

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6527132号  
(P6527132)

(45) 発行日 令和1年6月5日(2019.6.5)

(24) 登録日 令和1年5月17日(2019.5.17)

(51) Int.Cl.	F I
<b>A 6 1 K 39/395 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395 Z N A T
<b>A 6 1 P 35/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 35/00
<b>A 6 1 P 43/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 43/00 1 1 1
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/09 Z
<b>C O 7 K 16/18 (2006.01)</b>	C O 7 K 16/18

請求項の数 41 (全 80 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-502189 (P2016-502189)	(73) 特許権者	509012625 ジェネンテック, インコーポレイテッド アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ ディーエヌエー ウェイ 1
(86) (22) 出願日	平成26年3月13日 (2014.3.13)	(74) 代理人	110002077 園田・小林特許業務法人
(65) 公表番号	特表2016-520520 (P2016-520520A)	(72) 発明者	フレンチ, ドロシー アメリカ合衆国 カリフォルニア 940 70, サン カルロス, マイケル コ ート 23
(43) 公表日	平成28年7月14日 (2016.7.14)	(72) 発明者	ハントジッカー, エーリク アメリカ合衆国 カリフォルニア 945 60, ニューアーク, キャレー プレ イス 7195
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/026588		最終頁に続く
(87) 国際公開番号	W02014/151866		
(87) 国際公開日	平成26年9月25日 (2014.9.25)		
審査請求日	平成29年2月16日 (2017.2.16)		
(31) 優先権主張番号	61/789,475		
(32) 優先日	平成25年3月15日 (2013.3.15)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 肝臓がんの診断及び治療のための組成物及び方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

抗 J a g g e d 1 ( 抗 J a g 1 ) 抗体を含む、肝臓がん治療を必要とする個体における肝臓がんを治療するための医薬であって、

肝臓がんは、E p C A M 及び / 又は A F P を発現する細胞を含む、医薬。

【請求項2】

抗 J a g 1 抗体を含む、図 1 1 に示されるポリペプチドに対して少なくとも 9 0 % の同一性を有するアミノ酸配列を含むペプチドをコードする S p p 1 遺伝子を発現する細胞を含む肝臓がんを有する哺乳動物を治療的に処置するための医薬であって、

肝臓がんは、E p C A M 及び / 又は A F P を発現する細胞を含む、医薬。

【請求項3】

肝臓がんにおいて、抗 J a g 1 抗体が、S P P 1 発現の減少をもたらす、請求項 2 に記載の医薬。

【請求項4】

哺乳動物はヒトである、請求項 2 又は 3 に記載の医薬。

【請求項5】

N o t c h 2 シグナル伝達阻害剤を含む、肝臓がんを有する個体を治療するための方法に使用するための医薬であって、前記方法は

( a ) 個体に N o t c h 2 シグナル伝達阻害剤を投与する工程、及び

( b ) N o t c h 2 シグナル伝達を決定する工程を含み、

治療前のNotch2シグナル伝達と比較した、治療後のNotch2シグナル伝達の減少が、個体における肝臓がんの減少を示し、Notch2シグナル伝達阻害剤は抗Jag1抗体であり、肝臓がんはEpCAM及び/又はAFPを発現する細胞を含む、医薬。

【請求項6】

Notch2シグナル伝達が、Notch2ICDの核局在化を測定することによって、又はNotch2、Jag1、Hes又はHey1の発現を測定することによって決定される、請求項5に記載の医薬。

【請求項7】

抗Jag1抗体を含む、肝臓がんを有する個体における血清SPP1タンパク質レベルを減少させるための医薬であって、抗Jag1抗体の有効量が個体に投与され、これにより個体における血清SPP1濃度を減少させ、肝臓がんはEpCAM及び/又はAFPを発現する細胞を含む、医薬。

10

【請求項8】

個体に抗Jag1抗体を投与する前の血清SPP1タンパク質レベルが、少なくとも約80ng/mlであるか、又は約80ng/mlと約500ng/mlの間である、請求項7に記載の医薬。

【請求項9】

個体に抗Jag1抗体を投与する前の血清SPP1タンパク質レベルが、約86ng/mlと約250ng/mlの間であるか、又は約120ng/mlと約170ng/mlの間である、請求項7に記載の医薬。

20

【請求項10】

個体に抗Jag1抗体を投与することは、80ng/ml未満の血清SPP1タンパク質レベルをもたらす、請求項7から9の何れか一項に記載の医薬。

【請求項11】

抗Jag1抗体を投与する前の血清SPP1タンパク質レベルが、抗Jag1抗体を投与する前24時間に決定される、請求項7から9の何れか一項に記載の医薬。

【請求項12】

抗Jag1抗体を投与する前の血清SPP1タンパク質レベルが、酵素結合免疫吸着法により決定される、請求項7から11の何れか一項に記載の医薬。

30

【請求項13】

血清SPP1タンパク質レベルが、抗Jag1抗体を投与した後、約1ヶ月、2ヶ月、又は3ヶ月減少する、請求項7から12の何れか一項に記載の医薬。

【請求項14】

Jag1に結合する抗体であるNotch2シグナル伝達阻害剤を含む、哺乳動物の肝臓がんを治療的に処置するための医薬であって、Notch2シグナル伝達の増殖増強効果に少なくとも一部依存している腫瘍を、Jag1に結合する抗体であるNotch2シグナル伝達阻害剤と接触させ、それによって腫瘍を効果的に治療し、肝臓がんはEpCAM及び/又はAFPを発現する細胞を含む、医薬。

【請求項15】

抗体の、がんに対する結合が、Notch2の増殖増強活性に拮抗する、請求項14に記載の医薬。

40

【請求項16】

抗Jag1抗体を含む、肝臓がんを有する危険性のある個体における肝臓がんを予防するための医薬であって、肝臓がんはEpCAM及び/又はAFPを発現する細胞を含む、医薬。

【請求項17】

抗Jag1アンタゴニスト抗体であるNotch2シグナル伝達阻害剤を含む、図8Cに示されるポリペプチドに対して少なくとも90%のアミノ酸配列の同一性を有するタンパク質の増加した発現又は活性と関連した肝細胞増殖性疾患を治療するための医薬であっ

50

て、肝細胞増殖性疾患はがんであってE p C A M及び/又はA F Pを発現する細胞を含む、医薬。

【請求項18】

抗J a g 1抗体を含む、分泌型ホスホプロテイン1 ( S P P 1 ) を発現する肝臓がん細胞の増殖を阻害するための医薬であって、抗J a g 1抗体と細胞を接触させ、それによって細胞の増殖を阻害し、肝臓がんはE p C A M及び/又はA F Pを発現する細胞を含む、医薬。

【請求項19】

細胞と当該抗体を接触させることが肝臓がん細胞においてS P P 1発現を減少させる、請求項18に記載の医薬。

10

【請求項20】

S P P 1発現を、少なくとも約50%、60%、70%、80%、90%、95%又は100%減少させる、請求項19に記載の医薬。

【請求項21】

発現が、R N A s e q、マイクロアレイ分析、免疫組織化学、酵素結合免疫吸着法、遺伝子発現プロファイリング、ポリメラーゼ連鎖反応、S A G E、M a s s A R R A Y技術、蛍光インサイツハイブリダイゼーション及びウェスタンブロットティングからなる群から選択される方法により決定される、請求項19又は20に記載の医薬。

【請求項22】

細胞を抗体と接触させることは、( i ) 細胞によるE p C A M、A F P、P r o m 1、S p p 1、F o x M 1、P l k 1、c c n b 1及びA u r k bの少なくとも一の発現の減少をもたらすか、又は( i i ) 細胞によるW n t 2、A x i n 2及びG l u 1の少なくとも一の発現の増加をもたらす、請求項18から21の何れか一項に記載の医薬。

20

【請求項23】

細胞は個体中にある、請求項18から22の何れか一項に記載の医薬。

【請求項24】

S P P 1タンパク質が、図11に示されるアミノ酸配列を含む、請求項7から13及び18から23の何れか一項に記載の医薬。

【請求項25】

肝臓がんが、肝細胞がん、ヘパトーマ、胆管がん、肝芽腫、肝がん、肝血管肉腫、又は転移性肝臓がんである、請求項1から14及び17の何れか一項に記載の医薬。

30

【請求項26】

肝臓がんが、N o t c h 2、J a g 1、S o x 9、C K 1 9、R a s、P r o m 1、S p p 1、F o x M 1、P l k 1、c c n b 1、A u r k b、W n t 2、A x i n 2、又はG l u 1の少なくとも一を発現する細胞を含む、請求項1から14、17、及び25の何れか一項に記載の医薬。

【請求項27】

肝臓がんが、核N o t c h 2を有する細胞を含むか、又は活性化R a sを有する細胞を含む；

抗J a g 1抗体の投与が、細胞におけるE p C A M発現の減少をもたらす；

40

肝臓がんが、A F Pを発現する細胞を含み、抗J a g 1抗体の投与が、細胞におけるA F P発現の減少をもたらす；

肝臓がんにおいて、抗J a g 1抗体の投与が、抗J a g 1抗体を投与する前の発現と比較して、P r o m 1、S p p 1、F o x M 1、P l k 1、c c n b 1及びA u r k bの少なくとも一の発現の減少をもたらす；又は

肝臓がんにおいて、抗J a g 1抗体の投与が、W n t 2、A x i n 2及びG l u 1の少なくとも一の発現の増加をもたらす、請求項26に記載の医薬。

【請求項28】

抗J a g 1抗体が、モノクローナル抗体及び/又はアンタゴニスト抗体である、請求項1から27の何れか一項に記載の医薬。

50

## 【請求項 29】

抗 J a g 1 抗体が、

( i )

- ( a ) 配列番号 8 1 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1 ;
- ( b ) 配列番号 8 4 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 ;
- ( c ) 配列番号 8 7 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 ;
- ( d ) 配列番号 8 8 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1 ;
- ( e ) 配列番号 8 9 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 ; 及び
- ( f ) 配列番号 9 2 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3

を含む抗体 ;

10

( i i )

- ( a ) 配列番号 8 1 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1 ;
- ( b ) 配列番号 8 2 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 ;
- ( c ) 配列番号 8 5 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 ;
- ( d ) 配列番号 8 8 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1 ;
- ( e ) 配列番号 8 9 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 ; 及び
- ( f ) 配列番号 9 0 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3

を含む抗体 ;

( i i i )

- ( a ) 配列番号 8 1 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1 ;
- ( b ) 配列番号 8 2 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 ;
- ( c ) 配列番号 8 6 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 ;
- ( d ) 配列番号 8 8 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1 ;
- ( e ) 配列番号 8 9 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 ; 及び
- ( f ) 配列番号 9 1 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3

を含む抗体 ; 又は

20

( i v )

- ( a ) 配列番号 8 1 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1 ;
- ( b ) 配列番号 8 3 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 ;
- ( c ) 配列番号 8 5 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 ;
- ( d ) 配列番号 8 8 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1 ;
- ( e ) 配列番号 8 9 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 ; 及び
- ( f ) 配列番号 9 0 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3

を含む抗体

30

である、請求項 1 から 2 8 の何れか一項に記載の医薬。

## 【請求項 30】

抗体が、

( i ) 図 1 8 の、 h u M A b 4 D 5 - 8 の軽鎖可変ドメインフレームワーク L C - F R 1、L C - F R 2、L C - F R 3、及び L C - F R 4 のアミノ酸配列を順番に含む、軽鎖可変ドメインフレームワーク L C - F R 1、L C - F R 2、L C - F R 3、及び L C - F R 4 ;

40

( i i ) 図 1 8 の、 h u M A b 4 D 5 - 8 の重鎖可変ドメインフレームワーク H C - F R 1、H C - F R 2、H C - F R 3、及び H C - F R 4 のアミノ酸配列を順番に含む、重鎖可変ドメインフレームワーク H C - F R 1、H C - F R 2、H C - F R 3、及び H C - F R 4 ;

( i i i ) 図 1 9 の、 h u M A b 4 D 5 - 8 の軽鎖可変ドメインフレームワーク L C - F R 1、L C - F R 2、L C - F R 3、及び L C - F R 4 のアミノ酸配列を順番に含む、軽鎖可変ドメインフレームワーク L C - F R 1、L C - F R 2、L C - F R 3、及び L C - F R 4 ; 又は

( i v ) 図 1 9 の、 h u M A b 4 D 5 - 8 の重鎖可変ドメインフレームワーク H C - F R

50

1、HC-FR2、HC-FR3、及びHC-FR4のアミノ酸配列を順番に含む、重鎖可変ドメインフレームワークHC-FR1、HC-FR2、HC-FR3、及びHC-FR4を更に含む、請求項29に記載の医薬。

【請求項31】

抗体が、

(a)配列番号93のアミノ酸配列に対して、少なくとも95%の配列同一性を有するVH配列；

(b)配列番号96のアミノ酸配列に対して、少なくとも95%の配列同一性を有するVL配列；

(c)(a)に記載のVH配列及び(b)に記載のVL配列；

10

(d)配列番号94のアミノ酸配列に対して、少なくとも95%の配列同一性を有するVH配列；

(e)配列番号97のアミノ酸配列に対して、少なくとも95%の配列同一性を有するVL配列；

(f)(d)に記載のVH配列及び(e)に記載のVL配列；

(g)配列番号95のアミノ酸配列に対して、少なくとも95%の配列同一性を有するVH配列；

(h)配列番号98のアミノ酸配列に対して、少なくとも95%の配列同一性を有するVL配列；又は

(i)(g)に記載のVH配列及び(h)に記載のVL配列を含む、請求項29又は30に記載の医薬。

20

【請求項32】

抗体が、

(i)配列番号93のVH配列及び/又は配列番号96のVL配列；

(ii)配列番号94のVH配列及び/又は配列番号97のVL配列；又は

(iii)配列番号95のVH配列及び/又は配列番号98のVL配列を含む、請求項31に記載の医薬。

【請求項33】

抗Jag1抗体が、

完全長IgG1又はIgG2a抗体であるか、

30

抗体断片であるか、

ヒト、ヒト化、又はキメラ抗体であるか、

増殖阻害剤にコンジュゲートされているか、又は

任意に毒素、抗生物質、放射性同位体及び核酸分解酵素から選択される、細胞傷害性薬剤にコンジュゲートされている、

請求項1から32の何れか一項に記載の医薬。

【請求項34】

抗Jag1抗体が細菌で産生されるか、又はCHO細胞で産生される、請求項1から33の何れか一項に記載の医薬。

【請求項35】

40

抗Jag1抗体が、がん細胞死を引き起こす抗体である、請求項1から34の何れか一項に記載の医薬。

【請求項36】

少なくとも一の付加的な治療剤を更に含み、場合により付加的な治療剤が化学療法剤又は抗体である、請求項1から35の何れか一項に記載の医薬。

【請求項37】

付加的な治療剤が抗Notch2アンタゴニスト抗体である、請求項36に記載の医薬。

【請求項38】

Jag1に対する抗体を含む、哺乳動物の肝臓がん細胞の増殖を阻害するための医薬で

50

あって、

哺乳動物の肝臓がん細胞が J a g 1 に対する抗体を用いて治療され、肝臓がんは、E p C A M 及び / 又は A F P を発現する肝臓がん細胞を含む、医薬。

【請求項 39】

細胞が、ヒトにあるか、又は培地中にある、請求項 38 に記載の医薬。

【請求項 40】

( a ) 容器 ; ( b ) 肝臓がんの治療のための抗 J a g 1 抗体及び担体を含む、容器内に含まれる組成物 ; 及び ( c ) 肝臓がんの治療的処置の組成物の使用に言及する、容器に貼付されたラベル又は容器と共に含まれる添付文書を含む、肝臓がんの治療的処置のための製造品であって、

肝臓がんは E p C A M 及び / 又は A F P を発現する細胞を含む、製造品。

【請求項 41】

肝臓がんの治療のための医薬の調製における、請求項 40 に記載される製造品の使用であって、

肝臓がんは E p C A M 及び / 又は A F P を発現する肝臓がん細胞を含む、使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2013年3月15日に提出された米国仮出願第61/789,475号の利益を主張し、その開示内容は、参照によりその全体が記載されるかのように本明細書に組み込まれる。

【0002】

配列表

本出願は、ASCIIフォーマットで電子的に提出された配列表を含み、その全体が本明細書中で参照することにより援用される。2014年3月13日に作成された前記ASCIIコピーはP5570R1-WO\_\_SL.txtと命名され、大きさは115,666バイトである。

【0003】

発明の分野

本発明は、分子生物学の分野に関する。より具体的には、本発明は、がんなどの病的な状態の治療の方法に関する。

【背景技術】

【0004】

肝臓がんは、5番目に最も一般的ながんの形態である。毎年、約75万例が診断され、毎年約70万人がその疾患で死亡し、世界中でそれをがんによる死亡の第三番目に最も一般的な原因とならしている (Ferlay et al., Int. J. Cancer 127:2893-2917 (2010))。米国では、原発性肝臓がんの発生率は上昇しており、局所的な疾患の検出及び治療においてある程度の進歩がなされているが、末期の肝臓がんの5年生存率は10%をはるかに下回っている (American-Cancer-Society, 2012. Cancer Facts & Figures 2012. Atlanta: American Cancer Society)。

【0005】

肝臓がんの確立された治療は、腫瘍を含む肝臓の一部の外科的除去 (部分肝切除)、肝移植、肝動脈塞栓術 (TACE)、ラジオ波焼灼療法 (RFA) 又は凍結手術などの様々な方法によるその場での腫瘍の破壊、及びソラフェニブの投与を含む。末期肝臓がん患者の治療オプションは限られている。このように、肝臓がんの有効な治療法は、満たされていない医学的必要性のままである。

【0006】

肝臓がんにおけるNotchシグナル伝達の役割は十分に理解されていない。Qiraは、Notch1シグナル伝達は、細胞周期停止及びアポトーシスを誘導することにより、

10

20

30

40

50

インビトロ及びインビボでヒト肝細胞がん細胞の増殖を阻害することを報告し (Qi et al., Cancer Res. 63:8323 (2003))、Viatourらは、マウス及びヒトHCC細胞において、Notch1の細胞内ドメインの発現は増殖を減少させ、アポトーシスを誘導することを報告している (Viatour et al., J. Exp. Med. 208(10):1963 (2011))。他の人は、Notch1の低分子干渉RNA (siRNA) は、細胞の浸潤及び遊走を減少させるが生存率は低下させないことを報告している (Zhou et al. Dig. Dis. Sci.)。また他者は、個々のNotch経路ファミリーメンバーの阻害は効果がなかったことを報告している。まとめると、肝臓がんにおけるNotch経路の役割は十分に理解されていなかった。

【0007】

10

要約

肝臓の増殖性障害を有するか又は危険性のある患者を治療するためのNotch2シグナル伝達阻害剤の使用が提供される。

【0008】

一態様において、個体にNotch2シグナル伝達阻害剤の有効量を投与する工程を含む、肝臓がん治療を必要とする個体における肝臓がんを治療する方法が提供される。幾つかの実施態様において、肝臓がんは肝細胞がん (hepatocellular carcinoma)、ヘパトーマ (hepatoma)、胆管がん (cholangiocarcinoma)、肝芽腫 (hepatoblastoma)、肝がん (hepatic carcinoma)、肝血管肉腫 (hepatic angiosarcoma)、又は転移性肝がん (metastatic liver cancer) である。幾つかの実施態様において、肝細胞がんは、前駆細胞様又は胆管細胞がん様の肝腫瘍を含む。幾つかの実施態様において、肝臓がんは、難治性がんである。

20

【0009】

幾つかの実施態様において、方法は、少なくとも一の付加的な治療剤を投与することを更に含む。付加的な治療剤の例としては、限定されないが、化学療法剤及び抗体を含む。

【0010】

幾つかの実施態様において、肝臓がんは、EpCAM、AFP、Notch2、Jag1、Notch2及びJag1、核のNotch2 ICD、Sox9、CK19、Ras、Prom1、Spp1、FoxM1、Plk1、ccnb1、Aurkb、Wnt2、Axin2、若しくはGlu1、又はそれらの任意の組合せを発現する細胞を含む。特定の実施態様において、肝臓がんは、AFP<sup>+</sup> EpCAM<sup>+</sup>である細胞を含む。幾つかの実施態様において、肝臓がんは、AFP<sup>+</sup> EpCAM<sup>-</sup>、AFP<sup>+</sup> EpCAM<sup>+</sup> SPP1<sup>+</sup>、AFP<sup>-</sup> EpCAM<sup>+</sup>、AFP<sup>-</sup> EpCAM<sup>+</sup> Notch2<sup>+</sup>、AFP<sup>+</sup> EpCAM<sup>-</sup> Notch2<sup>+</sup>、AFP<sup>+</sup> EpCAM<sup>+</sup> Sox9<sup>+</sup>及びAFP<sup>+</sup> EpCAM<sup>+</sup> Sox9<sup>+</sup>又はAFP<sup>-</sup> EpCAM<sup>+</sup> SPP1<sup>+</sup>である細胞を含む。マーカー発現の代替的組合せを有する細胞を含む肝臓がんが具体的に意図される。

30

【0011】

幾つかの実施態様において、EpCAM、AFP、Notch2、Jag1、Sox9、CK19、Ras、Prom1、Spp1、FoxM1、Plk1、ccnb1、Aurkb、Wnt2、Axin2又はGlu1タンパク質の発現の少なくとも一が、免疫組織化学 (IHC) を使用して個体からの試料において検出される。幾つかの実施態様において、発現は、核酸発現である。幾つかの実施態様において、発現は、RNAseq、マイクロアレイ分析、免疫組織化学、酵素結合免疫吸着法、遺伝子発現プロファイリング、ポリメラーゼ連鎖反応、SAGE、MassARRAY技術、蛍光インサイツハイブリダイゼーション及びウェスタンブロットティングからなる群から選択される方法により決定される。

40

【0012】

幾つかの実施態様において、肝臓がんにおいて、Notch2シグナル伝達阻害剤の投与は、EpCAM、AFP、Notch2、Notch2 ICD、Jag1、Prom

50

1、Spp1、FoxM1、Plk1、ccnb1及びAurkbの少なくとも一の発現の減少をもたらす。幾つかの実施態様において、肝臓がんにおいて、Notch2シグナル伝達阻害剤の投与は、Wnt2、Axin2及びGlulの少なくとも一の発現の増加をもたらす。幾つかの実施態様において、発現は、RNAseq、マイクロアレイ分析、免疫組織化学、酵素結合免疫吸着法、及びウェスタンブロッティングにより決定される。

【0013】

上記の実施態様の抗体の何れかは、完全長IgG1又はIgG2a抗体であってもよい。幾つかの実施態様において、抗体は、がん細胞死、例えば、肝臓がん細胞死を引き起こす。上記実施態様の何れかの抗体は、増殖阻害剤、例えば、細胞障害性薬剤にコンジュゲートすることができる。細胞傷害性薬剤の例としては、毒素、抗生物質、放射性同位体及び核酸分解酵素を含むが、これらに限定されない。上記実施態様の抗体の何れかは、当技術分野で周知の方法によって、例えば、細菌又はCHO細胞で産生することができる。

10

【0014】

一態様において、個体にNotch2シグナル伝達阻害剤の有効量を投与する工程を含む、肝臓がんを有する危険性にある個体における肝臓がんを予防するための方法が提供される。幾つかの実施態様において、個体は、B型又はC型肝炎、肝硬変、非ウイルス性/非アルコール性脂肪性肝炎、良性肝腫瘍、血管腫、肝腺腫、及び限局性結節性過形成からなる群から選択される肝臓の状態を有する。幾つかの実施態様において、Notch2シグナル伝達阻害剤は、抗Jag1抗体、例えば抗Jag1アンタゴニスト抗体である。

【0015】

一態様において、Notch2シグナル伝達阻害剤と細胞を接触させ、それによって細胞の増殖を阻害することを含む、分泌型ホスホプロテイン1(SPP1)を発現する細胞の増殖を阻害するための方法が提供される。一実施態様において、SPP1タンパク質は、図11に示されるアミノ酸配列を含む。一実施態様において、細胞をNotch2シグナル伝達阻害剤と接触させると、細胞内のSPP1の発現を減少させる。例えば、細胞をNotch2シグナル伝達阻害剤と接触させると、細胞内のSPP1の発現を、少なくとも約50%、60%、70%、80%、90%、又は100%減少させる。SPP1 mRNA又はタンパク質の発現は、当該技術分野における任意の方法によって決定することができる。幾つかの実施態様において、Notch2シグナル伝達阻害剤は、抗Notch2抗体、例えば、本明細書に開示される任意の抗Notch2 NRR抗体などの抗Notch2の負の調節領域(NRR)抗体である。幾つかの実施態様において、抗体は、本明細書に開示される任意の抗Jag1抗体などの、抗Jag1抗体である。幾つかの実施態様において、細胞は、肝臓がん細胞である。幾つかの実施態様において、肝臓がん細胞は、EpCAM、AFP、AFP及びEpCAM、Notch2、Jag1、Notch2及びJag1、核Notch2 ICD、Ras、Prom1、Spp1、FoxM1、Plk1、ccnb1、Aurkb、Wnt2、Axin2、若しくはGlul、又はそれらの任意の組合せを発現する。幾つかの実施態様において、細胞をNotch2シグナル伝達阻害剤と接触させると、EpCAM、AFP、Notch2、Notch2 ICD、Jag1、Prom1、Spp1、FoxM1、Plk1、ccnb1及びAurkbの少なくとも一の、細胞における発現の減少をもたらす。幾つかの実施態様において、Notch2シグナル伝達阻害剤の投与は、Wnt2、Axin2及びGlulの少なくとも一の、細胞における発現の増加をもたらす。幾つかの実施態様において、発現は、RNAseq、マイクロアレイ分析、免疫組織化学、酵素結合免疫吸着法、及びウェスタンブロッティングにより決定される。

20

30

40

【0016】

一態様において、Notch2シグナル伝達阻害剤と細胞を接触させ、それによって細胞の増殖を阻害することを含む、分泌型ホスホプロテイン1(SPP1)を発現する細胞の増殖を阻害するための方法が提供される。

【0017】

一態様において、哺乳動物にNotch2シグナル伝達阻害剤の有効量を投与し、それ

50

によって哺乳動物を効果的に治療することを含む、図11に示されるポリペプチドに対して少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%の同一性を有するアミノ酸配列を含むペプチドをコードするSpp1遺伝子を発現する細胞を含む肝臓がんを有する哺乳動物を治療するための方法が提供される。幾つかの実施態様において、細胞は、図11に示されるポリペプチドに対して少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%の同一性を有するアミノ酸配列を含むSPP1タンパク質を発現する。

#### 【0018】

幾つかの実施態様において、肝臓がんは肝細胞がん (hepatocellular carcinoma)、ヘパトーマ (hepatoma)、胆管がん (cholangiocarcinoma)、肝芽腫 (hepatoblastoma)、肝がん (hepatic carcinoma)、肝血管肉腫 (hepatic angiosarcoma)、又は転移性肝がん (metastatic liver cancer) である。幾つかの実施態様において、肝臓がんは、難治性がんである。本明細書中の抗体の何れかは、完全長IgG1又はIgG2a抗体であってもよい。幾つかの実施態様において、抗体は、がん細胞死、例えば、肝臓細胞死を引き起こす。本明細書中の抗体の何れかは、増殖阻害剤、例えば、細胞障害性薬剤にコンジュゲートすることができる。細胞傷害性薬剤の例としては、毒素、抗生物質、放射性同位体及び核酸分解酵素を含むが、これらに限定されない。本明細書中の抗体の何れかは、当技術分野で周知の方法によって、例えば、細菌又はCHO細胞で産生することができる。

#### 【0019】

幾つかの実施態様において、方法は、少なくとも一の付加的な治療剤を投与することを更に含む。付加的な治療剤の例としては、限定されないが、化学療法剤及び抗体を含む。

#### 【0020】

幾つかの実施態様において、肝臓がんは、EpCAM、AFP、AFP及びEpCAM、Notch2、Jag1、Notch2及びJag1、核Notch2 ICD、Ras、Prom1、Spp1、FoxM1、Plk1、ccnb1、Aurkb、Wnt2、Axin2、若しくはGlu1、又はそれらの任意の組合せを発現する細胞を含む。幾つかの実施態様において、肝臓がんにおいて、Notch2シグナル伝達阻害剤の投与は、EpCAM、AFP、Notch2、Notch2 ICD、Jag1、Prom1、Spp1、FoxM1、Plk1、ccnb1及びAurkbの少なくとも一の発現の減少をもたらす。幾つかの実施態様において、肝臓がんにおいて、Notch2シグナル伝達阻害剤の投与は、Wnt2、Axin2及びGlu1の少なくとも一の発現の増加をもたらす。幾つかの実施態様において、発現は、RNAseq、マイクロアレイ分析、免疫組織化学、酵素結合免疫吸着法、及びウェスタンブロットティングにより決定される。

#### 【0021】

一態様において、治療を必要とする個体に、抗Jag1アンタゴニスト抗体の有効量を投与し、それによって効果的に肝細胞増殖性疾患を治療することを含む、図8Cに示されるポリペプチドに対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%のアミノ酸配列の同一性を有するタンパク質の増加した発現又は活性と関連した肝細胞増殖性疾患を治療するための方法が提供される。幾つかの実施態様において、細胞増殖性疾患は、肝臓がんなどのがんである。幾つかの実施態様において、個体は、B型又はC型肝炎、肝硬変、良性肝腫瘍、血管腫、肝腺腫、及び限局性結節性過形成からなる群から選択される肝臓の状態を有する。

#### 【0022】

所定の実施態様において、抗Jag1抗体は、本明細書に記載される抗体の何れかである。所定の実施態様において、抗Jag1抗体はヒト、ヒト化、又はキメラ抗体である。所定の実施態様において、上記実施態様の抗体の何れかは抗体断片である。

#### 【0023】

10

20

30

40

50

一態様において、治療を必要とする個体に、抗Jag1アンタゴニスト抗体の有効量を投与し、それによって効果的に肝細胞増殖性疾患を治療することを含む、図11に示されるポリペプチドに対して少なくとも90%のアミノ酸配列の同一性を有するタンパク質の増加した発現又は活性と関連した肝細胞増殖性疾患を治療するための方法が提供される。幾つかの実施態様において、細胞増殖性疾患は、肝臓がんなどのがんである。幾つかの実施態様において、個体は、B型又はC型肝炎、肝硬変、良性肝腫瘍、血管腫、肝腺腫、及び限局性結節性過形成からなる群から選択される肝臓の状態を有する。

#### 【0024】

一態様において、個体における血清SPP1タンパク質レベルを減少させるための方法であって、個体に、Notch2シグナル伝達阻害剤の有効量を投与し、これにより個体における血清SPP1濃度を減少させることを含む方法が提供される。一実施態様において、個体は肝臓がんを有する。一実施態様において、個体にNotch2シグナル伝達阻害剤を投与する前の血清SPP1タンパク質レベルは、少なくとも約80ng/mlである。所定の実施態様において、個体にNotch2シグナル伝達阻害剤を投与する前の血清SPP1タンパク質レベルは、約80ng/mlから約500ng/mlの間、約86ng/mlから約250ng/mlの間、約120ng/mlから約170ng/mlの間、又は約165ng/mlである。幾つかの実施態様において、個体にNotch2シグナル伝達阻害剤を投与すると、80ng/ml未満の血清SPP1タンパク質レベルをもたらす。特定の実施態様において、Notch2シグナル伝達阻害剤を投与する前の血清SPP1タンパク質レベルは、Notch2シグナル伝達阻害剤を投与する前の24時間である。Notch2シグナル伝達阻害剤の投与前又は後の血清SPP1タンパク質レベルは、例えば、酵素結合免疫吸着アッセイなどの任意の適切な方法によって決定することができる。特定の実施態様において、血清SPP1タンパク質レベルは、Notch2シグナル伝達阻害剤を投与した後、約1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、6ヶ月又は12ヶ月減少する。幾つかの実施態様において、肝臓がんは肝細胞がん、ヘパトーマ、胆管がん、肝芽腫、肝がん、肝血管肉腫、又は転移性肝臓がんである。幾つかの実施態様において、Notch2シグナル伝達阻害剤は、siRNA、小分子阻害剤又は抗体である。幾つかの実施態様において、抗体はアンタゴニスト抗体である。

#### 【0025】

所定の実施態様において、上記実施態様の抗体の何れかはモノクローナル断片である。所定の実施態様において、上記実施態様の抗体の何れかはヒト、ヒト化、又はキメラ抗体である。所定の実施態様において、上記実施態様の抗体の何れかは抗体断片である。

#### 【0026】

幾つかの実施態様において、方法は、少なくとも一の付加的な治療剤を投与することを更に含む。付加的な治療剤の例としては、限定されないが、化学療法剤及び抗体を含む。幾つかの実施態様において、ソラフェニブは、付加的な治療剤である。

#### 【0027】

幾つかの実施態様において、肝臓がんは、EpCAM、AFP、AFP及びEpCAM、Notch2、Jag1、Notch2及びJag1、核Notch2 ICD、Ras、Prom1、Spp1、FoxM1、Plk1、ccnb1、Aurkb、Wnt2、Axin2、若しくはGlu1、又はそれらの任意の組合せを発現する細胞を含む。幾つかの実施態様において、Rasは変異体Rasである。幾つかの実施態様において、肝臓がんにおいて、Notch2シグナル伝達阻害剤の投与は、EpCAM、AFP、Notch2、Notch2 ICD、Jag1、Prom1、Spp1、FoxM1、Plk1、ccnb1及びAurkbの少なくとも一の発現の減少をもたらす。幾つかの実施態様において、肝臓がんにおいて、Notch2シグナル伝達阻害剤の投与は、Wnt2、Axin2及びGlu1の少なくとも一の発現の増加をもたらす。幾つかの実施態様において、発現は、RNAseq、マイクロアレイ分析、免疫組織化学、酵素結合免疫吸着法、及びウェスタンブロットティングにより決定される。

#### 【0028】

一態様において、腫瘍をN o t c h 2又はJ a g 1に結合する抗体と接触させることを含む、哺乳動物における肝臓腫瘍を治療するための方法が提供され、ここで、肝臓腫瘍の増殖は、N o t c h 2シグナル伝達の増殖増強効果に少なくとも一部依存している。一実施態様において、抗体の、腫瘍に対する結合は、N o t c h 2の増殖増強活性に拮抗する。幾つかの実施態様において、哺乳動物はヒトである。

#### 【0029】

一態様において、血清S P P 1タンパク質レベルが上昇している個体にN o t c h 2シグナル伝達阻害剤の有効量を投与することを含む肝臓がんの治療のための方法が提供される。一実施態様において、個体の血清S P P 1タンパク質レベルは、少なくとも約80ng/mlである。所定の実施態様において、個体にN o t c h 2シグナル伝達阻害剤を投与する前の血清S P P 1タンパク質レベルは、約80ng/mlから約500ng/mlの間、約86ng/mlから約250ng/mlの間、約120ng/mlから約170ng/mlの間、又は約165ng/mlである。幾つかの実施態様において、個体にN o t c h 2シグナル伝達阻害剤を投与すると、80ng/ml未満の血清S P P 1タンパク質レベルをもたらす。特定の実施態様において、N o t c h 2シグナル伝達阻害剤を投与する前の血清S P P 1タンパク質レベルは、N o t c h 2シグナル伝達阻害剤を投与する前の24時間である。N o t c h 2シグナル伝達阻害剤の投与前又は後の血清S P P 1タンパク質レベルは、例えば、酵素結合免疫吸着アッセイなどの任意の適切な方法によって決定することができる。特定の実施態様において、血清S P P 1タンパク質レベルは、個体において、N o t c h 2シグナル伝達阻害剤を投与した後、約1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、6ヶ月又は12ヶ月減少する。幾つかの実施態様において、肝臓がんは肝細胞がん、ヘパトーマ、胆管がん、肝芽腫、肝がん、肝血管肉腫、又は転移性肝臓がんである。幾つかの実施態様において、N o t c h 2シグナル伝達阻害剤は、s i R N A、小分子阻害剤又は抗体である。幾つかの実施態様において、抗体は、抗N o t c h 2アンタゴニスト抗体又は抗J a g 1アンタゴニスト抗体などのアンタゴニスト抗体である。

#### 【0030】

幾つかの態様において、個体にN o t c h 2シグナル伝達阻害剤を投与し、N o t c h 2シグナル伝達を決定する工程を含む、肝臓がんを有する個体を治療するための方法が提供され、ここで治療後のN o t c h 2シグナル伝達の減少は、治療前のN o t c h 2シグナル伝達と比較して、個体における肝臓がんの減少を示している。幾つかの実施態様において、N o t c h 2シグナル伝達は、例えば、個体からの肝臓がん試料の免疫組織化学的分析によって、N o t c h 2 I C Dの核局在化を測定することによって決定される。幾つかの実施態様において、N o t c h 2シグナル伝達は、N o t c h 2、J a g 1、H e s及びH e y 1からなる群から選択される遺伝子の発現を測定することによって決定される。発現は、任意の方法、例えば、R T - P C R、マイクロアレイ、及びR N A s e q分析によって決定することができる。幾つかの実施態様において、肝臓がんは肝細胞がん、ヘパトーマ、胆管がん、肝芽腫、肝がん、肝血管肉腫、及び転移性肝臓がんである。幾つかの実施態様において、N o t c h 2シグナル伝達阻害剤は、s i R N A、小分子阻害剤又は抗体である。幾つかの実施態様において、抗体は、抗N o t c h 2アンタゴニスト抗体又は抗J a g 1アンタゴニスト抗体などのアンタゴニスト抗体である。

#### 【0031】

幾つかの態様において、肝臓がん細胞の増殖を阻害するための方法は、N o t c h 2又はJ a g 1に対する抗体を用いて、哺乳動物の肝臓がん細胞を治療することを含み、それによって肝臓がん細胞の増殖が阻害される。所定の実施態様において、細胞は患者にある。所定の実施態様において、細胞は培地中にある。所定の実施態様において、細胞は肝臓がん細胞である。所定の実施態様において、抗体は、本明細書に記載される抗N o t c h 2又は抗J a g 1アンタゴニスト抗体である。所定の実施態様において、抗体はヒト、ヒト化、又はキメラ抗体である。所定の実施態様において、上記実施態様の抗体の何れかは抗体断片である。

