腫瘍幹細胞シグネチャー」または「がん幹細胞シグネチャー」という用語は、その他の細胞または細胞の集団、例えば、正常な乳房上皮組織と比較してがん幹細胞で差次的に発現される遺伝子を含む遺伝子シグネチャーをいうように本明細書において互換的に用いられる。いくつかの態様において、がん幹細胞遺伝子シグネチャーは、倍数変化を単位として、例えば、発現の2倍の低下および/または上昇を単位として、正常乳房上皮に対してがん幹細胞で差次的に発現し、かつ例えば、複数の試料にわたるt-検定のP値によるような統計解析を用いてさらに限定される遺伝子を含む。別の態様において、がん幹細胞で差次的に発現される遺伝子を、それらの発現の倍数または割合の変化と組み合わせたそれらの発現と選ばれた遺伝子との相関に基づいて

50

ん幹細胞遺伝子シグネチャーに分ける。がん幹細胞シグネチャーは、転移および死を含むが、これらに限定されない、臨床的変動性の局面を、事後および事前の両方で予測する。

【0073】

本明細書において用いられる「遺伝子検査」という用語は、患者または患者腫瘍試料の遺伝子構成を解析する手順をいう。この解析は、臨床目的で遺伝性もしくは体細胞性の疾患関連の遺伝子型または核型を検出するためのDNA、RNA、染色体、タンパク質または代謝産物の検出を含むことができる。

【0074】

本明細書において用いられる場合、「生検」または「生検組織」という用語は、試料ががん性組織を含むかどうかを決定する目的で対象から取り出される組織または体液の試料をいう。いくつかの態様において、対象はがんを有することが疑われるので、生検組織または体液が採取される。その後、生検組織または体液をがんの有無について調べる。

【0075】

本明細書において用いられる場合、「対象」という用語は、特定の処置のレシピエントとなるべき、ヒト、非ヒト霊長類、齧歯類などを含むが、これらに限定されない、任意の動物(例えば、哺乳動物)をいう。典型的には、「対象」および「患者」という用語は、ヒト対象に関して本明細書で互換的に用いられる。

【0076】

「薬学的に許容される」とは、ヒトを含めて、動物での使用が、連邦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なこと、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いう。

【0077】

「薬学的に許容される賦形剤、担体もしくはアジュバント」または「許容される薬学的な担体」とは、少なくとも一つの本開示の抗体とともに、対象に投与でき、抗体の薬理活性を破壊せず、治療量の抗体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いう。さらに、「薬学的に許容される担体」はレシピエント対象において免疫応答を誘発しない。例としては、リン酸緩衝生理食塩溶液、水、およびさまざまな油/水型乳剤などの標準的な薬学的担体のいずれかが挙げられるが、これらに限定されることはない。エアロゾルまたは非経口投与用の希釈剤の中には、リン酸緩衝生理食塩液または生理(0.9%)食塩水がある。

【0078】

「薬学的に許容される媒体」とは、少なくとも一つの本開示の抗体とともに投与される希釈剤、アジュバント、賦形剤または担体をいう。

【0079】

「有効量」または「治療的有效量」または「治療的効果」という用語は、対象または哺乳動物における疾患または障害を「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、小有機化合物、または他の薬物の量をいう。がんの場合、薬物の治療的有效量は、治療的効果を有し、したがってがん細胞の数を減らす；腫瘍形成性、腫瘍形成頻度もしくは腫瘍形成能を下げる；がん幹細胞の数もしくは頻度を減らす、腫瘍サイズを減らす；例えば、軟組織もしくは骨へのがんの拡散を含む末梢臓器へのがん細胞の浸潤を阻むもしくは止める；腫瘍転移を阻むおよび止める；腫瘍成長を阻むおよび止める；がんと関連する症状の一つもしくは複数をある程度まで和らげる；有病率および死亡率を減らす；生活の質を良くする；またはこのような効果の組み合わせをもたらすことができる。薬剤、例えば抗体が既存のがん細胞の成長を抑止する、かつ/または既存のがん細胞を死滅化する程度まで、それを、細胞増殖抑制性および/または細胞傷害性ということができる。

【0080】

「処置する」もしくは「処置」もしくは「処置するため」または「緩和する」もしくは「緩和するため」などの用語は、(1) 診断された病理学的状態もしくは障害の症状を治療する、減速する、軽減する、および/または診断された病理学的状態もしくは障害の進行を食い止める治療的手段、ならびに(2) 標的化された病理学的状態または障害の発生を阻

10

20

30

40

50

止するまたは遅延する予防的または防止的手段の両方をいう。したがって、処置を必要とする者には、障害を既に有する者；障害を有する傾向がある者；および障害が予防されるべき者が含まれる。患者が以下の一つまたは複数を示すなら、対象は本発明の方法によって成功裏に「処置されて」いる：がん細胞の数の低下もしくはがん細胞の完全な非存在；腫瘍サイズの低下；軟組織および骨へのがんの拡散を含む末梢臓器へのがん細胞浸潤の阻害もしくは非存在；腫瘍転移の阻害もしくは非存在；腫瘍成長の阻害もしくは非存在；特異的ながんに関連する一つもしくは複数の症状の緩和；有病率および死亡率の低下；生活の質の改善；腫瘍形成性の低下；がん幹細胞の数もしくは頻度の低下；またはこのような効果のいくつかの組み合わせ。

【 0 0 8 1 】

本明細書において用いられる場合、「ポリヌクレオチド」または「核酸」という用語は、DNAまたはRNAを含むが、これらに限定されない、ホスホジエステル結合を介して連結された多数のヌクレオチド単位(リボヌクレオチドもしくはデオキシリボヌクレオチドまたは関連する構造変異体)から構成される重合体をいう。この用語は、DNAおよびRNAの公知の塩基類似体のいずれかを含む配列を包含する。

【 0 0 8 2 】

「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)の産生に必要なコード配列を含む核酸(例えば、DNA)配列をいう。ポリペプチドは、全長ポリペプチドまたは断片の所望の活性または機能的性質(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)が保持される限り、全長のコード配列によりまたはコード配列の任意の部分によりコードされることができる。この用語は、構造遺伝子のコード領域、ならびにコード領域の5'および3'末端の両方に隣接して位置する配列であって、いずれかの末端において遺伝子が全長のmRNAの長さに対応するように約1 kbまたはそれ以上の距離に及ぶものも包含する。「遺伝子」という用語は、cDNAおよびゲノム両方の形態の遺伝子を包含する。

【 0 0 8 3 】

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の「組み換え」という用語は、細胞、核酸、タンパク質またはベクターが、異種の核酸もしくはタンパク質の導入、天然の核酸もしくはタンパク質の改変によって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、組み換え細胞は、天然の(非組み換え)形態の細胞内で見出されない遺伝子を発現する、または過剰発現させたかもしくはそうでなければ例えば、非天然の断片もしくはスプライシング変異体として発現するように異常に発現させた天然の遺伝子を発現する。本明細書中の「組み換え核酸」という用語によって、本来はインビトロで、一般に、核酸の操作によって、例えば、ポリメラーゼおよびエンドヌクレアーゼを用いて、自然界で通常見出されない形態で形成される核酸を意味する。このように、異なる配列の機能的連結を達成する。したがって、直鎖状の形態の単離された核酸、または通常接続されていないDNA分子を核酸連結することによって形成された発現ベクターは両方とも、本発明の目的のための組み換え体とみなされる。ひとたび組み換え核酸を作出しかつ宿主の細胞または生物に導入すれば、それは非組み換えによって、すなわち、インビトロ操作ではなく宿主細胞のインビボ細胞機構を用いて複製すると考えられるが；そのような核酸は、ひとたび組み換えによって産生されれば、その後非組み換えによって複製されても、やはり本発明の目的のための組み換え体とみなされることが理解される。同様に、「組み換えタンパク質」は、組み換え技術を用いて、すなわち、上記のような組み換え核酸の発現を通じて作出されたタンパク質である。

【 0 0 8 4 】

本明細書において用いられる場合、「ベクター」という用語は、ある細胞から別の細胞へDNAセグメントを移す核酸分子に関して用いられる。ベクターは多くの場合、プラスミド、バクテリオファージ、または植物もしくは動物のウイルスに由来する。

【 0 0 8 5 】

本明細書において用いられる場合、「遺伝子発現」という用語は、遺伝子にコードされ

10

20

30

40

50

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って) RNA (例えば、mRNA、rRNA、tRNA、またはsnRNA)に、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に変換する過程をいう。遺伝子発現を過程の多くの段階で調節することができる。「上方調節」または「活性化」は、遺伝子発現産物(例えば、RNAまたはタンパク質)の産生を増加させる調節をいうのに対し、「下方調節」または「抑制」は、産生を減少させる調節をいう。上方調節または下方調節に関与する分子(例えば、転写因子)は多くの場合、それぞれ「活性化因子」および「抑制因子」と呼ばれる。

【0086】

「ポリペプチド」または「ペプチド」または「タンパク質」または「タンパク質断片」という用語は、アミノ酸残基の重合体をいうように本明細書において互換的に用いられる。この用語は、天然のアミノ酸重合体および非天然のアミノ酸重合体だけでなく、一つまたは複数のアミノ酸残基が対応する天然のアミノ酸の人工的の化学模倣体であるアミノ酸重合体にも当てはまる。

10

【0087】

「アミノ酸」という用語は、天然および合成のアミノ酸だけでなく、天然のアミノ酸と同様に機能するアミノ酸類似体およびアミノ酸模倣体もいう。天然のアミノ酸とは、遺伝暗号によってコードされたアミノ酸だけでなく、後に修飾されたアミノ酸、例えば、ヒドロキシプロリン、 γ -カルボキシグルタミン酸、およびO-ホスホセリンでもある。「アミノ酸類似体」とは、天然のアミノ酸と同じ基本的化学構造、例えば、水素、カルボシキル基、アミノ基、およびR基に結合した炭素を有する化合物、例えば、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いう。そのような類似体は、修飾されたR基(例えば、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、天然のアミノ酸と同じ基本的化学構造を保持する。「アミノ酸模倣体」とは、アミノ酸の一般的化学構造とは異なる構造を有するが、天然のアミノ酸と同様に機能する化学的化合物をいう。

20

【0088】

「保存的に修飾された変種」は、アミノ酸配列および核酸配列の両方に当てはまる。「アミノ酸変種」は、アミノ酸配列をいう。特定の核酸配列に関して、保存的に修飾された変種は、同一もしくは本質的に同一のアミノ酸配列をコードする核酸をいい、または核酸がアミノ酸配列をコードしない場合には、本質的に同一もしくは関連の(例えば、天然に隣接する)配列をいう。遺伝暗号の縮重のために、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。例えば、コドンGCA、GCC、GCGおよびGCUは全て、アミノ酸アラニンをコードする。したがって、コドンによってアラニンが指定されるあらゆる位置で、コードされるポリペプチドを改変することなく、コドンを、記述した対応するコドンのうちの別のものに改変することができる。そのような核酸変異は、保存的に修飾された変異の1つの種である「サイレント変異」である。ポリペプチドをコードする本明細書中のあらゆる核酸配列は、核酸のサイレント変異も記述する。ある文脈において、核酸中の各コドン(通常はメチオニンに対する唯一のコドンである、AUG、および通常はトリプトファンに対する唯一のコドンである、TGGを除く)を修飾し、機能的に同一の分子を生み出すことができることが認識されている。したがって、ポリペプチドをコードする核酸のサイレント変異は、発現産物については記述された配列に内在するが、実際のプローブ配列については内在しない。

30

40

【0089】

アミノ酸配列に関して、コードされた配列中の一つのアミノ酸またはわずかな割合のアミノ酸を、改変する、付加する、または欠失させる核酸、ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質配列に対する個々の置換、欠失、または付加は、改変によって化学的に類似のアミノ酸によるアミノ酸の置換がもたらされる場合を含む「保存的に修飾された変種」であることが認識されると考えられる。機能的に類似のアミノ酸を提供する保存的置換表は、当技術分野において周知である(例えば、表1を参照のこと)。どのアミノ酸変化が表

50

現型のうえでサイレントである可能性が高いかに関する指針をBowie et al., 1990, Science 247: 1306-1310のなかで見出すこともできる。そのような保存的に修飾された変種は、本発明の多型変種、種間ホモログ、および対立遺伝子に追加したものであり、本発明の多型変種、種間ホモログ、および対立遺伝子を除外しない。典型的には、保存的置換には：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)が含まれる。表示の通り、変化は、典型的には、タンパク質の折り畳みまたは活性にあまり影響を与えない保存的アミノ酸置換のような、比較的重要なでない性質のものである。

10

【0090】

(表1) 保存的アミノ酸置換

本来のアミノ酸	例示的な保存的置換
アラニン	バリン、イソロイシン、ロイシン、グリシン、セリン
アルギニン	リジン、ヒスチジン、グルタミン、アスパラギン
アスパラギン	グルタミン、ヒスチジン、リジン、アルギニン
アスパラギン酸	グルタミン酸、アスパラギン
システイン	セリン、アラニン、メチオニン
グルタミン	アスパラギン
グルタミン酸	アスパラギン酸、グルタミン
グリシン	プロリン、アラニン
ヒスチジン	アスパラギン、グルタミン、リジン、アルギニン
イソロイシン	ロイシン、バリン、メチオニン、アラニン、フェニルアラニン、ノルロイシン
ロイシン	ノルロイシン、イソロイシン、バリン、メチオニン、アラニン、フェニルアラニン
リジン	アルギニン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン
メチオニン	ロイシン、フェニルアラニン、イソロイシン、バリン、システイン
フェニルアラニン	ロイシン、バリン、イソロイシン、アラニン、チロシン
プロリン	アラニン、グリシン
セリン	トレオニン
トレオニン	セリン
トリプトファン	チロシン、フェニルアラニン
チロシン	トリプトファン、フェニルアラニン、トレオニン、セリン
バリン	イソロイシン、メチオニン、ロイシン、フェニルアラニン、アラニン、ノルロイシン

20

30

40

【0091】

本開示および特許請求の範囲において用いられる場合、単数形「一つの(a)」、「一つの(an)」および「その(the)」は、文脈からそうでないと明記されていない限り、複数形

50

を含む。

【0092】

「含む」という言葉により本明細書において態様が記述される場合にはいつも、「からなる」および/または「から本質的になる」という点で記述されているほかの類似の態様も提供されることが理解されよう。

【0093】

本発明のある種の態様

本発明は、がんを研究する、診断する、特徴付ける、および処置するための組成物および方法を提供する。具体的には、ある種の態様において、本発明は、Notch受容体に結合する、アンタゴニストを含めた、薬剤ならびにヒト患者において腫瘍成長を阻害しかつがんまたは他の疾患を処置するために薬剤またはアンタゴニストを使用する方法を提供する。ある種の態様において、アンタゴニストは、ヒトNotch受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に特異的に結合する抗体である。

10

【0094】

一つの局面において、本発明は、ヒトNotch1受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合性の膜近位領域に特異的に結合する抗体を提供する。いくつかの態様において、抗体は、大体アミノ酸1427番目から大体アミノ酸1732番目までを含むヒトNotch1の領域に結合する。いくつかの態様において、抗体は、SEQ ID NO:2を含む領域に結合する。ある種の態様において、抗体は、少なくとも一つのさらなるNotch受容体の、細胞外ドメインの非リガンド結合性の膜近位領域に特異的に結合する。

20

【0095】

いくつかの態様において、抗体はヒトNotch1のアンタゴニストである。ある種の態様において、抗体はリガンドによるNotch1経路のシグナル伝達を阻害する。いくつかの態様において、抗体はNotch1の活性を阻害する。他の態様において、抗体はNotch1受容体の切断を阻害する。いくつかの態様において、抗体は細胞外ドメインの膜近位領域内の位置でのNotch1の切断を阻害する。ある種の態様において、抗体はNotch1の細胞内ドメイン(ICD)の放出または形成を阻害する。他の態様において、抗体は、がん幹細胞を含む腫瘍の腫瘍形成性を低下させる。ある種の態様において、抗体は、がん幹細胞を含む腫瘍の成長を阻害する。ある種の態様において、抗体は腫瘍の成長を阻害する。

【0096】

ある種の態様において、ヒトNotch1受容体の細胞外ドメインの膜近位領域に特異的に結合しかつ腫瘍成長を阻害する抗体は、モノクローナル抗体である。ある種の態様において、ヒトNotch1受容体の細胞外ドメインの膜近位領域に特異的に結合する抗体はキメラ抗体であり、ヒト化抗体であり、ヒト抗体であり、抗体断片であり、または二重特異性抗体である。ある種の態様において、本発明は、ヒトNotch1受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合性の膜近位領域に特異的に結合しかつ腫瘍成長を阻害する抗体を産生するハイブリドーマを提供する。

30

【0097】

別の局面において、本発明は、対象における腫瘍の成長を阻害する方法であって、ヒトNotch1受容体タンパク質の細胞外ドメインの非リガンド結合性の膜近位領域に特異的に結合する抗体の治療的有効量を対象に投与する段階を含む、該方法を提供する。いくつかの態様において、腫瘍はがん幹細胞を含む。いくつかの態様において、該方法は抗体でがん幹細胞を標的化する段階を含む。ある種の態様において、腫瘍の成長を阻害する方法は、モノクローナル抗体の治療的有効量を投与する段階を含む。ある種の態様において、腫瘍の成長を阻害する方法は、キメラ抗体の治療的有効量を投与する段階を含む。ある種の態様において、腫瘍の成長を阻害する方法は、ヒト化抗体の治療的有効量を投与する段階を含む。ある種の態様において、腫瘍の成長を阻害する方法は、ヒト抗体の治療的有効量を投与する段階を含む。