#### 【0032】

10

20

30

40

50

本明細書の方法の何れかにおいて、Notch2シグナル伝達阻害剤は、以下の阻害剤であり得る。幾つかの実施態様において、Notch2シグナル伝達阻害剤は、siRNA、小分子阻害剤又は抗体である。幾つかの実施態様において、抗体はアンタゴニスト抗体である。幾つかの実施態様において、抗体は、抗Notch2と抗体、例えば、抗Notch2の負の調節領域(NRR)抗体である。幾つかの実施態様において、抗体は、Notch2以外のNotchファミリーメンバーには有意に結合しない。幾つかの実施態様において、抗体は、マウスNotch2 NRR及びヒトNotch2 NRRに、例えば10nMのKdで結合する。幾つかの実施態様において、抗体は、

- (a) 配列番号1のアミノ酸配列を含むHVR-H1;
  - (b) 配列番号3のアミノ酸配列を含むHVR-H2;
  - (c) 配列番号4のアミノ酸配列を含むHVR-H3;
  - (d) 配列番号9のコンセンサス配列に一致するアミノ酸配列を含むHVR-L1;
  - (e) 配列番号14のコンセンサス配列に一致するアミノ酸配列を含むHVR-L2;
- 及び
- (f) 配列番号19のコンセンサス配列に一致するアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。

#### 【0033】

更なる実施態様において、抗体は、抗Jag1抗体である。幾つかの実施態様において、抗体は、(a) 配列番号81のアミノ酸配列を含むHVR-H1; (b) 配列番号84のアミノ酸配列を含むHVR-H2; (c) 配列番号87のアミノ酸配列を含むHVR-H3; (d) 配列番号88のアミノ酸配列を含むHVR-L1; (e) 配列番号89のアミノ酸配列を含むHVR-L2; 及び(f) 配列番号92のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される、少なくとも1、2、3、4、5、又は6つHVRを含む。一実施態様において、抗体は、(a) 配列番号81のアミノ酸配列を含むHVR-H1; (b) 配列番号82のアミノ酸配列を含むHVR-H2; (c) 配列番号85のアミノ酸配列を含むHVR-H3; (d) 配列番号88のアミノ酸配列を含むHVR-L1; (e) 配列番号89のアミノ酸配列を含むHVR-L2; 及び(f) 配列番号90のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。

#### 【0034】

一実施態様において、抗体は、(a) 配列番号81のアミノ酸配列を含むHVR-H1; (b) 配列番号82のアミノ酸配列を含むHVR-H2; (c) 配列番号86のアミノ酸配列を含むHVR-H3; (d) 配列番号88のアミノ酸配列を含むHVR-L1; (e) 配列番号89のアミノ酸配列を含むHVR-L2; 及び(f) 配列番号91のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。一実施態様において、抗体は、(a) 配列番号81のアミノ酸配列を含むHVR-H1; (b) 配列番号83のアミノ酸配列を含むHVR-H2; (c) 配列番号85のアミノ酸配列を含むHVR-H3; (d) 配列番号88のアミノ酸配列を含むHVR-L1; (e) 配列番号89のアミノ酸配列を含むHVR-L2; 及び(f) 配列番号90のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。

#### 【0035】

所定の実施態様において、本明細書の実施態様に記載の抗体の何れかは、モノクローナル抗体である。所定の実施態様において、上記実施態様の抗体の何れかはヒト、ヒト化、又はキメラ抗体である。所定の実施態様において、上記実施態様の抗体の何れかは抗体断片である。

#### 【0036】

更なる実施態様において、本明細書の実施態様に記載の任意の抗体は、図18の、hUMA b4D5-8の軽鎖可変ドメインフレームワークのLC-FR1、LC-FR2、LC-FR3、及びLC-FR4のアミノ酸配列を順番に含む、軽鎖の可変ドメインフレームワークのLC-FR1、LC-FR2、LC-FR3、及びLC-FR4を更に含む。

#### 【0037】

更なる実施態様において、本明細書の実施態様に記載の任意の抗体は、図18の、h u 50

MAb 4D5 - 8の重鎖可変ドメインフレームワークのHC - FR 1、HC - FR 2、HC - FR 3及びHC - FR 4のアミノ酸配列を順番に含む、重鎖の可変ドメインフレームワークのHC - FR 1、HC - FR 2、HC - FR 3及びHC - FR 4を更に含む。

【0038】

更なる実施態様において、本明細書の実施態様に記載の任意の抗体は、図19の、h u M A b 4 D 5 - 8の軽鎖可変ドメインフレームワークのLC - FR 1、LC - FR 2、LC - FR 3、及びLC - FR 4のアミノ酸配列を順番に含む、軽鎖の可変ドメインフレームワークのLC - FR 1、LC - FR 2、LC - FR 3及びLC - FR 4を更に含む。

【0039】

更なる実施態様において、本明細書の実施態様に記載の任意の抗体は、図19の、h u M A b 4 D 5 - 8の重鎖可変ドメインフレームワークのHC - FR 1、HC - FR 2、HC - FR 3及びHC - FR 4のアミノ酸配列を順番に含む、重鎖の可変ドメインフレームワークのHC - FR 1、HC - FR 2、HC - FR 3及びHC - FR 4を更に含む。

【0040】

所定の実施態様において、抗体は、( a ) 配列番号94のアミノ酸配列に少なくとも95%の配列同一性を有するV H配列；( b ) 配列番号97のアミノ酸配列に少なくとも95%の配列同一性を有するV L配列；又は( c ) ( a ) に記載のV H配列及び( b ) に記載のV L配列を含む、J a g 1に結合する単離された抗体である。幾つかの実施態様において、抗体は、配列番号94のV H配列を含む。幾つかの実施態様において、抗体は、配列番号97のV L配列を含む。幾つかの実施態様において、抗体は、配列番号94のV H配列、及び配列番号97のV L配列を含む。幾つかの実施態様において、抗体は、( a ) 配列番号95のアミノ酸配列に少なくとも95%の配列同一性を有するV H配列；( b ) 配列番号98のアミノ酸配列に少なくとも95%の配列同一性を有するV L配列；又は( c ) ( a ) に記載のV H配列及び( b ) に記載のV L配列を含む。幾つかの実施態様において、抗体は、配列番号95のV H配列を含む。幾つかの実施態様において、抗体は、配列番号98のV L配列を含む。幾つかの実施態様において、抗体は、配列番号95のV H配列、及び配列番号98のV L配列を含む。

【0041】

所定の実施態様において、抗体は、( a ) 配列番号93のアミノ酸配列に少なくとも95%の配列同一性を有するV H配列；( b ) 配列番号96のアミノ酸配列に少なくとも95%の配列同一性を有するV L配列；又は( c ) ( a ) に記載のV H配列及び( b ) に記載のV L配列を含む、J a g 1に結合する単離された抗体である。幾つかの実施態様において、抗体は、配列番号93のV H配列を含む。幾つかの実施態様において、抗体は、配列番号96のV L配列を含む。幾つかの実施態様において、抗体は、配列番号93のV H配列、及び配列番号96のV L配列を含む。

【0042】

一態様において、( a ) 容器；( b ) 肝臓がんの治療のための抗N o t c h 2抗体又は抗J a g g e d 1抗体及び担体を含む容器内に含まれる組成物；及び( c ) 肝臓がんの治療的処置又は診断的検出のための組成物の使用に言及する、容器に貼付されたラベル又は容器と共に含まれる添付文書を含む製造品が提供される。

【0043】

一態様において、肝臓がんの治療において使用のための抗N o t c h 2抗体が提供される。所定の実施態様において、肝臓がんは肝細胞がんである。所定の実施態様において、抗体は、抗N o t c h 2 N R Rアンタゴニスト抗体である。一態様において、肝臓がんの治療において使用のための抗J a g 1抗体が提供される。所定の実施態様において、肝臓がんは肝細胞がんである。所定の実施態様において、抗体は、抗J a g 1アンタゴニスト抗体である。

【0044】

一態様において、肝臓がんの治療的処置のための医薬の調製における抗N o t c h 2抗体の使用が提供される。一態様において、肝臓がんの治療のための医薬の調製における抗

10

20

30

40

50

Jagged 1 抗体の使用が提供される。

【0045】

一態様において、肝臓がんの治療的処置のための医薬の調製における本明細書に記載される製造品の使用が提供される。一態様において、肝細胞増殖性疾患の治療又は予防のための医薬の調製における本明細書に記載される製造品の使用が提供される。

【図面の簡単な説明】

【0046】

【図1A-F】図1A-Fは、AKT/Ras HTV肝臓がんモデルにおける肝臓がんマーカーの発現の特徴付けを示す。図1A-Cは、AFP<sup>+</sup>EpCAM<sup>-</sup> (図1A)、AFP<sup>+</sup>EpCAM<sup>+</sup> (図1B) 及びAFP<sup>-</sup>EpCAM<sup>+</sup> (図1C) である、腫瘍の免疫組織化学的染色を示す。図1Dは、全細胞のパーセンテージで表されたマーカー発現の罹患率を示す。図1Fは、核におけるNotch2タンパク質の局在化によって示される、Notch2シグナル伝達の活性化の免疫組織化学染色を示す。図1Eは、核Notch2染色を有する細胞のパーセントを示す。

10

【図2A-D】図2A-Dは、抗Notch2又は抗Jag1アンタゴニスト抗体により処置されたRas/AKT HTVマウスにおける減少した腫瘍量を示している。図2Aは、HTVの日に開始し、アイソタイプ対照抗体(左上)、抗Notch2抗体(右上)又は抗Jag1抗体(左下)で処置されたHTVマウスから単離された肝臓を示す。図2Bは、HTV注入の時点で投与された抗体処置後の、体重のパーセントで表されたRas/AKT HTVマウスの肝臓重量を示す。図2Cは、HTV注入後2週間で投与された抗体処置後の、体重のパーセントで表されたRas/AKT HTVマウスの肝臓重量を示す(p<0.05、n>8)。図2Dは、抗体処置後のRas/AKT HTVマウスの肝臓重量を示す(p<0.02、n>6)。

20

【図3A-H】図3A-Hは、広範囲の腫瘍タイプの発達を妨げるNotch阻害性抗体によるAKT/Ras HTV担腫瘍マウスの処置を示している。図3Aは、抗Notch2、抗Jag1又はアイソタイプ対照抗体で処置された、AKT/Ras HTVマウスの肝臓におけるAFP及びEpCAM発現の免疫蛍光分析を示している。図3B及びCは、抗Notch2及び抗Jag1処置後の、EpCAM<sup>+</sup> (図3B; p<0.007、n=7) 及びAFP<sup>+</sup> (図3C; p<0.03、n=7) の面積の減少を示している。図3Aは、抗Notch1抗体で処置された、AKT/Ras HTVマウスの肝臓におけるAFP及びEpCAM発現の免疫蛍光分析を示している。図3Eは、抗Notch1、抗Notch2、抗Notch3、抗Jag1又はアイソタイプ対照抗体によるAKT/Ras HTVマウスの処置後のEpCAM<sup>+</sup>細胞のパーセンテージを示している。図3Fは、抗Notch1、抗Notch2、抗Notch3、抗Jag1又はアイソタイプ対照抗体によるAKT/Ras HTVマウスの処置後のサイトケラチン19(CK19)の相対的発現を示している。図3Gは、抗Notch1、抗Notch2、抗Notch3、抗Jag1又はアイソタイプ対照抗体によるAKT/Ras HTVマウスの処置後のSox9のRNAを示し、図3Hはタンパク質レベルを示す。

30

【図4A-E】図4A-Eは、AKT/Ras HTVマウスのNotch阻害性抗体による処置は、担腫瘍肝臓におけるNotch経路活性化を低下させることを示している。図4Aは、細胞の数で表されたNotch2核免疫組織化学染色を示す。図4Bは、QRTPCRにより決定された、Notch2の相対的発現を示す。図4Cは、AKT/Ras HTV担腫瘍肝臓におけるHes1の免疫組織化学染色を示す。図4Dは、免疫組織化学により決定された、Hes1+細胞の画分を示す。図4Eは、QRTPCRにより決定された、HeyLの相対的発現を示す。

40

【図5A-I】図5A-Iは、肝臓がんのAKT/RasモデルにおけるNotchシグナル伝達経路の発現におけるNotch阻害性抗体の効果を示す。AKT/Ras HTVに供されたマウスは、Notch1、Notch2、Notch3、又はJag1に対するアンタゴニスト抗体又は抗ブタクサ陰性対照抗体により処置され、定量的リアルタイムPCRが、Notch1(図5A)、Notch2(図5B)、Notch3(図5C)

50

)、Notch4 (図5D)、Jag1 (図5E)、Jag2 (図5F)、DLL1 (図5G)、DLL3 (図5H)、DLL4 (図5I) について5週間後に肝臓から単離されたRNAで実施された。

【図6A-I】図6A-Iは、アイソタイプ対照、抗Notch2又は抗Jag1抗体で処置したAKT/Ras HTVマウスからの肝臓のRNAseq分析からの結果を示す。示されるのは、Prom1 (図6A)、Spp1 (図6B)、FoxM1 (図6C)、Plk1 (図6D)、ccnb1 (図6E)、Aurkb (図6F)、Wnt2 (図6G)、Axin2 (図6H) 及びグルタミン合成酵素 (Glu1、図6I) に対して正規化された数である。

【図7A-B】図7A-Bは、ヒトHCCにおけるNotch2の発現を示す。図7Aは、培養されたヒトHCC細胞株における、RT-PCRにより決定された、Notch1、Notch2及びNotch3の発現を示す。図7Bは、Notch2、Jag1及びHes1に対するヒトHCC腫瘍の免疫組織化学染色を示す。

【図8A-D】図8A-Dは、ヒト(C)及びマウス(D)のNotch2タンパク質、及びヒト(A)及びマウス(B)のNotch2の負の調節領域(NRR)の典型的なアミノ酸配列を示す。

【図9】図9は、ヒト及びマウスのJagged1タンパク質の典型的なアミノ酸配列を示す。

【図10A-B】図10A-Bは、ファージ抗体ライブラリースクリーニング及び選択のために使用されるペプチドのアミノ酸配列を示す。全てのタンパク質は、BEVS細胞において分泌タンパク質として発現され、それらの配列は、N末端からC末端の方向にに記載される。図10Aは、発現タンパク質のマウスJagged1タンパク質のアミノ酸配列を示す。N末端の太字は、短いリンカー配列(ADLGS(配列番号2))を表す。C末端での太字フォントは、短いリンカー配列(EFG)、トロンピン切断部位(LVPRGS(配列番号26))、Gスペーサー及び6-Hisタグ(配列番号27)を表す。図10Bは、発現タンパク質のヒトJag1-DSL-EGF1-4のアミノ酸配列を示す。抗原はまた、TEVプロテアーゼ切断部位、及びC末端での6-Hisタグ(配列番号27)を含んでいたが、Jag1配列のみが示されている。

【図11】図11は、ヒト分泌型ホスホプロテイン1(SPP1)の典型的なアミノ酸配列を示す。

【図12】図12は、抗Notch2 NRRアンタゴニスト抗体のH1、H2、及びH3重鎖超可変領域(HVR)配列を示す。アミノ酸位置は、以下に記載されるKabab番号付けシステムに従って番号付けされる。

【図13】図13は、抗Notch2 NRRアンタゴニスト抗体のL1、L2、及びL3軽鎖HVR配列を示す。アミノ酸位置は、以下に記載されるKabab番号付けシステムに従って番号付けされる。

【図14A-B】図14A-Bは、抗Notch2抗体の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列のアラインメントを示す。相補性決定領域(CDR)のアミノ酸の位置が示される。

【図15A-B】図15A-Bは、抗Notch2抗体の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列のアラインメントを示す。相補性決定領域(CDR)のアミノ酸の位置が示される。

【図16A-B】図16A-Bは、本発明を実施する際に使用するための典型的なアクセプターヒト可変重鎖(VH)コンセンサスフレームワーク配列を示す。配列識別子は、次のとおりである： - ヒトVHサブグループIコンセンサスフレームワーク「A」マイナスKababのCDR(配列番号32、33、34、35)。 - ヒトVHサブグループIコンセンサスフレームワーク「B」、「C」及び「D」マイナス拡張超可変領域(配列番号36、37、34、35; 配列番号36、37、38、35; 及び配列番号36、37、39、35)。 - ヒトVHサブグループIIコンセンサスフレームワーク「A」マイナスKababのCDR(配列番号40、41、42、35)。 - ヒトVHサブグループIIコンセンサスフレームワーク「B」、「C」及び「D」マイナス拡張超可変領域(配列番号43、44、42、35; 配列番号43、44、45、35; 及び配

10

20

30

40

50

列番号43、44、46、及び35)。 - ヒトVHサブグループIIIコンセンサスフレームワーク「A」マイナスKabatのCDR(配列番号47、48、49、35)。  
 - ヒトVHサブグループIコンセンサスフレームワーク「B」、「C」及び「D」マイナス拡張超可変領域(配列番号50、51、49、35;配列番号50、51、52、35;及び配列番号50、51、53、35)。  
 - ヒトVHアクセプターフレームワーク「A」マイナスKabatのCDR(配列番号54、48、55、35)。  
 - ヒトVHアクセプターフレームワーク「B」及び「C」マイナス拡張超可変領域(配列番号50、51、55、35;配列番号50、51、56、35)。  
 - ヒトVHアクセプター2フレームワーク「A」マイナスKabatのCDR(配列番号54、48、57、35)。  
 - ヒトVHアクセプター2フレームワーク「B」、「C」及び「D」マイ

10

ナス拡張超可変領域(配列番号50、51、57、35;配列番号50、51、58、35;及び配列番号50、51、59、35)。  
 【図17】図17は、本発明を実施する際に使用するための典型的なアクセプターヒト可変軽鎖(VL)コンセンサスフレームワーク配列を示す。配列識別子は、次のとおりである：  
 - ヒトVLカップサブグループIコンセンサスフレームワーク(v1)：配列番号60、61、62、63  
 - ヒトVLカップサブグループIIコンセンサスフレームワーク(v2)：配列番号64、65、66、63  
 - ヒトVLカップサブグループIIIコンセンサスフレームワーク(v3)：配列番号67、68、69、63  
 - ヒトVLカップサブグループIVコンセンサスフレームワーク(v4)：配列番号70、71、72、63。

20

【図18】図18は、hUMA b4D5-8の軽鎖及び重鎖のフレームワーク領域配列を示す(出現順に、それぞれ、配列番号60、61、30、63、50、51、59及び35)。上付き文字の数字は、Kabatに記載のアミノ酸位置を示している。

【図19】図19は、hUMA b4D5-8の軽鎖及び重鎖の改変型/変異型フレームワーク領域配列を示す(出現順に、それぞれ、配列番号60、61、62、31、50、51、53及び35)。上付き文字の数字は、Kabatに記載のアミノ酸位置を示している。

【図20】図20は、実施例に記載されるような、抗Jagged抗体のH1、H2、及びH3重鎖超可変領域(HVR)配列を示す。アミノ酸位置は、以下に記載されるKabat番号付けシステムに従って番号付けされる。

30

【図21】図21は、実施例に記載されるような、抗Jagged抗体のL1、L2、及びL3軽鎖HVR配列を示す。アミノ酸位置は、以下に記載されるKabat番号付けシステムに従って番号付けされる。

【図22】図22は、抗Jagged抗体の軽鎖及び重鎖可変ドメインフレームワーク配列を示す(出現順に、それぞれ、配列番号60、61、62、77、50、99、57及び35)。上付き文字の数字は、Kabatに記載のアミノ酸位置を示している。

【図23A-B】図23A-Bは、実施例に記載されるNotch2(配列番号100)(B?)、Notch1(配列番号101)(Y)、Notch3(配列番号102)(W)及びJag1(配列番号103)(A-2)に対する抗体の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列のアラインメントを示す。

40

【図24A-B】図24A-Bは、実施例で使用されるNotch2(配列番号104)、Notch1(配列番号105)、Notch3(配列番号106)及びJag1(配列番号107)に対する抗体の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列のアラインメントを示す。

【図25A-B】図25A-Bは、抗Jag1抗体の重鎖(図25A)及び軽鎖(図25B)可変ドメインのアミノ酸配列のアラインメントを示す。相補性決定領域(CDR)のアミノ酸の位置が示される。

【0047】

本発明の実施態様の詳細な説明

I. 定義

50

本明細書における目的のための「アクセプターヒトフレームワーク」とは、下記に定義されるように、ヒト免疫グロブリンフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワークから得られる軽鎖可変ドメイン(VL)フレームワーク又は重鎖可変ドメイン(VH)フレームワークのアミノ酸配列を含有するフレームワークである。ヒト免疫グロブリンのフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワーク「に由来する」アクセプターヒトフレームワークは、その同一のアミノ酸配列を含んでもよく、又はそれはアミノ酸配列の変化を含み得る。幾つかの実施態様において、アミノ酸変化の数は、10以下、9以下、8以下、7以下、6以下、5以下、4以下、3以下、又は2以下である。幾つかの実施態様において、VLアクセプターヒトフレームワークは、Vはヒト免疫グロブリンのフレームワーク配列又はヒトコンセンサスフレームワーク配列に、配列が同一である。

10

**【0048】**

「親和性」とは、分子(例えば、抗体)の単一結合部位とその結合パートナー(例えば、抗原)との間の非共有結合相互作用の総和の強度を指す。本明細書で使用する場合、特に断らない限り、「結合親和性」は、結合対(例えば、抗体と抗原)のメンバー間の1:1の相互作用を反映している本質的な結合親和性を指す。そのパートナーYに対する分子Xの親和性は、一般的に解離定数(Kd)で表すことができる。親和性は、本明細書に記載したものを含む、当技術分野で知られている一般的な方法によって測定することができる。結合親和性を測定するための具体的な例示であって典型的な実施態様は、以下で説明される。

**【0049】**

20

「親和性成熟」抗体とは、その改変を有していない親抗体と比較して、抗原に対する抗体の親和性に改良を生じせしめる、その一又は複数の超可変領域(HVR)において一又は複数の改変を持つ抗体を指す。

**【0050】**

用語「抗Jag1抗体」及び「Jag1に特異的に結合する抗体」は、抗体がJag1を標的とし、診断薬剤及び/又は治療的薬剤として有用であるように十分な親和性でJag1に結合することができる抗体を指す。一実施態様において、抗Jag1抗体の、無関係な、非Jag1タンパク質への結合の程度は、例えば、ラジオイムノアッセイ(RIA)によって測定される場合、抗体のJag1への結合の約10%未満である。所定の実施態様において、Jag1へ結合する抗体は、解離定数(Kd)が、1µM、100nM、10nM、1nM、0.1nM、0.01nM、又は0.001nM(例えば、 $10^{-8}$ M以下、例えば、 $10^{-8}$ Mから $10^{-13}$ M、例えば、 $10^{-9}$ Mから $10^{-13}$ M)を有する。所定の実施態様において、抗Jag1抗体は、異なる種由来のJag1間で保存されているJag1のエピトープに結合する。

30

**【0051】**

「抗Jag1アンタゴニスト抗体」は、Jag1媒介性シグナル伝達、例えば、Jag1媒介性Notch2とシグナル伝達の減少をもたらす抗Jag1抗体である。

**【0052】**

用語「抗Notch2抗体」及び「Notch2に特異的に結合する抗体」は、抗体がNotch2を標的とし、診断薬剤及び/又は治療的薬剤として有用であるように十分な親和性でNotch2に結合することができる抗体を指す。一実施態様において、抗Notch2抗体の、無関係な非Notch2タンパク質への結合の程度は、例えば、ラジオイムノアッセイ(RIA)によって測定される場合、抗体のNotch2への結合の約10%未満である。所定の実施態様において、Notch2へ結合する抗体は、解離定数(Kd)が、1µM、100nM、10nM、1nM、0.1nM、0.01nM、又は0.001nM(例えば、 $10^{-8}$ M以下、例えば、 $10^{-8}$ Mから $10^{-13}$ M、例えば、 $10^{-9}$ Mから $10^{-13}$ M)を有する。所定の実施態様において、抗Notch2抗体は、異なる種由来のNotch2間で保存されているNotch2のエピトープに結合する。

40

**【0053】**

50

「抗Notch2アンタゴニスト抗体」は、以下に定義されるように、Notch2シグナル伝達の減少をもたらす抗Notch2抗体（抗Notch2 NRR抗体を含む）である。

【0054】

本明細書における用語「抗体」は最も広い意味で用いられ、様々な抗体構造を包含し、限定されないが、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば二重特異性抗体）、及び、所望の抗原結合活性を示す限り、抗体断片を含む。

【0055】

「抗体断片」は、インタクトな抗体が結合する抗原を結合するインタクトな抗体の一部を含むインタクトな抗体以外の分子を指す。抗体断片の例としては、限定されないが、Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')<sub>2</sub>；ダイアボディ；直鎖状抗体；単鎖抗体分子（例えばscFv）；及び抗体断片から形成された多重特異性抗体を含む。

【0056】

参照抗体として「同一のエピトープに結合する抗体」とは、競合アッセイにおいて50%以上、参照抗体のその抗原への結合を遮断する抗体、逆に競合アッセイにおいて50%以上、その抗体のその抗原への結合を遮断するその参照抗体を指す。典型的な競合アッセイが、本明細書において提供される。

【0057】

「遮断抗体」又は「アンタゴニスト抗体」は、結合する抗原の生物学的活性を（部分的又は完全にのどちらかで）著しく阻害する抗体である。

【0058】

用語「キメラ」抗体は、重鎖及び／又は軽鎖の一部が特定の起源又は種から由来し、一方重鎖及び／又は軽鎖の残りが異なる起源又は種から由来する抗体を指す。

【0059】

用語「がん」及び「がん性」は、無秩序な細胞成長／細胞増殖を典型的に特徴とする、哺乳動物における生理学的状態を記述する。肝臓がんの例としては、肝細胞がん、肝細胞がん、肝芽腫、胆管がん、肝芽腫、肝がん、肉腫、リンパ腫及び肝血管肉腫を含むが、これらに限定されない。肝臓がんは、肝臓で生じ、身体の別の部分に転移したがんが含まれる。

【0060】

用語「細胞増殖性障害」及び「増殖性疾患」は、ある程度の異常な細胞増殖に関連する障害を言う。一実施態様において、肝細胞増殖性疾患はがんである。

【0061】

「化学療法剤」は、がんの治療に有用な化合物を指す。化学療法剤の例には、アルキル化剤、例えばチオテパ及びシクロホスファミド（CYTOXAN（登録商標））；スルホン酸アルキル、例えばブスルファン、インプロスルファン及びピボスルファン（pibosulfan）；アジリジン類、例えばベンゾドーパ（benzodopa）、カルボコン、メツレドーパ（meturedopa）、及びウレドーパ（uredopa）；アルトレットアミン（altretamine）、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（triethylenethiophosphoramidate）及びトリメチロロメラミン（trimethylolomelamine）を含むエチレンイミン類及びメチラメラミン類；アセトゲニン（特にプラタシン及びプラタシノン）；デルタ-9-テトラヒドロカナビノール（ドロナビノール、MARINOL（登録商標））；ラパチョーネ；ラパコール；コルヒチン；ベツリン酸；カンプトセシン（合成アナログトポテカン（HYCAMTIN（登録商標））、CPT-11（イリノテカン、CAMPTOSAR（登録商標）を含む）、アセチルカンプトテシン、スコポレクチン（scopollectin）及び9-アミノカンプトテシン；プリオスタチン；カリスタチン；CC-1065（そのアドゼレシン、カルゼレシン及びビゼレシン合成アナログを含む）；ポドフィロトキシン；ポドフィリン酸（podophyllinic acid）；テニボシド；クリプトフィシン（特にクリプトフィシン1及びクリプトフ

10

20

30

40

50

イシン 8) ; ドラスタチン ; ドゥオカルマイシン ( 合成アナログ、KW - 2189 及び C  
 B1 - TM1 を含む ) ; エロイテロピン ; パンクラチスタチン ; サルコジクチン ; スポン  
 ギスタチン ; クロランブシル、クロロナファジン ( chlornaphazine )、チ  
 ヨロホスファミド ( cholophosphamide )、エストラムスチン、イフォス  
 ファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシドヒドロクロリド、メルファラン、ノ  
 ベンビチン ( novembichin )、フェネステリン ( phenesterine )  
 、ブレドニムスチン ( prednimustine )、トロフォスファミド ( trofos  
 sfamide )、ウラシルマスタードなどのナイトロジェンマスタード ; カルムスチン  
 、クロロゾトシン ( chlorozotocin )、フォテムスチン ( fotemust  
 ine )、ロムスチン、ニムスチン、ラニムスチンなどのニトロスレアス ( nitros  
 ureas ) ; 抗生物質、例えばエネジイン抗生物質 (例えば、カリケアマイシン ( ca  
 licheamicin )、特にカリケアマイシン 1I 及びカリケアマイシン I1 ( 例  
 えば、Nicolaou et al., Agnew Chem Intl. Ed. Engl. 33:183-186(1994) を参照 ) ; C  
 DP323、経口 - 4 インテグリン阻害剤 ; ダイネマイシン ( dynemicin ) A  
 を含むダイネマイシン ; エスペラマイシン ; 並びにネオカルチノスタチン発色団及び関連  
 する色素タンパクエネジイン抗生物質発色団)、アクラシノマイシン類 ( aclacin  
 omycins )、アクチノマイシン、オースラマイシン ( authramycin )、  
 アザセリン、プレオマイシン、カクチノマイシン ( cactinomycin )、カラビ  
 シン ( carabycin )、カルミノマイシン、カルジノフィリン ( carzinop  
 hilin )、クロモマイシン類、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、デトルピシン ( 20  
 detorbicin )、6 - ジアゾ - 5 - オキソ - L - ノルロイシン、ドキシソルピシン  
 ( ADRIAMYCIN ( 登録商標 )、モルホリノ - ドキシソルピシン、シアノモルホリノ  
 - ドキシソルピシン、2 - ピロリノ - ドキシソルピシン、ドキシソルピシン HCl リポソーム注  
 射剤 ( DOXIL ( 登録商標 )、リポソームドキシソルピシン TLCD - 99 ( MYOCE  
 T ( 登録商標 )、ペグ化リポソームドキシソルピシン ( CAELYX ( 登録商標 )、及び  
 デオキシドキシソルピシンを含む)、エピルピシン、エソルピシン、イダルピシン、マーセ  
 ロマイシン ( marcellomycin )、マイトマイシン C のようなマイトマイシン  
 、マイコフェノール酸 ( mycophenolic acid )、ノガラマイシン ( no  
 galamicin )、オリボマイシン ( olivomycins )、ペプロマイシン、  
 ポトフィロマイシン ( potfiromycin )、ピューロマイシン、ケラマイシン ( 30  
 quelamicin )、ロドルピシン ( rodorubicin )、ストレプトニグリン  
 、ストレプトゾシン、ツベルシジン ( tubercidin )、ウベニメクス、ジノス  
 タチン ( zinostatin )、ゾルピシン ( zorubicin ) ; 代謝拮抗剤、例  
 えばメトトレキセート、ゲムシタピン ( gemcitabine ) ( GEMZAR ( 登録  
 商標 )、テガフル ( tegafur ) ( UFTORAL ( 登録商標 )、カペシタピン  
 ( capecitabine ) ( XELODA ( 登録商標 )、エポチロン ( epoth  
 ilone )、及び 5 - フルオロウラシル ( 5 - FU ) ; 葉酸アナログ、例えばデノプテ  
 リン ( denopterin )、メトトレキセート、プテロプテリン ( pteropte  
 rin )、トリメトレキセート ( trimetrexate ) ; プリンアナログ、例えば  
 フルダラビン ( fludarabine )、6 - メルカプトプリン、チアミプリン、チオ  
 グアニン ; ピリミジンアナログ、例えばアンシタピン、アザシチジン ( azacitid  
 ine )、6 - アザウリジン ( azauridine )、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、エノシタピン ( enocitabine )、フロ  
 キシウリジン ( floxuridine ) ; アンドロゲン類、例えばカルステロン ( ca  
 lusterone )、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 ( testolactone ) ; 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 ; 葉酸リプレニッシャー ( replenisher )、  
 例えばフロリン酸 ( frolinic acid ) ; アセグラトン ; アルドホスファミド  
 グリコシド ; アミノレブリン酸 ; エニルウラシル ; アムサクリン ( amsacrine )  
 ; ベストラブシル ( bestrabucil ) ; ビサントレン ( bisantrene ) 50

;エダトラキセート(edatraxate);デフォファミン(defofamine);  
 デメコルシン(demecolcine);ジアジコン(diaziquone);  
 エルフォルニチン(elfornithine);酢酸エリプチニウム(elliptin-  
 ium);エポチロン;エトグルシド(etoglucid);硝酸ガリウム;ヒドロ  
 キシ尿素;レンチナン;ロニダイニン(lonidainine);メイタンシン(ma-  
 ytansine)及びアンサマイトシン類(ansamitocins)のようなメイ  
 タンシノイド類(maytansinoids);ミトグアゾン(mitoguazone);  
 ミトキサントロン;モピダンモール(mopidanmol);ニトラクリン(ni-  
 tracraine);ペントスタチン;フェナメット(phenamet);ピラルビ  
 シン;ロソキサントロン(losoxantron);2-エチルヒドラジド;プロカル  
 バジン;PSK(登録商標)多糖類複合体(JHS Natural Products,  
 Eugene, OR);ラゾキサン(razoxane);リゾキシソリン(rhizoxin);  
 シゾフィラン;スピロゲルマニウム(spirogermanium);テニユア  
 ゾン酸(tenuazonic acid);トリアジコン(triaziquone);  
 ;2,2',2''-トリクロロトリエチルアミン;トリコテセン(trichothec-  
 enes)(特に、T-2トキシソリン、ベラキュリンA(verracurin A)、  
 ロリジンA(roridin A)及びアングイジン(anguidine));ウレタ  
 ン;ピンデシン(ELDISINE(登録商標)、FILDESIN(登録商標));ダ  
 カルバジン;マンノムスチン(mannomustine);ミトプロニトール;ミトラ  
 クトール(mitolactol);ピポブロマン(pipobroman);ガシトシ  
 ン(gacytosine);アラビノシド(「Ara-C」);チオテパ;タキソイド  
 、例えばバクリタキセル(TAXOL(登録商標))、バクリタキセルのアルブミン操作  
 ナノ粒子製剤(ABRAXANE<sup>TM</sup>)、及びドキシセタキセル(TAXOTERE(登録  
 商標));クロランブシル;6-チオグアニン;メルカプトプリン;メトトレキサート;  
 プラチナ剤、例えばシスプラチン、オキサリプラチン(例えばELOXATIN(登録商  
 標))及びカルボプラチン;ピンカ類でチューブリン重合の微小管形成を阻害するもの、  
 例えばピンプラスチン(VELBAN(登録商標))、ピンクリスチン(ONCOVIN(登  
 録商標))、ピンデシン(ELDISINE(登録商標))、FILDESIN(登録商  
 標))、及びビノレルピン(NAVELBINE(登録商標));エトボシド(VP-1  
 6);イホスファミド;ミトキサントロン;ロイコボビン(leucovovin);ノ  
 バントロン(novantrone);エダトレキセート;ダウノマイシン;アミノプテ  
 リン;イバンドロナート(ibandronate);トポイソメラーゼ阻害薬RFS2  
 000;ジフルオロメチロールニチン(DMFO);レチノイン酸などのレチノイド、例  
 えば、ベキサロテン(TARGRETIN(登録商標));ビスホスホネート、例えばク  
 ロドロネート(例えばBONEFOS(登録商標)又はOSTAC(登録商標))、エチ  
 ドロン酸(DIDROCAL(登録商標))、NE-58095、ゾレドロン酸/ゾレド  
 ロネート(ZOMETA(登録商標))、アレンドロネート(FOSAMAX(登録商標  
 ))、パミドロン酸(AREDIA(登録商標))、チルドロン酸(SKELID(登録  
 商標))、又はリセドロン酸(ACTONEL(登録商標));トロキサシタピン(tr-  
 oxacitabine)(1,3-ジオキソランヌクレオシドシトシン類似体);アン  
 チセンスオリゴヌクレオチド、特に異常な細胞増殖に結びつくシグナル伝達経路における  
 遺伝子の発現を阻害するもの、例えばPKC-、Raf、及びH-Ras、及び上皮増  
 殖因子受容体(EGF-R);THERATOPE(登録商標)ワクチン及び遺伝子治療  
 ワクチン等のワクチン、例えばALLOVECTIN(登録商標)ワクチン、LEUVE  
 CTIN(登録商標)ワクチン、及びVAXID(登録商標)ワクチン;トポイソメラー  
 ゼ1阻害薬(例えばLURTOTECAN(登録商標));rmRH(例えばABARE  
 LIX(登録商標));BAY439006(ソラフェニブ;Bayer);SU-11  
 248(スニチニブ、SUTENT(登録商標)、Pfizer);ペリフォシン(pe-  
 rifosine)、COX-2阻害剤(例えばセレコキシブ又はエトリコキシブ)、プ  
 ロテオゾーム阻害剤(例えばPS341);ボルテゾミブ(VELCADE(登録商標))

10

20

30

40

50

); CCI-779; チピファルニブ (tipifarnib) (R11577); オラフィニブ (orafenib)、ABT510; BCL-2 阻害剤、例えばオブリメルセンナトリウム (oblimersen sodium) (GENASENSE (登録商標)); ピクサントロン; EGFR 阻害剤 (以下の定義を参照); チロシンキナーゼ阻害剤; セリン-スレオニンキナーゼ阻害剤、例えばラパマイシン (シロリムス、RAPAMUNE (登録商標)); ファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤、例えばロナファーンニブ (SCH6636, SARASAR<sup>TM</sup>); 及び上述したものの何れかの薬学的に許容可能な塩、酸又は誘導体; 並びに上記のうち2以上の組合せ、例えば、シクロフォスファミド、ドキシソルピシン、ピンクリスチン、及びプレドニソロンの併用療法の略称であるCHOP; 及び5-FU及びロイコボリンとオキサリプラチン (ELOXATIN<sup>TM</sup>) を組合せた治療法の略称であるFOLFOXが含まれる。

10

## 【0062】

本明細書で定義される化学療法剤には、がんの増殖を促進しうるホルモンの作用を調節、低減、遮断、又は阻害するように働く「抗ホルモン剤」又は「内分泌治療剤」が含まれる。それらはそれ自体がホルモンであってもよく、限定するものではないが、混合アゴニスト/アンタゴニストプロファイルを持つ抗エストロゲン、例えばタモキシフェン (NOLVADEX (登録商標))、4-ヒドロキシタモキシフェン、トレミフェン (FARESTON (登録商標))、イドキシフェン、ドロキシフェン、ラロキシフェン (raloxifene) (EVISTA (登録商標))、トリオキシフェン (trioxifene)、ケオキシフェン (keoxifene)、及びSERM3などの選択的なエストロゲン受容体調節因子 (SERM); アゴニスト特性を有さない純粋な抗エストロゲン類、例えばフルベストラント (FASLODEX (登録商標))、及びEM800 (このような薬剤はエストロゲン受容体 (ER) 二量体化をブロックし、DNA結合を阻害し、ER代謝回転を増加させ、及び/又はERレベルを抑制しうる); アロマターゼ阻害剤、例えば、ホルメスタン及びエキセメスタン (AROMASIN (登録商標)) などのステロイド系アロマターゼ阻害剤、及びアナストロゾール (ARIMIDEX (登録商標))、レトロゾール (FEMARA (登録商標)) 及びアミノグルテチミドなどの非ステロイド性アロマターゼ阻害剤、及びボロゾール (RIVISOR (登録商標))、メゲストロールアセテート (MEGASE (登録商標))、ファドロゾール及び4(5)-イミダゾールを含む他のアロマターゼ阻害剤; 黄体形成ホルモン放出ホルモンアゴニスト、例えばロイプロリド (LUPRON (登録商標)) 及びELIGARD (登録商標))、ゴセレリン、ブセレリン、及びトリプトレリン; 性ステロイド、例えばプロゲステロン、例えばメゲストロールアセテート及びメドロキシプロゲステロンアセテート、エストロゲン、例えばジエチルスチルベストロール及びブレマリン、及びアンドロゲン/レチノイド、例えばフルオキシメステロン、全てのトランスレチオニン酸及びフェンレチニド; オナプリストン; 抗プロゲステロン; エストロゲン受容体下方制御因子 (ERD); 抗アンドロゲン類、例えばフルタミド、ニルタミド及びピカルタミド; 及び上記の何れかの薬学的に許容可能な塩、酸又は誘導体; 並びに、上記のうちの2以上の組合せを含む。

20

30

## 【0063】

抗体の「クラス」は、その重鎖が保有する定常ドメイン又は定常領域のタイプを指す。抗体の5つの主要なクラス: IgA、IgD、IgE、IgG及びIgMがあり、それらの幾つかは更にサブクラス (アイソタイプ)、例えばIgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub>、IgA<sub>1</sub>及びIgA<sub>2</sub>に分類される。免疫グロブリンの異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ、  
、  
、  
、及びμと呼ばれる。

40

## 【0064】

「補体依存性細胞障害」もしくは「CDC」は、補体の存在下で標的を溶解することを意味する。古典的補体経路の活性化は、その同族抗原に結合する (適切なサブクラスの) 抗体に対する補体系 (C1q) の第一の成分の結合によって開始される。補体活性化を評価するために、CDCアッセイを、例えば、Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996)に記載されるように実施することができる。Fc領域アミノ酸配列を

50

変更して C 1 q 結合能力が増大又は減少したポリペプチド変異体は、米国特許第 6 1 9 4 5 5 1 号 ( B 1 ) 及び国際公開第 1 9 9 9 / 5 1 6 4 2 号に記述される。また、Idusogie et al. J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000)を参照のこと。

【 0 0 6 5 】

本明細書で用いられる「細胞傷害性薬剤」という用語は、細胞の機能を阻害又は阻止し及び/又は細胞死又は破壊を生ずる物質を指す。細胞傷害性薬剤は、限定されないが、放射性同位体 (例えば、A t <sup>2 1 1</sup>、I <sup>1 3 1</sup>、I <sup>1 2 5</sup>、Y <sup>9 0</sup>、R e <sup>1 8 6</sup>、R e <sup>1 8 8</sup>、S m <sup>1 5 3</sup>、B i <sup>2 1 2</sup>、P <sup>3 2</sup>、P b <sup>2 1 2</sup> 及び L u の放射性同位体) ; 化学療法剤又は薬物 (例えば、メトトレキセート、アドリアマイシン、ピンカアルカロイド (ピンクリスチン、ピンブラスチン、エトポシド)、ドキシソルピシン、メルファラン、マイトマイシン C、クロラムブシル、ダウノルピシン又は他の挿入剤) ; 増殖阻害剤; 酵素及びその断片、例えば核酸分解酵素など; 抗生物質; 小分子毒素などの毒素、又は細菌、真菌、植物又は動物由来の酵素活性毒素 (それらの断片及び/又はその変異体を含む) ; 及び以下に開示される様々な抗腫瘍剤又は抗がん剤を包含する。

【 0 0 6 6 】

用語「細胞分裂阻害剤」とは、インビトロ又はインビボの何れかにおいて、細胞の増殖を停止する化合物又は組成物を指す。従って、細胞分裂阻害剤は、S 期の細胞の割合を有意に減少させるものであってもよい。細胞分裂阻害剤の更なる例は、G 0 / G 1 停止又は M 期停止を誘導することによって、細胞周期の進行を遮断する薬剤を含む。ヒト化抗 H e r 2 抗体のトラスツズマブ (ハーセプチン (登録商標)) は G 0 / G 1 停止を誘導する細胞分裂阻害剤の例である。古典的な M 期ブロッカーには、ピンカ (ピンクリスチン及びピンブラスチン)、タキサン、及び例えばドキシソルピシン、エピルピシン、ダウノルピシン、エトポシド、及びブレオマイシンなどのトポイソメラーゼ I I 阻害剤が含まれる。また G 1 停止させるこれらの薬剤は、S 期停止にも波及し、例えば、DNA アルキル化剤、例えば、タモキシフェン、プレドニゾン、ダカルバジン、メクロレタミン、シスプラチン、メトトレキセート、5 - フルオロウラシル、及びアラ - C である。更なる情報は、The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn 及び Israel, 編、第一章、表題「Cell cycle regulation, oncogene, and antineoplastic drugs」, Murakami et al. (W.B. Saunders, Philadelphia, 1995)、特に 1 3 頁に見出すことができる。タキサン類 (パクリタキセル及びドセタキセル) は、共にイチイに由来する抗がん剤である。ヨーロッパイチイに由来するドセタキセル (T A X O T E R E (登録商標)、ローン・プーラン ローラー) は、パクリタキセル (T A X O L (登録商標)、プリストル - マイヤー スクウィブ) の半合成類似体である。パクリタキセル及びドセタキセルは、チューブリン二量体から微小管の集合を促進し、細胞の有糸分裂を阻害する結果となる脱重合を防ぐことによって微小管を安定化にする。

【 0 0 6 7 】

「エフェクター機能」とは、抗体のアイソタイプにより変わる、抗体の F c 領域に起因する生物学的活性を指す。抗体エフェクター機能の例としては、C 1 q 結合及び補体依存性細胞傷害 (C D C ) ; F c 受容体結合; 抗体依存性細胞媒介性細胞障害 (A D C C ) ; 貪食; 細胞表面受容体 (例えば、B 細胞受容体) のダウンレギュレーション; 及び B 細胞の活性化を含む。

【 0 0 6 8 】

薬剤、例えば、薬学的製剤の「有効量」とは、所望の治療的又予防的結果を達成するために必要な用量及び期間での、有効な量を指す。

【 0 0 6 9 】

用語「発現」は、遺伝子にコードされる情報の、メッセンジャー RNA (mRNA) への、そしてその後のタンパク質への変換を指す。

【 0 0 7 0 】

ここで、目的のタンパク質を「発現する」試料又は細胞は、タンパク質をコードする mRNA、又はタンパク質 (その断片を含む) が、試料又は細胞中に存在すると判断される

10

20

30

40

50

ものである。

【 0 0 7 1 】

用語「Fc領域」は、定常領域の少なくとも一部を含む、免疫グロブリン重鎖のC末端領域を定義するために使用される。その用語は、天然配列Fc領域と変異体Fc領域を含む。一実施態様において、ヒトIgG重鎖Fc領域はCys 226又はPro 230から重鎖のカルボキシル末端まで伸長する。しかし、Fc領域のC末端リジン(Lys 447)は存在しているか、又は存在していない場合がある。本明細書に明記されていない限り、Fc領域又は定常領域内のアミノ酸残基の番号付けは、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991に記載されるように、EUインデックスとも呼ばれるEU番号付けシステムに従う。

10

【 0 0 7 2 】

「フレームワーク」又は「FR」は、超可変領域(HVR)残基以外の可変ドメイン残基を指す。可変ドメインのFRは、一般的に4つのFRのドメイン:FR1、FR2、FR3、及びFR4からなる。従って、HVR配列及びFR配列は、一般に次のVH(又はVL)配列:FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4に現れる。

【 0 0 7 3 】

用語「完全長抗体」、「インタクトな抗体」及び「全抗体」は、本明細書中で互換的に使用され、天然型抗体構造と実質的に類似の構造を有するか、又は本明細書で定義されるFc領域を含む重鎖を有する抗体を指す。

20

【 0 0 7 4 】

用語「宿主細胞」、「宿主細胞株」及び「宿主細胞培養」は互換的に使用され、外因性の核酸が導入された細胞を指し、そのような細胞の子孫を含める。宿主細胞は、「形質転換体」及び「形質転換された細胞」を含み、継代の数に関係なく、それに由来する一次形質転換細胞及び子孫が含まれる。子孫は親細胞と核酸含量が完全に同一ではないかもしれないが、突然変異が含まれる場合がある。最初に形質転換された細胞においてスクリーニング又は選択されたものと同じ機能又は生物活性を有する変異型子孫が本明細書において含まれる。

【 0 0 7 5 】

「ヒト抗体」は、ヒト又はヒト細胞により産生されるか又はヒト抗体のレパートリー又は他のヒト抗体をコードする配列を利用した非ヒト起源に由来する抗体のアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列を有するものである。ヒト抗体のこの定義は、非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を特に除外する。

30

【 0 0 7 6 】

「ヒトコンセンサスフレームワーク」とは、ヒト免疫グロブリンVL又はVHフレームワーク配列の選択において最も一般的に存在するアミノ酸残基を表すフレームワークである。一般的には、ヒト免疫グロブリンVL又はVH配列の選択は、可変ドメイン配列のサブグループからのものである。一般的には、配列のサブグループは、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3にあるサブグループである。一実施態様において、VLについて、サブグループは上掲のKabataらにあるサブグループC<sub>1</sub>である。一実施態様において、VHについて、サブグループは上掲のKabataらにあるサブグループI<sub>1</sub>である。

40

【 0 0 7 7 】

「ヒト化」抗体は、非ヒトHVR由来のアミノ酸残基、及びヒトFR由来アミノ酸残基を含むキメラ抗体を指す。所定の実施態様において、ヒト化抗体は、少なくとも一つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含み、HVR(例えば、CDR)の全て又は実質的に全てが、非ヒト抗体のものに対応し、FRの全て又は実質的に全てが、ヒト抗体のものに対応する。ヒト化抗体は、任意で、ヒト抗体由来の抗体定常領域の少なくとも

50

一部を含んでもよい。抗体の「ヒト化型」、例えば、非ヒト抗体は、ヒト化を遂げた抗体を指す。

【0078】

本明細書で使用される用語「超可変領域」又は「HVR」は、配列が超可変（「相補性決定領域」又は「CDR」）であるか、及び/又は構造的に定義されたループ（「超可変ループ」）を形成するか、及び/又は抗原接触残基（「抗原接触」）を含む抗体可変ドメインの各領域を指す。一般的に、抗体は、6つのHVR：VH（H1、H2、H3）に3つ、及びVL（L1、L2、L3）に3つを含む。本明細書における典型的なHVRは、  
（a）アミノ酸残基26-32（L1）、50-52（L2）、91-96（L3）、26-32（H1）、53-55（H2）、及び96-101（H3）で生じる超可変ループ（Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)）；

（b）アミノ酸残基24-34（L1）、50-56（L2）、89-97（L3）、31-35b（H1）、50-65（H2）、及び95-102（H3）で生じるCDR（Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)）；

（c）アミノ酸残基27c-36（L1）、46-55（L2）、89-96（L3）、30-35b（H1）、47-58（H2）、及び93-101（H3）で生じる抗原接触（MacCallum et al. J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996)）；及び

（d）HVRアミノ酸残基46-56（L2）、47-56（L2）、48-56（L2）、49-56（L2）、26-35（H1）、26-35b（H1）、49-65（H2）、93-102（H3）、及び94-102（H3）を含む、（a）、（b）、及び/又は（c）の組合せを含む。

【0079】

一実施態様において、HVR残基は、図12、13、20、21において同定されるものを含む。

【0080】

特に断らない限り、可変ドメイン内のHVR残基及び他の残基（例えば、FR残基）は、上掲のKabataらに従い、本明細書において番号が付けられる。

【0081】

「イムノコンジュゲート」は、一以上の異種分子にコンジュゲートした抗体であり、限定されないが、細胞傷害性薬剤を含む。

【0082】

「個体」又は「被検体」は、哺乳動物である。哺乳動物は、限定されないが、家畜動物（例えば、ウシ、ヒツジ、ネコ、イヌ、ウマ）、霊長類（例えば、ヒト、サルなどの非ヒト霊長類）、ウサギ、げっ歯類（例えば、マウス及びラット）を含む。所定の実施態様において、個体又は被検体はヒトである。

【0083】

「肝臓がんを有する危険性のある個体」は、肝臓がんを罹患する傾向が平均よりも高い個体を指す。肝臓がんを有する危険性のある個体の例は、限定されないが、肝炎、例えば、B型又はC型肝炎、肝硬変、良性肝腫瘍、血管腫、肝腺腫、及び限局性結節性過形成を有する個体を含む。

【0084】

「阻害する」とは、基準と比較して、活性、機能、及び/又は量を減少させる又は低下させることである。

【0085】

「細胞の成長及び増殖の阻害」は、細胞の成長及び増殖を少なくとも、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、又は100%減少させることを意味し、かつ細胞死を誘導することを含む。

【0086】

「単離された」抗体は、その自然環境の成分から分離されているものである。幾つかの

10

20

30

40

50

実施態様において、抗体は、例えば、電気泳動（例えば、S D S - P A G E、等電点電気泳動（I E F）、キャピラリー電気泳動）又はクロマトグラフィー（例えば、イオン交換又は逆相H P L C）により決定されるように、95%以上又は99%の純度に精製される。抗体純度の評価法の総説としては、例えば、Flatman et al., J. Chromatogr. B 848:79-87 (2007)を参照のこと。

【0087】

「単離された」核酸は、その自然環境の成分から分離された核酸分子を指す。単離された核酸は、核酸分子を通常含む細胞に含まれる核酸分子を含むが、しかし、その核酸分子は、染色体外又はその自然の染色体上の位置とは異なる染色体位置に存在している。

【0088】

「抗J a g 1抗体をコードする単離された核酸」又は「抗N o t c h 2抗体をコードする単離された核酸」は、抗体の重鎖及び軽鎖（又はその断片）をコードする一以上の核酸分子を指し、単一のベクター又は別個のベクター内のそのような核酸分子、及び宿主細胞の一以上の位置に存在するそのような核酸分子を含む。

【0089】

特に断らない限り、本明細書で使用する用語「J a g g e d」又は「J a g」は、霊長類（例えばヒト）及びげっ歯類（例えば、マウス、ラット）などの哺乳動物を含む任意の脊椎動物由来の任意の天然型J a g g e dを指す。その用語は、「完全長」で未処理のJ a g、並びに細胞内でのプロセッシングから生じた任意の形態のJ a g g e dを含む。その用語はまた、J a g g e dの天然に生じる変異体、例えば、スプライス変異体又は対立遺伝子変異体を含む。

【0090】

特に断らない限り、本明細書で使用する用語「J a g g e d 1」又は「J a g 1」は、霊長類（例えばヒト）及びげっ歯類（例えば、マウス、ラット）などの哺乳動物を含む任意の脊椎動物由来の任意の天然型J a g 1を指す。その用語は、「完全長」で未処理のJ a g 1、並びに細胞内でのプロセッシングから生じた任意の形態のJ a g 1を含む。その用語はまた、J a g 1の天然に生じる変異体、例えば、スプライス変異体又は対立遺伝子変異体を含む。典型的なヒト及びマウスJ a g 1のアミノ酸配列が図9に示される。

【0091】

本明細書において使用される「発現のレベル」又は「発現レベル」なる用語は、生物学的試料中のポリヌクレオチド、m R N A又はアミノ酸生成物若しくはタンパク質の量を意味する。

【0092】

本明細書で使用される用語「モノクローナル抗体」は、実質的に均質な抗体の集団から得られる抗体を意味し、即ち、例えば、天然に存在する変異を含み、又はモノクローナル抗体製剤の製造時に発生し、一般的に少量で存在している変異体などの、可能性のある変異体抗体を除き、集団を構成する個々の抗体は同一であり、及び/又は同じエピトープに結合する。異なる決定基（エピトープ）に対する異なる抗体を典型的に含むポリクローナル抗体の調製物とは対照的に、モノクローナル抗体の調製物の各モノクローナル抗体は、抗原の単一の決定基に対するものである。従って、修飾語「モノクローナル」は、実質的に均質な抗体の集団から得られる抗体の特徴を示し、任意の特定の方法による抗体の産生を必要とするものとして解釈されるべきではない。例えば、本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は、限定されないが、ハイブリドーマ法、組換えD N A法、ファージディスプレイ法、ヒト免疫グロブリン遺伝子座の全部又は一部を含むトランスジェニック動物を利用する方法を含む様々な技術によって作成され、モノクローナル抗体を作製するためのそのような方法及び他の例示的な方法は、本明細書に記載されている。

【0093】

「ネイキッド抗体」とは、異種の部分（例えば、細胞傷害性部分）又は放射性標識にコンジュゲートしていない抗体を指す。ネイキッド抗体は薬学的製剤中に存在してもよい。

【0094】

10

20

30

40

50

「天然型抗体」は、天然に存在する様々な構造をとる免疫グロブリン分子を指す。例えば、天然型 I g G 抗体は、ジスルフィド結合している 2 つの同一の軽鎖と 2 つの同一の重鎖から成る、約 1 5 0 0 0 0 ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。N 末端から C 末端に、各重鎖は、可変重鎖ドメイン又は重鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域 ( V H ) を有し、3 つの定常ドメイン ( C H 1、C H 2 及び C H 3 ) が続く。同様に、N 末端から C 末端に、各軽鎖は、可変軽鎖ドメイン又は軽鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域 ( V L ) を有し、定常軽鎖 ( C L ) ドメインが続く。抗体の軽鎖は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ ( ) とラムダ ( ) と呼ばれる、2 つのタイプの何れかに割り当てることができる。

【 0 0 9 5 】

特に断らない限り、本明細書で使用する用語「 N o t c h 」は、霊長類 ( 例えばヒト ) 及びげっ歯類 ( 例えば、マウス、ラット ) などの哺乳動物を含む任意の脊椎動物由来の任意の天然型 N o t c h を指す。その用語は、「完全長」で未処理の N o t c h、並びに細胞内でのプロセッシングから生じた任意の形態の N o t c h を含む。その用語はまた、N o t c h の天然に生じる変異体、例えば、スプライス変異体又は対立遺伝子変異体を含む。

【 0 0 9 6 】

特に断らない限り、本明細書で使用する用語「 N o t c h 2 」は、霊長類 ( 例えばヒト ) 及びげっ歯類 ( 例えば、マウス、ラット ) などの哺乳動物を含む任意の脊椎動物由来の任意の天然型 N o t c h 2 を指す。その用語は、「完全長」で未処理の N o t c h、並びに細胞内でのプロセッシングから生じた任意の形態の N o t c h を含む。その用語はまた、N o t c h 2 の天然に生じる変異体、例えば、スプライス変異体又は対立遺伝子変異体を含む。典型的なヒト N o t c h 2 のアミノ酸配列が図 8 に示される。

【 0 0 9 7 】

「 N o t c h 2 シグナル伝達阻害剤」なる用語は、上記に定義されるように、N o t c h 2 シグナル伝達の減少をもたらす薬剤を指す。N o t c h 2 シグナル伝達阻害剤は、N o t c h 2 特異的アンタゴニスト及び J a g 1 特異的アンタゴニストを含む。N o t c h 2 特異的アンタゴニストは、N o t c h 2 シグナル伝達を減少させ、別の N o t c h 受容体 ( 哺乳動物における N o t c h 1、3、又は 4 ) によるシグナル伝達には有意には影響を与えない。N o t c h 2 特異的アンタゴニストの例は、N o t c h 2 リガンドへの N o t c h 2 の結合を遮断する薬剤を含む。J a g 1 特異的アンタゴニストは、J a g 1 媒介性シグナル伝達を減少させる。J a g 1 特異的アンタゴニストの例は、N o t c h 2 に結合する薬剤を含む。ガンマセクレターゼ阻害剤などの P a n - N o t c h 阻害剤は、本明細書に定義される N o t c h 2 シグナル伝達阻害剤から明示的に除外される。

【 0 0 9 8 】

用語「添付文書」は、効能、用法、用量、投与、併用療法、禁忌についての情報、及び / 又はそのような治療用製品の使用に関する警告を含む、治療用製品の商用パッケージに慣習的に含まれている説明書を指すために使用される。

【 0 0 9 9 】

参照ポリペプチド配列に関する「パーセント ( % ) アミノ酸配列同一性」は、配列を整理させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば間隙を導入した後、如何なる保存的置換も配列同一性の一部と考えないとした、参照ポリペプチドのアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセントとして定義される。パーセントアミノ酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当業者の技量の範囲にある種々の方法、例えば B L A S T、B L A S T - 2、A L I G N、又は M e g a l i g n ( D N A S T A R ) ソフトウェアのような公に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用することにより達成可能である。当業者であれば、比較される配列の完全長に対して最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、配列をアラインするための適切なパラメータを決定することができる。しかし、ここでの目的のためには、% アミノ酸配列同一性の値は、配列比較コンピュータプログラム A L I G N - 2 を使用することによって生成される。A L I G N - 2 配列比較コンピュータプログラムはジェネンテッ

10

20

30

40

50

ク社によって作製され、ソースコードは米国著作権庁、ワシントンD.C., 20559に使用者用書類とともに提出され、米国著作権登録番号TXU510087の下で登録されている。ALIGN-2もまた、ジェネンテック社、サウスサンフランシスコ、カリフォルニアから公的に入手可能であり、又はそのソースコードからコンパイルすることができる。ALIGN-2プログラムは、デジタルUNIXのV4.0Dを含む、UNIXオペレーティングシステム上での使用のためにコンパイルされるべきである。全ての配列比較パラメータは、ALIGN-2プログラムによって設定され変動しない。

#### 【0100】

アミノ酸配列比較にALIGN-2が用いられる状況では、与えられたアミノ酸配列Aの、与えられたアミノ酸配列Bとの、又はそれに対する%アミノ酸配列同一性（或いは、与えられたアミノ酸配列Bと、又はそれに対して所定の%アミノ酸配列同一性を持つ又は含む与えられたアミノ酸配列Aと言うこともできる）は次のように計算される：

分率 $X/Y$ の100倍。

ここで、 $X$ は配列アラインメントプログラムALIGN-2により、AとBのそのプログラムのアラインメントにおいて同一と一致したスコアのアミノ酸残基の数であり、 $Y$ はBの全アミノ酸残基数である。アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さとは異なる場合、AのBに対する%アミノ酸配列同一性は、BのAに対する%アミノ酸配列同一性とは異なることは理解されるであろう。特に断らない限り、本明細書で使用される全ての%アミノ酸配列同一性値が、ALIGN-2コンピュータプログラムを使用し、直前の段落で説明したように得られる。

#### 【0101】

用語「薬学的製剤」は、その中に有効で含有される活性成分の生物学的活性を許容するような形態であって、製剤を投与する被検体にとって許容できない毒性である他の成分を含まない調製物を指す。

#### 【0102】

「薬学的に許容可能な担体」は、被検体に非毒性であり、有効成分以外の薬学的製剤中の成分を指す。薬学的に許容可能な担体は、限定されないが、緩衝剤、賦形剤、安定剤、又は保存剤を含む。

#### 【0103】

「再発した」とは、患者の病気のその以前の病的状態への退行、特に、見かけの回復又は部分的な回復後の症状の再発を意味する。他に示されない限り、再発状態は、化学療法及び幹細胞移植治療を含む以前の処置の前の病気へ戻るプロセス又は再発を指す。

#### 【0104】

「難治性」とは、治療に対しての、疾患又は状態の抵抗性又は非応答性を指す（例えば、治療が施されたとしても腫瘍性形質細胞の数が増加するなど）。他に示されない限り、用語「難治性」とは、限定されないが、化学療法及び幹細胞移植治療を含む任意の以前の治療に対しての、抵抗性又は非応答性を指す。

#### 【0105】

特に断らない限り、本明細書で使用する用語「分泌型ホスホプロテイン」又は「SPP1」又は「オステオポンチン」は、霊長類（例えばヒト）及びげっ歯類（例えば、マウス、ラット）などの哺乳動物を含む任意の脊椎動物由来の任意の天然型SPP1を指す。その用語は、「完全長」で未処理のSPP1、並びに細胞内でのプロセッシングから生じた任意の形態のSPP1を含む。その用語はまた、SPP1の天然に生じる変異体、例えば、スプライス変異体又は対立遺伝子変異体を含む。典型的なヒトSPP1のアミノ酸配列が図11に示される。

#### 【0106】

本明細書で用いる「実質的に減少」、「実質的に異なる」という句は、当業者が、2つの値の間の差異が、その値（例えばKd値）によって測定される生物学的特性という脈絡の中で、統計学的に有意であると考慮するであろうほどに、2つの数値（一般には、一つは分子に関連するもの、他方は参照/比較分子に関連するもの）の間の十分に高度な違い

10

20

30

40

50

を指す。

【0107】

本明細書で使用される「実質的に同様」又は「実質的に同一」なる用語は、当業者が、該値（例えばKd値）により測定される生物学的特徴の文脈で2つの値の間に、殆ど又は全く生物学的及び/又は統計的に有意な差がないと考えるように、2つの数値間（例えば本発明の抗体に関連する一方と参照/比較抗体に関連する他方）の十分に高い度合いの類似性を指す。

【0108】

本明細書で用いられる「腫瘍」は、悪性又は良性に関わらず、全ての新生細胞成長及び増殖、及び全ての前がん性及びがん性の細胞及び組織を意味する。「がん」、「がん性」、  
10 「細胞増殖性疾患」、「増殖性疾患」及び「腫瘍」という用語はここで意味するように相互排他的ではない。

【0109】

本明細書で用いられるように、「治療」（及び「治療する（treat）」又は「治療している（treating）」など文法上の変形）は、治療されている個体の自然経過を変えようと試みる臨床的介入を指し、予防のために、又は臨床病理の過程においての何れかで実行できる。治療の望ましい効果は、限定されないが、疾患の発症又は再発を予防すること、症状の緩和、疾患の直接的又は間接的な病理学的帰結の縮小、転移を予防すること、疾患の進行の速度を遅らせること、疾患状態の改善又は緩和、及び寛解又は予後の改善を含む。幾つかの実施態様において、本発明の抗体は、疾患の発症を遅延させるか又は疾患の進行を遅くするために使用される。  
20

【0110】

用語「可変領域」又は「可変ドメイン」は、抗体の抗原への結合に關与する抗体の重鎖又は軽鎖のドメインを指す。天然型抗体の可変重鎖ドメイン及び軽鎖（それぞれVH及びVL）は、4つの保存されたフレームワーク領域（FR）と3つの超可変領域（HVR）を含む各ドメインを持ち、一般的に似たような構造を有する。（例えば、Kindt et al. *Kuby Immunology*, 6<sup>th</sup> ed., W.H. Freeman and Co., 91頁（2007）を参照）。単一のVH又はVLドメインは、抗原結合特異性を付与するのに十分であり得る。更に、特定の抗原に結合する抗体は、相補的なVL又はVHドメインのそれぞれのライブラリーをスクリーニングするために、抗原に特異的に結合する抗体からのVH又はVLドメインを用いて単離  
30 することができる。例えば、Portolano et al., *J. Immunol.* 150:880-887 (1993); Clarkson et al., *Nature* 352:624-628 (1991)を参照。

【0111】

本明細書で使用される用語「ベクター」は、それが連結されている別の核酸を伝播することができる核酸分子を指す。この用語は、自己複製核酸構造としてのベクター、並びにそれが導入された宿主細胞のゲノムに組み込まれたベクターを含む。ある種のベクターは、それらが動作可能なように連結されている核酸の発現を指示することができる。このようなベクターは、本明細書では「発現ベクター」と言う。

【0112】

II. 組成物及び方法

一態様において、本発明は、肝臓がんの治療のための、Notch経路の成分の阻害に一部は基づく。  
40

【0113】

一態様において、個体にNotch2シグナル伝達阻害剤の有効量を投与する工程を含む、肝臓がん治療を必要とする個体における肝臓がんを治療する方法が提供される。幾つかの実施態様において、肝臓がんは肝細胞がん（hepatocellular carcinoma）、ヘパトーマ（hepatoma）、胆管がん（cholangiocarcinoma）、肝芽腫（hepatoblastoma）、肝がん（hepatic carcinoma）、肝血管肉腫（hepatic angiosarcoma）、又は転移性肝がん（metastatic liver cancer）である。幾つかの実  
50

施態様において、肝臓がんは、難治性がんである。

【0114】

Notch2シグナル伝達阻害剤の例は、当該分野で周知であり、幾つかは、限定されないが、可溶性Notch受容体、水溶性Notchリガンドの変異体、例えば、ドミナントネガティブリガンド変異体、Notch2又はJag1に結合するアプタマー又はオリゴペプチド、Notch2シグナル伝達を特異的に妨害する有機又は無機分子、抗Notch2アンタゴニスト抗体及び抗Jag1アンタゴニスト抗体を含み、本明細書に例示されている。Notch2特異的アンタゴニストの例は、米国特許出願公開第2010/0111958号、及びSjoelund et al., J. Clin. Invest. 118(1):217-228 (2008)に記載されるものを含む。

10

【0115】

所定の実施態様において、Notch2シグナル伝達阻害剤は、抗Notch2アンタゴニスト抗体である。一つのそのような実施態様において、抗Notch2アンタゴニスト抗体は、Notch2の細胞外ドメインに結合し、Notch2シグナル伝達の減少をもたらす抗体である。一つのそのような実施態様において、抗Notch2アンタゴニスト抗体は、抗Notch2 NRR抗体である。抗Notch2 NRR抗体は、限定されないが、国際出願公開番号WO2010039832に開示される任意の抗Notch2 NRR抗体を含み、これはその全体が本明細書に参照により援用される。このような抗体は、限定されないが、Notch2 NRRのLNR-Aドメイン及びHD-Cドメインに結合する抗Notch2 NRR抗体を含む。例示的な抗Notch2 NRR抗体は、抗体A、抗体B、抗体B-1、抗体B-2、及び抗体B-3として本明細書で指定されたモノクローナル抗体である。Notch2 NRRに結合する抗体Bは、ファージライブラリーから単離されたその抗体は、抗体B-1、B-2抗体、及び抗体B-3を生成するように親和性熟成された。抗体B、抗体B-1、抗体B-2、及び抗体B-3の重鎖及び軽鎖の超可変領域(HVR)の配列は、図12と13にそれぞれ示される。抗体B、抗体B-1、抗体B-2、及び抗体B-3の重鎖及び軽鎖の可変ドメインの配列は、図14と15に示される。抗Notch2 NRR抗体のさらなる実施態様が以下のように提供される。

20

【0116】

一態様において、Notch2 NRRに特異的に結合するアンタゴニスト抗体が提供され、ここでその抗体は、

30

- (a) 配列番号1のアミノ酸配列を含むHVR-H1；
- (b) 配列番号3のアミノ酸配列を含むHVR-H2；
- (c) 配列番号4のアミノ酸配列を含むHVR-H3；
- (d) 配列番号9のコンセンサス配列に一致するアミノ酸配列を含むHVR-L1；
- (e) 配列番号14のコンセンサス配列に一致するアミノ酸配列を含むHVR-L2；

及び

(f) 配列番号19のコンセンサス配列に一致するアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される少なくとも1、2、3、4、5、又は6つHVRを含む。

40

【0117】

更なる態様において、抗体は、配列番号4のアミノ酸配列を含むHVR-H3及び上記(a)、(b)、(d)、(e)、及び(f)から選択される少なくとも一、二、三、四、又は五のHVRを含む。更なる態様において、抗体は上記(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、及び(f)を含む。(a)、(d)、(e)及び(f)に関して、以下の実施態様の何れか一以上が意図される。HVR-H1は配列番号1のアミノ酸配列を含み；HVR-L1は配列番号5-8から選択されるアミノ酸配列を含み；HVR-L2は配列番号10-13から選択されるアミノ酸配列を含み；及びHVR-L3は配列番号15-18から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0118】

別の態様において、Notch2 NRRに特異的に結合する抗体が提供され、ここで

50

該抗体は、配列番号1のアミノ酸配列を含むHVR-H1、配列番号3のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び配列番号4のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む。

【0119】

別の態様において、Notch2 NRRに特異的に結合する抗体が提供され、ここで該抗体は、配列番号9のコンセンサス配列に一致するアミノ酸配列を含むHVR-L1、配列番号14のコンセンサス配列に一致するアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び配列番号19のコンセンサス配列に一致するアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。

【0120】

次の実施態様は、任意の組合せで意図される：HVR-L1は配列番号5-8から選択されるアミノ酸配列を含み；HVR-L2は配列番号10-13から選択されるアミノ酸配列を含み；及びHVR-L3は配列番号15-18から選択されるアミノ酸配列を含む。一実施態様において、Notch2 NRRに結合する抗体は、配列番号5のアミノ酸配列を含むHVR-L1；配列番号10のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び配列番号15のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。別の実施態様において、Notch2 NRRに結合する抗体は、配列番号6のアミノ酸配列を含むHVR-L1；配列番号11のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び配列番号16のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。別の実施態様において、Notch2 NRRに結合する抗体は、配列番号7のアミノ酸配列を含むHVR-L1；配列番号12のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び配列番号17のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。別の実施態様において、Notch2 NRRに結合する抗体は、配列番号8のアミノ酸配列を含むHVR-L1；配列番号13のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び配列番号18のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。

【0121】

一実施態様において、Notch2 NRRに特異的に結合する抗体が提供され、ここで該抗体は、

- (a) 配列番号1のアミノ酸配列を含むHVR-H1；
- (b) 配列番号3のアミノ酸配列を含むHVR-H2；
- (c) 配列番号4のアミノ酸配列を含むHVR-H3；
- (d) 配列番号5のアミノ酸配列を含むHVR-L1；
- (e) 配列番号10のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び
- (f) 配列番号15のアミノ酸配列を含むHVR-L3

を含む。

【0122】

別の実施態様において、Notch2 NRRに特異的に結合する抗体が提供され、ここで該抗体は、

- (a) 配列番号1のアミノ酸配列を含むHVR-H1；
- (b) 配列番号3のアミノ酸配列を含むHVR-H2；
- (c) 配列番号4のアミノ酸配列を含むHVR-H3；
- (d) 配列番号6のアミノ酸配列を含むHVR-L1；
- (e) 配列番号11のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び
- (f) 配列番号16のアミノ酸配列を含むHVR-L3

を含む。

【0123】

別の実施態様において、Notch2 NRRに特異的に結合する抗体が提供され、ここで該抗体は、

- (a) 配列番号1のアミノ酸配列を含むHVR-H1；
- (b) 配列番号3のアミノ酸配列を含むHVR-H2；
- (c) 配列番号4のアミノ酸配列を含むHVR-H3；
- (d) 配列番号7のアミノ酸配列を含むHVR-L1；
- (e) 配列番号12のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び

( f ) 配列番号 17 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 を含む。

【 0 1 2 4 】

別の実施態様において、N o t c h 2 N R R に特異的に結合する抗体が提供され、ここで該抗体は、

- ( a ) 配列番号 1 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1 ;
- ( b ) 配列番号 3 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 ;
- ( c ) 配列番号 4 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 ;
- ( d ) 配列番号 8 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1 ;
- ( e ) 配列番号 13 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 ; 及び
- ( f ) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3

を含む。

【 0 1 2 5 】

所定の実施態様において、上記抗体の何れかは、更に、V H サブグループ I I I コンセンサスフレームワーク及びV L サブグループ I コンセンサスフレームワークから選択される少なくとも一のフレームワークを含む。

【 0 1 2 6 】

所定の実施態様において、抗 N o t c h 2 N R R 抗体は、親和性成熟している。例えば、示された H V R の位置で以下の置換の任意の一以上が、任意の組合せでなされる：

- H V R - L 1 ( 配列番号 5 ) において：S 2 8 N ; I 2 9 N 又は V ; S 3 0 R 又は K ; S 3 1 R ; Y 3 2 F
- H V R - L 2 ( 配列番号 10 ) において：G 5 0 R ; S 5 3 I 又は T ; A 5 5 E
- H V R - L 3 ( 配列番号 15 ) において：S 9 3 I 又は R ; L 9 6 S 又は H。

【 0 1 2 7 】

本明細書に開示される特定の抗体、抗体 B 並びに抗体 B ( B - 1、B - 2、及び B - 3 ) の親和性成熟形態は、更なる親和性成熟を受けることができる。従って、本明細書に記載される抗体の何れかの親和性成熟形態が提供される。

【 0 1 2 8 】

所定の実施態様において、N o t c h 2 シグナル伝達阻害剤は、抗 J a g 1 アンタゴニスト抗体である。一つのそのような実施態様において、抗 J a g 1 アンタゴニスト抗体は、J a g 1 の細胞外ドメインに結合し、N o t c h 2 シグナル伝達の減少をもたらす抗体である。一つのそのような実施態様において、抗 J a g 1 アンタゴニスト抗体は、抗 J a g 1 E G F 1 - 4 抗体である。抗 J a g 1 抗体は、限定されないが、本明細書において開示される任意の抗 J a g 1 抗体を含む。

【 0 1 2 9 】

更なる実施態様において、抗体は、抗 J a g 1 抗体である。幾つかの実施態様において、抗体は、( a ) 配列番号 81 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1 ; ( b ) 配列番号 84 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 ; ( c ) 配列番号 87 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 ; ( d ) 配列番号 88 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1 ; ( e ) 配列番号 89 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 ; 及び ( f ) 配列番号 92 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 から選択される、少なくとも 1、2、3、4、5、又は 6 つ H V R を含む。一実施態様において、抗体は、( a ) 配列番号 81 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1 ; ( b ) 配列番号 82 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 ; ( c ) 配列番号 85 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 ; ( d ) 配列番号 88 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1 ; ( e ) 配列番号 89 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 ; 及び ( f ) 配列番号 90 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 を含む。