40

【0098】

ある種の態様において、腫瘍の成長を阻害する方法は、腫瘍中のがん幹細胞の頻度を低

50

下させる段階、腫瘍中のがん幹細胞の数を低下させる段階、腫瘍の腫瘍形成性を低下させる段階、および/または腫瘍中のがん幹細胞の数もしくは頻度を低下させることにより腫瘍の腫瘍形成性を低下させる段階を含む。いくつかの態様において、腫瘍の成長を阻害する方法は、Notch1受容体の活性を阻害する段階を含む。ある種の態様において、腫瘍は、乳房腫瘍、結腸直腸腫瘍、肝臓腫瘍、腎臓腫瘍、肺腫瘍、膵臓腫瘍、卵巣腫瘍、前立腺腫瘍および頭頸部腫瘍を含むが、これらに限定されることはない。

【0099】

別の局面において、本発明は、ヒトNotch1受容体タンパク質の細胞外ドメインの非リガンド結合性の膜近位領域に特異的に結合しかつ対象における腫瘍成長を阻害する抗体の治療的有効量を対象に投与する段階を含む、処置を必要とする対象におけるがんを処置する方法を提供する。ある種の態様において、がんを処置する方法はモノクローナル抗体の治療的有効量を投与する段階を含む。ある種の態様において、がんを処置する方法はキメラ抗体の治療的有効量を投与する段階を含む。ある種の態様において、がんを処置する方法はヒト化抗体の治療的有効量を投与する段階を含む。ある種の態様において、がんを処置する方法はヒト抗体の治療的有効量を投与する段階を含む。

10

【0100】

ある種の態様において、がんを処置する方法は、ヒトNotch1受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合性の膜近位領域に特異的に結合しかつ腫瘍成長を阻害する、細胞傷害性部分に結合された抗体の治療的有効量を投与する段階を含む。ある種の態様において、がんを処置する方法は、放射線療法と組み合わせて、該局面および/または態様、ならびに本明細書において記述されている他の局面および/または態様のいずれかの抗体の治療的有効量を投与する段階を含む。ある種の態様において、がんを処置する方法は、化学療法と組み合わせて、該局面および/または態様、ならびに本明細書において記述されている他の局面および/または態様のいずれかの抗体の治療的有効量を投与する段階を含む。ある種の態様において、がんを処置する方法は、ヒトNotch1受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合性の膜近位領域に特異的に結合しかつ乳房腫瘍、結腸直腸腫瘍、肺腫瘍、膵臓腫瘍、前立腺腫瘍または頭頸部腫瘍を含むが、これらに限定されない、腫瘍に由来する腫瘍成長を阻害する抗体の治療的有効量を投与する段階を含む。

20

【0101】

ある種の態様において、がんを処置する方法は、ヒトNotch1受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合性の膜近位領域に特異的に結合する抗体を含む遺伝子検査を用いて処置を必要とする患者を特定する段階；および患者に該抗体の治療的有効量を投与する段階を含む。ある種の態様において、がんを処置する方法は、がん幹細胞シグネチャーを検出する遺伝子検査を用いてヒトNotch1受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合性の膜近位領域に特異的に結合する抗体による処置を必要とする患者を特定する段階、およびヒトNotch1受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合性の膜近位領域に特異的に結合しかつ腫瘍成長を阻害する抗体の治療的有効量を投与する段階を含む。

30

【0102】

別の局面において、本発明は、ヒトNotch1受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合性の膜近位領域に結合しかつ腫瘍成長を阻害する分子を特定する方法であって、i) ヒトNotch1受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合性の膜近位領域とともに該分子をインキュベートする段階；ii) 該分子がヒトNotch1受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合性の膜近位領域に結合するかどうかを決定する段階；およびiii) 該分子が腫瘍成長を阻害するかどうかを決定する段階を含む、該方法を提供する。ある種の態様において、本発明は、ヒトNotch1受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合性の膜近位領域に結合しかつ腫瘍成長を阻害する分子を特定する方法であって、i) SEQ ID NO:2を含む、ヒトNotch1受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合性の膜近位領域とともに該分子をインキュベートする段階；ii) 該分子が、SEQ ID NO:2を含む、ヒトNotch1受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合性の膜近位領域に結合するかどうかを決定する段階；およびiii) 該分子が腫瘍成長を阻害するかどうかを決定する段階を含む、該方法を提供する。

40

50

【0103】

ある種の態様において、本発明は、ヒトNotch1受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合性の膜近位領域に特異的に結合しかつ腫瘍成長を阻害する抗体を含む薬学的組成物を提供する。

【0104】

ある種の態様において、本発明は、ヒトNotch1受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合性の膜近位領域に特異的に結合しかつ腫瘍成長を阻害する抗体を作出する方法を提供する。

【0105】

ある種の態様において、本発明は、ヒトNotch1受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合性の膜近位領域に特異的に結合しかつ腫瘍成長を阻害する抗体をコードする単離された核酸を提供する。

【0106】

ある種の態様において、Notch1などの、Notch受容体に対するアンタゴニストは細胞外で作用して、Notch受容体の機能に作用するかまたはその機能を阻害する。ある種の態様において、Notch受容体のアンタゴニストはタンパク質性である。いくつかの態様において、Notch1受容体のタンパク質性アンタゴニストは、Notch1受容体の細胞外エピトープに特異的に結合する抗体である。Notch1受容体に対するアンタゴニストの細胞外結合は、Notch1受容体の内因性の活性化(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、Notch受容体の、そのリガンドの一つとの相互作用を立体的に阻害することによりNotch受容体のシグナル伝達を阻害することができる。さらに、Notch受容体に対するアンタゴニストの細胞外結合は、例えば、Notch受容体の内部移行、および/またはNotch受容体の細胞表面輸送の減少によってなど、Notch受容体の細胞表面発現を下方調節することができる。Notch受容体に対するアンタゴニストの細胞外結合は、Notch受容体の切断を阻害し、かつNotchのICDの放出を低減しうる。

【0107】

いくつかの態様において、Notch受容体に対するアンタゴニストはNotch受容体に結合しかつ以下の効果の一つまたは複数を及ぼす：腫瘍細胞の増殖を阻害する、腫瘍細胞において直接的に細胞死を誘発する、または腫瘍細胞の転移を抑制する。ある種の態様において、Notch受容体のアンタゴニストは、結合されている毒素、化学療法剤、放射性同位体、または他のそのような薬剤により細胞死を誘発する。例えば、Notch受容体に対する抗体は、Notch受容体を発現する腫瘍細胞においてタンパク質内部移行により活性化される毒素に結合される。他の態様において、Notch受容体のアンタゴニストは、Notch受容体を発現する細胞の細胞死を、抗体依存性細胞傷害(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、細胞溶解を媒介することができる(Dillman, 1994, J. Clin. Oncol. 12:1497)。いくつかの態様において、Notch受容体のアンタゴニストは補体依存性細胞傷害(CDC)を活性化することによって、Notch受容体を発現する細胞の細胞死を誘発する抗体である。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。抗体の生物学的活性は、抗体分子の定常ドメインまたはFc領域により、かなりの程度まで、決定されることが知られている(Uananeu and Benacerraf, Textbook of Immunology, 2nd Edition, Williams & Wilkins, p.218 (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り、同じサブクラスのしかし異なる種由来の抗体も同様である。ヒト抗体のうち、IgMは、補体に結合する最も効率的なクラスの抗体であって、これに続くのがIgG1、IgG3およびIgG2であるのに対し、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; Jefferys et al., 1998, Immunol. Rev. 163:59-76)。本発明によれば、所望の生物学的活性を有するクラスの抗体が調製される。

【0108】

Notch受容体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による標的細胞の溶解を媒介する能力をアッセイすることができる。関心対象の細胞をインビトロで成長させ標識する；抗体を、抗原抗体複合体によって活性化されうる血清補体または免疫細胞のどちらかと一緒に細胞培養物に加える。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、補体および/または免疫細胞の供給源として患者自身の血清を用いて、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できるまたはADCCを媒介できる抗体を次いで、その特定の患者において治療的に用いることができる。

【0109】

ある種の態様において、Notch結合剤またはアンタゴニストは、一つまたは複数のエフェクタ機能を持たない抗体である。例えば、いくつかの態様において、抗体には抗体依存性細胞傷害(ADCC)活性がない、かつ/または補体依存性細胞傷害(CDC)活性がない。ある種の態様において、抗体は、Fc受容体および/または補体因子に結合しない。ある種の態様において、抗体にはエフェクタ機能がない。

10

【0110】

他の態様において、Notch受容体のアンタゴニストは、血管形成を阻害することによって間接的に細胞死を誘発することができる。血管形成は、既存の血管から新しい血管が形成される過程であり、例えば、胚発生、創傷治癒の間の、および排卵にตอบสนองの、正常な成長に必要な基本的過程である。1~2 mm²を上回る充実性腫瘍の成長もまた、栄養素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。したがってある種の態様において、Notch受容体のアンタゴニストは、例えば、内皮細胞、平滑筋細胞を含む、Notch受容体を発現する血管細胞、または血管の構築に必要な細胞外マトリックスの成分を標的とする。他の態様において、Notch受容体のアンタゴニストは、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。

20

【0111】

本発明は、抗体および抗体の断片を含むがこれらに限定されない、種々のポリペプチドを提供する。ある種の態様において、ポリペプチドは単離される。ある種の代替の態様において、ポリペプチドは実質的に純粋である。

【0112】

ある種の態様において、本発明のポリペプチドは、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:28またはSEQ ID NO:32の配列を含む組み換えポリペプチド、天然ポリペプチドまたは合成ポリペプチド(表示したシグナル配列ありまたはなし)であることができる。

30

【0113】

本発明は、それぞれ、SEQ ID NO:10および/またはSEQ ID NO:4に示されている重鎖および/または軽鎖を含むポリペプチド(表示した推定シグナル配列ありまたはなし)を提供する。ある種の態様において、ポリペプチドは抗体である。ある種の態様において、ポリペプチドは、ヒトNotch1受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合性の膜近位領域に特異的に結合する。

【0114】

40

本発明はさらに、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:28もしくはSEQ ID NO:32および/またはSEQ ID NO:14もしくはSEQ ID NO:24を含むポリペプチドを提供する。ある種の態様において、ポリペプチドは、SEQ ID NO:8を含んだ可変軽鎖配列およびSEQ ID NO:14を含んだ可変重鎖配列を含む。ある種の態様において、ポリペプチドは、SEQ ID NO:28を含んだ可変軽鎖配列およびSEQ ID NO:24を含んだ可変重鎖配列を含む。ある種の態様において、ポリペプチドは、SEQ ID NO:32を含んだ可変軽鎖配列およびSEQ ID NO:24を含んだ可変重鎖配列を含む。ある種の態様において、ポリペプチドは抗体である。ある種の態様において、ポリペプチドは、ヒトNotch1受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合性の膜近位領域に特異的に結合する。

【0115】

50

本発明のアミノ酸配列のなかにはタンパク質の構造または機能に顕著な影響を与えないで変えられるものもあることが当技術分野において認識されるであろう。配列のそのような差異が企図されるなら、活性を決定するタンパク質上の重要な領域が存在することを忘れてはならない。したがって、本発明はさらに、実質的な活性を示すポリペプチドの変種を含む。そのような変異体は欠失、挿入、逆位、反復およびタイプ置換を含む。どのアミノ酸変化が表現型のうえでサイレントである可能性が高いかに関する指針をBowie, J.U., et al., 「Deciphering the Message in Protein Sequences: Tolerance to Amino Acid Substitutions」, Science 1990, 247:1306-1310のなかで見出すことができる。

【0116】

したがって、本発明のポリペプチドの断片、誘導体または類似体は、(i) アミノ酸残基の一つもしくは複数が保存もしくは非保存アミノ酸残基(多くの場合には保存アミノ酸残基)と置換され、このような置換されたアミノ酸残基が遺伝暗号によってコードされるものであってもなくてもよいもの;あるいは(ii) アミノ酸残基の一つもしくは複数が置換基を含むもの;あるいは(iii) 成熟ポリペプチドがポリペプチドの半減期を増大させる化合物(例えば、ポリエチレングリコール)のような、別の化合物と融合されているもの;あるいは(iv) リーダーもしくは分泌配列、または成熟ポリペプチドもしくはプロタンパク質配列の精製のために利用される配列のような、さらなるアミノ酸が成熟ポリペプチドに融合されているものであることができる。そのような断片、誘導体および類似体は本明細書における教示の範囲内であるものと見なされる。

【0117】

特に興味深いのは、荷電アミノ酸と別の荷電アミノ酸との、および中性または負に荷電したアミノ酸との置換である。後者は、正荷電の低下したタンパク質をもたらす。凝集の阻止は非常に望ましい。タンパク質の凝集は活性の喪失をもたらすだけでなく、それらは免疫原となりうるので、薬学的処方物の調製時の問題にもなりうる(Pinckard et al., Clin. Exp. Immunol. 1967, 2:331-340, Robbins et al., Diabetes 1987, 36:838-845; Ciland et al. Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Systems 1993, 10:307-377)。

【0118】

もちろん、作出されるアミノ酸置換の数は、本明細書において記述されるものを含め、多くの要因に依る。ある種の態様において、任意の所与のポリペプチドに対する置換の数は50、40、30、25、20、15、10または3個超ではないであろう。

【0119】

本発明のポリペプチドは、SEQ ID NO:14のポリペプチド、ならびにSEQ ID NO:14のポリペプチドに対して少なくとも90%の類似性(ある時には少なくとも90%の配列同一性)およびSEQ ID NO:14のポリペプチドに対して少なくとも95%の類似性(ある時には少なくとも95%の配列同一性)を有するポリペプチド、さらに他の態様において、SEQ ID NO:14のポリペプチドに対して少なくとも96%、97%、98%または99%の類似性(ある時には96%、97%、98%または99%の配列同一性)を有するポリペプチドを含む。本発明のポリペプチドは、SEQ ID NO:8のポリペプチド、ならびにSEQ ID NO:8のポリペプチドに対して少なくとも90%の類似性(ある時には少なくとも90%の配列同一性)およびSEQ ID NO:8のポリペプチドに対して少なくとも95%の類似性(ある時には少なくとも95%の配列同一性)を有するポリペプチド、さらに他の態様において、SEQ ID NO:8のポリペプチドに対して少なくとも96%、97%、98%または99%の類似性(ある時には96%、97%、98%または99%の配列同一性)を有するポリペプチドを含む。当技術分野において公知のように、二つのポリペプチド間の「類似性」は、一つのポリペプチドのアミノ酸配列およびその保存アミノ酸置換物を第二のポリペプチドの配列と比較することによって決定される。

【0120】

ペプチド合成によって対応する全長ポリペプチドを産生するために、本発明のポリペプチドの断片または部分を利用することができる;それゆえ、断片を、全長ポリペプチドを産生するための中間体として利用することができる。本発明のポリヌクレオチドの断片または一部を用いて、本発明の全長ポリヌクレオチドを合成することができる。

【0121】

ある種の態様において、本発明のタンパク質の断片は、Notch1受容体タンパク質に結合できるタンパク質の一部または全部である。この断片はNotch受容体またはNotch1受容体のリガンドに対して高い親和性を有する。融合タンパク質のある種の断片は、免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部に融合されたポリペプチド剤またはアンタゴニストのNotch結合ドメインの少なくとも一部を含むタンパク質断片である。親和性は、典型的には、約 10^{-11} ~ 10^{-12} Mの範囲内であるが、親和性は、異なるサイズの断片に応じて 10^{-7} ~ 10^{-13} Mの範囲で相当に変化することができる。いくつかの態様において、断片は、約10~100アミノ酸長であり、免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部に連結されたポリペプチド剤またはアンタゴニストのNotch結合ドメインを含む。

10

【0122】

ポリペプチドおよび類似体をさらに修飾して、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むようにすることができる。それらの誘導体化された部分は、タンパク質の溶解度、生物学的半減期および/または吸収を改善することができる。その部分はまた、タンパク質などの任意の望ましくない副作用を低減させるかまたは除去することができる。化学的部分の概要は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 20th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (2000)のなかで見出すことができる。

【0123】

本明細書において記述される単離されたポリペプチドを、当技術分野において公知の任意の適当な方法により産生することができる。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当な形質変換宿主中でのその配列の発現まで、さまざまである。

20

【0124】

組み換え法のいくつかの態様においては、関心対象の野生型タンパク質をコードするDNA配列を単離または合成することによって、DNA配列を構築する。任意で、部位特異的突然変異誘発によって配列を突然変異誘発し、その機能的類似体を提供してもよい。例えば、Zoeller et al., Proc.-Nat Acad. Sci. USA 1984, 81:5662-5066および米国特許第4,588,585号を参照されたい。関心対象のポリペプチドをコードするDNA配列を構築する別の方法は、オリゴヌクレオチド合成機を用いる化学合成によるものであろう。所望のポリペプチドのアミノ酸配列に基づき、関心対象の組み換えポリペプチドを産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デザインすることができる。

30

【0125】

標準的方法を適用して、関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、次に核酸連結することができる。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。

40

【0126】

(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変異体DNA配列を発現ベクターへ挿入し、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する。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、宿主中でトランスフェクト遺伝子の高い発現レベルを得るためには、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する。

【0127】

50

本発明はNotch1受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合性の膜近位領域に対する単離された抗体を提供する。抗体、または抗体断片は、Notch1の細胞外ドメインの膜近位領域を特異的に認識する任意のモノクローナルまたはポリクローナル抗体であることができる。いくつかの態様において、本発明は、本明細書において記述のヒトNotch1の細胞外ドメインの膜近位領域に特異的に結合するモノクローナル抗体、またはその断片を提供する。いくつかの態様において、モノクローナル抗体、またはその断片は、本明細書において記述のヒトNotch1受容体の細胞外ドメインの膜近位領域に特異的に結合するキメラ抗体またはヒト化抗体である。他の態様において、モノクローナル抗体、またはその断片は、本明細書において記述のヒトNotch1受容体の細胞外ドメインの膜近位領域に特異的に結合するヒト抗体である。