【 0 1 3 0 】

一実施態様において、抗体は、( a ) 配列番号 81 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1 ; ( b ) 配列番号 82 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 ; ( c ) 配列番号 86 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 ; ( d ) 配列番号 88 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1 ; (

10

20

30

40

50

e) 配列番号 89 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 ; 及び ( f ) 配列番号 91 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 を含む。一実施態様において、抗体は、( a ) 配列番号 81 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1 ; ( b ) 配列番号 83 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 ; ( c ) 配列番号 85 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 ; ( d ) 配列番号 88 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1 ; ( e ) 配列番号 89 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 ; 及び ( f ) 配列番号 90 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 を含む。

#### 【 0 1 3 1 】

一実施態様において、上記 H V R 配列の何れかを有する抗 N o t c h 2 N R R 抗体又は抗 J a g 1 抗体は、N o t c h 2 N R R 及び J a g 1 のそれぞれに対する結合活性が実質的に保持されるという条件で、更に、任意の適切なフレームワーク可変ドメイン配列を含むことができる。所定の実施態様において、抗 N o t c h 2 N R R 抗体又は抗 J a g 1 抗体は、図 16 A 及び 16 B に示される V H コンセンサスフレームワーク配列の何れかにあるような、ヒト可変重鎖 ( V H ) コンセンサスフレームワーク配列を含む。一実施態様において、V H コンセンサスフレームワーク配列は、例えば、図 16 A 及び 16 B に示されるように、ヒトサブグループ I I I 重鎖フレームワークコンセンサス配列を含む。別の実施態様において、V H コンセンサスフレームワーク配列は、例えば、図 16 A 及び 16 B に示されるように、「アクセプター 2」フレームワーク配列を含む。特定の実施態様において、V H フレームワークコンセンサス配列は、アクセプター 2 B 又はアクセプター 2 D の F R 1 - F R 4 を含み、ここで F R 4 は、配列番号 35 を含み ( 図 16 A 及び 16 B )、配列番号 35 の最後の残基 ( S 1 1 ) は、必要に応じて、アラニンで置換されている。更なる特定の実施態様において、V H フレームワークコンセンサス配列は、配列番号 50 ; 51 ; 57 又は 59 ; 及び 35 の配列を含み、ここで配列番号 35 の S 1 1 は、必要に応じて、アラニンで置換されている。

#### 【 0 1 3 2 】

所定の実施態様において、上記の H V R 配列の何れかを有する抗 N o t c h 2 N R R 抗体又は抗 J a g 1 抗体は、図 17 に示されるように、ヒト可変軽鎖 ( V L ) コンセンサスフレームワーク配列を更に含むことができる。一実施態様において、V L コンセンサスフレームワーク配列は、例えば、図 17 に示されるように、ヒト V L カップサブグループ I コンセンサスフレームワーク ( v 1 ) 配列を含む。別の実施態様において、V L フレームワークコンセンサス配列は、図 18 又は 19 に示されるように、h u M A b 4 D 5 - 8 の F R 1 - F R 4 を含む。特定の実施態様において、V L フレームワークコンセンサス配列は、配列番号 60、61、62 及び 63 の配列を含む。

#### 【 0 1 3 3 】

別の態様において、抗 N o t c h 2 N R R 抗体は、配列番号 20 のアミノ酸配列に対して、少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は 100% の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン ( V H ) 配列を含む。所定の実施態様において、少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は 99% の同一性を有する V H 配列は、参照配列に対して置換 ( 例えば 保存的置換 )、挿入、又は欠失を含むが、その配列を含む抗 N o t c h 2 N R R 抗体は N o t c h 2 N R R へ結合する能力を保持する。所定の実施態様において、配列番号 20 のアミノ酸配列において、合計 1 から 10 のアミノ酸が、置換、挿入及び / 又は欠失している。所定の実施態様において、置換、挿入、又は欠失は、H V R 外の ( すなわち F R 内の ) 領域で生じる。特定の実施態様において、V H は、( a ) 配列番号 1 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、( b ) 配列番号 3 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、及び ( c ) 配列番号 4 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 から選択される一、二又は三の H V R を含む。

#### 【 0 1 3 4 】

別の態様において、配列番号 22 - 25 から選択されるアミノ酸配列に対して、少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は 100% の配列同一性を有する軽鎖可変ドメイン ( V L ) を含む、N o t c h 2

10

20

30

40

50

N R R に特異的に結合する抗体が提供される。所定の実施態様において、少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%の同一性を有するV L 配列は、参照配列に対して置換（例えば保存的置換）、挿入、又は欠失を含むが、その配列を含む抗N o t c h 2 N R R 抗体はN o t c h 2 N R R へ結合する能力を保持する。所定の実施態様において、配列番号22 - 25から選択されるアミノ酸配列において、合計1から10のアミノ酸が、置換、挿入及び/又は欠失している。所定の実施態様において、置換、挿入、又は欠失は、H V R 外の（すなわちF R 内の）領域で生じる。特定の実施態様において、V L は、（a）配列番号9のコンセンサス配列に一致するアミノ酸配列を含むH V R - L 1；（b）配列番号14のコンセンサス配列に一致するアミノ酸配列を含むH V R - L 2；及び（c）配列番号19のコンセンサス配列に一致するアミノ酸配列を含むH V R - L 3から選択される一、二、又は三のH V R を含む。一つのそのような実施態様において、V L は、（a）配列番号5 - 8から選択されるアミノ酸配列を含むH V R - L 1；（b）配列番号10 - 13から選択されるアミノ酸配列を含むH V R - L 2；及び（c）配列番号15 - 18から選択されるアミノ酸配列を含むH V R - L 3から選択される一、二又は三のH V R を含む。一つのそのような実施態様において、V L は、（a）配列番号5のアミノ酸配列を含むH V R - L 1；（b）配列番号10のアミノ酸配列を含むH V R - L 2；及び（c）配列番号15のアミノ酸配列を含むH V R - L 3から選択される一、二、又は三のH V R を含む。別のそのような実施態様において、V L は、（a）配列番号6のアミノ酸配列を含むH V R - L 1；（b）配列番号11のアミノ酸配列を含むH V R - L 2；及び（c）配列番号16のアミノ酸配列を含むH V R - L 3から選択される一、二、又は三のH V R を含む。別のそのような実施態様において、V L は、（a）配列番号7のアミノ酸配列を含むH V R - L 1；（b）配列番号12のアミノ酸配列を含むH V R - L 2；及び（c）配列番号17のアミノ酸配列を含むH V R - L 3から選択される一、二、又は三のH V R を含む。別のそのような実施態様において、V L は、（a）配列番号8のアミノ酸配列を含むH V R - L 1；（b）配列番号13のアミノ酸配列を含むH V R - L 2；及び（c）配列番号18のアミノ酸配列を含むH V R - L 3から選択される一、二、又は三のH V R を含む。

#### 【0135】

上記に提供される変異型V H 及びV L 配列の所定の実施態様において、置換、挿入、又は欠失はH V R 内で生じ得る。そのような実施態様において、置換、挿入、又は欠失は、そのような改変が抗原に結合する抗体の能力を実質的に低下させない限りにおいて、一以上のH V R 内で生じる可能性がある。例えば、実質的に結合親和性を低下させない保存的改変をH V R 内で行うことができる。特定の場合において、H V R の改変は、実際に、抗体の親和性を向上させ得る。そのような改変は、抗体の親和性を増加させるために、H V R 「ホットスポット」（すなわち、体細胞成熟プロセスの最中に高頻度で変異を受けるコドンによってコードされる残基）において作成され得る。（例えば、Chowdhury, Methods Mol. Biol. 207:179-196, 2008を参照）。上記に与えられた変異型V H 又はV L 配列の所定の実施態様において、各H V R は保存されている（改変されていない）か、又はわずかに一つのアミノ酸置換、挿入又は欠失が含まれているかの何れかである。

#### 【0136】

別の態様において、N o t c h 2 N R R に特異的に結合する抗体が提供され、その抗体は、上記に与えられた実施態様の何れかにあるV H、及び上記に与えられた実施態様の何れかにあるV L を含む。一実施態様において、抗体は配列番号20のアミノ酸配列に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有するV H、及び配列番号22のアミノ酸配列に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有するV L を含む。一つのそのような実施態様において、V H は、（a）配列番号1のアミノ酸配列を含むH V R - H 1；（b）配列番号3のアミノ酸配列を含むH V R - H 2；及び（c）配列番号4のアミノ酸配列を含むH V R - H 3から選択される一、二又は三のH V R を含み、V L は、（a）配

10

20

30

40

50

列番号5のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(b)配列番号10のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(c)配列番号15のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される一、二又は三のHVRを含む。特定の実施態様において、抗体は、配列番号20のアミノ酸配列を含むVH、及び配列番号22のアミノ酸配列を含むVLを含む。

【0137】

別の実施態様において、Notch2 NRRに特異的に結合する抗Notch2 NRR抗体は、配列番号20のアミノ酸配列に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有するVH、及び配列番号23-25から選択されるアミノ酸配列に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有するVLを含む。一つのそのような実施態様において、VHは、(a)配列番号1のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号3のアミノ酸配列を含むHVR-H2；及び(c)配列番号4のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される一、二又は三のHVRを含み、VLは、(a)配列番号6-8から選択されるアミノ酸配列を含むHVR-L1；(b)配列番号11-13から選択されるアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(c)配列番号16-18から選択されるアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される一、二又は三のHVRを含む。特定の実施態様において、抗体は、配列番号20のアミノ酸配列を含むVH、及び配列番号23-25から選択されるアミノ酸配列を含むVLを含む。

10

【0138】

別の態様において、Jag1に特異的に結合する抗体が提供され、その抗体は、上記に与えられた実施態様の何れかにあるVH、及び上記に与えられた実施態様の何れかにあるVLを含む。一実施態様において、抗体は配列番号93-95から選択されるアミノ酸配列に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有するVH、及び配列番号96-98から選択されるアミノ酸配列に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有するVLを含む。一つのそのような実施態様において、VHは、(a)配列番号81のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号82のアミノ酸配列を含むHVR-H2；及び(c)配列番号85のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される一、二又は三のHVRを含み、VLは、(a)配列番号88のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(b)配列番号89のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(c)配列番号90のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される一、二又は三のHVRを含む。特定の実施態様において、抗体は、配列番号93のアミノ酸配列を含むVH、及び配列番号96のアミノ酸配列を含むVLを含む。

20

30

【0139】

別の実施態様において、Jag1に特異的に結合する抗Jag1抗体は、配列番号94のアミノ酸配列に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有するVH、及び配列番号97のアミノ酸配列に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有するVLを含む。一つのそのような実施態様において、VHは、(a)配列番号81のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号82のアミノ酸配列を含むHVR-H2；及び(c)配列番号86のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される一、二又は三のHVRを含み、VLは、(a)配列番号88のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(b)配列番号89のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(c)配列番号91のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される一、二又は三のHVRを含む。特定の実施態様において、抗体は、配列番号94のアミノ酸配列を含むVH、及び配列番号97のアミノ酸配列を含むVLを含む。

40

【0140】

50

別の実施態様において、J a g 1 に特異的に結合する抗 J a g 1 抗体は、配列番号 9 5 のアミノ酸配列に対して、少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、又は 1 0 0 % の配列同一性を有する V H、及び配列番号 9 8 のアミノ酸配列に対して、少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、又は 1 0 0 % の配列同一性を有する V L を含む。一つのそのような実施態様において、V H は、( a ) 配列番号 8 1 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1 ; ( b ) 配列番号 8 3 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 ; 及び ( c ) 配列番号 8 5 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 から選択される一、二又は三の H V R を含み、V L は、( a ) 配列番号 8 8 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1 ; ( b ) 配列番号 8 9 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 ; 及び ( c ) 配列番号 9 0 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 から選択される一、二又は三の H V R を含む。特定の実施態様において、抗体は、配列番号 9 5 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 9 8 のアミノ酸配列を含む V L を含む。

10

**【 0 1 4 1 】**

所定の実施態様において、上記抗体の何れかの親和性成熟形態が提供される。更なる実施態様において、N o t c h 2 N R R 又は J a g 1 に特異的に結合する組換えタンパク質が提供され、その組換えタンパク質は、上記抗体の何れかの抗原結合部位を含む。一つのそのような実施態様において、組換えタンパク質は、上記に提供される H V R の任意の一以上を含む。

**【 0 1 4 2 】**

20

所定の実施態様において、上記抗体の何れかをコードするポリヌクレオチドが提供される。一実施態様において、ポリヌクレオチドを含むベクターが提供される。一実施態様において、ベクターを含む宿主細胞が提供される。一実施態様において、宿主細胞は、真核生物である。一実施態様において、宿主細胞は、C H O 細胞である。一実施態様において、抗 N o t c h 2 N R R 抗体を作成する方法が提供され、該方法は、抗体をコードするポリヌクレオチドの発現に適した条件下で宿主細胞を培養すること及び抗体を単離することを含む。

**【 0 1 4 3 】**

別の実施態様において、本明細書において与えられる抗体と同一エピトープに結合する単離された抗体が提供される。一実施態様において、抗体 B、抗体 B - 1、抗体 B - 2、及び抗体 B - 3 から選択される抗体と同一エピトープに結合する、単離された抗 N o t c h 2 N R R 抗体が提供される。別の実施態様において、本発明は、抗体 B、抗体 B - 1、抗体 B - 2、及び抗体 B - 3 から選択される抗体と、結合を競合する抗 N o t c h 2 N R R 抗体を提供する。別の実施態様において、N o t c h 2 の L N R - A ドメイン及び H D - C ドメインから選択される少なくとも一のドメインに結合する単離された抗体が提供される。一つのそのような実施態様において、抗体は、L N R - A ドメイン及び H D - C ドメインの両方に結合する。別のそのような実施態様において、抗体は、L N R - B 及び / 又は H D - N ドメインに更に結合する。

30

**【 0 1 4 4 】**

一実施態様において、抗体 A、抗体 A - 1、及び抗体 A - 2 から選択される抗体と同一エピトープに結合する、単離された抗 J a g 1 抗体が提供される。別の実施態様において、本発明は、抗体 A、抗体 A - 1、及び抗体 A - 2 から選択される抗体と、結合を競合する抗 J a g 1 抗体を提供する。別の実施態様において、J a g 1 の D S L ドメイン及び E G F ドメインから選択される少なくとも一のドメインに結合する単離された抗体が提供される。一つのそのような実施態様において、抗体は J a g 1 の E G F 1 - 4 に結合する。

40

**【 0 1 4 5 】**

本明細書に与えられる N o t c h 2 シグナル伝達阻害剤の何れかは、本明細書に記載される方法で使用され得る。

**【 0 1 4 6 】**

また、本発明は、肝臓がんを有する患者に対する治療的処置を選択するための方法を提

50

供し、その方法は、患者から得た試料中のNotch2、Jag1及びSPP1の一以上の発現を測定することを含む。幾つかの実施態様において、Notch2、Jag1及びSPP1の一以上の発現が患者の試料中で検出される場合、患者は、Notch2シグナル伝達阻害剤による治療のために選択される。幾つかの実施態様において、対照に比べて、患者から得られた試料中のNotch2、Jag1及びSpp1の一以上の発現の上昇は、本明細書に記載されるNotch2シグナル伝達阻害剤を用いた治療を受けるために適切な患者を同定する。幾つかの実施態様において、追加のパラメーター、例えば、医師による検査、生検の組織学的評価、肝臓がんを特徴付ける血清レベルの決定が、Notch2シグナル伝達阻害剤治療を受けるために患者を同定するために使用される。

#### 【0147】

幾つかの実施態様において、患者からの試料又は生検は、当技術分野で周知の方法、例えば定量的PCR分析を用いて、Notch2、Jag1及びSpp1の一以上のmRNAの発現について分析され、対照個体から得られた生検中の同一遺伝子又は遺伝子（複数）の発現と比較され、又は基準値と比較される。幾つかの実施態様において、発現は、酵素結合免疫吸着法（ELISA）を用いて決定される。幾つかの実施態様において、患者からの試料又は生検は、例えば、本明細書に記載されるようにNotch2の活性化形態を検出することにより、Notch2の活性化について分析される。

#### 【0148】

一態様において、個体にNotch2シグナル伝達阻害剤の有効量を投与する工程を含む、肝臓がんを有する危険性にある個体における肝臓がんを予防するための方法が提供される。幾つかの実施態様において、個体は、B型又はC型肝炎、肝硬変、良性肝腫瘍、血管腫、肝腺腫、及び限局性結節性過形成からなる群から選択される肝臓の状態を有する。幾つかの実施態様において、方法は、少なくとも一の付加的な治療剤を投与することを更に含む。付加的治療剤の例としては、細胞傷害性薬剤、ペプチド、小分子及び抗体のような増殖阻害剤を含む。

#### 【0149】

別の態様において、Notch2シグナル伝達阻害剤と細胞を接触させ、それによって細胞の増殖を阻害することを含む、分泌型ホスホプロテイン1（SPP1）を発現する細胞の増殖を阻害するための方法が提供される。一実施態様において、SPP1タンパク質は、図11に示されるアミノ酸配列を含む。一実施態様において、細胞をNotch2シグナル伝達阻害剤と接触させると、細胞内のSPP1の発現を減少させる。例えば、細胞をNotch2シグナル伝達阻害剤と接触させると、細胞内のSPP1の発現を、少なくとも約50%、60%、70%、80%、90%、又は90%減少させる。SPP1 mRNA又はタンパク質の発現は、当該技術分野における任意の方法によって決定することができる。幾つかの実施態様において、細胞は、肝臓がん細胞である。幾つかの実施態様において、肝臓がん細胞は、EpCAM、AFP、AFP及びEpCAM、Notch2、Jag1、Notch2及びJag1、核Notch2 ICD、Ras、Prom1、Spp1、FoxM1、Plk1、ccnb1、Aurkb、Wnt2、Axin2、若しくはGlu1、又はそれらの任意の組合せを発現する。幾つかの実施態様において、細胞をNotch2シグナル伝達阻害剤と接触させると、EpCAM、AFP、Notch2、Notch2 ICD、Jag1、Prom1、Spp1、FoxM1、Plk1、ccnb1及びAurkb、の少なくとも一の、細胞における発現の減少をもたらす。幾つかの実施態様において、Notch2シグナル伝達阻害剤の投与は、Wnt2、Axin2及びGlu1の少なくとも一の、細胞における発現の増加をもたらす。幾つかの実施態様において、発現は、RNAseq、マイクロアレイ分析、免疫組織化学、酵素結合免疫吸着法、及びウェスタンブロッティングにより決定される。

#### 【0150】

別の態様において、哺乳動物にNotch2シグナル伝達阻害剤の治療的有効量を投与し、それによって哺乳動物を効果的に治療することを含む、図11に示されるポリペプチドに対して少なくとも約90%の同一性を有するアミノ酸配列を含むペプチドをコードす

10

20

30

40

50

る S p p 1 遺伝子を発現する細胞を含む肝臓がんを有する哺乳動物を治療的に処置するための方法が提供される。

【 0 1 5 1 】

別の態様において、治療を必要とする個体に、抗 J a g 1 アンタゴニスト抗体の有効量を投与し、それによって効果的に肝細胞増殖性疾患を治療し又は予防することを含む、図 8 C に示されるポリペプチドに対して少なくとも 9 0 % のアミノ酸配列の同一性を有するタンパク質の増加した発現又は活性と関連した肝細胞増殖性疾患を治療し又は予防するための方法が提供される。幾つかの実施態様において、細胞増殖性疾患は、肝臓がんなどのがんである。幾つかの実施態様において、個体は、B 型又は C 型肝炎、肝硬変、良性肝腫瘍、血管腫、肝腺腫、及び限局性結節性過形成からなる群から選択される肝臓の状態を有する。

10

【 0 1 5 2 】

一態様において、個体における血清 S P P 1 タンパク質レベルを減少させるための方法であって、個体に、N o t c h 2 シグナル伝達阻害剤の有効量を投与し、これにより個体における血清 S P P 1 濃度を減少させることを含む方法が提供される。幾つかの実施態様において、減少とは、N o t c h 2 シグナル伝達阻害剤を投与する前の個体における血清 S P P 1 レベルに対するものである。幾つかの実施態様において、減少とは、基準値に対するものである。一実施態様において、個体は肝臓がんを有する。一実施態様において、個体に N o t c h 2 シグナル伝達阻害剤を投与する前の血清 S P P 1 タンパク質レベルは、少なくとも約 8 0 n g / m l である。所定の実施態様において、個体に N o t c h 2 シグナル伝達阻害剤を投与する前の血清 S P P 1 タンパク質レベルは、約 8 0 n g / m l から約 5 0 0 n g / m l の間、約 8 6 n g / m l から約 2 5 0 n g / m l の間、約 1 2 0 n g / m l から約 1 7 0 n g / m l の間、又は約 1 6 5 n g / m l である。幾つかの実施態様において、個体に N o t c h 2 シグナル伝達阻害剤を投与すると、8 0 n g / m l 未満の血清 S P P 1 タンパク質レベルをもたらす。特定の実施態様において、N o t c h 2 シグナル伝達阻害剤を投与する前の血清 S P P 1 タンパク質レベルは、N o t c h 2 シグナル伝達阻害剤を投与する前の 2 4 時間である。N o t c h 2 シグナル伝達阻害剤の投与前又は後の血清 S P P 1 タンパク質レベルは、例えば、酵素結合免疫吸着アッセイなどの任意の適切な方法によって決定することができる。特定の実施態様において、血清 S P P 1 タンパク質レベルは、N o t c h 2 シグナル伝達阻害剤を投与した後、約 1 ヶ月、2 ヶ月、3 ヶ月、6 ヶ月又は 1 2 ヶ月減少する。

20

30

【 0 1 5 3 】

一態様において、肝臓腫瘍の増殖が、N o t c h 2 シグナル伝達の増殖増強効果に少なくとも一部依存している、哺乳動物における肝臓腫瘍を治療的に処置するための方法であって、腫瘍を N o t c h 2 又は J a g 1 に結合する抗体と接触させ、それによって腫瘍を効果的に治療することを含む方法が提供される。一実施態様において、抗体の、腫瘍に対する結合は、N o t c h 2 の増殖増強活性に拮抗する。

【 0 1 5 4 】

一態様において、肝臓がんについて治療され、血清 S P P 1 タンパク質レベルが上昇している個体に N o t c h 2 シグナル伝達阻害剤の有効量を投与することを含む肝臓がんの再発を防止するための方法が提供される。一実施態様において、個体の血清 S P P 1 タンパク質レベルは、少なくとも約 8 0 n g / m l である。所定の実施態様において、個体に N o t c h 2 シグナル伝達阻害剤を投与する前の血清 S P P 1 タンパク質レベルは、約 8 0 n g / m l から約 5 0 0 n g / m l の間、約 8 6 n g / m l から約 2 5 0 n g / m l の間、約 1 2 0 n g / m l から約 1 7 0 n g / m l の間、又は約 1 6 5 n g / m l である。幾つかの実施態様において、個体に N o t c h 2 シグナル伝達阻害剤を投与すると、8 0 n g / m l 未満の血清 S P P 1 タンパク質レベルをもたらす。

40

【 0 1 5 5 】

幾つかの態様において、個体に N o t c h 2 シグナル伝達阻害剤を投与し、N o t c h 2 シグナル伝達を決定する工程を含む、肝臓がんを有する個体を治療するための方法が提

50

供され、ここで治療後のNotch2シグナル伝達の減少は、治療前のNotch2シグナル伝達と比較して、個体における肝臓がんの減少を示している。幾つかの実施態様において、Notch2シグナル伝達は、例えば、免疫組織化学的分析によって、Notch2 ICDの核局在化を測定することによって決定される。幾つかの実施態様において、Notch2シグナル伝達は、Notch2、Jag1、Hes及びHey1からなる群から選択される遺伝子の発現を測定することによって決定される。幾つかの実施態様において、肝臓がんは肝細胞がん、ヘパトーマ、胆管がん、肝芽腫、肝がん、肝血管肉腫、及び転移性肝臓がんである。幾つかの実施態様において、Notch2シグナル伝達阻害剤は、siRNA、小分子阻害剤又は抗体である。幾つかの実施態様において、抗体は、抗Notch2アンタゴニスト抗体又は抗Jag1アンタゴニスト抗体などのアンタゴニスト抗体である。

10

## 【0156】

幾つかの態様において、肝臓がん細胞の増殖を阻害するための方法は、Notch2又はJag1に対する抗体を用いて、哺乳動物の肝臓がん細胞を治療することを含み、それによって肝臓がん細胞の増殖が阻害される。所定の実施態様において、抗体は、本明細書に記載される抗Notch2又は抗Jag1アンタゴニスト抗体である。所定の実施態様において、抗体はヒト、ヒト化、又はキメラ抗体である。所定の実施態様において、上記実施態様の抗体の何れかは抗体断片である。所定の実施態様では、細胞は患者にある。所定の実施態様では、細胞は培地中にある。

## 【0157】

20

本発明のNotch2シグナル伝達阻害剤、例えば抗Notch2抗体及び抗Jag1抗体は、治療において、単独で、又は他の薬剤と組み合わせて使用することができる。例えば、本発明の抗体は少なくとも一の追加の治療剤と同時に投与され得る。

## 【0158】

上記のこうした併用療法は、併用投与（2つ以上の治療薬が、同一又は別々の製剤に含まれている）、及び、本発明のアンタゴニストの投与が、追加の治療薬及び/又はアジュバントの投与の前、同時、及び/又はその後起きうる分離投与を包含する。本発明のNotch2シグナル伝達阻害剤はまた放射線治療と併用して用いることができる。

## 【0159】

アンタゴニストは、例えば、ボラスとして静脈内投与など任意の既知の方法によって、又はある期間にわたる連続注入によって、筋肉内、腹腔内、脳脊髄内（intracerebrospinal）、皮下、関節内、滑液内、髄腔内、経口、局所、又は吸入経路によってヒト患者に投与することができる。Notch2シグナル伝達阻害剤は、タンパク質として又はタンパク質をコードする核酸として投与することができる（例えば、国際出願公開WO96/07321を参照）。他の治療レジメンは、Notch2シグナル伝達阻害剤の投与と組み合わせることができる。併用投与は、別個の製剤又は単一の薬学的製剤及び何れかの順番での連続投与を用いた、同時投与を含み、ここで好ましくは両方（又は全ての）活性薬剤が同時にその生物学的活性を発揮する期間が存在することを特徴とする。幾つかの実施態様において、そのような併用療法は相乗的な治療効果をもたらす。

30

## 【0160】

投与の用量及びモードは、周知の基準に従って、医師により選択されるであろう。抗体又は他のNotch2シグナル伝達阻害剤の適量は、治療する疾患のタイプ、疾患の重症度及び過程、抗体、オリゴペプチド又は有機分子が予防を目的としてか治療を目的として投与されるのかどうか、以前の治療法、患者の病歴、及びNotch2シグナル伝達阻害剤への反応、及び主治医の判断により決定されるであろう。Notch2シグナル伝達阻害剤は一時的又は一連の治療にわたって患者に投与することができる。

40

## 【0161】

肝臓がんの治療の成功は、肝臓の機能及び回復のパラメータを評価することによって監視することができる。このようなパラメータには、限定されないが、肝機能検査（例えば、血清アルブミン、ビリルビン、胆汁酸、総タンパク質、凝固時間の評価）の改善、肝酵

50

素（例えば、アラニントランスアミナーゼ、アスパラギン酸トランスアミナーゼ、アルカリホスファターゼ、ガンマグルタミルトランスペプチダーゼ）、組織学的外観（例えば、肝アーキテクチャの改善を示す針生検）及び画像診断法（例えば、線維症及び肝臓の大きさについての超音波、磁気共鳴イメージング）が含まれる。治療の成功はまた、S P P 1タンパク質の血清レベルを測定することによって監視することができ、ここでは、治療前のレベルと比較して、治療される患者における血清レベルの減少は、治療の成功を示す。

#### 【0162】

更なる態様にて、Notch2シグナル伝達阻害剤は、以下のセクション1-7で説明されるように、単独又は組み合わせで、任意の特徴を組み込んだ上記実施態様の何れかにおいて使用される抗体である。

#### 【0163】

##### 1. 抗体親和性

所定の実施態様において、本明細書において与えられる抗体は、解離定数（Kd）が、 $1\ \mu\text{M}$ 、 $100\ \text{nM}$ 、 $10\ \text{nM}$ 、 $1\ \text{nM}$ 、 $0.1\ \text{nM}$ 、 $0.01\ \text{nM}$ 、又は $0.001\ \text{nM}$ （例えば、 $10^{-8}\ \text{M}$ 以下、例えば、 $10^{-8}\ \text{M}$ から $10^{-13}\ \text{M}$ 、例えば、 $10^{-9}\ \text{M}$ から $10^{-13}\ \text{M}$ ）である。

#### 【0164】

一実施態様において、Kdは放射性標識抗原結合アッセイ（RIA）によって測定される。一実施態様において、RIAは、目的の抗体のFabバージョン及びその抗原により実施される。例えば、非標識抗原の力価測定系の存在下で、最小濃度の（ $^{125}\text{I}$ ）-標識抗原にてFabを均衡化して、抗Fab抗体コートプレートと結合した抗原を捕獲することによって抗原に対するFabの溶液結合親和性を測定する（例として、Chen, et al., J. Mol. Biol. 293:865-881(1999)を参照）。アッセイの条件を決めるために、MICROTITER（登録商標）マルチウェルプレート（Thermo Scientific）を、 $5\ \mu\text{g}/\text{ml}$ の捕獲抗Fab抗体（Cappel Labs）を含む50mM炭酸ナトリウム（pH 9.6）にて一晚コートして、その後2%（w/v）のウシ血清アルブミンを含むPBSにて室温（およそ23℃）で2~5時間、ブロックする。非吸着プレート（Nunc # 269620）に、 $100\ \text{pM}$ 又は $26\ \text{pM}$ の $^{125}\text{I}$ 抗原を段階希釈した目的のFabと混合する（例えば、Presta et al., Cancer Res. 57:4593-4599 (1997)の抗VEGF抗体、Fab-12の評価と一致する）。ついで目的のFabを一晚インキュベートする；しかし、インキュベーションは平衡状態に達したことを確認するまでに長時間（例えばおよそ65時間）かかるかもしれない。その後、混合物を捕獲プレートに移し、室温で（例えば1時間）インキュベートする。そして、溶液を取り除き、プレートを0.1%のポリソルベート20（Tween 20（登録商標））を含むPBSにて8回洗浄する。プレートが乾燥したら、 $150\ \mu\text{l}$ /ウェルの閃光物質（MICROSCINT-20<sup>TM</sup>；Packard）を加え、プレートをTOPCOUNT<sup>TM</sup>計測器（Packard）にて10分間計測する。それぞれ最大結合の20%以下の濃度のFabを選択して競合結合アッセイに用いる。

#### 【0165】

別の実施態様によれば、Kdは、BIACORE（登録商標）表面プラズモン共鳴アッセイを用いて測定される。例えば、BIACORE（登録商標）-2000又はBIACORE（登録商標）-3000（BIACore, Inc., Piscataway, NJ）を用いるアッセイが、~10反応単位（RU）で固定した抗原CM5チップを用いて25℃で実施される。一実施態様において、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサーチップ（CM5, BIACore Inc.）を、提供者の指示書に従ってN-エチル-N'-（3-ジメチルアミノプロピル）-カルボジイミド塩酸塩（EDC）及びN-ヒドロキシスクシニミド（NHS）で活性化した。抗原を10mM酢酸ナトリウム（pH 4.8）で $5\ \mu\text{g}/\text{ml}$ （~0.2 $\mu\text{M}$ ）に希釈し、結合したタンパク質の反応単位（RU）がおよそ10になるように $5\ \mu\text{l}$ /分の流速で注入する。抗原の注入後、反応しない群をブロックするために1Mのエタノールアミンを注入した。動力学測定のために、Fa

10

20

30

40

50

bの2倍の段階希釈(0.78 nMから500 nM)を、25℃で、およそ25 μl/分の流速で、0.05%ポリソルベート20(TWEEN 20™)界面活性剤(PBST)を含むPBSに注入した。会合及び解離のセンサーグラムを同時にフィットさせることによる単純一対一ラングミュア結合モデル(simple one-to-one Langmuir binding model)(BIA CORE(登録商標)Evaluationソフトウェアバージョン3.2)を用いて、会合速度( $k_{on}$ )と解離速度( $k_{off}$ )を算出した。平衡解離定数( $K_d$ )を $k_{off}/k_{on}$ 比として算出した。例えば、Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999)を参照。上記の表面プラズモン共鳴アッセイによる結合速度が $10^6 M^{-1} s^{-1}$ を上回る場合、分光計、例えば、流動停止を備えた分光光度計(stop-flow equipped spectrophotometer)(Aviv Instruments)又は攪拌キュベットを備えた8000シリーズSLM-AMINCO™分光光度計(Thermo Spectronic)で測定される、漸増濃度の抗原の存在下にて、PBS(pH7.2)中、25℃の、20 nMの抗抗原抗体(Fab型)の蛍光放出強度(励起=295 nm; 放出=340 nm、帯域通過=16 nm)の増加又は減少を測定する蛍光消光技術を用いて結合速度を測定することができる。

#### 【0166】

##### 2. 抗体断片

所定の実施態様において、本明細書で提供される抗体は、抗体断片である。抗体断片は、限定されないが、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、及びscFv断片、及び下記の他の断片を含む。所定の抗体断片の総説については、Hudson et al. Nat. Med. 9:129-134 (2003)を参照。scFv断片の総説については、例えば、Pluckhuhn, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York), pp. 269-315 (1994)を参照; また、国際公開第93/16185号; 及び米国特許第5571894号及び第5587458号も参照。サルベージ受容体結合エピソード残基を含み、かつインビボ半減期を増加させたFab及びF(ab')<sub>2</sub>断片の議論については、米国特許第5869046号を参照のこと。

#### 【0167】

ダイアボディは2価又は二重特異性であり得る2つの抗原結合部位を有する抗体断片である。例えば、欧州特許第404,097号; 国際公開第1993/01161号; Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003); 及びHollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993)を参照。トリアボディ及びテトラボディもまた Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003)に記載されている。

#### 【0168】

単ドメイン抗体は、抗体の重鎖可変ドメインの全て又は一部、又は軽鎖可変ドメインの全て又は一部を含む抗体断片である。所定の実施態様において、単ドメイン抗体は、ヒト単ドメイン抗体である(Domantis, Inc., Waltham, MA; 例えば、米国特許第6248516号(B1)を参照)。

#### 【0169】

抗体断片は様々な技術で作成することができ、限定されないが、本明細書に記載するように、インタクティブな抗体の分解、並びに組換え宿主細胞(例えば、大腸菌又はファージ)による生産を含む。

#### 【0170】

##### 3. キメラ及びヒト化抗体

所定の実施態様において、本明細書で提供される抗体は、キメラ抗体である。所定のキメラ抗体は、例えば、米国特許第4816567号; 及びMorrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)に記載されている。一例において、キメラ抗体は、非ヒト可変領域(例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、又はサル等の非ヒト霊長類由来の可変領域)及びヒト定常領域を含む。更なる例において、キメラ抗体は、クラス又はサブクラスが親抗体のものから変更された「クラススイッチ」抗体である。キメラ抗体は、その抗原結合断片を含む。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 7 1 】

所定の実施態様において、キメラ抗体は、ヒト化抗体である。典型的には、非ヒト抗体は、ヒトに対する免疫原性を低減するために、親の非ヒト抗体の特異性と親和性を保持したまま、ヒト化されている。一般に、ヒト化抗体は、HVR、例えば、CDR（又はその一部）が、非ヒト抗体から由来し、FR（又はその一部）がヒト抗体配列に由来する、一以上の可変ドメインを含む。ヒト化抗体はまた、任意で、ヒト定常領域の少なくとも一部をも含む。幾つかの実施態様において、ヒト化抗体の幾つかのFR残基は、例えば抗体特異性又は親和性を回復もしくは改善するために、非ヒト抗体（例えば、HVR残基が由来する抗体）由来の対応する残基で置換されている。

## 【 0 1 7 2 】

ヒト化抗体及びそれらの製造方法は、例えば、Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)に総説され、更に、Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); Queen et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:10029-10033 (1989); 米国特許第5821337号、第7527791号、第6982321号及び第7087409号; Kashmiri et al., *Methods* 36:25-34 (2005) (SDR (a-CDR) グラフティングを記述); Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489-498 (1991) (「リサーフェシング」を記述); Dall'Acqua et al., *Methods* 36:43-60 (2005) (「FRシャッフリング」を記述); 及びOsbourn et al., *Methods* 36:61-68 (2005) 及びKlimka et al., *Br. J. Cancer*, 83:52-260 (2000) (FRのシャッフリングへの「誘導選択」アプローチを記述)に記載されている。

## 【 0 1 7 3 】

ヒト化に用いられ得るヒトフレームワーク領域は、限定されないが、「ベストフィット」法を用いて選択されるフレームワーク領域（例えば、Sims et al. *J. Immunol.* 151:2296 (1993)）；軽鎖又は重鎖の可変領域の特定のサブグループのヒト抗体のコンセンサス配列由来のフレームワーク領域（例えば、Carter et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992)；及びPresta et al. *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)を参照）；ヒト成熟（体細胞変異）フレームワーク領域又はヒト生殖細胞系フレームワーク領域（例えば、Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)を参照）；及びFRライブラリスクリーニング由来のフレームワーク領域（例えば、Baca et al., *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 (1997)及びRosok et al., *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618 (1996)を参照）を含む。

## 【 0 1 7 4 】

## 4. ヒト抗体

所定の実施態様において、本明細書で提供される抗体はヒト抗体である。ヒト抗体は、当技術分野で周知の様々な技術を用いて生産することができる。ヒト抗体は一般的にvan Dijk and van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5: 368-74 (2001) 及びLonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459 (2008)に記載されている。

## 【 0 1 7 5 】

ヒト抗体は、抗原チャレンジにตอบสนองして、インタクテナ抗体又はヒト可変領域を持つ又はインタクテナ抗体を産生するように改変されたトランスジェニック動物に、免疫原を投与することにより調製することができる。このような動物は、典型的には、内因性免疫グロブリン遺伝子座を置換するか、又は染色体外に存在するかもしくは動物の染色体にランダムに組み込まれている、ヒト免疫グロブリン遺伝子座の全て又は一部を含む。このようなトランスジェニックマウスでは、内因性免疫グロブリン遺伝子座は一般的に不活性化される。トランスジェニック動物からヒト抗体を得るための方法の総説については、Lonberg, *Nat. Biotech.* 23:1117-1125 (2005)を参照。また、例えば、XENOMOUSE<sup>TM</sup> 技術を記載している、米国特許第6075181号及び6150584号；Humab（登録商標）技術を記載している米国特許第5770429号；K-MOUSE（登録商標）技術を記載している米国特許第7041870号及び、VelociMouse（登録商標）技術を記載している米国特許出願公開第2007/0061900号）

10

20

30

40

50

も参照のこと。このような動物で生成されたインタクトな抗体由来のヒト可変領域は、例えば、異なるヒト定常領域と組み合わせることにより、更に改変される可能性がある。

【 0 1 7 6 】

ヒト抗体は、ハイブリドーマベース法によって作成することができる。ヒトモノクローナル抗体の産生のためのヒト骨髄腫及びマウス - ヒトヘテロ細胞株が記載されている。(例えば、Kozbor J. Immunol., 133: 3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); and Boerner et al., J. Immunol., 147: 86 (1991)を参照)。ヒトB細胞ハイブリドーマ技術を介して生成されたヒト抗体はまた、Li et al., PNAS USA, 103:3557-3562 (2006)に記載されている。更なる方法は、例えば、米国特許第7189826号(10  
ハイブリドーマ細胞株からのモノクローナルヒトIgM抗体の産生を記載している)及びNi, Xiandai Mianyixue, 26(4):265-268 (2006) (ヒト - ヒトハイブリドーマを記載している)に記載されたものを含む。ヒトハイブリドーマ技術(トリオーマ技術)はまた、Volllmers and Brandlein, Histology and Histopathology, 20(3):927-937 (2005) 及びVolllmers and Brandlein, Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 27(3):185-91 (2005)に記載される。

【 0 1 7 7 】

ヒト抗体はまた、ヒト由来のファージディスプレイライブラリーから選択されたFvクローン可変ドメイン配列を単離することによって生成され得る。このような可変ドメイン配列は、次に所望のヒト定常ドメインと組み合わせてもよい。抗体ライブラリーからヒト抗体を選択するための技術を以下に説明する。20

【 0 1 7 8 】

5. ライブラリー由来抗体

本発明の抗体は、所望の活性又は活性(複数)を有する抗体についてコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングすることによって単離することができる。例えば、様々な方法が、ファージディスプレイライブラリーを生成し、所望の結合特性を有する抗体についてのライブラリーをスクリーニングするために、当該技術分野で知られている。そのような方法は、例えば、Hoogenboom et al. in Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001)に総説され、更に、例えば、McCaafferty et al., Nature 348:552-554; Clackson et al., Nature 352: 624-628 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1992); Marks and Bradbury, in Methods in Molecular Biology 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu et al., J. Mol. Biol. 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., J. Mol. Biol. 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34): 12467-12472 (2004); 及びLee et al., J. Immunol. Methods 284(1-2): 119-132(2004)に記載されている。30

【 0 1 7 9 】

所定のファージディスプレイ法において、VH及びVL遺伝子のレパートリーがポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により個別にクローニングされ、ファージライブラリーにランダムに再結合され、その後、Winter et al., Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994)に記載されるように、抗原結合ファージについてスクリーニングすることができる。ファージは、通常、抗体断片を、単鎖Fv(scFv)断片、又はFab断片の何れかとして提示する。免疫された起源からのライブラリーは、ハイブリドーマを構築する必要性を伴うことなく免疫原に高親和性抗体を提供する。あるいは、ナイーブレパートリーを(例えばヒトから)クローニングして、Griffiths et al., EMBO J, 12: 725-734 (1993)に記載のように如何なる免疫化をも伴うことなく、幅広い非自己抗原及び自己抗原に対する抗体の単一源を提供することが可能である。最後に、ナイーブなライブラリはまた、Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992)に記載されるように、非常に可変なCDR3領域をコードし、インビトロで再構成を達成するために、幹細胞由来の非再配列V遺伝子セグメントをクローニングし、ランダム配列を含むPCRプライマーを使用す40

ることにより合成することができる。ヒト抗体ファージライブラリーを記述する特許公報は、例えば、米国特許第5,750,373号、及び米国特許出願公開第2005/0079574号、第2005/0119455号、第2005/0266000号、第2007/0117126号、第2007/0160598号、第2007/0237764号、第2007/0292936号及び第2009/0002360を含む。

#### 【0180】

ヒト抗体ライブラリーから単離された抗体又は抗体断片は、本明細書でヒト抗体又はヒト抗体の断片とみなされる。

#### 【0181】

### 6. 多重特異性抗体

所定の実施態様において、本明細書で提供される抗体は、多重特異性抗体、例えば二重特異性抗体である。多重特異性抗体は、少なくとも二つの異なる部位に対して結合特異性を有するモノクローナル抗体である。所定の実施態様において、結合特異性の一つはJag1に対してであり、他は、任意の他の抗原に対してである。所定の実施態様において、結合特異性の一つはNotch2に対してであり、他は、任意の他の抗原に対してである。所定の実施態様において、二重特異性抗体は、Jag1の二つの異なるエピトープに結合することができる。所定の実施態様において、二重特異性抗体は、Notch2の二つの異なるエピトープに結合することができる。二重特異性抗体はまた、Jag1及び/又はNotch2を発現する細胞に対して細胞傷害性薬剤を局在化させるために用いることができる。二重特異性抗体は、全長抗体又は抗体断片として調製することができる。

#### 【0182】

多重特異性抗体を作製するための技術は、限定されないが、異なる特異性を有する二つの免疫グロブリン重鎖 - 軽鎖対の組換え共発現 (Milstein and Cuello, Nature 305: 537 (1983))、国際公開第93/08829号、及びTraunecker et al., EMBO J. 10: 3655 (1991)を参照)及び「ノブ・イン・ホール(knob-in-hole)」エンジニアリング(例えば、米国特許第5731168号を参照)を含む。多重特異抗体はまた、抗体のFc-ヘテロ2量体分子を作成するための静電ステアリング効果を操作すること(国際公開第2009/089004号(A1))、二つ以上の抗体又は断片を架橋すること(例えば米国特許第4676980号;及びBrennan et al., Science, 229: 81 (1985)を参照);二重特異性抗体を生成するためにロイシンジッパーを使用すること(例えば、Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992)を参照);二重特異性抗体断片を作製するため、「ダイアボディ」技術を使用すること(例えば、Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)を参照);単鎖Fv(sFv)ダイマーを使用すること(例えば、Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994)を参照);及び、例えばTutt et al. J. Immunol. 147: 60 (1991)に記載されているように、三重特異性抗体を調製することによって作成することができる。

#### 【0183】

「オクトパス抗体」を含む、3つ以上の機能性抗原結合部位を持つ改変抗体もまた本明細書に含まれる(例えば、米国特許出願公開第2006/0025576号(A1)を参照)。

#### 【0184】

本明細書中の抗体又は断片はまた、Jag1又はNotch2並びにその他の異なる抗原(例えば米国特許出願公開第2008/0069820号参照)に結合する抗原結合部位を含む、「2重作用(Dual Acting)FAb」又は「DAF」を含む。

#### 【0185】

### 7. 抗体変異体

所定の実施態様において、本明細書で提供される抗体のアミノ酸配列変異体が企図される。例えば、抗体の結合親和性及び/又は他の生物学的特性を改善することが望まれ得る。抗体のアミノ酸配列変異体は、抗体をコードするヌクレオチド配列に適切な改変を導入することにより、又はペプチド合成によって調製することができる。このような改変は、

10

20

30

40

50

例えば、抗体のアミノ酸配列内における、残基の欠失、及びノ又は挿入及びノ又は置換を含む。最終コンストラクトが所望の特性、例えば、抗原結合を有していることを条件として、欠失、挿入、及び置換の任意の組み合わせが、最終コンストラクトに到達させるために作成され得る。

【 0 1 8 6 】

a) 置換、挿入、及び欠失変異体

所定の実施態様において、一つ以上のアミノ酸置換を有する抗体変異体が提供される。置換型変異誘発の対象となる部位は、HVRとFRを含む。保存的置換は、表1の「望ましい置換」の見出しの下に示されている。より実質的な変更が、表1の「典型的な置換」の見出しの下に与えられ、アミノ酸側鎖のクラスを参照して以下に更に説明される。アミノ酸置換は、目的の抗体に導入することができ、その産物は、所望の活性、例えば、抗原結合の保持/改善、免疫原性の減少、又はADCC又はCDCの改善についてスクリーニングされる。

表 1

元の残基	典型的な置換	望ましい置換
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; ノルロイシン	Leu
Leu (L)	ノルロイシン; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; ノルロイシン	Leu

【 0 1 8 7 】

アミノ酸は共通の側鎖特性に基づいてグループに分けることができる：

- (1) 疎水性：ノルロイシン、Met、Ala、Val、Leu、Ile；
- (2) 中性の親水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；

- (3) 酸性：A s p、G l u；
- (4) 塩基性：H i s、L y s、A r g；
- (5) 鎖配向に影響する残基：G l y、P r o；
- (6) 芳香族：T r p、T y r、P h e。

**【0188】**

非保存的置換は、これらの分類の一つのメンバーを他の分類に交換することを伴うこととなる。

**【0189】**

置換された変異体の一つのタイプは、親抗体（例えば、ヒト化又はヒト抗体など）の以上の超可変領域残基の置換を含む。一般的には、更なる研究のために選択され得られた変異体は、親抗体と比較して、特定の生物学的特性の改変（例えば、改善）（例えば、親和性の増加、免疫原性の低下）を有し、及び/又は親抗体の特定の生物学的特性を実質的に保持しているであろう。典型的な置換型変異体は、親和性成熟抗体であり、例えば、本明細書に記載されるファージディスプレイに基づく親和性成熟技術を用いて簡便に生成され得る。簡潔に言えば、一つ以上のHVR残基が変異し、変異体抗体は、ファージ上に表示され、特定の生物学的活性（例えば、結合親和性）についてスクリーニングされる。

**【0190】**

改変（例えば、置換）を、例えば抗体の親和性を向上させるために、HVRで行うことができる。このような改変は、HVRの「ホットスポット」、すなわち、体細胞成熟過程中に高頻度で変異を受けるコドンにコードされた残基で（例えば、Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)を参照）、及び/又は抗原に接触する残基で行うことができ、得られた変異体VH又はVLが結合親和性について試験される。二次ライブラリから構築し再選択することによる親和性成熟が、例えば、Hoogenboom et al. in *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001)に記載されている。親和性成熟の幾つかの実施態様において、多様性が、種々の方法（例えば、変異性PCR、鎖シャッフリング、又はオリゴヌクレオチドを標的とした突然変異誘発）の何れかにより、成熟のために選択された可変遺伝子中に導入される。次いで、二次ライブラリーが作成される。次いで、ライブラリーが、所望の親和性を持つ抗体変異体を同定するためにスクリーニングされる。多様性を導入する別の方法は、幾つかのHVR残基（例えば、一度に4から6残基）がランダム化されたHVRを標的としたアプローチを含む。抗原結合に関与するHVR残基は、例えばアラニンスキャニング突然変異誘発、又はモデリングを用いて、特異的に同定され得る。CDR-H3及びCDR-L3がしばしば標的にされる。

**【0191】**

所定の実施態様において、置換、挿入、又は欠失は、そのような改変が抗原に結合する抗体の能力を実質的に低下させない限りにおいて、一以上のHVR内で生じる可能性がある。例えば、実質的に結合親和性を低下させない保存的改変（例えば本明細書で与えられる保存的置換）をHVR内で行うことができる。そのような改変は、HVR中の抗原と接触する残基以外であってもよい。上記に与えられた変異体VH又はVL配列の所定の実施態様において、各HVRは不変であるか、又はわずか1個、2個又は3個のアミノ酸置換が含まれているかの何れかである。

**【0192】**

突然変異誘発のために標的とすることができる抗体の残基又は領域を同定するための有用な方法は、Cunningham and Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085により説明されるように、「アラニンスキャニング突然変異誘発」と呼ばれる。この方法では、標的残基の残基又はグループ（例えば、a r g、a s p、h i s、l y s及びg l uなどの荷電残基）が同定され、抗原と抗体との相互作用が影響を受けるかどうかを判断するために、中性又は負に荷電したアミノ酸（例えば、アラニン又はポリアラニン）に置換される。更なる置換が、最初の置換に対する機能的感受性を示すアミノ酸の位置に導入され得る。代わりに、又は更に、抗原抗体複合体の結晶構造が、抗体と抗原との接触点を同定する。そのような接

10

20

30

40

50

触残基及び隣接残基が、置換の候補として標的とされるか又は排除され得る。変異体はそれらが所望の特性を含むかどうかを決定するためにスクリーニングされ得る。

【0193】

アミノ酸配列挿入は、一残基から百以上の残基を含有するポリペプチド長にわたるアミノ及び/又はカルボキシル末端融合、並びに単一又は複数のアミノ酸残基の配列内挿入を含む。末端挿入の例としては、N末端メチオニン残基を有する抗体が含まれる。抗体分子の他の挿入変異体は、酵素に対する抗体のN末端又はC末端への融合(例えばADEPTの場合)、又は抗体の血清半減期を増加させるポリペプチドへの融合を含む。

【0194】

b) グリコシル化変異体

所定の実施態様において、本明細書で提供される抗体は、抗体がグリコシル化される程度が増加又は減少するように改変される。抗体へのグリコシル化部位の付加又は欠失は、一以上のグリコシル化部位が作成又は削除されるようにアミノ酸配列を変えることによって簡便に達成することができる。

【0195】

抗体がFc領域を含む場合には、それに付着する糖を変えることができる。哺乳動物細胞によって生成された天然型抗体は、典型的には、Fc領域のCH2ドメインのAsn297にN-結合により一般的に付着した分岐鎖、二分岐オリゴ糖を含んでいる。例えば、Wright et al. TIBTECH 15:26-32 (1997)を参照。オリゴ糖は、様々な炭水化物、例えば、二分岐オリゴ糖構造の「幹」のGlcNAcに結合した、マンノース、N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)、ガラクトース、シアル酸、並びにフコースを含み得る。幾つかの実施態様において、本発明の抗体におけるオリゴ糖の改変は、一定の改善された特性を有する抗体変異体を作成するために行われ得る。

【0196】

一実施態様において、抗体変異体は、Fc領域に(直接又は間接的に)付着されたフコースを欠いた糖鎖構造を有して提供される。例えば、このような抗体のフコース量は、1%から80%、1%から65%、5%から65%、又は20%から40%であり得る。フコースの量は、例えば、国際公開第2008/077546号に記載されているように、MALDI-TOF質量分析法によって測定されるAsn297に付着している全ての糖鎖構造の合計(例えば、コンプレックス、ハイブリッド及び高マンノース構造)に対して、Asn297の糖鎖中のフコースの平均量を計算することによって決定される。Asn297は、Fc領域(Fc領域残基のEU番号付け)でおおよそ297の位置に位置するアスパラギン残基を指すが;しかしながら、Asn297もまた位置297の上流又は下流のおおよそ±3アミノ酸に、すなわち抗体の軽微な配列変異に起因して、位置294と300の間に配置され得る。このようなフコシル化変異体はADC機能を改善させた可能性がある。例えば、米国特許出願公開第2003/0157108号(Presta, L.);米国特許出願公開第2004/0093621号(協和発酵工業株式会社)を参照。「フコース非修飾」又は「フコース欠損」抗体変異体に関連する出版物の例としては、米国特許出願公開第2003/0157108号、国際公開第2000/61739号、国際公開第2001/29246号、米国特許出願公開第2003/0115614号、米国特許出願公開第2002/0164328号、米国特許出願公開第2004/0093621号、米国特許出願公開第2004/0132140号、米国特許出願公開第2004/0110704号、米国特許出願公開第2004/0110282号、米国特許出願公開第2004/0109865号、国際公開第2003/085119号、国際公開第2003/084570号、国際公開第2005/035586号、国際公開第2005/035778号、国際公開第2005/053742号、国際公開第2002/031140号、Okazaki et al. J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)が含まれる。非フコシル化抗体を産生する能力を有する細胞株の例としては、タンパク質フコシル化を欠損しているLec13 CHO細胞(Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986);米国特許出願公開第2003/01

10

20

30

40

50

57108号(A1)、Presta, L; 及び国際公開第2004/056312号(A1)、Adamsら、特に実施例11)、及びノックアウト細胞株、アルファ-1、6-フコシルトランスフェラーゼ遺伝子、FUT8、ノックアウトCHO細胞(例えば、Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004); Kanda, Y. et al., Biotechnol. Bioeng., 94(4):680-688 (2006); 及び国際公開第2003/085107号を参照)を含む。

#### 【0197】

抗体変異体は、例えば、抗体のFc領域に結合した二分岐オリゴ糖がGlcNAcによって二分されている二分オリゴ糖を更に備えている。このような抗体変異体はフコシル化を減少させ、及び/又はADCC機能を改善している可能性がある。そのような抗体変異体の例は、例えば、国際公開第2003/011878号(Jean-Mairettら); 米国特許第6602684号(Umanaら); 及び米国特許出願公開第2005/0123546号(Umanaら)に記載されている。Fc領域に結合したオリゴ糖内に少なくとも1つのガラクトース残基を持つ抗体変異体も提供される。このような抗体変異体はCDC機能を改善させた可能性がある。このような抗体変異体は、例えば、国際公開第1997/30087号(Patelら); 国際公開第1998/58964号(Raju, S.); 及び国際公開第1999/22764号(Raju, S.)に記載されている。

#### 【0198】

##### c) Fc領域変異体

所定の実施態様において、1つ又は複数のアミノ酸改変を、本明細書で提供される抗体のFc領域に導入することができ、それによってFc領域変異体を生成する。Fc領域の変異体は、1つ又は複数のアミノ酸位置においてアミノ酸修飾(例えば置換)を含むヒトFc領域の配列(例えば、ヒトIgG1、IgG2、IgG3又はIgG4のFc領域)を含んでもよい。

#### 【0199】

所定の実施態様において、本発明は、インビボにおける抗体の半減期が重要であるが、ある種のエフェクター機能(例えば補体及びADCCなど)が不要又は有害である用途のための望ましい候補とならしめる、全てではないが一部のエフェクター機能を有する抗体変異体を意図している。インビトロ及び/又はインビボでの細胞毒性アッセイを、CDC活性及び/又はADCC活性の減少/枯渇を確認するために行うことができる。例えば、Fc受容体(FcR)結合アッセイは、抗体がFcR結合を欠くが(それゆえ、おそらくADCC活性を欠く)、FcRn結合能力を保持していることを確認するために行うことができる。ADCCを媒介する初代細胞、NK細胞は、FcRIIIのみを発現するが、単球はFcRI、FcRII及びFcRIIIを発現する。造血細胞におけるFcRの発現は、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492 (1991)の464頁の表3に要約されている。目的の分子のADCC活性を評価するためのインビトロアッセイの非限定的な例は、米国特許第5500362号(例えば、Hellstrom, I. et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83:7059-7063 (1986)を参照)及びHellstrom, I et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82:1499-1502 (1985); 第5821337号(Bruggemann, M. et al., J. Exp. Med. 166:1351-1361 (1987)を参照)に記載されている。あるいは、非放射性アッセイ法を用いることができる(例えば、フローサイトメトリー用のACTIT<sup>M</sup>非放射性細胞傷害性アッセイ(Cell Technology, Inc. Mountain View, CA; 及びCytotox 96(登録商標)非放射性細胞傷害性アッセイ(Promega, Madison, WI)を参照。このようなアッセイに有用なエフェクター細胞は、末梢血単核細胞(PBMC)及びナチュラルキラー(NK)細胞を含む。あるいは、又は更に、目的の分子のADCC活性は、Clynes et al., PNAS (USA) 95:652-656 (1998)に開示されるように、インビボで、例えば動物モデルにおいて評価することができる。C1q結合アッセイはまた、抗体が体C1qを結合することができないこと、したがって、CDC活性を欠いていることを確認するために行うことができる。例えば、国際公開第2006/029879号及び国際公開第2005/100402号のC1q及びC3c結合ELISAを参照。補体活性化を評価するために、CDCアッセイを行

10

20

30

40

50

うことができる（例えば、Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996); Cragg, M.S. ら、Blood 101:1045-1052 (2003); 並びにCragg, M.S. and M.J. Glennie, Blood 103:2738-2743 (2004)を参照）。また、FcRn結合、及びインビボでのクリアランス/半減期の測定は、当該分野で公知の方法を用いて行うことができる（例えば、Petkova, S.B. et al., Int'l. Immunol. 18(12):1759-1769 (2006)を参照）。

#### 【0200】

エフェクター機能が減少した抗体は、Fc領域の残基238、265、269、270、297、327、329の一つ以上の置換を有するものが含まれる（米国特許第6737056号）。そのようなFc変異体は、残基265及び297のアラニンへの置換を有する、いわゆる「DANA」Fc変異体を含む、アミノ酸位置265、269、270、297及び327の2以上での置換を有するFc変異体を含む（米国特許第7332581号）。

10

#### 【0201】

FcRへの改善又は減少した結合を持つ特定の抗体変異体が記載されている。（例えば、米国特許第6737056号；国際公開第2004/056312号、及びShields et al., J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001)を参照）。

#### 【0202】

所定の実施態様において、抗体変異体はADCCを改善する1つ又は複数のアミノ酸置換、例えば、Fc領域の位置298、333、及び/又は334における置換（EUの残基番号付け）を含む。

20

#### 【0203】

幾つかの実施態様において、改変された（即ち、改善され又は減少した）C1q結合及び/又は補体依存性細胞傷害（CDC）を生じる、Fc領域における改変がなされ、例えば、米国特許第6194551号、国際公開第99/51642号、及びIdusogie et al. J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000)に説明される。

#### 【0204】

増加した半減期を持ち、胎仔への母性IgGの移送を担う、新生児Fc受容体（FcRn）への結合が改善された抗体（Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976) 及びKim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)）が、米国特許出願公開第2005/0014934号（A1）（Hintonら）に記載されている。これらの抗体は、FcRnへのFc領域の結合を改善する一つ又は複数の置換を有するFc領域を含む。このようなFc変異体は、Fc領域の残基：238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424又は434の一以上の置換、例えば、Fc領域の残基434の置換を有するものが含まれる（米国特許第7371826号）。

30

#### 【0205】

Fc領域の変異体の他の例に関しては、Duncan & Winter, Nature 322:738-40 (1988)；米国特許第5648260号；米国特許第5624821号；及び国際公開第94/29351号も参照のこと。

#### 【0206】

##### d) システイン操作抗体変異体

所定の実施態様において、抗体の1つ以上の残基がシステイン残基で置換されている、システイン操作抗体、例えば、「thioMAb（複数）」を作成することが望まれ得る。特定の実施態様において、置換された残基は、抗体のアクセス可能な部位で存在する。それらの残基をシステインで置換することにより、反応性チオール基は、それによって抗体のアクセス可能な部位に配置され、本明細書中で更に記載されるように、イムノコンジュゲートを作成するために、例えば薬物部分又はリンカー-薬剤部分などの他の部分に抗体をコンジュゲートするために使用することができる。所定の実施態様において、以下の残基の何れか又は複数がシステインに置換され得る：軽鎖のV205（Kabab番号付け）；重鎖のA118（EU番号付け）；及び重鎖Fc領域のS400（EU番号付け）。

40

50

システイン改変抗体は、例えば、米国特許第 7 5 2 1 5 4 1 号に記載のように生成され得る。

【 0 2 0 7 】

e) 抗体誘導体

所定の実施態様において、本明細書で提供される抗体は、当技術分野で知られ、容易に入手される追加の非タンパク質部分を含むように更に改変することができる。抗体の誘導体化に適した部分としては、限定されないが、水溶性ポリマーを含む。水溶性ポリマーの非限定的な例は、限定されないが、ポリエチレングリコール ( P E G )、エチレングリコール / プロピレングリコールの共重合体、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ - 1 , 3 - ジオキソラン、ポリ - 1 , 3 , 6 - トリオキサン、エチレン / 無水マレイン酸共重合体、ポリアミノ酸 ( 単独重合体又はランダム共重合体の何れか ) 及びデキストラン又はポリ ( n - ビニルピロリドン ) ポリエチレングリコール、プロピレングリコール単独重合体、プロピレンオキシド / エチレンオキシド共重合体、ポリオキシエチル化ポリオール ( 例えばグリセロール )、ポリビニルアルコール及びこれらの混合物を包含する。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドはその水中での安定性に起因して製造における利点を有し得る。ポリマーは何れかの分子量のものであってよく、そして分枝鎖又は未分枝鎖であってよい。抗体に結合するポリマーの数は変動してよく、そして、一以上の重合体が結合する場合は、それらは同じか又は異なる分子であってよい。一般的に、誘導体化に使用するポリマーの数及び / 又は種類は、限定されないが、向上させるべき抗体の特定の特性又は機能、抗体誘導体が限定された条件下で治療に使用されるのか等を含む検討事項に基づいて決定することができる。

10

20

【 0 2 0 8 】

その他の実施態様において、放射線への曝露によって選択的に加熱されてもよい抗体、及び非タンパク質部分とのコンジュゲートが提供される。一実施態様において、非タンパク質部分はカーボンナノチューブである ( Kam et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 11600-11605 (2005) )。放射線は、任意の波長であって良いが、限定されないものの、通常の細胞に害を与えないが、抗体 - 非タンパク質部分の近位細胞が死滅される温度に非タンパク質部分を加熱する波長が含まれる。

【 0 2 0 9 】

B . 組換え方法及び組成物

抗体は、例えば米国特許第 4 8 1 6 5 6 7 号で説明したように、組換えの方法及び組成物を用いて製造することができる。一実施態様において、本明細書に記載される抗 J a g 1 抗体をコードする単離された核酸が提供される。一実施態様において、本明細書に記載される抗 N o t c h 2 抗体をコードする単離された核酸が提供される。このような核酸は、抗体の V L を含むアミノ酸配列、及び / 又は抗体の V H を含むアミノ酸配列 ( 例えば、抗体の軽鎖及び / 又は重鎖 ) をコードし得る。更なる実施態様において、そのような核酸を含む一以上のベクター ( 例えば、発現ベクター ) が提供される。更なる実施態様において、そのような核酸を含む宿主細胞が提供される。一つのそのような実施態様において、宿主細胞は、( 1 ) 抗体の V L を含むアミノ酸配列、及び抗体の V H を含むアミノ酸配列をコードする核酸を含むベクター、又は ( 2 ) 抗体の V L を含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第一ベクター、及び抗体の V H を含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第二ベクターを含む。一実施態様において、宿主細胞は、真核生物、例えばチャイニーズハムスター卵巣 ( C H O ) 細胞、又はリンパ系細胞 ( 例えば、Y 0、N S 0、S p 2 0 細胞 ) である。一実施態様において、抗 J a g 1 抗体を作成する方法が提供され、その方法は、上記のように、抗体の発現に適した条件下で、抗体をコードする核酸を含む宿主細胞を培養することを含み、及び必要に応じて、宿主細胞 ( 又は宿主細胞培養培地 ) から抗体を回収することを含む。一実施態様において、抗 N o t c h 2 抗体を作成する方法が提供され、その方法は、上記のように、抗体の発現に適した条件下で、抗体をコードする核酸を含む宿主細胞を培養することを含み、及び必要に応じて、宿主細胞 ( 又は宿主細胞培養

30

40

50

培地) から抗体を回収することを含む。

【0210】

抗Jag1抗体又は抗Notch2抗体の組換え生産のために、例えば上述したように、抗体をコードする核酸が単離され、宿主細胞内での更なるクローニング及び/又は発現のために一以上のベクターに挿入される。このような核酸は、容易に単離され、従来の手順を用いて(例えば、抗体の重鎖と軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合できるオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって)配列決定することができる。

【0211】

抗体をコードするベクターのクローニング又は発現に適切な宿主細胞は、本明細書に記載の原核細胞又は真核細胞を含む。例えば、特に、グリコシル化及びFcエフェクター機能が必要ない場合には、抗体は、細菌で産生することができる。細菌における抗体断片及びポリペプチドの発現については、例えば、米国特許第5648237号、第5789199号及び第5840523号を参照。(また、大腸菌における抗体の発現を説明している、Charlton, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254も参照)。発現の後、抗体は可溶性画分において細菌の細胞ペーストから単離され、更に精製することができる。

10

【0212】

原核生物に加えて、糸状菌又は酵母菌のような真核微生物は、菌類や酵母菌株を含む抗体をコードするベクターのための、適切なクローニング宿主又は発現宿主であり、そのグリコシル化経路が、「ヒト化」されており、部分的又は完全なヒトのグリコシル化パターンを有する抗体の産生をもたらす。Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004)、及びLi et al., *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006)を参照。

20

【0213】

グリコシル化抗体の発現に適した宿主細胞はまた、多細胞生物(無脊椎動物と脊椎動物)から派生している。無脊椎動物細胞の例としては、植物及び昆虫細胞が挙げられる。多数のパキウウイルス株が同定され、これらは特にSpodoptera frugiperda細胞のトランスフェクションのために、昆虫細胞と組み合わせて使用することができる。

【0214】

植物細胞培養もまた宿主として利用することができる。例えば、米国特許第5959177号、第6040498号、第6420548号、第7125978号及び第6417429号(トランスジェニック植物における抗体産生に関するPLANTIBODIES<sup>TM</sup>技術を記載)を参照。

30

【0215】

脊椎動物細胞もまた宿主として用いることができる。例えば、懸濁液中で増殖するように適合した哺乳動物細胞株は有用であり得る。有用な哺乳動物宿主細胞株の他の例は、SV40(COS-7)で形質転換されたサル腎臓CV1株、ヒト胚腎臓株(Graham et al., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)に記載された293細胞又は293細胞; ベビーハムスター腎臓細胞(BHK)、マウスのセルトリ細胞(Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)に記載されるTM4細胞); サル腎臓細胞(CV1); アフリカミドリザル腎臓細胞(VERO-76); ヒト子宮頸がん細胞(HELA); イヌ腎臓細胞(MDCK; バッファローラット肝臓細胞(BRL 3A); ヒト肺細胞(W138); ヒト肝細胞(Hep G2); マウス乳腺腫瘍(MMT060562); 例えばMather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)に記載されるTRI細胞; MRC5細胞; 及びFS4細胞である。他の有用な哺乳動物宿主細胞株は、DHF R - CHO細胞(Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980))を含むチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、並びにY0、NS0及びSp2/0などの骨髄腫細胞株を含む。抗体産生に適した特定の哺乳動物宿主細胞株の概説については、例えば、Yazaki and Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003)を参照。

40

50

## 【 0 2 1 6 】

## C . アッセイ

本明細書で提供される抗体は、当技術分野で公知の様々なアッセイによってその物理的 / 化学的性質及び / 又は生物学的活性について同定され、スクリーニングされ、又は特徴づけることができる。

## 【 0 2 1 7 】

## 1 . 結合アッセイ及びその他のアッセイ

一態様において、本発明の抗体は、例えば E L I S A 、 ウエスタンブロット法など公知の方法により、その抗原結合活性について試験される。

## 【 0 2 1 8 】

その他の態様において、競合アッセイを、 J a g 1 への結合について抗体 A 、 A - 1 又は A - 2 と競合する抗体を同定するために用いることができる。所定の実施態様において、このような競合する抗体は、抗体 A 、 A - 1 又は A 2 により結合される同一のエピトープ ( 例えば、直鎖状又は立体構造エピトープ ) に結合する。その他の態様において、競合アッセイを、 N o t c h 2 への結合について抗体 B 、 B - 1 、 B - 2 又は B - 3 と競合する抗体を同定するために用いることができる。所定の実施態様において、このような競合する抗体は、抗体 B 、 B - 1 、 B - 2 又は B - 3 により結合される同一のエピトープ ( 例えば、直鎖状又は立体構造エピトープ ) に結合する。抗体が結合するエピトープをマッピングするための詳細な典型的な方法が、Methods in Molecular Biology vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ) の Morris (1996) " Epitope Mapping Protocols, " に提供される。

## 【 0 2 1 9 】

典型的な競合アッセイにおいて、固定化 J a g 1 は、 J a g 1 に結合する第一の標識された抗体 ( 例えば、抗体 A 、 A - 1 又は A - 2 ) 、及び J a g 1 へ結合について第一の抗体と競合する能力について試験された第二の未標識抗体を含む溶液中でインキュベートされる。第二抗体はハイブリドーマ上清中に存在してもよい。対照として、固定化 J a g 1 が、未標識の第二の抗体でなく、標識された第一の抗体を含む溶液中でインキュベートされる。 J a g 1 への第一の抗体の結合を許容する条件下でインキュベートした後、過剰の非結合抗体が除去され、固定化された J a g 1 に結合した標識の量が測定される。もし、固定化された J a g 1 に結合した標識の量が、対照試料と比較して試験試料中で実質的に減少している場合、それは、第二抗体が、 J a g 1 への結合において第一の抗体と競合していることを示している。Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual c h.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) を参照。別の典型的な競合アッセイにおいて、固定化 N o t c h 2 は、 N o t c h 2 に結合する第一の標識された抗体 ( 例えば、抗体 B 、 B - 1 、 B - 2 又は B 3 ) 、及び N o t c h 2 へ結合について第一の抗体と競合する能力について試験された第二の未標識抗体を含む溶液中でインキュベートされる。第二抗体はハイブリドーマ上清中に存在してもよい。対照として、固定化 N o t c h 2 が、未標識の第二の抗体でなく、標識された第一の抗体を含む溶液中でインキュベートされる。 N o t c h 2 への第一の抗体の結合を許容する条件下でインキュベートした後、過剰の非結合抗体が除去され、固定化された N o t c h 2 に結合した標識の量が測定される。もし、固定化された J a g 1 に結合した標識の量が、対照試料と比較して試験試料中で実質的に減少している場合、それは、第二抗体が、 N o t c h 2 への結合において第一の抗体と競合していることを示している。

## 【 0 2 2 0 】

## 2 . 活性のアッセイ

一態様において、生物学的活性を有する、抗 J a g 1 抗体及び抗 N o t c h 2 抗体などの N o t c h 2 シグナル伝達阻害剤抗体を同定するためのアッセイが提供される。生物学的活性は、例えば、 N o t c h 2 活性、例えば N o t c h 2 シグナル伝達の阻害又は減少、 J a g 1 媒介性 N o t c h シグナル伝達、例えば、 J a g 1 媒介性 N o t c h 2 シグナル伝達の阻害又は減少を含み得る。インビボ及び / 又はインビトロでこのような生物学的活性を有する抗体もまた提供される。

10

20

30

40

50

## 【0221】

所定の実施態様において、本発明の抗体は、そのような生物学的活性について試験される。所定の実施態様において、本発明の抗体は、Spp1の発現を阻害し、減少させるその能力について試験される。例示的なアッセイは、実施例に提供される。所定の他の実施態様において、本発明の抗体は、Notch2シグナル伝達に応答性であるレポーター遺伝子の発現を阻害するその能力について試験される。所定の他の実施態様において、本発明の抗体は、Jag1媒介性シグナル伝達、例えば、Jag1媒介性Notch2シグナル伝達に応答性であるレポーター遺伝子の発現を阻害するその能力について試験される。一つの典型的なアッセイにおいて、Notch2により安定的にトランスフェクトされたNIH-3T3細胞又は他のNotch受容体を含むプラスミドにより一過性にトランスフェクトされたNIH-3T3細胞は、トランスフェクション効率を制御するために、Notch応答性TP-I(12XCSL)ホタルルシフェラーゼレポーター及び恒常的に活性なウミシタケルシフェラーゼレポーター(PRL-CMV、Promega)により同時トランスフェクトされる。細胞は、6時間から一晩でトランスフェクションから回復させる。抗体及びリガンドにより安定的にトランスフェクトされたNIH-3T3細胞の処置が受容体細胞を刺激するために使用される。20時間後、ホタル及びウミシタケルシフェラーゼがDualGiolシフェラーゼアッセイシステム(Promega)を用いて測定される。複製物は、トランスフェクション効率を調節するために、ウミシタケのシグナルによってホタルのシグナルを分割することにより、各条件について分析される。平均及び標準偏差が計算され、値は、トランスフェクトされたりガンドなしでNIH-3T3細胞により刺激された共培養物について計算された値に正規化される。

10

20

## 【0222】

所定の実施態様において、本発明の抗体は、インビトロでの細胞の成長又は増殖を阻害するその能力について試験される。細胞成長又は増殖の阻害のアッセイは、当該分野で周知である。本明細書中に記載される「細胞の死滅」アッセイによって例示される、細胞増殖についての特定のアッセイは、細胞の生存率を測定する。そのようなアッセイの一つは、プロメガ社(ウイスコンシン州マディソン)から市販されている、CellTiter-Glo<sup>TM</sup>発光細胞生存率アッセイである。そのアッセイは、代謝活性細胞の指標である存在するATPの定量に基づき、培養液中で生存細胞の数を決定する。Crouch et al (1993) J. Immunol. Meth. 160:81-88, 米国特許第6602677号を参照。アッセイは、自動化ハイスループットスクリーニング(HTS)に適するように、96穴形式又は384穴形式で行うことができる。Cree et al (1995) AntiCancer Drugs 6:398-404を参照。アッセイ法では、直接培養細胞に単一試薬(CellTiter-Glo(登録商標)試薬)を追加することを含む。これにより、細胞溶解とルシフェラーゼ反応により生成した発光シグナルの生成を生じる。発光シグナルは、培養中に存在する生存細胞の数に直接的に比例しているATPの存在量に比例する。データは、ルミノメーター又はCCDカメラ撮像装置によって記録することができる。発光出力は相対光単位(RLU)として表される。

30

## 【0223】

他の細胞増殖アッセイは、「MTT」アッセイであり、ミトコンドリア還元酵素による3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウム臭化物のホルマザンへの酸化を測定する比色アッセイである。CellTiter-Glo<sup>TM</sup>アッセイと同様に、このアッセイは細胞培養中に存在する代謝的に活性な細胞の数を示す。例えば、Mosmann (1983) J. Immunol. Meth. 65:55-63及びZhang et al. (2005) Cancer Res. 65: 3877-3882を参照のこと。