10

【0128】

Notch1受容体の細胞外ドメインの膜近位領域に対する抗体は、本明細書において記述される実験方法、診断方法および治療方法において用途が見つかる。ある種の態様において、本発明の抗体は、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Notch1受容体の発現を検出するために用いられる。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、タンパク質を検出してよい。あるいは、試料から個々の細胞を単離し、固定細胞または生細胞にて、FACS分析によりタンパク質発現を検出してよい。さらに、抗体をタンパク質アレイ上で用いて、Notch1受容体の発現を、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してよい。他の態様において、インビトロの細胞に基づくアッセイまたはインビボの動物モデルにおいて抗体を腫瘍細胞と接触させることによって腫瘍細胞の成長を阻害するために、本発明の抗体が用いられる。さらに他の態様において、Notch1受容体の細胞外ドメインの膜近位領域に対する抗体の治療的有効量を投与することによってヒト患者におけるがんを処置するために、抗体が用いられる。

20

【0129】

ポリクローナル抗体は任意の公知の方法によって調製することができる。ポリクローナル抗体は、任意でキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)、血清アルブミンなどに結合され、無菌食塩水中で希釈され、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)と組み合わせられて安定な乳剤を形成してもよい、関連抗原(精製されたペプチド断片、全長の組み換えタンパク質、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、ヤギ、ロバなど)を免疫することにより作製される。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。集めた血液を凝血し、血清をデカントし、遠心分離によって清澄化し、抗体価をアッセイする。ポリクローナル抗体を血清または腹水から、親和性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において標準的な方法によって精製することができる。

30

【0130】

モノクローナル抗体をKohler and Milstein, 1975, Nature 256:495-497によって記述されているものなどの、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する。あるいは、リンパ球をインビトロで免疫してもよい。免疫の後、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、未融合のリンパ球およびミエローマ細胞から分離選択することができる。免疫沈降、免疫プロットングによって、または放射免疫アッセイ(RIA)もしくは酵素連結免疫吸着アッセイ(ELISA)のようなインビトロでの結合アッセイによって決定した、選択抗原に対して特異的に作製されたモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを次いで、標準的な方法(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, 1986)を用いるインビトロでの培養で、または動物中の腹水腫瘍としてインビボで増殖させることができる。モノクローナル抗体を次に、ポリクローナル抗体について上述

40

50

したように、培地または腹水から精製することができる。

【0131】

本発明のいくつかの態様において、抗体は、ヒトNotch1受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合性の膜近位領域に特異的に結合する抗体である。いくつかの態様において、抗体は、SEQ ID NO:14に対して少なくとも90%の配列同一性を有する重鎖可変領域；および/またはSEQ ID NO:8に対して少なくとも90%の配列同一性を有する軽鎖可変領域を含む。いくつかの態様において、抗体は、SEQ ID NO:14に対して少なくとも95%の配列同一性を有する重鎖可変領域、および/またはSEQ ID NO:8に対して少なくとも95%の配列同一性を有する軽鎖可変領域を含む。いくつかの態様において、抗体は、モノクローナル抗体または抗体断片である。

10

【0132】

ある種の態様において、本発明は、ヒトNotch1の細胞外ドメインの非リガンド結合性の膜近位領域に結合しかつRGYWIE (SEQ ID NO:15)を含んだ重鎖CDR1、QILPGTGRTNYNEKFKG (SEQ ID NO:16)

を含んだ重鎖CDR2、および/またはFDGNYGYAMDY (SEQ ID NO:17)を含んだ重鎖CDR3を含む抗体を提供する。いくつかの態様において、抗体は、RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:18)を含んだ軽鎖CDR1、GTNNRAP (SEQ ID NO:19)を含んだ軽鎖CDR2、および/またはALWYSNHWWFGGGTKL (SEQ ID NO:20)

を含んだ軽鎖CDR3をさらに含む。いくつかの態様において、抗体は、RGYWIE (SEQ ID NO:15)を含んだ重鎖CDR1、

20

QILPGTGRTNYNEKFKG (SEQ ID NO:16)

を含んだ重鎖CDR2、および/またはFDGNYGYAMDY (SEQ ID NO:17)を含んだ重鎖CDR3；ならびにRSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:18)を含んだ軽鎖CDR1、GTNNRAP (SEQ ID NO:19)を含んだ軽鎖CDR2、および/または

ALWYSNHWWFGGGTKL (SEQ ID NO:20)

を含んだ軽鎖CDR3を含む。いくつかの態様において、抗体は、(a) RGYWIE (SEQ ID NO:15)を含んだ重鎖CDR1、または1、2、3もしくは4個のアミノ酸置換を含んだその変種；(b)

QILPGTGRTNYNEKFKG (SEQ ID NO:16)

を含んだ重鎖CDR2、または1、2、3もしくは4個のアミノ酸置換を含んだその変種；および/あるいは(c) FDGNYGYAMDY (SEQ ID NO:17)を含んだ重鎖CDR3、または1、2、3もしくは4個のアミノ酸置換を含んだその変種を含む重鎖可変領域を含む。他の態様において、抗体は、(a) RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:18)を含んだ軽鎖CDR1、または1、2、3もしくは4個のアミノ酸置換を含んだその変種；(b) GTNNRAP (SEQ ID NO:19)を含んだ軽鎖CDR2、または1、2、3もしくは4個のアミノ酸置換を含んだその変種；および/あるいは(c) ALWYSNHWWFGGGTKL (SEQ ID NO:20)

30

を含んだ軽鎖CDR3、または1、2、3もしくは4個のアミノ酸置換を含んだその変種を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの態様において、アミノ酸置換は保存的アミノ酸置換である。

【0133】

いくつかの態様において、本発明は、ブダペスト条約の条件の下、2008年8月7日付でATCCに寄託され、番号PTA-9405を割り当てられたハイブリドーマ細胞株により産生される抗体52M51を提供する。いくつかの態様において、抗体は52M51のヒト化型である。いくつかの態様において、抗体は、ブダペスト条約の条件の下、2008年10月15日付でATCCに寄託され、番号PTA-9549を割り当てられたDNAによってコードされる、52M51のヒト化型「52M51 H4L3」である。いくつかの態様において、抗体は、52M51のヒト化型「52M51 H4L4」である。いくつかの態様において、本発明は、抗体52M51が結合するエピトープと同じエピトープに結合する抗体を提供する。他の態様において、本発明は、ヒトNotch1受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合性の膜近位領域への特異的な結合について、上記の態様および/または局面、ならびに本明細書中のほかの箇所に記述した他の局面/態様に記述の抗体

40

50

のいずれかと競合する抗体を提供する。抗体を含む薬学的組成物、および該抗体の治療的有効量を投与する段階を含むがんを処置する方法も提供される。

【0134】

いくつかの態様において、本発明は、ブダペスト条約の条件の下、2008年10月15日付でATCCに寄託され、番号PTA-9548を割り当てられたDNAによってコードされる、抗体52R43を提供する。いくつかの態様において、本発明は、抗体52R43が結合するエピトープと同じエピトープに結合する抗体を提供する。いくつかの態様において、本発明は、52R43のCDRの一つ、二つ、三つ、四つ、五つおよび/または六つを含む抗体を提供する。他の態様において、本発明は、52R43と競合する抗体を提供する。抗体を含む薬学的組成物、および該抗体の治療的有効量を投与する段階を含むがんを処置する方法も提供される。

10

【0135】

あるいは、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ように組み換えDNA法によって作出することもできる。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、例えば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たRT-PCRによって単離し、その配列を従来の手順によって決定する。重鎖および軽鎖をコードする単離ポリヌクレオチドを次いで、適当な発現ベクターにクローニングし、これを次いで、他の形では免疫グロブリンタンパク質を産生しない大腸菌(*E. coli*)細胞、サル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、宿主細胞にトランスフェクトする。宿主細胞をモノクローナル抗体の産生についてスクリーニングし、所望の特異性を有する抗体を選択する。また、所望の種の組み換えモノクローナル抗体またはその断片を記述(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)のように、ファージディスプレイライブラリから単離することもできる。

20

【0136】

モノクローナル抗体をコードするポリヌクレオチドを、組み換えDNA技術を用いていくつかの異なる方法でさらに修飾して、代替の抗体を作出することができる。いくつかの態様において、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ドメインを1) 例えば、ヒト抗体のその領域に置き換えてキメラ抗体を作出してもよく、または2) 非免疫グロブリンポリペプチドに置き換えて融合抗体を作出してもよい。他の態様において、定常領域を切断または除去して、モノクローナル抗体の所望の断片を作出する。さらに、可変領域の部位特異的または高密度突然変異誘発を用いて、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もできる。

30

【0137】

より一般的には、本発明において有用な修飾抗体を任意の抗体から得るまたは導出することができる。さらに、開示される修飾抗体を作出するために用いられる親抗体もしくは前駆体抗体、またはその断片はマウス、ヒト、キメラ、ヒト化されたもの、非ヒト霊長類または霊長類化されたものであることができる。他の態様において、本発明の修飾抗体は、本明細書において記述の改変された定常ドメインを有する一本鎖抗体構築体(参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第5,892,019号に開示されているものなどの)を含むことができる。その結果、本明細書における教示にしたがって修飾された抗体のこれらのタイプのいずれも本発明に適合する。

40

【0138】

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産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発現ライブラリ(Huse, et al., 1989, *Science*, 246: 1275-1281)の構築に適合させて、Notch、またはその誘導体、断片、類似体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る。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産生される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作出されるFa

50

b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作出されるFab断片、ならびに(d) Fv断片を含むが、これらに限定されない、当技術分野における技術によって産生することができる。

【0139】

二重特異性抗体も本発明の範囲内である。二重特異性抗体は、少なくとも二つの異なる抗原に対する結合特異性を持つモノクローナル抗体であり、好ましくはヒト抗体またはヒト化抗体である。

【0140】

二重特異性抗体を作出するための方法は当技術分野において公知である。例えば、この場合、結合特異性の一方は本発明の抗原ポリペプチド(Notch1またはその断片)に対するものであり、もう一方の結合標的はその他任意の抗体であり、有利には細胞表面タンパク質、または受容体もしくは受容体サブユニットである。二重特異性抗体の組み換えによる産生は二つの免疫グロブリン重鎖/軽鎖の対の同時発現に基づき、ここでは二つの重鎖が異なる特異性を有する(Milstein and Cuello, Nature 1983, 305:537-539)。免疫グロブリン重鎖および軽鎖の無作為な組み合わせのため、これらのハイブリドーマ(クアドローマ)は10種の異なる抗体分子の混合物を生じる可能性があり、そのうちの一つだけが的確な二重特異性構造を有する。的確な分子の精製は、通常、親和性クロマトグラフィーによって達成される。

【0141】

所望の結合特異性を有する抗体可変ドメインを免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合させることができる。融合は、ヒンジの少なくとも一部を含む、免疫グロブリン重鎖定常ドメインCH2およびCH3領域とである。軽鎖の結合に必要な部位を含んだ第一の重鎖定常領域(CH1)が融合体の少なくとも一方に存在することができる。免疫グロブリン重鎖融合体および、所望なら、免疫グロブリン軽鎖をコードするDNAを、別個の発現ベクターに挿入し、それから適当な宿主生物に同時にトランスフェクトする。二重特異性抗体の作出に関するさらなる詳細は、Suresh et al., Methods in Enzymology 1986, 121:210のなかで見出すことができる。

【0142】

二重特異性抗体は全長抗体または抗体断片として調製することができる。抗体断片から二重特異性抗体を作出するための技術は文献に記述されている。例えば、二重特異性抗体は化学的連結を用いて調製することができる。さらに、Brennan et al., Science 1985, 229:81には、インタクトな抗体をタンパク質分解により切断してF(ab')₂断片を作出する手順について記述されている。

【0143】

さらに、Fab'断片を大腸菌から直接回収し、二重特異性抗体を形成するよう化学的にカップリングさせることができる(Shalaby et al., J. Exp. Med. 1992, 175:217-225)。これらの方法を、完全にヒト化された二重特異性抗体F(ab')₂分子の産生において用いることができる。

【0144】

三以上の価数を有する抗体も企図される。例えば、三重特異性抗体を調製することができる(Tutt et al., 1991, J. Immunol. 147:60)。

【0145】

本発明はまた、Notch1受容体の細胞外ドメインの膜近位領域を特異的に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、結合しうる抗体である。異なるエピトープは、同じ分子(例えば同じNotch1)内に存在してもよく、あるいは異なる分子上に存在して、例えば、抗体はNotch1受容体、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分子、あるいは2) 以下で詳細に記述する細胞傷害剤の両方を特異的に認識し結合しうる。二重特異性抗体はインタクトな抗体または抗体断片であることができる。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

10

20

30

40

50

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; Kostelny 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)。

【0146】

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、そのうち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、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、細胞傷害剤を、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、細胞傷害剤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。

10

【0147】

ヘテロ結合体抗体も本発明の範囲内である。ヘテロ結合体抗体は、共有結合した二つの抗体から構成される。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、またはチオエーテル結合を形成させて、免疫毒素を構築することができる。この目的に適した試薬の例として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挙げられる。

20

【0148】

本発明の目的のためには、修飾抗体が、Notch1受容体の細胞外ドメインの膜近位領域と抗体との結合をもたらす任意のタイプの可変領域を含んでもよいと理解されよう。この点で、可変領域は、液性応答の開始および所望の腫瘍関連抗原に対する免疫グロブリンの作出を誘導できる、任意のタイプの哺乳動物のものを含むかまたはそれに由来するかである。このように、修飾抗体の可変領域は、例えば、ヒト、マウス、非ヒト霊長類(例えばカニクイザル、マカクなど)またはオオカミ由来のものであることができる。いくつかの態様において、修飾された免疫グロブリンの可変領域も定常領域もともにヒト由来である。他の態様において、適合性を有する抗体(通常は非ヒト供給源に由来する)の可変領域を遺伝子操作するかまたは特異的に調整するかして、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かである。この点で、本発明において有用な可変領域を、ヒト化するかまたはさもなければ移入されたアミノ酸配列の包含を通じて改変することができる。

30

【0149】

本発明のいくつかの態様において、Notch1受容体の細胞外ドメインの膜近位領域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、可変領域内に非ヒト(例えば、マウス)抗体由来の最小限の配列を含む抗体である。そのような抗体を治療的に用いて、ヒト対象に投与した時の抗原性およびHAMA(ヒト抗マウス抗体)応答を低下させる。実際、ヒト化抗体は、典型的には、最小限の非ヒト配列を持つものから非ヒト配列を全く持たないヒト抗体である。ヒト抗体は、ヒトによって産生される抗体、またはヒトによって産生される抗体に対応するアミノ酸配列を有する抗体である。

40

【0150】

当技術分野において公知のさまざまな技術を用いてヒト化抗体を産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/または能力を有する非ヒト抗体のCDR(例えば、マウス、ラット、ウサギ、ハムスターなど)と置換することによって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/または交換された非ヒト残基内のいずれかの追加の残基の置換によってヒト化抗体をさらに修飾し、抗体の特異性、親和性、および/または能力を洗

50

練し、最適化することができる。

【0151】

本発明のいくつかの態様において、抗体は、ヒトNotch1受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合性の膜近位領域に特異的に結合するヒト化抗体である。いくつかの態様において、抗体は、SEQ ID NO:24に対して少なくとも90%の配列同一性を有する重鎖可変領域；および/またはSEQ ID NO:28もしくはSEQ ID NO:32に対して少なくとも90%の配列同一性を有する軽鎖可変領域を含む。いくつかの態様において、抗体は、SEQ ID NO:24に対して少なくとも95%の配列同一性を有する重鎖可変領域；および/またはSEQ ID NO:28もしくはSEQ ID NO:32に対して少なくとも95%の配列同一性を有する軽鎖可変領域を含む。

【0152】

いくつかの態様において、ヒト化抗体は、SEQ ID NO:24の重鎖可変領域、およびSEQ ID NO:28の軽鎖可変領域を含む。いくつかの態様において、ヒト化抗体は、SEQ ID NO:24の重鎖可変領域、およびSEQ ID NO:32の軽鎖可変領域を含む。

【0153】

当技術分野において公知のさまざまな技術を用いてヒト抗体を直接調製することができる。インビトロで免疫されたまたは標的抗原に対して作製された抗体を産生する免疫された個体から単離された不死化ヒトBリンパ球を作製することができる(例えば、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)。また、ファージライブラリがヒト抗体を発現するファージライブラリから、ヒト抗体を選択することができる(Vaughan et al., 1996, *Nature Biotechnology*, 14:309-314; Sheets et al., 1998, *PNAS*, 95:6157-6162; Hoogenboom and Winter, 1991, *J. Mol. Biol.*, 227:381; Marks et al., 1991, *J. Mol. Biol.*, 222:581)。免疫によって、ヒト抗体の完全なレパートリーを内在性の免疫グロブリン産生の非存在下で産生できるヒト免疫グロブリン座を含むトランスジェニックマウスで、ヒト化抗体を作出することもできる。例えば、キメラおよび生殖系列変異体マウスにおける抗体重鎖接続領域(J_H)遺伝子のホモ接合欠失が、内在性抗体産生の完全な阻害を結果的にもたらしことが記述されている。ヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子アレイのそのような生殖系列変異体マウスへの移入が抗原刺激によるヒト抗体の産生を結果的にもたらしと考えられている。(例えば、Jakobovits et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551; Jakobovits et al., 1993, *Nature*, 362:255-258; Bruggemann et al., 1993, *Year in Immuno.* 7:33; 米国特許第5,545,807号; 同第5,545,806号; 同第5,569,825号; 同第5,625,126号; 同第5,633,425号; および同第5,661,016号を参照されたい。