40

## 【0224】

一態様において、本発明の抗体はインビトロでの細胞死誘導能力について試験される。細胞死を誘導するためのアッセイは、当該分野で周知である。幾つかの実施態様において、そのようなアッセイは、例えば、ヨウ化プロピジウム(PI)、トリパンプルー(Moore et al. (1995) Cytotechnology, 17:1-11を参照)又は7AADの取り込みによって示

50

される膜統合性の損失を測定する。例示的なPI取り込みアッセイにおいて、細胞は、ダルベッコ改変イーグル培地(D-MEM):10%の熱不活性FBS(Hyclone)及び2mM L-グルタミンが補充されたHam's F-12(50:50)において培養される。したがって、アッセイは、補体及び免疫エフェクター細胞の非存在下で行われる。細胞は、100×20mmのディッシュにおいてディッシュにつき $3 \times 10^6$ の密度で播種され、一晚付着させた。培地は取り除かれ、培地のみ、又は様々な濃度の抗体又はイムノコンジュゲートを含む培地で交換される。細胞は、3日間インキューベートされる。処置に続いて、単層はPBSで洗浄され、トリプシン処理によって分離される。細胞は4で、5分間1200rpmで遠心分離され、ペレットが3mlの低温 $Ca^{2+}$ 結合緩衝液(10mM HEPES、pH7.4、140mM NaCl、2.5mM  $CaCl_2$ )中に再懸濁され、細胞凝集塊の除去のために35mmの濾過器キャップの(strainer-capped)12×75mmのチューブ(1ml/チューブ、処理群につき3つのチューブ)に等分される。次いで、チューブにPI(10 $\mu$ g/ml)を加える。試料はFACSCAN<sup>TM</sup>フローサイトメーター及びFACSCONVERT<sup>TM</sup> CellQuestソフトウェア(Becton Dickinson)を用いて解析される。PI取り込みによって決定される統計的に有意な水準の細胞死を誘導する抗体がこのように同定される。

#### 【0225】

一態様において、本発明の抗体はインビトロでのアポトーシス(プログラムされた細胞死)を誘導する能力について試験される。アポトーシスを誘導する抗体又はイムノコンジュゲートの例示的なアッセイは、アネキシン結合アッセイである。前項で説明したように、典型的なアネキシン結合アッセイでは、細胞が培養され皿に播種される。培地は取り除かれ、培地のみ、又は0.001から10 $\mu$ g/mlの抗体又はイムノコンジュゲートを含む培地で交換される。3日間のインキュベーションに続いて、単層はPBSで洗浄され、トリプシン処理によって分離される。次いで、細胞は遠心分離され、 $Ca^{2+}$ 結合緩衝液に再懸濁し、前項で説明したように、チューブに等分される。次いで、チューブは、標識されたアネキシン(例えばアネキシンV-FITC)(1 $\mu$ g/ml)を受け取る。試料はFACSCAN<sup>TM</sup>フローサイトメーター及びFACSCONVERT<sup>TM</sup> CellQuestソフトウェア(BD Biosciences)を用いて解析される。コントロールと比較して、アネキシン結合の統計的に有意な水準を誘導する抗体が、このように同定される。アポトーシスを誘導する抗体又はイムノコンジュゲートについてのその他の例示的なアッセイは、ゲノムDNAのヌクレオソーム劣化を検出するためのヒストンDNAのELISA比色アッセイである。そのようなアッセイは例えば、細胞死検出ELISAキット(Roche, Palo Alto, CA)を用いて行うことができる。

#### 【0226】

インビトロアッセイにおいて、上記の何れかで使用するための細胞は、自然にNotch2及び/又はJag1を発現するか、又はNotch2及び/又はJag1を発現するように操作されている細胞又は細胞株が含まれる。そのような細胞は、同じ組織起源の正常細胞と比較してNotch2及び/又はJag1を過剰発現する腫瘍細胞を含む。そのような細胞はまた、Notch2及び/又はJag1を発現する細胞株(腫瘍細胞株を含む)、及びNotch2及び/又はJag1を通常発現しないが、Notch2及び/又はJag1をコードする核酸でトランスフェクトされている細胞株を含む。上記のインビトロアッセイの何れかで使用のための本明細書中で提供される典型的な細胞株はNIH-3T3細胞を含む。

#### 【0227】

一態様において、本発明の抗体は、インビボでの細胞の成長又は増殖を阻害するその能力について試験される。所定の実施態様において、その抗Jag1抗体は、インビボでの腫瘍増殖を阻害するその能力について試験される。所定の実施態様において、その抗Notch2抗体は、インビボでの腫瘍増殖を阻害するその能力について試験される。インビボのモデル系、例えば異種移植モデルを、そうした試験に使用することができる。例示的な異種移植システムでは、ヒト腫瘍細胞は、適当に免疫が低下した非ヒト動物、例えば、

無胸腺「ヌード」マウスに導入される。本発明の抗体は、動物に投与される。腫瘍増殖を阻害又は減少させる抗体の能力が測定される。上記の異種移植システムの特定の実施態様では、ヒト腫瘍細胞はヒト患者由来の腫瘍細胞である。このような異種移植モデルは *Oncotest* 社（フライブルク、ドイツ）から市販されている。所定の実施態様において、ヒト腫瘍細胞は、Hep G2、Hep 3B、PCL/PRF/5、Snu 387、Snu 398、Snu 423、Snu 449、Snu 475、Huh-7、HLE、HLF、JHH1、JHH4、JHH5 及び JHH7 などのヒト腫瘍細胞由来の細胞である。所定の実施態様において、ヒト腫瘍細胞は、乳房脂肪パッドのような適当な部位に皮下注射又は移植によって、適切に免疫不全非ヒト動物に導入される。

【0228】

上記のアッセイの何れかが、Notch2シグナル伝達阻害剤の代わりか又はそれに加えて、本発明のイムノコンジュゲートを用いて行われ得ることが理解される。

【0229】

D. イムノコンジュゲート

本発明はまた、化学療法剤又は薬物、成長抑制剤、毒素（例えば、タンパク質毒素、細菌、真菌、植物、又は動物起源の酵素活性毒素、又はそれらの断片）、又は放射性同位元素など、一以上の細胞傷害性薬物にコンジュゲートした本明細書中の抗Notch2抗体又は抗Jag1抗体を含むイムノコンジュゲートを提供する。

【0230】

一実施態様において、イムノコンジュゲートは、抗体-薬物コンジュゲート(ADC)であって、そこでは抗体は、限定されないが、メイタンシノイド（米国特許第5208020号、第5416064号及び欧州特許EP0425235B1を参照）；モノメチルアウリスタチン薬物部分DE及びDF（MMAE及びMMAF）（米国特許第5635483号及び5780588号及び7498298号を参照）などのアウリスタチン；ドラスタチン；カリケアマイシン又はその誘導体（米国特許第5712374号、5714586号、5739116号、5767285号、5770701号、5770710号、5773001号、及び5877296号を参照；Hinman et al., *Cancer Res.* 53:3336-3342 (1993)；及びLode et al., *Cancer Res.* 58:2925-2928 (1998)）；ダウノマイシン又はドキソルピシンなどのアントラサイクリン（Kratz et al., *Current Med. Chem.* 13:477-523 (2006)；Jeffrey et al., *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 16:358-362 (2006)；Torgov et al., *Bioconj. Chem.* 16:717-721 (2005)；Nagy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:829-834 (2000)；Dubowchik et al., *Bioorg. & Med. Chem. Letters* 12:1529-1532 (2002)；King et al., *J. Med. Chem.* 45:4336-4343 (2002)）；及び米国特許第6630579号を参照）；メトトレキサート；ビンデシン；ドセタキセル、パクリタキセル、ラロタキセル、テセタキセル、及びオルタタキセルなどのタキサン；トリコテセン；及びCC1065を含む一以上の薬物とコンジュゲートしている。

【0231】

その他の実施態様において、イムノコンジュゲートは、酵素的に活性な毒素又はその断片にコンジュゲートした、本明細書に記載の抗体を含み、限定されないが、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、（緑膿菌からの）外毒素A鎖、リシンA鎖、アプリンA鎖、モデクシン(modeccin)A鎖、アルファ-サルシン、アレウリテス・フォーディ(*Aleurites fordii*)タンパク質、ジアンチン(diantihin)タンパク質、フィトラカ・アメリカーナ(*Phytolacca americana*)タンパク質(PAPI、PAPII、及びPAP-S)、モモルディカ・チャランチア(*Momordica charantia*)阻害剤、クルシン(curcumin)、クロチン(crotin)、サパオナリア・オフィシナリス(*Saponaaria officinalis*)阻害剤、ゲロニン(gelonin)、ミトゲリン(mitogellin)、レストリクトシン(restrictocin)、フェノマイシン(phenomycin)、エノマイシン(enomycin)及びトリコテセン(tricothecene)が含まれる。

10

20

30

40

50

## 【0232】

その他の実施態様では、イムノコンジュゲートは、放射性コンジュゲートを形成するために放射性原子にコンジュゲートした本明細書に記載されるような抗体を含む。様々な放射性同位体が放射性コンジュゲートの生産のために入手可能である。例としては、 $At^{211}$ 、 $I^{131}$ 、 $I^{125}$ 、 $Y^{90}$ 、 $Re^{186}$ 、 $Re^{188}$ 、 $Sm^{153}$ 、 $Bi^{212}$ 、 $P^{32}$ 、 $Pb^{212}$  及び  $Lu$  の放射性同位体を含む。検出のために放射性複合体を使用するとき、それはシンチグラフィ試験のための放射性原子、例えば  $Tc^{99m}$  又は  $I^{123}$ 、又は核磁気共鳴 (NMR) 画像化 (磁気共鳴画像化 MRI としても知られている) のためのスピン標識、例えば再びヨウ素 - 123、ヨウ素 - 131、インジウム - 111、フッ素 - 19、炭素 - 13、窒素 - 15、酸素 - 17、ガドリニウム、マンガン又は鉄を含んでよい。

10

## 【0233】

抗体と細胞傷害性薬物のコンジュゲートは、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えば N - スクシンイミジル - 3 - (2 - ピリジルジチオ) プロピオナート (SPDP)、スクシンイミジル - 4 - (N - マレイミドメチル) シクロヘキサン - 1 - カルボキシラート (SMCC)、イミノチオラン (IT)、イミドエステル類の二官能性誘導体 (例えばジメチルアジピミダート HCL)、活性エステル類 (例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド類 (例えば、グルタルアルデヒド)、ビスアジド化合物 (例えば、ビス (p - アジドベンゾイル) ヘキサジアミン)、ビス - ジアゾニウム誘導体 (例えば、ビス - (p - ジアゾニウムベンゾイル) エチレンジアミン)、ジイソシアネート (例えば、トリエン - 2, 6 - ジイソシアネート)、及び二活性フッ素化合物 (例えば、1, 5 - ジフルオロ - 2, 4 - ジニトロベンゼン) を使用して作製することができる。例えば、Vitetta et al., Science 238:1098 (1987) に記載されるように、リシンイムノトキシンを調製することができる。カーボン - 14 - 標識 1 - イソチオシアナトベンジル - 3 - メチルジエチレントリアミン五酢酸 (MX-DTPA) は、放射性ヌクレオチドの抗体へのコンジュゲーションのためのキレート剤の例である。国際公開第 94/11026 号を参照。リンカーは、細胞中に細胞毒性薬物の放出を容易にする「切断可能なリンカー」であり得る。例えば、酸に不安定なリンカー、ペプチダーゼ過敏性リンカー、光解離性リンカー、ジメチルリンカー又はジスルフィド含有リンカー (Chari et al., Cancer Res. 52:127-131 (1992); 米国特許第 5208020 号) が使用され得る。

20

30

## 【0234】

本明細書において、イムノコンジュゲート又は ADC は、限定されないが、市販の (例えば、Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, U.S.A からの)、BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS MPBH、SBAP、SIA、SIA B、SMCC、SMPB、SMPH、スルホ - EMCS、スルホ - GMBS、スルホ - KMUS、スルホ - MBS、スルホ - SIA B、スルホ - SMCC、及びスルホ - SMPB、及び SVSB (スクシンイミジル (4 - ビニルスルホン) ベンゾエート) を含むクロスリンカー試薬を用いて調製されるコンジュゲートを明示的に意図する。

40

## 【0235】

E. 診断及び検出のための方法及び組成物

所定の実施態様において、本明細書で提供される抗体の何れかは、生物学的試料中の Notch2 又はその断片、又は Jag1 又はその断片の存在を検出するのに有用である。本明細書で使用する「検出」という用語は、定量的又は定性的検出を包含する。所定の実施態様において、生物学的試料は、肝細胞、肝臓がん細胞及び肝腫瘍組織などの細胞又は組織を含む。

## 【0236】

一実施態様において、診断又は検出の方法において使用のための抗 Notch2 抗体が提供される。更なる態様において、生物学的試料中の Notch2 の存在を検出する方法が提供される。所定の態様において、生物学的試料中の Notch2 の細胞内ドメイン (

50

ICD)の存在を検出する方法が提供される。所定の実施態様において、本方法は、抗Notch2抗体のNotch2への結合を許容する条件下で、本明細書に記載のように抗Notch2抗体と生物学的試料を接触させること、及び複合体が抗Notch2抗体とNotch2との間に形成されているかどうかを検出することを含む。そのような方法は、インビトロ又はインビボ法であり得る。一実施態様において、例えばNotch2、特に活性化Notch2が患者の選択のためのバイオマーカーであるなど、上述されるように、抗Notch2抗体が抗Notch2抗体による治療にふさわしい被検体を選択するために使用される。

#### 【0237】

一実施態様において、診断又は検出の方法において使用のための抗Jag1抗体が提供される。更なる態様において、生物学的試料中のJag1の存在を検出する方法が提供される。所定の態様において、生物学的試料中のJag1の細胞内ドメイン(ICD)の存在を検出する方法が提供される。所定の実施態様において、本方法は、抗Jag1抗体のJag1への結合を許容する条件下で、本明細書に記載のように抗Jag1抗体と生物学的試料を接触させること、及び複合体が抗Jag1抗体とJag1との間に形成されているかどうかを検出することを含む。そのような方法は、インビトロ又はインビボ法であり得る。一実施態様において、例えばJag1が患者の選択のためのバイオマーカーであるなど、上述されるように、抗Jag1抗体が抗Jag1抗体による治療にふさわしい被検体を選択するために使用される。

#### 【0238】

本発明の抗体を用いて診断され得る典型的な障害は、肝臓がん、具体的には、肝細胞がんを含む。

#### 【0239】

所定の実施態様において、標識された抗Notch2抗体又は抗Jag1抗体が提供される。標識は、限定されるものではないが、(例えば、蛍光標識、発色団標識、高電子密度標識、化学発光標識、放射性標識など)直接検出される標識又は部分、並びに、例えば、酵素反応又は分子間相互作用を介して間接的に検出される酵素又はリガンドのような部分が含まれる。典型的な標識は、限定されないが、ラジオアイソトープ<sup>32</sup>P、<sup>14</sup>C、<sup>125</sup>I、<sup>3</sup>H、及び<sup>131</sup>I、フルオロフォア、例えば希土類キレート又はフルオレセイン及びその誘導体、ローダミン及びその誘導体、ダンシル、ウンベリフェロン、ルシェフェラーゼ、例えばホタルルシェフェラーゼ及び細菌ルシェフェラーゼ(米国特許第4737456号)、ルシェフェリン、2,3-ジヒドロフタルジネジオン、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)、アルカリフォスファターゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、糖オキシダーゼ、例えばグルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、及びグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘテロサイクリックオキシダーゼ、例えばウリカーゼ及びキサントキシダーゼ、色素前駆体を酸化する過酸化水素を利用する酵素、例えばHRP、ラクトペルオキシダーゼ、又はマイクロペルオキシダーゼと共役したもの、ピオチン/アビジン、スピンラベル、バクテリオファージラベル、安定な遊離ラジカルなどが含まれる。

#### 【0240】

##### F. 薬学的製剤

本明細書に記載の抗Notch2又は抗Jag1抗体の薬学的製剤は、所望の程度の純度を有するその抗体と任意の薬学的に許容可能な担体(Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed.: Williams and Wilkins PA, USA (1980))とを、凍結乾燥製剤又は水性溶液の形態で混合することによって調製される。薬学的に許容可能な担体は、使用される投薬量及び濃度でレシipientに毒性でなく、そしてこれには、限定しないが、リン酸塩、クエン酸塩及び他の有機酸のような緩衝液;アスコルビン酸及びメチオニンを含む抗酸化剤;防腐剤(例えば、オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロライド;ヘキサメトニウムクロライド;塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、フェノール、ブチル又はベンジルアルコール;アルキルパラベン、例えば、メチル又

10

20

30

40

50

はプロピルパラベン；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；及びm-クレゾール）；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；タンパク質、例えば、血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン；親水性ポリマー、例えば、ポリビニルピロリドン；アミノ酸、例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン又はリジン；マンノサッカライド、ジサッカライド、及びグルコース、マンノース又はデキストリンを含む他の炭水化物；キレート剤、例えば、EDTA；糖、例えば、スクロース、マンニトール、トレハロース又はソルビトール；塩形成対イオン、例えば、ナトリウム；金属錯体（例えば、Zn-タンパク質錯体）；及び/又はポリエチレングリコール（PEG）等の非イオン性界面活性剤が挙げられる。本明細書における典型的な薬学的に許容可能な担体は、水溶性の中性アクティブヒアルロニダーゼ糖タンパク質（SHASEGP）などの介在性薬物分散剤、例えば、rHuPH20（HYLENEX（登録商標）、Baxter International, Inc.）などのヒト可溶性PH-20ヒアルロニダーゼ糖タンパク質を更に含む。所定の典型的なSHASEGP及び使用法は、rHuPH20を含み、米国特許出願公開第2005/0260186号及び第2006/0104968に開示されている。一態様において、SHASEGPは、コンドロイチナーゼなどの1つ又は複数の追加のグルコサミノグリカンと組み合わせられる。

10

## 【0241】

典型的な凍結乾燥抗体製剤は、米国特許第6267958号に記載されている。水性の抗体製剤は、米国特許第6171586号及び国際公開第2006/044908号に記載されているものが含まれ、後者の製剤はヒスチジン-酢酸緩衝液を含む。

20

## 【0242】

本明細書の製剤はまた、治療を受けている特定の徴候のために必要な一以上の活性成分、好ましくは、互いに悪影響を及ぼさない相補的活性を持つものが含まれる場合がある。例えば、更に、化学療法剤又は抗Notch2又は抗Jag1抗体を有する別の治療用抗体を提供することが望まれ得る。幾つかの実施態様において、製剤は、抗Notch2抗体及び抗Jag1抗体を含有し得る。このような活性成分は、意図した目的のために有効な量で組み合わせられ適切に存在する。

## 【0243】

活性成分は、例えば、コアセルベーション技術又は界面重合法によって、例えばそれぞれヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン-マイクロカプセル及びポリ（メチルメタクリレート（methyl methacrylate））マイクロカプセルにより、コロイド薬物送達系に（例えばリポソーム、アルブミンマイクロスフィア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル）又はマクロ・エマルジョンで調製されたマイクロカプセルに封入されてもよい。このような技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)に開示されている。

30

## 【0244】

徐放性製剤が調製されてもよい。徐放性製剤の好適な例は、抗体を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリクスを含み、そのマトリクスが成形品、例えばフィルム又はマイクロカプセルの形をしている。

40

## 【0245】

インピボ投与に使用される製剤は、一般的に無菌である。無菌性は、例えば、滅菌濾過膜を通して濾過することにより、達成することができる。

## 【0246】

## G. 治療用組成物

また、本明細書において提供されるのは、(a)容器；(b)肝臓がんの治療のための抗Notch2抗体又は抗Jagged1抗体及び担体を含む容器内に含まれる組成物；及び(c)肝臓がんの治療的処置又は診断的検出のための組成物の使用に言及する、容器に貼付されたラベル又は容器と共に含まれる添付文書を含む製造品である。

## 【0247】

50

本発明の抗体は、治療において、単独で、又は他の薬剤と組み合わせて使用することができる。例えば、本発明の抗体は少なくとも一の追加の治療剤と同時に投与され得る。所定の実施態様において、付加的な治療剤は、化学療法剤である。

【0248】

上記のこうした併用療法は、併用投与（2つ以上の治療薬が、同一又は別々の製剤に含まれている）、及び、本発明の抗体の投与が、追加の治療薬又は薬剤の投与の前、同時、及び/又はその後起きうる分離投与を包含する。一実施態様において、抗Notch2又はJag1抗体の投与、及び追加の治療剤の投与は、互いに、約1カ月以内、又は約1、2若しくは3週間以内、又は約1、2、3、4、5、若しくは6日以内に生じる。本発明の抗体はまた放射線治療と併用して用いることができる。

10

【0249】

本発明の抗体（及び任意の付加的な治療剤）は、任意の適切な手段によって投与することができ、経口、肺内、及び鼻腔内、及び局所治療が所望される場合、病巣内投与が含まれる。非経口注入には、筋肉内、静脈内、動脈内、腹腔内、又は皮下投与が含まれる。投薬は、その投与が短期間か又は長期であるかどうか部分的に依存し、任意の適切な経路、例えば、静脈内又は皮下注射などの注射により行うことができる。限定されないが、様々な時間点にわたる、単一又は複数回投与、ボラス投与、パルス注入を含む様々な投与スケジュールが本明細書で考えられている。

【0250】

本発明の抗体は良好な医療行為に合致した方法で処方され、投与され、投薬される。これに関連した考慮因子としては、治療すべき具体的な障害、治療すべき具体的な哺乳動物、個々の患者の臨床状態、障害の原因、薬剤の送達部位、投与方法、投与スケジュール及び医師にとって既知の他の因子が挙げられる。抗体は、必要ではないが任意で、問題となる障害の予防又は治療のために、現在使用中の一又は複数の薬剤とともに処方される。そのような他の薬剤の有効量は製剤中に存在する抗体の量、障害又は治療の種類及び上記した他の要因に依存する。これらは一般的には本明細書に記載されるのと同じ用量及び投与経路において、又は、本明細書に記載された用量の1%から99%で、又は経験的に/臨床的に妥当であると決定された任意の用量及び任意の経路により使用される。

20

【0251】

疾患の予防又は治療のためには、本発明の抗体の適切な用量（単独で使用されるか、又は、一以上の更なる治療的薬剤との組み合わせられる場合）は治療すべき疾患の種類、抗体の種類、疾患の重症度及び経過、抗体を予防又は治療目的のいずれにおいて投与するか、以前の治療、患者の臨床的履歴及び抗体に対する応答性、及び担当医の判断に依存する。抗体は一時的又は一連の治療にわたって患者に適切に投与される。数日間以上に渡る反復投与の場合には、状態に応じて、治療は疾患症状の望まれる抑制が起こるまで持続するであろう。初回より高い負荷投与量の後、一又は複数のより低い用量を投与することができる。しかしながら、他の投薬レジメンは有用でありうる。この治療法の進行は、一般的な技術及びアッセイにより容易にモニターされる。

30

【0252】

上記の製剤又は治療方法の何れかが、抗Notch2又は抗Jag1抗体の代わりか又は抗体に加えて、本発明のイムノコンジュゲートを用いて行うことができることが理解される。

40

【0253】

H. 製造品

本発明の他の実施態様において、上述した障害の治療、予防、及び/又は診断に有用な物質を含む製造品が提供される。製造品は、容器と容器上ないしは容器に付随するラベル又は添付文書を含んでなる。例えば、(a) 容器；(b) 肝臓がんの治療のための抗Notch2抗体又は抗Jagged1抗体及び担体を含む容器内に含まれる組成物；及び(c) 肝臓がんの治療的処置又は診断的検出のための組成物の使用に言及する、容器に貼付されたラベル又は容器と共に含まれる添付文書を含む製造品が提供される。

50

## 【0254】

好適な容器は、例としてボトル、バイアル、シリンジ、IV輸液バッグ等を含む。容器はガラス又はプラスチックなどの様々な物質から形成されうる。容器は、疾患の治療、予防、及び/又は診断に有効である、それ自体が、又はその他の組成物と併用される化合物を収容し、無菌のアクセスポートを有し得る（例えば、容器は皮下注射針による穴あきストッパーを有する静脈内溶液バッグ又はバイアルであってよい）。組成物中の少なくとも一の活性剤は、Notch2シグナル伝達阻害剤、例えば、抗Notch2と抗体又は抗Jag1抗体である。ラベル又は添付文書は、組成物が、肝臓がんなどの肝臓の増殖性疾患の治療のために使用されることを示している。更に、製造品は、(a)組成物が本発明の抗体を包含する組成物を含む第一の容器；及び(b)組成物が更なる細胞障害性又はその他の治療的薬剤を包含する組成物を含む第二の容器を含み得る。本発明の本実施態様における製造品は、組成物が、肝臓がんなどの肝臓の増殖性疾患を治療することに用いることができることを示す添付文書を更に含んでいてもよい。別法として、又は加えて、製造品は、薬学的に許容可能な緩衝液、例えば注射用静菌水(BWFI)、リン酸緩衝化生理食塩水、リンガー溶液及びデキストロース溶液を含む第二(又は第三)の容器を更に含んでもよい。製造品は、他の緩衝液、希釈剤、フィルター、針及びシリンジを含む商業的及び使用者の見地から望ましい他の材料を更に含んでもよい。

10

## 【0255】

上記の製造品の何れかは、抗Notch2抗体又は抗Jag1抗体の代わりか又はそれに加えて、本発明のイムノコンジュゲートを含み得ることが理解される。

20

## 【実施例】

## 【0256】

## III. 実施例

以下は本発明の方法及び組成物の例である。上記提供される一般的な説明を前提として、他の様々な実施態様が実施され得ることが理解される。

## 【0257】

## 実施例1

## 肝臓がんのマウスモデル

FVB-Nマウス(Charles River, Hollister)は、以前に記載されるように、Ras、AKT及びのSleeping Beautyトランスポザーゼをコードするプラスミドの尾静脈水圧注射が施された(Ho et al., C., Hepatology 55:833-845 (2012))。簡潔には、10ugのpT3-CAGGS-NRasV12、10ugのpT3-EF1A-AKT、及び0.8ugのCMV-SB(Ho et al., Hepatology 55:833-845 (2012); Yant et al., Mol. Cell. Biol. 24:9239-9247 (2004))が、生理食塩溶液(0.9%NaCl)で約2mlに希釈され、5から8秒でFVB-Nマウスの外側尾静脈に注射された。

30

## 【0258】

肝臓がんの発生をモデル化するために、上記のようにかつ前述されたように、マウスは、発がん性のRas及び恒常的に活性化AKTをコードするプラスミドを、Sleeping Beautyトランスポザーゼとともに尾静脈水圧注射を施された(Ho et al., C., Hepatology 55:833-845 (2012))。このモデルは、肝細胞の効率的かつ安定なトランスフェクションそしてトランスフェクトされたがん遺伝子の信頼性ある発現を可能とする。尾静脈水圧注射後5週間以内に、マウスは、多数の肝臓内腫瘍塊を発生した。正常な肝実質の多くは、腫瘍上皮によって取って代わり、これらのマウスの肝臓は、元のサイズの10倍もの大きさに拡大した。以前の報告と一致して、これらのマウスで生じた腫瘍は、肝細胞がん(HCC)と胆管がん(CC)を含む、肝臓の腫瘍型の広いスペクトルを含んでいた。腫瘍結節の約80%が肝細胞がんの組織病理学的基準を満たし、20%が胆管がんとしての識別のための組織病理学的基準を満たしていた。

40

## 【0259】

各肝臓は数十の腫瘍から構成され、その各々は、AFP(図1A)及びEpCAM(図

50

1 C) のような所定のマーカー又はマーカーの組み合わせを発現した。幾つかの腫瘍は、AFP と EpCAM (図 1 B) の両方を発現する。このモデルにおける腫瘍は、それらの、HCC - 及び CC - 特異的腫瘍マーカーの発現が変化していた (図 1 A)。HCC に特異的な  $\alpha$ -フェトプロテイン (AFP) の発現は、腫瘍を有しない正常な肝臓における 1 % 未満と比較して、腫瘍を有する肝臓において細胞の約 12.8 % で検出された (図 1 D)。胆管がんのマーカーである EpCAM の発現は、このモデルではあまり優勢ではなく、腫瘍を有しない正常な肝臓における約 1 % と比較して、全ての肝細胞の約 5 % の平均で検出された。HCC - 及び CC - 特異的マーカーの両方を発現する腫瘍もまた観察された (図 1 C)。これらの組み合わせられた HCC - CC (cHCC - CC) 腫瘍は、特に侵襲性が強い臨床的特徴により特徴づけられ (American-Cancer-Society, 2012. Cancer Facts & Figures 2012. Atlanta: American Cancer Society)、肝臓前駆細胞と遺伝子発現パターンを共有している (Coulouarn et al., Carcinogenesis 33:1791-1796 (2012))。

10

【0260】

## 実施例 2

## Notch2 シグナル伝達の活性化

肝臓がんが Notch2 活性化に関連付けられているかどうかを決定するために、免疫蛍光分析は、AKT/Ras H T V マウスの肝臓に生じる腫瘍で実施された。肝臓組織を包埋し、O.C.T.™ 凍結培地 (TISSUE-TEK (登録商標)) 中で凍結され、8  $\mu$ m で凍結切片化された。切片は、4 % パラホルムアルデヒド (PFA) で固定し、Notch2 (Cell Signaling Technology)、EpCAM (BioLegend)、及び AFP (R&D Systems に対する一次抗体を使用して染色された。画像解析のために、免疫蛍光染色スライドは Arrio1 スライド走査システム (Leica) を使用してスキャンされた。

20

【0261】

核 Notch2 の免疫蛍光検出によって決定される場合、高レベルの Notch2 活性化が、AFP + / EpCAM + 腫瘍で観察され (図 1 E)、それほどではないにせよ EpCAM + 腫瘍で観察された (図 1 E、図 1 F)。Notch2 活性化についてのそれほど顕著でない染色が、他の腫瘍細胞型で観察された (図 1 E)。

【0262】

## 実施例 3

## 抗体の産生

Notch2 シグナル伝達は肝臓がんの発生や増殖を、特に二重陽性腫瘍において、駆動するために重要であったかどうかを決定するために、実施例 1 に記載されるように、AKT/Ras コンストラクトによる尾静脈水圧注射が施され、抗 Notch2 抗体、抗 Jag1 抗体、又はアイソタイプ対照 (抗ブタクサ) 抗体で処置された。

30

【0263】

## a. 抗 Jag1 抗体を同定するためのライブラリー選別とスクリーニング

ヒト IgG レパートリーの天然の多様性を模倣する、選択された相補性決定領域における合成多様性を有するヒトファージ抗体ライブラリーが、M13 バクテリオファージ粒子の表面上に示された Fab 断片をパニングするために使用された。ヒト Jag1 - DSL - EGF1 - 4 (図 10) がライブラリー選別のための抗原として使用された。Nunc 96 ウェル Maxi sorp イムノプレートは、標的抗原 (10  $\mu$ g の / ml) により 4 で一晩コーティングされ、ファージブロック緩衝液 PBS T (リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 及び 1 % (w/v) ウシ血清アルブミン (BSA) 及び 0.05 % (v/v) の Tween - 20) を用いて室温にて 1 時間ブロックした抗体ファージライブラリー V H (Lee et al., J. Immunol. Meth. 284:119-132, 2004 を参照) 及び V H / V L (Liang et al., JMB. 366: 815-829, 2007 を参照) が別々に抗原プレートに加えられ、室温で一晩インキュベートされた。翌日、抗原でコーティングされたプレートは、PBS (0.05 % の Tween - 20 を含む PBS) で 10 回洗浄され、結合したファージを 30 分間、50 mM の HCl 及び 500 mM の NaCl で溶出し、1 M の Tris 塩基 (pH 7

40

50

． 5 ) の等量で中和した。回収したファージを大腸菌 X L - 1 B l u e 細胞中で増幅させた。つづく選択ラウンドの間に、抗原被覆プレートとの抗体ファージのインキュベーションは、2 ~ 3 時間に減らし、プレート洗浄のストリンジェンシーは徐々に増加された。

【 0 2 6 4 】

4 ラウンドのパニングの後、かなりの濃縮が観察された。9 6 個のクローンが、V H 及び V H / V L ライブラリー選別からそれぞれ採取され、それらがヒト J a g g e d 1 に特異的に結合しているかどうかを判断した。これらのクローンの可変領域は、固有な配列クローンを同定するために P C R で配列決定された。ファージ抗体の親和性は、スポット競合 E L I S A を使用してランク付けされた。ファージ抗体の I C 5 0 値は、更に競合的ファージ結合 E L I S A を用いて決定された。ヒト J a g g e d 1 ( J a g g e d 2 でない ) 又は J a g g e d 1 と J a g g e d 2 の両方に特異的に結合する固有のファージ抗体が選択され、インビトロ細胞アッセイで評価のために、完全長の I g G に再フォーマットされた。

10

【 0 2 6 5 】

目的のクローンは、ヒト 定常ドメインを含む p R K 哺乳動物細胞発現ベクター ( p R K . L P G 3 . H u m a n K a p p a ) 、 及び全長ヒト I g G 1 定常ドメインをコードする発現ベクター ( p R K . L P G 4 . H u m a n H C ) のそれぞれに、個々のクローンの V L 及び V H 領域をクローニングすることによって I g G に再フォーマットされた ( S h i e l d s e t a l . , J B i o l C h e m 2 0 0 0 ; 2 7 6 : 6 5 9 1 - 6 6 0 4 ) 。 次いで、抗体を哺乳動物 C H O 細胞で一過性に発現させ、プロテイン A カラムで精製した。

20

【 0 2 6 6 】

b . V <sub>H</sub> 又は V <sub>H</sub> V <sub>L</sub> ライブラリーに由来するクローンの親和性向上のためのライブラリーの構築

全ての C D R - L 3 の位置に停止コドン ( T A A ) を含み、かつ M 1 3 バクテリオファージの表面に一価の F a b を提示する、ファージミド p V 0 3 5 0 - 2 b 由来のファージミド p W 0 7 0 3 ( L e e e t a l . , J . M o l . B i o l 3 4 0 , 1 0 7 3 - 1 0 9 3 ( 2 0 0 4 ) は、親和性成熟のための V H ライブラリーから目的のクローンの重鎖可変ドメイン ( V <sub>H</sub> ) をグラフトするためのライブラリテンプレートとしての機能を果たした。ハード及びソフトランダム化の戦略が、親和性成熟のために使用された。ハードランダム化のために、天然のヒト抗体を模倣するように設計されたアミノ酸を使用して、3 つの軽鎖 C D R の選択された位置を含む一つの軽鎖ライブラリーがランダム化され、その設計された D N A の縮退は、 L e e e t a l . ( J . M o l . B i o l 3 4 0 , 1 0 7 3 - 1 0 9 3 ( 2 0 0 4 ) ) に記載される通りであった。選択された位置で約 5 0 % の突然変異率を導入されたソフトランダム化条件を達成するために、変異原性 D N A は、野生型ヌクレオチドを好む塩基の 7 0 - 1 0 - 1 0 - 1 0 混合物を用いて合成された ( G a l l o p e t a l . , J . M e d . C h e m . 3 7 : 1 2 3 3 - 1 2 5 1 ( 1 9 9 4 ) ) 。ソフトランダム化のために、C D R - L 3 の 9 1 - 9 6 、 C D R - H 1 の 3 0 - 3 3 、 3 5 、 C D R - H 2 の 5 0 、 5 2 、 5 3 - 5 4 , 及び 5 6 、 C D R - H 3 の 9 5 - 9 8 が標的とされ ; C D R ループの 3 つの異なる組み合わせ、H 1 / L 3 、 H 2 / L 3 , 及び H 3 / L 3 がソフトランダム化のために選択された。

30

【 0 2 6 7 】

V <sub>H</sub> V <sub>L</sub> ライブラリから由来するクローンについて、各 C D R に 4 つの終止コドン ( T A A ) を含み、かつ M 1 3 バクテリオファージの表面に一価の F a b を提示するファージミドが個別に生成され、親和性成熟ライブラリーの構築のためのクンケル突然変異誘発のためのテンプレートとしての役割を果たした。C D R - L 3 の多様性がナイーブライブラリーに組み込まれているため、ソフトランダム化戦略のみが V <sub>H</sub> V <sub>L</sub> ライブラリーに由来するクローンのために使用された。ソフトランダム化条件を達成するために、C D R - L 1 の 2 8 - 3 1 、 C D R - L 2 の 5 0 、 C D R - L 3 の 5 3 - 5 5 、 C D R - H の 9 1 - 9 6 、 3 0 - 3 5 、 C D R - H 2 の 5 0 - 5 6 、 C D R - H 3 の 9 5 - 1 0 0 が標的とされ ; C D R ループの 4 つの異なる組み合わせ、H 1 / L 3 \* 、 H 2 / L 3 \* 、 及び H 3 / L 3 \* 及び L 1 / L 2 / L 3 \* ( ここで、\* は、テンプレート上の停止コドンの位置を示

40

50

す) がランダム化のために選択された。

【0268】

c. 親和性の向上を生み出すためのファージ選別戦略

親和性向上の選択のために、Jag1抗原は、限定試薬条件下で最初にビオチン化された。ファージライブラリーは、ストリンジエンシーを増加させた、一ラウンドのプレート選別及び5ラウンドの溶液選別を受けた。プレート選別の最初のラウンドでは、10 µg/mlの抗原がMaxisorpプレート上に最初に塗布され、ブロッキング緩衝液(PBS中に1%BSA、0.05%のTween20)で予めブロックされた。ファージインプットのブロッキング緩衝液中の3 OD/mlが、3時間抗原プレートに対してインキュベートされた。ウェルをPBS-0.05% Tween20により10回洗浄した。結合ファージを50 mMのHCl、500 mMのKClの150 µl/ウェルで溶出し、続いて1 MのTris(pH8)の50 µl/ウェルにより中和し、滴定し、次のラウンドのために増殖された。続くラウンドにおいて、ファージライブラリーのパニングが溶液ファージ中で行われ、ここではファージライブラリーは、室温で2時間、1%のSuperblock(Pierce Biotechnology)及び0.05%のTween20を含有する100 µlの緩衝液中で100 nMのビオチン化標的タンパク質(濃度は親クローンファージのIC50値に基づく)とインキュベートされた。混合物は1%のスーパーブロックで10Xに更に希釈され、100 µl/ウェルをニュートラアビジンでコーティングされたウェル(10 µg/ml)に室温で30分間穏やかに振盪しながら適用した。バックグラウンド結合を決定するために、ファージを含むコントロールウェルをニュートラアビジンでコーティングされたプレート上に捕獲した。その後、結合したファージは、洗浄し、溶出し、最初のラウンドのために説明したように増殖させた。溶液選別の更なる4回のラウンドが、選別ストリンジエンシーの増加とともに実行された。その最初の2ラウンドは、ビオチン化標的タンパク質濃度を100 nMから0.1 nMに減少させることによる会合速度(on-rate)選択のためであり、その最後の2回のラウンドは、室温で弱い結合剤を競合するため、過剰量の非ビオチン化標的タンパク質(300から1000倍以上)を加えることによる解離速度(off-rate)選択のためのものであった。

【0269】

d. ハイスループット親和性スクリーニングELISA(単一スポットコンペティション)

コロニーが第6ラウンドのスクリーニングから採取された。コロニーを96ウェルプレート(Falcon)中で50 µg/mlのカルベニシリンと $1 \times 10^{10}$ /mlのM13KO7を含む2YT培地の150 µl/ウェル中で、37°Cで一晩増殖させた。同じプレートから、XL-1に感染した親のファージのコロニーをコントロールとして取り上げた。96ウェルNuncマキシソープ(登録商標)プレートを一晩4°Cで、PBS中のJag1又はJag2(0.5 µg/ml)のどちらかを100 µl/ウェルでコーティングした。プレートは1時間、PBS20中に1%のBSA及び0.05%のTween20を含む150 µlでブロックした。

【0270】

35 µlのファージ上清が、5 nMのJag1又はJag2を含むか又は含まない、75 µlのELISA(酵素結合免疫吸着測定法)緩衝液(0.5%のBSA、0.05%のTween20を含むPBS)で希釈され、Fプレート(NUNC)中で室温で1時間インキュベートさせた。混合物の95 µlが、抗原でコーティングしたプレートへ並べて移された。プレートを穏やかに15分間振とうし、PBS-0.05% Tween20で10回洗浄した。結合は、ELISA緩衝液(1:2500)中で西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)結合抗M13抗体を添加し、室温で30分間インキュベートすることにより定量した。プレートをPBS-0.05% Tween20により20回洗浄した。次に、ペルオキシダーゼ基質の100 µl/ウェルをウェルに加え、室温で5分間インキュベートした。反応を各ウェルに100 µlの0.1 Mリン酸( $H_3PO_4$ )を添加するこ

10

20

30

40

50

とによって停止させ、室温で5分間インキュベートさせた。各ウェルの黄色のOD（光学密度）を標準ELISAプレートリーダーを用いて450nmで測定した。親ファージのウェル（100%）のOD450nm減少（%）と比較して、50%未満のOD450nm減少（%）を有するクローンが配列解析用に選択された。それぞれの親クローンとの比較により、Jag1に対する結合親和性（ファージIC50）を決定するファージ調製のために、ユニークなクローンが選択された。次いで、最も親和性が向上されたクローンは、抗体産生のためにヒトIgG1に再フォーマットされた。

#### 【0271】

親抗体A及び親和性成熟抗体A-1及びA-2は、ヒト及びマウスJag1、具体的にはJag1 DSL-EGF1-4に特異的に結合したが、ヒト及びマウスJag2には結合しなかった。

10

#### 【0272】

特定の抗Notch2 NRR抗体の生成及び特性評価は、以前に説明されている。PCT出願番号PCT/US09/059028を参照。

#### 【0273】

##### 実施例4

Notch2とシグナル伝達阻害剤による治療は、腫瘍量を減少させる

実施例1に記載したように、AKT/RasHTVマウスは、尾静脈水圧注射の日に開始する、抗Notch2抗体（15mg/kg、1回/週）、抗Jag1抗体（10mg/kg、1回/週）又はアイソタイプ対照抗体により処置された。肝臓は画像化され、剖検時に標準的な実験室のバランス上で体重測定された。対照抗体で処置したマウスは、尾静脈水圧注射後5週間で重度の腫瘍量を生じ（図2A）、その肝臓は、正常な非担腫瘍マウスでは1.2gから体重の5.8%から（図2B）、最大で約8.9g又は体重のおよそ31%にまで大きさが増加した。抗Notch2又は抗Jag1抗体のどちらかによる処置は、腫瘍発生を有意に阻害した（図2A及びB； $p < 0.0001$ 、 $n > 8$ ）。抗Notch2抗体で処置されたマウスは、その肝臓は平均して5.1g又は体重の19.3%まで増殖し、有意に小さな腫瘍量を生じた（図2B）。抗Jag1処置はさらに大きな効果があった。これらのマウスでは、最終的な肝臓重量は、平均すると4.3g又は体重の15.8%であった（図2B）。

20

#### 【0274】

免疫蛍光による核のNotch2の検出によって決定されるように、Notch2シグナル伝達がEpCAM-腫瘍に比べてより高度に活性化される、腫瘍のEpCAM<sup>+</sup>及びAFP<sup>+</sup>/EpCAM<sup>+</sup>サブセット（図1E）は、Notch2経路阻害に対して非常に感受性であった。EpCAM<sup>+</sup>腫瘍（AFP<sup>-</sup>/EpCAM<sup>+</sup>及びAFP<sup>+</sup>/EpCAM<sup>+</sup>腫瘍）は、抗Notch2抗体又は抗Jag1抗体の何れかによる処置後に面積が有意に減少した（図3A、図3B）。Notch2シグナル伝達は、AFP<sup>+</sup>/EpCAM<sup>-</sup>腫瘍において高度には活性化されず（図1E）、これらの腫瘍はNotch2経路阻害の影響を受けていない可能性があることを示唆している。しかし、予想に反して、抗Notch2処置及び抗Jag1処置の双方ともにAFP<sup>+</sup>腫瘍面積の有意な低下へと導いた（図3C）。まとめると、これらの結果は、抗Notch2又は抗Jag1抗体処置は、肝臓がんのこのモデルにおいて肝臓腫瘍の広範囲の発生をブロックすることを示している。抗Notch2及び抗Jag1抗体による処置の成功は、抗Notch2及び抗Jag1抗体処置後のAFP及びEpCAM染色の有意な減少によって示されるように、HCC様及び胆管がん様腫瘍の両方を含む全体的な腫瘍量の減少をもたらした。

30

40

#### 【0275】

##### 実施例5

Notch1及びNotch3の阻害

Jag1の阻害はNotch2の阻害と同様の効果があり、Jag1とNotch2は同じ経路で作用していること、具体的には、Jag1は腫瘍形成を支える上でのNotch2に対するリガンドとして作用することを示唆している。他のNotch受容体の阻害

50

もまた、肝臓がんの形成や増殖を減少させることができるかどうかを決定するために、実施例1に記載されるように、マウスは、Ras/AKTコンストラクトによる尾静脈水圧注射が施され、抗Notch1アンタゴニスト抗体(10mg/kg、1回/週)又は抗Notch3アンタゴニスト抗体(30mg/kg、3回/週)により処置された。抗Notch1抗体による処置は、アイソタイプ対照と比較して、Ras/AKT HTVマウスの肝臓重量を減少させたが、抗Notch3抗体による処置は、肝臓重量には有意な影響を与えなかった(図2D;  $p < 0.02$ ,  $n = 7$ )。抗Notch2又は抗Jag1処置は、EpCAMの転写物のレベルを減少させたが、(図3E、 $p < 0.005$ ,  $n = 7$ )、Notch1の阻害は、肝臓でのEpCAM陽性腫瘍の断面積を増加させ(図3D、図3E、 $p < 0.02$ ,  $n = 7$ )、胆管がんマーカーのサイトケラチン19の発現を増加させた(CK19; 図3F)。抗Notch1又は抗Notch3に対するアンタゴニスト抗体を用いた処置は、肝前駆細胞及び前駆細胞様腫瘍マーカー並びに胆管がん様腫瘍マーカーである、Sox9の発現に影響を及ぼさなかったが、抗Notch2又は抗Jag1抗体による処置は、Sox9を、mRNA(図3G)及びタンパク質(図3H)のレベルの両方で、劇的に減少させた。

10

## 【0276】

したがって、抗Notch1抗体又は抗Notch3抗体を用いた処置は、有意には腫瘍量を減少させなかった。実際には、Notch1の阻害は、EpCAM<sup>+</sup>胆管がん様腫瘍によって占有される数と断面積の増加を引き起こした。これらの結果は、抗Notch1処置後の増加した胆管がん様病変の観察とあわせて、肝臓がんにおけるNotch2とNotch1において反対の役割があるという結論をサポートしていた。

20

## 【0277】

## 実施例6

抗Notch2又は抗Jag1抗体処置は、Notch2活性化を減少させる

免疫組織化学的分析のために、組織を、中性緩衝ホルマリン10%で固定し、パラフィンに包埋し、切片化した。4µmの厚さのホルマリン固定パラフィン包埋ヒト組織が染色に供された。Jag1 IHC染色については、全工程は、Ventana検出試薬(Ventana Medical Systems, Tucson, AZ)を用いてVentana Discovery XT自動染色機で行った。組織切片をEZ Prep溶液中で脱パラフィン化し、前処理は、標準的なインキュベーション時間を用いるCell Conditioner 1を用いて行った。組織切片は、その後、0.2µg/mlのヤギポリクローナル抗Jag1一次抗体(Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA; Cat# sc-6011)と共に室温で32分間インキュベートされ、その後、7.5µg/mlのビオチン化ウサギ抗ヤギIgG抗体(Vector Labs, Burlingame, CA)と室温で32分間インキュベートされた。一次及び二次抗体の両方とも、3%のBSA中の10%正常ヒト血清(Jackson ImmunoResearch)で希釈された。切片は、その後、室温で16分間、抗ウサギOmniMAP-HRP試薬とともにインキュベートされた。

30

## 【0278】

Notch2 IHCについては、全工程は、Ventana検出試薬(Ventana Medical Systems, Tucson, AZ)を利用してVentana Discovery XT Platformで行った。切片をEZ Prep溶液中で脱パラフィン化し、前処理は、標準的なインキュベーション時間を用いるCell Conditioner 1を用いて達成された。次いで、切片は、8µg/mlのウサギモノクローナル抗Notch2一次抗体(Clone D76A6, Cell Signaling Technologies, Beverly, MA)とともに37°Cで60分間インキュベートされ、その後、抗ウサギOMNIMAP-HRP試薬とともに32分間インキュベートされた。

40

## 【0279】

Hes1については、全工程は、DAKO洗浄緩衝液とDAKO Target Ret

50

rieval Solutionを用いてDako自動染色機で実施された。切片を脱パラフィンし、再水和し、20分間99 でDAKOTarget Retrieval Solutionとインキュベートし、4分間、3%のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>でクエンチされ、その後、アビジンビオチンブロッキングキット (Vector Laboratories: cat# sp-2001) でブロックされた。切片は、1ug/mlの抗HES-1 (clone NM1; MBL International) と室温で45分間、次いで、5ug/mlの二次抗体Bt-DK抗ラット (Jackson ImmunoResearch) (Jackson ImmunoResearch) と15分間インキュベートされ、その後、増幅希釈液中でビオチン化チラミドとともに3分間インキュベートされた。切片はその後、発色性の検出と対比染色のためにDAB及びヘマトキシリンII試薬と共にインキュベートされた。スライドを脱水しキシレンで透徹し、カバーガラスで覆った。全ての切片はその後、発色性の検出と対比染色のためにDAB及びヘマトキシリンII試薬と共にインキュベートされた。スライドを脱水しキシレンで透徹し、カバーガラスで覆った。画像解析のために、免疫組織化学スライドはNanozoomerスライド走査システム (Hamamatsu) を使用してスキャンされた。

10

#### 【0280】

定量的リアルタイムPCR (QRT-PCR) が、TaqManプローブ (Applied Biosystems) を備えた7900 HT RT-PCRシステム (Applied Biosystems) を用いる一ステップ反応に対して、TaqMan One-Step RT-PCRキットを用いて行われた。使用されるプローブは、Notch1 (Mm00435245\_\_m1、Hs01062014\_\_m1)、Notch2 (Mm00803077\_\_m1、Hs01050719\_\_m1)、Notch3 (Mm00435270\_\_m1、Hs01128541\_\_m1)、Notch4 (Mm00440525)、Jag1 (Mm00496902\_\_m1)、Jag2 (Mm01325629\_\_m1)、DLL1 (Mm01279269\_\_m1)、DLL3 (Mm00432854\_\_m1)、DLL4 (Mm00444619)、Hey1 (Mm00516555\_\_m1)、CK19 (Mm00492980\_\_m1) 及びSox9 (Mm00448840\_\_m1) であった。

20

#### 【0281】

腫瘍形成に対するNotch2及びJag1の阻害のより広範な影響に合わせて、免疫蛍光法による核Notch2タンパク質の検出によって決定されるNotch2シグナル伝達は、抗Notch2又は抗Jag1の何れかで処理した後に担腫瘍肝臓全体にわたって減少した (図4A;  $p < 0.05$ ,  $n = 7$ )。この減少は、定量的RT-PCRにより決定されるNotch2発現の全体的なレベルが変化しなかったため、Notch2タンパク質の活性化に対する直接的な影響によるものであるように見えた。Notch2活性化を遮断する抗Notch2又は抗Jag1抗体処置と一致して、免疫染色は、Notch2シグナル伝達経路の下流の転写標的であるHes1において減少した。対照で処置されたRas/AKT/HTV肝臓は、高レベルのHes1染色を示した (図4D)。しかし、抗Notch2又は抗Jag1抗体による処置は、抗体で処置された肝臓におけるNotch2シグナル伝達の効果的遮断と一致して、Hes1染色を有意に減少させた (図4C、図4D、 $p = 0.0001$ ,  $n > 10$ )。Notch2シグナル伝達が遮断されたことを確認し、定量的RT-PCR分析は、Notch経路標的遺伝子HeyLはまた、抗Notch2又は抗Jag1抗体のどちらかの処置により非常に減少することを明らかにした (図4E、 $p < 0.0001$ ,  $n > 7$ )。

30

40

#### 【0282】

それぞれの場合において、抗Jag1抗体処置は、抗Notch2抗体処置と同じ効果を有しており、Jag1は、肝臓がんの形成と増殖を維持する点において、Notch2を介して、即ち、Notch2のリガンドとして、主に作用しているとする結論を更に支持している。まとめると、これらの結果は、抗Notch2又は抗Jag1抗体のどちらかによる処置は、Notch2活性化の減少をもたらしたことを示している。

50

## 【0283】

## 実施例7

Notchシグナル伝達経路成分の発現に対するNotch阻害抗体の効果

AKT/RasHTVを施されたマウスは、Notch1(10mg/kg、1回/週)、Notch2(10mg/kg、2回/週)、Notch3(30mg/kg、3回/週)、又はJag1(10mg/kg、1回/週)に対するアンタゴニスト抗体で処置された。抗ブタクサ抗体が、陰性対照として30mg/kgで3回/週で投与された。5週間後、肝臓が採取され、定量的リアルタイムPCRが、Notchシグナル伝達経路の成分の転写物に対する処置の効果を決定的に決定するために、単離されたRNAについて行われた。個々のNotchファミリー受容体の阻害は、他のNotch受容体ファミリーメンバーの発現の代償性増加をもたらさなかった。

10

## 【0284】

上述したように、個々のNotch受容体、Notch1、Notch2、及びNotch3の阻害は、肝腫瘍発生のAKT/Rasモデルにおいて異なる効果を有していた。この結果は、個々のNotch受容体は、肝臓がんにおいては必ずしも互いに補わないことを示唆している。Notch受容体ファミリーメンバーの発現に対する個々のNotch受容体の阻害効果及びリガンドの効果を決定するために、発現が、抗Notch1、抗Notch2、抗Notch3、抗Jag1抗体又はアインタイプ対照抗体の何れかを用いて、実施例1に記載したように、AKT/Ras構築物によるマウスの注射処置後に評価された。個々のNotch受容体の何れかについての受容体転写物発現の増加は、3つの阻害抗体の何れかによる阻害の際には認められなかった(図5A-C)。逆に、特異的阻害抗体によるNotch2阻害は、Notch3及びNotch4の両方の発現レベルの有意な減少をもたらした( $p < 0.05$ 、 $n = 7$ )。また、Notch3の阻害は、それ自身の発現の減少をもたらした( $p < 0.005$ 、 $n = 7$ )。これは、Notch2とNotch3の両方がNotch3の転写を制御するという以前の観察と一致している(Wang et al., PLoS ONE 7:e37365 (2012); Liu et al., Circulation Research 107:860-870 (2010))。アンタゴニスト抗体による処置の効果は、NotchリガンドJag1とDLL1の発現に関していっそう大きかった。Notch2阻害は、恐らくはこれらの肝臓におけるJag1を発現する胆管がん及び前駆細胞様腫瘍の減少の結果として、Jag1発現の有意な減少をもたらした(図5E)。Jag1阻害は、同様の効果を有しており、Jag1とNotch2はこの腫瘍モデルで一緒に機能していることが確認された。対照的に、Notch1の阻害は、NotchリガンドJag2及びDLL1の発現を有意に増加させた(図5F、図5G)。この結果は、少なくとも部分的に、抗Notch1アンタゴニスト抗体で処置された肝臓内の胆管がん様病変において観察された増加を説明するのに役立つ可能性がある。

20

30

## 【0285】

要約すると、Notch2阻害の際に、他のNotch受容体の発現の代償性増加は観察されず、抗Notch2又は抗Jag1抗体による処置の成功は、代替的なNotchシグナル伝達成分の上方制御を介した耐性を生じないことを示唆している。実際には、Notch2又はJag1アンタゴニスト抗体の何れかによる処置は、Jag1リガンド発現の減少を実際に生じ、抗Notch2による処置はNotch3発現の減少を生じた。

40

## 【0286】

## 実施例8

抗Notch2又は抗Jag1抗体処置は、前駆細胞様及び胆管がん様の肝腫瘍増殖を遮断する。

Notch2阻害が腫瘍量の減少へと導くメカニズムに取り組むために、ハイスループットRNA配列分析を行った。AKT/RasHTVを施されたマウスは、Notch2(10mg/kg、2回/週)、Jag1(10mg/kg、1回/週)、又は抗ブタクサ対照(30mg/kg、1回/週)に対するアンタゴニスト抗体で処置された。5週間後、肝臓を採取し、RNAは、ハイスループット配列決定に供された。

50

## 【 0 2 8 7 】

前駆細胞及び胆管がん様HCC発現シグネチャー遺伝子の発現は、抗Notch2及び抗Jag1抗体処置後に、担腫瘍肝臓において下方制御された。EpCAM及びCK19の発現は、CD133/Prom1(図6A、データ非表示)及びSpp1(図6B)(双方とも肝前駆細胞のマーカーである)の発現が下方制御されたように有意に下方制御された。FoxM1は、以前に、一般的に(Xia et al., Carcinogenesis 33:2250-2259 (2012))、そして特に肝臓がんのRas/Aktモデルにおいて特に(Ho et al., Hepatology 55:833-845 (2012))、HCCの増殖に役割を果たすことが示されているので、我々はその発現を調べ、Notch2及びJag1の両方の阻害が、FoxM1発現の減少を導くことを示すことができた(図6C)。更に、FoxM1標的遺伝子(Laoukili et al., Nat Cell Biol 7:126-136 (2005))、PLK1(図6D)、Ccnb1(図6E)、及びAurkb(図6F)はまた、対照と比較して、抗Notch2又は抗Jag1抗体の何れかで処置した担腫瘍肝臓で減少した。Wntシグナル伝達のマーカーはNotch2又はJag1阻害により増加した。具体的には、Wnt-経路標的遺伝子のAxin2が増加したように(図6H)、Wnt2リガンドは増加した(図6G)。また、最終的に分化した肝細胞のサブセットのマーカーであるグルタミン合成酵素(Glu1;図6I)の発現は、対照と比較して、抗Notch2又は抗Jag1抗体の何れかで処置した担腫瘍肝臓で増加した。これらの観察は、Notch2阻害が、FoxM1の下方制御を介した腫瘍細胞増殖の減少を誘導し、かつWntシグナル伝達の誘導を介した分化した肝細胞運命を誘導することと一致している(Boulter et al., Nat. Med. 18(4):572 (2012))。肝臓がんにおけるNotch2シグナル伝達の阻害は、肝細胞への腫瘍細胞の最終分化に影響を与えることが可能である。この仮説と一致して、Notch2及びJag1の阻害は最終的に分化した肝細胞の転写マーカー並びに前駆細胞からの肝細胞の分化に重要であることが知られているWntシグナル伝達の増加につながった(Boulter et al., Nat. Med. 18(4):572 (2012))。Notch2及びJag1の阻害はまた、増殖を減少させ、腫瘍細胞死を増加させることによって機能することができる。

## 【 0 2 8 8 】

## 実施例9

## ヒト肝臓がんにおけるNotch2の発現と活性化

ヒトHCC細胞株及び原発性ヒトHCC腫瘍は、Notchシグナル伝達成分の発現について、定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(qRT-PCR)を使用して分析された。HCC細胞株のHepG2、Hep3B、PCL/PRF/5、Snu387、Snu398、Snu423、Snu449、Snu475は、ATCC(Manassas, Virginia)から入手した。HCC細胞株のHuh-7、HLE、HLF、JHH1、JHH4、JHH5、JHH7はJapanese Collection of Bioresources Cell Bank(Osaka, Japan)から入手した。全染色した組織切片は、Definienソフトウェアを用いて分析された。

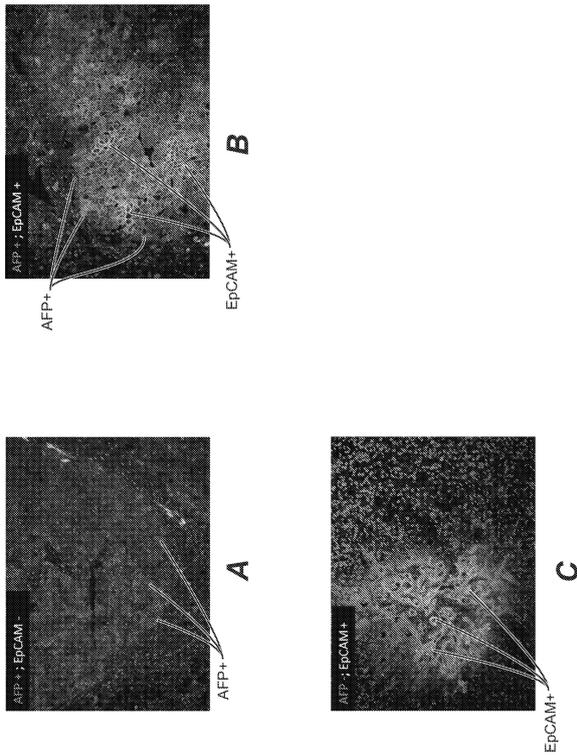
## 【 0 2 8 9 】

Notch2は、16の培養HCC細胞株のうち15において、Notch1又はNotch3の何れかよりも高いレベルで発現された(図7A)。多くの場合、Notch2の発現は、発現が参照遺伝子に対して正規化された場合、10倍以上、他のNotchファミリーメンバーの発現を上回っていた(RPL19、図7A)。この結果と一致して、Notch2の顕著な発現が、IHCによって決定される78のヒトの一次HCC試料のうち28において(37%)認められた。28のヒト一次HCC試料の15(54%)において、Notch2は、Notch2経路の活性化を示す様々な程度の核局在化を示した(図7B)。IHCにより評価されるJag1発現は、調べられた59のヒト一次HCC試料のうち34で観察された(図7B)。Notch2とJag1の両方で評価された56のヒト一次HCC試料のうち、15(27%)が、Notch2及びJag1の両方の発現を有することが見いだされた。重複発現を有する15の組織のうち11(73%)が、活性なNotch2シグナル伝達を示すNotch2の核局在化をある程度示した。

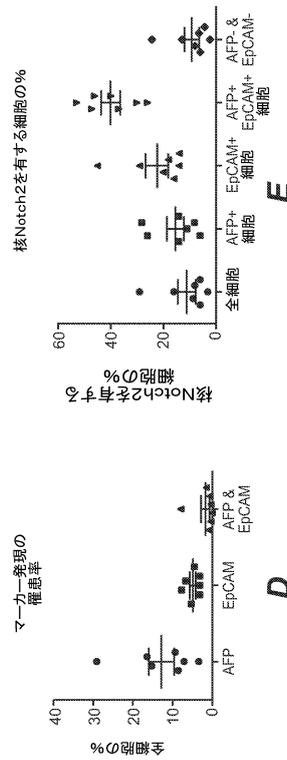
【0290】

前述の発明は、理解を明確にする目的のために例示及び実施例によってある程度詳細に説明してきたが、説明や例は、本発明の範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。全ての特許及び本明細書に引用される科学文献の開示は、参照によりその全体が援用される。

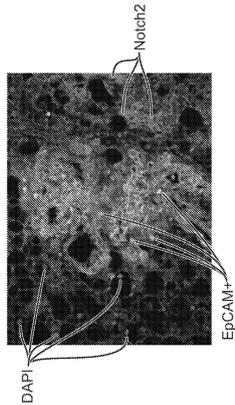
【図1A - C】



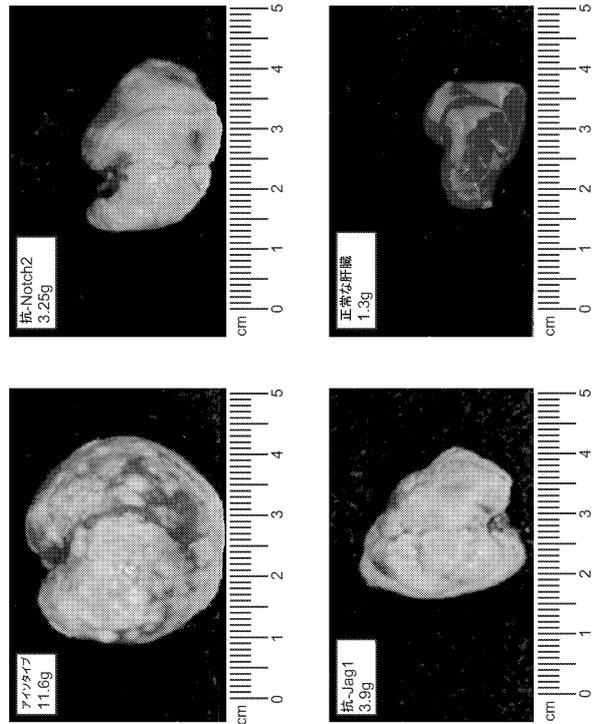
【図1D - E】



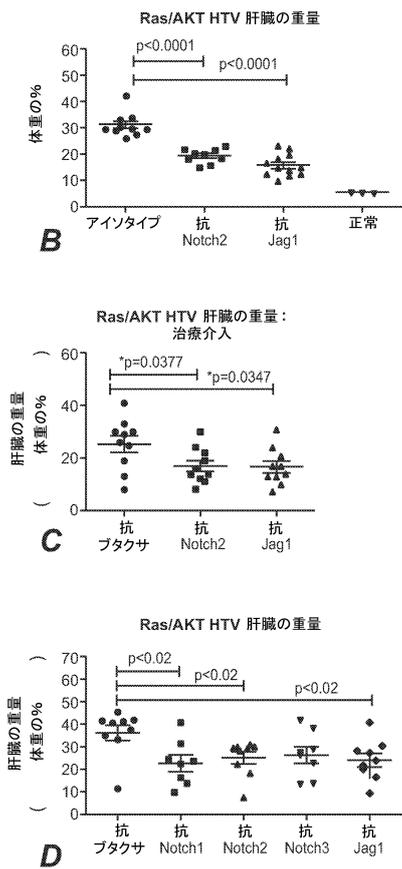
【 図 1 F 】



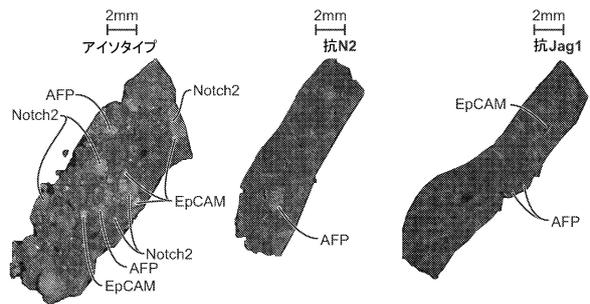
【 図 2 A 】



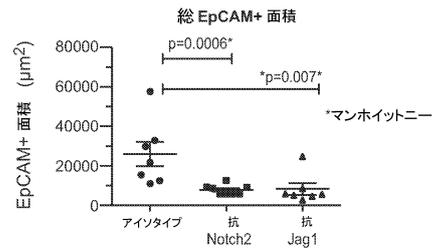
【 図 2 B - D 】



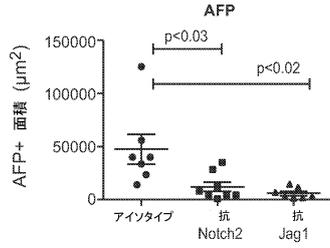
【 図 3 A 】



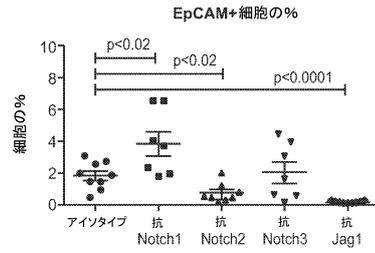
【 図 3 B 】



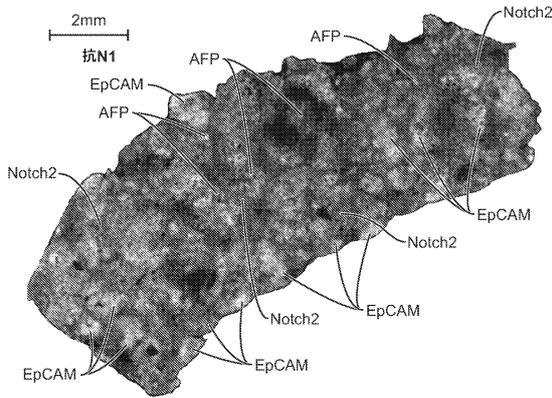
【 図 3 C 】



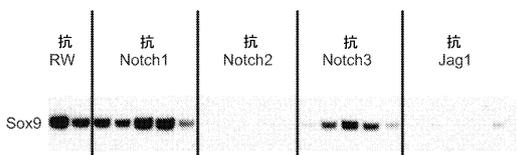
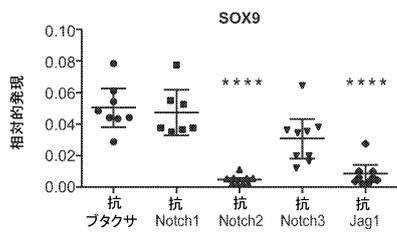
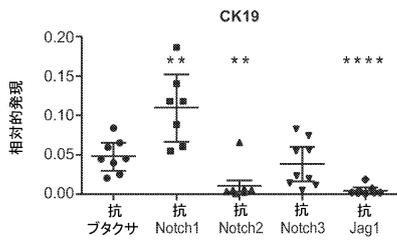
【 図 3 E 】



【 図 3 D 】

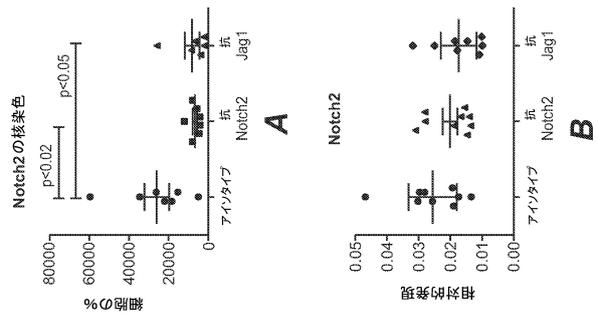


【 図 3 F - H 】

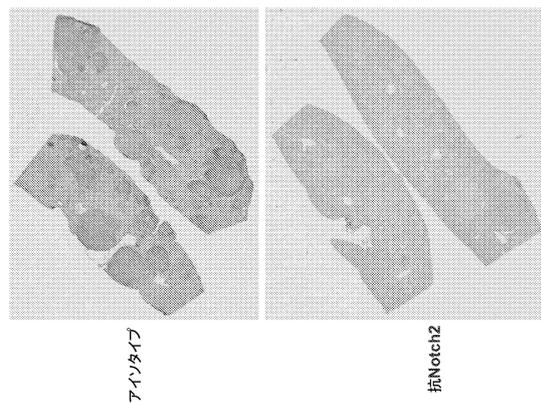


**H**

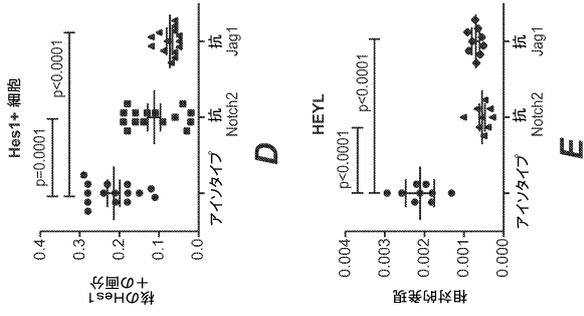
【 図 4 A - B 】



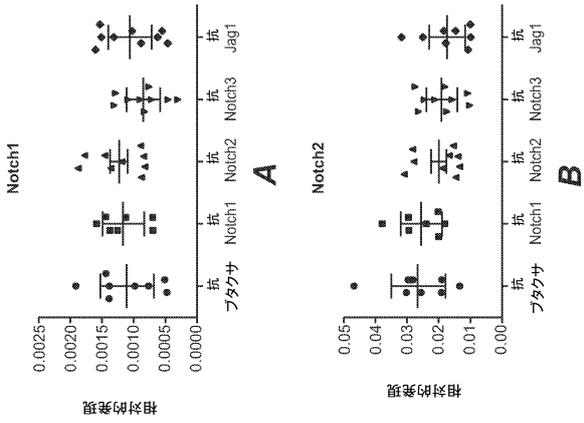
【 図 4 C 】



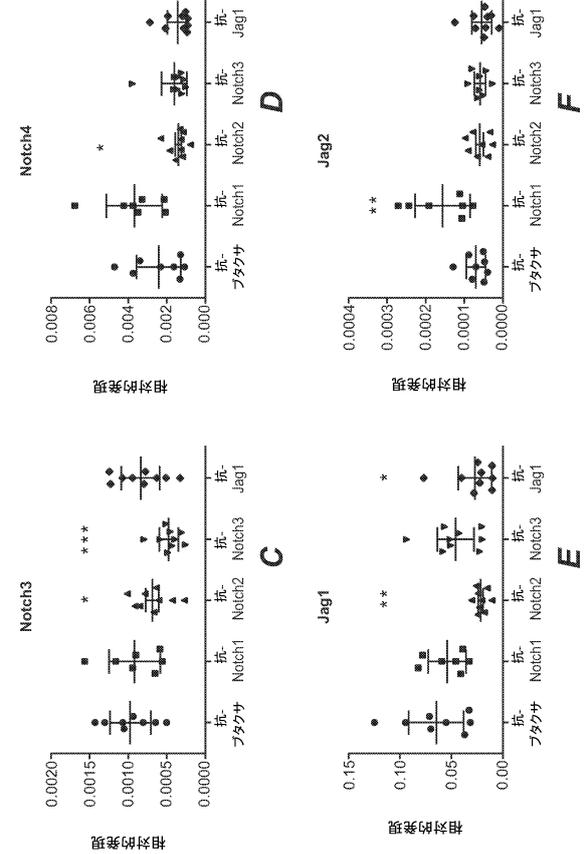
【図 4 D - E】



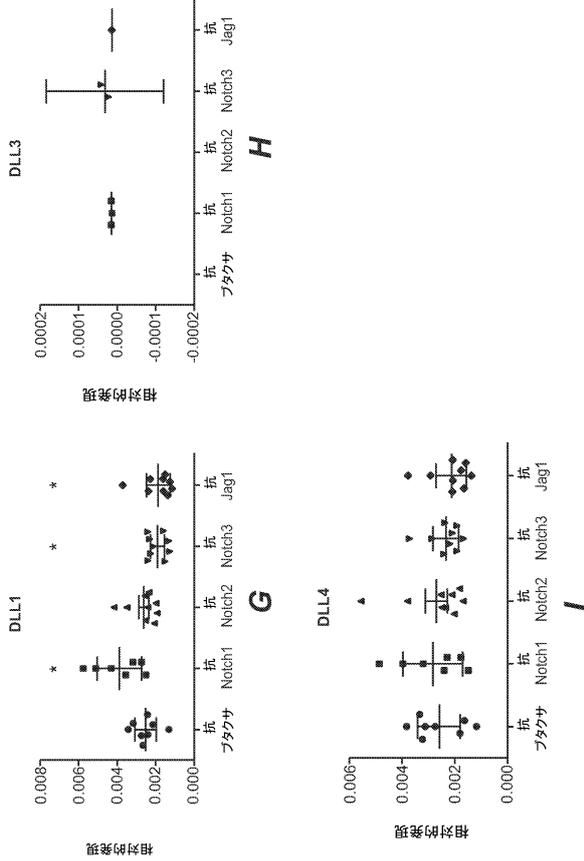
【図 5 A - B】



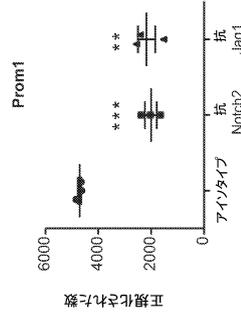
【図 5 C - F】



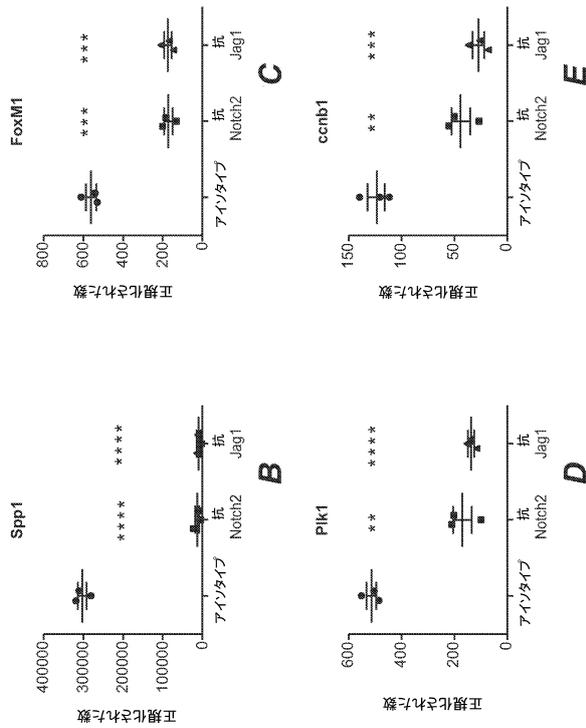
【図 5 G - I】



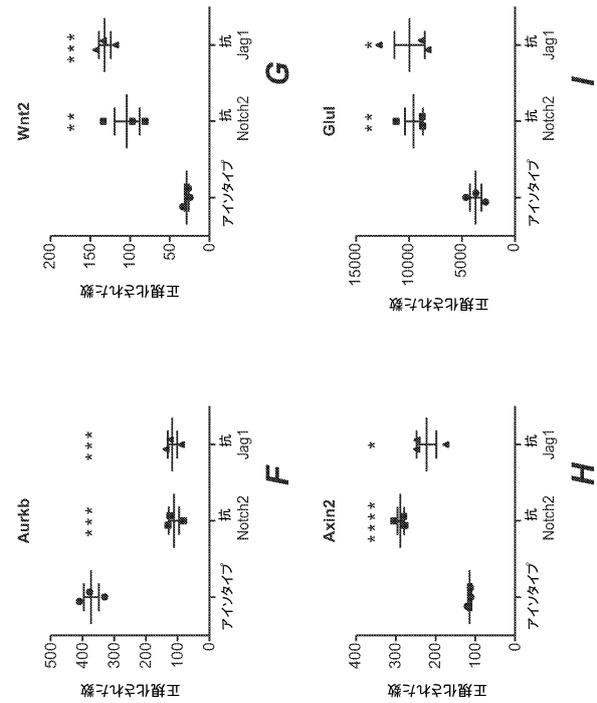
【図 6 A】



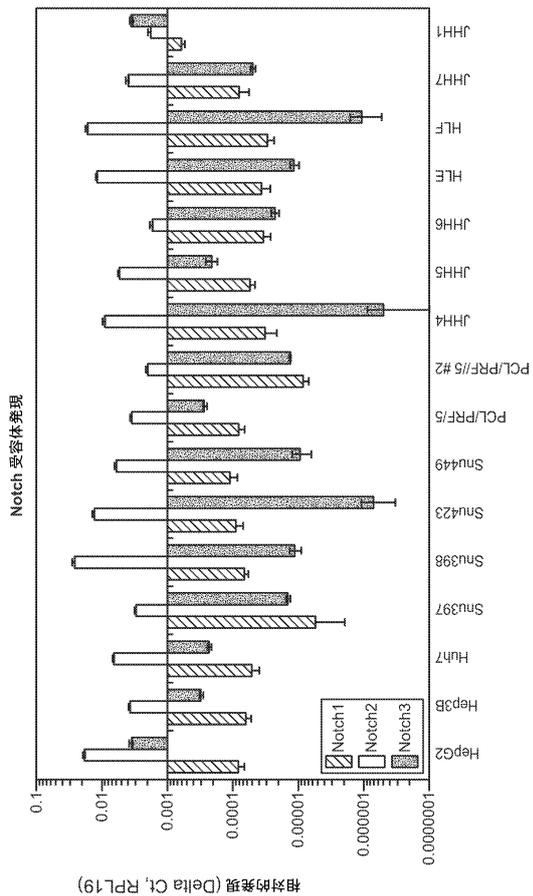
【 図 6 B - D 】



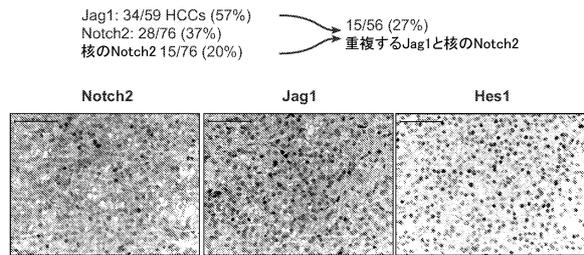
【 図 6 F - I 】



【 図 7 A 】



【 図 7 B 】



【 図 8 A - B 】

ヒト Notch2 NRR ( 配列番号: 73)

```
PATCLSQYCADKARDGVCDACNSHACQWDGGDCSLTMENPWANCSSPLPCWDYI
NQCDLNCNTAECLFDNFECQRNSKTKYDKYCADHFKNHCDQGCNSEECGWDL
LDCAADQPENLAEGTLIVVLLMPPEQLLQDARSFLRALGTLHTNLRIKRDSQGELMVY
PYYEKSAAAMKQRMRTRSLPGEQEQEVAGSKVFLRIDNRQCVDSDHCFKNTDAAA
AALLASHAIQGTLSYPLVSVVSESLTPERTQ
```