【0154】

あるいは、ファージディスプレイ技術を用いて、非免疫ドナー由来の免疫グロブリン可変(V)ドメイン遺伝子レパートリーから、インビトロにおいてヒト抗体および抗体断片を産生することができる。この技術によれば、抗体Vドメイン遺伝子は、M13またはfdなどの糸状バクテリオファージの主要なまたは主要ではない外被タンパク質遺伝子の中にインフレームでクローニングされ、機能的抗体断片としてファージ粒子の表面上に提示される。糸状粒子はファージゲノムの一本鎖DNAコピーを含有するので、抗体の機能的特性に基づく選択によって、それらの特性を示す抗体をコードする遺伝子の選択も行われる。すなわち、ファージはB細胞の特性の一部を模倣する。ファージディスプレイは種々の形式で行うことができる。V遺伝子セグメントのいくつかの供給源をファージディスプレイに用いることができる。免疫マウスの脾臓に由来するV遺伝子の小規模な無作為コンビナトリアルライブラリから抗オキサゾロン抗体の多様なアレイを単離している。非免疫ヒトドナー由来のV遺伝子のレパートリーを構築することができ、抗原の多様なアレイ(自己抗原を含む)に対する抗体を単離することができる。

【0155】

上記のように、ヒト抗体をインビトロにおいて活性化されたB細胞により作出することもできる(米国特許第5,567,610号および同第5,229,275号を参照のこと)。

10

20

30

40

50

【0156】

非ヒト可変ドメイン全体をヒト定常領域に移植することによって「古典的な」キメラ抗体が産生されることが理解されよう。本出願との関連で、「キメラ抗体」という用語は、免疫反応性の領域または部位が第一の種から得られまたは導出され、かつ定常領域(本発明によればインタクトであっても、部分的であってもまたは修飾されていてもよい)が第二の種から得られる任意の抗体を意味するものと考えられる。いくつかの態様において、抗原結合領域または部位は非ヒト供給源(例えばマウス)由来であり、定常領域はヒトのものである。可変領域の免疫原性特異性は一般にその供給源によって影響を受けないが、ヒト定常領域がヒト対象から免疫応答を誘発する可能性は、非ヒト供給源由来の定常領域が誘発するよりも低い。

10

【0157】

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うるが、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ことを強調しなければならない。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、十分に当技術分野の範囲内であろう。

20

【0158】

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が理解されよう。いくつかの態様において、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付加、欠失、または置換を含む。すなわち、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において、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、修飾定常領域を意図する。他の態様において、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体または変種(CH2構築体)を含む。さらに他の態様において、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。

30

【0159】

それらの形状の他に、定常領域がいくつかのエフェクタ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うる。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いくつかの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性細胞傷害、またはADCCと呼ばれる)、炎症性メディエータの放出、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こす。さまざまなFc受容体および受容体部位が

40

50

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、依然として多くで未知である。

【0160】

本発明の範囲を限定するわけではないが、本明細書において記述したように修飾された定常領域を含む抗体は、エフェクタ機能の改変をもたらし、これが、投与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、周知の生化学的技術または分子工学的技術を用いて容易に行うことができる。

10

【0161】

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。他の構築体では、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体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要素を、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、構築体に対する望ましくない免疫応答を誘発する可能性があることが認識されるべきである。したがって、構築体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。

20

【0162】

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ことが認識されよう。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機能(例えば補体CLQ結合)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体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りうる。さらに他の態様は、定常領域へ一つまたは複数のアミノ酸を付加して、エフェクタ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みうる。そのような態様において、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。

30

40

【0163】

本発明のある種の態様において、例えば腫瘍浸透性を増大させるために、インタクトな抗体ではなく、抗体断片を用いることが望ましい可能性がある。抗体断片の産生のためのさまざまな技術が公知である。従来から、これらの断片は、インタクトな抗体のタンパク質分解的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、およびBrennan et al., 1985, Science

50

、229:81)。しかしながら、これらの断片は現在、典型的には、上記のような組み換え宿主細胞によって直接産生されている。したがって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産生が可能である。あるいは、そのような抗体断片を本明細書において記載される抗体ファージライブラリから単離することができる。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、またそれは単一特異性、もしくは二重特異性であってよい。抗体断片産生のための他の技術は、当業者には明らかであろう。

【0164】

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。

【0165】

本発明はさらに、本明細書に示したキメラ抗体、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体を包含する。これらは、例えば、保存的置換突然変異、すなわ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いう。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。

【0166】

本発明はまた、細胞傷害剤に結合された抗体を含む免疫結合体に関する。細胞傷害剤には、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(すなわち、放射性結合体)などが含まれる。そのような免疫結合体の作出に有用な化学療法剤には、例えば、メトトレキサート、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カレート剤が含まれる。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、アプリンA鎖、モデシンA鎖、 β -サルシン、シナアブラギリ(*Aleurites fordii*)タンパク質、ジアンシタンタンパク質、アメリカヤマゴボウ(*Phytolacca 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(*Saponaria 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。いくつかの態様において、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、 ^{90}Y 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{123}I 、 ^{111}In 、 ^{105}Rh 、 ^{153}Sm 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{166}Ho 、 ^{177}Lu 、 ^{186}Re および ^{188}Re などの放射性同位体に結合させることができる。他の態様において、開示された組成物は、薬物、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。抗体と細胞傷害剤の結合体を、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(ジスクシンイミジルスベラートなどの)、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、さまざまな二官能基性タンパク質カップリング剤を用いて作出する。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

10

20

30

40

50

ド(maytansinoids)、トリコテン(trichotheine)、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)との結合体もまた、用いることができる。いくつかの態様において、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)と複合体を形成することができ、その結果生じる分子は、新生細胞にもT細胞などのエフェクタ細胞にも結合する。

【0167】

有用な量を得る方法にかかわらず、本発明の抗体を、いくつかの結合形(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。あるいは、本発明の抗体を非結合形すなわち「裸の」形で用いて、補体依存性細胞傷害(CDC)および抗体依存性細胞傷害(ADCC)を含む対象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、がんの種類および病期、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ことが認識されよう。

10

【0168】

競合アッセイを用いて、二つの抗体が同一のまたは立体的に重なり合うエピトープを認識することによって同じエピトープに結合するかどうかを決定することができる。競合的結合の決定のための当業者に公知の任意の方法(例えば、本明細書中のほかの箇所に記述した免疫アッセイなどの)を用いることができる。

【0169】

当技術分野において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、ウエスタンブロット分析、放射免疫アッセイ、ELISA、「サンドイッチ」免疫アッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降反応、ゲル内拡散沈降反応、免疫拡散アッセイ、凝集反応アッセイ、補体結合アッセイ、免疫放射定量アッセイ、蛍光免疫アッセイ、およびプロテインA免疫アッセイなどの技術を用いる、競合的および非競合的アッセイシステムが含まれるが、これらに限定されることはない。そのようなアッセイは、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 を参照されたく、これはその全体が参照により本明細書に組み入れられる)。

20

30

【0170】

本発明のいくつかの態様において、ELISAを用いて、ヒトNotch1受容体の細胞外ドメインの膜近位領域に対する抗体の免疫特異性を決定する。ELISAアッセイは、抗原を調製する段階、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段階、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フォスファターゼ)の基質などの検出可能な化合物に結合されたがん幹細胞マーカーに対する抗体をウェルに加える段階、ある期間インキュベートする段階および抗原の存在を検出する段階を含む。あるいは、ヒトNotch1受容体の細胞外ドメインの膜近位領域に対する抗体を検出可能な化合物に結合させずに、ヒトNotch1受容体の細胞外ドメインの膜近位領域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。さらに、抗原でウェルをコーティングする代わりに、ヒトNotch1受容体の細胞外ドメインの膜近位領域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に抗原を加えた後で、検出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。検出されたシグナルを増加させるためにパラメータを調節できること、および当技術分野において公知のELISAの他の変形が当業者には公知である(例えば、Ausubel et al, eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York at 11.2.1を参照のこと)。

40

【0171】

Notch1受容体の細胞外ドメインの膜近位領域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、競合的結合アッセイにより決定することができる。競合的結合アッセイの一つの例は、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

50

れた抗原またはその断片もしくは変種と、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アッセイである。抗体のヒトNotch1受容体の細胞外ドメインの膜近位領域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。いくつかの態様において、Biacore動力学分析を用いて、抗体のヒトNotch1受容体の細胞外ドメインの膜近位領域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、表面上に抗原、例えば、Notch1受容体を固定されたチップからの、抗体の結合と解離を分析する段階を含む。

【 0 1 7 2 】

ある種の態様において、本発明は、ヒトNotch1受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合性の膜近位領域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。「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、ならびにさらなるコード配列および/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の形態またはDNAの形態でありうる。DNAはcDNA、ゲノムDNA、および合成DNAを含み、かつ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。本発明のポリヌクレオチドは、RNAの形態またはDNAの形態であってもよく、このDNAにはcDNA、ゲノムDNA、および合成DNAが含まれる。DNAは二本鎖または一本鎖であってもよく、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。

【 0 1 7 3 】

本発明はさらに、断片、類似体および誘導体をコードする上記に記述されたポリヌクレオチドの変種に関する。ポリヌクレオチドの変種は、天然に存在するポリヌクレオチド対立遺伝子変種または天然には存在しないポリヌクレオチド変種でありうる。

【 0 1 7 4 】

上記のように、ポリヌクレオチドは、開示したポリペプチドのコード配列の、天然に存在する対立遺伝子変種であるコード配列を有することができる。当技術分野において公知のように、対立遺伝子変種はポリヌクレオチド配列の代替形態であって、これは一つまたは複数のヌクレオチドの置換、欠失または付加を有し、これはコードされるポリペプチドの機能を実質的に変化させない。

【 0 1 7 5 】

本発明はまた、成熟ポリペプチドのコード配列が同じ読み枠のなかで、宿主細胞からのポリペプチドの発現および分泌を補助す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融合されうる、ポリヌクレオチドを含む。リーダー配列を有するポリペプチドはプレタンパク質であり、宿主細胞により切断されてポリペプチドの成熟型を形成するリーダー配列を有することができる。ポリヌクレオチドはまた、成熟タンパク質にさらに5'アミノ酸残基を加えたものであるプロタンパク質を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、活性な成熟タンパク質が残る。したがって、例えば、本発明のポリヌクレオチドは成熟タンパク質をコードしてもよく、またはプロ配列を有するタンパク質をコードしてもよく、またはプロ配列もプレ配列(リーダー配列)もともに有するタンパク質をコードしてもよい。

【 0 1 7 6 】

本発明のポリヌクレオチドはまた、本発明のポリペプチドの精製を可能にするマーカー配列にインフレームで融合されたコード配列を有することができる。マーカー配列は細菌宿主の場合、マーカーに融合された成熟ポリペプチドの精製をもたらすようにpQE-9ベクターが供給するヘキサヒスチジンタグであることができ、または、例えば、マーカー配列は哺乳動物宿主、例えばCOS-7細胞を用いる場合、ヘマグルチニン(HA)タグであることができる。HAタグは、インフルエンザヘマグルチニンタンパク質に由来するエピトープに相当する(Wilson et al., 1984, Cell 37:767)。

【 0 1 7 7 】

本発明のさらなる態様は、開示される配列に対して少なくとも90%同一の、95%同一の、およびいくつかの態様において、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ポリヌクレオチドを含む単離された核酸分子を含む。いくつかの態様において、ポリヌクレオチドはSEQ ID NO:3、5、7、9、11、13、21、25または29 (シグナル配列ありまたはなし)に対して少なくとも90%同一のヌクレオチド配列を有する。いくつかの態様において、ポリヌクレオチドはSEQ ID NO:7または13に対して少なくとも90%同一のヌクレオチド配列を有する。いくつかの態様において、本発明は、SEQ ID NO:4、6、8、10、12、14、22、23、24、26、27、28、30、31または32のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドとハイブリダイズするポリヌクレオチドを提供する。いくつかの態様において、ポリヌクレオチドはSEQ ID NO:3、5、7、9、11、13、21、25または29のポリヌクレオチドとハイブリダイズする。いくつかの態様において、ポリヌクレオチドはストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の下でハイブリダイズする。

【0178】

本明細書において用いられる場合、「ハイブリダイズする」または「選択的にハイブリダイズする」または「特異的にハイブリダイズする」という語句は、配列が複合混合物(例えば、DNAまたはRNAのライブラリ)中に存在する場合に、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の下で特定のヌクレオチド配列にのみ分子が結合または二重鎖形成することをいう。例えば、Andersen (1998) *Nucleic Acid Hybridization* Springer-Verlag; Ross (ed. 1997) *Nucleic Acid Hybridization* Wileyを参照されたい。

【0179】

本明細書において用いられる場合、「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」という語句は、典型的には核酸の複合混合物の中で、プローブがその標的の部分配列とハイブリダイズするが、他の配列とはハイブリダイズしない条件をいう。ストリンジェントな条件は配列依存的であり、異なる状況では異なるものである。長い配列ほど、それだけ高い温度で特異的にハイブリダイズする。核酸のハイブリダイゼーションのための広範囲に及ぶガイドは、Tijssen, *Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Probes*, 「Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays」(1993)のなかで見出される。一般に、ストリンジェントな条件は、定義したイオン強度での特定の配列に対する熱融解点(T_m)よりも約5~10

低いように選択される。 T_m は、標的に相補的なプローブの50%が平衡状態で標的配列とハイブリダイズする(定義したイオン強度、pH、および核酸濃度の下での)温度である(標的配列が過剰に存在する場合、 T_m では、平衡状態でプローブの50%が占有される)。ストリンジェントな条件は、塩濃度がpH 7.0から8.3で約1.0 M未満のナトリウムイオン、典型的には約0.01から1.0 Mのナトリウムイオン(または他の塩)の濃度であり、短いプローブ(例えば、10から50ヌクレオチド)の場合には温度が少なくとも約30 °Cであり、長いプローブ(例えば、50ヌクレオチドを超える)場合には温度が少なくとも約60 °Cの条件であろう。ストリンジェントな条件は、ホルムアミドなどの不安定化剤の添加によって実現することもできる。高ストリンジェンシーのハイブリダイゼーションの場合、陽性シグナルは少なくともバックグラウンドの2倍、またはバックグラウンドハイブリダイゼーションの10倍である。高ストリンジェンシーまたはストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の例としては、以下が挙げられる: 50%ホルムアミド、5×SSCおよび1% SDSにて42 °Cでインキュベートするか、または5×SSCおよび1% SDSにて65 °Cでインキュベートするかし、0.2×SSCおよび0.1% SDS中にて65 °Cで洗浄する。PCRの場合、アニーリング温度はプライマーの長さに応じて約32 °Cから約48 °Cまで変わりうるが、低ストリンジェンシーの増幅には約36 °Cの温度が典型的である。高ストリンジェンシーのPCR増幅の場合、高ストリンジェンシーのアニーリング温度はプライマーの長さおよび特異性に応じて、約50 °Cから約65 °Cに及びうるが、約62 °Cの温度が典型的である。高ストリンジェンシーおよび低ストリンジェンシーの増幅の両方に典型的なサイクル条件には、30~120秒間90 °Cから95 °Cの変性段階、30~120秒間持続するアニーリング段階、および1~2分間約72 °Cの伸長段階が含まれる。

【0180】

10

20

30

40

50

参照ヌクレオチド配列に対して少なくとも例えば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ヌクレオチドあたり最大5つ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。言い換えれば、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。

10

【0181】

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ば95%同一であるかどうかを判断する場合には、当然ながら、参照ヌクレオチド配列の全長にわたって同一性の割合を計算し、参照配列中のヌクレオチド総数の5%以内の相同性の間隙を許容するようにパラメータが設定される。

20

【0182】

ポリヌクレオチド変種は、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。いくつかの態様において、ポリヌクレオチド変種は、サイレントな置換、付加、または欠失を産生するが、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。いくつかの態様において、遺伝コードの縮退によるサイレントな置換により、ヌクレオチド変種が産生される。ポリヌクレオチド変種は、さまざまな理由のために、例えば、特定の宿主のコドン発現を最適化する(ヒトmRNA中のコドンが大腸菌のような細菌宿主に好まれるものへ変更する)ために産生することができる。

30

【0183】

本発明のポリペプチドは、ヒトNotch1受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合性の膜近位領域に対する抗体またはその断片を含む組み換えポリペプチド、天然ポリペプチド、または合成ポリペプチドでありうる。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ができることは、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種、またはヒトNotch1受容体の細胞外ドメインの膜近位領域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種が含まれる。そのような変異体には、欠失、挿入、逆位、反復、およびタイプ置換が含まれる。

40

【0184】

本発明のポリペプチドおよびポリヌクレオチドは単離された形態で提供され、時には均質にまで精製される。

【0185】

本明細書において記述される単離されたポリペプチドを、当技術分野において公知の任意の適当な方法により産生することができる。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当な形質変換宿主中でのその配列の発現まで、さまざまである。例えば、cDNAは、ポリペプチド(例えば、ヌクレオチドSEQ ID NO:1)をコードする標識されたDNA断片でヒトcDNAライブラリをスクリーニングし、オートラジオグラフィーによって陽性クローンを同定することにより得

50

ることができる。従来の方法を用いてさらなるラウンドのプラーク精製およびハイブリダイゼーションを行う。

【0186】

組み換え法のいくつかの態様においては、関心対象の野生型タンパク質をコードするDNA配列を単離または合成することによって、DNA配列を構築する。任意で、部位特異的突然変異誘発によって配列を突然変異誘発し、その機能的類似体を提供してもよい。(例えばZ oeller et al., 1984, Proc.-Nat Acad. Sci. USA, 81:5662-5066および米国特許第4,588,585号を参照されたい)。関心対象のポリペプチドをコードするDNA配列を構築する別の方法は、オリゴヌクレオチド合成機を用いる化学合成によるものである。所望のポリペプチドのアミノ酸配列に基づき、関心対象の組み換えポリペプチドを産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デザインすることができる。

10

【0187】

標準的方法を適用して、関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、次に核酸連結することができる。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。

20

【0188】

(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変異体DNA配列を発現ベクターへ挿入し、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する。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、宿主中でトランスフェクト遺伝子の高い発現レベルを得るためには、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する。

【0189】

組み換え発現ベクターを用いて、がん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。組み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要素に機能的に連結された、がん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類似体をコードする、合成のまたはcDNA由来のDNA断片を有する、複製可能なDNA構築体である。転写単位は、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要素、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。そのような調節要素は、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での複製能、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、さらに組み込むことができる。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続的であることを意味し、分泌リーダーの場合には、連続的であることおよび読み枠の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要素は、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。あるいは、組み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うる。この残基を任意で

30

40

50

次に、発現された組み換え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。

【0190】

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。多種多様な発現宿主/ベクターの組み合わせを利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、ならびにM13および糸状一本鎖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。

【0191】

がん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、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(*bacilli*)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。無細胞翻訳系を利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))に記述されており、関連する開示は参照により本明細書に組み入れられる。

【0192】

さまざまな哺乳動物または昆虫の細胞培養系も、組み換えタンパク質を発現するために有利に利用される。組み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 (1981, *Cell*, 23:175)に記述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要素を含むことができる。昆虫細胞における異種タンパク質産生のバキュロウイルスシステムが、Luckow and Summers, 1988, *Bio/Technology*, 6:47によって概説されている。

【0193】

形質変換宿主によって産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親和性タグをタンパク質に付着させて適切な親和性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。

【0194】

例えば、培養培地へ組み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、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。濃縮段階の次に、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。あるいは、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利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利用される他の種類であってよい。あるいは、陽イオン交換段階を利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さまざま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

10

20

30

40

50

族基を有するシリカゲルを利用する、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) の段階を利用して、組み換えタンパク質またはがん幹細胞タンパク質-Fc組成物をさらに精製することができる。前記の精製段階の一部または全部を色々な組み合わせで利用して、均質な組み換えタンパク質を提供することができる。

【0195】

細菌培養物中に産生された組み換えタンパク質は、通常、最初の細胞ペレットからの抽出、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段階によって単離される。高性能液体クロマトグラフィー (HPLC) を最終の精製段階に利用することができる。組み換えタンパク質の発現に利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な方法によって破壊することができる。

10

【0196】

本発明はまた、がん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、本明細書において記述されるがん幹細胞マーカーのアンタゴニストを用いて阻害するための方法を提供する。いくつかの態様において、がん幹細胞マーカー、例えばNotch1受容体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、がん幹細胞マーカーに対するアンタゴニストとインビトロで接触させる段階を含む。例えば、がん幹細胞マーカーを発現する不死化された細胞株またはがん細胞株を、発現されたがん幹細胞マーカーのアンタゴニストを加えた培地中で培養して、細胞成長を阻害する。いくつかの態様において、腫瘍幹細胞を含む腫瘍細胞を、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単離し、がん幹細胞マーカーのアンタゴニストを加えた培地中で培養して、細胞成長を阻害する。いくつかの態様において、アンタゴニストは、がん幹細胞マーカータンパク質のエピトープを特異的に認識する抗体である。例えば、がん幹細胞マーカータンパク質に対する抗体を、単離されたがん幹細胞の培養培地に加えて、細胞成長を阻害することができる。

20

【0197】

いくつかの態様において、がん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、がん幹細胞マーカーに対するアンタゴニストとインビボで接触させる段階を含む。いくつかの態様において、Notch1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、ヒトNotch1受容体の非リガンド結合性の膜近位領域に特異的に結合する抗体と接触させる段階を含む。いくつかの態様において、抗体は、Notch1の活性を阻害することにより腫瘍形成性細胞の成長を阻害する。いくつかの態様において、抗体はリガンドによるNotch1シグナル伝達を阻害することにより腫瘍形成性細胞の成長を阻害する。いくつかの態様において、抗体はNotch1の切断を阻害することにより腫瘍形成性細胞の成長を阻害する。いくつかの態様において、抗体は腫瘍中のがん幹細胞の頻度または数を低下させることにより腫瘍形成性細胞の成長を阻害する。

30

【0198】

ある種の態様において、腫瘍形成性細胞をがん幹細胞マーカーに対するアンタゴニストと接触させる段階は、動物モデルで行われる。例えば、がん幹細胞マーカーを発現している異種移植片を、がん幹細胞マーカーに対するアンタゴニストを投与された免疫不全マウス(例えばNOD/SCIDマウス)中で成長させて、腫瘍成長を阻害する。いくつかの態様において、がん幹細胞マーカーを発現するがん幹細胞を、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単離し、免疫不全マウスに注入し、これにがん幹細胞マーカーに対するアンタゴニストを投与して、腫瘍細胞成長を阻害する。いくつかの態様において、がん幹細胞マーカーのアンタゴニストを、動物への腫瘍形成性細胞の導入と同時にまたはその直後に投与して、腫瘍成長を抑制する。他の態様において、がん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サイズに成長した後に治療剤として投与する。

40

【0199】

本発明は、がん幹細胞マーカーを標的とする抗体、ポリペプチドまたは他の薬剤を含む薬学的組成物をさらに提供する。これらの薬学的組成物は、腫瘍成長、腫瘍細胞増殖の阻

50

害およびヒト患者におけるがんの処置において用途が見つかる。

【0200】

製剤は、貯蔵および使用のために、精製された本発明のアンタゴニスト(例えば、抗体)を薬学的に許容される媒体(例えば、担体、賦形剤など)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媒体には、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; 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; プ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; シクロヘキサノール; 3-ペンタノール; およびm-クレゾールなどの保存剤; 低分子量ポリペプチド(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重合体; 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; 単糖類、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; スクロース、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; Zn-タンパク質複合体などの金属複合体; ならびに/あるいは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含まれるが、これらに限定されることはない。

10

【0201】

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、(膣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; 散剤もしくはエアロゾルの吸入もしくは通気による(噴霧器による)ような肺内投与、気管内、鼻腔内、表皮および経皮的投与; 経口投与; 静脈内、動脈内、腫瘍内、皮下、腹腔内もしくは筋肉内の注射もしくは注入を含む非経口投与; または髄膜下もしくは脳室内のような頭蓋内投与でよい。

20

【0202】

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。錠剤などの固形組成物では、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、コーンスターチ、ラクトース、スクロース、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、次に本明細書において記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さまざまな材料を用いることができるが、そのような材料は、いくつかの重合性酸、および、重合性酸とセラック、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。

30

40

【0203】

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号および同第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

50

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作出することができる。規定の孔径のフィルタ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。

【0204】

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)に記述されているマ

10

【0205】

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重合体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-グルタメートの共重合体、非分解性エチレン-酢酸ビニル、LUPRON DEPOT(商標)(乳酸-グリコール酸共重合体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-グリコール酸共重合体、ショ糖酢酸イソ酪酸エステル、およびポリD-(

20

【0206】

いくつかの態様において、処置には本発明の抗体または他の薬剤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、ドキシソルピシン、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、チオテパ、ブスルファン、サイトキシン、タキソール、メトトレキサート、シスプラチン、メルファラン、ピンブ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の、連続投与が含まれる。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、製造元の指示に従って、あるいは、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)にも記述されている。

30

40

【0207】

本発明において有用な化学療法剤はまた、アルキル化剤、例えばチオテパおよびシクロホスファミド(Cytosan)など; アルキルスルホネート、例えばブスルファン、インプロスルファンおよびピボスルファンなど; アジリジン、例えばベンゾドローパ、カルボコン、メツドローパおよびウレドローパなど; アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチレンチオホスホラミドおよびトリメチロールメラミンを含むエチレンイミンおよびメチルメラミン、ナイトロジェンマスタード、例えばクロラムブシル、クロルナファジン、クロロホスファミド、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、塩酸メクロレタミンオキシド、メルファラン、ノブエンピチン、フェネステリ

50

ン、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスタードなど；ニトロソ尿素、例えばカルムスチン、クロロゾトシン、ホテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、ラニムスチンなど；抗生物質、例えばアクラシノマイシン、アクチノマイシン、オースラマイシン、アザセリン、プレオマイシン、カクチノマイシン、カリチアマイシン、カラビシン、カミノマイシン (caminomycin)、カルジノフィリン、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、デトルピシン、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ドキシソルピシン、エピルピシン、エソルピシン、イダルピシン、マルセロマイシン、マイトマイシン、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン、ピューロマイシン、クエラマイシン、ロドルピシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルピシンなど；代謝拮抗剤、例えばメトトレキセートおよび5-フルオロウラシル(5-FU)など；葉酸類似体、例えばデノプテリン、メトトレキセート、プテロプテリン、トリメトトレキセートなど；プリン類似体、例えばフルダラビン、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニン；ピリミジン類似体、例えばアンシタビン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、フロクスウリジン、5-FUなど；アンドロゲン、例えばカルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトンなど；抗副腎剤、例えばアミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタンなど；葉酸補充剤、例えば、フロリン酸 (frolinic acid) など；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド；アミノレプリン酸；アムサクリン；ベストラブシル；ピサントレン；エダトラキセート；デホファミン；デメコルチン；ジアジクオン；エルホルミチン (elformithine)；酢酸エリプチニウム(elliptinium acetate)；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシ尿素；レンチナン；ロニダミン；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モピダモール；ニトラクリン；ペントスタチン；フェナメット；ピラルピシン；ポドフィリン酸；2-エチルヒドラジド；プロカルバジン；PSK.；ラゾキサン；シゾフラン；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジクオン；2,2',2''-トリクロロトリエチルアミン；ウレタン；ピンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトブロニトール；ミトラクトール；ピポプロマン；ガシトシン；アラビノシド(「Ara-C」)；シクロホスファミド；チオテパ；タキシソイド、例えばパクリタキセル(TAXOL, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.)およびドセタキセル(Taxotere, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France)；クロラムブシル；ゲムシタビン；6-チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキセート；白金類似体、例えばシスプラチンおよびカルボプラチンなど；ピンブラスチン；白金；エトポシド(VP-16)；イホスファミド；マイトマイシンC；ミトキサントロン；ピンクリスチン；ピノレルピン；ナベルピン；ノバントロン；テニポシド；ダウノマイシン；アミノプテリン；ゼローダ；イバンドロネート；CPT11；トポイソメラーゼ阻害剤RFS 2000；ジフルオロメチルオルニチン(DMFO)；レチノイン酸；エスペラマイシン；カペシタビン；ならびに上記のいずれかの薬学的に許容される塩、酸または誘導体を含むが、これらに限定されることはない。化学療法剤はまた、例えばタモキシフェン、ラロキシフェン、アロマターゼ阻害性4(5)-イミダゾール、4-ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン、ケオキシフェン、LY117018、オナプリストン、およびトレミフェン(Fareston)を含む、抗エストロゲンなどの、腫瘍に対するホルモンの作用を調節または阻害するように作用する抗ホルモン剤；ならびにフルタミド、ニルタミド、ピカルタミド、ロイプロリドおよびゴセレリンなどの抗アンドロゲン；および上記のいずれかの薬学的に許容される塩、酸または誘導体を含む。

【0208】

ある種の態様において、化学療法剤はトポイソメラーゼ阻害剤である。トポイソメラーゼ阻害剤は、トポイソメラーゼ酵素(例えば、トポイソメラーゼIまたはII)の作用を妨げる化学療法剤である。トポイソメラーゼ阻害剤はドキシソルピシンHCL、クエン酸ダウノルピシン、ミトキサントロンHCL、アクチノマイシンD、エトポシド、トポテカンHCL、テニポシド(VM-26)およびイリノテカンを含むが、これらに限定されることはない。

【0209】

10

20

30

40

50

ある種の態様において、化学療法剤は代謝拮抗剤である。代謝拮抗剤は、正常な生化学的反応に必要とされる代謝産物に似た、しかし細胞分裂のような、一つまたは複数の正常な細胞機能を妨げるのに十分に異なった構造を有する化学物質である。代謝拮抗剤はゲムシタピン、フルオロウラシル、カペシタピン、メトトレキセートナトリウム、ラリトレキセド (ralitrexed)、ペメトレキセド、テガフル、シトシンアラビノシド、チオグアニン (GlaxoSmithKline)、5-アザシチジン、6-メルカプトプリン、アザチオプリン、6-チオグアニン、ペントスタチン、リン酸フルダラビンおよびクラドリピン、ならびにこれらのいずれかの薬学的に許容される塩、酸または誘導体を含むが、これらに限定されることはない。

【0210】

他の態様において、処置には本発明の抗体または他の薬剤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。

【0211】

他の態様において、処置には、本発明の抗体と、EGF受容体(EGFR)(Erbbitux(登録商標))、erbB2受容体(HER2)(Herceptin(登録商標))、および血管内皮成長因子(VEGF)(Avastin(登録商標))に結合する抗体を含むが、これらに限定されない、さらなる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う。さらに、処置は、一つもしくは複数のサイトカインの投与を含むことができ、がん細胞の外科的除去、および/または処置する医師によって必要と認められる任意の他の療法と一緒にを行うことができる。

【0212】

疾患の処置については、本発明の抗体または他の薬剤の適切な用量は、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、および処置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、治療が達成されるか病態の低減が達成される(例えば腫瘍サイズの減少)まで、抗体または薬剤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、これは個々のアンタゴニスト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あたり0.01 μg~100 mg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抗体または薬剤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。

【0213】

本発明は、本明細書において記述された抗体を含み、本明細書において記述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。いくつかの態様において、キットは、一つまたは複数の容器中に少なくとも一つの、がん幹細胞マーカーに対する精製された抗体を含む。いくつかの態様において、キットは、一つまたは複数の容器中に、ヒトNotch1受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合性の膜近位領域に対する少なくとも一つの精製された抗体を含む。いくつかの態様において、キットは、抗体52M51または52M51のヒト化変種を含む。いくつかの態様において、キットは、抗体52R43を含む。いくつかの態様において、キットは、全ての対照、アッセイを行うための説明書、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、検出アッセイを行うために必要および/または十分な構成要素の全てを含む。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。

【0214】

ある種の態様において、本発明は、ヒトNotch1受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合性の膜近位領域に結合しかつ腫瘍成長を阻害する分子を特定する方法であって、i) ヒ

10

20

30

40

50

トNotch1受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合性の膜近位領域とともに該分子をインキュベートする段階; ii) 該分子がヒトNotch受容体の細胞外ドメインの膜近位領域に結合するかどうかを決定する段階; およびiii) 該分子が腫瘍成長を阻害するかどうかを決定する段階を含む、該方法を提供する。ヒトNotch1受容体の細胞外ドメインの膜近位領域に特異的に結合する分子には、ポリペプチドおよび抗体が含まれるが、これらに限定されることはない。

【0215】

当技術分野において公知の任意の適当な方法を用いてスクリーニングを行うことができる。ある種の態様において、スクリーニングをインビトロで行う。いくつかの態様において、ヒトNotch1受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合性の膜近位領域を発現する細胞を、標識分子とインキュベートし、ヒトNotch1受容体の細胞外ドメインの膜近位領域との標識分子の特異的結合をFACS分析によって決定する。いくつかの態様において、ヒトNotch1受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合性の膜近位領域をファージディスプレイによって発現させ、ヒトNotch1受容体の細胞外ドメインの膜近位領域に特異的に結合する分子を同定する。ヒトNotch1受容体の非リガンド結合性の膜近位領域に特異的に結合する分子を同定するための他の適当な方法には、ELISA; ウェスタン(または免疫)プロットティング; および酵母ツーハイブリッドが含まれるが、これらに限定されることはない。

【0216】

その後、ヒトNotch1受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合性の膜近位領域に特異的に結合する分子を、腫瘍細胞成長の阻害について試験する。当技術分野において公知の任意の適当な方法を用いて、試験を行うことができる。ある種の態様において、ヒトNotch1受容体の細胞外ドメインの膜近位領域に特異的に結合する分子を、インビトロで腫瘍成長を阻害する能力について試験する。いくつかの態様において、ヒトNotch1受容体の細胞外ドメインの膜近位領域に特異的に結合する分子を、培養中の腫瘍細胞とともにインキュベートし、かつヒトNotch1受容体の細胞外ドメインの膜近位領域に特異的に結合する分子の存在下での腫瘍細胞の増殖を明らかにし、非結合対照分子とともにインキュベートした腫瘍細胞と比較する。ある種の態様において、ヒトNotch1受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合性の膜近位領域に特異的に結合する分子を、インビトロで腫瘍成長を阻害する能力について試験する。ある種の態様において、ヒトNotch1受容体の細胞外ドメインの膜近位領域に特異的に結合する分子を、動物異種移植片モデルに注射し、かつヒトNotch1受容体の細胞外ドメインの膜近位領域に特異的に結合する分子で処置した動物における腫瘍の成長を明らかにし、非結合対照分子で処置した動物と比較する。

【実施例】

【0217】

実施例1

抗体をNotch1の非リガンド結合領域、具体的には、細胞外ドメインの非リガンド結合性の膜近位領域に対して作出した。ある種の態様において、ヒトNotch1細胞外ドメインの組み換えポリペプチド断片を抗体産生用の抗原として作出した。標準的な組み換えDNA技術を用いて、ヒトNotch1アミノ酸1427-1732番目の細胞外ドメインの膜近位領域をコードするポリヌクレオチド(SEQ ID NO:1)を単離した。これらのポリヌクレオチドをヒトFcおよびヒスチジンタグのN末端にインフレームで個別に核酸連結し、昆虫細胞でのバキュロウイルスを介した発現のため移入プラスミドベクターにクローニングした。標準的なトランスフェクション、感染および細胞培養プロトコルを用い、アミノ酸1427-1732番目 (SEQ ID NO:2)を含む膜近位領域に対応する対応Notch1ポリペプチドを発現する組み換え昆虫細胞を作出した(O'Reilly et al., 1994, Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual, Oxford: Oxford University Press)。

【0218】

Notch1膜近位領域(Notch1アミノ酸1472-1732番目)のポリペプチドを当業者に公知のように、プロテインAおよびNi++キレート親和性クロマトグラフィーを用いて昆虫細胞溶解物から精製した。精製Notch1膜近位領域のポリペプチドをPBS (pH=7)に対して透析し、お

よそ1 mg/mlまで濃縮し、免疫に備えて滅菌濾過した。

【0219】

標準的な技術を用いて精製Notch1抗原タンパク質(Antibody Solutions; Mountain View, CA)でマウス(n=3)を免疫した。個々のマウス由来の血液を初回免疫からおよそ70日後に抗原認識について(本明細書において記述されるように) ELISAおよびFACS分析を用いてスクリーニングした。最も高い抗体力価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用に単離した。ハイブリドーマ細胞を96ウェルプレートの中に1ウェルあたり細胞1個でプレーティングし、各ウェル由来の上清をNotch1膜近位領域のポリペプチドに対するELISAおよびFACS分析によってスクリーニングした。高い抗体力価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した。プロテインAまたはプロテインGアガロ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した。精製されたモノクローナル抗体を再び、本明細書において記述するようにFACSによって試験した。ヒトNotch1の細胞外ドメインの膜近位領域を認識したいくつかの抗体を単離した。抗体52M51を発現するハイブリドーマ細胞株はブダペスト条約の条件の下、2008年8月7日付でATCCに寄託され、ATCC特許寄託指定番号PTA-9405を割り当てられた。抗体52M51の重鎖のヌクレオチド配列および予測タンパク質配列(SEQ ID NO:9および10)ならびに軽鎖のヌクレオチド配列および予測タンパク質配列(SEQ ID NO:3および4)を決定した。

10

【0220】

ヒト抗体

20

代替の態様において、ファージディスプレイ技術により、Notch1受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合性の膜近位領域を特異的に認識するヒト抗体を単離する。ある種の態様において、ヒト抗体可変ドメインを含んだ合成抗体ライブラリを、本明細書において記述されるNotch受容体抗原の特異的かつ高親和性の認識についてスクリーニングする。ある種の態様において、Notch1受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合性の膜近位領域を含む一連の組み換えタンパク質を用いて、ヒトFabファージディスプレイライブラリをスクリーニングする。手短かに言えば、 2×10^{13} 個のFabディスプレイファージ粒子を、ラウンド1の(受動的に固定化された)組み換えタンパク質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(組み換えタンパク質)のいずれかで溶出する。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)で誘導する。この過程をさらに2ラウンド繰り返し、次いでラウンド3のものを、受動的に固定化された抗原(5 μ g/ml)に対するELISAにてスクリーニングする。

30

【0221】

抗体の最適化を目的にユニークな隣制限部位を介して、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。

【0222】

エピトープマッピング

Notch1受容体細胞外ドメインの非リガンド結合性の特定の膜近位領域を認識する抗体を同定するために、エピトープマッピングを行う。ある種の態様において、標準的な組み換えDNA技術を用い、Fc融合タンパク質として細胞外Notch1ドメインの断片をコードするポリヌクレオチドの上流にCMVプロモーターを含む哺乳動物発現プラスミドベクターを作出する。ある種の態様において、一連の融合タンパク質および大体アミノ酸番号1427から大体アミノ酸番号1732までのヒトNotch1の細胞外ドメインの膜近位領域の欠失を用い、52M系列の非リガンド結合領域抗体のエピトープマッピングを行う。これらの組み換え融合タンパク質を一過性にトランスフェクトされたHEK 293細胞において発現させ、この馴化培地をELISAのためにトランスフェクションから24~48時間後に回収する。

40

【0223】

ある種の態様において、Notch1融合タンパク質断片をSDS-PAGEゲル上で分離し、抗Fc抗

50

体でプローブして全ての融合タンパク質の存在を検出し、対して、抗Notch1抗体でプローブして各抗Notch抗体により認識されるドメインを検出する。

【0224】

Notch1に対する抗体によって認識される細胞外ドメイン内の特異的エピトープを同定するために、SPOTシステム(Sigma Genosys, The Woodlands, TX)を用いる。一アミノ酸だけ重複するかつNotch1細胞外ドメイン全体を網羅する一連の10残基線形ペプチドを合成し、SPOT合成技術によってセルロース膜に共有結合させる。この膜を8時間室温でブロッキング緩衝剤とともにプレインキュベートし、抗体と終夜4でハイブリダイズさせる。その後、膜を洗浄し、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)に結合された二次抗体(Amersham Bioscience, Piscataway, NJ)とともにインキュベートし、再洗浄し、3-アミノ-9-エチルカルバゾールを含有するシグナル現像溶液で可視化する。抗体によって認識される特異的エピトープをこのように決定する。

10

【0225】

キメラ抗体

Notch1受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合膜近位ドメイン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、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核酸連結する。あるいは、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)細胞に同時にトランスフェクトする。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。

20

【0226】

ヒト化抗体

キメラ抗体治療薬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、Notch1受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合膜近位ドメイン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。ヒト化抗体を作出するため、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)を組み換え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動物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。

30

【0227】

実施例2

ヒトNotch1の細胞外ドメインの膜近位領域に対するヒト化抗体を作出した。本質的にはLarrick, J. M., et al., 1989, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 160:1250およびJones, S.T. & Bendig, M.M., 1991, *Bio/Technology* 9:88に記述されているように縮重PCRを用いてマウスモノクローナル抗体52M51の可変ドメインをハイブリドーマ株から単離し、配列決定した。親52M51抗体のアミノ酸配列に構造的に類似している可能性が高いヒト重鎖および軽鎖可変フレームワーク領域を次に、参照ヒトフレームワーク領域と見なして、新規合成フレームワークのデザインをガイドするのに役立てる。52M51マウスフレームワークに対する類似性を持つヒトフレームワーク領域を同定するため、Genbankに寄託されているヒト配列に対するBLAST検索を用い、52M51のV_HおよびV_Lマウス可変ドメインによってコードされる予測タンパク質配列を、発現ヒトcDNAによりコードされるヒト抗体配列と比較する。この方法を用い、重鎖フレームワークをデザインする際のさらなる解析のために発現ヒトcDNA配列(例えばgenbank DA975021、DB242412)および生殖系列Vhドメイン(例え

40

50

ばIGHV1-24)を選択した。同様に、軽鎖フレームワークをデザインする際に発現ヒトcDNA配列(例えばgenbank CD709370、CD707373)および生殖系列V1(例えばIGLV7-46、IGLV8-61)を考慮した。

【0228】

候補ヒト化フレームワーク重鎖と親マウスモノクローナル抗体52M51の重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインとの間のアミノ酸の差異が重要である可能性が高いか評価し、各位置差異が可変ドメインの適切な折り畳みおよび機能に寄与するかどうかに関して判断をした。この解析は他の抗体断片の解析済み結晶構造(例えば、Trakhanov et al, Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 1999, 55:122-28に記述されているようにFab 2E8の構造、ならびに他のタンパク質結晶構造(例えば、タンパク質データバンクの構造1ADQおよび1GIG))の検討によってガイドされた。Jmol、quick PDBおよびPymolを含むコンピュータソフトウェアを用いて構造のモデルを作った。シートフレームワークのパッキング、重鎖および軽鎖可変ドメイン間の相互作用、アミノ酸側鎖の溶媒曝露度に及ぼす所与の位置のアミノ酸の潜在的な影響、ならびにアミノ酸がCDRループの位置調整に影響を与うる可能性を考慮した。この解析から、ヒトIgG2定常領域にインフレームで融合された9つの候補V_H鎖およびヒトIgLC1定常領域とインフレームで融合された8つの候補V_L鎖を考え出し、化学的に合成した。候補重鎖は、i) 天然のヒトフレームワークに似ているようにデザインされた合成フレームワークおよびii) 親52M51マウス抗体CDRを含む。

10

【0229】

各候補変種ヒト化重鎖および軽鎖の機能性を哺乳動物細胞へのコトランスフェクションによって試験した。上記の9つの候補ヒト化52M51重鎖のそれぞれをマウス52M51軽鎖cDNAとともにHEK293細胞に同時にトランスフェクトし、ELISAによりNotch1結合活性について馴化培地をアッセイした。最も強い結合を示す52M51重鎖変種を選択した。この変種「52M51-H4」(SEQ ID NO:22)は、マウスCDRに加えて、Vhフレームワーク内の3つのフレームワーク位置、つまり、Kabat位置20、48および71に一例のヒトフレームワーク(例えばIGHV1-24)と比較して変異を含む。次いで52M51-H4ヒト化重鎖を8つの候補ヒト化軽鎖のそれぞれとともにHEK293細胞に同時にトランスフェクトし、この場合も先と同様に、ELISAにより抗原結合について馴化培地をアッセイした。2つの軽鎖変種「2M51 L3」(SEQ ID NO:26)および「52M51 L4」(SEQ ID NO:30)は他の候補よりも良好な結合を示すことが分かったので、これらをさらなる研究のために選んだ。変種52M51-L3はマウスCDRに加えて、Kabat位置49の1つのフレームワーク位置に一例のヒトフレームワーク(例えば、IGLV7-46)と比較して変異を含む。2つのヒト化変種抗体52M51 H4L3および52M51 H4L4が開発された。ブダペスト条約の条件の下、2008年10月15日付でATCCに寄託され、指定番号PTA-9549を割り当てられたDNAによってコードされる、52M51 H4L3。

20

30

【0230】

Biacore 2000機器を用いてヒトおよびマウスNotch1に対する親和性を決定した。手短に言えば、標準的なアミンに基づく化学(NHS/EDC)を用いてCM5チップ上に組み換えヒトおよびマウスNotch1タンパク質を固定化した。異なる抗体濃度をタンパク質表面に投入し、動的データを経時的に集めた。データを同時全体的な適合方程式により適合させて、各Notch1に対する解離定数(K_D, nM)を得た(表2)。

40

【0231】

(表2)

抗体	IgG解離定数(K _D)	
	ヒトNotch1 (nM)	マウスNotch1 (nM)
52M51	2.86	NB
52M51H4L3	4.33	NB
52M51H4L4	7.35	NB

【0232】

実施例3

Notch受容体シグナル伝達

50

ある種の態様において、Notch1受容体抗体がリガンドを介したNotchシグナル伝達を遮断する能力を決定した。ある種の態様において、抗生物質および10% FCSを補充したDMEM中で培養された、Notch1を過剰発現するように遺伝子操作されているHeLa細胞(Notch1-HeLa)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蛍光素シフェラーゼレポーター遺伝子の上流にNotch応答性プロモーターを含むpGL4 8X CBS蛍光素シフェラーゼ; および2) トランスフェクション効率の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)を同時にトランスフェクトした。200 ng/ウェルのhDLL4-fcタンパク質でコーティングされた培養プレートにトランスフェクト細胞を加え、次いでNotch1に対する抗体を細胞培養培地に加えた。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(Promega; Madison, WI)によって測定し、蛍光素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規準化した。Notch1経路活性化を阻害する抗体の能力をこのようにして決定した。ヒトNotch1の細胞外ドメインの膜近位領域(図1A)に対して作出された抗体52M51、52M63、52M74および52M80は、他のNotch1抗体と比べて、ルシフェラーゼ活性を大幅に低下させ、Notch1シグナル伝達の低下を示した(図1B)。さらに、抗体52M51のヒト化変種である変種52M51 H4/L3は、ルシフェラーゼ活性を低下させるうえで類似の効力を示した(図1C)。

【 0 2 3 3 】

Notch受容体活性化およびICD形成

フリリン、ADAMおよび -セクレターゼによるNotch受容体の切断はNotch細胞内ドメイン(ICD)の形成を引き起こし、これが核内での下流のNotchシグナル伝達を誘発する。ある種の態様において、リガンドを介した受容体活性化を遮断するNotch1受容体抗体の能力をウエスタンブロット分析によって決定した。293-SMII培地(Gibco)中にてNotch1-HeLa細胞を浮遊培養で増殖させた。DMEMに加えて2% FBSおよび1 μ M MG 132 (Calbiochem)中のヒトDLL4-fc融合タンパク質(2 μ g/ml)で選択ウェルを予めコーティングしておいた96ウェルプレートに培養細胞を移した。ヒトNotch1の細胞外ドメインの膜近位領域に対して作出された抗体を細胞培養培地に加え、細胞を5時間37 $^{\circ}$ Cでインキュベートした。次いでウェルを吸引し、細胞を2 \times SDS泳動用緩衝剤中に再懸濁した。試料を室温で超音波処理し、次いでSDS-PAGEに供し、製造元の推奨(Cell Signaling Technology)に従って切断Notch1 ICDに特異的な抗体を用いたウエスタンブロット分析に供した。52M51は、52M63、52M74および52M80とともに全て、リガンド刺激後にICDの作出を顕著に阻害した(図1D)。

【 0 2 3 4 】

実施例4

非リガンド結合領域抗Notch受容体抗体を用いた腫瘍成長のインビボでの抑止

マウス中の異種移植片として継代された患者試料由来の腫瘍細胞を、実験動物への注射用に調製した。腫瘍は既報(Al-Hajj et al., 2003; Dalerba et al., 2007を参照のこと)の手順を忠実にを行うことによりOncoMed Pharmaceuticalsで樹立されたが、それらにはUM-PE13およびT3(乳房がん細胞)、OMP-C9、OMP-C8、OMP-C6およびColo-205(結腸腫瘍細胞)ならびにOMP-PN4(膵臓がん細胞)が含まれる。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る。得られた腫瘍片を培養培地中の超高純度コラゲナーゼIII(1 mLあたり200~250単位のコラゲナーゼ)と混合し、15~20分毎に10 mLのピペットを通じて上下にピペティングしながら3~4時間37 $^{\circ}$ Cでインキュベートした。消化された細胞を、45 μ lナイロンメッシュを通して濾過し、RPMI/20% FBSで洗浄し、HBSSで2回洗浄した。解離された腫瘍細胞を次いで、6~8週齢のNOD/SCIDマウスへ皮下注射して、腫瘍成長を誘発させた。UM-PE13およびT3乳房腫瘍細胞の場合、100 μ l中50,000個の細胞をエストロゲンペレットの移植とともに右の乳房脂肪体へ注射した(n=20)。OMP-C9結腸腫瘍細胞の場合、100 μ l中50,000個の細胞を右側腹部へ注射した(n=20)。OMP-C8結腸腫瘍細胞の場合、100 μ l中10,000個の細胞を右側腹域へ注射した(n=10)。OMP-C6結腸腫瘍細胞の場合、100 μ l中10,000個の細胞を右側腹へ注射した(n=10)。腫瘍細胞は全て、比率1:1のPBS(マグネシウムまたはカルシウム不含)およびBD Matrigel(BD Biosciences)混合物中で注射した。

【0235】

腫瘍細胞注射から3日後に、抗体処置を開始した。注射された各動物は週2回、計6～8週間、10 mg/kgの抗Notch1抗体または対照としてのPBSを腹腔内に(i.p.)受けた。PE13細胞を注射された動物は、エストロゲンペレット注射に加えて、右上の乳房脂肪体へ注射を受けた。C9、C8、またはC6細胞を注射された動物は、右下腹部に注射を受けた。腫瘍サイズを週2回評価した。

【0236】

ある種の態様において、ヒトNotch1の細胞外ドメインの膜近位領域に対する抗体が、乳房腫瘍の形成に及ぼす効果について試験した。PE13乳房腫瘍細胞(注射1回あたり細胞50,000個)を乳房脂肪体へ皮下移植した。細胞移植から2日後に、動物を対照抗体または52M抗体の52M1、52M2および52M8(これらには抗Notchシグナル伝達能がなかった、図1B参照)のいずれかにより、週2回10 mg/kgを腹腔内(i.p.)投与して処置した。非Notch1阻害剤の抗体による処置では、対照処置動物と比べて腫瘍成長に効果がなかった(図2Cおよび2D)。ある種の態様において、PE13乳房腫瘍細胞を注射された動物を、対照抗体または52M51のいずれかにより、週2回10 mg/kgを腹腔内(i.p.)投与して処置する。腫瘍体積を週2回測定し、乳房腫瘍増殖に及ぼす52M51の効果を決定する。

【0237】

代替の態様において、実験動物への注射の前に、解離された腫瘍細胞を細胞表面マーカーに基づき腫瘍形成性細胞および非腫瘍形成性細胞に最初に選別する。具体的には、上記のように解離された腫瘍細胞を、2%熱不活化ウシ血清(HICS)を含有するHepes緩衝生理食塩溶液(HBSS)で2回洗浄し、100 ulあたり細胞 10^6 個で再懸濁する。抗体を加え、細胞を20分間氷上でインキュベートし、その後HBSS/2% HICSで2回洗浄を行う。抗体には抗ESA (Biomed, Foster City, CA)、抗CD44、抗CD24、ならびに系統マーカーの抗CD2、抗CD3、抗CD10、抗CD16、抗CD18、抗CD31、抗CD64および抗CD140b(まとめてLinという; PharMingen, San Jose, CA)が含まれる。抗体を蛍光色素に直接結合して、これらのマーカーを発現する細胞を陽性選択または陰性選択する。H2Kd+細胞をマイナス選択することによってマウス細胞を除去し、生死判別色素7AADを用いることによって死細胞を除去する。FACSVantage (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)にてフローサイトメトリーを行う。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。その後、単離されたESA+、CD44+、CD24-/low、Lin-腫瘍形成性細胞をNOD/SCIDマウスへ皮下注射して、腫瘍成長を誘発する。

【0238】

実施例5

抗Notch1受容体抗体を用いた腫瘍のインビボでの処置

マウス中の異種移植片として継代された患者試料由来の腫瘍細胞(充実性腫瘍生検または胸水)を、実験動物中での再継代用に調製した。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。その後、解離された腫瘍細胞を、乳房腫瘍の場合にはNOD/SCIDマウスの乳房脂肪体へ、または非乳房腫瘍の場合にはNOD/SCIDマウスの脇腹へ皮下注射して、腫瘍成長を誘発した。ある種の態様において、ESA+、CD44+、CD24-/low、Lin-腫瘍形成性細胞を、上記に詳述したように単離し、注射する。

【0239】

ある種の態様において、新鮮単離されたC8結腸腫瘍細胞(1動物あたり細胞225個)をNOD/SCIDマウスへ皮下移植した。腫瘍細胞の注射後に、腫瘍成長について動物をモニタリングした。腫瘍を、およそ 210 mm^3 の平均サイズに達するまで48日間成長させ、無作為に二群に分けた(1群あたりn=10)。動物を対照抗体またはヒトNotch1の細胞外ドメインの膜近位領域に結合する抗体52M51のいずれかにより、週2回(10 mg/kg)を腹腔内(i.p.)投与して処置した。腫瘍サイズを55、57および62日目に評価した。52M51で処置された動物は、対照処置動物と比べて腫瘍成長の統計的に有意な(p=0.0006)阻害を示した(図2Aおよび2B)。

【0240】

10

20

30

40

50

抗体処置の終了時点で、さらなる分析のために腫瘍を採取する。いくつかの態様において、腫瘍の一部を免疫蛍光により分析して、腫瘍内への抗体の浸透および腫瘍応答を評価する。抗Notch1受容体で処置したマウスおよび対照抗体で処置したマウス由来の各採取された腫瘍の一部を液体窒素中で急速凍結し、O.C.T.中に包埋し、クリオスタットでスライドガラス上に10 μmの切片として切り取る。あるいは、各腫瘍の一部をホルマリン固定し、パラフィン包埋し、ミクロトームでスライドガラス上に10 μmの切片として切り取る。切片を後固定し、注射された抗体を特異的に認識する発色団標識抗体とともにインキュベートして、腫瘍生検中に存在する抗NOTCH1受容体抗体または対照抗体を検出する。さらに、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ルファアクチン抗体、増殖細胞を検出するための抗Ki67抗体、死につつある細胞を検出するためのTUNELアッセイ、および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断片抗体などの異なる腫瘍および腫瘍動員細胞型を検出する抗体を用いて、血管形成、腫瘍成長および腫瘍形態に及ぼす抗体処置の影響を評価することができる。

【0241】

腫瘍細胞遺伝子発現に及ぼす抗Notch1受容体抗体処置の効果も評価する。Notch1抗体で処置したマウスおよび対照抗体で処置したマウス由来の各採取された腫瘍の一部から全RNAを抽出し、定量的RT-PCRに用いる。Notch1、Notchシグナル伝達経路の構成要素の発現レベルだけでなく、例えば、CD44を含む以前に同定された追加のがん幹細胞マーカーの発現レベルも含めて、内部対照としてのハウスキーピング遺伝子GAPDHと比べて分析する。Notch1受容体抗体処置による腫瘍細胞遺伝子発現の変化をこのようにして決定する。

【0242】

さらに、腫瘍内のがん幹細胞の存在に及ぼす抗Notch1受容体抗体処置の効果も評価する。Notch1抗体処置マウス vs 対照抗体処置マウス由来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。その後、解離された腫瘍細胞を、上記に詳述したようにESA+、CD44+、CD24-/low、Lin-細胞表面マーカー発現に基づいて腫瘍形成性がん幹細胞の存在についてFACS分析により分析する。

【0243】

その後、抗Notch1抗体処置後にESA+、CD44+、CD24-/low、Lin-発現に基づいて単離された細胞の腫瘍形成性を評価することができる。Notch1抗体処置マウス vs 対照抗体処置マウス由来の単離されたESA+、CD44+、CD24-/low、Lin-がん幹細胞5,000個、1,000個、500個および100個をNOD/SCIDマウスの乳房脂肪体へ再び皮下注射する。安定した腫瘍形成に必要とされる、注射された細胞の数に基づくがん幹細胞の腫瘍形成性をこのようにして決定する。

【0244】

上記の結腸異種移植片モデルにおける、Notch1シグナル伝達を阻害する抗体52M51のインビボでの効力とは対照的に、Notch1の膜近位領域を認識するが、しかしNotch1シグナル伝達を阻害しないある種の他の抗体は、乳房異種移植片モデルにおいてインビボでの抗腫瘍効力を持たないことが分かった。それぞれがNotchシグナル伝達を感知できるほど阻害しないことが分かった抗体52M51、52M2および52M8(実施例3および図1B)を、PE13乳房腫瘍細胞を前もって注射しておいたNOD/SCIDマウスに注射した。抗体52M1、52M2および52M8のそれぞれが、対照処置動物に対して比較した場合、異種移植片モデルにおいて腫瘍成長に効果を及ぼすことはできなかつた(図2C(52M1、52M2)および図2D(52M8))。

【0245】

実施例6

抗Notch受容体抗体を用いたヒトがんの処置

本実施例は、がん幹細胞を含む腫瘍および/またはNotch受容体発現が検出された腫瘍細胞を標的化するためにNotch受容体に対する抗体を用いてがんを処置するための方法について記述する。

10

20

30

40

50

【0246】

がん幹細胞マーカー発現の存在を腫瘍生検から最初に決定することができる。がんと診断された患者の生検由来の腫瘍細胞を無菌条件下で取り出す。いくつかの態様において、組織生検を液体窒素中で新鮮凍結し、O.C.T.中に包埋し、クライオスタットでスライドガラス上に10 μmの切片として切り取る。あるいは、組織生検をホルマリン固定し、パラフィン包埋し、ミクロトームでスライドガラス上に10 μmの切片として切り取る。切片をNotch受容体に対する抗体とともにインキュベートして、タンパク質発現を検する。あるいは、がん幹細胞の存在を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、細胞を酵素消化および機械的破壊に供して、単細胞懸濁物を得る。その後、解離された腫瘍細胞を抗ESA抗体、抗CD44抗体、抗CD24抗体、抗Lin抗体および抗Notch1抗体とともにインキュベートしてがん幹細胞を検出し、ESA+、CD44+、CD24-/low、Lin-、Notch+の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分析する。

10

【0247】

腫瘍がNotch受容体を発現していると診断されたがん患者を抗Notch受容体抗体で処置する。上記のように作出されたヒト化またはヒトモノクローナル抗Notch受容体抗体を精製し、かつ適当な薬学的担体とともにPBS中で注射用に製剤化する。患者を週1回、少なくとも10週間Notch抗体で処置するが、場合によっては週1回、少なくとも約14週間処置する。抗体の各投与は、薬学的有効用量である、約2~約100 mg/mlとすべきであり、場合によっては約5~約40 mg/mlとすべきである。標準的な放射線療法レジメン、またはオキサリプラチン、フルオロウラシル、ロイコボリンもしくはストレプトゾシンなどの、一つもしくは複数の化学療法剤を用いる化学療法レジメンの前に、該レジメンと同時に、または該レジメンの後に抗体を投与することができる。患者をモニタリングして、そのような処置が抗腫瘍応答を結果的にもたらしたかどうかを、例えば、腫瘍縮退、新たな腫瘍の発生率の低下、より低い腫瘍抗原発現、がん幹細胞数の減少、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。

20

【0248】

実施例7

抗Notch1受容体抗体を用いた腫瘍のインビボでの処置に関するさらなる研究

一つの態様において、M2黒色腫細胞(10,000個)をNOD-SCIDマウスに皮下注射した。腫瘍を、およそ110 mm³の体積に達するまで、35日間成長させた。担腫瘍マウスを無作為に二群に分け(n=10)、対照抗体または抗Notch1抗体52R43のいずれかで処置した。抗体を週2回10 mg/kgで投与した。表示した日に腫瘍体積を測定した。図3Aに示されるように、52R43による抗Notch1処置は、対照群と比べて腫瘍成長を低減した(p=0.02)。

30

【0249】

一つの態様において、Lu24肺腫瘍細胞(30,000個)をNOD-SCIDマウスに皮下注射した。腫瘍を、およそ205 mm³の体積に達するまで、35日間成長させた。担腫瘍マウスを無作為に二群に分け(n=8)、対照抗体または抗Notch1抗体52R43のいずれかで処置した。抗体を週2回10 mg/kgで投与した。表示した日に腫瘍体積を測定した。図3Bに示されるように、52R43による抗Notch1処置は、対照群と比べて腫瘍成長を低減した(p=0.04)。

40

【0250】

一つの態様において、PN8膵臓腫瘍細胞(50,000個)をNOD-SCIDマウスに皮下注射した。腫瘍を、およそ115 mm³の体積に達するまで、27日間成長させた。担腫瘍マウスを無作為に二群に分け(n=8)、対照抗体または抗Notch1抗体52R43のいずれかで処置した。抗体を週2回10 mg/kgで投与した。表示した日に腫瘍体積を測定した。図3Cに示されるように、52R43による抗Notch1処置は、対照群と比べて腫瘍成長を低減した(p=0.005)。

【0251】

一つの態様において、T1乳房腫瘍細胞(300,000個)をNOD-SCIDマウスに皮下注射した。腫瘍を、およそ130 mm³の体積に達するまで、27日間成長させた。担腫瘍マウスを無作為に四群に分け(n=10)、対照抗体、抗Notch1 52R43、タキソールまたは52R43およびタキソ

50

SEQ ID NO:3

52M51軽鎖ポリヌクレオチド配列(推定上のシグナル配列に下線を引いてある)

ATGGCCTGGATTTCACTTATACTCTCTCTCCTGGCTCTCAGCTCAGGGGCCATTTCCAG
 GCTGTTGTGACTCAGGAATCTGCACTCACCACATCACCTGGTGAAACAGTCACACTCACT
 TGTCGCTCAAGTACTGGGGCTGTTACAACACTAGTAACTACGCCAACTGGGTCCAAGAAAA
 CCTGATCATTATTCACTGGTCTAATAGGTGGTACCAACAACCGAGCTCCAGGTGTTCCCT
 GCCAGATTCTCAGGCTCCCTGATTGGAGACAAGGCTGCCCTCACCATCACAGGGGCACAG
 ACTGAGGATGAGGCAATATATTTCTGTGCTCTATGGTACAGCAACCACTGGGTGTTCCGGT
 GGAGGAACCAAACACTGACTGTCCTAGGCCAGCCCAAGTCTTCGCCATCAGTCACCCTGTTT
 CCACCTTCCTCTGAAGAGCTCGAGACTAACAAGGCCACACTGGTGTGTACGATCACTGAT
 TTCTACCCAGGTGTGGTGACAGTGGACTGGAAGGTAGATGGTACCCCTGTCACTCAGGGT
 ATGGAGACAACCCAGCCTTCCAAACAGAGCAACAACAAGTACATGGCTAGCAGCTACCTG
 ACCCTGACAGCAAGAGCATGGGAAAGGCATAGCAGTTACAGCTGCCAGGTCACTCATGAA
 GGTCACTGTGGAGAAGAGTTTGTCCCGTGCTGACTGTTCCCTAG

10

SEQ ID NO:4

52M51軽鎖アミノ酸配列(推定上のシグナル配列に下線を引いてある)

MAWISLILSLLLALSSGAISQAVVTQESALTTSPGETVTLTLCRSSTGAVTTSNYANWVQEK
 PDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNHWVFG
 GGTKLTVLGQPKSSPSVTLFPPSSELETNKATLVCTITDFYPGVVTVDWKVDGTPVTQG
 METTQPSKQSNKYMASSYLTLTARAWERHSSYSCQVTHEGHTVEKSLSRADCS

20

SEQ ID NO:5

52M51軽鎖可変領域ポリヌクレオチド配列(推定上のシグナル配列に下線を引いてある)

ATGGCCTGGATTTCACTTATACTCTCTCTCCTGGCTCTCAGCTCAGGGGCCATTTCCAG
 GCTGTTGTGACTCAGGAATCTGCACTCACCACATCACCTGGTGAAACAGTCACACTCACT
 TGTCGCTCAAGTACTGGGGCTGTTACAACACTAGTAACTACGCCAACTGGGTCCAAGAAAA
 CCTGATCATTATTCACTGGTCTAATAGGTGGTACCAACAACCGAGCTCCAGGTGTTCCCT
 GCCAGATTCTCAGGCTCCCTGATTGGAGACAAGGCTGCCCTCACCATCACAGGGGCACAG
 ACTGAGGATGAGGCAATATATTTCTGTGCTCTATGGTACAGCAACCACTGGGTGTTCCGGT
 GGAGGAACCAAACACTGACTGTCCTAGGC

30

SEQ ID NO:6

52M51軽鎖可変領域アミノ酸配列(推定上のシグナル配列に下線を引いてある)

MAWISLILSLLLALSSGAISQAVVTQESALTTSPGETVTLTLCRSSTGAVTTSNYANWVQEK
 PDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNHWVFG
 GGTKLTVLGQPKSSPSVTLFPPSSELETNKATLVCTITDFYPGVVTVDWKVDGTPVTQG

40

SEQ ID NO:7

推定上のシグナル配列なしの52M51軽鎖可変領域ポリヌクレオチド配列

CAGGCTGTTGTGACTCAGGAATCTGCACTCACCACATCACCTGGTGAAACAGTCACACTC
 ACTTGTGCTCAAGTACTGGGGCTGTTACAAGTAACTACGCCAACTGGGTCCAAGAA
 AAACCTGATCATTATTCACTGGTCTAATAGGTGGTACCAACAACCGAGCTCCAGGTGTT
 CCTGCCAGATTCTCAGGCTCCCTGATTGGAGACAAGGCTGCCCTCACCATCACAGGGGCA
 CAGACTGAGGATGAGGCAATATATTTCTGTGCTCTATGGTACAGCAACCACTGGGTGTTT
 GGTGGAGGAACCAAAGTACTGTCCTAGGC

SEQ ID NO:8

10

推定上のシグナル配列なしの52M51軽鎖可変領域アミノ酸配列

QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNNRAPGV
 PARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNHVWVFGGKLTVLG

【 0 2 5 5 】

SEQ ID NO:9

52M51重鎖ポリヌクレオチド配列(推定上のシグナル配列に下線を引いてある)

ATGGAATGGACCTGGGTCTTTCTCTTCCTCCTGTCAGTAACTGCAGGTGTCCACTCCCAG
 GTTCAGCTGCAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGATGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGATATCC
 TGCAAGGCTGCTGGCTACACAATGAGAGGCTACTGGATAGAGTGGATAAAGCAGAGGCCT
 GGACATGGCCTTGAGTGGATTGGACAGATTTTACCTGGAAGTGGGAGAACTAACTACAAT
 GAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTCAGTGCAGATACATCCTCCAACACAGCCAACATG
 CAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCCGTCTATTACTGTGCAAGATTTGATGGT
 AACTACGGTTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGATCCTCAGTCACCGTCTCCTCA
 GCCAAAACGACACCCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCCTGGATCTGCTGCCAAACTAAC
 TCCATGGTGACCCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACC
 TGGAAGTCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCAGCTGTCTGCAGTCTGAC
 CTCTACACTCTGAGCAGCTCAGTGAAGTGTCCCCTCCAGCCCTCGGCCAGCGAGACCGTC
 ACCTGCAACGTTGCCACCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGTGCCCAGG
 GATTGTGGTTGTAAGCCTTGCATATGTACAGTCCAGAAGTATCATCTGTCTTCATCTTC
 CCCCCAAGCCCAAGGATGTCCTCACCATTACTCTGACTCCTAAGGTCACGTGTGTTGTG
 GTAGACATCAGCAAGGATGATCCCGAGGTCCAGTTCAGCTGGTTTGTAGATGATGTGGAG
 GTGCACACAGCTCAGACGCAACCCCGGAGGAGCAGTTCAACAGCACTTCCGCTCAGTC
 AGTGAAGTCCCATCATGCACCAGGACTGGCTCAATGGCAAGGAGTTCAAATGCAGGGTC
 AACAGTGCAGCTTTCCCTGCCCCATCGAGAAAACCATATCCAAAACCAAGGCAGACCG
 AAGGCTCCACAGGTGTACACCATTCCACCTCCCAAGGAGCAGATGGCCAAGGATAAAGTC
 AGTCTGACCTGCATGATAACAGACTTCTTCCCTGAAGACATAACAGTGGAGTGGCAGTGG
 AATGGGCAGCCAGCGGAGAACTACAAGAACAATCAGCCCATCATGAACACGAATGGCTCT
 TACTTCGTCTACAGCAAGCTCAATGTGCAGAAGAGCAACTGGGAGGCAGGAAATACTTTC
 ACCTGCTCTGTGTTACATGAGGGCCTGCACAACCACCATACTGAGAAGAGCCTCTCCAC
 TCTCCTGGTAAATGA

20

30

40

SEQ ID NO:10

50

52M51重鎖アミノ酸配列(推定上のシグナル配列に下線を引いてある)

MEWTWVFLFLLSVTAGVHSQVQLQQSGAELMKPGASVKISCKAAGYTMRGYWIEWIKQRP
 GHGLEWIGQILPGTGRNTNYNEKFKGKATFTADTSSNTANMQLSSLTSEDSAVYYCARFDG
 NYGYYAMDYWGQSSVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVT
 WNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSPRPSETVTCNVAHPASSTKVDDKIVPR
 DCGCKPCICTVPEVSSVFIFFPKPKDVLITITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVE
 VHQAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRP
 KAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMNTNGS
 YFVYSKLVNQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTKSLSHSPGK

10

SEQ ID NO:11

52M51重鎖可変領域ポリヌクレオチド配列(推定上のシグナル配列に下線を引いてある)

ATGGAATGGACCTGGGTCTTTCTCTCCTCCTGTCAGTAACTGCAGGTGTCCACTCCCAG
 GTTCAGCTGCAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGATGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGATATCC
 TGCAAGGCTGCTGGCTACACAATGAGAGGCTACTGGATAGAGTGGATAAAGCAGAGGCCT
 GGACATGGCCTTGAGTGGATTGGACAGATTTTACCTGGAAGTGGGAGAACTAACTACAAT
 GAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTCAGTGCAGATACATCCTCCAACACAGCCAACATG
 CAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCCGTCTATTACTGTGCAAGATTTGATGGT
 AACTACGGTTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGATCCTCAGTCACCGTCTCCTCA

20

SEQ ID NO:12

52M51重鎖可変領域アミノ酸配列(推定上のシグナル配列に下線を引いてある)

MEWTWVFLFLLSVTAGVHSQVQLQQSGAELMKPGASVKISCKAAGYTMRGYWIEWIKQRP
 GHGLEWIGQILPGTGRNTNYNEKFKGKATFTADTSSNTANMQLSSLTSEDSAVYYCARFDG
 NYGYYAMDYWGQSSVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVT

30

SEQ ID NO:13

推定上のシグナル配列なしの52M51重鎖可変領域ポリヌクレオチド配列

CAGGTTCAGCTGCAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGATGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGATA
 TCCTGCAAGGCTGCTGGCTACACAATGAGAGGCTACTGGATAGAGTGGATAAAGCAGAGG
 CCTGGACATGGCCTTGAGTGGATTGGACAGATTTTACCTGGAAGTGGGAGAACTAACTAC
 AATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTCAGTGCAGATACATCCTCCAACACAGCCAAC
 ATGCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCCGTCTATTACTGTGCAAGATTTGAT
 GGTAACTACGGTTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGATCCTCAGTCACCGTCTCC
 TCA

40

SEQ ID NO:14

推定上のシグナル配列なしの52M51重鎖可変領域アミノ酸配列

QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKAAGYTMRGYWIEWIKQRP
 GHGLEWIGQILPGTGRNTNYNEKFKGKATFTADTSSNTANMQLSSLTSEDSAVYYCARFDG
 NYGYYAMDYWGQSSVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVT
 SA

【 0 2 5 6 】

50

SEQ ID NO:15
52M51重鎖CDR1
RGYWIE

SEQ ID NO:16
52M51重鎖CDR2
QILPGTGRTNYNEKFKG

SEQ ID NO:17
52M51重鎖CDR3
FDGNYGYAMDY

10

SEQ ID NO:18
52M51軽鎖CDR1
RSSTGAVTTSNYAN

SEQ ID NO:19
52M51軽鎖CDR2
GTNNRAP

20

SEQ ID NO:20
52M51軽鎖CDR3
ALWYSNHWVFGGGTKL

【 0 2 5 7 】

ヒト化52M51配列:

SEQ ID NO:21

52M51-H4重鎖ポリヌクレオチド配列(推定上のシグナル配列に下線を引いてある)

ATGGATTGGACATGGAGGGTGTCTGCCTCCTCGCTGTGGCTCCTGGAGTCCTGAGCCAG
 GTCCAGCTCGTCCAGAGCGGGGCTGAAGTCAAGAAGCCTGGCGCTAGCGTCAAATCAGC
 TGTAAGGTGAGCGGATACACACTGAGGGGATACTGGATCGAGTGGGTGAGGCAGGCTCCA
 GGAAAGGGCCTGGAATGGATCGGCCAGATCCTGCCTGGAACCGGAAGGACAAATTACAAT
 GAGAAGTTTAAGGGAAGGGTCACAATGACAGCAGACACAAGCACAGACACAGCTTATATG
 GAACTCAGCTCCCTCAGATCCGAGGACACCGCTGTCTACTATTGTGCCAGGTTTCGATGGA
 AATTACGGATACTATGCCATGGATTACTGGGGACAGGGGACAACGGTCACCGTGAGCTCA
 GCCAGCACAAAGGGCCCTAGCGTCTTCCCTCTGGCTCCCTGCAGCAGGAGCACCAGCGAG
 AGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTG
 TGGAACTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCAGCTGTCTACAGTCCTCA
 GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACC
 TACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGC
 AAATGTTGTGTCGAGTGCCACCGTGCCAGCACCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTC
 CTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGC
 GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC
 GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGT
 GTGGTCAGCGTCTCACCGTTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGC
 AAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGG
 CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAAC
 CAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG
 GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATAAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGAC
 GGCTCCTTCTTCCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC
 GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTC
 TCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

10

20

30

SEQ ID NO:22

52M51 H4重鎖アミノ酸配列(推定上のシグナル配列に下線を引いてある)

MDWTWRVFCLLAVAPGVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKVSGYTLRGYIEWVRQAP
 GKGLEWIGQILPGTGRNTYNEKFKGRVTMTADTSTDYAMELSSLRSEDTAVYYCARFDG
 NYGYYAMDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVS
 WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVR
 KCCVECPPEPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDG
 VEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTIKTKG
 QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSD
 GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

40

SEQ ID NO:23

52M51-H4重鎖可変領域アミノ酸配列(推定上のシグナル配列に下線を引いてある)

MDWTWRVFCLLAVAPGVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKVSGYTLRGYWIEWVRQAP
 GKGLEWIGQILPGTGRTNYNEKFKGRVTMTADTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCARFDG
 NYGYAMDYWGQGTTVTVSSA

SEQ ID NO:24

推定上のシグナル配列なしの52M51-H4重鎖可変領域アミノ酸配列

QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKVSGYTLRGYWIEWVRQAPGKGLEWIGQILPGTGRTNY
 NEKFKGRVTMTADTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCARFDGNYGYAMDYWGQGTTVTVS
 SA

10

【 0 2 5 8 】

SEQ ID NO:25

52M51-L3軽鎖ポリヌクレオチド配列(推定上のシグナル配列に下線を引いてある)

ATGAGCGTCCCTACAATGGCTTGGATGATGCTCCTGCTGGGACTCCTGGCTTATGGAAGC
 GGAGTGGATAGCCAGGCCGTCGTACACAGGAACCTAGCCTCACCGTTAGCCCTGGAGGA
 ACAGTCACACTGACCTGTAGGAGCTCCACAGGAGCTGTGACAACAAGCAATTACGCTAAC
 TGGTTCACAGCAGAAGCCCGGTCAAGCCCCTAGAACCCTCATCGGCGGCACCAATAACAGA
 GCTCCCGGAGTCCCGCCAGGTTCTCCGGCTCCCTCCTGGGTGGCAAGGCTGCTCTGACA
 CTCAGCGGTGCCAGCCAGAGGATGAAGCGGAGTACTACTGTGCACTGTGGTACAGCAAC
 CATTGGGTTTTTCGGAGGCGGAACAAAGTTAACCGTCTCGGGCAGCCTAAGGCTGCTCCT
 AGCGTCACACTGTTCCCCCATCTAGCGAGGAGCTGCAGGCTAACAAGGCAACCCTCGTC
 TGCCTGGTTAGCGACTTCTACCCTGGCGCTGTCACAGTGGCCTGGAAAGCTGACGGCTCC
 CCTGTGAAAGTTGGCGTCGAAACCACAAAGCCTTCTAAGCAGAGCAATAATAAATATGCC
 GCAAGCTCCTACCTCTCCCTGACTCCTGAGCAGTGGAAAAGCCATAGGAGCTACTCCTGC
 CGGTCACACACGAAGGAAGCACAGTGGAAAAGACAGTCGCCCTGCTGAGTGTAGCTGA

20

30

SEQ ID NO:26

52M51-L3軽鎖アミノ酸配列(推定上のシグナル配列に下線を引いてある)

MSVPTMAWMMLLLGLLAYGSGVDSQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYAN
 WFQQKPGQAPRTLIGGTNNRAPGVPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSN
 HWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLVSDFYPGAVTVAWKADGS
 PVKVGVEETTKPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCRVTHEGSTVEKTVAPAECS

SEQ ID NO:27

52M51-L3軽鎖可変領域アミノ酸配列(推定上のシグナル配列に下線を引いてある)

MSVPTMAWMMLLLGLLAYGSGVDSQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYAN
 WFQQKPGQAPRTLIGGTNNRAPGVPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSN
 HWVFGGGTKLTVLG

40

SEQ ID NO:28

推定上のシグナル配列なしの52M51-L3軽鎖可変領域アミノ酸配列

SGVDSQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWFQQKPGQAPRTLIGGTNN
 RAPGVPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVLG

50

【 0 2 5 9 】

SEQ ID NO:29

52M51-L4軽鎖ポリヌクレオチド配列(推定上のシグナル配列に下線を引いてある)

ATGAGCGTCCCTACAATGGCTTGGATGATGCTCCTGCTGGGACTCCTGGCTTATGGAAGC
 GGAGTGGATAGCCAGACCGTCGTCACACAGGAACCTAGCTTTTCCGTTAGCCCTGGAGGA
 ACAGTCACACTGACCTGTAGGAGCTCCACAGGAGCTGTGACAACAAGCAATTACGCTAAC
 TGGTATCAGCAGACTCCCGGTCAAGCCCCTAGAACCCTCATCGGCGGCACCAATAACAGA
 GCTCCCGGAGTCCCGACAGGTTCTCCGGCTCCATCCTGGGAAATAAAGCTGCTCTGACA
 ATCACAGGTGCCCAGGCTGACGATGAAAGCGACTACTACTGTGCACTGTGGTACAGCAAC
 CATTTGGGTTTTCCGGAGGCGGAACAAAGTTAACCGTCCTCGGGCAGCCTAAGGCTGCTCCT
 AGCGTCACACTGTTCCCCCATCTAGCGAGGAGCTGCAGGCTAACAAGGCAACCCTCGTC
 TGCCTGGTTAGCGACTTCTACCCTGGCGCTGTACAGTGGCCTGGAAAGCTGACGGCTCC
 CCTGTGAAAGTTGGCGTCGAAACCACAAAGCCTTCTAAGCAGAGCAATAATAAATATGCC
 GCAAGCTCCTACCTCTCCCTGACTCCTGAGCAGTGGAAAAGCCATAGGAGCTACTCCTGC
 CGGGTCACACACGAAGGAAGCACAGTGGAAAAGACAGTCGCCCTGCTGAGTGTAGCTGA

10

SEQ ID NO:30

52M51-L4軽鎖アミノ酸配列(推定上のシグナル配列に下線を引いてある)

MSVPTMAWMMLLLGLLAYGSGVDSQTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYAN
 WYQQTPGQAPRTLIGGTNNRAPGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDES DYCALWYSN
 HWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLVSDFYPGAVTVAWKADGS
 PVKGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCRVTHEGSTVEKTVAPAEC

20

SEQ ID NO:31

52M51-L4軽鎖可変領域アミノ酸配列(推定上のシグナル配列に下線を引いてある)

MSVPTMAWMMLLLGLLAYGSGVDSQTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYAN
 WYQQTPGQAPRTLIGGTNNRAPGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDES DYCALWYSN
 HWVFGGGTKLTVLG

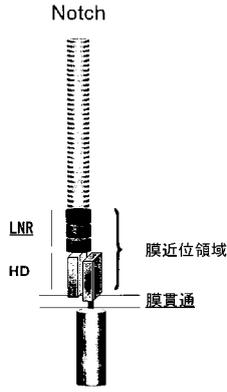
30

SEQ ID NO:32

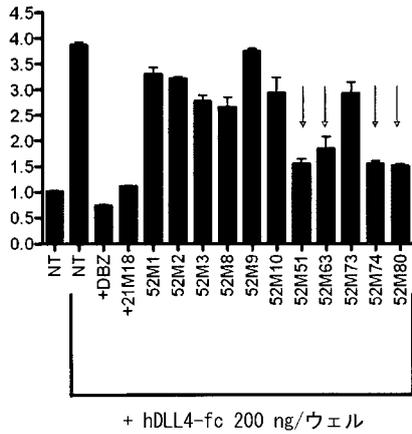
推定上のシグナル配列なしの52M51-L4軽鎖可変領域アミノ酸配列

SGVDSQTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWYQQTPGQAPRTLIGGTNN
 RAPGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDES DYCALWYSNHWVFGGGTKLTVLG

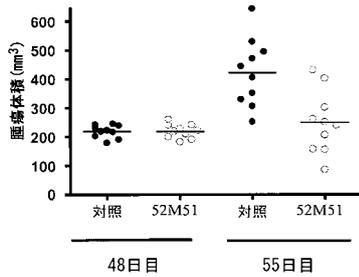
【図1A】



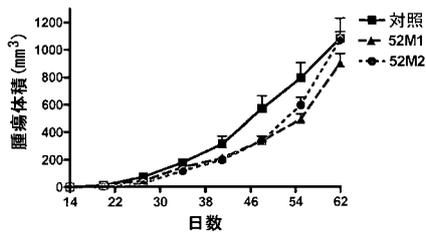
【図1B】



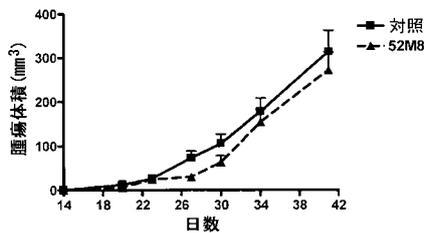
【図2B】



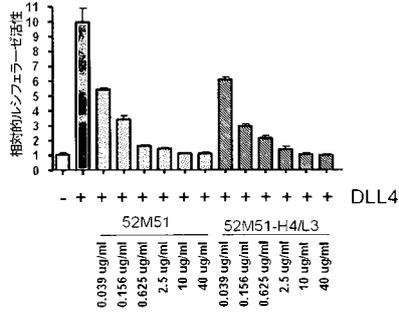
【図2C】



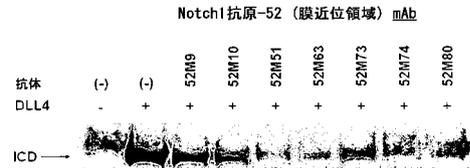
【図2D】



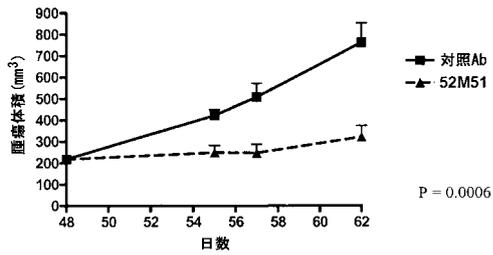
【図1C】



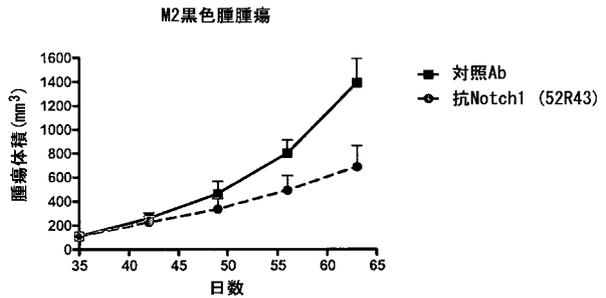
【図1D】



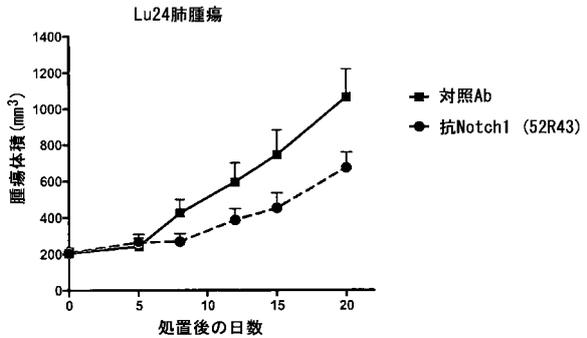
【図2A】



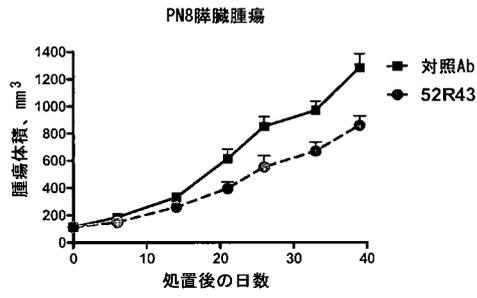
【図3A】



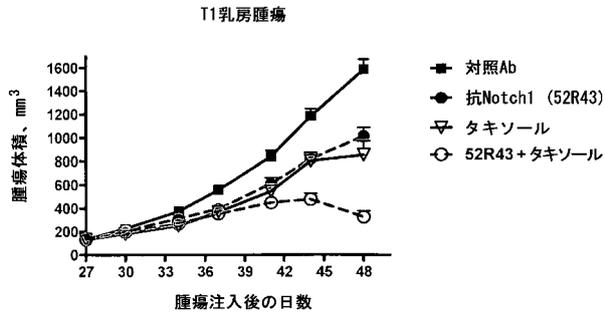
【図3B】



【 図 3 C 】



【 図 3 D 】



【 配列表 】

[0005560271000001.app](#)

[0005560271000002.xml](#)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/00 1 0 1
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	C 1 2 N	5/00 1 0 2
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/395 T
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
		A 6 1 K	39/395 D
		A 6 1 K	39/395 N
		C 1 2 P	21/08

- (31)優先権主張番号 61/079,095
 (32)優先日 平成20年7月8日(2008.7.8)
 (33)優先権主張国 米国(US)

微生物の受託番号 ATCC PTA-9549
 微生物の受託番号 ATCC PTA-9405

- (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 100114889
 弁理士 五十嵐 義弘
- (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 エル .
 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 9 4 6
- (72)発明者 ホーイ ティモシー チャールズ
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ヒルズボロー ダレル ロード 2 0 0
- (72)発明者 ブルーンズ モーリーン フィッチ
 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 6 3 2
- (72)発明者 アクセルロッド フミコ タカダ
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 パロアルト ライト プレイス 3 7 8 0

審査官 柴原 直司

- (56)参考文献 国際公開第2007/145840(WO, A1)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

P u b M e d