A

マウス Notch2 NRR ( 配列番号: 74)

```
PATCSQYCADKARDGICDEACNSHACQWDGGDCSLTMEDPWANCTSTLRCWEYIN
NQCDLNCNTAECLFDNFECQRNSKTKYDKYCADHFKNHCDQGCNSEECGWDL
DCASDQPENLAEGTLIVVLLPPEQLLQDARSFLRALGTLHTNLRIKRDSQGALMVVY
FGEKSAAAMKQRMRTRSLPEEQEQEVIGSKIIFLEIDNRQCVDSDQCFKNTDAAA
LLASHAIQGTLSYPLVSVFSELESPRNAQ
```

B

【 図 8 C 】

ヒト Notch2 ( 配列番号: 75)

MPALRFPALLWALLLWLLCAAPAHALQCRDGYEPCVNEGMCVTYHNGTGYCKPEGFLGEY
CQHRDPECKNRQNGGTCVVAOAMLGKATRCASGFTGEDCYQSTSHPCFVSRPCLNGGTC
HMLSRDTYECTCQVGFTRKQWTDACLSPHCANGSTCTTANQFSCKCLTGFQKCEITD
VNECDIPGHCQHGCTCLNLFPSYQCQCPQGFQYCDLSLVPCAPSPCVNGGTCRGTGDFE
FECNCLPGFEGSTCERNIDDCPNHCKQNGGVCVGVNTYNCRCPPQWTGQFCTEDVDECLL
QPACQNGGTCANRNGGYCVVNGWSGDDCSENIDDCAFASCTPGSTC IDRVAASFSCMCP
EGKAGLLCHLDDACISNPHKRGALCDTNPLNGQYICTCPQGYRGADCTEDVDECAMANSNPC
EHAGKCVNTDGAHFCECLKGYAGRCMDINECHSDPCQNDATCLDKIGGFTCLCMPGFKGV
HCELEINEQCNSPVCVNGQVDRVNRFCQLPPGFTGVCQIDIDDCSSPCLNGAKCIDHPN
GYEQCATGFTGVLCEENIDNCPDFCHHGQCDQDIDSYTCINCPYMGAIACSDQIDECYSSP
CLNDGRCIDLVNGYQCNCQPGTSGVNCENINFDDCASNPCIHGICMDGINRYSVCVSPGFTQGR
CNIDIDECASNPCKRGATCINGVNFRCICPEGPHHPSYQVNECLSNPCIHGNCCTGGLSGY
KCLCDAGWVGVNCEVDKNECLSNPCQNGGTCNDLVNRYRCKKGFKGYNCQVNIDECASN
PCLNQGTCFDDISYGTCHVCLPYTGKNCQTVLAPCSPNPNCEAAVCKESPNFESYTCCLCAPG
WQGRCTIDIDECSKPCMNHGLCHNTQGSYCECPGFGMDCEEDIDDCLANPCQNGGS
CMDGVNTPFSCCLLPGFTGDKQTDMNELSEPCRNNGTCSYVNSYTCCKQAGFDGVHCEN
NINECTESSCFNGGTCVGDINSFSLCPVGFSGFLHEINECSSHPCLNEGTCVLDGLTYRC
SCLPGYTKNCQTVLNLCSRSPCKNKGTVCQKKAESQCLCPSGWAGYCDVNVSDCIAASR
RCVLEVHLCHQSGVINCAGNTHYQCPLGYTGSYCEEQLDECASNPCQHGATCSDFIGGYRC
ECVFGYQVNCYEVDEBCNQPCQNGGTCIDLNVNFKCSCPPGTRGLLCEENIDDCARGPH
CLNGGQCMRIRGGYSCRLPGFAGERCEGIDINECLSNPCSESGSLDCIQLTNDLVLCVCSAFT
GRHCTFVDPVQMPCLNGGTCVAVSNMDFGICRCPGFGARCSQSSCQVVKRKGEOC
VHTASGPRCFSPRDCESGASSPCQHGSGCHPQRPYYSQCAPPFGSRSCELYTAPP
STPPATCLSQYCADKARDGVCDEACNSHACQWGDGDCSLTMEHPANCSPLPCWDYIINN
QCDELNTVECLFDNFECQNSKTKYDKYCADHFKNHCDQGCNSEECGWDGLDCAADQ
PENLAEGTIVVLMPEQLQDARSFLRALGTLTLNLRKIRDSQEGELMVYIYKGEAAMK
QRMTRRSLPGEQEQEVAGSKVLEIDNRQCVQSDHCKFNDAALASHAIQGLTSLVPLS
VVSESLTPERTQLLYLVAVVILFILLGVMIAKRRKRGSLWLPPEGTLRRDASNNKRRPEVQ
QDAVGLKNLSVQSEANLIGTGTSEHWVDEGPPKVKKAEDALLSEEDDPIRRRPTWQH
LEAADIRTPSLALTPQAEQVVDLVNVRGPDCTPLMLASLHGGSSDLDEDEDAEDSSA
NIITDLVYQASLQAQTDRTGEMALHLAARYSRADAARLADAGADANAQDNMGRCLHAAVA
ADAQGVFQILIRNRVTDLDARMNDGTTPLILAAARLAVEGMVAELINQADVNAVDDHGRKSLHW
AAAVNNEATLLEKNGANRDMQNKETPLFLAAREGYSAAKILLDHFANRDI TDHMDRLPR
DVARDRMHHDIVRLDEYVTPSPPTVLSALSPVICGPNRSLSLKHTPMGKSRSPAKST
MPTSLNLAKEAKDAGSRKSLSEKVLSESSVTLSPVDSLESPTHYVSDTSSPMITSPGIL
QASPNMLATAAPPAPVHAQHALSFLNHEMQPLAHGASTVLPVSVQLSHHHIVSPGSSGAG
SLSRHPVPPADWMNRMEVNETQYNEFMGMVLAPEGTHPIAQPSSRPEGKHITTPREPL
PPIVTFQLIPKGSIAQPAQAPQSQCTPPAAGPLPTMYQIPEMARLPSVAFPTAMMPQDQ
VAQTLIPAYHPPFASVGVKPTTSPQSHYASSNAERTPSHSHLQGEHPYLTSPSPESPDQWSS
SSPHASDSDWDTTSPITPGAGGGQGRGPTHMSEPHNNMQVYA

【 図 8 D 】

ヒト Notch2 ( 配列番号: 76)

MPDLRPAALRALWLLWLLCAGAPAHALQCRGGQEPVCNVEGTCVYHNGTGFRCPEGFLGEY
CQHRDPECKNRQNGGTCVPGMLGKATRCAPGFTGEDCYQSTSHPCFVSRPCLNGGTC
HMLSRDTYECTCQVGFTRKQWTDACLSPHCANGSTCTTANQFSCKCLTGFQKCEITD
VNECDIPGRCQHGCTCLNLPGSYRCQCGGFTGHCDSPIVVRGLPCVNGGTCRGTGDFLE
CNCLPGFEGSTCERNIDDCPNHCKQNGGVCVGVNTYNCRCPPQWTGQFCTEDVDECLLQ
NACQNGGTCNRRNGGYCVVNGWSGDDCSENIDDCAYASCTPGSTCIDRVAASFCLCPG
KAGLLCHLDDACISNPHKRGALCDTNPLNGQYICTCPQGYRGADCTEDVDECAMANSNPC
AGKCVNTDGAHFCECLKGYAGRCMDINECHSDPCQNDATCLDKIGGFTCLCMPGFKGVH
CELEINEQCNSPVCVNGQVDRVNRFCQLPPGFTGVCQIDIDDCSSPCLNGAKCIDHPN
YEQCATGFTGVLCEENIDNCPDPCHHGQCDQDIDSYTCINCPYMGAIACSDQIDECYSSP
CLNDGRCIDLVNGYQCNCQPGTSGVNCENINFDDCASNPCMHGVGVDGINRYSVCVSPGFTQGR
CNIDIDECASNPCKRGATCINDVNFRCICPEGPHHPSYQVNECLSNPCIHGNCCTGGLSGY
KCLCDAGWVGVNCEVDKNECLSNPCQNGGTCNVLNRYRCKKGFKGYNCQVNIDECASN
PCLNQGTCFDDISYGTCHVCLPYTGKNCQTVLAPCSPNPNCEAAVCKEAPNFESYTCCLCAPG
WQGRCTIDIDECSKPCMNHGLCHNTQGSYCECPGFGMDCEEDIDDCLANPCQNGGS
CMDGVNTPFSCCLLPGFTGDKQTDMNELSEPCRNNGTCSYVNSYTCCKQAGFDGVHCEN
NINECTESSCFNGGTCVGDINSFSLCPVGFSGFLHEINECSSHPCLNEGTCVLDGLTYRC
SCLPGYTKNCQTVLNLCSRSPCKNKGTVCQKKAESQCLCPSGWAGYCDVNVSDCIAASR
RCVLEVHLCHQSGVINCAGNTHYQCPLGYTGSYCEEQLDECASNPCQHGATCSDFIGGYRC
ECVFGYQVNCYEVDEBCNQPCQNGGTCIDLNVNFKCSCPPGTRGLLCEENIDDCARGPH
CLNGGQCMRIRGGYSCRLPGFAGERCEGIDINECLSNPCSESGSLDCIQLTNDLVLCVCSAFT
GRHCTFVDPVQMPCLNGGTCVAVSNMDFGICRCPGFGARCSQSSCQVVKRKGEOC
VHTASGPRCFSPRDCESGASSPCQHGSGCHPQRPYYSQCAPPFGSRSCELYTAPP
STPPATCLSQYCADKARDGVCDEACNSHACQWGDGDCSLTMEHPANCSPLPCWDYIINN
QCDELNTVECLFDNFECQNSKTKYDKYCADHFKNHCDQGCNSEECGWDGLDCAADQ
PENLAEGTIVVLMPEQLQDARSFLRALGTLTLNLRKIRDSQEGELMVYIYKGEAAMK
QRMTRRSLPGEQEQEVAGSKVLEIDNRQCVQSDHCKFNDAALASHAIQGLTSLVPLS
VVSESLTPERTQLLYLVAVVILFILLGVMIAKRRKRGSLWLPPEGTLRRDASNNKRRPEVQ
QDAVGLKNLSVQSEANLIGTGTSEHWVDEGPPKVKKAEDALLSEEDDPIRRRPTWQH
LEAADIRTPSLALTPQAEQVVDLVNVRGPDCTPLMLASLHGGSSDLDEDEDAEDSSA
NIITDLVYQASLQAQTDRTGEMALHLAARYSRADAARLADAGADANAQDNMGRCLHAAVA
ADAQGVFQILIRNRVTDLDARMNDGTTPLILAAARLAVEGMVAELINQADVNAVDDHGRKSLHW
AAAVNNEATLLEKNGANRDMQNKETPLFLAAREGYSAAKILLDHFANRDI TDHMDRLPR
DVARDRMHHDIVRLDEYVTPSPPTVLSALSPVICGPNRSLSLKHTPMGKSRSPAKST
MPTSLNLAKEAKDAGSRKSLSEKVLSESSVTLSPVDSLESPTHYVSDTSSPMITSPGIL
QASPNMLATAAPPAPVHAQHALSFLNHEMQPLAHGASTVLPVSVQLSHHHIVSPGSSGAG
SLSRHPVPPADWMNRMEVNETQYNEFMGMVLAPEGTHPIAQPSSRPEGKHITTPREPL
PPIVTFQLIPKGSIAQPAQAPQSQCTPPAAGPLPTMYQIPEMARLPSVAFPTAMMPQDQ
VAQTLIPAYHPPFASVGVKPTTSPQSHYASSNAERTPSHSHLQGEHPYLTSPSPESPDQWSS
SSPHASDSDWDTTSPITPGAGGGQGRGPTHMSEPHNNMQVYA

【 図 9 】

ヒト Jag1 ( 配列番号: 78)

MRSRPTRGRSRRPLSLLALLCALRAKVCASGQFELEILSMQNVNGLQNGNCCGGARN
PGDRKTRDECDTYFKVCLKEYQSRVTAGGPCSFSGSSTPVI GGNTFNLKASRGNDNRRI
VLPFFSAWPRS YTLLEAWDSSNDTIQPDSEIEKASHSGMINPSRQWTLKQNTGVAHFE
YQIRVTCDDHYGFGCNKFCRPRDDFFGHYACDQNGNKTCEMGWMPGECNRAICRQGCSP
KHGSKCLPGDCRCQYGNQGLYCDKCIHPHGVCHGICNEPWOQLCETNWWGQLCDKDLNYC
GTHQPCLNRCGTCSTNIDDCPNHCKQNGGTCIDLNVNFKCVCPPQWTGKTCQLDANCEEAKP
ECSPGWTGPTCSTNIDDCPNHCKQNGGTCIDLNVNFKCVCPPQWTGKTCQLDANCEEAKP
CVNAKSKNLIASYYCDCLPGWMMQNCIDINIDCLGQCQNDASCRDLVNGYRNICPPGYA
GDHGERDIDEASNPCLNGGHCQNEINRFQCLPTGFGSNLQCLDIDYCEPNPCQNGAQC
YNRASDYFCPCPEDEYEGKNCNHLKDHCRITTECEVIDSCTVAMASNDTPEGVRYISSNVCG
PHGCKSKSGGKFTCDNKGFTGTGYCHENINDCESNPNCRNGGTCIDGVNSYKICISDGE
GAYCETNIDDCSNPNCHNGGTCRDLVNDYCDCKNGWKGKTCNHRSDSQDEATCNGGTC
YDEGDAFKMCPGWEGTTCNIAARNSSCLPNPCHNGGTCVNVGSESFTCVCKEGWEGPICA
QNTNDCSPHPCYNSGTCVGDNDWYRCECAPGAGPDCRININECQSSPCAFGATCVDEN
GYRCVCPGHSAGKCEVSGRPCI THGVSIPDGAKWDDCNCQCLNGRVACSKVWCGPR
PCLLHKHSHNECPGSGQSCIPVLDQCFVPRCTGVGECRSSSLQPVKTKTSDSYQDNCAN
ITFTFNKEMMSPLTTEHICSELRNLNLIKNSVAEYSIYIACEPSANNEIHVAISAED
IRDDGNPKIETDKIIDLVSRRDGNSSLAAVAEVRVQRRLKNRTDFVPLLSVLTVA
WICCLVTAFYWCLRRKPKGSHTHSASEBNTNNVREQLNQIKNPIEKHGANTVPIKDYE
NKNSKMSKIRTHNSEVEEDMDKHQKARFAKQPAYTLVDREKPPNGTPTKHPNWNKQ
DNRDLESAQSLNRMEYIV

マウス Jag1 ( 配列番号: 79)

MRSRPTRGRSRRPLSLLALLCALRAKVCASGQFELEILSMQNVNGLQNGNCCGGVNR
PGDRKTRDECDTYFKVCLKEYQSRVTAGGPCSFSGSSTPVI GGNTFNLKASRGNDNRRI
VLPFFSAWPRS YTLLEAWDSSNDTIQPDSEIEKASHSGMINPSRQWTLKQNTGVAHFE
YQIRVTCDDHYGFGCNKFCRPRDDFFGHYACDQNGNKTCEMGWMPGDCNKAICRQGCSP
KHGSKCLPGDCRCQYGNQGLYCDKCIHPHGVCHGICNEPWOQLCETNWWGQLCDKDLNYC
GTHQPCLNRCGTCSTNIDDCPNHCKQNGGTCIDLNVNFKCVCPPQWTGKTCQLDANCEEAKP
CVNAKSKNLIASYYCDCLPGWMMQNCIDINIDCLGQCQNDASCRDLVNGYRNICPPGYA
GDHGERDIDEASNPCLNGGHCQNEINRFQCLPTGFGSNLQCLDIDYCEPNPCQNGAQC
YNRASDYFCPCPEDEYEGKNCNHLKDHCRITTECEVIDSCTVAMASNDTPEGVRYISSNVCG
PHGCKSKSGGKFTCDNKGFTGTGYCHENINDCESNPNCRNGGTCIDGVNSYKICISDGE
GAYCETNIDDCSNPNCHNGGTCRDLVNDYCDCKNGWKGKTCNHRSDSQDEATCNGGTC
YDEGDAFKMCPGWEGTTCNIAARNSSCLPNPCHNGGTCVNVGSESFTCVCKEGWEGPICA
QNTNDCSPHPCYNSGTCVGDNDWYRCECAPGAGPDCRININECQSSPCAFGATCVDEN
GYRCVCPGHSAGKCEVSGRPCI THGVSIPDGAKWDDCNCQCLNGRVACSKVWCGPR
PCLLHKHSHNECPGSGQSCIPVLDQCFVPRCTGVGECRSSSLQPVKTKTSDSYQDNCAN
ITFTFNKEMMSPLTTEHICSELRNLNLIKNSVAEYSIYIACEPSANNEIHVAISAED
IRDDGNPKIETDKIIDLVSRRDGNSSLAAVAEVRVQRRLKNRTDFVPLLSVLTVA
WICCLVTAFYWCLRRKPKGSHTHSASEBNTNNVREQLNQIKNPIEKHGANTVPIKDYE
NKNSKMSKIRTHNSEVEEDMDKHQKARFAKQPAYTLVDREKPPNGTPTKHPNWNKQ
DNRDLESAQSLNRMEYIV

【 図 10 A - B 】

マウス Jag1-DSL-EGF1-4の発現されたタンパク質 (マウス Jag1 抗原) ( 配列番号: 80)

ADLGSQFELEILSMQNVNGLQNGNCCGGVNRPGDRKTRDECDTYFKVCLKEYQSRVTAG
GPCSPGSGSTPVI GGNTFNLKASRGNDNRRI VLPFFSAWPRS YTLLEAWDSSNDTIQPDSEIE
KASHSGMINPSRQWTLKQNTGVAHFEYQIRVTCDDHYGFGCNKFCRPRDDFFGHYACDQNG
GNKTCEMGWMPGDCNKAICRQGCSPKHGSKCLPGDCRCQYGNQGLYCDKCIHPHGVCHGIC
NEPWOQLCETNWWGQLCDKDLNYC GTHQPCLNRCGTCSTNIDDCPNHCKQNGGTCIDLNVN
FKCVCPPQWTGKTCQLDANCEEAKP AEHAELSDPCHNRGSKETSLSGFECECSPGWTGPTCSTNID
DEFGLVPRGSGHHHHH

A

ヒト Jag1-DSL-EGF1-4の発現されたタンパク質 (ヒト Jag1 抗原) ( 配列番号: 82)

QFELEILSMQNVNGLQNGNCCGGARNPGDRKTRDECDTYFKVCLKEYQSRVTAGGPCSF
GSGSTPVI GGNTFNLKASRGNDNRRI VLPFFSAWPRS YTLLEAWDSSNDTIQPDSEIEKASH
SGMINPSRQWTLKQNTGVAHFEYQIRVTCDDHYGFGCNKFCRPRDDFFGHYACDQNGNKT
CEMGWMPGECNRAICRQGCSPKHGSKCLPGDCRCQYGNQGLYCDKCIHPHGVCHGICNEP
WOQLCETNWWGQLCDKDLNYC GTHQPCLNRCGTCSTNIDDCPNHCKQNGGTCIDLNVN
FKCVCPPQWTGPTCSTNIDDCPNHCKQNGGTCIDLNVNFKCVCPPQWTGPTCSTNID

B

【 図 11 】

ヒト分泌型ホスホタンパク質1 (SPP1) ( 配列番号: 29)

MRIVAVICFLGITCAIPVKQADSGSSEKQLYNYKPDVAWTLNPDPSQKQNLAPQNA
VSSEETNDFKQETLPSKSNESHDMDDDDDDHVDSDQSDSINDNSDDVDDTDDSHQS
DESHSDSEDELVDFTDLPATVEVFPVPTVDTYDGRGDSVYGLRKSXKFRFRPDIQ
YPDATDEDITSHMESLNGAYKAI PVQDLNAPSDDWSRGSYSYETSQDLDQSAETHSH
KQSRLYKRRKANDESNESDVIDSQELSKVSRFPHSHEFHSHEDMLVDPKSKEDKHLK
RISHELDSASSEVN



【 図 1 5 A 】

Kabat  
番号付付

配列番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
抗体B	D	I	Q	K	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C
抗体B-1	D	I	Q	K	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C
抗体B-2	D	I	Q	K	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C
抗体B-3	D	I	Q	K	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C

配列番号	24	25	26	27	27A	27B	27C	27D	27E	27F	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	
抗体B	R	A	S	Q	.	.	.	.	.	.	S	I	S	S	R	F	L	A	W	Y	Q	Q	K	P
抗体B-1	R	A	S	Q	.	.	.	.	.	.	S	N	R	R	F	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	
抗体B-2	R	A	S	Q	.	.	.	.	.	.	S	V	R	S	F	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	
抗体B-3	R	A	S	Q	.	.	.	.	.	.	N	I	K	R	F	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	

配列番号	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	54A	54B	54C	54D	54E	55	56	57	58
抗体B	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	G	A	S	R	.	.	.	.	.	.	A	S	G	V
抗体B-1	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	G	A	S	R	.	.	.	.	.	.	A	S	G	V
抗体B-2	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	G	A	S	R	.	.	.	.	.	.	A	S	G	V
抗体B-3	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	G	A	S	R	.	.	.	.	.	.	E	S	G	V

配列番号	59	60	61	62	63	64	65	66	66A	66B	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
抗体B	P	S	R	F	S	G	S	G	.	.	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P
抗体B-1	P	S	R	F	S	G	S	G	.	.	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P
抗体B-2	P	S	R	F	S	G	S	G	.	.	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P
抗体B-3	P	S	R	F	S	G	S	G	.	.	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P

【 図 1 5 B 】

Kabat  
番号付付

配列番号	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	95A	95B	95C	95D	95E	95F	96	97	
抗体B	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	Y	S	S	P	.	.	.	.	.	.	.	L	T
抗体B-1	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	Y	S	S	P	.	.	.	.	.	.	.	L	T
抗体B-2	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	Y	S	S	P	.	.	.	.	.	.	.	L	T
抗体B-3	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	Y	R	S	F	.	.	.	.	.	.	.	H	T

配列番号	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107
抗体B	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K
抗体B-1	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K
抗体B-2	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K
抗体B-3	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K

【 図 1 6 A 】

FR1	FR2	FR3	FR4
A OVOLVSGAENVKPPGASVKVSKRAS	WVROAEGQGLEWMG	-H1-	WGQGLTVVSS
B OVOLVSGAENVKPPGASVKVSKRAS	WVROAEGQGLEWMG	-H1-	WGQGLTVVSS
C OVOLVSGAENVKPPGASVKVSKRAS	WVROAEGQGLEWMG	-H1-	WGQGLTVVSS
D OVOLVSGAENVKPPGASVKVSKRAS	WVROAEGQGLEWMG	-H1-	WGQGLTVVSS

FR1	FR2	FR3	FR4
A OVOLVSGAENVKPPGASVKVSKRAS	WVROAEGQGLEWMG	-H2-	WGQGLTVVSS
B OVOLVSGAENVKPPGASVKVSKRAS	WVROAEGQGLEWMG	-H2-	WGQGLTVVSS
C OVOLVSGAENVKPPGASVKVSKRAS	WVROAEGQGLEWMG	-H2-	WGQGLTVVSS
D OVOLVSGAENVKPPGASVKVSKRAS	WVROAEGQGLEWMG	-H2-	WGQGLTVVSS

FR1	FR2	FR3	FR4
A OVOLVSGAENVKPPGASVKVSKRAS	WVROAEGQGLEWMG	-H3-	WGQGLTVVSS
B OVOLVSGAENVKPPGASVKVSKRAS	WVROAEGQGLEWMG	-H3-	WGQGLTVVSS
C OVOLVSGAENVKPPGASVKVSKRAS	WVROAEGQGLEWMG	-H3-	WGQGLTVVSS
D OVOLVSGAENVKPPGASVKVSKRAS	WVROAEGQGLEWMG	-H3-	WGQGLTVVSS

【 図 1 6 B 】

FR1, FR2, FR3, FR4 の配列番号
配列番号: 32, 33, 34, 35
配列番号: 36, 37, 38, 35
配列番号: 36, 37, 38, 35
配列番号: 36, 37, 39, 35

FR1, FR2, FR3, FR4 の配列番号
配列番号: 40, 41, 42, 35
配列番号: 43, 44, 42, 35
配列番号: 43, 44, 45, 35
配列番号: 43, 44, 46, 35

FR1, FR2, FR3, FR4 の配列番号
配列番号: 47, 48, 49, 35
配列番号: 50, 51, 49, 35
配列番号: 50, 51, 52, 35
配列番号: 50, 51, 53, 35

FR1, FR2, FR3, FR4 の配列番号
配列番号: 54, 48, 55, 35
配列番号: 50, 51, 55, 35
配列番号: 50, 51, 56, 35
配列番号: 50, 51, 56, 35

FR1, FR2, FR3, FR4 の配列番号
配列番号: 54, 48, 57, 35
配列番号: 50, 51, 57, 35
配列番号: 50, 51, 58, 35
配列番号: 50, 51, 59, 35



【 図 2 2 】

抗体A、A-1、A-2軽鎖可変ドメインのフレームワーク配列

LC-FR1 <sup>1</sup>Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp  
Arg Val Thr Ile Thr Cys<sup>23</sup>

LC-FR2 <sup>35</sup>Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr<sup>49</sup>

LC-FR3 <sup>57</sup>Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu  
Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr  
Tyr Cys<sup>88</sup>

LC-FR4 <sup>98</sup>Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg<sup>108</sup>

抗体A、A-1、A-2軽鎖可変ドメインのフレームワーク配列

HC-FR1 <sup>1</sup>Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser  
Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser<sup>25</sup>

HC-FR2 <sup>36</sup>Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly<sup>49</sup>

HC-FR3 <sup>66</sup>Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met  
Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
Ala Arg<sup>94</sup>

HC-FR4 <sup>103</sup>Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser<sup>113</sup>

【 図 2 3 A 】

抗体	軽鎖配列
抗-Notch2	D I Q M T Q S P S S L S A S V G G D R V T I T C
抗-Notch1	D I Q M T Q S P S S L S A S V G G D R V T I T C
抗-Notch3	D I Q M T Q S P S S L S A S V G G D R V T I T C
抗-Jag1	D I Q M T Q S P S S L S A S V G G D R V T I T C
	Kabab-CDR L1
抗-Notch2	R A S Q . . . . . N I K R F L A W Y Q Q K P G G
抗-Notch1	R A S Q . . . . . D V S T A V A W Y Q Q K P G G
抗-Notch3	R A S Q . . . . . G I S S Y V A W Y Q Q K P G G
抗-Jag1	R A S Q . . . . . D V S T A V A W Y Q Q K P G G
	Kabab-CDR L2
抗-Notch2	42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 54A 54B 54C 54D 54E 55 56 57 58 59
抗-Notch1	K A P K L L I Y G A S T R . . . . . E S G V P P
抗-Notch3	K A P K L L I Y S A S F L . . . . . Y S G V P P
抗-Jag1	K A P K L L I Y S A S F L . . . . . Y S G V P P
	Kabab-CDR L2
抗-Notch2	60 61 62 63 64 65 66 66A 66B 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81
抗-Notch1	S R F S G S G . . . S G T D F T L T I S S L Q P E E
抗-Notch3	S R F S G S G . . . S G T D F T L T I S S L Q P E E
抗-Jag1	S R F S G S G . . . S G T D F T L T I S S L Q P E E

【 図 2 3 B 】

抗体	軽鎖配列
抗-Notch2	82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 95A 95B 95C 95D 95E 95F 96 97 98 99
抗-Notch1	D F A T Y Y C Q Q Y Y R S P . . . . . H T F G G
抗-Notch3	D F A T Y Y C Q Q F Y T F P . . . . . S T F F G
抗-Jag1	D F A T Y Y C Q Q W N S Y P . . . . . F T F F G
	Kabab-CDR L3
抗-Notch2	100 101 102 103 104 105 106 107
抗-Notch1	Q G T K V E I K
抗-Notch3	Q G T K V E I K
抗-Jag1	Q G T K V E I K

【 図 2 4 A 】

抗体	重鎖配列
抗-Notch2	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23
抗-Notch1	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A
抗-Notch3	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A
抗-Jag1	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A
	Kabab-CDR H1
抗-Notch2	24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 35A 35B 36 37 38 39 41 41 42 43 44
抗-Notch1	A S G Y S F T S Y G M S . . W V R Q A P G K G
抗-Notch3	A S G F T F S N Y W I H . . W V R Q A P G K G
抗-Jag1	A S G F T F S N Y G I H . . W V R Q A P G K G
	Kabab-CDR H2
抗-Notch2	45 46 47 48 49 50 51 52 52A 52B 52C 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65
抗-Notch1	L E W V S Y I Y P . . Y S G A T Y Y A D S V X G
抗-Notch3	L E W V A R I N P . . P N R S N Q Y A D S V X G
抗-Jag1	L E W V G A I S S . . S G S T Y Y A D S V X G
	Kabab-CDR H2
抗-Notch2	66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 82A 82B 82C 83 84 85 86
抗-Notch1	R F T I S A D T S K N T A Y L Q M N S L R A E D
抗-Notch3	R F T I S R D N S K N T L V L Q M N S L R A E D
抗-Jag1	R F T I S A D T S K N T A Y L Q M N S L R A E D

【 2 4 B 】

重製配列

抗体

抗-Notch2  
 抗-Notch1  
 抗-Notch3  
 抗-Jag1

100R 100L 100R 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113

87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 100A 100B 100C 100D 100E 100F 100G 100H 100I 100J

T A V Y Y C A R H S G Y Y R I S S A . . . . .  
 T A V Y Y C A R G S G F R W V . . . . .  
 T A V Y Y C A R Q I Y R D . . . . .  
 T A V Y Y C A R A G S W . . . . .

. . M D V W G Q G T L V T V S S  
 . . M D V W G Q G T L V T V S S  
 . . M D V W G Q G T L V T V S S  
 . . P A Y W G Q G T L V T V S S

Kabat - CDR H3

【 2 5 A 】

Kabat# 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40

Chothia - CDR H1  
 接合 - CDR H1

A E V Q L V E S G G L V Q P G G S L R L S C A A S C E F E S N Y G I H W V R Q A  
 A-1 E V Q L V E S G G L V Q P G G S L R L S C A A S C E F E S N Y G I H W V R Q A  
 A-2 E V Q L V E S G G L V Q P G G S L R L S C A A S C E F E S N Y G I H W V R Q A

Kabat# 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 A B C 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78

Chothia - CDR H2  
 接合 - CDR H2

A P G K G L E W V G W I T P . . . D G G Y T D Y A D S V K G R R F F I S A D E S K N T A  
 A-1 P G K G L E W V G W I T P . . . D G G Y T D Y A D S V K G R R F F I S A D E S K N T A  
 A-2 P G K G L E W V G W I T G . . . N G C Y S D Y A D S V K G R R F F I S A D E S K N T A

Kabat# 79 80 81 82 A B C 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 A B C D E F G H K 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113

Chothia - CDR H3  
 接合 - CDR H3

A Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R A R A G S L . . . . . P A Y W G Q G T L V T V S S  
 A-1 Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R A R A G S L . . . . . P A Y W G Q G T L V T V S S  
 A-2 Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R A R A G S H . . . . . P A Y W G Q G T L V T V S S

配列番号: 93  
 配列番号: 94  
 配列番号: 95

【 2 5 B 】

Kabat# 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 A B C D E F 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37

Kabat - CDR L1  
 Chothia - CDR L1  
 接合 - CDR L1

A D I Q M E Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q . . . . . D V S T A V A W V Q  
 A-1 D I Q M E Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q . . . . . D V S T A V A W V Q  
 A-2 D I Q M E Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q . . . . . D V S T A V A W V Q

Kabat# 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80

Kabat - CDR L2  
 Chothia - CDR L2  
 接合 - CDR L2

A Q R P G K A P K L L I Y S A S P L Y S G V P S R F S G S S G T D P T L T I S S L Q P  
 A-1 Q R P G K A P K L L I Y S A S P L Y S G V P S R F S G S S G T D P T L T I S S L Q P  
 A-2 Q R P G K A P K L L I Y S A S P L Y S G V P S R F S G S S G T D P T L T I S S L Q P

Kabat# 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107

Kabat - CDR L3  
 Chothia - CDR L3  
 接合 - CDR L3

A E D P A T Y Y C C O C S Y T T P P F C G C T K V E I K  
 A-1 E D P A T Y Y C C O C S Y T T P P F C G C T K V E I K  
 A-2 E D P A T Y Y C C O C S Y T T P P F C G C T K V E I K

配列番号: 96  
 配列番号: 97  
 配列番号: 98

【配列表】

0006527132000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
C 0 7 K 16/30 (2006.01) C 0 7 K 16/30  
C 0 7 K 16/46 (2006.01) C 0 7 K 16/46

(72)発明者 シーベル, クリスチャン ダブリュ.  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー  
ウェイ 1, シー/オー ジェネンテック, インコーポレイテッド

審査官 鳥居 福代

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 1 / 0 6 3 2 3 7 (WO, A 2)  
特表 2 0 1 2 - 5 0 4 6 3 4 (JP, A)  
DILL, M.T. et al., "Constitutive Notch2 Signaling Induces Hepatic Tumors in Mice", Hep  
atology, 2 0 1 3 年 3 月 1 4 日, Vol.57, No.4, p.1607-1619  
Cancer Res., 2 0 0 8 年, Vol.68, No.5, pp.1451-1461  
LITTEN, J.B. et al., "Activated NOTCH2 is overexpressed in hepatoblastomas: an immunoh  
istochemical study.", Pediatr. Dev. Pathol., 2 0 1 1 年, Vol.14, No.5, p.378-383, ISSN  
:1093-5266

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
A 6 1 K 3 9 / 0 0 - 3 9 / 4 4  
A 6 1 K 4 5 / 0 0  
A 6 1 K 4 5 / 0 6  
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )  
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )