

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2012-501625

(P2012-501625A)

(43) 公表日 平成24年1月26日(2012.1.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C O 7 K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28	4 B O 6 4
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 O 2	4 B O 6 5
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 E	4 C O 8 4
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 T	4 C O 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 121 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2011-517416 (P2011-517416)	(71) 出願人	308031072
(86) (22) 出願日	平成21年7月8日 (2009.7.8)		オンコメッド ファーマシューティカルズ
(85) 翻訳文提出日	平成23年2月17日 (2011.2.17)		インコーポレイテッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2009/003994		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 レッ
(87) 国際公開番号	W02010/005566		ドウッドシティー チェサピーク ドライ
(87) 国際公開日	平成22年1月14日 (2010.1.14)		ブ 800
(31) 優先権主張番号	61/079,095	(74) 代理人	100102978
(32) 優先日	平成20年7月8日 (2008.7.8)		弁理士 清水 初志
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100102118
(31) 優先権主張番号	61/112,701		弁理士 春名 雅夫
(32) 優先日	平成20年11月7日 (2008.11.7)	(74) 代理人	100160923
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 山口 裕孝
(31) 優先権主張番号	61/112,699	(74) 代理人	100119507
(32) 優先日	平成20年11月7日 (2008.11.7)		弁理士 刑部 俊
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 NOTCH結合剤およびアンタゴニストならびにその使用方法

(57) 【要約】

本発明は、Notch結合剤およびNotchアンタゴニスト、ならびに癌などの疾患を治療するために剤および/またはアンタゴニストを使用する方法に関する。本発明は、Notch2および/またはNotch3などの1つまたは複数の種類のヒトNotch受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に特異的に結合し、かつ腫瘍成長を阻害する抗体を提供する。さらに、本発明は、ヒトNotch受容体タンパク質の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に特異的に結合し、かつ腫瘍成長を阻害する治療有効量の抗体を投与する工程を含む、癌を治療する方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒトNotch2のEGF反復10に特異的に結合する、ヒトNotch2の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に特異的に結合する単離された抗体。

【請求項 2】

ヒトNotch2のアンタゴニストである、請求項1記載の抗体。

【請求項 3】

リガンドのヒトNotch2への結合を阻害する、請求項2記載の抗体。

【請求項 4】

リガンドが、DLL4、JAG1、および/またはJAG2である、請求項3記載の抗体。 10

【請求項 5】

ヒトNotch2のシグナル伝達を阻害する、請求項2～4のいずれか一項記載の抗体。

【請求項 6】

K_D が約1nMまたはそれ以下でヒトNotch2に結合する、請求項1～5のいずれか一項記載の抗体。

【請求項 7】

EGF反復10の外側にあるどのヒトNotch2領域にも結合しない、請求項1～6のいずれか一項記載の抗体。

【請求項 8】

Notch2のEGF反復10の中にある配列HKGAL(SEQ ID NO:28)の少なくとも一部に結合する、請求項1～7のいずれか一項記載の抗体。 20

【請求項 9】

さらに、少なくとも1つのさらなるヒトNotch受容体に特異的に結合する、請求項1～8のいずれか一項記載の抗体。

【請求項 10】

ヒトNotch2およびさらなるヒトNotch受容体の両方の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に結合する抗原結合部位を含む、請求項9記載の抗体。

【請求項 11】

さらなるヒトNotch受容体がヒトNotch3である、請求項10記載の抗体。

【請求項 12】

さらに、ヒトNotch3の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に特異的に結合し、ヒトNotch3のEGF反復9に特異的に結合する、請求項1～8のいずれか一項記載の抗体。 30

【請求項 13】

ヒトNotch3のEGF反復9およびNotch2のEGF反復10の両方に結合する抗原結合部位を含む、請求項12記載の抗体。

【請求項 14】

ヒトNotch3のアンタゴニストである、請求項12または13記載の抗体。

【請求項 15】

リガンドのヒトNotch3への結合を阻害する、請求項14記載の抗体。

【請求項 16】

リガンドが、DLL4、JAG1、および/またはJAG2である、請求項15記載の抗体。 40

【請求項 17】

ヒトNotch3のシグナル伝達を阻害する、請求項14～16のいずれか一項記載の抗体。

【請求項 18】

K_D が約1nMまたはそれ以下でヒトNotch3に結合する、請求項12～17のいずれか一項記載の抗体。

【請求項 19】

EGF反復9の外側にあるどのヒトNotch3領域にも結合しない、請求項12～18のいずれか一項記載の抗体。

【請求項 20】

ヒトNotch3のEGF反復9に特異的に結合する、ヒトNotch3の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に特異的に結合する単離された抗体。

【請求項 2 1】

ヒトNotch3のアンタゴニストである、請求項20記載の抗体。

【請求項 2 2】

リガンドのヒトNotch3への結合を阻害する、請求項21記載の抗体。

【請求項 2 3】

リガンドが、DLL4、JAG1、および/またはJAG2である、請求項22記載の抗体。

【請求項 2 4】

ヒトNotch3のシグナル伝達を阻害する、請求項21～23のいずれか一項記載の抗体。 10

【請求項 2 5】

K_D が約1nMまたはそれ以下でヒトNotch3に結合する、請求項20～24のいずれか一項記載の抗体。

【請求項 2 6】

EGF反復9の外側にあるどのヒトNotch3領域にも結合しない、請求項20～25のいずれか一項記載の抗体。

【請求項 2 7】

Notch3のEGF反復9の内側にある配列HEDA1 (SEQ ID NO:29)の少なくとも一部に結合する、請求項20～26のいずれか一項記載の抗体。

【請求項 2 8】

さらに、少なくとも1つのさらなるヒトNotch受容体のEGF反復10に特異的に結合する、請求項20～27のいずれか一項記載の抗体。 20

【請求項 2 9】

ヒトNotch3およびさらなるヒトNotch受容体の両方の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に結合する抗原結合部位を含む、請求項28記載の抗体。

【請求項 3 0】

ATCCに59R1またはPTA-9547として寄託されたポリヌクレオチドによってコードされる抗体。

【請求項 3 1】

ヒトNotch2および/またはNotch3に特異的に結合する抗体であって、以下を含む、抗体：
(a)SSSGMS (SEQ ID NO:5)を含む重鎖CDR1、または1個、2個、3個、もしくは4個の保存的アミノ酸置換を含む、その変種；

(b)

VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6)

を含む重鎖CDR2、または1個、2個、3個、もしくは4個の保存的アミノ酸置換を含む、その変種；および

(c)SIFYTT (SEQ ID NO:51)もしくはGIFFAI (SEQ ID NO:7)のいずれかを含む重鎖CDR3、または1個、2個、3個、もしくは4個の保存的アミノ酸置換を含む、その変種。

【請求項 3 2】

重鎖CDR1がSSSGMS (SEQ ID NO:5)を含み、重鎖CDR2が

VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6)

を含み、かつ重鎖CDR3がSIFYTT (SEQ ID NO:51)を含む、請求項31記載の抗体。

【請求項 3 3】

ヒトNotch2および/またはNotch3に特異的に結合する抗体であって、以下を含む、抗体：
SSSGMS (SEQ ID NO:5)を含む重鎖CDR1、

VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6)

を含む重鎖CDR2、および

10

20

30

40

50

(G/S)(I/S)F(F/Y)(A/P)(I/T/S/N) (SEQ ID NO:30)

を含む重鎖CDR3。

【請求項 3 4】

重鎖CDR3が、
GIFFAI (SEQ ID NO:7), SIFYPT (SEQ ID NO:22), SSFFAS (SEQ ID NO:23), SSFYAS (SEQ ID NO:24), SSFFAT (SEQ ID NO:25), SIFYPS (SEQ ID NO:26), および SSFFAN (SEQ ID NO:27)

からなる群より選択される、請求項33記載の抗体。

【請求項 3 5】

(a)

RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO: 8)

を含む軽鎖CDR1、または1個、2個、3個、もしくは4個の保存的アミノ酸置換を含む、その変種；

(b) GASSRAT (SEQ ID NO:9) を含む軽鎖CDR2、または1個、2個、3個、もしくは4個の保存的アミノ酸置換を含む、その変種；および

(c) QQYSNFPI (SEQ ID NO:10) を含む軽鎖CDR3、または1個、2個、3個、もしくは4個の保存的アミノ酸置換を含む、その変種

をさらに含む、請求項31～34のいずれか一項記載の抗体。

【請求項 3 6】

軽鎖CDR1が、

RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO: 8)

を含み、軽鎖CDR2がGASSRAT (SEQ ID NO:9) を含み、かつ/または軽鎖CDR3がQQYSNFPI (SEQ ID NO:10) を含む、請求項35記載の抗体。

【請求項 3 7】

ヒトNotch2および/またはNotch3の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に特異的に結合する抗体であって、以下を含む、抗体：

(a) SSSGMS (SEQ ID NO:5) を含む重鎖CDR1、

VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6)

を含む重鎖CDR2、およびSIFYTT (SEQ ID NO:51) もしくはGIFFAI (SEQ ID NO:7) を含む重鎖CDR3；ならびに/または

(b)

RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:8)

を含む軽鎖CDR1、GASSRAT (SEQ ID NO:9) を含む軽鎖CDR2、およびQQYSNFPI (SEQ ID NO:10) を含む軽鎖CDR3。

【請求項 3 8】

(a) SSSGMS (SEQ ID NO:5) を含む重鎖CDR1、

VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6)

を含む重鎖CDR2、およびSIFYTT (SEQ ID NO:51) を含む重鎖CDR3；ならびに

(b)

RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:8)

を含む軽鎖CDR1、GASSRAT (SEQ ID NO:9) を含む軽鎖CDR2、およびQQYSNFPI (SEQ ID NO:10) を含む軽鎖CDR3

を含む、請求項37記載の抗体。

10

20

30

40

50

【請求項 39】

(a)SSSGMS(SEQ ID NO:5)を含む重鎖CDR1、
VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6)

を含む重鎖CDR2、およびGIFFAI (SEQ ID NO:7)を含む重鎖CDR3;ならびに

(b)

RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:8)

を含む軽鎖CDR1、GASSRAT(SEQ ID NO:9)を含む軽鎖CDR2、およびQQYSNFP1 (SEQ ID NO:10)
を含む軽鎖CDR3

10

を含む、請求項37記載の抗体。

【請求項 40】

ヒトNotch2および/またはNotch3に特異的に結合する抗体であって、以下を含む、抗体：
(a)SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:14、もしくはSEQ ID NO:20と少なくとも約90%の配列同一性を有する重鎖可変領域;および/または

(b)SEQ ID NO:13またはSEQ ID NO:19と少なくとも約90%の配列同一性を有する重鎖可変領域。

【請求項 41】

(a)SEQ ID NO:50もしくはSEQ ID NO:14と少なくとも約95%の配列同一性を有する重鎖可変領域;および/または

20

(b)SEQ ID NO:13と少なくとも約95%の配列同一性を有する軽鎖可変領域

を含む、請求項40記載の抗体。

【請求項 42】

(a)SEQ ID NO:50を含む重鎖可変領域;および/または

(b)SEQ ID NO:13を含む軽鎖可変領域

を含む、請求項41記載の抗体。

【請求項 43】

(a)SEQ ID NO:14を含むポリペプチド;および/または

(b)SEQ ID NO:13を含むポリペプチド

を含む、請求項41記載の抗体。

30

【請求項 44】

ヒトNotch2に特異的に結合する、請求項31~43のいずれか一項記載の抗体。

【請求項 45】

さらに、ヒトNotch3に特異的に結合する、請求項44記載の抗体。

【請求項 46】

ヒトNotch2のEGF反復10および/またはヒトNotch3のEGF反復9に結合する、請求項31~43のいずれか一項記載の抗体。

【請求項 47】

請求項30~43のいずれか一項記載の抗体とヒトNotch2および/またはNotch3との特異的結合において競合する、単離された抗体。

40

【請求項 48】

ヒトNotch2および/またはNotch3のアンタゴニストである、請求項30~43のいずれか一項記載の抗体。

【請求項 49】

2種類またはそれ以上のヒトNotch受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に特異的に結合する単離された抗体であって、2種類またはそれ以上のヒトNotch受容体が、Notch2、Notch1、またはNotch4を含む場合、抗体はNotch2、Notch1、またはNotch4のEGF10に特異的に結合し、かつ2種類またはそれ以上のヒトNotch受容体がNotch3を含む場合、抗体はNotch3のEGF9に結合する、抗体。

【請求項 50】

50

2種類またはそれ以上のヒトNotch受容体のアンタゴニストである、請求項49記載の抗体。

【請求項51】

2種類またはそれ以上のヒトNotch受容体がNotch1およびNotch4の両方を含む、請求項49または50記載の抗体。

【請求項52】

腫瘍成長を阻害する、請求項1～51のいずれか一項記載の抗体。

【請求項53】

組換え抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、または抗体断片である、請求項1～52のいずれか一項記載の抗体。

10

【請求項54】

二重特異性抗体である、請求項1～53のいずれか一項記載の抗体。

【請求項55】

単一特異性抗体である、請求項1～53のいずれか一項記載の抗体。

【請求項56】

IgG1またはIgG2抗体である、請求項1～55のいずれか一項記載の抗体。

【請求項57】

請求項1～56のいずれか一項記載の抗体を含む、または請求項1～56のいずれか一項記載の抗体を産生する、細胞。

【請求項58】

請求項1～56のいずれか一項記載の抗体を含む、薬学的組成物。

20

【請求項59】

細胞と、有効量の請求項11～43、45～48、または52～56のいずれか一項記載の抗体とを接触させる工程を含む、細胞におけるNotch3シグナル伝達を阻害する方法。

【請求項60】

細胞と、有効量の請求項1～19、30～48、または52～56のいずれか一項記載の抗体とを接触させる工程を含む、細胞におけるNotch2シグナル伝達を阻害する方法。

【請求項61】

有効量の請求項1～48または52～56のいずれか一項記載の抗体を被験体に投与する工程を含む、被験体における血管形成を阻害する方法。

30

【請求項62】

周皮細胞および/または血管平滑筋細胞の機能を調整することによって、血管形成を阻害する方法である、請求項61記載の方法。

【請求項63】

血管形成が腫瘍血管形成である、請求項61または62記載の方法。

【請求項64】

有効量の請求項1～56のいずれか一項記載の抗体を被験体に投与する工程を含む、被験体における腫瘍成長を阻害する方法。

【請求項65】

有効量の請求項1～56のいずれか一項記載の抗体を被験体に投与する工程を含む、被験体における腫瘍の腫瘍形成能を低下させる方法。

40

【請求項66】

腫瘍内の癌幹細胞の頻度を低下させる、請求項65記載の方法。

【請求項67】

腫瘍が、結腸直腸腫瘍、乳房腫瘍、膵臓腫瘍、または黒色腫である、請求項64、65、または66記載の方法。

【請求項68】

有効量の請求項1～48または52～56のいずれか一項記載の抗体を被験体に投与する工程を含む、被験体における血管形成関連疾患を治療する方法。

【請求項69】

50

有効量の請求項1～56のいずれか一項記載の抗体を被験体に投与する工程を含む、被験体における癌を治療する方法。

【請求項70】

癌が、結腸直腸癌、乳癌、膵臓癌、または黒色腫である、請求項69記載の方法。

【請求項71】

治療有効量の第2の剤を被験体に投与する工程をさらに含み、該第2の剤が抗癌剤および/または抗血管形成剤である、請求項61～70のいずれか一項記載の方法。

【請求項72】

第2の剤が化学療法剤である、請求項71記載の方法。

【請求項73】

化学療法剤が、パクリタキセル、ゲムシタピン、またはイリノテカンである、請求項72記載の方法。

【請求項74】

第2の剤が血管内皮細胞増殖因子(VEGF)のアンタゴニストまたはVEGF受容体のアンタゴニストである、請求項71記載の方法。

【請求項75】

第2の剤が抗DLL4抗体である、請求項71記載の方法。

【請求項76】

被験体がヒトである、請求項61～75のいずれか一項記載の方法。

【請求項77】

SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、およびSEQ ID NO:49からなる群より選択される配列を含む、ポリペプチド。

【請求項78】

請求項77記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む、ポリヌクレオチド。

【請求項79】

SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:15、およびSEQ ID NO:17からなる群より選択される配列を含む、ポリヌクレオチド。

【請求項80】

ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:59、またはSEQ ID NO:60の配列を有するポリヌクレオチドにハイブリダイズする、ポリヌクレオチド。

【請求項81】

請求項78～80のいずれか一項記載のポリヌクレオチドを含む、ベクター。

【請求項82】

ヒトNotch2および/またはNotch3のアンタゴニストの有効量を被験体に投与する工程を含む、被験体において血管形成を阻害する方法。

【請求項83】

周皮細胞および/または血管平滑筋細胞の機能を調整することによって、血管形成を阻害する方法である、請求項82記載の方法。

【請求項84】

血管形成が腫瘍血管形成である、請求項82または83記載の方法。

【請求項85】

アンタゴニストが抗体である、請求項82～84のいずれか一項記載の方法。

【請求項86】

アンタゴニストが抗体でない、請求項82～84のいずれか一項記載の方法。

【請求項87】

アンタゴニストがヒトNotch3アンタゴニストである、請求項82～86のいずれか一項記載

10

20

30

40

50

の方法。

【請求項 88】

アンタゴニストがヒトNotch2アンタゴニストでもある、請求項87記載の方法。

【請求項 89】

血管内皮細胞増殖因子(VEGF)のアンタゴニストまたはVEGF受容体のアンタゴニストを被験体に投与する工程をさらに含む、請求項82～88のいずれか一項記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

10

本発明は、ヒトNotch受容体に結合する剤を含む組成物、ならびに癌および他の疾患を治療するために、これらの組成物を使用する方法に関する。さらに具体的には、本発明は、例えば、ヒトNotch受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に特異的に結合し、腫瘍成長を阻害する抗体を提供する。さらに、本発明は、ヒトNotch受容体タンパク質の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に特異的に結合し、腫瘍成長を阻害する治療有効量の抗体を投与する工程を含む、癌を治療する方法を提供する。

【背景技術】

【0002】

背景

20

Notchシグナル伝達経路は、胚パターン形成、後胚期組織の維持、および幹細胞生物学のいくつかの重要な調節因子の1つである。具体的には、Notchシグナル伝達は、隣接する細胞運命の側方抑制プロセスに関与し、非対称細胞分裂間の細胞運命の決定において重要な役割を果たしている。無秩序なNotchシグナル伝達は非常に多くのヒト癌と関連しており、腫瘍細胞の発生運命を変えて、腫瘍細胞を未分化で増殖性の状態に維持することができる(Brennan and Brown, 2003, Breast Cancer Res. 5:69)。従って、発癌は、幹細胞集団による正常発生および組織修復を制御するホメオスタシス機構に取って代わることで進行することができる(Beachy et al., 2004, Nature 432:324)。

【0003】

Notch受容体は、ハプロ不全では羽根の縁に切れ目を生じるのに対して、機能喪失すると、表皮細胞が運命を神経組織に変える、胚致死性「神経」表現型が現われるショウジョウバエ(*Drosophila*)変異体において最初に同定された(Moohr, 1919, Genet. 4:252; Poulson, 1937, PNAS 23:133; Poulson, 1940, J. Exp. Zool. 83:271)。Notch受容体は、大きな細胞外ドメインの中に非常に多くの上皮細胞成長因子(EGF)様縦列反復および3つのシステインリッチNotch/LIN-12反復を含有する1回膜貫通受容体である(Wharton et al., 1985, Cell 43:567; Kidd et al., 1986, Mol. Cell Biol. 6:3094; Artavanis et al., 1999, Science 284:770において概説)。4つの哺乳動物Notchタンパク質(Notch1、Notch2、Notch3、およびNotch4)が同定されており、これらの受容体の中に変異があると、発生異常、および下記で詳述するいくつかの癌を含むヒト疾患が必ず現われる(Gridley, 1997, Mol. Cell Neurosci. 9:103; Joutel & Tournier-Lasserre, 1998, Semin. Cell Dev. Biol. 9:619-25)。

30

40

【0004】

Notch受容体は、Delta、Serrated、Lag-2(DSL)ファミリーの1回膜貫通りリガンドによって活性化される。哺乳動物には5つの公知のNotchリガンド:Delta-like 1(DLL1)、Delta-like 3(DLL3)、Delta-like 4(DLL4)、Jagged1(JAG1)、およびJagged2(JAG2)があり、細胞外ドメイン内のDSLドメインおよびEGF様縦列反復を特徴とする。Notch受容体の細胞外ドメインがリガンドの細胞外ドメインと、典型的には隣接細胞上にあるリガンドの細胞外ドメインと相互作用すると、Notchは2回タンパク質分解切断される。1回は、ADAM(A Disintegrin And Metalloproteinase)プロテアーゼによって媒介される細胞外切断であり、1回は、セクレターゼによって媒介される膜貫通ドメイン内での切断である。この後者の切断によってNotch細胞内ドメイン(ICD)が生じ、次いで、ICDは核に入って、Hairy and Enhan

50

cer of Split[E(sp1)]の核塩基性ヘリックス-ループ-ヘリックス転写因子ファミリーの転写を増大させる主要な下流エフェクターとして、CBF1、Suppressor of Hairless[Su(H)]、Lag-2(CSL)の転写因子ファミリーを活性化する(Artavanis et al., 1999, Science 284:770; Brennan and Brown, 2003, Breast Cancer Res. 5:69; Iso et al., 2003, Arterioscler. Thromb. Vase. Biol. 23:543)。ショウジョウバエにおいて同定された細胞質タンパク質Deltexが関与する別の細胞内経路も哺乳動物に存在する場合があります(Martinez et al., 2002, Curr. Opin. Genet. Dev. 12:524-33)、このDeltex依存性経路はWnt標的遺伝子の発現を抑制するように作用する可能性がある(Brennan et al., 1999, Curr. Biol. 9:707-710; Lawrence et al., 2001, Curr. Biol. 11:375-85)。

【 0 0 0 5 】

哺乳動物Notch受容体は切断されて成熟受容体を形成し、また、リガンド結合後に下流シグナル伝達を活性化する。フューリン様プロテアーゼがNotch受容体を成熟の間に切断して、非共有結合した細胞外サブユニットおよび膜貫通サブユニットと一緒に自己抑制状態に保たれている膜近傍ヘテロ二量体を生じる。リガンドが結合すると、この障害は緩和し、ADAM型メタロプロテアーゼおよび -セクレターゼによってNotch受容体の切断が誘導される。後者は細胞内ドメイン(ICD)を細胞質に放出し、細胞内ドメイン(ICD)は核に移動して遺伝子転写を活性化する。ADAMによる切断は、膜の近くにある負の調節領域内の非リガンド結合切断ドメイン内で起こる。

【 0 0 0 6 】

造血幹細胞(HSC)は、体内にある最もよく理解されている幹細胞であり、Notchシグナル伝達は、造血幹細胞の正常な維持および白血病形質転換の両方に結びつけられている(Kopper & Hajdu, 2004, Pathol. Oncol. Res. 10:69-73)。HSCは、成体骨髄内の間質ニッチに存在する希少な細胞集団である。これらの細胞は、独特の遺伝子発現プロファイルと、より分化した前駆細胞を絶えず生じて造血系全体を再構成する能力の両方を特徴とする。HSCおよび前駆細胞におけるNotch1シグナル伝達が構成的に活性化されると、インビトロおよび長期再構成アッセイでリンパ系細胞および骨髄系細胞の両方を産生する不死化細胞株が樹立し(Varnum-Finney et al., 2000, Nat. Med. 6:1278-81)、Jagged1が存在すると、HSCが豊富なヒト骨髄細胞集団の生着が増大する(Karanu et al., 2000, J. Exp. Med. 192:1365-72)。さらに最近では、Notchシグナル伝達はインビボのHSCにおいて実証され、HSCの分化の障害に関与することが示された。さらに、Notchシグナル伝達はWnt介在性のHSC自己複製に必要と思われる(Duncan et al., 2005, Nat. Immunol. 6:314)。

【 0 0 0 7 】

Notchシグナル伝達経路はまた神経幹細胞の維持にも中心的な役割を果たしており、神経幹細胞の正常維持ならびに脳癌に結びつけられている(Kopper & Hajdu, 2004, Pathol. Oncol. Res. 10:69-73; Purow et al., 2005, Cancer Res. 65:2353-63; Hallahan et al., 2004, Cancer Res. 64:7794-800)。神経幹細胞は、発生中に哺乳動物神経系の全てのニューロン細胞およびグリア細胞を生じ、さらに最近では成体の脳において特定された(Gage, 2000, Science 287:1433-8)。Notch1 ; Notch標的遺伝子であるHes1、Hes3、およびHes5 ; ならびにNotchシグナル伝達の調節因子であるプレセニン1(PS1)を欠損したマウスは胚性神経幹細胞数が減少している。さらに、成体神経幹細胞はPS1ヘテロ接合性マウスの脳では減少している(Nakamura et al., 2000, J. Neurosci. 20:283-93; Hitoshi et al., 2002, Genes Dev. 16:846-58)。神経幹細胞の減少は、これらの細胞がニューロンに時期尚早に分化した結果と思われる(Hatakeyama et al., 2004, Dev. 131:5539-50)、Notchシグナル伝達が神経幹細胞の分化と自己複製を調節することを示唆している。

【 0 0 0 8 】

異常なNotchシグナル伝達は多くのヒト癌に結びつけられている。ヒトのNotch1遺伝子は、Notch経路を活性化する転座遺伝子座としてT細胞急性リンパ芽球性白血病の一部において最初に特定された(Ellisen et al., 1991, Cell 66:649-61)。マウスモデルでも同様に、T細胞におけるNotch1シグナル伝達の構成的活性化によってT細胞リンパ腫が発生し、原因としての役割を果たすことを示唆している(Robey et al., 1996, Cell 87:483-92; P

10

20

30

40

50

ear et al., 1996, *J. Exp. Med.* 183:2283-91; Yan et al., 2001, *Blood* 98:3793-9; Bellavia et al., 2000, *EMBO J.* 19:3337-48)。異常なNotch1シグナル伝達を発生するNotch1点変異、挿入、および欠失はまた、小児および成人のT細胞急性リンパ芽球性白血病/リンパ腫の両方に頻繁に存在することも見出されている(Pear & Aster, 2004, *Curr. Opin. Hematol.* 11:416-33)。

【 0 0 0 9 】

乳房腫瘍においてマウス乳癌ウイルスがNotch1遺伝子座およびNotch4遺伝子座の両方に頻繁に入り込み、結果として活性化Notchタンパク質断片が生じることで、Notchシグナル伝達が乳癌に初めて結び付けられた(Gallahan & Callahan, 1987, *J. Virol.* 61:66-74; Brennan & Brown, 2003, *Breast Cancer Res.* 5:69; Politi et al., 2004, *Semin. Cancer Biol.* 14:341-7)。トランスジェニックマウスにおけるさらなる研究から、Notchが正常乳腺発生中の管の分岐において役割を果たし、構成的活性型Notch4が乳腺上皮細胞における上皮分化を阻害し、腫瘍形成をもたらすことが確かめられた(Jhappan et al., 1992, *Genes & Dev.* 6:345-55; Gallahan et al., 1996, *Cancer Res.* 56:1775-85; Smith et al., 1995, *Cell Growth Differ.* 6:563-77; Soriano et al., 2000, *Int. J. Cancer* 86:652-9; Uyttendaele et al., 1998, *Dev. Biol.* 196:204-17; Politi et al., 2004, *Semin. Cancer Biol.* 14:341-7)。Notchがヒト乳癌において役割を果たすという証拠は、乳癌においてNotch受容体が発現し、これと臨床アウトカムが関連することを示すデータによって得られた(Weijzen et al., 2002, *Nat. Med.* 8:979-86; Parr et al., 2004, *Int. J. Mol. Med.* 14:779-86)。さらに、Notch経路の過剰発現が、子宮頸癌(Zagouras et al., 1995, *PNAS* 92:6414-8)、腎細胞癌(Rae et al., 2000, *Int. J. Cancer* 88:726-32)、頭頸部扁平上皮癌(Leethanakul et al., 2000, *Oncogene* 19:3220-4)、子宮内膜癌(Suzuki et al., 2000, *Int. J. Oncol.* 17:1131-9)、および神経芽細胞腫(van Limpt et al., 2000, *Med. Pediatr. Oncol.* 35:554-8)において観察され、これは、多くの新生物の発生においてNotchが役割を果たす可能性があることを示唆している。興味深いことに、Notchシグナル伝達は、結腸のApc変異新生細胞の未分化状態の維持において役割を果たしているかもしれない(van Es & Clevers, 2005, *Trends in Mol. Med.* 11:496-502)。

【 0 0 1 0 】

Notch経路はまた、増殖、遊走、平滑筋分化、血管形成、および動脈-静脈分化を含む血管発生の複数の局面に関与している(Iso et al., 2003, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23:543)。例えば、Notch1/4およびJagged1のホモ接合性ヌル変異ならびにDLL4のヘテロ接合性消失の結果として、動脈発生および卵黄嚢血管新生に重篤だが変化に富んだ欠陥が生じる。さらに、DLL1欠損Notch2低形質マウス胚は、血管構造の不十分な発生に起因する可能性の高い大量出血を示す(Gale et al., 2004, *PNAS*, 101:15949-54; Krebs et al., 2000, *Genes Dev.* 14:1343-52; Xue et al., 1999, *Hum. Mol. Genet.* 8:723-30; Hrabe de Angelis et al., 1997, *Nature* 386:717-21; McCright et al., 2001, *Dev.* 128:491-502)。ヒトでは、Jagged1変異は、血管欠陥を含む発生障害であるアラジール症候群と関連し、Notch3変異は、血管ホメオスタシスに欠損のある遺伝性血管性認知症(カダシル(Cadasil))の原因である(Joutel et al., 1996, *Nature* 383:707-10)。

【 0 0 1 1 】

抗Notch抗体および抗癌治療剤としての可能性のあるその使用が以前に報告されている。例えば、全体が参照により本明細書に組み入れられる、米国特許出願公開第2008/0131434号を参照されたい。国際公開公報第2008/057144号および同第2008/076960号、ならびに米国特許出願公開第2008/0226621号、同第2008/0118520号、および同第2008/0131908号も参照されたい。

【 発明の概要 】

【 0 0 1 2 】

発明の簡単な概要

本発明は、新規のNotch結合剤および1つまたは複数の種類のヒトNotch受容体の新規のアンタゴニスト、ならびにこれらの剤およびアンタゴニストを使用する方を提供する。さ

10

20

30

40

50

らに、本発明は、新規のポリペプチド、例えば、1つまたは複数の種類のヒトNotch受容体に結合する抗体、このような抗体の断片、およびこのような抗体に関連する他のポリペプチドを提供する。ある特定の態様において、本発明は、ヒトNotch2および/またはヒトNotch3に特異的に結合する抗体を含むが、これに限定されない、ヒトNotch2および/またはヒトNotch3のアンタゴニストを提供する。本明細書で使用する「Notch2および/またはNotch3」という句は、「Notch2」、「Notch3」、または「Notch2およびNotch3」を意味する。ある特定の態様において、抗体または他のアンタゴニストは、リガンド結合ドメインの外側にあるNotch受容体領域(例えば、Notch2のEGF10またはNotch3のEGF9)に結合する。ある特定の態様において、抗体は、ヒトNotch2に特異的に結合する。ある特定の態様において、抗体は、ヒトNotch2およびヒトNotch3に特異的に結合する。一部の態様において、抗体は、ヒトNotch3に特異的に結合する。ポリペプチドをコードする核酸配列を含むポリヌクレオチドも提供され、同様にポリヌクレオチドを含むベクターも提供される。本発明のポリペプチドおよび/またはポリヌクレオチドを含む細胞もさらに提供される。新規のNotchアンタゴニストを含む組成物(例えば、薬学的組成物)も提供される。前記の剤およびアンタゴニストを使用する方法、例えば、腫瘍成長を阻害する、腫瘍の腫瘍形成能を低下させる、血管形成を阻害する、および/または癌もしくは血管形成に関連する他の疾患を治療するために、Notchアンタゴニストを使用する方法も提供される。

10

【0013】

1つの局面において、本発明は、1つまたは複数の種類のヒトNotch受容体のEGF10ドメイン(またはEGF10ドメインの同等物)に特異的に結合する剤(例えば、抗体)を提供する。ある特定の態様において、剤は抗体である。ある特定の態様において、剤はアンタゴニストである。ある特定の態様において、剤は、ヒトNotch2のEGF10および/またはヒトNotch3のEGF9に特異的に結合する。EGF9は、他のヒトNotch受容体Notch1、Notch2、およびNotch4にあるEGF10と同等の、ヒトNotch3の中にあるEGFである。一部の態様において、剤は、Notch2のEGF10に特異的に結合する。一部の態様において、剤は、Notch2のEGF10およびNotch3のEGF9に特異的に結合する。一部の態様において、剤は、Notch3のEGF9に特異的に結合する。他の態様において、剤は、Notch2 EGF10の中の配列HKGAL(SEQ ID NO:28)の少なくとも一部に結合する。一部の態様において、剤は、Notch3 EGF9の中の配列HEDA1(SEQ ID NO:29)の少なくとも一部に結合する。

20

【0014】

上述のそれぞれの局面または態様、ならびに本明細書の他の場所に記載の他の局面および/または態様のある特定の態様において、剤は、リガンドとヒトNotch2および/またはNotch3の結合を阻害する。一部の態様において、剤は、リガンドとヒトNotch2との結合を阻害する。一部の態様において、剤は、リガンドとNotch2およびNotch3との結合を阻害する。他の態様において、剤は、リガンドとNotch3との結合を阻害する。ある特定の態様において、リガンドはDLL4、JAG1またはJAG2である。他の態様において、剤は、ヒトNotch2および/またはNotch3のシグナル伝達を阻害する。一部の態様において、剤は、ヒトNotch2のシグナル伝達を阻害する。一部の態様において、剤は、Notch2およびNotch3のシグナル伝達を阻害する。他の態様において、剤は、Notch3のシグナル伝達を阻害する。一部の態様において、Notch2および/またはNotch3シグナル伝達は、DLL4、JAG1またはJAG2によって誘導される。前記剤を含む薬学的組成物、ならびに血管形成を阻害する、腫瘍成長を阻害する、腫瘍の腫瘍形成能を低下させる、および/または癌を治療するなどの用途のために前記剤を使用する方法も提供される。

30

40

【0015】

さらなる局面において、本発明は、ヒトNotch2および/またはNotch3に特異的に結合し、(a)SSSGMS(SEQ ID NO:5)を含む重鎖CDR1、

VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6)

を含む重鎖CDR2、および/もしくはSIFYTT(SEQ ID NO:51)を含む重鎖CDR3;ならびに/または(b)

50

RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:8)

を含む軽鎖CDR1、GASSRAT(SEQ ID NO:9)を含む軽鎖CDR2、および/もしくはQQYSNFPI(SEQ ID NO:10)を含む軽鎖CDR3を含む、抗体を提供する。一部の態様において、抗体は、(a)SSSGMS(SEQ ID NO:5)を含む重鎖CDR1、または1個、2個、3個、もしくは4個の保存的アミノ酸置換を含む、その変種;

VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6)

を含む重鎖CDR2、または1個、2個、3個、もしくは4個の保存的アミノ酸置換を含む、その変種;および/あるいはSIFYTT(SEQ ID NO:51)を含む重鎖CDR3、または1個、2個、3個、もしくは4個の保存的アミノ酸置換を含む、その変種;ならびに/あるいは(b)

10

RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:8)

を含む軽鎖CDR1、または1個、2個、3個、もしくは4個の保存的アミノ酸置換を含む、その変種;GASSRAT(SEQ ID NO:9)を含む軽鎖CDR2、または1個、2個、3個、もしくは4個の保存的アミノ酸置換を含む、その変種;および/あるいはQQYSNFPI(SEQ ID NO:10)を含む軽鎖CDR3、または1個、2個、3個、もしくは4個の保存的アミノ酸置換を含む、その変種を含む。前記抗体を含む薬学的組成物、ならびに血管形成を阻害する、腫瘍成長を阻害する、腫瘍の腫瘍形成能を低下させる、および/または癌を治療するなどの用途のために前記抗体を使用する方法も提供される。

20

【 0 0 1 6 】

さらなる局面において、本発明は、ヒトNotch2および/またはNotch3に特異的に結合し、(a)SSSGMS(SEQ ID NO:5)を含む重鎖CDR1、

VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6)

を含む重鎖CDR2、および/またはGIFFAI(SEQ ID NO:7)を含む重鎖CDR3;ならびに/または(b)

RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:8)

を含む軽鎖CDR1、GASSRAT(SEQ ID NO:9)を含む軽鎖CDR2、および/またはQQYSNFPI(SEQ ID NO:10)を含む軽鎖CDR3を含む、抗体を提供する。ある特定の態様において、抗体は、Notch2に特異的に結合する。一部の態様において、抗体は、(a)SSSGMS(SEQ ID NO:5)を含む重鎖CDR1、または1個、2個、3個、もしくは4個の保存的アミノ酸置換を含む、その変種;

30

VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6)

を含む重鎖CDR2、または1個、2個、3個、もしくは4個の保存的アミノ酸置換を含む、その変種;および/あるいはGIFFAI(SEQ ID NO:7)を含む重鎖CDR3、または1個、2個、3個、もしくは4個の保存的アミノ酸置換を含む、その変種;ならびに/あるいは(b)

RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:8)

を含む軽鎖CDR1、または1個、2個、3個、もしくは4個の保存的アミノ酸置換を含む、その変種;GASSRAT(SEQ ID NO:9)を含む軽鎖CDR2、または1個、2個、3個、もしくは4個の保存的アミノ酸置換を含む、その変種;および/あるいはQQYSNFPI(SEQ ID NO:10)を含む軽鎖CDR3、または1個、2個、3個、もしくは4個の保存的アミノ酸置換を含む、その変種を含む。前記抗体を含む薬学的組成物、ならびに血管形成を阻害する、腫瘍成長を阻害する、腫瘍の腫瘍形成能を低下させる、および/または癌を治療するなどの用途のために前記抗体を使用する方法も提供される。

40

【 0 0 1 7 】

別の局面において、本発明は、ヒトNotch2および/またはNotch3に特異的に結合し、(a)SSSGMS(SEQ ID NO:5)を含む重鎖CDR1、

50

VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6)

を含む重鎖CDR2、および/または
(G/S)(I/S)F(F/Y)(A/P)(I/T/S/N) (SEQ ID NO:30)

を含む重鎖CDR3;ならびに/あるいは(b)

RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:8)

を含む軽鎖CDR1、GASSRAT(SEQ ID NO:9)を含む軽鎖CDR2、および/またはQQYSNFP1(SEQ ID NO:10)を含む軽鎖CDR3を含む、抗体を提供する。一部の態様において、抗体は、SIFYPT(SEQ ID NO:22)を含む重鎖CDR3を含む。一部の態様において、抗体は、SSSFFAS(SEQ ID NO:23)を含む重鎖CDR3を含む。他の態様において、抗体は、SSFYAS(SEQ ID NO:24)を含む重鎖CDR3を含む。ある特定の態様において、抗体は、SSFFAT(SEQ ID NO:25)を含む重鎖CDR3を含む。一部の態様において、抗体は、SIFYPS(SEQ ID NO:26)を含む重鎖CDR3を含む。さらに他の態様では、抗体は、SSFFAN(SEQ ID NO:27)を含む重鎖CDR3を含む。前記抗体を含む薬学的組成物、ならびに血管形成を阻害する、腫瘍成長を阻害する、腫瘍の腫瘍形成能を低下させる、および/または癌を治療するなどの用途のために前記抗体を使用する方法も提供される。

10

【0018】

別の局面において、本発明は、(a)(シグナル配列と共に、もしくはシグナル配列を伴わずに)SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:57、もしくはSEQ ID NO:20と少なくとも約80%の配列同一性を有するポリペプチド(例えば、重鎖可変領域);および/または(b)(シグナル配列と共に、もしくはシグナル配列を伴わずに)SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:19、もしくはSEQ ID NO:39と少なくとも約80%の配列同一性を有するポリペプチド(例えば、軽鎖可変領域)を含む、ポリペプチドを提供する。ある特定の態様において、ポリペプチドは抗体である。ある特定の態様において、ポリペプチドは、ヒトNotch2および/またはNotch3に特異的に結合する。一部の態様において、ポリペプチドは、ヒトNotch2に特異的に結合する。一部の態様において、ポリペプチドはNotch2およびNotch3に結合する。他の態様において、ポリペプチドはNotch3に結合する。ある特定の態様において、ポリペプチドは、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:13、またはSEQ ID NO:50と少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、または約100%の配列同一性を有するポリペプチドを含む。前記ポリペプチドを含む薬学的組成物、ならびに血管形成を阻害する、腫瘍成長を阻害する、腫瘍の腫瘍形成能を低下させる、および/または癌を治療するなどの用途のために前記ポリペプチドを使用する方法も提供される。

20

30

【0019】

さらに他の局面において、本発明は、(a)(シグナル配列と共に、もしくはシグナル配列を伴わずに)SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:16、もしくはSEQ ID NO:2と少なくとも約80%の配列同一性を有するポリペプチド;および/または(b)(シグナル配列と共に、もしくはシグナル配列を伴わずに)SEQ ID NO:18もしくはSEQ ID NO:4と少なくとも約80%の配列同一性を有するポリペプチドを含む、ポリペプチド(例えば、抗体または抗体の重鎖もしくは軽鎖)を提供する。ある特定の態様において、ポリペプチドは、SEQ ID NO:39またはSEQ ID NO:40と少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、または約100%の配列同一性を有するポリペプチドを含む。前記抗体を含む薬学的組成物、および治療有効量の前記抗体を投与する工程を含む、癌を治療する方法も提供される。

40

【0020】

別の局面において、本発明は、(a)SEQ ID NO:50と少なくとも約80%の配列同一性を有するポリペプチド;および/または(b)SEQ ID NO:13と少なくとも約80%の配列同一性を有するポリペプチドを含む、ポリペプチド(例えば、抗体または抗体の重鎖もしくは軽鎖)を提供する。ある特定の態様において、ポリペプチドは、SEQ ID NO:50またはSEQ ID NO:13と少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、または

50

約100%の配列同一性を有するポリペプチドを含む。ある特定の態様において、ポリペプチドは、ヒトNotch2および/またはヒトNotch3に結合する抗体である。前記抗体を含む薬学的組成物、および治療有効量の前記抗体を投与する工程を含む、癌を治療する方法も提供される。

【0021】

別の局面において、本発明は、(シグナル配列と共に、もしくはシグナル配列を伴わずに)SEQ ID NO:16の重鎖およびSEQ ID NO:18の軽鎖を含む59R1 IgG2抗体を含む、これからなる、もしくはこれから本質的になる抗体、またはブダペスト条約の規定に基づいて、2008年10月15日に、American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA, USAに寄託され、指定番号PTA-9547が付与されたDNAによりコードされる抗体を提供する。前記抗体を含む薬学的組成物、ならびに血管形成を阻害する、腫瘍成長を阻害する、腫瘍の腫瘍形成能を低下させる、および/または癌を治療するなどの用途のために前記抗体を使用する方法も提供される。

10

【0022】

さらなる局面において、本発明は、(シグナル配列と共に、もしくはシグナル配列を伴わずに)SEQ ID NO:49の重鎖およびSEQ ID NO:18の軽鎖を含む59R5 IgG2抗体を含む、これからなる、もしくはこれから本質的になる抗体、または2009年7月6日にATCCに寄託され、指定番号[...]が付与されたDNAによりコードされる抗体を提供する。前記抗体を含む薬学的組成物、ならびに血管形成を阻害する、腫瘍成長を阻害する、腫瘍の腫瘍形成能を低下させる、および/または癌を治療するなどの用途のために前記抗体を使用する方法も提供される。

20

【0023】

別の局面において、本発明は、ヒトNotch2および/またはNotch3と、SEQ ID NO:14を含む重鎖可変領域およびSEQ ID NO:13を含む軽鎖可変領域を含む抗体との特異的結合において競合する抗体を提供する。ある特定の態様において、抗体は、(シグナル配列と共に、またはシグナル配列を伴わずに)SEQ ID NO:16の重鎖およびSEQ ID NO:18の軽鎖を含む59R1 IgG2抗体、または2008年10月15日にATCCに寄託され、指定番号PTA-9547が付与されたDNAによりコードされる抗体との特異的結合において競合する。一部の態様において、抗体は、ヒトNotch2との結合において競合する。一部の態様において、抗体は、ヒトNotch2およびNotch3との結合において競合する。他の態様において、抗体は、ヒトNotch3との結合において競合する。前記抗体を含む薬学的組成物、ならびに血管形成を阻害する、腫瘍成長を阻害する、腫瘍の腫瘍形成能を低下させる、および/または癌を治療するなどの用途のために前記抗体を使用する方法も提供される。

30

【0024】

さらなる局面において、抗体は、ヒトNotch2および/またはNotch3と、SEQ ID NO:50を含む重鎖可変領域およびSEQ ID NO:13を含む軽鎖可変領域を含む抗体との特異的結合において競合する。一部の態様において、抗体は、SEQ ID NO:49の重鎖およびSEQ ID NO:18の軽鎖を含む59R5抗体、または2009年7月6日にATCCに寄託され、指定番号[...]が付与されたDNAによりコードされる抗体との特異的結合において競合する。一部の態様において、抗体は、ヒトNotch2との結合において競合する。一部の態様において、抗体は、ヒトNotch2およびNotch3との結合において競合する。他の態様において、抗体は、ヒトNotch3との結合において競合する。抗体を含む薬学的組成物、ならびに血管形成を阻害する、腫瘍成長を阻害する、腫瘍の腫瘍形成能を低下させる、および/または癌を治療するなどの用途のために、抗体を使用する方法も提供される。

40

【0025】

ある特定の他の局面において、本発明は、(シグナル配列を有する、またはシグナル配列を有さない)、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56、およびSEQ ID NO:57からなる群より選択される配列を含むポリペプチド、な

50

らびにこのようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供する。ある特定の態様において、ポリペプチドは抗体である。ある特定の態様において、抗体は、ヒトNotch2および/またはヒトNotch3に特異的に結合する。ある特定の態様において、抗体は、ヒトNotch2に特異的に結合する。ある特定の態様において、抗体は、ヒトNotch2およびヒトNotch3に特異的に結合する。ある特定の態様において、抗体は、ヒトNotch3に特異的に結合する。別の局面において、本発明は、SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:59、およびSEQ ID NO:60からなる群より選択される配列を含むポリヌクレオチドを提供する。

【0026】

別の局面において、本発明は、被験体において(例えば、被験体の腫瘍または他の異常な血管形成の部位において)周皮細胞および/または血管平滑筋細胞の機能を調整する方法を提供する。ある特定の態様において、前記方法は、ヒトNotch2および/またはヒトNotch3に特異的に結合する有効量の剤を被験体に投与する工程を含む。ある特定の態様において、剤は抗体である。一部の態様において、剤は、上述の局面および/または態様、ならびに本明細書に記載の他の局面および/または態様のいずれか1つに記載の抗体である。ある特定の態様において、剤はアンタゴニストである。ある特定の態様において、剤は、ヒトNotch3に特異的に結合し、ヒトNotch3のアンタゴニストである。ある特定の態様において、周皮細胞および/または血管平滑筋細胞の機能が調整されると、血管形成および/または腫瘍成長が阻害される。

【0027】

さらに別の局面において、本発明は、被験体における血管形成(例えば、腫瘍血管形成)を阻害する方法を提供する。ある特定の態様において、前記方法は、ヒトNotch2および/またはヒトNotch3に特異的に結合する有効量の剤を被験体に投与する工程を含む。ある特定の態様において、剤はアンタゴニストである。一部の態様において、剤はヒトNotch2に特異的に結合し、ヒトNotch2のアンタゴニストである。ある特定の態様において、前記剤はヒトNotch3に特異的に結合し、ヒトNotch3のアンタゴニストである。一部の態様において、前記剤は、Notch2およびNotch3両方のアンタゴニストである。一部の態様において、アンタゴニストは抗体である。ある特定の態様において、剤は抗体である。一部の態様において、剤は、上述の局面および/または態様、ならびに本明細書に記載の他の局面および/または態様のいずれか1つに記載の抗体である。一部の態様において、アンタゴニストは抗体でない。一部の態様において、血管形成を阻害する方法は、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)のアンタゴニストまたはVEGF受容体のアンタゴニストを被験体に投与する工程をさらに含む。ある特定の態様において、前記方法は、周皮細胞および/または血管平滑筋細胞の機能を調整することによって血管形成を阻害する方法である。

【0028】

さらなる局面において、本発明は、被験体における腫瘍成長を阻害する方法を提供する。ある特定の態様において、前記方法は、ヒトNotch2および/またはヒトNotch3の治療有効量のアンタゴニストを被験体に投与する工程を含む。ある特定の態様において、アンタゴニストは、ヒトNotch2に特異的に結合する抗体である。一部の態様において、アンタゴニストは、ヒトNotch2およびヒトNotch3の両方に特異的に結合する抗体である。ある特定の態様において、アンタゴニストは、ヒトNotch3に特異的に結合する抗体である。一部の態様において、アンタゴニストは、上述の局面および/または態様、ならびに本明細書に記載の他の局面および/または態様のいずれか1つに記載の抗体である。ある特定の態様において、腫瘍は、ホスファターゼおよびテンシンホモログ(PTEN)遺伝子における欠失または他の変異を含む。ある特定の態様において、腫瘍は乳房腫瘍である。

【0029】

なおさらなる局面において、本発明は、ヒトNotch2および/またはヒトNotch3のアンタゴニストによる治療のために被験体を選択する方法を提供する。ある特定の態様において、前記方法は、(a)腫瘍が、ホスファターゼ遺伝子およびテンシンホモログ(PTEN)遺伝子に欠失または変異を含むかどうかを確かめる工程;ならびに(b)腫瘍が欠失または変異を含

10

20

30

40

50

むのであれば、Notch2および/またはNotch3アンタゴニストによる治療のために被験体を選択する工程を含む。一部の態様において、被験体はNotch2アンタゴニストで治療される。一部の態様において、被験体は、Notch2およびNotch3のアンタゴニストで治療される。一部の態様において、被験体は、Notch3アンタゴニストで治療される。一部の態様において、アンタゴニストは抗体である。ある特定の態様において、腫瘍は乳房腫瘍である。

【0030】

別の局面において、本発明は、少なくとも1種類のヒトNotch受容体(例えば、1種類、2種類、3種類、または4種類のNotch受容体)の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に特異的に結合する抗体を提供する。ある特定の態様において、非リガンド結合領域は、ヒトNotch受容体のEGF反復10(もしくはEGF10の同等物、例えば、ヒトNotch3のEGF9)を含む、またはこれからなる。一部の態様において、抗体は腫瘍成長を阻害する。一部の態様において、抗体は、リガンドとNotch受容体との結合を阻害する。ある特定の態様において、抗体は、Notch受容体によるシグナル伝達を阻害する。一部の態様において、Notch受容体は、ヒトNotch1、Notch2、Notch3、またはNotch4受容体である。ある特定の態様において、抗体は、Notch2(例えば、Notch2のEGF10)に特異的に結合する。ある特定の態様において、抗体は、Notch2および少なくとも1つのさらなるNotch受容体に特異的に結合する。ある特定の態様において、さらなるNotch受容体はNotch3である。前記抗体を含む薬学的組成物および治療有効量の前記抗体を投与する工程を含む、癌を治療する方法も提供される。

【0031】

さらなる局面において、本発明は、2種類またはそれ以上の(すなわち、少なくとも2種類、または2種類、3種類、もしくは4種類の)ヒトNotch受容体に特異的に結合する抗体を提供する。ある特定の態様において、抗体は、2種類またはそれ以上のヒトNotch受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に特異的に結合する。ある特定の態様において、2種類またはそれ以上のヒトNotch受容体がNotch1、Notch2、またはNotch4を含むのであれば、抗体は、Notch1、Notch2、またはNotch4のEGF10に結合し、2種類またはそれ以上のヒトNotch受容体がNotch3を含むのであれば、抗体は、Notch3のEGF9に結合する。ある特定の態様において、非リガンド結合領域はEGF4でない。ある特定の態様において、2種類またはそれ以上のヒトNotch受容体はNotch2を含む。ある特定の態様において、2種類またはそれ以上のヒトNotch受容体はNotch3を含む。なおさらなる態様において、2種類またはそれ以上のヒトNotch受容体はNotch2およびNotch3を含む。ある特定の態様において、抗体は、2種類またはそれ以上のヒトNotch受容体のアンタゴニストである。ある特定の態様において、抗体は腫瘍成長を阻害する。前記抗体を含む薬学的組成物および治療有効量の前記抗体を投与する工程を含む、癌を治療する方法も提供される。

【0032】

さらに別の局面において、本発明は、ヒトNotch2受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に特異的に結合し、腫瘍成長を阻害する、単離された抗体を提供する。ここで、非リガンド結合領域は、ヒトNotch2受容体(例えば、SEQ ID NO:36)のEGF反復10を含む、またはこれからなる。一部の態様において、抗体は、EGF反復10の外側にあるどのヒトNotch2領域にも結合しない。ある特定の態様において、抗体はまた、少なくとも1つのさらなるヒトNotch受容体のEGF反復10(または同等物)(例えば、Notch3のEGF9)に特異的に結合する。一部の態様において、抗体は、ヒトNotch2 EGF10およびNotch3 EGF9に結合する。抗体を含む薬学的組成物および治療有効量の抗体を投与する工程を含む、癌を治療する方法も提供される。

【0033】

さらに別の局面において、本発明は、ヒトNotch3受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に特異的に結合し、腫瘍成長を阻害する、単離された抗体を提供する。ここで、非リガンド結合領域は、ヒトNotch3受容体の(他のNotch受容体にあるEGF10と同等の)EGF反復9を含む、またはこれからなる。一部の態様において、抗体は、EGF反復9の外側にあるどのヒトNotch3領域にも結合しない。ある特定の態様において、抗体はまた、少なくとも1つのさらなるヒトNotch受容体のEGF反復10に特異的に結合する。一部の態様におい

て、抗体は、ヒトNotch3 EGF9およびNotch2 EGF10に結合する。前記抗体を含む薬学的組成物および治療有効量の前記抗体を投与する工程を含む、癌を治療する方法も提供される。

【0034】

なおさらなる局面において、本発明は、ヒトNotch受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に結合し、(a)SSSGMS(SEQ ID NO:5)を含む重鎖CDR1、
VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6)

を含む重鎖CDR2、および/もしくはGIFFAI (SEQ ID NO:7)を含む重鎖CDR3;ならびに/または (b)

RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:8)

を含む軽鎖CDR1、GASSRAT(SEQ ID NO:9)を含む軽鎖CDR2、および/もしくはQQYSNFP1 (SEQ ID NO:10)を含む軽鎖CDR3を含む抗体を提供する。ある特定の態様において、ヒトNotch受容体はNotch2である。ある特定の態様において、抗体は、ヒトNotch2受容体のEGF10および/またはヒトNotch3受容体のEGF9に結合する。さらなる局面において、本発明は、競合的結合アッセイにおけるNotch2の細胞外ドメインの非リガンド結合領域との特異的結合において、このような抗体と競合する抗体を提供する。前記抗体を含む薬学的組成物および治療有効量の前記抗体を投与する工程を含む、癌を治療する方法も提供される。前記組成物を投与する工程を含む、血管形成を阻害する方法も提供される。

【0035】

別の局面において、本発明は、ヒトNotch受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に結合し、(a)SSSGMS(SEQ ID NO:5)を含む重鎖CDR1、

VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6)

を含む重鎖CDR2、および/もしくはSIFYTT(SEQ ID NO:51)を含む重鎖CDR3;ならびに/または (b)

RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:8)

を含む軽鎖CDR1、GASSRAT(SEQ ID NO:9)を含む軽鎖CDR2、および/もしくはQQYSNFP1 (SEQ ID NO:10)を含む軽鎖CDR3を含む抗体を提供する。ある特定の態様において、ヒトNotch受容体はNotch2である。一部の態様において、抗体は、ヒトNotch2およびNotch3受容体に結合する。ある特定の態様において、抗体は、ヒトNotch2受容体のEGF10および/またはヒトNotch3受容体のEGF9に結合する。別の態様において、本発明は、競合的結合アッセイにおけるNotch2の細胞外ドメインの非リガンド結合領域との特異的結合において、このような抗体と競合する抗体を提供する。前記抗体を含む薬学的組成物および治療有効量の前記抗体を投与する工程を含む、癌を治療する方法も提供される。組成物を投与する工程を含む、血管形成を阻害する方法も提供される。

【0036】

上述のそれぞれの局面または態様、ならびに本明細書の他の場所に記載の他の局面および/または態様のある特定の態様において、抗体は、ヒトNotch2およびヒトNotch3の両方に特異的に結合する。

【0037】

上述のそれぞれの局面または態様、ならびに本明細書の他の場所に記載の他の局面および/または態様のある特定の態様において、抗体は組換え抗体である。ある特定の態様において、抗体はモノクローナル抗体である。ある特定の態様において、抗体はキメラ抗体である。ある特定の態様において、抗体はヒト化抗体である。ある特定の態様において、抗体はヒト抗体である。一部の態様において、抗体は、一価抗体、二価抗体、または多価抗体である。ある特定の態様において、抗体は単一特異性抗体である。ある特定の態様において、抗体の個々の抗原結合部位は、複数のヒトNotch受容体(例えば、Notch2およびNo

10

20

30

40

50

tch3)の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に結合する(またはこれに結合することができる)。ある特定の別の態様において、抗体は二重特異性抗体である。ある特定の態様において、抗体はIgG1抗体である。ある特定の態様において、抗体はIgG2抗体である。ある特定の態様において、抗体は細胞傷害性部分とコンジュゲートしている。ある特定の態様において、抗体は単離されている。なおさらなる態様において、抗体は実質的に純粋である。

【0038】

上述のそれぞれの局面または態様、ならびに本明細書の他の場所に記載の他の局面および/または態様のある特定の態様において、抗体で治療される癌または腫瘍は、乳房、結腸直腸、肺、膵臓、前立腺、または頭頸部の癌または腫瘍である。ある特定の態様において、癌または腫瘍は黒色腫である。ある特定の態様において、癌または腫瘍は乳房の癌または腫瘍である。ある特定の態様において、癌または腫瘍は結腸直腸の癌または腫瘍である。ある特定の態様において、癌または腫瘍は膵臓の癌または腫瘍である。ある特定の態様において、癌または腫瘍は前立腺の癌または腫瘍である。

10

【0039】

上述のそれぞれの局面または態様、ならびに本明細書の他の場所に記載の他の局面および/または態様のある特定の態様において、癌を治療する方法は、腫瘍成長を阻害する工程を含む。ある特定の態様において、癌を治療する方法は、(例えば、腫瘍内の癌幹細胞の頻度を少なくすることによって)腫瘍の腫瘍形成能を低下させる工程を含む。

20

【0040】

上述のそれぞれの局面または態様、ならびに本明細書の他の場所に記載の他の局面および/または態様のある特定の態様において、アンタゴニストまたは抗体は、癌のさらなる治療と組み合わせて被験体に投与される。ある特定の態様において、癌のさらなる治療は、放射線療法、化学療法、および/またはさらなる抗体治療剤を含む。一部の態様において、癌のさらなる治療は化学療法剤を含む。ある特定の態様において、化学療法は、パクリタキセル(例えば、タキソール)、イリノテカン、ゲムシタピン、および/またはオキサリプラチンを含む。ある特定の態様において、さらなる抗体治療剤は、ヒトNotch受容体(例えば、Notch1、2、3、もしくは4)またはヒトNotch受容体リガンド(例えば、DLL4もしくはJAG1)に特異的に結合する抗体である。一部の態様において、さらなる抗体治療剤は抗DLL4抗体である。ある特定の別の態様において、さらなる抗体治療剤は、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)に特異的に結合する抗体である。ある特定の態様において、さらなる療法はVEGF受容体に結合する。

30

【0041】

上述のそれぞれの局面または態様、ならびに他の局面および/または態様のある特定の態様において、抗体は、抗血管形成剤である第2の治療剤と組み合わせて被験体に投与される。

【0042】

本明細書に記載の抗体もしくは他のポリペプチドを含む、または本明細書に記載の抗体もしくは他のポリペプチドを産生する細胞株(例えば、ハイブリドーマ細胞株)が本発明によってさらに提供される。本明細書に記載の抗体のポリペプチドまたは軽鎖可変領域もしくは重鎖可変領域をコードするポリヌクレオチドを含む、本明細書に記載のポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチド(例えば、ベクター)も提供され、同様に、このようなポリヌクレオチドを含む細胞株も提供される。

40

【0043】

ある特定の態様において、本発明は、Notch受容体に結合する治療有効量の抗体を被験体に投与する工程を含む、癌幹細胞を含む癌を治療する方法を提供する。さらに具体的な局面において、本発明は、Notch受容体ファミリーメンバーに結合する治療有効量の抗体を被験体に投与する工程を含む、1つまたは複数の種類のNotch受容体ファミリーメンバーを発現する幹細胞を含む癌を治療する方法を提供する。本発明は、ヒトNotch受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合ドメインに結合し、癌治療に有効な抗体を提供する。従っ

50

て、ある特定の態様において、本発明は、ヒトNotch受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に特異的に結合し、腫瘍成長を阻害する抗体を提供する。ある特定の態様において、さらに、本発明は、ヒトNotch受容体タンパク質の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に特異的に結合し、腫瘍成長を阻害する治療有効量の抗体を投与する工程を含む、癌を治療する方法を提供する。

【0044】

このような癌を治療するために、Notch受容体ファミリーメンバーに結合する抗体またはNotch受容体に対するリガンドに結合する抗体を使用することにおける様々な利点が本明細書において意図される。一部の態様において、ある特定のNotch受容体は、ある特定の固形腫瘍、例えば、乳房および結腸において高発現している。これは、Notch受容体に結合する活性薬物の吸い込み口となる。過剰発現しているNotch受容体に結合する抗体は、現在利用可能な化学療法薬より安全性が優れていると予測される。

10

【0045】

さらに、本発明は、ヒトにおいて、癌幹細胞による1つまたは複数の種類のNotch受容体の過剰発現を特徴としない、癌幹細胞を含む癌を治療する方法であって、Notch受容体に結合し、Notch受容体のリガンド活性化をブロックする治療有効量の抗体をヒトに投与する工程を含む方法を提供する。

【0046】

さらに、本発明は、ヒトにおいて癌を治療する方法であって、治療有効量の、(a)Notch受容体に結合し、Notch受容体を過剰発現する癌幹細胞の成長または増殖を阻害する、第1の抗体;および(b)Notch受容体に結合し、Notch受容体のリガンド活性化をブロックする第2の抗体をヒトに投与する工程を含む方法を提供する。

20

【0047】

本発明はまた、Notchに結合する治療有効量の抗体を投与する工程を含む、乳癌、結腸癌、直腸癌、および結腸直腸癌からなる群より選択される癌を治療する方法を提供する。本発明はまた、Notch受容体のリガンド活性化をブロックする治療有効量の抗体を投与する工程を含む、乳癌、結腸癌、膵臓癌、前立腺癌、肺癌、直腸癌、および結腸直腸癌からなる群より選択される癌を治療する別の方法を提供する。本発明はまた、Notchに結合し、Notch受容体のリガンド活性化をブロックする治療有効量の抗体を投与する工程を含む、乳癌、結腸癌、膵臓癌、前立腺癌、肺癌、直腸癌、および結腸直腸癌からなる群より選択される、癌を治療するさらに別の方法を提供する。

30

【0048】

さらなる態様において、本発明は、(特に)前記方法において使用するための製造物品を提供する。例えば、本発明は、容器、および容器の中に入れられた、Notchに結合する抗体を含む組成物を備え、癌幹細胞を含む癌を治療するために組成物が使用できることを示す添付文書をさらに備える、製造物品を提供する。一部の態様において、本発明は、容器、および容器の中に入れられた、Notchに結合する抗体を含む組成物を備え、1つまたは複数の種類のNotch受容体を発現する癌幹細胞を含む癌を治療するために組成物が使用できることを示す添付文書をさらに備える、製造物品を提供する。

【0049】

ある特定の態様において、本発明は、さらに、容器、および容器の中に入れられた、Notch受容体に結合し、Notch受容体のリガンド活性化をブロックする抗体を含む組成物を備え、Notch受容体の過剰発現を特徴としない癌幹細胞を含む癌を治療するために組成物が使用できることを示す添付文書をさらに備える、製造物品に関する。

40

【0050】

ある特定の態様において、(a)Notch受容体に結合し、Notchを過剰発現する癌幹細胞を含む癌細胞の増殖を阻害する第1の抗体を含む組成物が中に入れられている、第1の容器;および(b)Notchに結合し、Notch受容体のリガンド活性化をブロックする第2の抗体を含む組成物が中に入れられている第2の容器を備える、製造物品が提供される。

【0051】

50

一部の態様において、容器、および容器に入れられた、Notchに結合し、Notch受容体のリガンド活性化をブロックする抗体を含む組成物を備え、結腸癌、膵臓癌、前立腺癌、肺癌、直腸癌、および結腸直腸癌からなる群より選択される癌を治療するために組成物が使用できることを示す添付文書をさらに備える、さらなる製造物品が提供される。

【0052】

さらに、本発明は、Notchに結合し、Notch受容体のリガンド活性化をブロックする抗体(例えば、ヒト抗体またはヒト化抗体);抗体および薬学的に許容される担体を含む組成物;ならびに細胞傷害剤とコンジュゲートした抗体を含むイムノコンジュゲートを提供する。

【0053】

1つの局面において、本発明は、上述の局面または態様、ならびに本明細書の他の場所に記載の他の局面および/または態様の抗体またはポリペプチドのいずれかをコードする、単離されたポリヌクレオチドを提供する。一部の態様において、本発明は、ポリヌクレオチドを含むベクターを提供する。一部の態様において、宿主細胞はポリヌクレオチドまたはベクターを含む。他の態様において、抗体を作製するプロセスは、ポリヌクレオチドが発現されるように、ポリヌクレオチドを含む宿主細胞を培養する工程を含み、任意で、宿主細胞培養物(例えば、宿主細胞培地から)から抗体を回収する工程をさらに含む。

10

【0054】

さらに、本発明は、上述の態様または局面に記載の、ならびに本明細書の他の場所に記載のヒト化抗体またはヒト抗体をコードする、単離されたポリヌクレオチド;ポリヌクレオチドを含むベクター;ポリヌクレオチドまたはベクターを含む、宿主細胞;ならびにポリヌクレオチドが発現されるように、ポリヌクレオチドを含む宿主細胞を培養する工程を含む、任意で、宿主細胞培養物(例えば、宿主細胞培地から)から抗体を回収する工程をさらに含む、抗体を作製するプロセスを提供する。

20

【0055】

さらに、本発明は、Notchに結合する抗体が1つまたは複数の種類のカリチアマイシン分子とコンジュゲートしたイムノコンジュゲート、およびNotch発現癌、例えば、癌幹細胞がNotchを過剰発現する癌を治療するための、このようなコンジュゲートの使用に関する。

【0056】

本発明の局面または態様が、マーカッシュグループ、あるいは「および/または」もしくは「または」によって分けられる代替物のグループを含むが、これに限定されない、代替物の他のグループで説明された場合、本発明は、列挙されたグループ全体を全体として含む、グループの各メンバー個々に含む、メイングループの全ての可能性のあるサブグループを含むだけでなく、グループのメンバーの1つまたは複数が存在しないメイングループも含む。本発明はまた、本発明においてグループのメンバーのいずれか1つまたは複数の明確な除外も想定する。例えば、「Xおよび/またはY」などの言葉は、「X」のみ、「Y」のみ、ならびに「X」と「Y」をあわせて含む。

30

【図面の簡単な説明】

【0057】

【図1A】59R1抗体および変種はヒトNotch2に結合し、リガンド結合をブロックする。ヒトNotch2に対する59R1 Fabによる結合のFACS分析を示す。「クローン1」は、安定にトランスフェクトされたHEK293細胞上のヒトNotch2に結合することが示された59R1 Fabである。「クローン5」は、Notch2に結合しない、ファージライブラリーから単離された異なるクローンのFabである。

40

【図1B】59R1抗体および変種はヒトNotch2に結合し、リガンド結合をブロックする。59R1 Fabによるリガンド(JAG1)結合のブロッキングのFACS分析を示す。「クローン1」は、h Jagged1 ECD-Fc融合と、安定にトランスフェクトされたHEK293細胞上のヒトNotch2との結合をブロックすることが示された、59R1 Fabである。「クローン5」は、アッセイにおいてリガンド結合をブロックしない、ファージライブラリーから単離された異なるクローンのFabである。

50

【図1C】59R1抗体および変種はヒトNotch2に結合し、リガンド結合をブロックする。59R1 IgG2抗体と、安定にトランスフェクトされたHEK293細胞上のヒトNotch2との結合のFACS分析を示す。59R1 IgG2抗体は、安定にトランスフェクトされたHEK293細胞上のヒトNotch2に結合することが示された。

【図1D】59R1抗体および変種はヒトNotch2に結合し、リガンド結合をブロックする。59R1 IgG2抗体によるリガンド(DLL4)結合のブロッキングのFACS分析を示す。59R1 IgG2抗体は、hDLL4 ECD-Fc融合と、安定にトランスフェクトされたHEK293細胞上のヒトNotch2との結合をブロックすることが示された。

【図1E】59R1抗体および変種はヒトNotch2に結合し、リガンド結合をブロックする。59R1の重鎖CDR3の親和性成熟戦略を示す。59R1の重鎖CDR3の親配列を囲みで示した。許容される残基変化は、図中の親配列の下に示した通りである。

10

【図1F】59R1抗体および変種はヒトNotch2に結合し、リガンド結合をブロックする。JA G1ブロッキング能力についての親和性成熟59R1配列のスクリーニングを示す。改善した変種を矢印で示した。

【図2】59R1 IgG2抗体と4つのヒトNotchホモログとの交差反応性のFACS分析を示す。59R1は、一過的にトランスフェクトされたHEK-293細胞上のhNotch2およびhNotch3に結合することが見出されたが、同じ細胞上にあるhNotch1およびhNotch4と有意な結合を示さないことが見出された。

【図3A】59R1抗体のエピトープマッピングを示す。抗Notch2/3抗体59R1はヒトNotch2のEGF反復10に結合する。組換えNotch2-Fc融合タンパク質と、Notch2の指示されたEGF反復1~12(x軸)を発現するHEK293細胞からの上清を、抗Notch2/3抗体59R1を用いたELISAにおいて使用した。OD(y軸)は、抗体が、EGF反復10を含むNotch2融合タンパク質としか結合しないことを示す(斜線の付いたバー)(この図は、上および下のグラフにおいて別々に示されている、2回別々の実験から得られたデータを示す)。

20

【図3B】59R1抗体のエピトープマッピングを示す。EGF反復11および12は、抗Notch2/3抗体59R1と完全長hNotch2との結合に関与しない。緑色蛍光タンパク質(GFP)(x軸)のみでトランスフェクトされたHEK293細胞のFACS分析(左上)、あるいはGFPと、インタクトな完全長Notch2でコトランスフェクトされたHEK293細胞、またはGFPと、EGF反復11が欠失された完全長Notch2(EGF11)、もしくはEGF反復12が欠失された完全長Notch2(EGF12)でコトランスフェクトされたHEK293細胞のFACS分析を示す。GFP発現細胞における、59R1と3種類全てのNotch2タンパク質の結合をy軸(PE)に沿って示した。

30

【図3C】59R1抗体のエピトープマッピングを示す。EGF反復10は、抗Notch2/3抗体59R1と完全長hNotch2との結合に関与するが、リガンド結合には関与しない。hNotch2のEGF1~4に結合する抗Notch2抗体59M70による結合は「抗Notch2結合」と示される。DLL4による結合は「リガンド結合」と示される。

【図4A】抗Notch2/3抗体59R1はルシフェラーゼレポーターアッセイにおいてNotch2シグナル伝達をブロックする。59R1は、hDLL4により誘導されたNotch2レポーター活性をブロックする。

【図4B】抗Notch2/3抗体59R1はルシフェラーゼレポーターアッセイにおいてNotch2シグナル伝達をブロックする。59R1は、hJAG1により誘導されたNotch2レポーター活性をブロックする。

40

【図4C】抗Notch2/3抗体59R1はルシフェラーゼレポーターアッセイにおいてNotch2シグナル伝達をブロックする。59R1は、hJAG2により誘導されたNotch2レポーター活性をブロックする。

【図5A】Notch2/3受容体抗体59R1はインビボで腫瘍の形成および成長を阻害する。抗Notch2/3(59R1)はPE13乳房腫瘍の形成を阻害する。PE13乳房腫瘍細胞を注射したNOD/SCIDマウスを、細胞注射の2日後に、対照抗体(四角)または抗Notch2/3抗体59R1(白三角)で治療した。腫瘍量(y軸、mm³)を経時的に測定した(x軸、細胞注射後の日数)。59R1抗体による治療は、対照と比較して腫瘍形成を有意に阻害した(p<0.001)。

【図5B】Notch2/3受容体抗体59R1はインビボで腫瘍の形成および成長を阻害する。抗No

50

tch2/3(59R1)はT3乳房腫瘍の形成を阻害する。T3乳房腫瘍細胞を注射したNOD/SCIDマウスを、細胞注射の2日後に、対照抗体(四角)または抗Notch2/3抗体59R1(白三角)で治療した。腫瘍量(y軸、 mm^3)を経時的に測定した(x軸、細胞注射後の日数)。59R1抗体による治療は、対照と比較して腫瘍形成を有意に阻害した($p<0.001$)。

【図5C】Notch2/3受容体抗体59R1はインビボで腫瘍の形成および成長を阻害する。抗Notch2/3(59R1)はColo-205結腸腫瘍の成長を阻害する。Colo-205結腸腫瘍細胞を注射した、背景がSwiss CD-1である6~8週齢の免疫不全bg/nu X1D雌マウスを、腫瘍量が $65\sim 200\text{mm}^3$ に達した後に、対照抗体(四角)または抗Notch2/3抗体59R1(ダイヤモンド)で治療した。腫瘍量の平均(y軸、 mm^3)を経時的に測定した(x軸、細胞注射後の日数)。59R1抗体による治療は対照と比較して腫瘍成長を阻害した($***p<0.001$ 、40日後)。

【図5D】Notch2/3受容体抗体59R1はインビボで腫瘍の形成および成長を阻害する。抗Notch2/3(59R1)はPN4膵臓腫瘍の成長を阻害する。PN4膵臓腫瘍細胞を注射したNOD/SCIDマウスを、腫瘍量が $65\sim 200\text{mm}^3$ に達した後に、対照抗体(四角)または抗Notch2/3抗体59R1(ダイヤモンド)で治療した。腫瘍量の平均(y軸、 mm^3)を経時的に測定した(x軸、細胞注射後の日数)。59R1抗体による治療は対照と比較して腫瘍成長を阻害した($***p<0.001$ 、70日後)。

【図5E】Notch2/3受容体抗体59R1はインビボで腫瘍の形成および成長を阻害する。抗Notch2/3(59R1)はPE13乳房腫瘍の成長を阻害する。PE13乳房腫瘍細胞を注射したNOD/SCIDマウスを、腫瘍量が $65\sim 200\text{mm}^3$ に達した後に、対照抗体(四角)または抗Notch2/3抗体59R1(ダイヤモンド)で治療した。腫瘍量の平均(y軸、 mm^3)を経時的に測定した(x軸、細胞注射後の日数)。59R1抗体による治療は対照と比較して腫瘍成長を阻害した($*p<0.05$ 、57日後)。

【図5F】Notch2/3受容体抗体59R1はインビボで腫瘍の形成および成長を阻害する。抗Notch2/3(59R1)はT3乳房腫瘍の成長を阻害する。T3乳房腫瘍細胞を注射したNOD/SCIDマウスを、腫瘍量が $65\sim 200\text{mm}^3$ に達した後に、対照抗体(黒色のバー)または抗Notch2/3抗体59R1(白色のバー)で治療した。腫瘍量の平均を、細胞注射後18日目、25日目、39日目、および42日目に測定した。59R1抗体による治療は対照と比較して腫瘍成長を阻害した($***p<0.001$ 、42日目)。

【図6】抗Notch2/3抗体59R1はパクリタキセル治療後のB51乳房腫瘍再発を遅らせる。

【図7】抗Notch2/3抗体59R1はB51乳房腫瘍における癌幹細胞頻度を減少させる。

【図8】抗Notch2/3抗体59R1とゲムシタピンとの組み合わせはPN4膵臓腫瘍の成長を阻害する。

【図9】抗Notch2/3抗体59R1はM4黒色腫異種移植片モデルにおける腫瘍成長を阻害する。

【図10】抗Notch2/3抗体59R1は単独で、およびイリノテカンと組み合わせてC28結腸腫瘍の成長を阻害する。

【図11A】59R1 IgG2抗体は、インビボで、確立したヒト腫瘍異種移植片の腫瘍成長を有意に阻害する。指示された 15mg/kg の抗体(1B711、LZ-1対照抗体、黒四角;59R1、黒三角;アパスチン、黒丸;アパスチン+59R1、黒ダイヤモンド)を1週間に1回使用して、確立したColo-205腫瘍(s.c、一群あたり $n=10$)を治療した。腫瘍量(x軸)を経時的にプロットした(y軸)。Colo-205異種移植片モデルでは、59R1とアパスチンの併用療法は、抗体単独での治療より有意に有効であった。図11B~11Hにおいて、星印は、示した日での有意な腫瘍成長阻害を示す。 $*$ 、 $P<0.05$; $**$ 、 $P<0.01$; $***$ 、 $P<0.001$ 、スチューデントt検定;記号、平均;バー、SEM。

【図11B】59R1 IgG2抗体は、インビボで、確立したヒト腫瘍異種移植片の腫瘍成長を有意に阻害する。指示された 15mg/kg の抗体(1B711、LZ-1対照抗体、黒四角;59R1、黒三角;アパスチン、黒丸;アパスチン+59R1、黒ダイヤモンド)を1週間に1回使用して、確立したC8腫瘍(s.c、一群あたり $n=10$)を治療した。腫瘍量(x軸)を経時的にプロットした(y軸)。Colo-205異種移植片モデルでは、59R1とアパスチンの併用療法は、抗体単独での治療より有意に有効であった。図11B~11Hにおいて、星印は、示した日での有意な腫瘍成長阻害を示す。 $*$ 、 $P<0.05$; $**$ 、 $P<0.01$; $***$ 、 $P<0.001$ 、スチューデントt検定;記号、平均;バー、SE

10

20

30

40

50

M。

【図 1 1 C】59R1 IgG2抗体は、インビボで、確立したヒト腫瘍異種移植片の腫瘍成長を有意に阻害する。指示された15mg/kgの抗体(1B711、LZ-1対照抗体、黒四角;59R1、黒三角;アバスチン、黒丸;アバスチン+59R1、黒ダイヤモンド)を1週間に1回使用して、確立したPN8腫瘍(s.c、一群あたりn=10)を治療した。腫瘍量(x軸)を経時的にプロットした(y軸)。Colo-205異種移植片モデルでは、59R1とアバスチンの併用療法は、抗体単独での治療より有意に有効であった。図11B~11Hにおいて、星印は、示した日での有意な腫瘍成長阻害を示す。*、P<0.05; **、P<0.01; ***、P<0.001、スチューデントt検定;記号、平均;バー、SEM。

【図 1 1 D】59R1 IgG2抗体は、インビボで、確立したヒト腫瘍異種移植片の腫瘍成長を有意に阻害する。指示された15mg/kgの抗体(1B711、LZ-1対照抗体、黒四角;59R1、黒三角;アバスチン、黒丸;アバスチン+59R1、黒ダイヤモンド)を1週間に1回使用して、確立したB34腫瘍(s.c、一群あたりn=10)を治療した。腫瘍量(x軸)を経時的にプロットした(y軸)。Colo-205異種移植片モデルでは、59R1とアバスチンの併用療法は、抗体単独での治療より有意に有効であった。図11B~11Hにおいて、星印は、示した日での有意な腫瘍成長阻害を示す。*、P<0.05; **、P<0.01; ***、P<0.001、スチューデントt検定;記号、平均;バー、SEM。

【図 1 1 E】59R1 IgG2抗体は、インビボで、確立したヒト腫瘍異種移植片の腫瘍成長を有意に阻害する。指示された15mg/kgの抗体(1B711、LZ-1対照抗体、黒四角;59R1、黒三角;アバスチン、黒丸;アバスチン+59R1、黒ダイヤモンド)を1週間に1回使用して、確立したB39腫瘍(s.c、一群あたりn=10)を治療した。腫瘍量(x軸)を経時的にプロットした(y軸)。Colo-205異種移植片モデルでは、59R1とアバスチンの併用療法は、抗体単独での治療より有意に有効であった。図11B~11Hにおいて、星印は、示した日での有意な腫瘍成長阻害を示す。*、P<0.05; **、P<0.01; ***、P<0.001、スチューデントt検定;記号、平均;バー、SEM。

【図 1 1 F】59R1 IgG2抗体は、インビボで、確立したヒト腫瘍異種移植片の腫瘍成長を有意に阻害する。指示された15mg/kgの抗体(1B711、LZ-1対照抗体、黒四角;59R1、黒三角;アバスチン、黒丸;アバスチン+59R1、黒ダイヤモンド)を1週間に1回使用して、確立したB44腫瘍(s.c、一群あたりn=10)を治療した。腫瘍量(x軸)を経時的にプロットした(y軸)。Colo-205異種移植片モデルでは、59R1とアバスチンの併用療法は、抗体単独での治療より有意に有効であった。図11B~11Hにおいて、星印は、示した日での有意な腫瘍成長阻害を示す。*、P<0.05; **、P<0.01; ***、P<0.001、スチューデントt検定;記号、平均;バー、SEM。

【図 1 1 G】59R1 IgG2抗体は、インビボで、確立したヒト腫瘍異種移植片の腫瘍成長を有意に阻害する。指示された15mg/kgの抗体(1B711、LZ-1対照抗体、黒四角;59R1、黒三角;アバスチン、黒丸;アバスチン+59R1、黒ダイヤモンド)を1週間に1回使用して、確立したPE-13腫瘍(s.c、一群あたりn=10)を治療した。腫瘍量(x軸)を経時的にプロットした(y軸)。Colo-205異種移植片モデルでは、59R1とアバスチンの併用療法は、抗体単独での治療より有意に有効であった。図11B~11Hにおいて、星印は、示した日での有意な腫瘍成長阻害を示す。*、P<0.05; **、P<0.01; ***、P<0.001、スチューデントt検定;記号、平均;バー、SEM。

【図 1 1 H】59R1 IgG2抗体は、インビボで、確立したヒト腫瘍異種移植片の腫瘍成長を有意に阻害する。指示された15mg/kgの抗体(1B711、LZ-1対照抗体、黒四角;59R1、黒三角;アバスチン、黒丸;アバスチン+59R1、黒ダイヤモンド)を1週間に1回使用して、確立したT1腫瘍(s.c、一群あたりn=10)を治療した。腫瘍量(x軸)を経時的にプロットした(y軸)。Colo-205異種移植片モデルでは、59R1とアバスチンの併用療法は、抗体単独での治療より有意に有効であった。図11B~11Hにおいて、星印は、示した日での有意な腫瘍成長阻害を示す。*、P<0.05; **、P<0.01; ***、P<0.001、スチューデントt検定;記号、平均;バー、SEM。

【図 1 2 A】様々な異種移植片腫瘍モデルにおける59R1治療によって、選択された遺伝子

の相対発現レベルが有意に調節される。以前に試験された異種移植片モデルからのTaqMan (登録商標)分析によって、HEYLの発現レベルを個々に試験した。特に、エストロゲンの欠如(ne)によって、T1を有するマウスの宿主間質におけるANGPT1発現およびANGPT2発現の低下における59R1の作用が無くなった。白丸は、分析した個々の腫瘍に対応する。水平線、平均。

【図12B】様々な異種移植片腫瘍モデルにおける59R1治療によって、選択された遺伝子の相対発現レベルが有意に調節される。以前に試験された異種移植片モデルからのTaqMan (登録商標)分析によって、Notch3の発現レベルを個々に試験した。特に、エストロゲンの欠如(ne)によって、T1を有するマウスの宿主間質におけるANGPT1発現およびANGPT2発現の低下における59R1の作用が無くなった。白丸は、分析した個々の腫瘍に対応する。水平線、平均。

10

【図12C】様々な異種移植片腫瘍モデルにおける59R1治療によって、選択された遺伝子の相対発現レベルが有意に調節される。以前に試験された異種移植片モデルからのTaqMan (登録商標)分析によって、RGS5の発現レベルを個々に試験した。特に、エストロゲンの欠如(ne)によって、T1を有するマウスの宿主間質におけるANGPT1発現およびANGPT2発現の低下における59R1の作用が無くなった。白丸は、分析した個々の腫瘍に対応する。水平線、平均。

【図12D】様々な異種移植片腫瘍モデルにおける59R1治療によって、選択された遺伝子の相対発現レベルが有意に調節される。以前に試験された異種移植片モデルからのTaqMan (登録商標)分析によって、ANGPT1の発現レベルを個々に試験した。特に、エストロゲンの欠如(ne)によって、T1を有するマウスの宿主間質におけるANGPT1発現およびANGPT2発現の低下における59R1の作用が無くなった。白丸は、分析した個々の腫瘍に対応する。水平線、平均。

20

【図12E】様々な異種移植片腫瘍モデルにおける59R1治療によって、選択された遺伝子の相対発現レベルが有意に調節される。以前に試験された異種移植片モデルからのTaqMan (登録商標)分析によって、ANGPT2の発現レベルを個々に試験した。特に、エストロゲンの欠如(ne)によって、T1を有するマウスの宿主間質におけるANGPT1発現およびANGPT2発現の低下における59R1の作用が無くなった。白丸は、分析した個々の腫瘍に対応する。水平線、平均。

【図13】59R1が抗腫瘍効力を示した乳房腫瘍の多くにおいて、腫瘍抑制PTEN遺伝子に欠失がある。10番染色体にあるPTEN遺伝子内のPTENエキソン、Affymetrixプローブ分布、および欠失を示した。濃い灰色のバーおよび薄い灰色のバーは、それぞれ、染色体断片のホモ接合性欠失およびヘテロ接合性欠失を示す。

30

【図14】59R1抗体のエピトープマッピングを示す。(A)ヒトNotchホモログのタンパク質アラインメントを示す。アラインメントはClone Manager Softwareによって行った。ヒトNotch1、Notch2、およびNotch4のEGF10反復、ならびにヒトNotch3のEGF同等物であるEGF9は、示した通りのものである。囲みの領域は、59R1 IgG2抗体と、hNotch2 H385N AL 388-89 SN変異体(図14B)およびhNotch2配列と一致するようにaa382~386が変異しているhNotch1構築物(図14C)とのFACS結合によって規定された、59R1エピトープの少なくとも一部を構成する1つまたは複数のアミノ酸を含有する領域を示す。(B)59R1 IgG2抗体はhNotch2に結合するが、ある特定のEGF10残基がhNotch1残基(H385N AL 388-89 SN)に変異している変異体hNotch2には結合しない。(C)59R1 IgG2抗体はhNotch1に結合しないが、hNotch2残基385~389と適合するようにある特定のEGF10残基(aa382~387)が変異している変異体hNotch1には結合する。

40

【図15A】59R5のインビトロ特徴付けを示す。抗体59R5が、リガンドにより誘導されたNotch2シグナル伝達およびNotch3シグナル伝達をブロックできることを示す。PC3腫瘍細胞を、ヒトまたはマウスNotch受容体(hN2、ヒトNotch2;mN2、マウスNotch2;hN3、ヒトNotch3;mN3、マウスNotch3)およびGFP誘導性レポーター構築物で一過的にトランスフェクトした。トランスフェクトされた細胞を、受動的に固定化されたDLL4 Fcの存在下で、異なる濃度の抗体59R1および59R5とインキュベートした。

50

【図15B】59R5のインビトロ特徴付けを示す。59R5が59R1とほぼ同じエピトープに結合することを示す。HEK293細胞を、ヒトNotch2をコードする発現ベクター、ヒトNotch1をコードする発現ベクター、または残基382-386が対応するヒトNotch2残基に変異しているヒトNotch1をコードする発現ベクターで一過的にトランスフェクトした。細胞を、トランスフェクトされたプラスミドを有する細胞に印を付けるために、緑色蛍光タンパク質(GFP)をコードするプラスミドでもコトランスフェクトした。細胞を、59R1または59R5ならびに蛍光二次抗体とインキュベートし、次いで、FACSによって調べた。囲みで強調した領域は、指示されたNotch発現ベクターでトランスフェクトされた細胞が59R1または59R5に結合できたことを示唆している。

【図16A】Notch受容体抗体59R5はインビボで腫瘍の形成および成長を阻害する。抗体59R5によるPE13乳房腫瘍細胞のインビボ治療を示す。 10

【図16B】Notch受容体抗体59R5はインビボで腫瘍の形成および成長を阻害する。抗体59R5によるC28結腸細胞のインビボ治療を示す。

【図16C】Notch受容体抗体59R5はインビボで腫瘍の形成および成長を阻害する。抗体59R5によるColo205結腸細胞のインビボ治療を示す。

【図17】Notch2/3抗体59R5を併用治療で用いた、腫瘍のインビボ治療を示す。(A)マウスにPN8膵臓腫瘍細胞を注射した。120mm³の平均体積に達するまで、腫瘍を33日間、成長させた。動物を、20mg/kgのゲムシタピンと、対照Ab(四角)、59R1(三角)、または59R5(丸)と組み合わせて、4週間にわたって週1回治療した。(B)マウスにPE13乳房腫瘍細胞を注射した。治療を開始するまで40日間、腫瘍を成長させた。動物を、15mg/kgのタキソールと対照抗体(四角)または59R5(丸)を用いて、5週間にわたって週2回治療した。5週間後に、タキソール治療を止め、抗体治療を続けた。 20

【図18】抗体59R5で治療した後の腫瘍における遺伝子発現の調節を示す。図18は、59R1、59R5、または対照抗体で治療した後の、間質細胞における選択された遺伝子の発現レベルおよびPE13腫瘍細胞における選択されたヒト遺伝子の発現レベルを示す。

【図19A】59R1によるPE13乳癌幹細胞頻度の低下を示す。確立した腫瘍を、対照抗体、タキソール+対照抗体、59R1、またはタキソール+59R1で治療した。3週間の治療後に腫瘍を採取し、処理し、4種類の治療群それぞれから連続測定したヒト細胞を、新たな組のマウス(n=10/細胞投与)に移植した。75日後に腫瘍成長速度を求めた。75日間成長させた後の腫瘍成長速度を用いて、L-calcプログラム(Stem Cell Technologies, Inc.)を使用してCSC頻度を計算した。 30

【図19B】59R1によるPE13乳癌幹細胞頻度の低下を示す。59R1および/またはタキソールで治療した後のPE13乳房腫瘍における癌幹細胞頻度を示す。

【図19C】59R1によるPE13乳癌幹細胞頻度の低下を示す。59R1および/またはゲムシタピンで治療した後のPN4膵臓腫瘍における癌幹細胞頻度を示す。

【図19D】59R1によるPE13乳癌幹細胞頻度の低下を示す。59R5および/またはタキソールで治療した後のPE13乳房腫瘍における癌幹細胞頻度を示す。1個の星印は、対照抗体治療群に対する統計的に有意な差(p<0.05)を示す。2個の星印は、タキソールおよび対照抗体で治療した群に対する有意差を示す。

【発明を実施するための形態】 40

【0058】

発明の詳細な説明

本発明は、Notch2および/またはNotch3などの1つまたは複数の種類のヒトNotch受容体に結合する抗体などのポリペプチドを含むがこれらに限定されない新規な剤を提供する。Notch結合剤はヒトNotch受容体のアンタゴニストを含む。関連するポリペプチドおよびポリヌクレオチド、Notch結合剤を含む組成物、ならびにNotch結合剤の作製方法も提供される。腫瘍増殖を阻害する方法、血管新生を阻害する方法、および/または癌もしくは他の血管新生関連の疾病を治療する方法などの新規なNotch結合剤の使用方法がさらに提供される。

【0059】

50

本発明はさらにヒトNotch受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に特異的に結合し且つインビボで腫瘍増殖を阻害する分子（例えば抗体）を同定する。リガンド結合に必要なかつ十分なNotchのリガンド結合領域はEGF反復11および12として同定され、Notch受容体のこの領域がNotchシグナル伝達および腫瘍形成に重要であることを示唆している（Rebay et al., 1991, Cell 67:687; Lei et al., 2003, Dev. 130:6411; Hambleton et al., 2004, Structure 12: 2173）。意外にも、ヒトNotch受容体の細胞外ドメインのリガンド結合ドメイン外に結合する抗体がインビボで腫瘍細胞の増殖を阻害することが見いだされた（参照により全体として本明細書に組み入れられる米国特許出願公報第2008/0131434号を参照）。従って、ヒトNotch受容体-Notch1、Notch2、Notch3、およびNotch4-の1つまたは複数の細胞外ドメインのリガンド結合ドメイン外に結合する抗体は、潜在的な癌治療として価値を有する。

10

【0060】

ヒトNotch2のEGF反復10内の残基を含むエピトープに特異的に結合する抗体が現在同定されている（実施例1および3ならびに図3A~3C）。抗体の59R1は、リガンド結合領域外の領域でNotch2に結合するにも関わらず、Notch2に対するリガンドの結合を阻害し（実施例1および図1A~1D）、リガンド誘導性Notch2シグナル伝達を阻害する（実施例4および図4A~4C）。59R1はヒトNotch3にも特異的に結合する（実施例2および図2）。抗体は、単独であるいは第二の抗癌剤と組み合わせて、種々の異なる異種移植モデルにおいてインビボで腫瘍細胞の増殖を妨げるまたは阻害することが見いだされてきた（実施例5、6、7および9ならびに図5A~F、6、8~10および11A~H）。抗体は、癌幹細胞の頻度を減少させることにより、複数の異種移植モデルにおいてインビボで腫瘍の腫瘍原性を低減することも示された（実施例8および23ならびに図7および19A~C）。その上、59R1による処理は、様々な腫瘍の間質においてRGS5（周皮細胞および/または血管平滑筋細胞のマーカー）、Notch3、およびHeyLの発現を下方調節し（実施例10および図12A~E）、乳房および結腸の腫瘍において低酸素症を上方調節することが見いだされた（実施例11）。理論に拘束されなければ、これらのデータは、周皮細胞および/または血管平滑筋細胞の機能調節に少なくとも一部は起因する腫瘍血管新生に59R1抗体が阻害効果を有することを示している。59R1による処理は乳房腫瘍において更なる遺伝子を制御することも見出した。細胞周期遺伝子経路、myc活性化遺伝子および幾つかの幹細胞遺伝子のセットが59R1により下方調節されることが見いだされた（実施例22）。

20

30

【0061】

更なるヒト抗体の59R5も開発された。59R5は、Notch2およびNotch3に対する同様な結合親和性ならびにそれらのエピトープにおける類似性および重複など、59R1と同様な性質を有する（実施例13および図15B）。抗体59R5は、Notch2およびNotch3のシグナル伝達の阻害において59R1と同様な活性を有することが示された（実施例13および図15A）。59R5抗体は、単独であるいは第二の抗癌剤と組み合わせて、いくつかの異種移植モデルにおいてインビボで腫瘍増殖を阻害することも示された（実施例14および15ならびに図16A~Cおよび17A~B）。その上、59R1のように、59R5による処理は、様々な腫瘍の間質においてRGS5、Notch3、およびHeyLの発現を下方調節することが見いだされ、59R5は、59R1と同程度まで腫瘍細胞におけるヒト遺伝子のID4、EDNRA、およびEGLN3の発現を調節することも見いだされた（実施例16）。59R5はさらに癌幹細胞の頻度を減少させることにより異種移植モデルにおいてインビボで腫瘍原性を低減することが示された（実施例23および19D）。

40

【0062】

定義

Notch受容体の「アンタゴニスト」は、Notch経路の生物活性を部分的にまたは完全に遮断し、阻害し、または中和する任意の分子を含む用語である。適切なアンタゴニスト分子は、具体的には、アンタゴニスト抗体または抗体断片を含む。

【0063】

「抗体」という用語は、免疫グロブリン分子の可変領域内の少なくとも1つの抗原認識部位を通じて、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、炭水化物、ポリヌクレオチド、脂

50

質、または前記の組み合わせなどの標的を認識し特異的に結合する免疫グロブリン分子を意味するために用いられる。本明細書で用いられるように、当該用語は、無傷ポリクローナル抗体、無傷モノクローナル抗体、抗体断片 (Fab、Fab'、F(ab')₂、およびFv断片など)、一本鎖Fv (scFv) 変異体、少なくとも2つの無傷抗体から作製される二重特異性抗体などの多重特異性抗体、抗体部分を含む融合タンパク質、ならびに抗体が所望の生物活性を示す限り抗原認識部位を含む任意の他の改変免疫グロブリン分子を包含する。抗体は、それぞれ、 γ 、 μ 、および δ および μ と呼ばれる重鎖定常ドメインの同定に基づいて、免疫グロブリンの5つの主要なクラス、即ちIgA、IgD、IgE、IgG、およびIgMのいずれか、またはそれらのサブクラス (アイソタイプ) (例えばIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1およびIgA2) であり得る。免疫グロブリンの異なるクラスは、異なる周知のサブユニット構造および三次元立体配置を有する。抗体は露出または毒素、放射性同位元素などの他の分子とコンジュゲートし得る。

10

【0064】

本明細書で用いられるように、「抗体断片」という用語は、無傷抗体の一部を指し、無傷抗体の抗原決定可変領域を指す。抗体断片の例は、Fab、Fab'、F(ab')₂、およびFv断片、直鎖抗体、一本鎖抗体、および抗体断片から形成される多重特異性抗体を含むがこれらに限定されない。

【0065】

「Fv抗体」は、1つの重鎖および1つの軽鎖の可変ドメインが非共有二量体を形成する二本鎖として、あるいは2つの鎖が類似する二量体構造に結びつくように1つの重鎖および1つの軽鎖の可変ドメインが柔軟なペプチドリンカーにより共有結合する一本鎖 (scFv) として、完全な抗原認識部位および抗原結合部位を含む最小の抗体断片を指す。この立体配置において、それぞれの可変ドメインの相補性決定領域 (CDR) は相互作用してFv二量体の抗原結合特異性を定める。あるいは、単一の可変ドメイン (すなわちFvの半分) が抗原を認識し結合するために使用され得るが、一般に親和性は低い。

20

【0066】

本明細書で用いられる「モノクローナル抗体」は、単一の抗原決定基、すなわちエピトープの高度に特異的な認識および結合に關与する均一な抗体集団を指す。これは、異なる抗原決定基に対する異なる抗体を通常含むポリクローナル抗体と対照的である。「モノクローナル抗体」という用語は、無傷かつ完全長のモノクローナル抗体の両方、ならびに抗体断片 (Fab、Fab'、F(ab')₂、Fvなど)、一本鎖 (scFv) 変異体、抗体部分を含む融合タンパク質、および抗原認識部位を含む任意の他の改変免疫グロブリン分子を包含する。さらに、「モノクローナル抗体」は、ハイブリドーマ、ファージ選別、組換え発現、およびトランスジェニック動物を含むがこれらの限定されない多数の方法で作製されるような抗体を指す。

30

【0067】

本明細書で用いられるように、「ヒト化抗体」という用語は、特異的な免疫グロブリン鎖であるヒト以外の (例えばマウス) 抗体、キメラ免疫グロブリン、または最小の非ヒト配列を含むこれらの断片の形態を指す。通常、ヒト化抗体は、相補性決定領域 (CDR) 由来の残基が所望の特異性、親和性および能力を有するヒト以外の種 (例えば、マウス、ラット、ウサギ、ハムスターなど) のCDRに由来する残基に置換されているヒト免疫グロブリンである。ある場合には、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク領域 (FR) 残基は、所望の特異性、親和性および能力を有するヒト以外の種に由来する抗体の対応する残基と置換される。ヒト化抗体は、抗体の特異性、親和性、および/または能力を改良し最適化するために、Fvフレームワーク領域、および/または置換された非ヒト残基内のいずれかで更なる残基の置換によりさらに改変され得る。一般に、ヒト化抗体は、非ヒト免疫グロブリンに対応するCDR領域の全てまたは実質的に全てを含む、少なくとも1つ、通常2つまたは3つの可変ドメインを実質的に全て含む一方、FR領域の全てまたは実質的に全てはヒト免疫グロブリン共通配列のものである。ヒト化抗体は免疫グロブリン定常領域またはドメイン (Fc) の少なくとも一部、通常ヒト免疫グロブリンのものも含み得る。ヒト化抗体

40

50

を作製するために用いられる方法の例は米国特許第5,225,539号に記載されており、参照により本明細書に組み入れられる。

【0068】

抗体の「可変領域」は、単独であるいは組み合わせてのいずれかでの、抗体軽鎖の可変領域または抗体重鎖の可変領域を指す。重鎖および軽鎖の可変領域は、超可変領域としても知られる3つの相補性決定領域(CDR)と連結した4つのフレームワーク領域(FR)からそれぞれ成る。各鎖のCDRはFRにより他鎖由来のCDRと近接して結合し、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する。CDRを決定するには2つの技法が存在する：(1)異種間の配列多様性に基づく手法(即ち、Kabat et al. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, (5th ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda Md.));および(2)抗原抗体複合体の結晶学的研究に基づく手法(Al-lazikani et al 1997, *J. Molec. Biol.* 273:927-948)。さらに、これら2手法の組み合わせがCDRを決定するために当技術分野において時折用いられる。

10

【0069】

本明細書で用いられる「ヒト抗体」という用語は、人間により産生される抗体または当技術分野で公知の技術のいずれかを用いて作製され、人間により産生される抗体に対応するアミノ酸配列を有する抗体を意味する。ヒト抗体のこの定義は、無傷もしくは完全長の抗体、それらの断片、ならびに/または、例えばマウス軽鎖およびヒト重鎖ポリペプチドを含む抗体など、少なくとも1つのヒト重鎖および/もしくは軽鎖ポリペプチドを含む抗体を含む。

20

【0070】

「ハイブリッド抗体」は、2つの異なるエピトープまたは2つの異なる抗原が得られる4量体により認識され結合され得るように、異なる抗原決定基領域をもつ抗体に由来する重鎖および軽鎖の対が会合する免疫グロブリン分子である。

【0071】

「キメラ抗体」という用語は、免疫グロブリン分子のアミノ酸配列が2つ以上の種に由来する抗体を指す。通常、軽鎖および重鎖の両可変領域は、所望の特異性、親和性、および能力を備えた哺乳動物(例えばマウス、ラット、ウサギなど)の1種に由来する抗体の可変領域に対応する一方、定常領域は該種で免疫応答を引き起こすことを避けるために別(通常ヒト)に由来する抗体の配列と相同である。

30

【0072】

「エピトープ」または「抗原決定基」という用語は、本明細書において交換可能に用いられ、特定の抗体により認識され特異的に結合され得る抗原の部分を指す。抗原がポリペプチドである場合、エピトープは、タンパク質の三次折り畳みにより並置された隣接アミノ酸と非隣接アミノ酸との両方から形成され得る。隣接アミノ酸から形成されるエピトープは通常タンパク質変性でも保持される一方、三次折り畳みにより形成されるエピトープは通常タンパク質変性で消失する。エピトープは、特有の空間立体配座に通常少なくとも3、より普通には少なくとも5または8~10個のアミノ酸を含む。

【0073】

抗体間の競合は、試験される免疫グロブリンが共通抗原に対する参照抗体の特異的結合を阻害する分析により測定される。多種類の競合結合分析が知られており、例えば、固相直接または間接放射免疫測定(RIA)、固相直接または間接酵素免疫測定(EIA)、サンドイッチ競合分析(Stahli et al., 1983, *Methods in Enzymology* 9:242-253を参照)、固相直接ピオチン-アビジンEIA(Kirkland et al., *J. Immunol* 1986, 137:3614-3619を参照)、固相直接標識分析、固相直接標識サンドイッチ分析(Harlow and Lane, 1988, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Pressを参照)、I-125標識を用いる固相直接標識RIA(Morel et al., 1988, *Molec. Immunol.* 25(1):7-15を参照)、固相直接ピオチン-アビジンEIA(Cheung et al., 1990, *Virology* 176:546-552)、および直接標識RIA(Moldenhauer et al., 1990, *Scand. J. Immunol.* 32:77-82)である。通常、このような分析は、非標識試験免疫グロブリンおよび標識参照免疫グロブリンのいずれか

40

50

を保持する固体表面または細胞に結合させた精製抗原の使用を含む。競合阻害は、試験免疫グロブリンの存在下で固体表面または細胞に結合した標識の量を決定することにより測定される。通常、試験免疫グロブリンは過剰に存在する。競合分析により同定される抗体（競合抗体）は、参照抗体と同じエピトープに結合する抗体、および立体障害が起きるように参照抗体と結合したエピトープの十分近位にある隣接エピトープに結合する抗体を含む。通常、競合抗体が過剰に存在する場合、共通抗原に対する参照抗体の特異的結合を少なくとも50%または75%まで阻害する。

【0074】

抗体がエピトープまたは受容体に「選択的に結合する」または「特異的に結合する」とは、抗体が、非関連タンパク質を含む代替物質とより頻繁に、急速に、長い持続時間で、高い親和性で、または上記の幾つかの組み合わせで、エピトープまたは受容体と反応または会合することを意味する。「選択的に結合する」または「特異的に結合する」とは、例えば、抗体が約0.1mM以下、より通常では約1 μ M以下の K_D でタンパク質と結合することを意味する。「選択的に結合する」または「特異的に結合する」は、抗体が約0.1mM以下、時には約1 μ M以下、時には約0.1 μ M以下、時には約0.01 μ M以下、および時には約1nM以下の K_D でタンパク質と結合することを意味するときもある。異なる種における相同タンパク質間の配列同一性のため、特異的結合は複数の種のNotch受容体を認識する抗体を含み得る。同様に、受容体のポリペプチド配列の一定の領域における異なるNotch受容体（例えば、Notch2およびNotch3）間の相同性のため、特異的結合は複数のNotch受容体を認識する抗体を含み得る。幾つかの態様においては、一次標的に特異的に結合する抗体または結合部分は二次標的に特異的に結合してもよく、または結合していなくてもよいと理解される。このように、「特異的に結合する」とは、排他的な結合、即ち単一の標的との結合を必ずしも必要としない（が、含み得る）。従って、抗体は、ある態様において、複数の標的（例えばヒトNotch2およびNotch3）に特異的に結合し得る。ある態様において、複数の標的が該抗体の同一の抗原結合部位により結合し得る。例えば、抗体は、場合によっては、2つの同一の抗原結合部位を含んでもよく、そのそれぞれが2つ以上のヒトNotch受容体（例えばヒトNotch2およびNotch3）に特異的に結合する。ある別の態様において、抗体は二重特異性であり異なる特異性をもつ少なくとも2つの抗原結合部位を含み得る。非限定的実施例として、二重特異性抗体は、ヒトNotch2などの1つのNotch受容体のエピトープを認識する1つの抗原結合部位を含んでもよく、さらにヒトNotch3などの第二のNotch受容体の異なるエピトープを認識する第二の異なる抗原結合部位を含む。一般に、本明細書の「結合」についての言及は「特異的結合」を意味するが、必ずしもそうではない。

【0075】

本明細書で用いられるように、「非特異的結合」および「バックグラウンド結合」という用語は、抗体とタンパク質またはペプチドとの相互作用についての言及で用いられる場合、特定構造の存在に依存しない相互作用を指す（即ち、抗体は一般にエピトープなどの特定構造よりむしろタンパク質に結合する）。

【0076】

「単離された」または「精製された」という用語は、通常天然の状態が付随する構成要素を実質的にまたは本質的に含まない物質を指す。純度および均一性は通常、ポリアクリルアミドゲル電気泳動または高速液体クロマトグラフィーなどの分析化学技術を用いて測定される。調製物に存在する優勢種であるタンパク質（例えば抗体）または核酸は実質的に精製されている。具体的には、単離された核酸は、天然で該遺伝子に隣接するオープンリーディングフレームから分離され、該遺伝子によりコードされるタンパク質以外のタンパク質をコードする。単離された抗体は、他の非免疫グロブリンタンパク質および異なる抗原結合特異性をもつ他の免疫グロブリンタンパク質から分離される。核酸またはタンパク質は少なくとも85%純粋であり、少なくとも95%純粋であり、幾つかの態様においては少なくとも99%純粋であることも意味し得る。

【0077】

本明細書で用いられるように、「癌」および「癌性の」という用語は、細胞集団が無秩

10

20

30

40

50

序な細胞増殖により特徴付けられる哺乳動物の生理的状态を言及または記載する。癌の例は、上皮性悪性腫瘍、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、および白血病を含むがこれらに限定されない。このような癌のより具体的な例は、扁平上皮細胞癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺の腺癌、肺の扁平上皮癌、腹膜の癌、肝細胞癌、消化管癌、膵癌、グリア芽腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝癌、膀胱癌、肝癌、乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜または子宮の癌、唾液腺癌、腎癌、肝癌、前立腺癌、外陰癌、甲状腺癌、肝癌、ならびに多種類の頭部および頸部の癌を含む。

【0078】

「増殖性疾患」および「増殖性疾病」という用語は、癌などの異常な細胞増殖に関連する疾患を指す。

10

【0079】

本明細書で用いられる「腫瘍」および「新生物」は、良性（非癌性）または前癌性病変を含む悪性（癌性）のいずれかの過度な細胞の成長または増殖に起因する任意の組織塊を指す。

【0080】

本明細書で用いられる「転移」は、癌が出現部位から他の身体領域に広がりまたは移転し、新たな場所で同様な癌性病変の進行を伴う過程を指す。「転移の」または「転移する」細胞は、近隣細胞と付着接触を失い、疾病の原発部位から血流またはリンパ液を介して移動し近隣の身体構造に浸潤する細胞である。

【0081】

本明細書で用いられるように、「被験体」という用語は、ヒト、人間以外の霊長類、齧歯動物などを含むがこれらの限定されない任意の動物（例えば、哺乳動物）を指し、特定治療の受容者である。通常、「被験体」および「患者」という用語は、ヒトの被験体に関しては本明細書において交換可能に用いられる。

20

【0082】

「癌幹細胞」または「腫瘍幹細胞」または「固形腫瘍幹細胞」という用語は、本明細書において交換可能に用いられ、(1) 広範な増殖能を有し、(2) 非対称細胞分裂により増殖能および発生能の低下した1種類または複数種の分化した子孫を生み出すことができ、ならびに(3) 自己再生または自己維持のため対称細胞分裂ができる、固形腫瘍由来の細胞集団を指す。「癌幹細胞」または「腫瘍幹細胞」または「固形腫瘍幹細胞」のこれらの性質は、腫瘍を形成しない大部分の腫瘍細胞と比較して、免疫不全マウスに連続移植すると触知可能な腫瘍を形成する能力を該癌幹細胞に与える。癌幹細胞は、無秩序な様式で自己再生対分化を行い、突然変異が起きる期間にわたって変化し得る異常な細胞型をもつ腫瘍を形成する。

30

【0083】

「癌細胞」または「腫瘍細胞」という用語および文法的に等価な語は、腫瘍に由来する全細胞集団を指し、腫瘍細胞集団の大部分を含む非腫瘍形成細胞と腫瘍形成幹細胞（癌幹細胞）の両方を含む。

【0084】

本明細書で用いられるように、「腫瘍形成の」とは、自己再生（さらなる腫瘍形成癌幹細胞を生じる）および固体腫瘍幹細胞が腫瘍を形成できる他のあらゆる腫瘍細胞を生成する増殖（分化しているため非腫瘍形成腫瘍細胞を生じる）の性質を含む、固体腫瘍幹細胞の機能的特色を指す。

40

【0085】

本明細書で用いられるように、腫瘍の「腫瘍原性」とは、腫瘍由来細胞の無作為試料が免疫不全マウスへの連続移植で触知可能な腫瘍を形成できる能力を指す。

【0086】

本明細書で用いられるように、「幹細胞癌マーカー」または「癌幹細胞マーカー」または「腫瘍幹細胞マーカー」または「固体腫瘍幹細胞マーカー」という用語は、遺伝子、または該遺伝子により発現され、その発現レベルが、単独でもしくは他の遺伝子と組み合わ

50

せて、非腫瘍形成細胞と比較して腫瘍形成癌細胞の存在と相関するタンパク質、ポリペプチド、またはペプチドを指す。相関関係は遺伝子発現の増減（例えばmRNAまたは遺伝子によりコードされるペプチドの増減レベル）のいずれかに関連し得る。

【0087】

「癌幹細胞遺伝子特性」または「腫瘍幹細胞遺伝子特性」または「癌幹細胞特性」という用語は、本明細書において交換可能に用いられ、他の細胞または細胞集団、例えば正常な乳房上皮組織と比較して癌幹細胞で差次的に発現する遺伝子を含む遺伝子特性を指す。幾つかの態様において、癌幹細胞遺伝子特性は、倍の変化により、例えば2倍に減少および/または上昇した発現により、正常な乳房上皮に対して癌幹細胞で差次的に発現し、例えば複数の試料にわたるt-検定のP値等の統計分析を用いることにより更に限定される遺伝子を含む。別の態様において、癌幹細胞で差次的に発現する遺伝子は、倍または百分率の発現変化と組み合わせて、選択された遺伝子との発現の相関関係に基づいて、癌幹細胞遺伝子特性に分類される。癌幹細胞特性は、転移および死亡を含むがこれらに限定されない臨床的変動の局面を後ろ向きおよび前向きの両方で予測する。

10

【0088】

本明細書で用いられる「遺伝子検査」という用語は、患者の遺伝的構成または患者の腫瘍試料が分析される手法を指す。該分析は、臨床目的で遺伝性または体細胞性の疾病に関連する遺伝子型または核型を検出するために、DNA、RNA、染色体、タンパク質または代謝産物の検出を含み得る。

【0089】

本明細書で用いられるように、「生検」または「生検組織」という用語は、試料が癌性組織を含むか否かを測定する目的で被験体から取り出される組織または体液の試料を指す。幾つかの態様において、被験体に癌の疑いがあるため、生検査組織または体液が採取される。生検組織または体液は次いで癌の有無について調べられる。

20

【0090】

本明細書で用いられるように、「薬学的に許容される担体」は、抗体などの薬学的組成物の活性成分と組み合わせられる場合、例えば抗体がその生物活性を保持できる任意の物質を指す。さらに、「薬学的に許容される担体」は、受容被験体に免疫応答を誘発しない。例には、リン酸緩衝生理食塩水、水、および種々の油/水乳濁液などの標準的な薬学的担体のいずれかが含まれるが、これらに限定されない。エアロゾルまたは非経口投与用の幾つかの希釈剤はリン酸緩衝生理食塩水または通常の生理食塩水（0.9%）である。

30

【0091】

「治療上の有効量」という用語は、被験体または哺乳動物の疾病または疾患を「治療」するために有効な抗体、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、有機小分子、または他の薬物の量を指す。癌の場合、薬物の治療上の有効量は、癌細胞数を減少し、腫瘍の大きさを縮小し、癌細胞の末梢器官への浸潤を阻害または停止し、腫瘍転移を阻害および停止し、腫瘍の増殖を阻害および停止し、癌に関連する1つまたは複数の症状をある程度軽減し、または癌細胞へのこのような影響の組み合わせである。薬物が増殖を妨げ、および/または既存の癌細胞を殺す程度で、細胞増殖抑制性および/または細胞障害性と呼ばれ得る。

【0092】

「治療する」または「治療」または「治療すること」または「緩和する」または「緩和すること」などの用語は、1) 診断された病態または疾患の症状を治療し、減速させ、低減させ、および/または進行を停止する治療策、ならびに2) 標的の病態または疾患の進行を妨げるまたは遅らせる予防策または防止策の両方を指す。従って、治療の必要があるものは、既に疾患があるもの、疾患の傾向があるもの、および疾患が予防されるべきものを含む。幾つかの態様において、患者が、下記の1つまたは複数を示す場合、被験体は本発明の方法に従ってうまく癌「治療」される。癌細胞数の減少または完全な欠如;腫瘍の大きさの縮小;軟組織および骨への癌の広がりを含む末梢器官への癌細胞の浸潤の阻害または欠如;腫瘍転移の阻害または欠如;腫瘍増殖の阻害または欠如;特定の癌に関連する1つまたは複数の症状の緩和;罹患率および死亡率の低下;ならびに生活の質の向上。従って、あ

40

50

る態様において、癌治療は被験体の腫瘍増殖の阻害を含む。

【0093】

本明細書で用いられるように、「ポリヌクレオチド」または「核酸」という用語は、DNAまたはRNAを含むがこれらの限定されないホスホジエステル結合を介して結合する多数のヌクレオチド単位（リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドまたは関連する構造変異体）からなる高分子化合物を指す。該用語は、4-アセチルシトシン、8-ヒドロキシ-N6-メチルアデノシン、アジリジニルシトシン、プソイドイソシトシン、5-（カルボキシヒドロキシメチル）ウラシル、5-フルオロウラシル、5-プロモウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル2-チオウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、1-メチルアデニン、1-メチルプソイドウラシル、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-メチルアデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル2-チオウラシル、-D-マンノシルクエオシン（mannosylqueosine）、5'-メトキシカルボニルメチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸、オキシプトキソシン（oxybutoxosine）、プソイドウラシル、クエオシン、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、N-ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸、および2,6-ジアミノプリンを含むがこれらの限定されないDNAおよびRNAの既知の塩基類似体のいずれかを含む配列を包含する。

10

20

【0094】

「遺伝子」という用語は、ポリペプチド、前駆体、またはRNA（例えば、rRNA、tRNA）の産生に必要なコード配列を含む核酸（例えばDNA）配列を指す。ポリペプチドは、完全長ポリペプチドまたは断片の所望の活性または機能的性質（例えば、酵素活性、リガンド結合、シグナル伝達、免疫原性など）が保持されている限り、完全長コード配列によりまたはコード配列の任意の部分によりコードされ得る。該用語はまた、遺伝子が完全長mRNAの長さに対応するように、構造遺伝子のコード領域、ならびに5'および3'の両末端にコード領域に隣接して位置する両端約1kb以上の距離の配列を包含する。コード領域の5'に位置しmRNAに存在する配列は5'非翻訳配列と呼ばれる。コード領域の3'または下流に位置しmRNAに存在する配列は3'非翻訳配列と呼ばれる。「遺伝子」という用語は、遺伝子のcDNAおよびゲノム形態の両方を包含する。遺伝子のゲノム形態またはクローンは、「イントロン」または「介在領域」または「介在配列」と呼ばれる非コード配列に割り込まれたコード領域を含む。イントロンは核RNA（hnRNA）に転写される遺伝子の分節であり、イントロンはエンハンサーなどの調節要素を含み得る。イントロンは核または一次転写産物から除去すなわち「スプライシング」されるため、イントロンはメッセンジャーRNA（mRNA）転写産物に存在しない。mRNAは、翻訳中に新生ポリペプチドのアミノ酸の配列または順序を特定する機能を果たす。イントロンを含むことに加えて、遺伝子のゲノム形態はRNA転写産物に存在する配列の5'および3'の両末端に位置する配列も含み得る。これらの配列は「隣接」配列または領域と呼ばれる（これらの隣接配列はmRNA転写産物に存在する非翻訳配列の5'および3'に位置する）。5'隣接領域は、遺伝子の転写を制御または影響するプロモータおよびエンハンサーなどの調節配列を含み得る。3'隣接領域は、転写、転写後切断、およびポリアデニル化の終結を指令する配列を含み得る。

30

40

【0095】

細胞、核酸、タンパク質またはベクターに関して用いられる場合の「組み換え」という用語は、細胞、核酸、タンパク質もしくはベクターが異種の核酸もしくはタンパク質の導入、天然の核酸もしくはタンパク質の改変により改変されたこと、または該細胞がこのように改変された細胞に由来することを示す。従って、例えば、組み換え細胞は、細胞の天然（非組み換え）型内で見出されない遺伝子を発現し、過剰発現する天然遺伝子、または例えば天然に存在しない断片もしくはスプライス変異体として発現するなど、別な方法で異常に発現する天然遺伝子を発現する。本明細書の「組み換え核酸」という用語により、

50

例えばポリメラーゼおよびエンドヌクレアーゼを用いた核酸の操作により、一般に本来インビトロで形成され、通常天然で見出されない形態の核酸が意味される。この方法で、異なる配列の機能的連結が達成される。従って、直鎖形態で単離される核酸、または通常連結されていないDNA分子を連結することによりインビトロで形成される発現ベクターは、両方とも本発明の目的のための組み換えとみなされる。組み換え核酸が、一旦作製され宿主細胞または生物に取り込まれると、非組み換えで、すなわちインビトロ操作よりむしろ宿主細胞のインビボ細胞機構を用いて複製されると理解されるが、一度組み換えで産生された後に非組み換えで複製された核酸も依然本発明の目的で組み換えとみなされる。同様に、「組み換えタンパク質」は、組み換え技術を用いて、即ち上述したように組み換え核酸の発現により作製されるタンパク質である。

10

【0096】

本明細書で用いられるように、「ベクター」という用語は、1つの細胞から別の細胞へDNA分節を転移する核酸分子に関して用いられる。「ビヒクル」という用語が「ベクター」と交換可能に用いられることもある。ベクターはしばしばプラスミド、バクテリオファージ、または植物もしくは動物のウイルスに由来する。

【0097】

本明細書で用いられるように、「遺伝子発現」という用語は、遺伝子にコードされる遺伝情報を、遺伝子の「転写」により（例えばRNAポリメラーゼの酵素作用により）RNA（例えば、mRNA、rRNA、tRNA、またはsnRNA）に、タンパク質をコードする遺伝子についてはmRNAの「翻訳」によりタンパク質に変換する過程を指す。遺伝子発現は該過程の多数の段階で調節され得る。「上方調節」または「活性化」とは、遺伝子発現産物（例えばRNAまたはタンパク質）の産生を増加させる調節を指す一方、「下方調節」または「抑制」とは産生を減少させる調節を指す。上方調節または下方調節に関与する分子（例えば転写因子）はそれぞれ「アクチベータ」および「リプレッサー」とも呼ばれる。

20

【0098】

「ポリペプチド」または「ペプチド」または「タンパク質」または「タンパク質断片」という用語は本明細書で交換可能に用いられ、アミノ酸残基の高分子化合物を指す。該用語は、1つまたは複数のアミノ酸残基が対応する天然アミノ酸の人工化学模倣体であるアミノ酸高分子化合物、ならびに天然に存在するアミノ酸高分子化合物および天然に存在しないアミノ酸高分子化合物に適用する。

30

【0099】

「アミノ酸」という用語は、天然に存在するアミノ酸および合成アミノ酸、ならびに天然に存在するアミノ酸と同様に機能するアミノ酸類似体およびアミノ酸模倣体を指す。天然に存在するアミノ酸は遺伝コードによりコードされるもの、ならびに後に修飾されるアミノ酸、例えばヒドロキシプロリン、 γ -カルボキシグルタメート、およびO-ホスホセリンである。アミノ酸類似体は、例えば水素に結合したアルファ炭素、カルボキシル基、アミノ基、およびR基など、天然に存在するアミノ酸と同じ基本的化学構造を有する化合物を指し、例えばホモセリン、ノルロイシン、メチオニンスルホキシド、メチオニンメチルスルホニウムである。このような類似体は、修飾されたR基（例えばノルロイシン）または修飾されたペプチド骨格を有し得るが、天然に存在するアミノ酸と同じ基本的化学構造を保持する。アミノ酸模倣体は、アミノ酸の一般化学構造と異なる構造を有するが天然に存在するアミノ酸と同様に機能する化学化合物を指す。

40

【0100】

「保存改変された変異体」はアミノ酸および核酸の両配列に適用する。「アミノ酸変異体」はアミノ酸配列を指す。特定の核酸配列に関して、保存改変された変異体は、同一もしくは本質的に同一なアミノ酸配列をコードする核酸を指し、または核酸がアミノ酸配列をコードしない場合、本質的に同一なもしくは関連する（例えば天然では連続した）配列を指す。遺伝コードの縮重のため、多数の機能的に同一な核酸が大半のタンパク質をコードする。例えば、GCA、GCC、GCGおよびGCUのコドンは全てアミノ酸のアラニンをコードする。従って、アラニンがコドンに指定されるいずれの位置でも、該コドンはコードされる

50

ポリペプチドを変更することなく上記の他の対応コドンに変更され得る。このような核酸の変異は「サイレント変異」であり、保存改変された変異の1種である。ポリペプチドをコードする本明細書のいずれの核酸配列も核酸のサイレント変異体を表す。ある文脈においては、核酸の各コドン（通常メチオニンの唯一のコドンであるAUGおよび通常トリプトファンの唯一のコドンであるTGGを除く）は改変され機能的に同一な分子を得ることができると認識される。従って、ポリペプチドをコードする核酸のサイレント変異は発現産物に関する上記配列で潜在しているが、実際のプローブ配列に関してはそうではない。アミノ酸配列について、コードされた配列における単一アミノ酸または僅かな比率のアミノ酸を変更、付加または欠失する核酸、ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質の配列に対する個々の置換、欠失または付加は、該変更が結果として化学的に類似するアミノ酸によるアミノ酸の置換をもたらす場合を含む「保存改変された変異体」として認識される。このような保存改変された変異体はさらに本発明の多型変異体、種間相同体、および対立遺伝子にさらに加えられるものであり、これらを排除しない。保存的アミノ酸置換に有用な機能的に類似するアミノ酸を提供する表は当技術分野において周知である。例示的な保存的置換は、1) アラニン (A)、グリシン (G); 2) アスパラギン酸 (D)、グルタミン酸 (E); 3) アスパラギン (N)、グルタミン (Q); 4) アルギニン (R)、リシン (K); 5) イソロイシン (I)、ロイシン (L)、メチオニン (M)、バリン (V); 6) フェニルアラニン (F)、チロシン (Y)、トリプトファン (W); 7) セリン (S)、トレオニン (T); および 8) システイン (C)、メチオニン (M) (例えば、Creighton, Proteins (1984) を参照) (本明細書の表1も参照) を含む。

10

20

【0101】

本開示および請求項で用いられるように、「一つの (a)」、「一つの (an)」および「その (the)」の単数形は、文脈が明らかに他を指示しない限り、複数形を含む。

【0102】

態様が本明細書において「含む」という言葉で記載されている場合、「からなる」および/または「から本質的になる」の用語で記載される他の類似態様も提供されることが理解される。

【0103】

本発明の特定の態様

本発明は、癌を研究、診断、特徴付け、および治療するための組成物および方法を提供する。具体的には、ある態様において、本発明は、アンタゴニストを含むNotch受容体に結合する剤、および腫瘍増殖を阻害しヒト患者の癌または他の疾病を治療するために該剤またはアンタゴニストを使用する方法を提供する。ある態様において、アンタゴニストは1つまたは複数の種類のヒトNotch受容体を特異的に認識する抗体である。

30

【0104】

一局面において、本発明はヒトNotch受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に特異的に結合する抗体を提供する。幾つかの態様において、ヒトNotch受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に特異的に結合する抗体は腫瘍の増殖を阻害する。ある態様において、ヒトNotch受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に特異的に結合し腫瘍増殖を阻害する抗体は、少なくとも2つのNotch受容体ファミリーメンバーの細胞外ドメインの非リガンド結合領域に特異的に結合する。ある態様において、該抗体はNotch2および/またはNotch3受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に結合する。幾つかの態様において、該抗体はヒトNotch2の非リガンド結合領域に結合する。幾つかの態様において、該抗体はNotch2およびNotch3の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に結合する。幾つかの態様において、該抗体はヒトNotch3の非リガンド結合領域に結合する。幾つかの態様において、該抗体はNotch1および/またはNotch4に結合する。

40

【0105】

ある態様において、ヒトNotch受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に特異的に結合し腫瘍増殖を阻害する抗体はモノクローナル抗体である。ある態様において、ヒトNotch受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に特異的に結合し腫瘍増殖を阻害す

50

る抗体はキメラ抗体である。ある態様において、ヒトNotch受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に特異的に結合し腫瘍増殖を阻害する抗体はヒト化抗体である。ある態様において、ヒトNotch受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に特異的に結合し腫瘍増殖を阻害する抗体はヒトの抗体である。ある態様において、ヒトNotch受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に特異的に結合し腫瘍増殖を阻害する抗体は単一特異性抗体である。ある態様において、ヒトNotch受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に特異的に結合し腫瘍増殖を阻害する抗体は二重特異性抗体である。ある態様において、本発明は、ヒトNotch受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に特異的に結合し腫瘍増殖を阻害する抗体を産生するハイブリドーマを提供する。

【0106】

ある態様において、本発明は、ヒトNotch受容体の細胞外ドメインのEGF反復1~10を含む非リガンド結合領域に特異的に結合し腫瘍増殖を阻害する抗体を提供する。ある態様において、本発明は、ヒトNotch受容体の細胞外ドメインのEGF反復10(または等価物)を含む非リガンド結合領域に特異的に結合し腫瘍増殖を阻害する抗体を提供する。ある態様において、本発明は、ヒトNotch受容体の細胞外ドメインのEGF反復13~36を含む非リガンド結合領域に特異的に結合し腫瘍増殖を阻害する抗体を提供する。ある態様は、ヒトNotch受容体の細胞外ドメインのEGF反復4を含む非リガンド結合領域に特異的に結合し腫瘍増殖を阻害する抗体を提供する。ある態様は、ヒトNotch受容体の細胞外ドメインのEGF反復13を含む非リガンド結合領域に特異的に結合し腫瘍増殖を阻害する抗体を提供する。ある態様において、該抗体は、LNR-HDドメインを含む非リガンド結合領域に特異的に結合し腫瘍増殖を阻害する。

【0107】

ある態様において、本発明は、治療の必要性がある被験体の癌を治療する方法であって、ヒトNotch受容体タンパク質の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に特異的に結合し被験体の腫瘍増殖を阻害する治療上有効量の抗体を被験体に投与する工程を含む方法を提供する。ある態様において、癌を治療する方法は、少なくとも2つのNotch受容体ファミリーメンバーに特異的に結合し腫瘍増殖を阻害する治療上有効量の抗体を投与する工程を含む。ある態様において、治療の必要性がある被験体の癌を治療する方法は、Notch2および/またはNotch3受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に特異的に結合し腫瘍増殖を阻害する治療上有効量の抗体を被験体に投与する工程を含む。

【0108】

ある態様において、癌を治療する方法は、ヒトNotch受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に特異的に結合し腫瘍増殖を阻害する治療上有効量のモノクローナル抗体を投与する工程を含む。ある態様において、癌を治療する方法は、ヒトNotch受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に特異的に結合し腫瘍増殖を阻害する治療上有効量のキメラ抗体を投与する工程を含む。ある態様において、癌を治療する方法は、ヒトNotch受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に特異的に結合し腫瘍増殖を阻害する治療上有効量のヒト化抗体を投与する工程を含む。ある態様において、癌を治療する方法は、ヒトNotch受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に特異的に結合し腫瘍増殖を阻害する治療上有効量のヒトの抗体を投与する工程を含む。幾つかの態様において、該抗体は単一特異性抗体である。幾つかの態様において、該抗体は二重特異性抗体である。

【0109】

ある態様において、癌を治療する方法は、EGF反復1~10を含むヒトNotch受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に特異的に結合し腫瘍増殖を阻害する治療上有効量の抗体を投与する工程を含む。ある態様において、癌を治療する方法は、EGF反復10(またはNotch3の場合その等価物)を含むヒトNotch受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に特異的に結合し腫瘍増殖を阻害する治療上有効量の抗体を投与する工程を含む。ある態様において、癌を治療する方法は、EGF反復13~36を含むヒトNotch受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に特異的に結合し腫瘍増殖を阻害する治療上有効量の抗体を投与する工程を含む。ある態様において、癌を治療する方法は、EGF反復4を含むヒトNotch受

10

20

30

40

50

容体の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に特異的に結合し腫瘍増殖を阻害する治療上有効量の抗体を投与する工程を含む。ある態様において、癌を治療する方法は、EGF反復4を含むヒトNotch受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に特異的に結合し腫瘍増殖を阻害する治療上有効量の抗体を投与する工程を含む。他のある態様において、投与される該抗体はヒトNotch受容体のLNR-HDドメインに特異的に結合する。

【0110】

ある態様において、癌を治療する方法は、ヒトNotch受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に特異的に結合し腫瘍増殖を阻害する細胞障害性部分とコンジュゲートした治療上有効量の抗体を投与する工程を含む。ある態様において、癌を治療する方法は、放射線治療と併用して、ヒトNotch受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に特異的に結合し腫瘍増殖を阻害する治療上有効量の抗体を投与する工程を含む。ある態様において、癌を治療する方法は、化学療法と併用して、ヒトNotch受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に特異的に結合し腫瘍増殖を阻害する治療上有効量の抗体を投与する工程を含む。ある態様において、癌を治療する方法は、ヒトNotch受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に特異的に結合し、ならびに乳房腫瘍、大腸腫瘍、肺腫瘍、膵臓腫瘍、前立腺腫瘍、または頭部および頸部の腫瘍に由来する腫瘍の増殖を阻害する治療上有効量の抗体を投与する工程を含む。

10

【0111】

ある態様において、癌を治療する方法は、ヒトNotch受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に特異的に結合する抗体を用いた治療のために遺伝子検査を用いて患者を同定する工程、およびヒトNotch受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に特異的に結合し腫瘍増殖を阻害する治療上有効量の抗体を投与する工程を含む。ある態様において、癌を治療する方法は、ヒトNotch受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に特異的に結合する抗体を用いた治療のために癌幹細胞特性を検出する遺伝子検査を用いて患者を同定する工程、およびヒトNotch受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に特異的に結合し腫瘍増殖を阻害する治療上有効量の抗体を投与する工程を含む。

20

【0112】

ある態様において、本発明は、ヒトNotch受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に結合し腫瘍増殖を阻害する分子を同定する方法を提供し、該方法は、i) ヒトNotch受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合ドメインと該分子とをインキュベートする工程、ii) 該分子がヒトNotch受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に結合するか否かを測定する工程、およびiii) 該分子が腫瘍増殖を阻害するか否かを測定する工程を含む。ある態様において、本発明は、ヒトNotch受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に結合し腫瘍増殖を阻害する分子を同定する方法を提供し、該方法は、i) EGF反復1~10を含むヒトNotch受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合ドメインと該分子とをインキュベートする工程、ii) 該分子がEGF反復1~10を含むヒトNotch受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に結合するか否かを測定する工程、およびiii) 該分子が腫瘍増殖を阻害するか否かを測定する工程を含む。ある態様において、本発明は、ヒトNotch受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に結合し腫瘍増殖を阻害する分子を同定する方法を提供し、該方法は、i) EGF反復10(またはNotch3の場合その等価物)を含むヒトNotch受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合ドメインと該分子とをインキュベートする工程、ii) 該分子がEGF反復10(またはNotch3の場合その等価物)を含むヒトNotch受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に結合するか否かを測定する工程、およびiii) 該分子が腫瘍増殖を阻害するか否かを測定する工程を含む。ある態様において、本発明は、ヒトNotch受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に結合し腫瘍増殖を阻害する分子を同定する方法を提供し、該方法は、i) EGF反復13~36を含むヒトNotch受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合ドメインと該分子とをインキュベートする工程、ii) 該分子がEGF反復13~36を含むヒトNotch受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に結合するか否かを測定する工程、およびiii) 該分子が腫瘍増殖を阻害するか否かを測定する工程を含む。

30

40

50

【0113】

ある態様において、本発明は、ヒトNotch受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に特異的に結合し腫瘍増殖を阻害する抗体を含む薬学的組成物を提供する。

【0114】

ある態様において、本発明はヒトNotch受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に特異的に結合し腫瘍増殖を阻害する抗体を作製する方法を提供する。

【0115】

ある態様において、本発明はヒトNotch受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に特異的に結合し腫瘍増殖を阻害する抗体をコードする単離核酸を提供する。

【0116】

幾つかの態様において、本発明は、1つまたは複数の種類のヒトNotch受容体のEGF10ドメイン（またはNotch3の場合EGF10ドメインの等価物）に特異的に結合する剤（例えば抗体）を提供する。ある態様において、該剤は抗体である。ある態様において、該剤はアンタゴニストである。ある態様において、該剤はヒトNotch2のEGF10および/またはヒトNotch3のEGF9に特異的に結合する。EGF9は、他のヒトNotch受容体のNotch1、Notch2、およびNotch4のEGF10と等価なヒトNotch3内のEGFである。ある態様において、該剤はヒトNotch2に特異的に結合する。ある態様において、該剤はヒトNotch2およびNotch3に特異的に結合する。ある態様において、該剤はヒトNotch3に特異的に結合する。

【0117】

一局面において、本発明は、SEQ ID NO:16および18（シグナル配列ありまたはなし）でそれぞれ提供される重鎖および軽鎖の配列、すなわち2008年10月15日にATCCに寄託され、指定番号PTA-9547が割り当てられたDNAにコードされる配列を含む59R1抗体を提供する。本発明はさらに59R1抗体などの重鎖可変領域（例えばSEQ ID NO:14）および/または軽鎖可変領域（例えばSEQ ID NO:13）を含むポリペプチドまたは抗体を提供する。本発明はさらに、1つまたは複数（例えば1、2、または3つ）の重鎖CDR、および/または59R1抗体の1つまたは複数の軽鎖CDRを含むポリペプチドまたは抗体を提供する。さらなる態様において、本発明は、59R1抗体と同一のエピトープに結合する抗体、またはヒトNotch2および/またはNotch3への特異的結合を59R1抗体と競合する抗体を提供する。

【0118】

別の局面において、本発明は、SEQ ID NO:49および18（シグナル配列ありまたはなし）でそれぞれ提供される重鎖および軽鎖の配列、すなわち2009年7月6日にATCCに寄託され、指定番号[...]が割り当てられたDNAにコードされる配列を含む59R5抗体を提供する。本発明はさらに重鎖可変領域および/または軽鎖可変領域の配列であるSEQ ID NO:50および/またはSEQ ID NO:13を含むポリペプチドまたは抗体を提供する。本発明はさらに59R5抗体の1つまたは複数（例えば1、2、または3つ）の重鎖CDRおよび/または1つまたは複数の軽鎖CDRを含むポリペプチドまたは抗体を提供する。さらなる態様において、本発明は59R5抗体と同一のエピトープに結合する抗体、またはヒトNotch2および/またはNotch3への特異的結合を59R5抗体と競合する抗体を提供する。

【0119】

更なる態様において、本発明は2種またはそれ以上の（すなわち少なくとも2または2、3もしくは4）ヒトNotch受容体に特異的に結合する抗体を提供する。ある態様において、該抗体は2以上のヒトNotch受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に特異的に結合する。ある態様において、該抗体は2種またはそれ以上のヒトNotch受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に特異的に結合する単一特異性抗体である。ある態様において、該抗体はNotch1、Notch2、もしくはNotch4のEGF10、および/またはNotch3のEGF9に結合する。ある態様において、該抗体が結合する非リガンド結合領域はEGF4ではなくEGF4を含まない。ある態様において、2種またはそれ以上のヒトNotch受容体はNotch2および/またはNotch3を含む。ある態様において、2種またはそれ以上のヒトNotch受容体はNotch2およびNotch3を含む。ある態様において、該抗体は2種またはそれ以上のヒトNotch受容体のアンタゴニストである。

10

20

30

40

50

【0120】

本発明はさらに、被験体の周皮細胞および/または血管平滑筋細胞の機能を調節する方法であって、ヒトNotch2および/またはヒトNotch3に特異的に結合する有効量の剤を被験体に投与する工程を含む方法を提供する。ある態様において、剤は抗体である。ある態様において、剤はアンタゴニストである。

【0121】

本発明はさらに、被験体の血管新生を阻害する方法であって、ヒトNotch2および/またはヒトNotch3に特異的に結合する有効量の剤を被験体に投与する工程を含む方法を提供する。ある態様において、該剤は抗体である。ある態様において、該剤はアンタゴニストである。ある態様において、該アンタゴニストはNotch2のアンタゴニストである。ある態様において、該アンタゴニストはNotch3のアンタゴニストである。ある態様において、該アンタゴニストはNotch2およびNotch3のアンタゴニストである。幾つかの態様において、血管新生を阻害する該方法は周皮細胞および/または血管平滑筋細胞の機能を調節する工程を含む。幾つかの態様において、該血管新生は腫瘍血管新生である。

10

【0122】

ある態様において、Notch結合剤はヒトNotch受容体に特異的に結合する該受容体のアンタゴニストである。ほかの幾つかの態様において、該Notch結合剤はヒトNotch受容体に特異的に結合する該受容体のアゴニストである。

【0123】

ある態様において、1つまたは複数の種類のNotch受容体に特異的に結合し1つまたは複数の種類のNotch受容体のアンタゴニストである剤は、結合したNotch受容体の1つまたは複数の活性の少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約50%、少なくとも約75%、少なくとも約90%、または約100%を阻害する。

20

【0124】

ある態様において、1つまたは複数の種類のヒトNotch受容体（例えばNotch2および/またはNotch3）のアンタゴニストは1つまたは複数の下記効果を有する。1つまたは複数の種類のヒトNotch受容体へのリガンド結合を阻害する；1つまたは複数の種類のNotch受容体によるリガンド誘導性シグナル伝達を阻害する；腫瘍細胞の増殖を阻害する；腫瘍における癌幹細胞の頻度を減少することにより腫瘍の腫瘍原性を低減する；腫瘍成長を阻害する；生存率を高める；腫瘍細胞の細胞死を誘発する；血管新生を阻害する；または腫瘍細胞の転移を妨げる。

30

【0125】

ある態様において、該アンタゴニストは1つまたは複数の下記効果を有する。Notch受容体の発現を妨害する；例えばNotch受容体と1つまたは複数のそのリガンドとの相互作用を立体的に阻害することにより、またはヒトNotch受容体に結合し細胞死を誘発しもしくは細胞増殖を阻害することにより、Notch受容体シグナル伝達経路の活性化を妨害する。

【0126】

ある態様において、Notch2またはNotch3などのNotch受容体に対するアンタゴニストは、Notch受容体の機能に作用または阻害するために細胞外で作用する。ある態様において、アンタゴニストはNotch受容体の細胞外ドメインに結合する小分子である。ある態様において、Notch受容体のアンタゴニストはタンパク性である。幾つかの態様において、Notch受容体のタンパク性アンタゴニストはNotch受容体の細胞外エピトープに特異的に結合する抗体である。Notch受容体に対するアンタゴニストの細胞外結合は、Notch受容体の内活性化（例えばキナーゼ活性）を阻害することにより、および/または、例えばNotch受容体とそのリガンドの1つとの相互作用を立体的に阻害することにより、Notch受容体タンパク質のシグナル伝達を阻害し得る。さらに、Notch受容体に対するアンタゴニストの細胞外結合は、例えばNotch受容体の内在化および/またはNotch受容体の細胞表面輸送の減少によるなど、Notch受容体の細胞表面発現を下方調節し得る。

40

【0127】

ある態様において、Notch結合剤またはアンタゴニスト（例えば抗体）は少なくとも1つ

50

のヒトNotch受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に特異的に結合し、該非リガンド結合領域はEGF反復10（またはNotch3の場合その等価物）を含む。ある態様において、該剤またはアンタゴニストはNotch2に特異的に結合する。ある態様において、該剤またはアンタゴニストはNotch3に特異的に結合する。ある態様において、該剤またはアンタゴニストはヒトNotch2およびヒトNotch3の両方に特異的に結合する。

【0128】

ある態様において、Notch結合剤またはアンタゴニスト（例えば抗体）はヒトNotch2のEGF10ドメインに特異的に結合する。ある態様において、Notch結合剤またはアンタゴニストはEGF10ドメインの外側のヒトNotch2の任意領域と結合しない。他の態様において、ヒトNotch2のEGF10ドメインに特異的に結合するNotch結合剤またはアンタゴニストはまたさらにヒトNotch2の別領域と結合する。換言すれば、幾つかの態様において、該剤またはアンタゴニストの全エピトープはEGF10内にある。他の態様において、ヒトNotch2に結合する該剤またはアンタゴニストのエピトープはEGF10と部分的に重複する。ある態様において、該剤またはアンタゴニストはヒトNotch2のEGF10内のHKGAL配列（SEQ ID NO:28）の少なくとも一部に結合する。ある態様において、該剤またはアンタゴニストはヒトNotch2のEGF10内の他のアミノ酸とも結合する（例えば、抗Notch2抗体の全エピトープは必ずしもHKGAL配列内に完全に含まれるわけではない）。ある態様において、Notch結合剤またはアンタゴニストは少なくとも1つのさらなるヒトNotch受容体（例えばNotch1、Notch3、またはNotch4）にさらに特異的に結合する。ある態様において、ヒトNotch2のEGF10に結合するNotch結合剤またはアンタゴニストは、ヒトNotch1のEGF10ドメイン、ヒトNotch3のEGF9ドメイン、および/またはヒトNotch4のEGF10ドメインにさらに結合する。ある態様において、さらなるヒトNotch受容体はヒトNotch3である。

10

20

30

40

50

【0129】

ある態様において、Notch結合剤またはアンタゴニスト（例えば抗体）はヒトNotch3のEGF9ドメインに結合する。ヒトNotch2およびヒトNotch3の細胞外ドメインの配列間の相同性から明らかなように、EGF9はヒトNotch3におけるNotch2EGF10の機能的/構造的等価物であるEGFである。ある態様において、Notch結合剤またはアンタゴニストはEGF9の外側のヒトNotch3の任意領域と結合しない。ある態様において、該剤またはアンタゴニストはヒトNotch3のEGF9ドメイン内のHEDA1配列（SEQ ID NO:29）の少なくとも一部に結合する。HEDA1（SEQ ID NO:29）は、ヒトNotch2EGF10内のHKGAL配列（SEQ ID NO:28）に対応するNotch3のEGF9ドメイン内の配列である。ある態様において、該剤またはアンタゴニストはヒトNotch3のEGF9内の他のアミノ酸とも結合する。ある態様において、Notch結合剤またはアンタゴニストは少なくとも1つのさらなるヒトNotch受容体（例えばNotch1、Notch3、および/またはNotch4）のEGF10ドメインに結合する。ある態様において、さらなるヒトNotch受容体は、ヒトNotch2のEGF10ドメインに結合する剤またはアンタゴニストなどのヒトNotch2である。ある態様において、Notch結合剤またはアンタゴニストはEGF10の外側のヒトNotch2の任意領域に結合しない。ある態様において、該剤またはアンタゴニストはヒトNotch2のEGF10内のHKGAL配列（SEQ ID NO:28）の少なくとも一部に結合する。幾つかの態様において、該剤またはアンタゴニストは、Notch2のHKGAL配列（SEQ ID NO:28）の少なくとも一部に結合する単一性抗体であり、Notch3のHEDA1配列（SEQ ID NO:29）の少なくとも一部にも結合する。

【0130】

ほかの態様において、該Notch結合剤またはアンタゴニストは、Notch1、Notch2、またはEGF10以外の領域のNotch4受容体、またはEGF9以外の領域のNotch3受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合領域の一部に結合する。例えば、ある態様において、該剤またはアンタゴニストは1つまたは複数の種類のNotch受容体のLNR-HDドメインに結合する。ある態様において、該剤またはアンタゴニストは、1つまたは複数の種類のNotch受容体の細胞外ドメインのEGF1、EGF2、EGF3、EGF4、EGF5、EGF6、EGF7、EGF9、EGF10、EGF13、EGF14、EGF15、EGF16、EGF17、EGF18、EGF19、EGF20、EGF21、EGF22、EGF23、EGF24、EGF25、EGF26、EGF27、EGF28、EGF29、EGF30、EGF31、EGF32、EGF33、EGF34、EGF35、および/またはE

GF36に結合する。

【0131】

ある態様において、該Notch結合剤またはアンタゴニストは1つまたは複数の種類のヒトNotch受容体の細胞外ドメインのリガンド結合領域に結合する。従って、ある態様において、該Notch結合剤またはアンタゴニストは、Notch1、2もしくは4のEGF11および/もしくはEGF12 (Rebay et al., 1991, Cell 67:687; Lei et al., 2003, Dev. 130:6411; Hambl et al., 2004, Structure 12:2173)、またはNotch3のEGF10および/もしくはEGF11 (Peters et al., 2004, Experimental Cell Research, 299:454-464)に結合し得る。

【0132】

ある態様において、Notch結合剤(例えば抗体)は2種またはそれ以上のヒトNotch受容体(例えばNotch1、Notch2、Notch3および/またはNotch4)に特異的に結合する。換言すれば、ある態様において、該剤または抗体は少なくとも2種のヒトNotch受容体(すなわち2、3、または4種のヒトNotch受容体)に結合する。2つのヒトNotchファミリー受容体(例えばNotch2とNotch3、Notch1とNotch2、Notch1とNotch3、Notch1とNotch4、Notch2とNotch4、またはNotch3とNotch4)に特異的に結合する剤および抗体が包含される。4種のヒトNotch受容体ファミリーメンバーに特異的に結合する剤および抗体(例えばNotch1、Notch2、Notch3およびNotch4に特異的に結合する剤および抗体)と同様に、3種のヒトNotch受容体ファミリーのメンバーに特異的に結合する剤および抗体(例えばNotch1、Notch2、およびNotch3、Notch1、Notch2およびNotch4、またはNotch2、Notch3およびNotch4に特異的に結合する剤および抗体)も想定される。ある態様において、該剤または抗体はヒトNotch2およびNotch3の両方に特異的に結合する。他の態様において、該剤または抗体はヒトNotch1およびNotch2の両方に特異的に結合する。いくつかの態様において、該剤または抗体はヒトNotch1およびNotch3の両方に特異的に結合する。幾つかのさらなる態様において、該剤または抗体はヒトNotch1およびNotch4の両方に特異的に結合する。ある態様において、該剤または抗体は2種またはそれ以上のヒトNotch受容体のアンタゴニストである。

【0133】

ある態様において、Notch結合剤またはアンタゴニストは、約1 μ M以下、約100nM以下、約40nM以下、約20nM以下、約10nM以下の解離定数でNotch受容体(例えばNotch2および/またはNotch3)に結合する。ある態様において、該剤またはアンタゴニストは、約1nM以下の K_D で、ヒトNotch2および/またはヒトNotch3などの1つまたは複数の種類のヒトNotch受容体に結合する。幾つかの態様において、Notch結合剤は約1nM以下の K_D でNotch2に結合する抗体である。幾つかの態様において、Notch結合剤は約1nM以下の K_D でNotch3に結合する抗体である。ある態様において、特定のNotch受容体についての該剤またはアンタゴニストの解離定数は、Notch細胞外ドメインおよび/またはバイオコア(Biacore)チップに固定されたEGF10を含む細胞外ドメインの部分を含むNotch-Fc融合タンパク質を用いて測定される解離定数である。

【0134】

ある態様において、該アンタゴニストはヒトNotch3に特異的に結合しヒトNotch3へのリガンド(例えばDLL4、JAG1、および/またはJAG2)結合を阻害しおよび/またはヒトNotch3のシグナル伝達を阻害する。ある態様において、該アンタゴニストはヒトNotch2に特異的に結合しヒトNotch2へのリガンド(例えばDLL4、JAG1、および/またはJAG2)結合を阻害しおよび/またはヒトNotch2のシグナル伝達を阻害する。ある態様において、該アンタゴニストはDLL4誘導性Notch2シグナル伝達を阻害する。ある態様において、該アンタゴニストはDLL4誘導性Notch3シグナル伝達を阻害する。ある態様において、該アンタゴニストはJAG2誘導性Notch2シグナル伝達を阻害する。ある態様において、該アンタゴニストはJAG2誘導性Notch3シグナル伝達を阻害する。ある態様において、Notch2および/またはNotch3によるシグナル伝達は、少なくとも約10%、少なくとも約25%、少なくとも約50%、少なくとも約75%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%まで減少する。ある態様において、Notch2および/またはNotch3への1つまたは複数のリガンド結合は、少なくとも約10%、少なくとも約25%、少なくとも約50%、少なくとも約75%、少なくとも約90%、また

は少なくとも約95%まで減少する。

【0135】

幾つかの態様において、Notch受容体に対するアンタゴニストは、Notch受容体に結合し、1つまたは複数の下記効果を有する。腫瘍細胞の増殖を阻害する、腫瘍細胞の細胞死を直接誘発する、または腫瘍細胞の転移を防ぐ。ある態様において、Notch受容体のアンタゴニストは、コンジュゲート毒素、化学療法剤、放射性同位体、またはこのような他の剤を介して、細胞死を誘発する。例えば、Notch受容体に対する抗体は、タンパク質内在化によりNotch受容体を発現する腫瘍細胞で活性化される毒素とコンジュゲートする。他の態様において、Notch受容体のアンタゴニストは、抗体依存性細胞性細胞障害（ADCC）によって該Notch受容体を発現する細胞の細胞死を媒介する。ADCCは、抗体のFc部分を認識するエフェクター細胞による細胞溶解に参与する。例えば、多数のリンパ球、単球、組織マクロファージ、顆粒球、および好酸球は、Fc受容体を有し、細胞溶解を媒介し得る（Dillman, 1994, J. Clin. Oncol. 12:1497）。幾つかの態様において、Notch受容体のアンタゴニストは、補体依存性細胞障害（CDC）を活性化することによりNotch受容体を発現する細胞の細胞死を誘発する抗体である。CDCは、抗体のFc部分への血清補体の結合、およびその後の補体タンパク質カスケードの活性化に参与し、細胞膜損傷および最終的に細胞死をもたらす。抗体の生物活性は、抗体分子の定常ドメインまたはFc領域により、かなりの程度まで測定されることが知られている（Uananeu and Benacerraf, Textbook of Immunology, 2nd Edition, Williams & Wilkins, p. 218 (1984)）。異なるクラスおよびサブクラスの抗体は、同じサブクラスの抗体だが異なる種に由来する場合のように、この点で相違する。ヒトの抗体のうち、IgMは補体に結合する抗体の最も効率的なクラスであり、続いて、IgG1、IgG3、およびIgG2である一方で、IgG4は補体カスケードの活性化に欠けるようである（Dillman, 1994, J. Clin. Oncol. 12:1497; Jefferis et al., 1998, Immunol. Rev. 163:59-76）。本発明に従って、所望の生物活性を有する該クラスの抗体が調製される。

10

20

【0136】

補体活性化および/またはADCCにより標的細胞の溶解を媒介するNotch受容体に対する任意の特定抗体の能力が分析され得る。対象となる細胞は増殖しインビトロで標識され、該抗体は血清補体または抗原抗体複合体により活性化され得る免疫細胞のいずれかと組み合わせる細胞培養に添加される。標的細胞の細胞溶解は、例えば溶解細胞からの標識の放出により、検出される。事実、抗体は補体源としての患者自身の血清および/または免疫細胞を用いてスクリーニングされ得る。インビトロで補体を活性化しADCCを媒介できる抗体は、次いで特定患者に治療的に使用され得る。

30

【0137】

ある態様において、Notch結合剤またはアンタゴニストは1つまたは複数のエフェクター機能を有しない抗体である。例えば、幾つかの態様において、該抗体は抗体依存性細胞性細胞障害（ADCC）および/または補体依存性細胞障害（CDC）の活性を有しない。ある態様において、該抗体はFc受容体および/または補体因子に結合しない。ある態様において、該抗体はエフェクター機能を有しない。

【0138】

他の態様において、Notch受容体のアンタゴニストは血管新生を阻害することにより間接的に細胞死を誘発し得る。血管新生は、新しい血管が既存の血管から形成される過程であり、例えば、胚発生中、創傷治癒、および排卵への応答など、正常な成長に必要な基本過程である。1~2mm²より大きな固形腫瘍増殖も該腫瘍細胞が死なずに栄養および酸素を供給するために血管新生を要する。従って、ある態様において、Notch受容体のアンタゴニストは、例えば内皮細胞、平滑筋細胞、または血管の集合に必要な細胞外基質の構成要素を含む、Notch受容体を発現する血管細胞を標的とする。ある態様において、Notch受容体（例えばNotch2および/またはNotch3）のアンタゴニストは周皮細胞および/または血管平滑筋細胞を標的とする。他の態様において、Notch受容体のアンタゴニストは、血管細胞の動員、集合、維持および/または生存に必要な増殖因子のシグナル伝達を阻害する。

40

50

ある態様において、該アンタゴニストは周皮細胞および/または血管平滑筋細胞の機能を調節する。

【0139】

ある態様において、Notch結合剤またはアンタゴニスト（例えば、抗体）は、単独であるいは第二の治療剤と組み合わせて、腫瘍増殖を阻害できる。ある態様において、Notch結合剤またはアンタゴニストは、インビボ（例えば異種移植マウスモデルおよび/または癌を有するヒト）で腫瘍増殖を阻害できる。ある態様において、Notch結合剤またはアンタゴニストは、異種移植モデルの所定の時点で少なくとも約10%、少なくとも約25%、少なくとも約50%、少なくとも約75%、少なくとも約90%まで腫瘍増殖を阻害できる。ある態様において、Notch結合剤またはアンタゴニストは腫瘍増殖を防止する。ある態様において、Notch結合剤またはアンタゴニストは腫瘍再発を阻害する。

10

【0140】

ある態様において、Notch結合剤は腫瘍の腫瘍原性を低減できる。ある態様において、該剤または抗体は、マウス異種移植モデルなどの動物モデルの癌幹細胞を含む腫瘍の腫瘍原性を低減できる。ある態様において、腫瘍の癌幹細胞の数または頻度は、（例えば異種移植モデルで）少なくとも約2倍、約3倍、約5倍、約10倍、約50倍、約100倍、または約1000倍まで減少する。ある態様において、癌幹細胞の頻度の減少は動物モデルを用いた限界希釈分析により測定される。抗Notch抗体の有効性を試験するために用いられる限界希釈分析の例は、下記の実施例8で提供される。腫瘍の癌幹細胞の数または頻度における減少を測定するための限界希釈分析の使用に関するさらなる実施例および手引きは、例えば国際公開公報第WO2008/042236号、米国特許出願公開第2008/0064049号、および2008/0178305号で見出され、そのそれぞれが全体として参照により本明細書に組み入れられる。

20

【0141】

本発明は、抗体および抗体断片を含むがこれらの限定されない、種々のポリペプチドを提供する。ある態様において、該ポリペプチドは単離される。他の態様において、該ポリペプチドは実質的に純粋である。

【0142】

ある態様において、本発明のポリペプチドは、SEQ ID NO:2、4、13、14、16、18、19、20、39、40、49、50、52、53、54、55、56、または57（表示されるシグナル配列ありまたはなし）の配列を含む組み換えポリペプチド、天然ポリペプチド、または合成ポリペプチド、ならびにSEQ ID NO:1、3、15、17、47、48、58、59または60（表示されるシグナル配列ありまたはなし）のポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドを含むポリペプチドであり得る。

30

【0143】

本発明は、SEQ ID NO:16および/またはSEQ ID NO:18でそれぞれ提供される59R1の重鎖および/または軽鎖を含むポリペプチドを提供する。ある態様において、該ポリペプチドは抗体である。ある態様において、該ポリペプチドはNotch2および/またはNotch3に特異的に結合する。幾つかの態様において、該ポリペプチドはNotch2およびNotch3に特異的に結合する。

【0144】

本発明は、SEQ ID NO:49および/またはSEQ ID NO:18でそれぞれ提供される59R5の重鎖および/または軽鎖を含むポリペプチドを提供する。ある態様において、該ポリペプチドは抗体である。ある態様において、該ポリペプチドはNotch2および/またはNotch3に特異的に結合する。幾つかの態様において、該ポリペプチドはNotch2およびNotch3に特異的に結合する。

40

【0145】

本発明はさらにSEQ ID NO:13および/またはSEQ ID NO:14を含むポリペプチドをさらに提供する。ある態様において、該ポリペプチドは、SEQ ID NO:13を含む可変軽鎖配列および/またはSEQ ID NO:14を含む可変重鎖配列を含む。幾つかの態様において、該ポリペプチドは、SEQ ID NO:13を含む可変軽鎖配列およびSEQ ID NO:14を含む可変重鎖配列を含む

50

。ある態様において、該ポリペプチドは、SEQ ID NO:13を含む可変軽鎖配列および/またはSEQ ID NO:50を含む可変重鎖配列を含む。幾つかの態様において、該ポリペプチドは、SEQ ID NO:13を含む可変軽鎖配列およびSEQ ID NO:50を含む可変重鎖配列を含む。ある態様において、該ポリペプチドは、SEQ ID NO:13を含む可変軽鎖配列および/またはSEQ ID NO:52を含む可変重鎖配列を含む。ある態様において、該ポリペプチドは、SEQ ID NO:13を含む可変軽鎖配列および/またはSEQ ID NO:53を含む可変重鎖配列を含む。ある態様において、該ポリペプチドは、SEQ ID NO:13を含む可変軽鎖配列および/またはSEQ ID NO:54を含む可変重鎖配列を含む。ある態様において、該ポリペプチドは、SEQ ID NO:13を含む可変軽鎖配列および/またはSEQ ID NO:55を含む可変重鎖配列を含む。ある態様において、該ポリペプチドは、SEQ ID NO:13を含む可変軽鎖配列および/またはSEQ ID NO:56を含む可変重鎖配列を含む。ある態様において、該ポリペプチドは、SEQ ID NO:13を含む可変軽鎖配列および/またはSEQ ID NO:57を含む可変重鎖配列を含む。ある態様において、該ポリペプチドは抗体である。ある態様において、該ポリペプチドはNotch2および/またはNotch3に特異的に結合する。幾つかの態様において、該ポリペプチドはNotch2およびNotch3に特異的に結合する。幾つかの態様において、該ポリペプチドはヒトNotch2に特異的に結合する。幾つかの態様において、該ポリペプチドはヒトNotch3に特異的に結合する。

10

【0146】

本発明のいくつかのアミノ酸配列はタンパク質の構造または機能に有意な影響なく変更され得ることが認識されるであろう。配列のこのような相違が意図される場合、タンパク質上に活性を決定する重要部位が存在するであろうことを思い出すべきである。従って、本発明は実質的な活性を示すポリペプチドの変異体をさらに含む。このような変異は、欠失、挿入、逆位、反復、および型の置換を含む。アミノ酸の変化が表現型上サイレントである可能性が高いことに関する手引きは、Bowie et al., Deciphering the Message in Protein Sequences: Tolerance to Amino Acid Substitutions, 1990, Science 247:1306-1310に見出され得る。

20

【0147】

従って、本発明のポリペプチドの断片、誘導体、または類似体は、(i)1つまたは複数のアミノ酸残基が保存的または非保存的アミノ酸残基(大抵、保存的アミノ酸残基)で置換され、そのような置換アミノ酸残基は遺伝コードによりコードされるものであり得るまたはあり得ないもの;または(ii)1つまたは複数のアミノ酸残基が置換基を含むもの;または(iii)成熟ポリペプチドが、ポリペプチドの半減期を延ばすための化合物など(例えばポリエチレングリコール)、他の化合物と融合しているもの;または(iv)リーダー配列または分泌配列または成熟ポリペプチドの精製に使用される配列またはプロタンパク質配列など、さらなるアミノ酸が成熟ポリペプチドと融合しているものであり得る。このような断片、誘導体、および類似体は本明細書の教示範囲内であるとみなされる。

30

【0148】

他の荷電アミノ酸によるおよび中性または負に荷電したアミノ酸による荷電アミノ酸の置換は特に興味深い。後者はタンパク質の正電荷減少につながる。タンパク質上の正電荷減少によりタンパク質凝集を減少でき、凝集の防止は極めて望ましい。タンパク質の凝集は活性の喪失だけでなく、凝集物が免疫原性であり得るため、薬学的製剤を調製する際にも問題があり得る(Pinckard et al., 1967, Clin. Exp. Immunol. 2:331-340; Robbins et al., 1987, Diabetes 36:838-845; Cleland et al., 1993, Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Systems 10:307-377)。

40

【0149】

指摘したように、アミノ酸の変化は、タンパク質の折り畳みまたは活性に有意に影響を及ぼさない保存的アミノ酸置換など、通常マイナーな性質のものである(表1参照)。

【0150】

(表1) 保存的アミノ酸置換

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

10

20

30

40

50

【0151】

無論、アミノ酸置換数は、上記を含む多数の因子に依存する。ある態様において、任意のポリペプチドについての置換数は、50、40、30、25、20、15、10、または3を上回らないだろう。

【0152】

ある態様において、本発明のポリペプチドおよびポリヌクレオチドは単離形態で提供され、均一に精製されることもある。

【0153】

本発明のポリヌクレオチドは、SEQ ID NO:2、4、13、14、16、18、19、20、39、40、49、50、52、53、54、55、56、または57のポリペプチド、ならびにSEQ ID NO:2、4、13、14、16、18、19、20、39、40、49、50、52、53、54、55、56、または57のポリペプチドに対して少なくとも90%の類似性（ある時点で少なくとも90%の配列同一性）およびSEQ ID NO:2、4、13、14、16、18、19、20、49、50、52、53、54、55、56、または57のポリペプチドに対して少なくとも95%の類似性（ある時点で少なくとも95%の配列同一性）を有する

ポリペプチド、ならびにさらなる他の態様においてSEQ ID NO:2、4、13、14、16、18、19、20、39、40、49、50、52、53、54、55、56、または57のポリペプチドに対して少なくとも96%、97%、98%、または99%の類似性（ある時点で96%、97%、98%、または99%の配列同一性）を有するポリペプチドを含む。当技術分野で知られるように、2つのポリペプチド間の「類似性」は、該アミノ酸配列と第2のポリペプチド配列に対する1つのポリペプチドの保存的アミノ酸置換とを比較することにより決定される。

【0154】

本発明のポリペプチドの断片または部分は、対応する完全長ポリペプチドをペプチド合成により産生するために使用でき、従って、該断片は該完全長ポリペプチドを産生するために中間体として使用できる。本発明のポリヌクレオチドの断片または部分は、本発明の完全長ポリヌクレオチドを合成するために用いられ得る。

10

【0155】

ある態様において、本発明のタンパク質の断片は、Notch受容体タンパク質に結合できるタンパク質の一部または全部である。この断片はNotch受容体またはNotch受容体のリガンドに対して高親和性を有する。融合タンパク質の特定の断片は、免疫グロブリンの少なくとも一部の定常領域と融合させたポリペプチド剤またはアンタゴニストの少なくとも一部のNotch結合ドメインを含むタンパク質断片である。該親和性は通常約 10^{-11} から 10^{-12} Mの範囲であるが、該親和性は異なる大きさの断片で 10^{-7} から 10^{-13} Mの範囲にわたって相当に変化し得る。幾つかの態様において、該断片は長さ約10~110のアミノ酸であり、免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部と連結したポリペプチド剤またはアンタゴニスト

20

【0156】

該ポリペプチドおよび類似体はさらに、通常タンパク質の一部ではない追加の化学部分を含むよう改変され得る。これらの誘導体化部分は、タンパク質の溶解度、生物学的半減期、または吸収を改良し得る。該部分はまたタンパク質などの好ましくない副作用を減少または除外し得る。これらの部分の概要は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 20th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA(2000)で見出され得る。

【0157】

本明細書に記載される単離ポリペプチドは当技術分野で公知の任意の適切な方法により産生され得る。このような方法は、直接タンパク質合成法から、単離ポリペプチド配列をコードするDNA配列の構築および適切な形質転換宿主における該配列の発現まで及ぶ。

30

【0158】

組み換え方法の幾つかの態様において、DNA配列は対象となる野生型タンパク質をコードするDNA配列を単離または合成することにより構築される。任意で、該配列は部位特異的突然変異により突然変異を起こさせられ、その機能的類似体を提供し得る。例えば、Zeller et al., 1984, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 81:5662-5066および米国特許第4,588,585号を参照せよ。対象となるポリペプチドをコードするDNA配列を構築する別の方法はオリゴヌクレオチド合成装置を用いた化学合成によるであろう。このようなオリゴヌクレオチドは、所望するポリペプチドのアミノ酸配列に基づいて、対象となる組み換えポリペプチドが産生される宿主細胞で好適なコドンを選択して、設計され得る。

40

【0159】

対象となる単離ポリペプチドをコードする単離ポリヌクレオチド配列を合成するために標準的な方法が適用され得る。例えば、完全アミノ酸配列が逆翻訳遺伝子を構築するために用いられ得る。さらに、特定の単離ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むDNAオリゴマーが合成され得る。例えば、所望するポリペプチド部分をコードするいくつかの小オリゴヌクレオチドが合成された後連結され得る。個々のオリゴヌクレオチドは相補的な集合のため通常5'または3'突出を含む。

【0160】

一度集合すると（合成、部位特異的突然変異誘発、または別の方法により）、対象となる特定の単離ポリペプチドをコードする突然変異体DNA配列は、発現ベクターに挿入され

50

、所望の宿主におけるタンパク質の発現に適切な発現制御配列に機能的に連結される。適切な集合は、ヌクレオチド配列決定、制限マッピング、および適切な宿主における生物活性ポリペプチドの発現により確認され得る。当技術分野で周知のように、宿主におけるトランスフェクション遺伝子の高発現レベルを得るために、該遺伝子は選択された発現宿主で機能的な転写および翻訳の発現制御配列に機能的に連結される。

【0161】

組み換え発現ベクターはポリペプチドをコードするDNAを増幅し発現するために使用され得る。組み換え発現ベクターは、哺乳動物、微生物、ウイルスまたは昆虫の遺伝子に由来する適切な転写または翻訳の調節因子と機能的に連結させた、Notch受容体融合物または生物学的に同等な類似体をコードする合成またはcDNA由来のDNA断片を有する複製可能なDNA構築物である。転写単位は一般に、(1) 遺伝子発現で調節的な役割を有する遺伝因子、例えば転写プロモータまたはエンハンサー、(2) mRNAに転写されタンパク質に翻訳される構造配列またはコード配列、および(3) 下記に詳細に記載する適切な転写および翻訳の開始配列および終結配列の集合を含む。このような調節因子は転写を制御するためにオペレータ配列を含み得る。通常宿主に複製能を与える複製起点および形質転換体の認識を促進する選択遺伝子がさらに組み入れられ得る。DNA領域は機能上互いに関連する場合に機能的に連結される。例えば、ポリペプチドの分泌に参加する前駆体として発現する場合、シグナルペプチドのDNA(分泌リーダー)がポリペプチドのDNAに機能的に連結され;該配列の転写を制御する場合、プロモータがコード配列に機能的に連結され;翻訳ができるよう位置付ける場合、リボソーム結合部位がコード配列に機能的に連結される。一般に、「機能的に連結される」とは、連続性を意味し、分泌リーダーの場合、連続性かつ読み枠内を意味する。酵母発現系での使用を意図する構造要素は、宿主細胞による翻訳タンパク質の細胞外分泌を可能にするリーダー配列を含む。あるいは、組み換えタンパク質はリーダー配列または輸送配列なしに発現する場合、N末端メチオニン残基を含み得る。この残基はその後任意で発現した組み換えタンパク質から切断され最終産物を提供し得る。

10

20

【0162】

発現制御配列および発現ベクターの選択は宿主の選択に依存する。多種多様な発現宿主/ベクターの組み合わせが使用できる。真核生物宿主に有用な発現ベクターは、例えばSV40、牛パピローマウイルス、アデノウイルスおよびサイトメガロウイルス由来の発現制御配列を含むベクターを含む。細菌宿主に有用な発現ベクターは、pCR1、pBR322、pMB9およびそれらの誘導体を含む大腸菌由来のプラスミドなどの既知の細菌プラスミド、ならびにM13および線維状一本鎖DNAファージなどのより広範な宿主域プラスミドを含む。

30

【0163】

ポリペプチドの発現に適した宿主細胞は、適切なプロモータの制御下で原核生物、酵母、昆虫または高等真核細胞を含む。原核生物は、グラム陰性またはグラム陽性の生物を含み、例えば大腸菌またはパチルスである。高等真核細胞は本明細書に記載するように哺乳動物起源の樹立細胞株を含む。無細胞翻訳系も使用され得る。細菌、真菌、酵母、および哺乳動物細胞宿主での使用に適したクローニングおよび発現ベクターは、Pouwelsら(Cloning Vectors: A laboratory Manual, Elsevier, N. Y., 1985)により記載されており、その関連性のある開示は参照により本明細書により組み入れられる。

40

【0164】

種々の哺乳動物または昆虫の細胞培養系も組み換えタンパク質を発現するために有利に使用される。哺乳動物細胞における組み換えタンパク質の発現は、該タンパク質が一般に正確に折り畳まれ、適切に改変され、完全に機能的であるため、実施され得る。適切な哺乳動物の宿主細胞株の例は、Gluzman 1981, Cell 23:175により記載されるサル腎細胞のCOS-7株、ならびに例えばL細胞、C127、3T3、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)、ヒーラおよびBHK細胞株を含む適切なベクターを発現できる他の細胞株を含む。哺乳動物の発現ベクターは、複製起点、発現されるべき遺伝子と連結した適切なプロモータおよびエンハンサー、および他の5'または3'隣接非転写配列などの非転写要素、ならびに必要なリボソーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライスドナー部位およびスプライスアクセプ

50

ター部位、および転写終結配列などの5'または3'非翻訳配列を含み得る。昆虫細胞における異種タンパク質の産生用のバキュロウイルス系は、Luckow and Summers, 1988, Bio/Technology 6:47により概観される。

【0165】

形質転換宿主により産生されるタンパク質は、任意の適切な方法に従って精製され得る。このような標準的方法には、クロマトグラフィー（例えば、イオン交換、アフィニティーおよびサイジング（sizing）カラムクロマトグラフィー）、遠心分離、微分溶解度を含み、またはタンパク質精製の任意の他の標準技術による。ヘキサヒスチジン、マルトース結合ドメイン、インフルエンザコート配列およびグルタチオン-S-トランスフェラーゼなどの親和性標識は、適切なアフィニティーカラムの通過により精製を容易にするため、該タンパク質に付着させ得る。単離タンパク質はまた、タンパク質分解、核磁気共鳴およびx線結晶学などの技術を用いて物理的に特性化され得る。

10

【0166】

例えば、組み換えタンパク質を培地に分泌する系から上清はまずAmiconまたはMillipore Pelliconの限外濾過装置などの市販のタンパク質濃縮フィルターを用いて濃縮され得る。濃縮段階後、該濃縮物は適切な精製基質に適用され得る。あるいは、例えば、ペンダント型のジエチルアミノエチル（DEAE）基を有するマトリックスまたは基質の陰イオン交換樹脂が使用され得る。該マトリックスはアクリルアミド、アガロース、デキストラン、セルロースまたは通常タンパク質精製で使用される他の型であり得る。あるいは陽イオン交換段階が用いられ得る。適切な陽イオン交換体はスルホプロピル基またはカルボキシメチル基を含む種々の不溶性マトリックスを含む。最後に、疎水性RP-HPLC媒質、例えばペンダント型のメチル基または他の脂肪族基を有するシリカゲルを使用する1つまたは複数の逆相高速液体クロマトグラフィー（RP-HPLC）段階が、さらに癌幹細胞タンパク質Fc組成物を精製するために用いられ得る。前述の精製段階のいくつかまたは全てはまた、種々の組み合わせにおいて、均一な組み換えタンパク質を提供するために用いられ得る。

20

【0167】

細菌培養で産生される組み換えタンパク質は通常、細胞ペレットからの初期抽出後、1回以上の濃縮、塩析、水性イオン交換またはサイズ排除クロマトグラフィー段階により単離される。高速液体クロマトグラフィー（HPLC）は最終的な精製段階に用いられ得る。組み換えタンパク質の発現に用いられる微生物細胞は、凍結融解サイクル、超音波破碎、機械的破碎を含む任意の簡便な方法、または細胞溶解剤の使用により破碎され得る。

30

【0168】

ある態様において、Notch結合剤またはアンタゴニストは抗体を含む。ある態様において、該抗体は単離される。ある態様において、該抗体は実質的に純粋である。

【0169】

本発明は、SEQ ID NO:14を含む重鎖可変領域およびSEQ ID NO:13を含む軽鎖可変領域を含む抗体とヒトNotch2および/またはNotch3に対する特異的な結合を競合する抗体を提供する。本発明はまた、それぞれSEQ ID NO:16および18の重鎖および軽鎖を含む（シグナル配列と共に、もしくはシグナル配列を伴わずに）、すなわち2008年10月15日にATCCに寄託され指定番号PTA-9547が割り当てられたDNAにコードされる59R1 IgG2抗体を含む、該抗体からなる、または該抗体から本質的に成る抗体と、ヒトNotch2および/またはNotch3に対する特異的な結合を競合する抗体を提供する。

40

【0170】

本発明はさらに、1つまたは複数の種類のNotch受容体に特異的に結合し、1CDRにつき4つ以下（即ち、0、1、2、3または4つ）の保存的アミノ酸置換（例えば表1を参照）でSEQ ID NO:5~10、22~27、30または51の1、2、3、4、5、および/または6つのCDRを含む抗体を提供する。本発明はまた、1つまたは複数の種類のNotch受容体に特異的に結合し、1CDRにつき4つ以下の保存的アミノ酸置換で、59R1の1、2、3、4、5、および/または6つのCDR（すなわちSEQ ID NO:5~10）を含む抗体を提供する。従って、本発明は、59R1の1、2、3、4、5、および/または6つのCDRを含む1つまたは複数の種類のヒトNotch受容体に特異的

50

に結合する抗体を提供する。ある態様において、該抗体は、4つ以下の保存的アミノ酸置換で59R1の重鎖CDR3、および/または4つ以下の保存的アミノ酸置換で59R1の軽鎖CDR3を含む。幾つかの態様において、該抗体は、(a) SSSGMS (SEQ ID NO:5)を含む重鎖CDR1、または1、2、3、もしくは4つの保存的アミノ酸置換を含むその変異体;

VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6)

を含む重鎖CDR2、もしくは1、2、3、もしくは4つの保存的アミノ酸置換を含むその変異体;および/もしくはGIFFAI (SEQ ID NO:7)を含む重鎖CDR3、もしくは1、2、3、もしくは4つの保存的アミノ酸置換を含むその変異体;ならびに/または(b)

RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:8)

を含む軽鎖CDR1、もしくは1、2、3、もしくは4つの保存的アミノ酸置換を含むその変異体;GASSRAT (SEQ ID NO:9)を含む軽鎖CDR2、もしくは1、2、3、もしくは4つの保存的アミノ酸置換を含むその変異体、および/もしくはQQYSNFPI (SEQ ID NO:10)を含む軽鎖CDR3、もしくは1、2、3、もしくは4つの保存的アミノ酸置換を含むその変異体を含む。

【0171】

本発明はまた1つまたは複数の種類のNotch受容体に特異的に結合し、1CDRにつき4つ以下の保存的アミノ酸置換で59R5の1、2、3、4、5、および/または6つのCDR(すなわちSEQ ID NO:5、6、8~10、51)を含む抗体も提供する。ある態様において、該抗体は、4つ以下の保存的アミノ酸置換で59R5の重鎖CDR3、および/または4つ以下の保存的アミノ酸置換で59R5の軽鎖CDR3を含む。幾つかの態様において、該抗体は、(a) SSSGMS (SEQ ID NO:5)を含む重鎖CDR1、もしくは1、2、3、もしくは4つの保存的アミノ酸置換を含むその変異体;

VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6)

を含む重鎖CDR2、もしくは1、2、3、もしくは4つの保存的アミノ酸置換を含むその変異体;および/もしくはSIFYTT (SEQ ID NO:51)を含む重鎖CDR3、もしくは1、2、3、もしくは4つの保存的アミノ酸置換を含むその変異体;ならびに/または(b)

RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:8)

を含む軽鎖CDR1、もしくは1、2、3、もしくは4つの保存的アミノ酸置換を含むその変異体;GASSRAT (SEQ ID NO:9)を含む軽鎖CDR2、もしくは1、2、3、もしくは4つの保存的アミノ酸置換を含むその変異体、および/もしくはQQYSNFPI (SEQ ID NO:10)を含む軽鎖CDR3、もしくは1、2、3、もしくは4つの保存的アミノ酸置換を含むその変異体を含む。ある態様において、該抗体はSSSGMS (SEQ ID NO:5)を含む重鎖CDR1、

VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6)

を含む重鎖CDR2、および/またはSIFYTT (SEQ ID NO:51)を含む重鎖CDR3を含む。

【0172】

ヒトNotch2および/またはNotch3に特異的に結合する抗体も提供され、該抗体はSSSGMS (SEQ ID NO:5)を含む重鎖CDR1、

VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6)

を含む重鎖CDR2、および/または

(G/I)(I/S)F(F/Y)(A/P)(I/T/S/N) (SEQ ID NO:30)

を含む重鎖CDR3を含む。ある態様において、重鎖CDR3は、SIFYPT (SEQ ID NO:22), SSFFAS (SEQ ID NO:23), SSFYAS

(SEQ ID NO:24), SSFFAT (SEQ ID NO:25), SIFYPS (SEQ ID NO:26),および SSFFAN (SEQ ID NO:27)

10

20

30

40

50

からなる群より選択される。ある態様において、該抗体は、SSSGMS (SEQ ID NO:5) を含む重鎖CDR1、

VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6)

を含む重鎖CDR2、および/またはGIFFAI (SEQ ID NO:7) を含む重鎖CDR3を含む。ある態様において、重鎖CDRは抗体重鎖の可変領域内に含まれる。ある態様において、該抗体は、

RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:8)

を含む軽鎖CDR1、GASSRAT (SEQ ID NO:9) を含む軽鎖CDR2、および/またはQQYSNFPI (SEQ ID NO:10) を含む軽鎖CDR3をさらに含む。ある態様において、該軽鎖CDRは抗体軽鎖の可変領域内に含まれる。ある態様において、重鎖CDRおよび/または軽鎖CDRは1、2、3、もしくは4つの保存的アミノ酸置換で改変された。ある態様において、CDRのそれぞれは1~2つを超えない保存的アミノ酸置換により改変された。

10

【0173】

例えば、ある態様において、本発明は、ヒトNotch2および/またはNotch3に特異的に結合する抗体を提供し、該抗体は、(a) SSSGMS (SEQ ID NO:5) を含む重鎖CDR1、

VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6)

を含む重鎖CDR2、およびGIFFAI (SEQ ID NO:7) を含む重鎖CDR3;ならびに/または(b)

RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:8)

20

を含む軽鎖CDR1、GASSRAT (SEQ ID NO:9) を含む軽鎖CDR2、およびQQYSNFPI (SEQ ID NO:10) を含む軽鎖CDR3を含む。幾つかの態様において、該抗体は表示される軽鎖および重鎖の両CDRを含む。

【0174】

幾つかの態様において、本発明は、ヒトNotch2および/またはNotch3に特異的に結合する抗体を提供し、該抗体は、(a) SSSGMS (SEQ ID NO:5) を含む重鎖CDR1、

VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6)

を含む重鎖CDR2、およびSIFYTT (SEQ ID NO:51) を含む重鎖CDR3;ならびに/または(b)

RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:8)

30

を含む軽鎖CDR1、GASSRAT (SEQ ID NO:9) を含む軽鎖CDR2、およびQQYSNFPI (SEQ ID NO:10) を含む軽鎖CDR3を含む。ある態様において、該抗体は表示される軽鎖および重鎖の両CDRを含む。

【0175】

本発明は、ヒトNotch2および/またはNotch3に特異的に結合する抗体をさらに提供し、該抗体は、

RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:8)

40

を含む軽鎖CDR1、GASSRAT (SEQ ID NO:9) を含む軽鎖CDR2、および/またはQQYSNFPI (SEQ ID NO:10) を含む軽鎖CDR3を含む。

【0176】

本発明はまたNotch2および/またはNotch3に特異的に結合する抗体も提供し、該抗体は、(a) SEQ ID NO:14もしくはSEQ ID NO:20に少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、もしくは少なくとも約98%の配列同一性を有するポリペプチド、ならびに/または(b) SEQ ID NO:13もしくはSEQ ID NO:19に少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、もしくは少なくとも約98%の配列同一性を有するポリペプチドを含む。従って、ある態様において、(a) SEQ ID NO:14に少なくとも約95%の配列同一性を有する重鎖可変領域および/または(b) SEQ ID

50

NO:13に少なくとも約95%の配列同一性を有する軽鎖可変領域を含む。ある態様において、該抗体は、(a) SEQ ID NO:14もしくはSEQ ID NO:20を含むポリペプチド(例えば重鎖可変領域)、および/または(b) SEQ ID NO:13もしくはSEQ ID NO:19を含むポリペプチド(例えば軽鎖可変領域)を含む。

【0177】

本発明はまたNotch2および/またはNotch3に特異的に結合する抗体も提供し、該抗体は、(a) SEQ ID NO:50に少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、もしくは少なくとも約98%の配列同一性を有するポリペプチド、ならびに/または(b) SEQ ID NO:13に少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、もしくは少なくとも約98%の配列同一性を有するポリペプチドを含む。従って、ある態様において、該抗体は、(a) SEQ ID NO:50に少なくとも約95%の配列同一性を有する重鎖可変領域および/または(b) SEQ ID NO:13に少なくとも約95%の配列同一性を有する軽鎖可変領域を含む。ある態様において、該抗体は、(a) SEQ ID NO:50を含むポリペプチド(例えば重鎖可変領域)、および/または(b) SEQ ID NO:13を含むポリペプチド(例えば軽鎖可変領域)を含む。

10

【0178】

ある態様において、該アンタゴニストは、標的抗原を発現する腫瘍を死滅させるために補体依存性細胞障害または抗体依存性細胞性細胞障害を媒介し得る抗体である。他の態様において、該抗体は腫瘍細胞の死滅を媒介する毒素または放射性同位体に直接結合する。さらに、腫瘍の生存は新血管新生に依存し、ある態様において、該抗体は抗血管新生効果を有する。

20

【0179】

本発明はヒトNotch2および/またはNotch3などのNotch受容体に対する単離抗体を提供する。抗体、または抗体断片は記載するNotch受容体を特異的に認識する任意のモノクローナルまたはポリクローナル抗体であり得る。幾つかの態様において、本発明は本明細書に記載するNotch受容体に特異的に結合するモノクローナル抗体またはその断片を提供する。幾つかの態様において、該モノクローナル抗体またはその断片は、本明細書に記載するNotch受容体の細胞外ドメインに特異的に結合するキメラまたはヒト化抗体である。他の態様において、該モノクローナル抗体またはその断片は、本明細書に記載するNotch受容体の細胞外ドメインに特異的に結合するヒトの抗体である。ある態様において、該抗体はIgG1またはIgG2抗体である。

30

【0180】

Notch受容体に対する抗体は本明細書に記載する実験方法、診断方法および治療方法における用途を見出す。ある態様において、本発明の抗体は、例えば患者の組織生検、胸水、または血液試料などの生体試料におけるNotch受容体の発現を検出するために用いられる。組織生検は薄片にされ、例えば免疫蛍光または免疫組織化学を用いてタンパク質検出される。あるいは、試料由来の個々の細胞は単離され、FACS分析により、固定細胞または生細胞上でタンパク質発現検出される。さらに、該抗体は、例えば腫瘍細胞、細胞溶解物、または他のタンパク質試料におけるNotch受容体の発現を検出するために、タンパク質アレイで使用され得る。他の態様において、本発明の抗体は、インビトロ細胞系分析あるいはインビボ動物モデルのいずれかで腫瘍細胞を抗体と接触させることにより腫瘍細胞の増殖を阻害するために用いられる。さらなる他の態様において、該抗体は、Notch受容体に対する治療上有効量の抗体を投与することにより、ヒト患者の癌を治療するために用いられる。

40

【0181】

ポリクローナル抗体は任意の既知の方法により調製できる。ポリクローナル抗体は、安定な乳濁液を形成するためにキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)、血清アルブミンなどに任意に結合させ、滅菌生理食塩水で希釈しアジュバント(例えば完全または不完全フロインドアジュバント)と混合した関連抗原(精製ペプチド断片、完全長組み換えタンパク質、融合タンパク質など)を複数回皮下注射または腹腔内注射することによって動

50

物（例えばウサギ、ラット、マウス、ロバ、ヤギなど）を免疫化することにより生じる。該ポリクローナル抗体は次いでこのように免疫化された動物の血液、腹水などから回収される。収集された血液は凝固し、血清を静かに移し、遠心分離により浄化し、抗体力価について分析される。該ポリクローナル抗体は、親和性クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析などを含む当技術分野で標準的な方法に従って、血清または腹水から精製され得る。

【0182】

モノクローナル抗体は、Kohler and Milstein, 1975, Nature 256:495により記載される方法などのハイブリドーマ方法を用いて調製され得る。ハイブリドーマ方法を用いて、マウス、ハムスター、または他の適切な宿主動物が上述のように免疫化され、免疫抗原に特異的に結合する抗体のリンパ球による産生を引き起こす。あるいは、リンパ球はインビトロで免疫化され得る。免疫化後、該リンパ球は単離され、例えばポリエチレングリコールを用いて適切な骨髓腫細胞株と融合させ、ハイブリドーマ細胞を形成し、その後未融合のリンパ球および骨髓腫細胞から選別され得る。免疫沈降、免疫プロット、または放射免疫測定（RIA）もしくは酵素結合免疫吸着分析（ELISA）などのインビトロ結合分析により測定されるような選別抗原に対して特異的なモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、その後、標準的方法（Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, 1986）を用いるインビトロ培養あるいは動物の腹水腫瘍としてのインビボで増殖され得る。該モノクローナル抗体は次いで上記のポリクローナル抗体で記載したように培養培地または腹水精製から精製され得る。

10

20

【0183】

あるいは、モノクローナル抗体はまた米国特許第4,816,567号に記載されるような組み換えDNA法を用いても作製できる。モノクローナル抗体をコードするポリヌクレオチドは、該抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子の特異的に増幅するオリゴヌクレオチドプライマーを用いるRT-PCRによるなど、成熟B細胞またはハイブリドーマ細胞から単離され、その配列は従来手法を用いて決定される。重鎖および軽鎖をコードする単離されたポリヌクレオチドは次いで適切な発現ベクターにクローニングされ、大腸菌、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、または別の方法で免疫グロブリンタンパク質を産生しない骨髓腫細胞などの宿主細胞にトランスフェクションされる場合、該宿主細胞でモノクローナル抗体を発現する。また、所望する種の組み換えモノクローナル抗体またはその断片は、例えば本明細書に記載されるファージディスプレイライブラリーから単離され得る。

30

【0184】

モノクローナル抗体をコードするポリヌクレオチドは、組み換えDNA技術を用いて多数の異なる様式でさらに改変され、別の抗体を生成し得る。幾つかの態様において、例えばマウスモノクローナル抗体の軽鎖および重鎖の定常ドメインは、1) 例えばキメラ抗体を生成するためのヒト抗体の該領域、または2) 融合抗体を生成するための非免疫グロブリンポリペプチドと置換され得る。他の態様において、該定常領域はモノクローナル抗体の所望の抗体断片を生成するために短縮または除去される。さらに、可変領域の部位特異的または高密度の突然変異誘発は、モノクローナル抗体の特異性、親和性などを最適化するために用いられ得る。

40

【0185】

より一般的には、本発明に有用な改変抗体は任意の抗体から入手または由来し得る。さらに、開示される改変抗体を生成するために用いられる親もしくは前駆体の抗体またはその断片は、マウス、ヒト、キメラ、ヒト化、ヒト以外の霊長類または霊長類化であり得る。他の態様において、本発明の改変抗体は、本明細書に記載する改変定常ドメインを有する一本鎖抗体構築物（参照により本明細書に組み入れられる米国特許第5,892,019号に開示されるものなど）を含み得る。その結果として、本明細書の教示にしたがって改変されたこれらの任意の型の抗体が本発明に適合する。

【0186】

50

本発明に従って、技術を本発明のポリペプチドに特異的な一本鎖抗体の産生用に適合させ得る（米国特許第4,946,778号を参照）。その上、方法をFab発現ライブラリー（Huse et al., 1989, Science 246: 1275-1281）の構築用に適合させ、Notch、またはその誘導体、断片、類似体もしくは相同体に対する所望の特異性を備えたモノクローナルFab断片の迅速かつ有効的な同定を可能にし得る。本発明のポリペプチドに対するイディオタイプを含む抗体断片は、(a) 抗体分子のペプシン消化により産生されるF(ab')₂断片；(b) F(ab')₂断片のジスルフィド架橋を減少させることにより生成するFab断片；(c) パパインおよび還元剤による抗体分子の処理により生成するFab断片、ならびに(d) Fv断片を含むがこれらに限定されない当技術分野の技術により産生され得る。

【0187】

二重特異性抗体も本発明の範囲内である。二重特異性抗体はモノクローナルであり、好ましくは、少なくとも2つの異なる抗原（または、ある態様において、同抗原上の2つの異なるエピトープ）に対する結合特異性を有するヒトまたはヒト化抗体である。この場合、結合特異性の1つは本発明の抗原ポリペプチド（Notch、またはその断片）に対するものである一方、第二の結合標的は任意の他の抗原であり、細胞表面タンパク質、または受容体または受容体サブユニットが有益である。1つのヒトNotch受容体（例えばNotch2）に特異的に結合する1つの抗原結合部位を含み、さらに第二のヒトNotch受容体（例えばNotch3）に特異的に結合する第二の異なる抗原結合部位を含む二重特異性抗体が提供される。

【0188】

二重特異性抗体を作製する方法は当技術分野で知られている。伝統的には、二重特異性抗体の組み換え産生は2つの免疫グロブリン重鎖/軽鎖対の共発現に基づき、2つの重鎖は異なる特異性を有する（Milstein and Cuello, 1983, Nature 305:537-539）。免疫グロブリンの重鎖および軽鎖のランダムな組み合わせ（random assortment）のため、これらのハイブリドーマ（クアドローマ）は潜在的な10の異なる抗体分子混合物を産生し、そのただ1つが正確な二重特異性構造を有する。正確な該分子の精製は通常親和性クロマトグラフィーにより遂行される。

【0189】

あるいは、ある態様において、本明細書に記載される抗体は単一特異性であり得る。例えば、ある態様において、抗体が含む1つまたは複数の抗原結合部位のそれぞれが同じ1つまたは複数の種類のヒトNotch受容体（例えばNotch2、Notch3、またはNotch2およびNotch3の両方に相同なエピトープ）に結合できる（または結合する）。ある態様において、本明細書に記載する単一特異性抗体の抗原結合部位はヒトNotch3のEGF反復9およびNotch2のEGF反復10の両方に結合できる（結合する）。

【0190】

所望の結合特異性をもつ抗体可変ドメインは免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合できる。該融合は、少なくともヒンジの一部、CH2およびCH3の領域を含む免疫グロブリン重鎖定常ドメインによる。軽鎖結合に必要な部位を含む第一の重鎖定常領域（CH1）は少なくとも1つの融合に存在し得る。免疫グロブリン重鎖の融合、および希望に応じて免疫グロブリン軽鎖をコードするDNAは、別個の発現ベクターに挿入され、適切な宿主生物内に共トランスフェクションされる。二重特異性抗体を生成するさらなる詳細は、Suresh et al., 1986, Methods in Enzymology 121:210で見出され得る。

【0191】

二重特異性抗体は完全長抗体または抗体断片として調製され得る。抗体断片から二重特異性抗体を生成する技術は文献に記載されている。例えば、二重特異性抗体は、化学結合を用いて調製され得る。さらに、Brennan et al., 1985, Science 229:81は、無傷抗体がタンパク質分解で切断されF(ab')₂断片を生成する手法を記載している。

【0192】

さらに、Fab'断片は大腸菌から直接回収され、化学的に結合させ、二重特異性抗体を形成し得る（Shalaby et al., 1992, J. Exp. Med. 175:217-225）。これらの方法は十分にヒト化された二重特異性抗体F(ab')₂分子の産生に用いられ得る。

10

20

30

40

50

【0193】

2を上回る力値をもつ抗体も意図される。例えば、三重特異性抗体が調製され得る (Tutt et al., 1991, J. Immunol. 147:60)。

【0194】

例示的な二重特異性抗体は2つの異なるエピトープに結合でき、少なくともその1つは本発明のポリペプチドに由来する。あるいは、免疫グロブリン分子の抗抗原性アームは、特定の抗原を発現する細胞に細胞防御機構を集中するように、T細胞受容体分子 (例えばCD2、CD3、CD28、またはB7) またはIgGに対するFc受容体などの白血球の誘発分子に結合するアームと組み合わせ得る。二重特異性抗体は特定の抗原を発現する細胞に細胞障害剤を向けるためにも用いられ得る。これらの抗体は、抗原結合アーム、および細胞障害剤またはEOTUBE、DPTA、DOTAまたはTETAなどの放射線核種キレート剤に結合するアームを所有する。

10

【0195】

ヘテロ複合抗体も本発明の範囲内にある。ヘテロ複合抗体は2つの共有結合した抗体からなる。このような抗体は、例えば、不要な細胞を免疫細胞が標的化すると提案されている (米国特許第4,676,980号)。抗体は架橋剤を伴うものを含む合成タンパク質化学の既知の方法を用いてインビトロで調製できることが意図される。例えば、免疫毒素はジスルフィド交換反応を用いてまたはチオエーテル結合を形成することにより構築できる。この目的に適した試薬の例はイミノチオレートおよびメチル-4-メルカプトブチルイミデート (methyl-4-mercaptobutyrimidate) を含む。

20

【0196】

本発明の目的のため、改変抗体はNotchのポリペプチドと抗体との会合のために提供される任意の型の可変領域を含み得ることが理解されるべきである。この点において、該可変領域は、液性応答を仕掛け、所望の腫瘍関連抗原に対して免疫グロブリンを生成するために誘導され得る任意の種類哺乳動物を含み得るまたは由来し得る。このようなものとして、改変抗体の可変領域は、例えばヒト、マウス、ヒト以外の霊長類 (例えばカニクイザル、アカゲザルなど) またルピン (lupine) 起源であり得る。幾つかの態様において、改変免疫グロブリンの可変および定常の両領域はヒトである。他の態様において、適合する抗体 (通常ヒト以外の起源に由来する) の可変領域は、結合特性を改良または分子の免疫原性を低減するために操作または特異的に調整され得る。この点で、本発明に有用な可変領域はヒト化されまたは移入されたアミノ酸配列の組み込みを通じて別の方法で改変され得る。

30

【0197】

幾つかの態様において、本発明のNotch受容体に対するモノクローナル抗体はヒト化抗体である。ヒト化抗体は、可変領域内のヒト以外 (例えばマウス) の抗体に由来する最小配列を含む抗体である。このような抗体は、ヒトの被験体に投与される場合に、抗原性およびHAMA (ヒト抗マウス抗体) 応答を低減するために治療上用いられる。実際に、ヒト化抗体は通常非ヒト配列に対して最小限のヒト抗体である。ヒト抗体はヒトにより産生される抗体またはヒトにより産生される抗体に対応するアミノ酸配列を有する抗体である。

40

【0198】

ヒト化抗体は当技術分野で公知の種々の技術を用いて産生できる。抗体は、ヒト抗体のCDRを所望の特異性、親和性、および/または能力を有する非ヒト抗体 (例えばマウス、ラット、ウサギ、ハムスターなど) のCDRで置換することによりヒト化できる (Jones et al., 1986, Nature 321:522-525; Riechmann et al., 1988, Nature 332:323-327; Verhoeyen et al., 1988, Science 239:1534-1536)。ヒト化抗体は抗体特異性、親和性、および/または能力を改良し最適化するためにFvフレームワーク領域および/または置換された非ヒト残基内のいずれかでさらなる残基の置換によりさらに改変され得る。

【0199】

ヒト化の代替手段として、ヒト抗体が生成できる。ヒト抗体は、トランスジェニック動物、ファージライブラリー、およびインビトロ活性化ヒトB細胞を含む、当技術分野で公

50

知の種々の技術を用いて調整され得る。

【0200】

例えば、免疫時に内在性免疫グロブリンの産生が欠如する場合にヒト抗体の完全なレパートリーを産生できるヒト免疫グロブリン座を含むトランスジェニック動物（例えばマウス）を産生することが現在可能である。例えば、キメラおよび生殖系突然変異マウスの抗体重鎖結合領域（ J_H ）遺伝子の同型接合性欠失が内在性抗体産生の完全な阻害をもたらすことを記載している。このような生殖系突然変異マウスへのヒト生殖系免疫グロブリン遺伝子アレイの移入は、抗原投与時にヒト抗体の産生をもたらすであろう。例えば、Jakobovits et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2551; Jakobovits et al., 1993, Nature 362:255-258; Bruggemann et al., 1993, Year in Immuno. 7: 33; 米国特許第5,545,806号; 第5,569,825号; 第5,591,669号; 第5,545,807号; 第5,545,807号; 第5,625,126号; 第5,633,425号; および第5,661,016号; ならびにWO97/17852を参照のこと。

10

【0201】

あるいは、非免疫ドナー由来の免疫グロブリン可変（V）ドメイン遺伝子レパートリーからインビトロでヒト抗体および抗体断片を産生するためにファージディスプレイ技術が用いられ得る。この技術に従って、抗体のVドメイン遺伝子は、M13またはfdなどの線維状バクテリオファージの主要あるいはマイナーなコートタンパク質遺伝子にインフレームでクローニングされ、ファージ粒子の表面上に機能的抗体断片として提示される。該線維状粒子はファージゲノムの一本鎖DNAコピーを含むので、抗体の機能特性に基づいた選別はまた該特性を示す抗体をコードする遺伝子の選別ももたらす。従って、該ファージはB細胞の特性のいくつかを模倣する。ファージディスプレイは多様な形式で実行され得る。V遺伝子分節のいくつかの起源はファージディスプレイに用いられ得る。多様な抗オキサロン抗体が免疫化マウスの脾臓に由来するV遺伝子の小規模ランダム組み合わせライブラリーから単離された。免疫化を受けていないヒトのドナーに由来するV遺伝子のレパートリーが構築でき、多様な抗原（自己抗原を含む）アレイに対する抗体が単離できる。ファージライブラリーからヒト抗体を選別する方法は、該ファージライブラリーがヒト抗体を発現する場合、当技術分野で周知である（Vaughan et al., 1996, Nature Biotechnology 14: 309-314; Sheets et al., 1998, PNAS 95:6157-6162; Hoogenboom and Winter, 1991, J. Mol. Biol. 227:381; McCafferty et al., 1990, Nature 348:552-554; Clackson et al., 1991, Nature 352:624-628; and Marks et al., 1991, J. Mol. Biol., 222:581-597）。抗体ファージライブラリーの作製および使用の技術も米国特許第5,969,108号; 第6,172,197号; 第5,885,793号; 第6,521,404号; 第6,544,731号; 第6,555,313号; 第6,582,915号; 第6,593,081号; 第6,300,064号; 第6,653,068号; 第6,706,484号; および第7,264,963号; ならびにRothe et al., 2008, J. Mol. Bio. 376:1182-1200（それぞれが参照により全体として組み入れられる）に記載される。鎖シャッフリング（Marks et al., 1992, Bio/Technology 10:779-783、参照により全体として組み入れられる）などの親和性成熟戦略は、当技術分野で知られており、高親和性ヒト抗体を生成するために用いられ得る。

20

30

【0202】

ヒト抗体はまた当技術分野で公知の種々の技術を用いて直接調製され得る。標的抗原に対する抗体を産生するインビトロで免疫化された、または免疫化された個体から単離された不死化ヒトBリンパ球が作製され得る（例えば、Cole et al., 1985, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss. P. 77; Boemer et al., 1991, J. Immunol., 147 (1): 86-95; 米国特許第5,750,373号; 第5,567,610号; および第5,229,275号を参照）。

40

【0203】

全非ヒト可変ドメインをヒト定常領域上に移植することは、「古典的」キメラ抗体を産生することが理解されよう。本出願の文脈において、「キメラ抗体」という用語は、免疫反応性の領域または部位が第一の種から得られるかまたは由来し、定常領域（本発明にしたがって無傷、部分的または改変され得る）が第二の種から得られる任意の抗体を意味すると考えられる。幾つかの態様において、該抗原結合の領域または部位はヒト以外の起源

50

(例えばマウス)に由来し、該定常領域はヒトである。可変領域の免疫原性特異性は一般にその起源により影響されないが、ヒト定常領域はヒト以外の起源に由来する定常領域に比べてヒト被験体から免疫応答を誘発する可能性が低い。

【0204】

重鎖および軽鎖の両方の可変ドメインは、1つまたは複数のCDRの少なくとも一部の置換、ならびに必要な部分なフレームワーク領域の置換および配列改変により改変される。CDRは該フレームワーク領域が由来する抗体として同じクラスまたは同等のサブクラスの抗体に由来し得るが、CDRは異なるクラスの抗体および好ましくは異なる種由来の抗体に由来することが予測される。1つの可変ドメインの抗原結合能力を他に転移するためにCDRの全てをドナー可変領域由来の完全CDRで置換することは必要でないであろうことが強調されなければならない。むしろ、抗原結合部位の活性を維持するために必要な残基を転移すれば足りるであろう。米国特許第5,585,089号;第5,693,761号;および第5,693,762号で明記される説明を鑑みて、免疫原性の低減した機能的抗体を得るために、日常の実験の実施により、あるいは試行錯誤の試験により、当技術分野内でよいだろう。

10

【0205】

可変領域への改変にもかかわらず、本発明の改変抗体は、天然または未改変の定常領域を含むおおよそ同じ免疫原性の抗体と比較して増大した腫瘍局在化または短縮した血清半減期などの所望の生化学的および/または生物学的特徴を提供するために、少なくとも1つまたは複数の定常領域ドメインの画分が欠失または別な方法で改変した抗体またはその免疫反応性断片を含むことが理解されよう。幾つかの態様において、改変抗体の定常領域はヒトの定常領域を含むであろう。本発明に適合する定常領域への改変は、1つまたは複数のドメインにおける1つまたは複数のアミノ酸の付加、欠失または置換を含む。すなわち、本明細書で開示する改変抗体は3つの重鎖定常ドメイン(CH1、CH2またはCH3)の1つまたは複数および/または軽鎖定常ドメイン(CL)への改変または修飾を含み得る。本発明の幾つかの態様において、1つまたは複数のドメインが部分的または完全に欠失する改変定常領域が意図される。他の態様において、改変抗体は、全CH2ドメインが除去された(CH2構築物)ドメイン欠失の構築物または変異体を含む。さらなる他の態様において、除外された定常領域ドメインは、通常定常領域の欠如により授けられる分子柔軟性のいくらかを提供する短アミノ酸スペーサー(例えば10残基)により置換されるであろう。

20

【0206】

それらの立体配置に加えて、定常領域がいくつかのエフェクター機能を媒介することが当技術分野で知られている。例えば、補体のC1構成要素の抗体への結合は補体系を活性化する。補体の活性化はオプソニン化および細胞病原体の溶解に重要である。補体の活性化はまた炎症応答も刺激し自己免疫過敏性にも関与し得る。さらに、抗体は細胞のFc受容体(FcR)に結合する抗体Fc領域のFc受容体部位でFc領域を介して細胞に結合する。IgG(受容体)、IgE(受容体)、IgA(受容体)およびIgM(μ 受容体)を含む異なるクラスの抗体に特異的ないくつかのFc受容体が存在する。細胞表面上のFc受容体への抗体の結合は、貪食、抗体コート粒子の破壊、免疫複合体のクリアランス、キラー細胞による抗体コート標的細胞の溶解(抗体依存性細胞媒介性細胞障害、すなわちADCC)、炎症伝達物質の放出、胎盤通過および免疫グロブリン産生の制御を含むいくつかの重要かつ多様な生物

30

40

【0207】

本発明の範囲を限定しないが、本明細書に記載されるように改変される定常領域を含む抗体は、投与抗体の生物学的特徴に順に作用する改変されたエフェクター機能を提供すると確信する。例えば、定常領域ドメインの欠失または不活性化(点突然変異または他の手段により)は血中改変抗体のFc受容体結合を減少し得ることにより、腫瘍局在化を増大する。他の場合において、本発明と一致して、定常領域の改変は補体結合を加減するため、血清半減期およびコンジュゲート細胞毒素の非特異的会合を減少し得る。定常領域のさらなる他の改変は、増大した抗原特異性または抗体柔軟性のため局在化を増進できるジスル

50

フィド結合またはオリゴ糖部分を除外するために用いられ得る。同様に、本発明に従う定常領域への改変は周知の生化学技術または分子工学技術を用いて容易に為され得る。

【0208】

改変抗体は各改変抗体のヒンジ領域に直接CH3ドメインを融合するよう操作され得ることに留意されたい。他の構築物において、該ヒンジ領域と改変CH2および/またはCH3ドメインとの間にペプチドスペーサーを提供することが望ましい。例えば、適合する構築物は、該CH2ドメインが欠失し残るCH3ドメイン（改変または未改変）が5~20アミノ酸スペーサーで該ヒンジ領域と連結される場合に発現し得る。このようなスペーサーは、例えば定常ドメインの調節要素が依然自由で接近しやすいことまたは該ヒンジ領域が依然柔軟性があることを保証するために付加され得る。しかしながら、該アミノ酸スペーサーは、ある場合には、該構築物に対して免疫原性があり望ましくない免疫応答を引き起こすことが記されるべきである。従って、該構築物に付加される任意のスペーサーは、相対的に非免疫原性であるべきであり、または改変抗体の所望の生化学的および/または生物学的性質が維持されるべきである場合、実に完全に除外されるべきである。

10

【0209】

全定常領域ドメインの欠失に加えて、本発明の抗体が部分欠失または少数もしくは唯一つのアミノ酸置換により提供され得ることが理解されよう。例えば、CH2ドメインの選択域における単一アミノ酸の突然変異はFc結合を実質的に減少させるのに十分であり、それにより腫瘍局在化を増大し得る。同様に、調節すべきエフェクター機能（例えば補体C1q結合）を制御する1つまたは複数の定常領域ドメインの該部分を単に欠失させることが望ましいかもしれない。対象の定常領域ドメインに関連する他の望ましい機能は無傷のままにして、定常領域のこのような部分欠失は抗体の選別特徴（血清半減期）を改良し得る。さらに、上記に示唆したように、開示される抗体の定常領域は、得られる構築物のプロファイルを高める1つまたは複数のアミノ酸の突然変異または置換を通して改変され得る。この点において、保存結合部位（例えばFc結合）により与えられる活性を破壊することが可能であり得る一方、改変抗体の立体配置および免疫原性プロファイルを実質的に維持する。さらなる他の態様は、エフェクター機能などの望ましい特徴を向上させ、より多くの細胞毒素もしくは炭水化物の付着を提供するために定常領域への1つまたは複数のアミノ酸の付加を含む。このような態様において、選択された定常領域ドメインに由来する特定の配列を挿入または複製することが望ましい。

20

30

【0210】

本発明はまたNotch受容体を特異的に認識する二重特異性抗体を包含する。二重特異性抗体は少なくとも2つの異なるエピトープを特異的に認識し結合できる抗体である。異なるエピトープは同じ分子内（例えば同じNotch受容体ポリペプチド）または異なる分子上のいずれかに存在し得る。例えば、該抗体は、Notch受容体、ならびに例えば、1）T細胞受容体（例えばCD3）もしくはFc受容体（例えばCD64、CD32、もしくはCD16）などの白血球上のエフェクター分子、または2）本明細書に詳細に記載する細胞障害剤を特異的に認識し結合し得る。二重特異性抗体は無傷の抗体または抗体断片であり得る。二重特異性抗体を作製する技術は当技術分野で普及している（Millstein et al., 1983, Nature 305:537-539; Brennan et al., 1985, Science 229:81; Suresh et al., 1986, Methods in Enzymol. 121:120; Traunecker et al., 1991, EMBO J. 10:3655-3659; Shalaby et al., 1992, J. Exp. Med. 175:217-225; Kostelny et al., 1992, J. Immunol. 148:1547-1553; Gruber et al., 1994, J. Immunol. 152:5368; および米国特許第5,731,168号）。

40

【0211】

本発明のある態様において、例えば腫瘍浸潤を増大させるために無傷抗体よりむしろ抗体断片を使用することが望ましいことがあり得る。抗体断片の産生について種々の技術が知られている。伝統的には、これらの断片は無傷抗体のタンパク質分解によって派生する（例えば、Morimoto et al., 1993, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117およびBrennan et al., 1985, Science, 229:81）。しかしながら、現在、これらの断片は通常本明細書に記載するように組み換え宿主細胞により直接産生される。従

50

って、Fab、Fv、およびscFvの抗体断片は全て大腸菌または他の宿主細胞で発現し分泌され得るため、大量のこれらの断片を産生できる。あるいは、このような抗体断片は本明細書で論議される抗体ファージライブラリーから単離され得る。抗体断片はまた、例えば米国特許第5,641,870号に記載されるような直鎖状抗体であり、単一特異性または二重特異性であり得る。抗体断片の産生の他の技術は明らかであろう。

【0212】

特に抗体断片の場合、その血清半減期を延ばすために抗体を改変することがさらに望ましい。これは、例えば抗体断片における適切な領域の突然変異により抗体断片にサルベージ受容体結合エピトープを組み込むことにより、またはペプチドタグにエピトープを組み込んだ後、いずれかの端または中間で抗体断片と融合させることにより（例えばDNAまたはペプチド合成により）達成され得る。

10

【0213】

本発明は、変異体、ならびに本明細書に明記するキメラ、ヒト化およびヒトの抗体、またはその抗体断片と実質的に相同な等価物をさらに包含する。これらは、例えば保存的置換突然変異、すなわち類似アミノ酸による1つまたは複数のアミノ酸の置換を含み得る。例えば、保存的置換は、例えば1つの酸性アミノ酸と別の酸性アミノ酸、1つの塩基性アミノ酸と別の塩基性アミノ酸、または1つの中性アミノ酸と別の中性アミノ酸など、同じ一般クラス内の他のアミノ酸と1つのアミノ酸の置換を指す。保存的アミノ酸置換により意味されるものは当技術分野で周知である。

【0214】

本発明はまた細胞障害剤にコンジュゲートさせた抗体を含むイムノコンジュゲートにも関する。細胞障害剤は、化学療法剤、増殖阻害剤、毒素（例えば細菌、真菌、植物、もしくは動物起源の酵素活性毒素、またはその断片）、放射性同位体（すなわち放射性コンジュゲート）などを含む。このようなイムノコンジュゲートの生成に役立つ化学療法剤は、例えば、メトトレキサート、アドリアマイシン、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、ダウノルピシンまたは他の挿入剤を含む。使用され得る酵素活性毒素およびその断片は、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、外毒素A鎖、リシンA鎖、アプリンA鎖、モデシン (modeccin) A鎖、 α -サルシン (sarcin)、シナアブラギリタンパク質、ジアンシン (dianthin) タンパク質、フィトラカアメリカーナ (*Phytolaca americana*) タンパク質 (PAPI、PAPII、およびPAP-S)、ニガウリ (*Momordica charantia*) 阻害剤、クルシン (curcin)、クロティン (crotonin)、サバオナリアオフシナリス (*Sapaonaria officinalis*) 阻害剤、ゲロニン (gelonin)、マイトゲリン (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)、トリコテセネス (trichothecenes) を含む。抗体と細胞障害剤とのコンジュゲートは、N-サクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオール)プロピオネート (SPDP)、イミノチオレーン (iminothiollane) (IT)、イミドエステルの二官能性誘導体 (ジメチルアジピミデート (adipimidate) HCLなど)、活性エステル (ジサクシンイミジルスベレート (disuccinimidyl suberate) など)、アルデヒド類 (グルタルアルデヒドなど)、ビス-アジド化合物 (ビス (p-アジドベンゾイル) ヘキサンジアミンなど)、ビス-ジアゾニウム誘導体 (ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミンなど)、ジイソシアネート類 (トルエン (tolylene) 2,6-ジイソシアネートなど)、およびビス活性フッ素化合物 (1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼンなど) などの種々の二官能性タンパク質-カップリング剤を用いて作製される。抗体と、カリケアマイシン、メイタンシノイド (maytansinoid)、トリコテセン (trichothene)、およびCC1065などの1つまたは複数の小分子毒素とのコンジュゲート、ならびに毒素活性を有するこれらの毒素の誘導体も使用できる。

20

30

40

【0215】

コンジュゲート抗体は2つの共有結合で結合した抗体からなる。このような抗体は、例えば不要な細胞を免疫細胞が標的化すると意図されている（米国特許第4,676,980号）。該抗体は、架橋剤を伴う方法を含む合成タンパク質化学における既知の方法を用いてイン

50

ビトロで調製できる。例えば、免疫毒素はジスルフィド交換反応を用いてまたはチオエーテル結合を形成することにより構築できる。この目的に適した試薬の例はイミノチオレートおよびメチル-4-メルカプトブチリミデート (methyl-4-mercaptobutyrimidate) を含む。

【0216】

幾つかの態様において、本発明の抗体は、例えば抗原依存性細胞媒介性細胞障害 (ADCC) および/または補体依存性細胞障害 (CDC) などのエフェクター機能を強化するために改変されるヒトFc領域を含む。これは抗体のFc領域に1つまたは複数のアミノ酸置換を導入することにより達成され得る。例えば、システイン残基がFc領域に導入され、この領域の鎖間ジスルフィド結合の形成を可能にし、補体媒介性殺細胞および抗体依存性細胞性細胞障害 (ADCC) を改善し得る (Caron et al., 1992, J. Exp Med. 176:1191-1195; Shopes, 1992, Immunol. 148:2918-2922)。高い抗腫瘍活性をもつホモ二量体抗体も、Wolff et al., 1993, Cancer Research 53:2560-2565に記載されるようにヘテロ二官能性架橋剤を用いて調製され得る。あるいは、2つのFc領域を有する抗体が操作され得る (Stevenson et al., 1989, Anti-Cancer Drug Design 3:219-230)。

10

【0217】

どのようにして有用な量が得られるかに関わらず、本発明の抗体は多数のコンジュゲート (すなわちイムノコンジュゲート) または非コンジュゲート形態の任意の1つで用いられ得る。本発明の抗体は、補体依存性細胞障害 (CDC) および抗体依存性細胞性毒性 (ADCC) を含む、被験体の自然防御機構を利用し悪性細胞を除去するために、非コンジュゲートまたは「露出」形態で用いられ得る。幾つかの態様において、該抗体は、多数の周知のキレート剤または直接標識のいずれか1つを用いて、 ^{90}Y 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{123}I 、 ^{111}In 、 ^{131}In 、 ^{212}Bi 、 ^{105}Rh 、 ^{153}Sm 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{166}Ho 、 ^{177}Lu 、 ^{186}Re および ^{188}Re を含むがこれらの限定されない放射性同位体とコンジュゲートし得る。他の態様において、開示される組成物は、薬物、プロドラッグ、またはメトトレキサート、アドリアマイシン、およびインターフェロンなどのリンホカインなどの生物応答調節物質に結合した抗体を含み得る。本発明のさらなる他の態様はリシンまたはジフテリア毒素などの特異的生物毒素とコンジュゲートした抗体の使用を含む。さらなる他の態様において、改変抗体は他の免疫学的に活性なリガンド (例えば抗体またはその断片) と複合体形成でき、得られる分子は新生細胞およびT細胞などのエフェクター細胞の両方に結合する。使用するコンジュゲートまたは非コンジュゲート改変抗体の選択は、癌の型および病期、補助治療 (例えば化学療法または外部放射) の使用ならびに患者の状態に依存するであろう。本明細書の教示を考慮してこのような選択を容易に為し得ることが理解されよう。

20

30

【0218】

抗Notch抗体の調製および特徴決定はまた、例えば、全体として参照により本明細書に組み入れられる米国特許出願公開第2008/0131434号で教示される。

【0219】

ある態様において、Notch結合剤またはアンタゴニストは、抗体ではないポリペプチドである。タンパク質標的に高い親和性で結合する非抗体ポリペプチドを同定し産生する種々の方法が当技術分野で知られる。例えば、各々が全体として参照により本明細書に組み入れられる、Skerra, 2007, Curr. Opin. Biotechnol., 18:295-304; Hosse et al., 2006, Protein Science, 15:14-27; Gill et al., 2006, Curr. Opin. Biotechnol., 17:653-658; Nygren, 2008, FEBS J., 275:2668-76; およびSkerra, 2008, FEBS J., 275:2677-83を参照のこと。ある態様において、ファージディスプレイ技術はNotch結合ポリペプチドを同定/産生するために使用された。ある態様において、該ポリペプチドは、プロテインA、リポカリン、フィブロネクチンドメイン、アンキリン共通反復ドメイン、およびチオレドキシニンからなる群より選択される型のタンパク質骨格を含む。

40

【0220】

幾つかの態様において、該剤は非タンパク質分子である。ある態様において、該剤は小分子である。組み合わせ化学ライブラリーおよび非タンパク質Notch結合剤の同定に役立つ

50

つ技術は当業者に知られている。例えば、各々が全体として参照により本明細書に組み入れられる、Kennedy et al., 2008, J. Comb. Chem, 10:345-354; Dolle et al., 2007, J. Comb. Chem., 9:855-902; およびBhattacharyya, 2001, Curr. Med. Chem., 8:1383-404を参照のこと。さらなる態様において、該剤は炭水化物、グリコサミノグリカン、糖タンパク質、またはプロテオグリカンである。

【0221】

ある態様において、該剤は核酸アプタマーである。アプタマーは別分子への結合能に基づいて（例えばランダムまたは突然変異プールから）選択されたポリヌクレオチド分子である。幾つかの態様において、該アプタマーはDNAポリヌクレオチドを含む。他のある態様において、該アプタマーはRNAポリヌクレオチドを含む。ある態様において、該アプタマーは1つまたは複数の修飾核酸残基を含む。タンパク質に結合する核酸アプタマーを生成しスクリーニングする方法は当技術分野で周知である。例えば、各々が全体として参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第5,270,163号;第5,683,867号;第5,763,595号;第6,344,321号;第7,368,236号;第5,582,981号;第5,756,291号;第5,840,867号;第7,312,325号;および第7,329,742号;国際公開公報第WO02/077262号;第WO03/070984号;米国特許出願公開第2005/0239134号;第2005/0124565号;および第2008/0227735号を参照のこと。

10

【0222】

本発明の抗体は当技術分野で公知の任意の方法により免疫特異的結合について分析され得る。用いられ得る免疫測定は、Biacore分析などの技術を用いる競合および非競合アッセイ系、FACS分析、免疫蛍光、免疫細胞化学、ウェスタンブロット分析、放射免疫測定、ELISA、「サンドウィッチ」免疫測定、免疫沈降アッセイ、沈降素反応、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散アッセイ、凝集測定、補体結合測定、免疫放射定量測定、蛍光免疫測定、およびプロテインA免疫測定を含むがこれらに限定されない。このような測定は常套であり当技術分野で周知である（例えば、各々が全体として参照により本明細書に組み入れられるAusubel et al., eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc. New Yorkを参照のこと）。

20

【0223】

本発明の幾つかの態様において、Notch受容体に対する抗体の免疫特性はELISAを用いて決定される。ELISA測定は、抗原を調製する工程、96ウェルマイクロタイタープレートのウェルを抗原でコーティングする工程、酵素基質（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼまたはアルカリ性ホスファターゼ）などの検出可能な化合物にコンジュゲートさせたNotch受容体に対する抗体を該ウェルに添加する工程、一定時間インキュベートする工程、および抗原の存在を検出する工程を含む。あるいはNotch受容体に対する抗体は検出可能な化合物とコンジュゲートされないが、その代わりにNotch受容体に対する抗体を認識する第二のコンジュゲート抗体が該ウェルに添加される。さらに、該ウェルを該抗原でコーティングする代わりに、Notch受容体に対する抗体が該ウェルにコーティングされ、コーティングされたウェルへの抗原の添加後に、検出可能な化合物とコンジュゲートさせた第二の抗体が添加され得る。検出シグナルを増大するために修正され得るパラメータ、およびELISAの他の変形は当技術分野で周知である（例えば、Ausubel et al., eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York at 11.2.1を参照）。

30

40

【0224】

Notch受容体に対する抗体の結合親和性および抗体-抗原相互作用のオフレートは競合結合測定により測定できる。競合結合測定の一例は、増量する非標識抗原の存在下で標識抗原（例えば³Hまたは¹²⁵I）またはその断片もしくは変異体と対象となる抗体とをインキュベーションした後、標識抗原に結合した抗体を検出する工程を含む放射免疫測定である。Notch受容体に対する抗体の親和性および結合オフレートはスキャッチャードプロット解析によりデータから決定され得る。パイアコア動態解析は、Notch受容体に対する抗体の結合オンオフレート（binding on and off rates）を決定するために使用される。パイアコア動態解析は表面上の固定化Notch抗原とチップの抗体との結合および解離を分析する

50

工程を含む。

【0225】

本発明は、SEQ ID NO:2、4、13、14、16、18、19、20、39、40、49、50、52、53、54、55、56、または57のポリペプチドをコードする単離ポリヌクレオチド、およびSEQ ID NO:1、3、15、17、47または48のポリヌクレオチドを提供する。本発明のポリヌクレオチドはRNAの形態またはDNAの形態であり得る。ここで、DNAは、cDNA、ゲノムDNA、および合成DNAを含む。DNAは、二本鎖または一本鎖であり、一本鎖である場合、コード鎖または非コード鎖（アンチセンス）であり得る。従って、「ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド」という用語は、ポリペプチドのコード配列のみを含むポリヌクレオチドだけでなく、追加のコードおよび/または非コード配列を含むポリヌクレオチドを包含する。幾つかの態様において、本発明は、SEQ ID NO:2、4、13、14、16、18、19、20、39、40、49、50、52、53、54、55、56、または57のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドを提供する。幾つかの態様において、該ポリヌクレオチドは、SEQ ID NO:1、3、15、17、47、48、58、59または60のポリヌクレオチドにハイブリダイズする。幾つかの態様において、該ポリヌクレオチドはストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズする。

10

【0226】

本明細書で用いられるように、「ハイブリダイズする」または「選択的にハイブリダイズする」または「特異的にハイブリダイズする」という語句は、特定のヌクレオチド配列が複合混合物（例えばDNAまたはRNAのライブラリー）に存在する場合にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下における該配列にのみ分子が結合または二本鎖形成することを指す。例えば、Andersen(1998) Nucleic Acid Hybridization Springer-Verlag; Ross(ed. 1997) Nucleic Acid Hybridization Wileyを参照のこと。

20

【0227】

本明細書で用いられるように、「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」という語句は、プローブまたは他のポリヌクレオチドが、通常核酸の複合混合物において、その標的部分配列または他の相補的配列にハイブリダイズするが、一般に他の配列にハイブリダイズしない条件を指す。ストリンジェントな条件は配列に依存し、異なる状況において異なるであろう。より長い配列はより高温で特異的にハイブリダイズする。核酸のハイブリダイゼーションへの詳しい手引きは、Tijssen, Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Probes, 「Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays」(1993)で見出される。一般に、ストリンジェントな条件は、規定のイオン強度で特定配列の熱融解点(T_m)より約5~10 低く選定される。T_mは(規定のイオン強度、pH、および核酸濃度の下で)標的に相補的なプローブの50%が標的配列に平衡状態でハイブリダイズする温度である(標的配列が過剰に存在するため、T_mでプローブの50%が平衡状態で占める)。ストリンジェントな条件は、塩濃度がpH7.0から8.3で約1.0M未満のナトリウムイオン、通常約0.01から1.0Mのナトリウムイオン濃度(または他の塩)であり、かつ温度が短いプローブ(例えば10から50ヌクレオチド)で少なくとも約30 であり長いプローブ(例えば50ヌクレオチドを上回る)で少なくとも約60 であるものである。ストリンジェントな条件はまたホルムアミドなどの不安定化剤の添加で達成され得る。高ストリンジェントなハイブリダイゼーションでは、陽性シグナルはバックグラウンドハイブリダイゼーションの少なくとも2倍または10倍である。例示的な高ストリンジェントまたはストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、42 度で50%ホルムアミド、5xSSC、および1%SDSのインキュベートまたは65 度で5xSSCおよび1%SDSのインキュベートと65 度で0.2xSSCおよび0.1%SDSでの洗浄を含む。PCRについて、約36 度の温度は低ストリンジェントな増幅の典型であるが、アニーリング温度はプライマーの長さに応じて約32 から約48 まで変化し得る。高ストリンジェントなPCR増幅では、約62 度の温度が例示的であるが、高ストリンジェントなアニーリング温度はプライマーの長さおよび特異性に応じて約50 から約65 まで変化し得る。高ストリンジェントおよび低ストリンジェントな両増幅の例示的なサイクル条件は、30

30

40

50

~120秒間で90 から95 の変性相、30~120秒続くアニーリング相、および1~2分間約72の伸長相を含む。

【0228】

本発明はさらに断片、類似体、および誘導体をコードする上記ポリヌクレオチドの変異体に関する。ポリヌクレオチドの変異体は、天然に存在するポリヌクレオチドの対立遺伝子変異体または天然に存在しないポリヌクレオチドの変異体であり得る。

【0229】

以上に示したように、該ポリヌクレオチドは開示ポリペプチドのコード配列の天然に存在する対立遺伝子変異体であるコード配列を有し得る。当技術分野で知られるように、対立遺伝子変異体は、コードするポリペプチドの機能を実質的に改変しない1つまたは複数のヌクレオチドの置換、欠失または付加を有するポリヌクレオチド配列の別の形態である。

10

【0230】

本発明は、成熟ポリペプチドのコード配列が、宿主細胞からのポリペプチドの発現および分泌を助けるポリヌクレオチドと、例えば該細胞からのポリペプチドの輸送を制御する分泌配列として機能するリーダー配列と、同じ読み枠で融合され得るポリヌクレオチドも含む。リーダー配列を有するポリペプチドは、プレタンパク質であり、ポリペプチドの成熟形態を形成するために宿主細胞により切断されるリーダー配列を有し得る。該ポリヌクレオチドは成熟タンパク質に追加の5'アミノ酸残基を加えたプロタンパク質もコードし得る。プロ配列を有する成熟タンパク質はプロタンパク質であり、該タンパク質の不活性形態である。一度該プロ配列が切断されると、活性な成熟タンパク質が残る。

20

【0231】

従って、例えば、本発明のポリヌクレオチドは、成熟タンパク質、またはプロ配列を有するタンパク質またはプロ配列およびプレ配列（リーダー配列）の両方を有するタンパク質をコードし得る。

【0232】

本発明のポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチドを精製できるマーカー配列とインフレームで融合したコード配列も有し得る。例えば、該マーカー配列は、pQE-9ベクターにより供給されるヘキサ-ヒスチジンタグであり、細菌宿主の場合に該マーカーと融合した成熟ポリペプチドの精製を提供し得る。または例えば、該マーカー配列は、哺乳動物宿主、例えばCOS-7細胞が用いられる場合、血球凝集素（HA）タグであり得る。HAタグはインフルエンザ血球凝集素タンパク質に由来するエピトープに対応する（Wilson et al., 1984, Cell 37:767）。

30

【0233】

本発明のさらなる態様は、SEQ ID NO:1、3、15、17、47、48、58、59または60と少なくとも90%同一、95%同一、および幾つかの態様において、少なくとも96%、97%、98%または99%同一なヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドを含む単離核酸分子を含む。幾つかの態様において、少なくとも90%同一、95%同一、および幾つかの態様において、少なくとも96%、97%、98%または99%同一なヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドは、SEQ ID NO:1、3、15、17、47、48、58、59または60のポリヌクレオチドとハイブリダイズする。幾つかの態様において、少なくとも90%同一、95%同一、および幾つかの態様において、少なくとも96%、97%、98%または99%同一なヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドは、SEQ ID NO:58、59または60のポリヌクレオチドとハイブリダイズする。幾つかの態様において、該ポリヌクレオチドはストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズする。幾つかの態様において、該ポリヌクレオチドはストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でSEQ ID NO:58、59または60のポリヌクレオチドとハイブリダイズする。参照ヌクレオチド配列と少なくとも、例えば95%「同一な」ヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドにより、ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列は、該ポリヌクレオチド配列が参照ヌクレオチド配列の各100ヌクレオチドにつき5以下の点突然変異を含み得ることを除いて、該参照配列と同一であることが意図される。換言すれ

40

50

ば、参照ヌクレオチド配列と少なくとも95%同一なヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドを得るために、参照配列のヌクレオチドの5%までが欠失または他のヌクレオチドで置換され、または参照配列の全ヌクレオチドの5%までのヌクレオチド数が参照配列に挿入され得る。参照配列のこれらの突然変異は、参照ヌクレオチド配列のアミノまたはカルボキシ末端部位で、または該末端部位間のどこかで起き、個別に参照配列のヌクレオチド間であるいは参照配列内の1つまたは複数の隣接群で散在し得る。

【0234】

実際問題として、任意の特定核酸分子が参照配列と确实性パーセントの配列同一性を有するか否かは（例えば、参照配列に対して少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、もしくは少なくとも約97%の配列同一性を有する、または参照配列と95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一である）、Bestfitプログラム（Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711）などの既知のコンピュータプログラムを用いて従来的に決定され得る。Bestfitは、2配列間の最良な相同性分節を見出すために、Smith and Waterman, 1981, *Advances in Applied Mathematics* 2:482-489の局部相同性アルゴリズムを使用する。特定配列が例えば本発明の参照配列と95%同一であるか否かを決定するためにBestfitまたは任意の他の配列アライメントプログラムを用いる場合、該パラメータは、無論、同一性の百分率が参照ヌクレオチド配列の全長にわたって計算され且つ参照配列におけるヌクレオチド総数の5%までの相同性中のギャップは許容されるように設定される。

10

20

【0235】

該ポリヌクレオチド変異体は、コード領域、非コード領域、またはその両方で変更を含む。幾つかの態様において、該ポリヌクレオチド変異体は、サイレントの置換、付加、または欠失を生じるが、コードされるポリペプチドの性質または活性を変更しない変更を含む。幾つかの態様において、ヌクレオチド変異体は遺伝コードの縮重によるサイレント置換により産生される。ポリヌクレオチド変異体は、種々の理由で、例えばヒトmRNAのコドンで大腸菌などの細菌宿主に好まれるコドンに変更するなど、特定の宿主用にコドン発現を最適化するために産生され得る。

【0236】

本発明はさらにNotch受容体を標的とするアンタゴニスト（例えば抗体）を含む薬学的組成物を提供する。これらの薬学的組成物は腫瘍細胞増殖を阻害しヒト患者の癌を治療する用途を見出す。

30

【0237】

製剤は、本発明の精製されたNotch結合剤またはアンタゴニスト（例えば抗体）を滅菌凍結乾燥粉末、水溶液等としての薬学的に許容される担体、賦形剤、および/または安定剤と混合することにより、保存および使用のために調製される（Remington, *The Science and Practice of Pharmacy* 20th Edition Mack Publishing, 2000）。適切な担体、賦形剤、または安定剤は、リン酸塩、クエン酸塩、および他の有機酸などの非毒性緩衝剤；塩化ナトリウムなどの塩類；アスコルビン酸およびメチオニンなどの抗酸化剤；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、塩化ヘキサメトニウム、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、フェノール、ブチルもしくはベンジルアルコール、メチルもしくはプロピルパラベンなどのアルキルパラベン、カテコール、レソルシノール、シクロヘキサノール、3-ペンタノール、およびm-クレゾール；低分子量ポリペプチド（約10未満のアミノ酸残基）；血清アルブミン、ゼラチン、および免疫グロブリンなどのタンパク質；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、およびリシンなどのアミノ酸；単糖類、二糖類、グルコース、マンノース、およびデキストリンなどの炭水化物；EDTAなどのキレート剤；スクロース、マンニトール、トレハロースおよびソルビトールなどの糖類；ナトリウムなどの塩形成対イオン；Zn-タンパク質複合体などの金属錯体；ならびに/またはTWEENおよびポリエチレングリコール（PEG）などの非イオン性界面活性剤などの保存剤を含む。

40

50

【0238】

本発明の薬学的組成物は、局所あるいは全身治療のため、あらゆる方法で投与され得る。投与は、経皮貼布、軟膏、ローション、クリーム、ゲル、点滴、座剤、噴霧、液体および粉末を用いて局所性（経膈および直腸を含む粘膜など）；肺（例えば、粉末もしくはエアロゾルの吸入もしくは吹送により、噴霧器により、気管内、鼻腔内、表皮性および経皮を含む）；経口；または静脈内、動脈内、皮下、腹腔内、腫瘍内、もしくは筋肉注射を含む非経口もしくは注入；または頭蓋内（例えば髄腔内もしくは心室内）投与であり得る。

【0239】

治療製剤は単位剤形であり得る。このような製剤は、錠剤、丸薬、カプセル、粉末、顆粒、水もしくは非水媒体の溶液または懸濁液、または経口、非経口、もしくは直腸投与もしくは吸入による投与のための座剤を含む。錠剤などの固体組成物において、主活性成分は薬学的担体と混合される。従来の錠剤化成分は、コーンスターチ、ラクトース、スクロース、ソルビトール、タルク、ステアリン酸、ステアリン酸マグネシウム、第二リン酸カルシウムまたはゴム、および他の希釈剤（例えば水）を含み、本発明の化合物の均質な混合物、またはその非毒性の薬学的に許容される塩を含む固体予備処方組成物を形成する。固体予備処方組成物は次いで上記型の単位剤形に細分される。新規組成物の錠剤、丸薬などはコーティングされ、または他の方法で調合され、持効性作用の利点を与える剤形を提供し得る。例えば、錠剤または丸薬は、外部構成要素により覆われる内部組成物を含み得る。さらに、該2つの構成要素は、分解に耐えるのに役立つ、且つ内部構成要素が損なわれずに胃を通過できるまたは遅延放出できる腸溶層により分離され得る。種々の物質がこのような腸溶層またはコーティングに使用でき、このような物質は、多数のポリマー酸、およびセラック、セチルアルコールおよび酢酸セルロースなどの物質とポリマー酸との混合物を含む。

【0240】

薬学的製剤は、リポソームと複合体形成した本発明のアンタゴニスト（例えば抗体）を含む（Epstein, et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688; Hwang, et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030; および米国特許第4,485,045号および第4,544,545号）。向上した循環時間のリポソームが米国特許第5,013,556号に開示されている。いくつかのリポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール、およびPEGで誘導体化されたホスファチジルエタノールアミン（PEG-PE）を含む脂質組成物を用いて逆相蒸発法により作成し得る。リポソームは規定孔径のフィルターを通して押し出され所望の直径をもつリポソームを得る。

【0241】

アンタゴニスト（例えば抗体）はまたマイクロカプセルに封入され得る。例えば、それぞれコロイド薬物送達システム（例えば、リポソーム、アルブミン小球体、マイクロエマルジョン、ナノ粒子およびナノカプセル）、またはRemington's, The Science and Practice of Pharmacy, 20th Ed., Mack Publishing (2000)に記載のマクロエマルジョンのヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチン-マイクロカプセルおよびポリ-（メチルメタクリレート）（poly-(methylmethacrylate)）マイクロカプセルなどのマイクロカプセルは、例えばコアセルベーション技術によりまたは界面重合により調製される。

【0242】

その上、徐放性調節物が調製され得る。徐放性調製物の適切な例は、該抗体を含む固体疎水性ポリマーの半透過性基質を含み、その基質は成形品（例えばフィルムまたはマイクロカプセル）の形態である。徐放性基質の例は、ポリエステル、ポリ（2-ヒドロキシエチル-メタクリレート）またはポリ（ビニルアルコール）、ポリラクチド（polylactide）（米国特許第3,773,919号）などのヒドロゲル、L-グルタミン酸および7エチル-L-グルタメート、非分解性エチレン-酢酸ビニル、Lupron Depot（乳酸-グリコール酸共重合体および酢酸ロイプロリドからなる注入可能なマイクロスフェア）などの分解性乳酸-グリコール酸共重合体、スクロースアセテートイソブチレートおよびポリ-D(-)-3-ヒドロキシ酪酸を含む。

10

20

30

40

50

【0243】

ある態様において、薬学的組成物はNotch結合剤またはアンタゴニストと第二の治療剤の両方を含む。ある態様において、第二の治療剤は抗癌剤および/または抗血管形成剤である。

【0244】

本発明は、本明細書に記載するNotch受容体アンタゴニストを用いてNotch受容体を発現する腫瘍形成細胞の成長または増殖を阻害する方法を提供する。幾つかの態様において、該方法は、本明細書に記載する抗体またはポリペプチドの任意の1つを用いてNotch2および/またはNotch3受容体を発現する腫瘍形成細胞の成長を阻害する工程を含む。幾つかの態様において、Notch受容体を発現する腫瘍形成細胞の成長を阻害する方法は、該細胞をNotch受容体に対するアンタゴニストとインビトロで接触させる工程を含む。例えば、Notch受容体を発現する不死化細胞株または癌細胞株は培地で培養し、Notch2および/またはNotch3に特異的に結合し細胞増殖を阻害する抗体が該培地に添加される。または、腫瘍細胞および/または腫瘍幹細胞が例えば組織生検、胸水、または血液試料などの患者試料から単離され、培地で培養され、Notch2および/またはNotch3に特異的に結合し細胞増殖を阻害する抗体が添加される。幾つかの態様において、該アンタゴニストはNotch2および/またはNotch3受容体のエピトープを特異的に認識する抗体である。

10

【0245】

幾つかの態様において、Notch受容体を発現する腫瘍形成細胞の成長または増殖を阻害する方法は、該細胞をNotch受容体に対するアンタゴニスト(例えばNotch2および/またはNotch3のアンタゴニスト)とインビボで接触させる工程を含む。ある態様において、腫瘍形成細胞をNotch受容体に対するアンタゴニストと接触する工程は動物モデルで行われる。例えば、Notch受容体を発現する異種移植片は免疫不全マウス(例えばNOD/SCIDマウス)で成長する。該マウスは腫瘍の成長を阻害するためにNotch受容体に対するアンタゴニストが投与される。あるいは、Notch受容体を発現する癌幹細胞は、例えば組織生検、胸水、または血液試料などの患者試料から単離され、免疫不全マウスに注入される。該マウスには次いで腫瘍の成長を阻害するためにNotch受容体に対するアンタゴニストが投与される。幾つかの態様において、Notch受容体のアンタゴニストは、腫瘍の増殖を防ぐため、該動物に腫瘍形成細胞の導入と同時にまたは直後に投与される。他の態様において、Notch受容体のアンタゴニストは、腫瘍形成細胞が特定の大きさまで成長した後の治療として投与される。幾つかの態様において、該アンタゴニストはNotch受容体に特異的に結合するNotch受容体タンパク質融合物である。ある態様において、該アンタゴニストはNotch受容体のエピトープを特異的に認識する抗体である。幾つかの態様において、該抗体は本明細書に記載する抗体またはポリペプチドの任意の1つである。

20

30

【0246】

ある態様において、腫瘍形成細胞をNotch受容体に対するアンタゴニストと接触させる工程は、癌と診断されたヒト患者で行われる。幾つかの態様において、該アンタゴニストはNotch受容体に特異的に結合する抗体である。他の態様において、該アンタゴニストはNotch受容体のエピトープを特異的に認識する抗体である。例えば、本発明は、被験体における腫瘍の増殖を阻害する方法を提供し、該方法は治療上有効量のヒトNotch2および/またはNotch3のアンタゴニストを該被験体に投与する工程を含む。幾つかの態様において、該アンタゴニストはNotch2に結合する抗体である。幾つかの態様において、該アンタゴニストはNotch3に結合する抗体である。幾つかの態様において、該アンタゴニストはNotch2およびNotch3に結合する抗体である。幾つかの態様において、該アンタゴニストは、前述した局面または態様の任意の1つならびに本明細書に記載する任意の他の局面または態様に記載する抗体またはポリペプチドである。ある態様において、該腫瘍はホスファターゼおよびテンシンホモログ(PTEN)遺伝子の欠失または突然変異を不活性化する工程を含む。

40

【0247】

本発明はさらに細胞におけるNotchシグナル伝達(例えばNotch2および/またはNotch3)

50

を阻害する方法を提供し、該方法は有効量のNotchアンタゴニストと該細胞とを接触させる工程を含む。これらの方法はインビボまたはインビトロであり得る。幾つかの態様において、該Notchアンタゴニストは抗体である。幾つかの態様において、該方法は、細胞におけるNotch2シグナル伝達を阻害する工程を含み、前述した局面または態様ならびに本明細書に記載する任意の他の局面または態様の任意の1つの有効量の抗体またはポリペプチドと該細胞とを接触させる工程を含む。幾つかの態様において、Notchアンタゴニストは抗体である。幾つかの態様において、該方法は細胞におけるNotch3シグナル伝達を阻害する工程を含み、前述した局面または態様ならびに本明細書に記載する任意の他の局面または態様の任意の有効量の抗体またはポリペプチドと該細胞とを接触させる工程を含む。

【0248】

10

本発明はさらに周皮細胞および/または血管平滑筋細胞の機能を調節する方法を提供し、該方法は有効量のヒトNotch3のアンタゴニストを被験体に投与する工程を含む。幾つかの態様において、該方法は周皮細胞および/または血管平滑筋細胞の機能を調節することにより血管新生を阻害する。幾つかの態様において、該アンタゴニストは、前述する局面または態様のいずれか、ならびに本明細書に記載する任意の他の局面または態様に記載されるような抗体またはポリペプチドである。ある態様において、阻害される血管発生は異常な血管発生である。ある態様において、阻害される血管発生は腫瘍内である。ある態様において、該方法はさらにVEGFまたはVEGF受容体のアンタゴニストを被験体に投与する工程を含む。

【0249】

20

さらに、本発明は被験体における血管新生または血管発生を阻害する方法を提供し、有効量のNotchアンタゴニストを該被験体に投与する工程を含む。ある態様において、NotchアンタゴニストはNotch3アンタゴニストである。ある態様において、NotchアンタゴニストはNotch2アンタゴニストである。ある態様において、該アンタゴニストはNotch2および/または3のアンタゴニストである。幾つかの態様において、該アンタゴニストは抗Notch2/3抗体である。幾つかの態様において、血管新生を阻害する方法は、前述する局面または態様ならびに本明細書に記載する任意の他の態様または局面のいずれかの抗体またはポリペプチドを投与する工程を含む。ある態様において、該血管新生は腫瘍血管新生である。ある態様において、血管発生は腫瘍の部位で発生する。ある代替態様において、血管新生は腫瘍血管新生ではない。ある態様において、血管新生または血管発生の阻害は、少なくとも部分的に周皮細胞および/または血管平滑筋細胞の機能調節による。ある態様において、該方法はさらに血管内皮細胞増殖因子(VEGF)またはVEGF受容体のアンタゴニストを被験体に投与する工程を含む。

30

【0250】

腫瘍(例えば癌幹細胞を含む腫瘍)の腫瘍原性を低減する方法も提供される。ある態様において、該方法は、治療上有効量のNotchアンタゴニストをその必要性のある被験体(例えば腫瘍を有する被験体)に投与する工程を含む。ある態様において、NotchアンタゴニストはNotch2に結合する抗体である。ある態様において、NotchアンタゴニストはNotch3に結合する抗体である。ある態様において、NotchアンタゴニストはNotch2およびNotch3に結合する抗体である。ある態様において、該Notchアンタゴニストは、前述した任意の局面または態様ならびに本明細書の他の部分に記載する任意の他の局面または態様のいずれかの抗体またはポリペプチドである。ある態様において、腫瘍における癌幹細胞の頻度は該抗体の投与により減少する。幾つかの態様において、該腫瘍は、結腸直腸腫瘍、乳房腫瘍、膵臓腫瘍または黒色腫である。

40

【0251】

本発明の剤およびアンタゴニストはNotch受容体に対する細胞の発現および/または反応性の増大により特徴付けられる様々な状態を治療するために使用されることが想定される。本発明は、癌などの増殖性疾患、血管新生に関連する疾病(例えば血管新生依存性疾病)、およびNotchシグナル伝達の上方調節または下方調節が役割を果たす疾病を治療する方法を提供する。

50

【0252】

ある態様において、Notch結合剤またはアンタゴニストで治療されるべき疾病はNotch関連疾病である。ある態様において、該疾病はNotchシグナル伝達（例えばNotch2および/またはNotch3シグナル伝達）の上方調節または下方調節により特徴付けられる。ある態様において、該疾病または腫瘍はNotch2および/またはNotch3依存性である。

【0253】

具体的には、Notch受容体に対するアンタゴニスト（例えば抗体）は、腎臓、肝臓、膀胱、乳房、胃、卵巣、結腸、直腸、前立腺、肺、外陰、甲状腺、頭部および首部、脳（膠芽細胞腫、星状細胞腫、髄芽腫など）、血液および/またはリンパ（白血病およびリンパ腫）の良性および悪性腫瘍を含むがこれらの限定されない増殖性疾病を治療するために使用されるであろうことが想定される。ある態様において、Notch結合剤またはアンタゴニストが治療に使用される増殖性疾患は、結腸直腸癌、乳がん、膵臓癌、または黒色腫である。ある態様において、該癌は癌幹細胞を含む。

10

【0254】

ある態様において、治療される腫瘍は固形腫瘍である。本発明の治療組成物、例えばNotchに結合する抗体を用いて治療され得る固形腫瘍の例は、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫（endotheliosarcoma）、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫（lymphangiendotheliosarcoma）、滑液腫瘍、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌、膵臓癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、扁平上皮細胞癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳頭癌、乳頭腺癌、嚢胞腺癌、延髄癌、気管支癌、腎細胞癌、肝癌、胆管癌、絨毛癌、精上皮腫、胚性癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸癌、精巣腫瘍、肺癌、小細胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神経膠腫、星状細胞腫、髄芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣腫、松果体腫、血管芽腫、聴神経腫、希突起膠腫、髄膜腫、黒色腫、神経芽腫、および網膜芽腫などの肉腫および癌腫を含むがこれらに限定されない。本発明は卵巣癌および乳癌などの肉腫および上皮癌に適用できる。ある態様において、該腫瘍は結腸直腸腫瘍、乳房腫瘍、膵臓腫瘍、または黒色腫である。ある態様において、該腫瘍は卵巣腫瘍である。ある態様において、該腫瘍は髄芽腫である。ある態様において、該腫瘍は癌幹細胞を含む。

20

【0255】

ある態様において、Notch結合剤またはアンタゴニストで治療されるべき疾病は血管新生に関連する疾病である。ある態様において、該疾病は癌である。ある他の態様において、該疾病は癌性状態ではない。例えば、該疾病は湿性黄斑変性、加齢黄斑変性、糖尿病性網膜症、血管腫、関節リウマチ、乾癬、血管新生緑内障、多嚢胞卵巣病、子宮内膜症および炎症性腸疾患であり得る。

30

【0256】

ある態様において、該腫瘍は、Notch結合剤またはアンタゴニストが標的とするNotch受容体または受容体を発現する。ある態様において、該腫瘍はNotch2および/またはNotch3を発現する。ある態様において、該腫瘍はNotch2および/またはNotch3を過剰発現する。ある態様において、該腫瘍は投与抗体が特異的に結合する1つまたは複数の種類のNotch受容体に依存する。例えば、ある態様において、Notch2（またはNotch2およびNotch3）に特異的に結合する抗体は該増殖を阻害し、または他の方法でNotch2依存性腫瘍を標的にするために使用され得る。ある態様において、Notch3（またはNotch2およびNotch3）に特異的に結合する抗体は該増殖を阻害し、または他の方法でNotch3依存性腫瘍を標的にするために使用され得る。ある態様において、該腫瘍は癌幹細胞を含む。

40

【0257】

ある態様において、該腫瘍は、腫瘍抑制ホスファターゼおよびテンシンホモログ（PTEN）をコードする遺伝子における欠失または突然変異を不活性化するためにホモ接合性またはヘテロ接合性である。ある態様において、該欠失または突然変異を含む腫瘍は乳房腫瘍である。

【0258】

50

該アンタゴニストは既知の方法に従って適切な薬学的組成物としてヒト患者に投与される。適切な投与方法は、筋肉内、腹腔内、静脈内、腫瘍内、動脈内、脳脊髄内、皮下、関節内、滑液嚢内、髄腔内、口腔、局所または吸入経路により、ポーラスとしての静脈内投与または一定時間にわたる持続注入を含む。

【0259】

ある態様において、Notchアンタゴニストを投与する工程に加えて、該方法または治療はさらに第二の治療剤を（Notchアンタゴニストの投与前、同時、および/または後に）投与する工程を含む。ある態様において、第二の治療剤は抗癌剤および/または抗血管新生剤である。Notchアンタゴニストおよび第二の治療剤を含む薬学的組成物も提供される。

【0260】

Notchアンタゴニスト（例えば抗体）と第二の治療剤との組み合わせは任意の順序でまたは同時に投与され得ることが理解されよう。選定される態様において、該Notchアンタゴニストは、既に第二の抗癌剤で治療を受けた患者に投与される。他のある態様において、Notchアンタゴニストおよび第二の治療剤は実質的に同時にまたは同時に投与される。例えば、被験体は、第二の治療剤（例えば化学療法）で治療過程を受けながらNotchアンタゴニストを与えられ得る。ある態様において、Notchアンタゴニストは第二の治療剤を用いた治療の1年以内に投与される。ある他の態様において、Notchアンタゴニストは第二の治療剤を用いた任意治療の10、8、6、4または2月以内に投与される。ある他の態様において、Notchアンタゴニストは第二の治療剤を用いた任意治療の4、3、2または1週間以内に投与される。幾つかの態様において、Notchアンタゴニストは第二の治療剤を用いた任意治療の5、4、3、2または1日以内に投与される。2つの該剤または治療は数時間または数分間以内で（すなわち実質的に同時に）被験体に投与され得ることがさらに理解されよう。

【0261】

抗癌剤の有用なクラスは、例えば抗チューブリン剤、アウリスタチン（auristatin）、DNA副溝結合剤、DNA複製阻害剤、アルキル化剤（例えばシスプラチン、モノ（プラチナ）、ビス（プラチナ）および三核プラチナ錯体およびカルボプラチン）、アントラサイクリン、抗生物質、抗葉酸剤、代謝拮抗剤、化学療法増感剤、デュオカルマイシン（duocarmycin）、エトポシド、フッ素化ピリミジン、イオノフォア、レキシトロプシン（lexitropsins）、ニトロソウレア、プラチノール（platinols）、実行化合物（performing compounds）、プリン代謝拮抗剤、ピューロマイシン、放射線増感剤、ステロイド、タキサン、トポイソメラーゼ阻害剤、ピンカルカロイド等を含む。ある態様において、第二の治療剤は代謝拮抗剤、トポイソメラーゼ阻害剤、または血管新生阻害剤である。

【0262】

Notchアンタゴニストと組み合わせて投与され得る抗癌剤は化学療法剤を含む。従って、幾つかの態様において、治療は本発明のアンタゴニストと化学療法剤または複数の異なる化学療法剤のカクテルとの併用投与を含む。アンタゴニストによる治療は化学療法剤投与の前、同時、または後に起き得る。本発明により意図される化学療法剤は、ドキソルビシン、5-フルオロウラシル、シトシンアラビノシド（Ara-C）、シクロホスファミド、チオテパ、ブスルファン、サイトキシン（cytoxan）、タキソール、メトトレキサート、シスプラチン、メルファラン、ピンブラスチンおよびカルボプラチンなどの当技術分野で公知の化学物質または薬物を含み市販されている。併用投与は、単一薬学的製剤あるいは別個の製剤を用いての同時投与、または、いずれの順序でも、しかし一般に全活性成分がそれらの生物活性を同時に及ぼすような時間内での連続投与を含み得る。このような化学療法剤の調製および服薬スケジュールは、製造業者の使用説明書に従って、または経験的に決定されるように用いられ得る。このような化学療法剤の調製および服薬スケジュールは、Chemotherapy Service Ed., M. C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, Md. (1992)にも記載されている。

【0263】

本発明に有用な化学療法剤は、チオテパおよびシクロホスファミド（CYTOXAN）などの

10

20

30

40

50

アルキル化剤;ブスルファン、インプロスルファンおよびピボスルファン (piposulfan) などのスルホン酸アルキル;ベンゾドーパ (benzodopa)、カルボコン、メツレドーパ (meturedopa)、およびウレドーパ (uredopa) などのアジリジン;アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチレンチオホスホラミド (triethylenethiophosphoramidate) およびトリメチレンメラミン (trimethylolomelamine) を含むエチレンイミンおよびメチルアメラミン (methylamelamines);クロラムブシル、クロルナファジン (chlornaphazine)、クロロホスファミド (cholophosphamide)、エストラムスチン、イホスファミド、メクロルレタミン、メクロルレタミン酸化物塩酸塩、メルファラン、ノベムピチン (novembichin)、フェネステリン (phenesterine)、プレドニムスチン、トロフォスファミド (trofosfamidate)、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、ホテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、ラニムスチンなどのニトロソウレア (nitrosurea);アクラシノマイシン、アクチノマイシン、アウストラマイシン (authramycin)、アザセリン、プレオマイシン、カクチノマイシン (cactinomycin)、カリケアマイシン、カラビシン (carabycin)、カミノマイシン (caminomycin)、カルジノフィリン、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、デトルピシン、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ドキシソルピシン、エピルピシン、エソルピシン (esorubicin)、イダルピシン、マルセロマイシン、マイトマイシン、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン (potfiromycin)、ピューロマイシン、クエラマイシン (quelamycin)、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、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルピシンなどの抗生物質;メトトレキサートおよび5-フルオロウラシル (5-FU) などの代謝拮抗剤;デノプテリン (denopterin)、メトトレキサート、プテロプテリン (pteropterin)、トリメトトレキサートなどの葉酸類似体;フルダラビン、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニンなどのプリン類似体;アンシタビン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、フロクスウリジン、5-FUなどのピリミジン類似体;カルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタノール、テストラクトンなどのアンドロゲン;アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタンなどの抗アドレナール (anti-adrenals);フロリン酸 (frolinic acid) などの葉酸補給薬;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;アムサクリン;ベストラブシル (bestrabucil);ピサントレン (bisantrene);エダトラキサート (edatraxate);デフォファミン (defofamine);デメコルシン;ジアジクオン;エルフォルミチン (elformithine);酢酸エリプチニウム;エトグルシド;硝酸ガリウム;ヒドロキシウレア;レンチナン;ロニダミン;ミトグアゾン;ミトキサントロン;モピダモール;ニトラクリン;ペントスタチン;フェナメット;ピラルピシン;ポドフィリン酸;2-エチルヒドラジド;プロカルバジン;PSK;ラゾキサソ;シゾフラン (sizofuran);スピロゲルマニウム;テヌアゾ酸;トリアジコン;2,2',2''-トリクロロトリエチルアミン;ウレタン;ピンデシン;ダカルバジン;マンノムスチン;ミトプロニトール;ミトラクトール;ピボプロマン;ガシトシン (gacytosine);アラビノシド (Ara-C);シクロホスファミド;チオテパ;パクリタキセル (TAXOL) およびドキシセタキセル (TAXOTERE, Rhone) などのタキソイド;クロラムブシル;ゲムシタビン;6-チオグアニン;メルカプトプリン;メトトレキサート;シスプラチンおよびカルボプラチンなどのプラチナ類似体;ピンブラスチン;プラチナ;エトポシド (VP-16);イホスファミド;マイトマイシン C;ミトキサントロン;ピンクリスチン;ピノレルピン;ナベルピン;ノバントロン;テニボシド;ダウノマイシン;アミノプテリン;ゼローダ;イバンドロネート;CPT11;トポイソメラーゼ阻害剤RFS2000;ジフルオロメチルオルニチン (DMFO);レチノイン酸;エスペラミシン;カペシタビン;ならびに上記のいずれかの薬学的に許容される塩、酸、または誘導体も含むがこれらに限定されない。化学療法剤は、例えば、タモキシフェン、ラロキシフェン、4(5)-イミダゾールを阻害するアロマターゼ、4-ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン (trioxifene)、ケオキシフェン (keoxifene)、LY117018、オナプリストン (onapristone)、トレミフェン (Fareston) を含む抗エストロゲン;ならびにフルタミド、

10

20

30

40

50

ニルタミド、ピカルタミド、ロイプロリド、およびゴセレリンなどの抗アンドロゲン;ならびに上記のいずれかの薬学的に許容される塩、酸または誘導体などの腫瘍に対するホルモン作用を調節または阻害するように作用する抗ホルモン剤も含む。

【0264】

ある態様において、該化学療法剤はトポイソメラーゼ阻害剤である。トポイソメラーゼ阻害剤はトポイソメラーゼ酵素（例えばトポイソメラーゼIまたはII）の作用を妨げる化学療法剤である。トポイソメラーゼ阻害剤は、ドキソルビシンHCL、ダウノルビシンクエン酸塩、ミトキサントロンHCL、アクチノマイシンD、エトポシド、トポテカンHCL、テニポシド（VM-26）、およびイリノテカンを含むがこれらに限定されない。ある態様において、第二の抗癌剤はイリノテカンである。ある態様において、治療すべき腫瘍は結腸直腸腫瘍であり、第二の抗癌剤はイリノテカンなどのトポイソメラーゼ阻害剤である。

10

【0265】

ある態様において、該化学療法剤は代謝拮抗剤である。代謝拮抗剤は、正常な生化学反応に必要な代謝物に類似する構造をもつ化学物質であるにもかかわらず、細胞分割などの1つまたは複数の正常な細胞機能を妨げるのに十分に相違する。代謝拮抗剤は、ゲムシタピン、フルオロウラシル、カペシタピン、メトトレキサートナトリウム、ラリトレキセド（ralitrexed）、ペメトレキセド、テガフル、シトシンアラビノシド、チオグアニン、5-アザシチジン、6-メルカプトプリン、アザチオプリン、6-チオグアニン、ペントスタチン、リン酸フルダラビン、およびクラドリビン、ならびにこれらのいずれかの薬学的に許容される塩、酸または誘導体を含むがこれらに限定されない。ある態様において、第二の抗癌剤はゲムシタピンである。ある態様において、治療すべき腫瘍は膵臓腫瘍であり、第二の抗癌剤は代謝拮抗剤（例えばゲムシタピン）である。

20

【0266】

他の態様において、該治療は本発明のアンタゴニストの併用投与および放射線治療を含む。アンタゴニストによる治療は、放射線治療の投与前、同時、または後に起き得る。このような放射線治療のいずれかの服薬スケジュールが用いられ得る。

【0267】

他の態様において、該治療は、EGF受容体（EGFR）（例えばErbitux（登録商標））、erbB2受容体（HER2）（例えばHerceptin（登録商標））、および血管内皮増殖因子（VEGF）（例えばAvastin（登録商標））に結合する抗体を含むがこれらの限定されない更なる腫瘍関連抗原に対する他の抗体と本発明の抗体との併用投与を含み得る。ある他の態様において、該第二の抗癌剤は、ヒトDLL4またはNotch受容体の他のリガンドに特異的に結合する抗体または更なるヒトNotch受容体に特異的に結合する抗体を含む。例示的な抗DLL4抗体は、例えば参照により全体として本明細書に組み入れられる米国特許出願公開第US2008/0187532号に記載されている。さらなる抗DLL4抗体は、例えば国際公開公報第WO2008/091222号および第WO2008/0793326号;ならびに米国特許出願公開第US2008/0014196号、第US2008/0175847号、第US2008/0181899号、および第US2008/0107648号に記載されており、それらの各々は参照により全体として本明細書に組み入れられる。例示的な抗Notch抗体は、例えば参照により全体として本明細書に組み入れられる米国特許出願公開第US2008/0131434号に記載されている。ある態様において、第二の抗癌剤はNotchシグナル伝達の阻害剤である。ある態様において、第二の抗癌剤は血管新生阻害剤である抗体である（例えば抗VEGF抗体）。ある態様において、第二の治療剤はVEGF受容体に特異的に結合する抗体である。ある態様において、第二の治療剤はAVASTIN（ベバシズマブ）、HERCEPTIN（トラスツズマブ）、VECTIBIX（パニツムマブ）、またはERBITUX（セツキシマブ）である。併用投与は、単一薬学的製剤あるいは別個の製剤を用いての同時投与、または、いずれの順序でも、しかし一般に全活性成分がそれらの生物活性を同時に及ぼし得るような時間内での連続投与を含み得る。

30

40

【0268】

さらに、治療は1つまたは複数の種類のサイトカイン（例えば、リンホカイン、インターロイキン、腫瘍壊死因子、および/または増殖因子）の投与を含み、または癌細胞の外

50

科的切除もしくは治療医師により必要と判断される任意の他の治療により達成され得る。

【0269】

疾病治療のため、本発明のアンタゴニストの適切な用量は、治療すべき疾病の種類、疾病の重症度および経過、疾病の反応性、該アンタゴニストが治療目的または予防目的で投与されるか否か、過去の治療、患者の病歴などに依存し、全て治療医師の裁量にある。該アンタゴニストは、一度で、または数日から数ヶ月まで続く一連の治療にわたって、または治療が効くまでもしくは病態の減退が達成されるまで（例えば腫瘍の大きさの縮小）投与され得る。最適な服薬スケジュールは患者の体内における薬物蓄積の測定から計算でき、個々のアンタゴニストの相対的効力に依存して変化するだろう。投薬する医師は最適な用量、投薬手順および繰り返し率を容易に決定できる。一般に、用量は体重1kgにつき0.01 μgから100mgまでであり、日、週、月または年ごとに1回以上与えられ得る。治療医師は体液または組織における測定した薬物の滞留時間および濃度に基づいて投薬の繰り返し数を見積もり得る。

10

【0270】

ある態様において、Notchアンタゴニストによる治療について検討中の患者はNotchアンタゴニストによる治療前に検査される。ある態様において、患者の腫瘍または患者から切除された腫瘍は癌幹細胞の存在について試験される。ある態様において、腫瘍は、アンタゴニストが結合する1つまたは複数の種類のNotch受容体（例えばNotch2および/またはNotch3）の発現について試験される。ある態様において、該腫瘍は、腫瘍抑制ホスファターゼおよびテンシンホモログ（PTEN）をコードする遺伝子の不活性な欠失または突然変異の有無について試験される。ある態様において、このように試験される腫瘍は乳房腫瘍である。

20

【0271】

例えば、本発明はNotch2および/またはNotch3で治療する被験体を選定する方法を提供し、該被験体は腫瘍を有するまたは切除された腫瘍を有していた。ある態様において、該方法は、（a）腫瘍がPTEN遺伝子の欠失または突然変異を含むか否かを決定する工程、および（b）該腫瘍が該欠失または突然変異を含む場合にNotch3アンタゴニストで治療する被験体を選定する工程を含む。

【0272】

本発明のある他の態様において、結腸腺腫またはポリープの存在について検査される患者は、遺伝子検査により対立遺伝子欠損および体細胞突然変異について試験される。幾つかの態様において、遺伝子検査は、例えばAPC、Axin2または -カテニンを含むWnt経路の欠損または突然変異について検査する。

30

【0273】

別の局面において、本発明は本明細書に記載する方法を実施するために使用できるキットを提供する。幾つかの態様において、キットは1つまたは複数の容器にNotch受容体に特異的な抗体、精製された抗体を含む。幾つかの態様において、キットは、キットに含まれる抗体と特異的に免疫反応性のあるエピトープを含む実質的に単離されたNotch受容体、Notch受容体と反応しない対照抗体、および/またはNotch受容体への抗体の結合を検出する手段（例えば、Notch受容体に対する抗体またはNotch受容体に対する抗体を認識する第二の抗体とコンジュゲートさせた蛍光性発色団、酵素基質、放射性化合物または発光化合物など）をさらに含む。他の態様において、キットは、1つまたは複数のNotch受容体のmRNAまたはcDNA（例えばオリゴヌクレオチドプローブまたはプライマー）の検出に特異的な試薬を含む。幾つかの態様において、該キットは、検出分析を実施するのに必要および/または十分な構成要素の全てを含み、全対照、分析を実施するための説明書、ならびに結果の分析および提示に必要な任意のソフトウェアを含む。

40

【0274】

区画キットは試薬が別々の容器に含まれる任意のキットを含む。このような容器は、小さなガラス容器、プラスチック容器またはプラスチック片もしくは紙片を含む。このような容器により、試料および試薬が二次汚染しないように一方の区画から別の区画へ試薬を

50

効率良く移すことができ、各容器の剤または溶液は一方の区画から別の区画へ定量的な様式で添加され得る。このような容器は、試験試料を入れる容器、該方法で使用される抗体またはプローブを含む容器、洗浄試薬を含む容器（リン酸緩衝生理食塩水、Tris緩衝剤など）、結合した抗体またはプローブを検出するために使用する試薬を含む容器を含む。本発明の開示ポリヌクレオチド、ポリペプチドおよび抗体が当技術分野で周知の確立されたキット形式の1つに容易に組み入れられ得ることは容易に認識されるであろう。

【0275】

幾つかの態様において、本発明はNotch結合剤またはアンタゴニストおよび第二の治療剤を含むキットをさらに提供する。ある態様において、Notch結合剤またはアンタゴニストはNotch2および/またはNotch3に特異的に結合する抗体である。ある態様において、Notch結合剤またはアンタゴニストはNotch2およびNotch3に特異的に結合する抗体である。ある態様において、第二の治療剤は抗癌剤および/または抗血管新生剤である。

10

【0276】

一局面において、本発明は、ヒトNotch受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に結合し腫瘍増殖を阻害する分子を同定する方法を提供し、該方法は、i) 該分子をヒトNotch受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合ドメインとインキュベートする工程; ii) 該分子がヒトNotch受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に結合するか否かを決定する工程; および iii) 該分子が腫瘍の増殖を阻害するか否かを決定する工程を含む。ヒトNotch受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に特異的に結合する分子は、有機小分子、ポリペプチド、および抗体を含むがこれらに限定されない。

20

【0277】

スクリーニングは当技術分野で公知の任意の適切な方法を用いて実施され得る。ある態様において、スクリーニングはインビトロで実施される。幾つかの態様において、ヒトNotch受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合領域を発現する細胞は標識分子とインキュベートし、ヒトNotch受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に対する標識分子の特異的結合がFACS分析により測定される。幾つかの態様において、ヒトNotch受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合領域はファージディスプレイにより発現され、ヒトNotch受容体の細胞外ドメインの非結合領域に特異的に結合する分子が同定される。ヒトNotch受容体の非リガンド結合領域に特異的に結合する分子を同定する他の適切な方法は、ELISA、ウェスタン（または免疫）プロットティング、および酵母ツーハイブリッドを含むがこれらに限定されない。

30

【0278】

ヒトNotch受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に特異的に結合する分子は次いで腫瘍細胞の増殖阻害について試験される。試験は当技術分野で公知の任意の適切な方法を用いて実施され得る。ある態様において、ヒトNotch受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に特異的に結合する分子はインビトロで腫瘍増殖を阻害する能力について試験される。幾つかの態様において、ヒトNotch受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に特異的に結合する分子は培地の腫瘍細胞とインキュベートし、ヒトNotch受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に特異的に結合する分子の存在下で腫瘍細胞の増殖が測定され、非結合対照分子とインキュベートした腫瘍細胞と比較される。ある態様において、ヒトNotch受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に特異的に結合する分子はインビボで腫瘍増殖を阻害する能力について試験される。ある態様において、ヒトNotch受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に特異的に結合する分子は異種移植動物モデルに注入され、ヒトNotch受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合領域に特異的に結合する分子で処理された動物における腫瘍の増殖が測定され、非結合対照分子で処理した動物と比較される。

40

【実施例】

【0279】

本明細書に記載の実施例および態様は例示にすぎず、これらを考慮すれば様々な変更または変化が当業者に示唆され、本願の精神および範囲に含まれることが理解される。

50

【 0 2 8 0 】

実施例1

Notch2に対するヒト抗体の作製

Notch2受容体の細胞外ドメインの非リガンド結合部分を特異的に認識するヒト抗体を、ファージディスプレイ技術を用いて単離した。ヒト抗体可変ドメインを含有する合成抗体ライブラリーを、Notch2受容体に対する特異的かつ高親和性の認識についてスクリーニングした。

【 0 2 8 1 】

簡単に述べると、1回目に、 2×10^{13} Fabディスプレイファージ粒子を、Notch2の細胞外リガンド結合部位および周囲のEGF反復(EGF1~12)を含む受動的に固定化された組換えNotch2 Fc融合タンパク質(SEQ ID NO:21)とインキュベートした。非特異的ファージを洗い流し、次いで、特異的ファージをDTTによって溶出させた。溶出したアウトプットを用いてTG1 F+細菌に感染させ、ヘルパーファージを用いてレスキューし、次いで、IPTG(0.25mM)を用いてFabディスプレイを誘導した。このプロセスを、さらに2回繰り返し、次いで、3回目を、受動的に固定化された組換えNotch2(EGF1~12)Fc融合(5 μ g/ml)に対するELISAにおいてスクリーニングした。

【 0 2 8 2 】

ヒトNotch2受容体に結合し、Jagged1とヒトNotch2との結合をブロックする特定のFab(59R1)が特定された。59R1 FabとヒトNotch2との結合は、ヒトNotch2(hN2)を過剰発現する安定なヒト細胞株HEK-293を用いたFACSアッセイによって確かめた(図1A)。Fab結合は、フィコエリトリン(PE)コンジュゲートヤギ抗ヒトFab(Jackson Immunochemicals)によって検出した。59R1 Fab(図1Aではクローン1と呼ぶ)は、hN2と良好に結合することを証明した。59R1 Fabはまた、同じ安定細胞株を用いた結合アッセイにおいて、NotchリガンドであるヒトJagged1に対して良好なブロッキング活性を証明した(図1B)。リガンドの結合およびブロッキングは、ヒトFc定常領域と融合したhJagged1細胞外ドメイン(ECD)と、細胞およびファージライブラリーより選択されたFabをインキュベートし、検出のためにPEコンジュゲートヤギ抗ヒトFc 特異的抗体(Jackson Immunochemicals)を使用することによって確かめた。

【 0 2 8 3 】

59R1 FabのVHおよびVLの配列を、それぞれ、(分泌の際に切断されるN末端細菌シグナル配列を含む)SEQ ID NO:11およびSEQ ID NO:12に示した。59R1 FabのCDRを以下の表2に示した。

【 0 2 8 4 】

(表2) 59R1ヒトFabおよびIgG抗体のCDR

リード化合物	重鎖			軽鎖		
	CDR1	CDR2	CDR3	CDR1	CDR2	CDR3
59R1	SSSGMS (SEQ ID NO:5)	VIASSGSNTYYADSVK (SEQ ID NO:6)	GIFFAI (SEQ ID NO:7)	RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:8)	GASSRAT (SEQ ID NO:9)	QQYSNFPI (SEQ ID NO:10)

【 0 2 8 5 】

59R1 Fabの可変領域に基づく可変領域を、ヒトIgG2重鎖および軽鎖と、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞における発現用の、それぞれの哺乳動物シグナル配列も含有するIg発現ベクターにクローニングした。59R1 IgG抗体のVHおよびVLを、それぞれ、SEQ ID NO:13およびSEQ ID NO:14として示した。(シグナル配列を含む)59R1 IgG抗体の重鎖および軽鎖のアミノ酸配列を、それぞれ、SEQ ID NO:16およびSEQ ID NO:18として示した。各鎖のアミノ酸配列のN末端にあるシグナル配列は分泌の際に切断される。59R1 IgG抗体の重鎖および軽鎖をコードする核酸配列を、それぞれ、SEQ ID NO:1およびSEQ ID NO:3として示した。プロテインA精製を用いて、抗体を精製した。59R1 IgG2抗体DNAの重鎖および軽鎖をコードする合成DNAインサートを含有する細菌プラスミドDNAは、ブダペスト条約の

規定に基づいて、2008年10月15日に、「59R1」としてATCC, 10801 University Boulevard, Manassas, VA, USAに寄託され、指定番号PTA-9547が付与された。

【0286】

さらに、59R1 IgG2抗体が、DLL4とヒトNotch2受容体との結合をブロックする能力を、FACS分析によってアッセイした。ヒトNotch2を安定に過剰発現するHEK-293細胞を、様々な濃度の抗体とインキュベートし、次いで、PEコンジュゲートヤギ抗ヒトFc 特異的抗体によってhNotch2結合(図1C)が検出された、またはリガンドブロッキング活性(図1D)が検出された。リガンドブロッキングは、細胞と、ウサギFc定常領域でタグ化されたヒトDLL4 ECDおよびある範囲の濃度の59R1抗体をインキュベートし、次いで、PEコンジュゲートロバ抗ウサギ抗体でhDLL4を検出することによって確かめた。このように、59R1 IgG2抗体についてhNotch2結合およびリガンドブロッキング活性が確かめられた。

10

【0287】

59R1の生殖系列化変種(本明細書において「59RGV」と呼ばれる)も発現および精製した。59RGV抗体のVHおよびVLを、それぞれ、SEQ ID NO:19およびSEQ ID NO:20として示した。(シグナル配列を含む)59RGV抗体の重鎖および軽鎖のアミノ酸配列を、それぞれ、SEQ ID NO:2およびSEQ ID NO:4として示した。各鎖のアミノ酸配列のN末端にあるシグナル配列は分泌の際に切断される。59RGV抗体の重鎖および軽鎖をコードする核酸配列を、それぞれ、SEQ ID NO:15およびSEQ ID NO:17として示した。

【0288】

高度に疎水性のCDRがあると、場合によっては、抗体による好ましくない非特異的な結合が可能になることがある。59R1の重鎖CDR3のアミノ酸配列には並はずれた程度の疎水性があるので、疎水性の低い重鎖CDR3配列を含有する59R1変種を作製した。重鎖CDR3親和性成熟は、図1Eに示したように親配列(GIFFAI;SEQ ID NO:7)を限定的に変えることによって行った。各位置で許容されるアミノ酸を、親残基から図1Eに示した残基に変えた。図1Fに示したように(矢印で示した)JAG1ブロッキングの改善についてスクリーニングすることによって、改善した変種を単離した。簡単に述べると、Fab(1 μg/mlおよび10 μg/ml)を、hJAG1-rb Fc(予めクラスター形成した、5 μg/ml ~ 2 μl/mlのPEコンジュゲートロバ抗ウサギ)と混合し、次いで、hNotch2で安定にトランスフェクトされた293細胞に添加した。次いで、フローサイトメトリーを用いてhJAG1結合を評価した。6つの改善した変種(対59R1 Fab)を単離した。これらのHC CDR3配列は以下の通りであった。

20

30

SIFYPT (SEQ ID NO:22), SSFFAS (SEQ ID NO:23),

SSFYAS (SEQ ID NO:24), SSFFAT (SEQ ID NO:25), SIFYPS (SEQ ID NO:26),およびSSFFAN (SEQ ID NO:27)

これらの変種の重鎖可変領域の配列は、配列SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56、およびSEQ ID NO:57である。

【0289】

実施例2

抗Notch2/3 59R1抗体の交差反応性および結合親和性

40

ヒトNotch1、Notch2、Notch3、またはNotch4発現プラスミド、およびトランスフェクション対照として緑色蛍光タンパク質(GFP)で一過的にトランスフェクトされたHEK-293細胞を用いたFACSアッセイによって、59R1 IgG2抗体が他のNotch受容体と交差反応する能力を確かめた。GFP陽性細胞はトランスジーン発現を示した。59R1 IgG2は、2 μg/mlで細胞に添加し、PEコンジュゲートヤギ抗ヒトFc 特異的抗体(Jackson Immunochemicals)によって検出した。全てのNotch構築物は完全長であった。結果を図2に示した。図2に示したように、59R1 IgG2抗体はヒトNotch3およびヒトNotch2に特異的に結合するが、完全長ヒトNotch1にもヒトNotch4にも有意に結合しない。

【0290】

ヒトおよびマウスNotch1、Notch2、Notch3、およびNotch4に対する親和性は、Biacore

50

2000計器を用いて確かめた。簡単に述べると、組換えヒトおよびマウスNotchタンパク質(Notch1、2、および4についてはEGF10~15;Notch3についてはEGF9~14)を、標準的なアミンをベースとする化学(NHS/EDC)を用いてCM5チップ上に固定化した。hNotch2については、EGF1~12の結合についても試験した。異なる抗体濃度(1~100nM)をタンパク質表面上に注入し、キネティックデータを経時的に収集した。シミュルタネアスグローバルフィット式(simultaneous global fit equation)を用いてデータをフィットさせて、それぞれのNotchについての解離定数(K_D 、nM)を得た(表3)。

【0291】

(表3)

59R1 IgG 解離定数 (K_D)								
Ab	mNotch1 (nM)	hNotch1 (nM)	mNotch2 (nM)	hNotch2 (nM)*	hNotch2 (nM)**	mNotch3 (nM)	hNotch3 (nM)	hNotch4 (nM)
59R1	>10	86.4	0.35	<0.1	<0.1	0.13	0.12	NB

10

*N2(EGF1~12)

**N2(EGF10~155)

【0292】

実施例3

抗Notch2/3抗体59R1のエピトープマッピング

Notch受容体細胞外ドメインの特異的な非リガンド結合領域を認識する抗体を特定するために、エピトープマッピングを行った。

20

【0293】

抗Notch2/3抗体と、完全長ヒトNotch2タンパク質を含む組換えヒトNotch2 Fc融合タンパク質をコードする配列またはEGF反復1~12の様々な欠失を含有する様々なヒトNotch2欠失構築物でトランスフェクトされたHEK293細胞からの上清との結合を、ELISAによって試験した。以下の表4を参照されたい。ヒトIgGの定常領域(hFc)と融合した指示されたアミノ酸をコードするhNotch2 cDNAを含むpcDNA3.1(Invitrogen)で、HEK-293細胞を一過的にトランスフェクトした。上清を48時間後に採取した。hN2-hfcタンパク質を捕捉するために、最初に、96ウェルプレートに、ヤギ抗ヒトFc 特異的IgG(Jackson Immunochemicals, #109-006-098)を重炭酸ナトリウム緩衝液に溶解して100ng/ウェルで、4で一晚コーティングした。プレートを洗浄し、5%ウシ血清/PBS-Tween-20でブロックした。上清をプレートに添加し、室温で1時間インキュベートした。プレートをPBS-Tで洗浄した。59R1 Fabを5%血清/PBS-Tに溶解して10 μ g/mlで添加し、室温で1時間インキュベートした。プレートをPBS-Tで洗浄した。Fab結合は、5%血清/PBS-Tで1:5000に希釈した、西洋ワサビペルオキシダーゼとコンジュゲートしたヤギ抗ヒトFab特異的抗体(Thermo, #31414)によって、室温で1時間、検出した。プレートを洗浄し、1 Step Ultra TMB(Thermo, #34028)を用いて発色させた。プレートをPerkin Elmer Victor 1420プレートリーダーで読み取った。抗Notch2/3 59R1抗体は、ヒトNotch2のアミノ酸375~417からなるEGF10を含む組換えNotch2タンパク質を発現する細胞からの上清にのみ結合した(図3A)。

30

【0294】

(表4) ヒトNotch2欠失構築物構築物アミノ酸

40

構築物	アミノ酸
hN2 1-3	1-144
hN2 1-4	1-181
hN2 1-5	1-221
hN2 1-6	1-263
hN2 1-7	1-301
hN2 1-8	1-341
hN2 1-9	1-378
hN2 1-10	1-417
hN2 1-11	1-456
hN2 1-12	1-493
hN2 8-12	296-493
hN2 9-12	326-493
hN2 10-12	375-493
hN2 11-12	413-493
hN2 12-12	454-493

10

【 0 2 9 5 】

さらに、FACS分析によって、HEK293細胞によって発現される完全長Notch2組換えタンパク質からEGF11またはEGF12が欠失された時でも、59R1 Fab抗体結合は保持されたことが分かる(図3B)。Notch2融合タンパク質のEGF10の中に点変異を加え、59R1と各EGF10変異体との結合をFACS分析によって確かめた。HEK-293細胞を、指示されたNotch発現プラスミドおよびトランスフェクション対照であるGFPで一過的にトランスフェクトした。GFP陽性細胞はトランスジーンを発現を示した。59R1 Fab抗体を10 µg/mlで細胞に添加し、PEコンジュゲートヤギ抗ヒト(Jackson Immunochemicals)によって検出した。

20

【 0 2 9 6 】

EGF反復10の消失によってリガンド結合が妨げられないことを確かめるために、アミノ酸375~412を欠く変異体hNotch2を作製し、EGF1~4に対するhNotch2モノクローナル59M70である59R1との結合、およびリガンドヒトDLL4との結合について試験した(図3C)。指示されたNotch発現プラスミドおよびトランスフェクション対照であるGFPで一過的にトランスフェクトされたHEK-293細胞のFACS分析。GFP陽性細胞はトランスジーンを発現を示す。抗Notch2(59M70)を20 µg/mlで添加し、PEコンジュゲートヤギ抗マウス(Caltag, #3004-4)によって検出した。59R1(IgG2)を2 µg/mlで細胞に添加し、PEコンジュゲートヤギ抗ヒトFc特異的抗体(Jackson Immunochemicals)によって検出した。リガンド結合は、細胞と、5 µg/mlの、ウサギIgG定常領域と融合したヒトDLL4細胞外ドメイン(ECD)とのインキュベーションによって確かめ、PEコンジュゲートロバ抗ウサギによって検出した。図3Cに示したように、リガンドおよび59M70は両方ともEGF10の非存在下でhNotch2に結合するが、59R1は結合しない。

30

【 0 2 9 7 】

59R1の可能性の高い結合部位を決定するために、ヒトNotch1、Notch2、およびNotch4のEGF10領域と、ヒトNotch3のEGF9領域(他のNotch受容体にあるEGF10の同等物)の比較分析を行った(図14A)。分析の結果として、完全長Notch2のEGF10の中の残基を、ヒトNotch1にある対応するアミノ酸に変換する、いくつかの点変異体を作り出した。また、逆に、hNotch1 EGF10の残基を、対応するhN2残基に変換する点変異を作った。完全長Notch配列の変異体を、QuikChange(登録商標)変異誘発(Stratagene)によって作製し、配列決定によって確認した。変異体との結合はFACS分析によって確かめた(図14Bおよび14C)。59R1は、PEコンジュゲートヤギ抗ヒトFc特異的抗体(Jackson Immunochemicals, #109-116-170)によって検出した。このように、59R1とhNotch2との結合に必要なアミノ酸は、ヒスチジン385、アラニン388、およびロイシン389(図14Aに示した、囲みのhNotch2配列内の残基)であることが確かめられた。hNotch3の対応する残基は、ヒスチジン361、アラニン364、およびイソロイシン365である。

40

50

【0298】

実施例4

抗Notch2/3抗体59R1はNotch2シグナル伝達を阻害する

ルシフェラーゼレポーターアッセイを用いて、hDLL4、hJAG1、およびhJAG2により誘導されたNotch2シグナル伝達を59R1抗体がブロックする能力をアッセイした。

【0299】

ヒトNotch2を安定に過剰発現するHela細胞を、合成8X CBSプロモーターを有するホタルルシフェラーゼ(Ong et al., 2006, J. of Biological Chemistry, 281:5106-5119)、pSPORT6 MAML-1、およびトランスフェクション対照としてウミシイタケ(Renilla)ルシフェラーゼ-CMVで一過的にトランスフェクトした。細胞を、指示された抗体、100ngの固定化hDLL4(R&D systems)と16時間インキュベートし、次いで、Dual-Glo(Promega)を用いて製造業者の説明書に従ってアッセイした。対照抗体は、40 µg/mlの濃度であった。59R1 IgG2抗体は40 µg/mlから用量設定し、次いで、1/4まで希釈した。セクレターゼ阻害剤(GSI)であるジベンザゼピン(DBZ)を対照として1 µMで使用した。図4Aに示したように、59R1抗体は、hDLL4により誘導されたNotch2レポーター活性を阻害することが見出された。

10

【0300】

ヒトNotch2を安定に過剰発現するHela細胞を、合成8X CBSプロモーターを有するホタルルシフェラーゼ、pSPORT6 MAML-1、およびトランスフェクション対照としてウミシイタケルシフェラーゼ-CMVで一過的にトランスフェクトした。細胞を、200ngの固定化されたhJAG1(R&D systems)またはhJAG2(R&D systems)と16時間インキュベートし、次いで、Dual-Glo(Promega)を用いて製造業者の説明書に従ってアッセイした。59R1 IgG2抗体は40 µg/mlの濃度であった。セクレターゼ阻害剤(GSI)ジベンザゼピン(DBZ)を1 µMで対照として使用した。図4Bおよび4Cに示したように、59R1抗体は、hJAG1により誘導されたNotch2レポーター活性およびhJAG2により誘導されたNotch2レポーター活性を両方とも阻害することが見出された。

20

【0301】

実施例5

抗Notch2/3抗体59R1はインビボ腫瘍成長を妨げる

本実施例は、Notch受容体の非リガンド結合領域(Notch2のEGF10およびNotch3のEGF10)に結合する抗Notch2/3受容体抗体(59R1)を用いて、異種移植片モデルにおける腫瘍成長を妨げることにについて述べる。

30

【0302】

ある特定の態様では、50,000個のPE13またはT3乳房腫瘍細胞を注射したNOD/SCIDマウスを、細胞注射の2日後に、抗Notch2/3抗体59R1または対照抗体1B7.11で治療した。抗体は10mg/kgを週2回投与した。抗Notch2/3抗体59R1は、対照と比較して、PE13(図5A)およびT3(図5B)の腫瘍成長を有意に低下させた。

【0303】

実施例6

抗Notch2/3抗体59R1を用いた、腫瘍のインビボ治療

本実施例は、抗Notch2/3抗体を用いて、異種移植片モデルにおいて癌を治療することについて述べる。

40

【0304】

1つの実験では、 1×10^7 個の生きているColo-205結腸腫瘍細胞を、背景がSwiss CD-1である6~8週齢の免疫不全bg/nu XID雌マウスに注射した。腫瘍を65~200mm³のサイズまで成長させ、この後、マウスを無作為化し(n=10/実験群)、抗体投与を開始した。動物を、15mg/kgの対照1B7.11抗体または抗Notch2/3 59R1抗体で週1回、治療した。腫瘍サイズを週2回測定し、記載のように腫瘍量を計算した(Michieli et al., 2004, Cancer Cell, 6:61-73を参照されたい)。抗Notch2/3抗体59R1は、対照と比較してColo-205腫瘍成長を有意に低下させた(図5C)。

【0305】

50

別の実験では、膵臓腫瘍成長に対する抗Notch2/3抗体の作用を試験した。NOD/SCIDマウスに、30,000個のPN4膵臓腫瘍細胞を右側腹部に皮下注射し、100mm³の平均体積に達するまで腫瘍を成長させた。マウスを無作為化し、抗Notch2/3抗体59R1または対照抗体1B711の投与を開始した。抗体の投与は、15mg/kg、週1回であった。抗Notch2/3抗体59R1は、対照と比較してPN4腫瘍成長を有意に低下させた(図5D)。

【0306】

さらなる実験では、乳房腫瘍成長に対する抗Notch2/3抗体の作用を試験した。NOD/SCIDマウスに50,000個のPE13またはT3乳房腫瘍細胞を注射し、腫瘍を65~200mm³のサイズまで成長させ、この後、マウスを無作為化し(n=10/実験群)、抗体投与を開始した。動物を、15mg/kgの対照1B7.11抗体または抗Notch2/3 59R1抗体で週2回治療した。腫瘍サイズを週2回測定し、記載のように腫瘍量を計算した(Michieli et al., 2004を参照されたい)。抗Notch2/3抗体59R1は、対照と比較して、PE13(図5E)およびTE(図5F)腫瘍の成長を有意に低下させた。

10

【0307】

抗体治療の終了時に、さらなる分析のために腫瘍を採取してもよい。一部の態様では、腫瘍への抗体の浸透および腫瘍応答を評価するために、腫瘍の一部を免疫蛍光法で分析する。抗Notch2/3抗体で治療したマウスおよび対照抗体で治療したマウスから採取した各腫瘍の一部を液体窒素に入れて新鮮凍結し、O.C.T.に包埋し、クリオスタットで10μm切片として切断してガラススライドに載せる。または、各腫瘍の一部をホルマリン固定し、パラフィン包埋し、マイクロームで10μm切片として切断してガラススライドに載せる。切片を後固定し、腫瘍生検材料に存在する抗Notch2/3抗体または対照抗体を検出するために、注射した抗体を特異的に認識する発色団標識抗体とインキュベートする。さらに、異なる腫瘍および腫瘍に補充される細胞タイプを検出する抗体、例えば、血管内皮細胞を検出する抗VEカドヘリン(CD144)抗体または抗PECAM-1(CD31)抗体、血管平滑筋細胞を検出する抗平滑筋-アクチン抗体、増殖している細胞を検出する抗Ki67抗体、死につつある細胞を検出するTUNELアッセイ、ならびにNotchシグナル伝達を検出する抗細胞内ドメイン(ICD)Notch断片抗体を用いて、血管形成、腫瘍成長、および腫瘍形態に対する抗体治療の作用を評価することができる。

20

【0308】

腫瘍細胞の遺伝子発現に対する抗Notch2/3抗体治療の作用も評価することができる。Notch2/3抗体治療マウスおよび対照抗体治療マウスから採取された各腫瘍の一部から総RNAを抽出し、定量RT-PCRに使用する。Notch2/3、Notch2シグナル伝達経路および/またはNotch3シグナル伝達経路の成分、ならびに、例えば、CD44を含む癌幹細胞マーカーの発現レベルを、内部対照であるハウスキーピング遺伝子GAPDHと比較して分析する。このように、Notch2/3抗体で治療された時の腫瘍細胞の遺伝子発現の変化を求める。

30

【0309】

さらに、腫瘍内の癌幹細胞の存在に対する抗Notch2/3抗体治療の作用も評価することができる。Notch2/3抗体治療マウスからの腫瘍試料と対照抗体治療マウスからの腫瘍試料を小さな断片に切断し、滅菌したナイフを用いて完全に切り刻み、酵素消化および機械的破壊によって単細胞懸濁液を得る。次いで、解離した腫瘍細胞に腫瘍形成性の癌幹細胞が存在するかどうか、FACS分析によって、前記で詳述したようにESA+、CD44+、CD24-/low、Lin-表面細胞マーカー発現に基づいて分析する。

40

【0310】

次いで、抗Notch2/3抗体治療後のESA+、CD44+、CD24-/low、Lin-発現に基づいて単離された細胞の腫瘍形成能を評価することができる。一例では、Notch2/3抗体治療マウスと対照抗体治療マウスから単離された、5,000個、1,000個、500個、および100個のESA+、CD44+、CD24-/low、Lin-癌幹細胞を、NOD/SCIDマウスの乳房脂肪パッドの皮下に再注射する。このように、腫瘍が一貫して形成するのに必要な注射細胞数に基づいて、癌幹細胞の腫瘍形成能を確かめる。

【0311】

50

実施例7

抗Notch2/3抗体59R1はパクリタキセル治療後のインビボでの腫瘍再発を遅らせる

B51乳房腫瘍細胞(50,000個の細胞/マウス)をNOD-SCIDマウスの乳房脂肪パッドに皮下注射した。約100mm³の平均体積に達するまで、腫瘍を50日間成長させた。動物を無作為化し(n=10/群)、治療を開始した。一方の群には、対照抗体(1B711)を10mg/kg、週2回、パクリタキセル(タキソール)を15mg/kg、週2回与え、他方の群には、59R1を10mg/kg、週2回、パクリタキセルを15mg/kg、週2回与えた。腫瘍量は、指示された日に測定した。治療は、腫瘍量が約50mm³に達するまで38日間行い、この後に、パクリタキセル治療を止め、抗体治療を実験期間にわたって続けた。

【0312】

結果を図6に示した。対照群の腫瘍は、59R1治療群と比較して速く再発することが観察された。

【0313】

実施例8

抗Notch2/3抗体59R1はインビボで腫瘍内の癌幹細胞の頻度を減少させる

限界希釈アッセイ(LDA)を用いて、固形腫瘍癌幹細胞および癌幹細胞を含む腫瘍の腫瘍形成能に対するNotch結合剤の作用を評価することができる。このアッセイは、Notch結合剤または他の剤で治療された動物に由来する腫瘍内の癌幹細胞の頻度を求め、この頻度と、対照動物からの腫瘍内の癌幹細胞の頻度と比較するように合わせることができる。

【0314】

前記の実施例7に記載のように、対照抗体(1B711)+パクリタキセル(タキソール)の組み合わせで治療したB51乳房腫瘍、または59R1およびパクリタキセルの組み合わせで治療したB51乳房腫瘍の腫瘍形成能に対する作用を、LDAを用いて評価した。さらに、対照抗体単独または59R1単独によるB51乳房腫瘍の治療の効果もLDAによって確かめた。対照抗体群および59R1群の、抗体およびパクリタキセルの用量および投与計画は、他の2つの治療群について前記の実施例7に記載したものと同一であった。抗体および/またはパクリタキセルを3回投与した後、腫瘍を採取し、処理し、単細胞になるまで解離させた。ヒト腫瘍細胞は、ビオチン化マウス抗体(-マウスCD45-ビオチン1:200希釈およびラット -マウスH2Kd-ビオチン1:100希釈, BioLegend, San Diego, CA)と氷上で30分間インキュベートし、その後、ストレプトアビジン標識磁気ビーズを添加し、磁石の助けを借りてマウス細胞を取り出すことによって、異種移植片腫瘍細胞から単離した。懸濁液中のヒト細胞を採取および計数した。

【0315】

4つの治療群のそれぞれから連続測定した細胞(30個、90個、270個、および810個の細胞)を、FACS緩衝液およびMatrigelと1:1(v/v)に混合して、新たな組のNOD-SCIDマウス(n=10/群)に注射した。腫瘍を72日間成長させた。検出可能な腫瘍を有するマウスのパーセントを全群において求めた。次いで、L-Calc(商標)ソフトウェア(StemCell Technologies Inc.; www.stemcell.com/search/default.aspからダウンロード可能)を用いて、癌幹細胞頻度を計算した。

【0316】

結果を図7に示した。対照治療マウス(「対照」)における腫瘍内の癌幹細胞の頻度は1:66であると求められた。パクリタキセル治療マウス(「タキソール」)における腫瘍内の癌幹細胞の頻度は1:25であると示された。このことから、パクリタキセル治療によって、実際には、腫瘍内の癌幹細胞の頻度が対照と比較して2倍超に上昇したことが分かる。他方で、59R1抗体単独による治療(「59R1」)、または59R1抗体とパクリタキセルを組み合わせた治療(「タキソール+59R1」)によって、腫瘍内の癌幹細胞の頻度が低下した。59R1抗体単独によって、乳房腫瘍内の癌幹細胞頻度は対照と比較して1/2以下に低下した。59R1抗体およびパクリタキセルの組み合わせによる治療によって、腫瘍内の癌幹細胞の頻度は、59R1単独による治療と比較して約1/2以下に(p<0.0001)、対照抗体による治療と比較して約1/4.5に、パクリタキセル単独による治療と比較して約1/12に低下した。これらの結果

10

20

30

40

50

から、59R1抗体による治療は単独でも、パクリタキセルと組み合わせても、乳房腫瘍の腫瘍形成能の低下に有効であるが、パクリタキセル単独による治療には反対の作用があることが分かる。

【0317】

実施例9

抗Notch2/3抗体59R1を用いた、腫瘍のさらなるインビボ治療

PN4膵臓腫瘍細胞(50,000個の細胞/マウス)を、Nod-Scidマウスの側腹部領域に皮下注射した。約120mm³の平均体積に達するまで、腫瘍を27日間成長させた。動物を4つの治療群(n=10/群)に無作為化し、治療を開始した。ある群には、対照抗体(1B711)を10mg/kg、週2回与えた。ある群には、ゲムシタピンを40mg/kg、週1回+対照抗体を10mg/kg、週2回与えた。ある群には、59R1を10mg/kg、週2回与えた。4番目の群には、59R1、10mg/kg、週2回およびゲムシタピン、40mg/kg、週1回の組み合わせを与えた。腫瘍量は、指示された日に測定した。結果を図8に示した。腫瘍成長は、59R1およびゲムシタピンの組み合わせによって阻害されることが見出された(p<0.001)。

10

【0318】

M4黒色腫瘍細胞(10,000個の細胞/マウス)を、NOD-SCIDマウスの側腹部領域に皮下注射した。腫瘍を、約80mm³の平均体積に達するまで25日間成長させた。動物を治療群(n=10/群)に無作為化し、治療を開始した。ある群には、対照抗体(1B711)を10mg/kg、週2回与えた。ある群には、59R1を10mg/kg、週2回与えた。腫瘍量は、指示された日に測定した。結果を図9に示した。腫瘍成長は59R1によって阻害されることが見出された。

20

【0319】

C28結腸腫瘍細胞(10,000個の細胞/マウス)をNOD-SCIDマウスの側腹部領域に皮下注射した。約130mm³の平均体積に達するまで、腫瘍を24日間成長させた。動物を4つの治療群(n=10/群)に無作為化し、治療を開始した。ある群には、対照抗体(1B711)を10mg/kg、週2回与えた。ある群には、イリノテカン(irinotecan)を7.5mg/kg、週1回、対照抗体を、10mg/kg、週2回与えた。ある群には、59R1を10mg/kg、週2回与えた。4番目の群には、59R1、10mg/kg、週2回、イリノテカンを、7.5mg/kg、週1回与えた。腫瘍量は、指示された日に測定した。結果を図10に示した。腫瘍成長は、対照抗体群と比較して59R1単独によって阻害されることが見出され、イリノテカン群と比較して59R1およびイリノテカンの組み合わせによって阻害されることが見出された。

30

【0320】

乳房腫瘍異種移植片系OMP-B34、OMP-B39、OMP-B44、PE13、およびUM-T1、膵臓腫瘍異種移植片系OMP-PN8、ならびに結腸腫瘍異種移植片系OMP-C8でも、59R1 IgG2抗体をインビボで試験した。Al-Hajj et al., 2003, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100:3983-3988に記載の手順に従って、これらの腫瘍異種移植片系を確立した。乳房腫瘍異種移植片の確立には、免疫無防備状態の雌NOD/SCIDマウス7~10週齢を使用し、OMP-Pn8およびOMP-C8腫瘍モデル(Harlan, Indianapolis, Indiana)には、雄NOD/SCIDマウスを使用した。Colo-205結腸腫瘍異種移植片モデルでも59R1 IgG2抗体をインビボで試験した。Colo-205異種移植片腫瘍モデルには、背景がSwiss CD-1である雌免疫不全bg/nu XIDマウスを使用した。この乳癌モデルの場合、ゆっくりと放出するエストロゲンペレット(0.36mg)を移植しなければならなかった。マウスの右側腹部に、50,000個の(OMP-B34、OMP-B39、OMP-B44、PE13、およびUM-T1)または1x10⁷個の(Colo-205)生細胞をそれぞれ、PBS(マグネシウムもカルシウムも含まない)およびMatrigelと1:1の比で混合して皮下注射した。注射総体積/マウスは200 μlであり、50%はMatrigelであった。腫瘍が65~200mm³のサイズに達したら、マウスを無作為化した。抗体を毎週投与し、腫瘍を週2回測定した。それぞれの腫瘍タイプの治療には、LZ1(リゾザイム(Lysozyme)を認識するヒト抗体)または1B711(ハプテントリニトロフェノールを認識するマウスIgG1抗体)を対照抗体として使用した。腫瘍量は、Al-Hajj et al. (2003)に記載のように計算した。データは平均および平均±S.E.M.で表した。群平均を、スチューデント両側独立t検定を用いて比較した。確率(P)値が<0.05であれば有意差があると解釈した。全ての統計解析は、Microsoft EXCELおよびGraph Pad PRISMを用

40

50

いて行った。

【0321】

Colo205、C8、PNA、B34、B39、B44、PE13、およびT1異種移植片モデルにおける、さらなるインビボ実験の結果を、それぞれ、図11A~11Hに示した。図11Aに示したように、59R1抗体を用いた単独療法によって、Colo205腫瘍の成長は対照抗体(LZ1)と比較して有意に阻害された($p<0.01$)。59R1+抗VEGF抗体ベバシズマブ(アバスタチン)を用いた併用療法によって、腫瘍成長は59R1単独またはベバシズマブ単独よりさらに大幅に阻害された($p<0.001$)。別の結腸直腸異種移植片モデルであるC8でも、59R1は、LZ1対照抗体と比較して腫瘍成長を阻害することが示された(図11B)。同様に、PN8異種移植片モデルにおいて、59R1は、(対照抗体と比較して)膵臓腫瘍成長を阻害することが示された(図11C)。5つの乳癌異種移植片モデルB34(図11D)、B39(図11E)、B44(図11F)、およびPE13(図11G)のそれぞれにおいて、59R1は対照抗体と比較して乳癌成長を阻害することも示された。T1乳癌モデル(図11H)でも、59R1抗体は、腫瘍成長の阻害に有効であることが見出されたが、T1がエストロゲン受容体陰性腫瘍であるにもかかわらず、エストロゲンの存在下でしか有効でなかった。

【0322】

実施例10

異種移植片腫瘍モデルにおける遺伝子調節に対する抗Notch2/3抗体59R1治療の作用

59R1 IgG2抗体で治療した様々な異種移植片腫瘍モデルにおける遺伝子発現レベルをマイクロアレイ分析によって分析した。包括的な遺伝子発現プロファイリング分析を、Affymetrix HG-U133+2.0マイクロアレイ(Affymetrix, Santa Clara, CA)によって行った。対照群および治療群からの異種移植片全腫瘍の3つの独立したRNA試料を単離し、製造業者の説明書に従ってマイクロアレイにハイブリダイズさせた。走査されたアレイのバックグラウンド調整およびおよびシグナル強度の標準化は、オープンソースのbioconductorソフトウェア(www.bioconductor.org)の中にあるGCRMAアルゴリズムを用いて行った。各遺伝子の発現レベルを、対照群(CTRL)および治療群(59R1)の試料全体にわたるz-スコア変換(z-score transformation)によって標準化した。ベイズのt検定(Baldi et al., 2001, Bioinformatics, 17:509-519)によって、2つの群間で異なって発現した遺伝子($p<0.05$ および倍率変化 >2.0)が特定された。選択された腫瘍異種移植片モデル(Colo205、B44、PE13、およびT1)における、選択された、関連する、異なって調節される遺伝子の発現パターンを以下の表5に示した。各遺伝子のP値(PVal)は、ベイズのt検定を用いた、偶然に59R1がこの遺伝子を有意に調節する確率である。Gプロテインシグナル伝達調節因子5(RGS5)、Notch3、およびhairy/enhancer-of-split related with YRPW motif-like(HEYL)タンパク質をコードする遺伝子を含む多くの遺伝子が、59R1で治療されたマウスの間質において、対照マウスと比較して有意に下方調節されることが示された(対照的に、RGS5、Notch3、およびHEYLをコードする、これらの特定の遺伝子は、これらの腫瘍のヒト細胞では有意に下方調節されることが見出されなかった)。

【0323】

(表5) 59R1治療腫瘍の間質における異なって発現する遺伝子

遺伝子	Colo205		B44		PE13		T1	
	倍率	pVal	倍率	pVal	倍率	pVal	倍率	pVal
1420942 s at (Rgs5)	-5.52	7.65E-07	-2.43	5.59E-04	-4.23	2.86E-05	-1.18	9.82E-04
1417466 at (Rgs5)	-3.39	6.62E-07	-2.22	3.11E-04	-4.03	1.31E-10	-1.99	4.11E-04
1420941 at (Rgs5)	-5.10	1.66E-03	-2.09	1.18E-03	-2.99	1.35E-05	-1.97	2.07E-03
1421964 at (Notch3)	-3.26	3.70E-06	-2.03	2.30E-03	-1.91	1.67E-03	-1.01	8.86E-01
1416286 at (Rgs4)	-3.08	2.69E-03	-1.57	3.84E-02	-1.83	6.71E-05	-1.13	4.47E-01
1434141 at (Gucyl1a3)	-2.49	2.87E-03	-1.74	1.07E-02	-4.18	1.49E-07	1.20	5.95E-01
1459713_s at (Tmem16a)	-1.90	1.90E-03	-1.70	1.01E-02	-7.28	9.89E-10	-2.14	1.79E-04
1420872_at (Gucyl1b3)	-1.94	1.90E-02	-1.65	7.68E-03	-3.06	8.52E-10	-1.01	7.13E-01
1422789 at (Aldh1a2)	-1.73	1.20E-02	-4.92	2.42E-08	-2.17	1.58E-04	-2.16	9.27E-04
1419302 at (Heyl)	-3.28	5.61E-03	-1.12	2.36E-01	-1.77	5.72E-04	-1.07	2.39E-02
1451501 a at (Ghr)	-1.83	1.69E-02	-2.24	2.71E-04	-1.66	8.90E-04	-1.12	3.38E-01
1417714_x at (Hba-a1/Hba-a2)	-8.37	2.49E-02	-2.56	4.63E-04	-1.92	1.06E-02	1.42	9.24E-01
1428361_x at (Hba-a1/Hba-a2)	-8.91	1.93E-02	-2.42	1.08E-03	-1.73	4.27E-02	1.73	4.67E-01
1452590 a at (Plac9)	-1.61	1.07E-02	-1.64	1.22E-02	-1.62	6.17E-03	1.20	7.36E-01
1449632_s at (Fkbp10)	-1.72	1.69E-02	-1.57	1.12E-02	-1.63	1.80E-04	1.07	5.97E-01
1449280 at (Esml)	2.07	1.06E-02	1.55	3.48E-02	1.56	4.35E-02	1.18	2.44E-01
1418829 a at (Eno2)	1.79	2.92E-02	1.71	1.02E-02	1.54	5.43E-03	1.29	9.92E-02

10

20

【 0 3 2 4 】

異種移植片モデルColo205、B29、B34、B44、PE13、T1(エストロゲン治療なし)、T1(エストロゲン治療あり)、C8、およびPN8からの間質における、マイクロアレイ分析において59R1治療により調節されると特定された選択された遺伝子(hey1、notch3、rgs5、angpt1、およびangpt2)の発現レベルをTaqMan(登録商標)分析によってさらに分析した。結果を、図12A(hey1)、12B(notch3)、12C(rgs5)、12D(angpt1)、および12E(angpt2)に示した。

【 0 3 2 5 】

TaqMan(登録商標)分析の結果から、様々な腫瘍タイプのそれぞれの間質において、59R1治療に反応して(対照と比較して)、notch3およびrgs5は下方調節されることが確かめられた(図12BおよびC)。RGS5は、周皮細胞および血管平滑筋細胞の周知のマーカである(Berger et al., 2005, Blood, 105:1094-1101; Lovschall et al., 2007, Int. J. Dev. Biol., 51: 715-721; Cho et al., 2003, FASEB J., 17:440-2)。Notch3は、血管形成の間に周皮細胞においてRGS5と同時発現しており、周皮細胞および血管平滑筋細胞の運命の調節において重要な役割を果たすことが特定されている(Lovschall et al., 2007, Int. J. Dev. Biol., 51: 715-721; Domenga et al., 2004, Genes & Dev., 18:2730-2735; Sweeney et al., 2004, FASEB J., 18:1421-3; Morrow et al., 2005, Am. J. Physiol. Cell Physiol., 289:C1188-C1196)。

30

【 0 3 2 6 】

さらに、hey1もまた、B34以外の異種移植片モデルのそれぞれの間質において下方調節されることが確かめられた(図12A)。HeyLは、Notchシグナル伝達の下流転写因子のHeyファミリー(Hey1、Hey2、およびHeyL)に属する。59R1によるhey1のダウンレギュレーションは、59R1抗体がhey1を下方調節することによってNotchシグナル伝達に直接影響を及ぼすことを示唆している。

40

【 0 3 2 7 】

アンジオポエチン-1(angpt1)およびアンジオポエチン-2(angpt2)もまた多くの乳癌モデルの間質において下方調節されることが確かめられた(図12DおよびE)。ANGPT1および2(アンジオポエチン-1および-2)は、TIE1および2受容体のリガンドである。VEGFと同様にTIE受容体は、血管新生プロセスにおける重要なシグナル伝達分子である(Jones et al., 2001, Nature Reviews, 2:257-267)。

50

【0328】

しかしながら、特に、59R1治療が腫瘍成長に対する有効な条件であるエストロゲン治療が用いられた時には(「T1 e」)、angpt1およびangpt2はT1モデルの間質において下方調節され、59R1治療が腫瘍成長に対して有効でない条件であるエストロゲン治療の非存在下では(「T1 ne」)、angpt1およびangpt2は同じモデルの間質において下方調節されなかった(前記の実施例9を参照されたい)。従って、エストロゲン治療の非存在下では、T1腫瘍の間質におけるアンジオポエチン-1およびアンジオポエチン-2のダウンレギュレーションに対する59R1の作用は無くなる。この作用の1つの可能性のある説明は、エストロゲン治療の非存在下では、T1間質における増殖因子アンジオポエチン-1およびアンジオポエチン-2のレベルは、59R1抗体による治療の際に発現レベルを測定可能に減少させるほど十分に高くないというものである。エストロゲンは腫瘍微小環境に大きな影響を及ぼすことが示されている(Banka et al., 2006, Cancer Res. 66:3667-3672)。このデータの1つの可能性のある説明は、エストロゲンが腫瘍のANGPT2シグナル伝達依存性を引き起こし、次いで、これが、59R1治療に対する感受性につながるというものである。

10

【0329】

実施例11

抗Notch2/3抗体59R1は結腸腫瘍および乳房腫瘍において低酸素を有意に誘導する

59R1 IgG2抗体または1B711対照抗体を用いて治療されたColo-205結腸腫瘍およびPE-13乳房腫瘍において、低酸素領域の染色を行った。Ridgway et al., 2006, Nature 444:1083-1087に記載のように、染色を行った。簡単に述べると、低酸素を測定するために、約10 mmHg未満の酸素分圧で長寿命のタンパク質付加物を形成する、塩酸ピモニダゾール(Hypox yProbe, NPI, Burlington, MA)を、60mg/kgで、屠殺の1時間前に腹腔内注射した。次いで、腫瘍を組織学的分析のために処理し、腫瘍切片を、抗ピモニダゾール抗体を用いて製造業者のプロトコール(NPI)に従って染色した。BX51顕微鏡(Olympus, Center Valley, PA)を用いて、写真を撮影した。

20

【0330】

比較的均一で高密度のDAPI染色により示されるように、生きている腫瘍細胞が、1B711で治療された腫瘍および59R1で治療された腫瘍に等しく存在することが見出された(データ示さず)。CD31陽性細胞の数も変化しなかった。このことは、内皮細胞数が59R1治療の影響を受けなかったことを示唆している。しかしながら、59R1で治療されたColo-205腫瘍および59R1で治療されたPE13腫瘍では、低酸素領域(抗ピモニダゾール抗体によって検出した)は、1B711で治療された腫瘍よりかなり顕著であった(データ示さず)。抗CD31抗体を検出するために、AF594コンジュゲータヤギ抗ラットF(ab')₂を使用し、抗ピモニダゾール抗体を検出するために、FITC結合ヤギ抗ウサギ抗体を使用した。

30

【0331】

実施例12

PTEN腫瘍抑制遺伝子に欠失を含む乳房腫瘍は59R1治療に応答する

異種移植片乳癌の腫瘍細胞からDNA試料を調製した。DNA単離の前に、マウス細胞特異的抗体とコンジュゲータした磁気ビーズを用いて、異種移植片腫瘍にあるマウス間質細胞を枯渇させた。精製されたDNA試料を、製造業者の説明書に従って、AffymetrixゲノムワイドヒトSNPアレイ6.0遺伝子チップ(Affymetrix, Santa Clara, CA)とハイブリダイズさせた。このチップは、コピー数パリエーション(CNV)を検出するために946,000超のプローブを有する。コピー数状態の変化は、隠れマルコフモデル(HMM)を用いて概算した。各試料のパリエーション(CNV)は、ランクセグメンテーション(rank segmentation)分析によって、ベースラインとしてHapmap270を用いて得た。アレイ内の固有ノイズのために、有意性の閾値 $<1.0 \times 10^{-6}$ およびセグメントあたりの最小プローブ数=5の下で、ヘテロ接合性欠失およびホモ接合性欠失のカットオフとして、-0.5および-1.0のlog2比を使用した。

40

【0332】

図13は、10番染色体にある腫瘍抑制ホスファターゼテンシンホモログ(PTEN)遺伝子内のエキソン、Affymetrixプローブ分布、および欠失を示す。B29、B34、B37、B40、B51、T2

50

、T3、およびT6乳房腫瘍は、これらのゲノムにおいてインタクトなPTEN遺伝子を有することが見出された。PTEN遺伝子は、B39腫瘍においてホモ接合性欠失を有すると確かめられたのに対して、B44、PE13、およびT1腫瘍は、この遺伝子のヘテロ接合性欠失を有すると確かめられた。前記のように、59R1は、PTENのホモ接合性欠失またはヘテロ接合性欠失を含む、これらの4つの乳房腫瘍のそれぞれにおいて抗腫瘍効力を有すると確かめられた。これらの結果は、腫瘍、特に、ホモ接合性またはヘテロ接合性のPTEN欠失を有する乳房腫瘍が、抗Notch2/3抗体、例えば、59R1による治療に特に適している可能性があることを示唆している。

【0333】

実施例13

59R5抗体の特徴付け

ヒトNotch2およびヒトNotch3に特異的に結合する、さらなるヒト抗体59R5を特定した。重鎖および軽鎖の配列を、それぞれ、SEQ ID NO:49およびSEQ ID NO:18に示した。重鎖可変領域をSEQ ID NO:50に示し、軽鎖可変領域をSEQ ID NO:13に示した。59R5の重鎖CDR3配列はSIFYTT、SEQ ID NO:51を含む。59R5の他のCDR配列は59R1と同一である。59R1および59R5結合親和性のBiacore分析から、59R5はNotch2およびNotch3に対して59R1とほぼ同じ結合特性を有することが分かった。両抗体とも、nM以下の親和性でヒトおよびマウスNotch2およびNotch3受容体に結合する(表6を参照されたい)。

【0334】

(表6)

IgG解離定数 (K_D , nM)							
	m-Notch1	h-Notch1	m-Notch2	h-Notch2	m-Notch3	h-Notch3	h-Notch4
59R1	>10	>10	0.65	0.05	0.32	0.19	NB
59R5	>10	>10	0.26	0.05	0.29	0.22	NB

【0335】

59R5は、Notch2シグナル伝達およびNotch3シグナル伝達のブロックにおいて59R1とほぼ同じ活性を有することが確かめられた。受容体活性化はルシフェラーゼをベースとするアッセイにおいて確かめられた。PC3腫瘍細胞を、ヒトまたはマウスNotch受容体(ヒトNotch2、マウスNotch2、ヒトNotch3、またはマウスNotch3)およびGFP誘導性レポーター構築物で一過的にトランスフェクトした。トランスフェクトされた細胞を、受動的に固定化されたDLL4-Fcタンパク質の存在下で、異なる濃度の59R1抗体または59R5抗体とインキュベートした。Notch受容体活性化は、ルシフェラーゼ活性を測定することによって確かめられた。図15Aに示したように、59R5は、ヒトNotch2、マウスNotch2、ヒトNotch3、およびマウスNotch3受容体シグナル伝達の、リガンドにより誘導された活性化を、59R1とほぼ同じレベルでブロックした。

【0336】

59R5の結合エピトープを決定した。抗体59R1の分析について実施例3で述べたように、完全長Notch1のEGF10の中の残基を、ヒトNotch2にある対応するアミノ酸に変換する、いくつかの点変異体を作り出した。完全長Notch配列の変異体を、QuikChange(登録商標)変異誘発(Stratagene)によって作製し、配列決定によって確認した。ヒトNotch2をコードする発現ベクター、ヒトNotch1をコードする発現ベクター、または残基382~386が対応するヒトNotch2残基に変異したヒトNotch1をコードする発現ベクターで、HEK293細胞を一過的にトランスフェクトした。トランスフェクトされたプラスミドを有する細胞に印を付けるために、緑色蛍光タンパク質(GFP)をコードするプラスミドで、細胞をコトランスフェクトした。細胞を59R1または59R5および蛍光二次抗体とインキュベートし、次いで、FACSによって調べた。59R1および59R5を、PEコンジュゲートヤギ抗ヒトFc 特異的抗体(Jackson Immunochemicals、#109-116-170)によって検出した。図15Bに示したように、59R5はNotch2に結合し、Notch1に結合しなかった。しかしながら、Notch2アミノ酸385~389に対応す

10

20

30

40

50

るアミノ酸がNotch1に導入された時に、59R5は変異Notch1に結合することができた。このことは、59R5とヒトNotch2との結合に必要な少なくとも1つのまたはそれ以上のアミノ酸がアミノ酸385～389の中にあることを示唆し(図14Aに示した、囲みのhNotch2配列の中にある残基)、59R5が、59R1と同じエピトープ、または59R1のエピトープと類似するエピトープ、もしくは59R1のエピトープと重複するエピトープに結合することを示唆した。

【0337】

実施例14

Notch2/3抗体59R5を用いた、腫瘍のインビボ治療

1つの態様において、NOD/SCIDマウスにPE13乳房腫瘍細胞を注射した。抗Notch2/3抗体59R1、抗Notch2/3抗体59R5、または対照抗体を用いて、マウスを治療した。抗体は、細胞注射の2日後に投与が始まる「予防(preventative)」形式で、15mg/kg、週1回投与した。図16Aは、59R1で見られた作用と同様に、59R5治療によって腫瘍成長が80%超、阻害されたことを示す。

10

【0338】

別の態様において、NOD/SCIDマウスにC28結腸腫瘍細胞を注射した。抗Notch2/3抗体59R1、抗Notch2/3抗体59R5、または対照抗体を用いて、マウスを治療した。抗体は、細胞注射の2日後に投与が始まる「予防」形式で、15mg/kg、週1回投与した。図16Bは、59R1および59R5によってC28結腸腫瘍の成長が阻害されたことを示す。

【0339】

別の態様において、NOD/SCIDマウスにColo205結腸腫瘍細胞を注射した。抗Notch2/3抗体59R1、抗Notch2/3抗体59R5、または対照抗体を用いて、マウスを治療した。抗体は、腫瘍が確立した後に、15mg/kg、週1回投与した。図16Cは、59R1および59R5によってColo28結腸腫瘍の成長がほぼ同じレベルで阻害されたことを示す。

20

【0340】

実施例15

併用治療におけるNotch2/3抗体59R5を用いた、腫瘍のインビボ治療

1つの態様において、NOD/SCIDマウスにPN8膵臓腫瘍細胞を注射した。150mm³の平均腫瘍量に達するまで、約33日間、腫瘍を成長させた。4週間にわたって週1回、20mg/kgのゲムシタピンと、対照抗体、抗Notch2/3抗体59R1、または抗Notch2/3抗体59R5を組み合わせ、マウスを治療した。図17Aに示したように、抗体59R5によって、抗体59R1とほぼ同じレベルで腫瘍成長が阻害され、併用治療によってゲムシタピン単独より長期間、腫瘍再発が遅れた。

30

【0341】

1つの態様において、癌幹細胞に対する59R5の作用を評価するために、PE13乳房腫瘍モデルにおいて腫瘍再発試験を行った。NOD/SCIDマウスにPE13乳房腫瘍細胞を注射した。腫瘍を40日間増殖させた後に、治療を開始した。マウスを、15mg/kgのタキソールと対照抗体または抗Notch2/3抗体59R5を組み合わせ、5週間にわたって週2回治療した。5週間後に、タキソール治療を止め、抗体治療を続けた。59R5は、高用量タキソール治療後の腫瘍再発を有意に遅らせることが観察された(図17B)。これらの結果は、59R5治療によって癌幹細胞頻度が低下することを示唆している。

40

【0342】

前の態様に記載の59R1および59R5のインビボ活性の概要を表7に示した。各実験の腫瘍量およびp値を対照群と比較して示した。実施例14に記載のように、PE13、C28、およびColo205研究を行った。PN8研究は前記のように行った。PN8実験については、対照はゲムシタピン単独であり、59R1および59R5の値はゲムシタピンとの組み合わせである。抗体は、全ての実験について15mg/kg、週1回投与した。

【0343】

(表7)

	PE13		C28		Colo205		PN8	
	腫瘍体積	p値	腫瘍体積	p値	腫瘍体積	p値	腫瘍体積	p値
59R1	0.25	<0.0001	0.29	<0.0001	0.68	0.003	0.27	0.026
59R5	0.18	<0.0001	0.38	<0.0001	0.61	0.001	0.11	0.036

【0344】

実施例16

59R5治療後の腫瘍における遺伝子発現の調節

59R5および59R1がインビボで同じ機構によって機能しているかどうか確かめるために、腫瘍細胞および腫瘍間質における鍵となる標的遺伝子の発現を調べた。PE13腫瘍細胞および間質細胞における遺伝子発現を定量PCRによってアッセイした。対照抗体治療群と比較した遺伝子発現レベルを図18に示した。59R1および59R5は、間質細胞においてマウスHeyL、Notch3、およびRGS5の発現をほぼ同じ程度で調節した(左パネル)。同じ調節パターンがC28腫瘍において観察された(データ示さず)。従って、腫瘍脈管構造および周皮細胞の機能に重要な腫瘍間質における遺伝子の調節において59R1について以前に特定された作用機序が59R5によって保持されていた。同様に、59R5および59R1は、腫瘍細胞におけるヒト遺伝子ID4、EDNRA、およびEGLN3の発現を同程度に調節した(右パネル)。

【0345】

この遺伝子ファミリーの他のメンバーとは異なり、ID4は腫瘍において概して低発現であり、ID4は、メチル化によって頻繁に発現停止される、乳癌の腫瘍抑制因子であることが示されている。ID4の発現消失は乳癌患者の予後不良と相関付けられている(Noetzel et al., 2008, BMC Cancer 8:154)。従って、PE13乳房腫瘍細胞におけるID4のアップレギュレーションは、抗Notch2/3の抗腫瘍機構の一部であり得る。EDNRAは、内皮細胞および腫瘍細胞の成長を促進し、腫瘍細胞の転移活性を刺激するエンドセリン受容体をコードする遺伝子である(Bagnato and Rosano 2008, Int. J. Biochem. Cell. Biol. 40:1443-51)。EGLN3(HIF-3とも知られる)は低酸素誘導性遺伝子である。抗Notch2/3によるEGLN3の誘導は、治療を受けた腫瘍における機能的脈管構造の破壊と一致している。これらのデータは、59R1および59R5の生物学的活性および作用機序が非常に似ていることを示した。

【0346】

表8は、59R1および59R5で治療されたPE13腫瘍のマイクロアッセイ分析からの結果を示す。数値は、治療を受けた動物の発現値と対照動物の発現値の平均の差を示す。一群あたり動物は3匹である。

【0347】

(表8)

59R1		59R5		記号	遺伝子名
倍率	pVal	倍率	pVal		
-5.10	3.21E-05	-3.00	1.10E-03	Foxc2	フォークヘッドボックスC2
-4.40	1.26E-05	-2.46	7.45E-04	Hey2	YRPWモチーフ2関連 hairy/enhancer-of-split
-4.32	8.03E-06	-2.14	1.00E-04	Rgs5	Gプロテインシグナル伝達調節因子5
-3.33	5.59E-04	-2.79	3.18E-03	Hey1	YRPWモチーフ様関連 hairy/enhancer-of-split
-2.71	4.80E-04	-2.90	1.02E-04	Rgs4	Gプロテインシグナル伝達調節因子4
-2.10	2.17E-04	-1.86	4.33E-05	Notch3	Notch遺伝子ホモログ3(ショウジョウバエ)
-1.92	3.16E-02	-2.35	3.43E-03	Mmp9	マトリックスメタロペプチダーゼ9
2.36	3.06E-02	4.97	3.35E-02	Pdcd1lg2	プログラム細胞死1リガンド2
7.42	6.25E-07	2.80	2.07E-03	Gzma	グランザイムA

【0348】

マイクロアレイ分析から、59R5は、遺伝子発現(例えば、Foxc2、Hey2、Hey1、Notch3)によって測定されたようにNotch経路を有意に阻害したことが明らかになった(p<0.01)。

これらの結果は59R1と同等のものであった。Foxc2はHedgehog経路の下流標的であり、細胞分化に参与している。アポトーシスに参与するさらなる遺伝子(例えば、グランザイムA)および腫瘍に関連する組織リモデリングに参与するさらなる遺伝子(MMP-9)もまた同様に59R1と59R5との間で発現していた。これらのデータは、59R1および59R5の生物学的活性および作用機序が非常に似ていることを示唆していた。

【0349】

実施例17

さらなるNotch2抗体および/またはNotch3抗体の作製 抗原の作製

ある特定の態様では、抗体作製の抗原として、ヒトNotch2またはヒトNotch3細胞外ドメインの組換えポリペプチド断片を作製する。例えば、標準的な組換えDNA技術を用いて、EGF1~12を含むNotch2(SEQ ID NO:33)のアミノ酸1~493をコードするポリヌクレオチドを単離することができる。このポリヌクレオチドは、N末端でヒトFc-タグまたはヒスチジン-タグとインフレイムに連結し、昆虫細胞におけるバキュロウイルスを介した発現のためにトランスファープラスミドベクターにクローニングすることができる。標準的なトランスフェクション、感染、および細胞培養プロトコルを用いて、対応するNotch2ポリペプチド(SEQ ID NO:34)を発現する組換え昆虫細胞を作製することができる(O'Reilly et al., 1994, Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual, Oxford: Oxford University Press)。

【0350】

切断予測ソフトウェアSignalP3.0を用いて、ヒトNotch2の内因性シグナル配列の切断を概算した。しかしながら、実際のインビボ切断点は、どちらの方向でも、アミノ酸数個分、異なる場合がある。Notch2の予測された切断は、アミノ酸1から26の間であり、従って、Notch2抗原タンパク質は、おおそアミノ酸27からアミノ酸493を含む。抗原タンパク質は、プロテインAおよびNi⁺⁺キレートアフィニティクロマトグラフィーを用いて昆虫細胞条件培地から精製することができる。次いで、精製された抗原タンパク質をPBS(pH=7)に対して透析し、約1mg/mlまで濃縮し、免疫化のために調製中に滅菌濾過する。

【0351】

免疫化

マウスは、標準法を用いて、精製されたNotch2またはNotch3抗原タンパク質で免疫化することができる。抗原認識のための初回免疫化の約70日後に、ELISAおよびFACS分析を用いて、個々のマウスからの血液をスクリーニングすることができる(以下に詳述)。次いで、最後の抗原追加免疫のために、最も高い抗体価を有する動物を選択する。この後に、ハイブリドーマ作製のために脾臓細胞を単離する。ハイブリドーマ細胞を96ウェルプレートの中に1ウェルあたり1細胞でプレートし、各ウェルからの上清を、抗原タンパク質に対するELISAおよびFACS分析によってスクリーニングする。高い抗体価を有するいくつかのハイブリドーマを選択し、静置フラスコ培養においてスケールアップする。プロテインAまたはプロテインGアガロースクロマトグラフィーを用いて、ハイブリドーマ上清から抗体を精製し、下記のようにFACSによって試験する。

【0352】

FACS分析

ネイティブな細胞表面Notch2(および/またはNotch3)タンパク質を認識するハイブリドーマクローンによって産生されたモノクローナル抗体を選択するために、FACS分析を使用する。Notch2の完全長cDNAクローンをコードする発現ベクターおよびトランスフェクションマーカーGFPをコードする発現ベクターを用いて、HEK293細胞をトランスフェクトする。トランスフェクションの24~48時間後に、細胞を懸濁液中に収集し、抗Notch2(もしくは抗Notch3もしくは抗Notch2/3)抗体またはバックグラウンド抗体結合を検出する対照IgGと氷上でインキュベートする。細胞を洗浄し、蛍光発色団とコンジュゲートした抗マウス二次抗体を用いて一次抗体を検出する。次いで、ネイティブな細胞表面Notch2および/またはNotch3タンパク質の細胞表面発現を特異的に認識する抗Notch2、抗Notch3、または抗

10

20

30

40

50

Notch2/3抗体を特定するために、標識細胞をFACSによって分別する。

【0353】

キメラ抗体

Notch受容体の非リガンド結合ドメインを特異的に認識するモノクローナル抗体が同定された後、げっ歯類抗体が治療剤として用いられた時のヒト抗マウス抗体(HAMA)免疫応答を克服するために、これらの抗体を改変する。選択されたモノクローナル抗体の重鎖および軽鎖の可変領域を、ハイブリドーマ細胞からRT-PCRによって単離し、哺乳動物発現ベクター内で、それぞれ、ヒトIgG1重鎖定常領域および軽鎖定常領域とインフレームで連結する。または、同じプラスミド上にヒトIgG1重鎖および軽鎖の定常領域遺伝子を含むヒトIg発現ベクター、例えば、TCAE5.3が用いられる(Preston et al., 1998, *Infection & Immunity* 66:4137-42)。次いで、キメラ抗体作製のために、キメラ重鎖をコードする発現ベクターおよびキメラ軽鎖をコードする発現ベクターをチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞にコトランスフェクトする。ELISAおよびFACSによって、キメラ抗体の免疫反応性および親和性を親マウス抗体と比較する。

10

【0354】

ヒト化抗体

キメラ抗体治療剤は依然として抗原性があり、抗キメラ抗体(HACA)免疫応答を生じることが多いので、Notch2またはNotch3受容体に対するキメラ抗体はさらなるヒト化を必要とする場合がある。ヒト化抗体を作製するために、前記のキメラ抗体重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインの3つの短い超可変配列、すなわち相補性決定領域(CDR)を、組換えDN A技術を用いて、それぞれ、ヒト重鎖配列および軽鎖配列の可変ドメインフレームワークに操作する。次いで、CHO細胞において発現させるために哺乳動物発現ベクターにクローニングする。ELISAおよびFACSによって、ヒト化抗体の免疫反応性および親和性を親キメラ抗体と比較する。さらに、可変領域の部位特異的変異誘発または高密度変異誘発を用いて、ヒト化抗体の特異性、親和性などを最適化することができる。

20

【0355】

実施例18

Notch受容体に対する抗体を評価するための、さらなるインビトロアッセイ

本実施例は、Notch2および/またはNotch3受容体に対して作製された抗体の、細胞増殖および細胞傷害性に対する活性を試験するためのインビトロアッセイ方法について述べる。

30

【0356】

増殖アッセイ

Notch2および/またはNotch3に対する抗体の、インビトロでの腫瘍細胞増殖に及ぼす影響を、BrdUベースのアッセイを用いて試験する。新鮮に解離した、Linを枯渇させた乳房腫瘍細胞を、2~5日間、低酸素培養した。次いで、細胞を、20,000細胞/ウェルで、2.5 μg/mLもしくは5.0 μg/mLの抗Notch抗体、または対照非特異的マウスIgGと共に、あるいは抗体無しで、3日間培養した後、BrdU標識を18時間行った。実験は全て複数回繰り返して行った。次いで、抗Notch抗体が対照抗体と比較して細胞増殖を阻害する能力を確かめた。

40

【0357】

補体依存性細胞傷害性アッセイ

Notch2受容体および/もしくはNotch3受容体を発現する癌細胞株、または免疫無防備状態マウスにおいて異種移植片として継代された、患者試料から単離された癌幹細胞を用いて、Notch2および/またはNotch3受容体に対する抗体により媒介される補体依存性細胞傷害性(CDC)を測定する。細胞を、 10^6 細胞/mlで、抗生物質および5%FBSを添加したRPMI1640培地200 μlに懸濁する。次いで、懸濁細胞を、Notch2および/もしくはNotch3受容体に対する抗体または対照抗体を含む、血清または熱失活血清200 μlと三通り混合する。細胞混合物を、5%CO₂、37 °Cで1~4時間インキュベートする。次いで、処理した細胞を収集し、培地で希釈したFITC標識アネキシンV 100 μlに再懸濁し、室温で10分間インキュベートす

50

る。HBSSで希釈したヨウ化プロピジウム溶液(25 µg/ml)100 µlを添加し、室温で5分間インキュベートする。細胞を収集し、培地に再懸濁し、フローサイトメトリーによって分析する。FITC染色細胞のフローサイトメトリーによって総細胞数が得られ、総細胞数のパーセントとして表される、死細胞によるヨウ化プロピジウム取り込みは、血清ならびにNotch2および/またはNotch3受容体に対する抗体の存在下での細胞死を、熱失活血清および対照抗体と比較して測定するのに用いられる。このように、抗Notch2/3抗体が補体依存性細胞傷害性を媒介する能力が確かめられる。

【0358】

抗体依存性細胞傷害性アッセイ

Notch2受容体および/もしくはNotch3受容体を発現する癌細胞株、または免疫無防備状態マウスにおいて異種移植片として継代された、患者試料から単離された癌幹細胞(下記で詳述する)を用いて、Notch2および/またはNotch3受容体に対する抗体によって媒介される抗体依存性細胞傷害性(ADCC)を測定する。抗生物質および5%FBSを添加したフェノールレッドを含まないRPMI1640培地200 µlに、細胞を 10^6 細胞/mlで懸濁する。末梢血単核球(PBMC)をエフェクター細胞として使用するために、Ficoll-Paque密度勾配遠心分離法によってヘパリン添加末梢血から単離する。次いで、96ウェルプレート内で、Notch2もしくはNotch3受容体または対照抗体の存在下で、標的細胞(T)とPBMCエフェクター細胞(E)を25:1、10:1、および5:1のE/T比で混合する。対照には、抗体の存在下での標的細胞単独およびエフェクター細胞単独のインキュベーションが含まれる。細胞混合物を、5%CO₂、37 °Cで1~6時間インキュベートする。次いで、細胞溶解の際に放出される安定したサイトゾル酵素である乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)の放出が比色アッセイ(例えば、CytoTox96非放射性細胞傷害性アッセイ;Promega; Madison, WI)によって測定される。標準的な96ウェルプレートリーダーを用いて490nmでの吸光度データを集め、バックグラウンドを補正する。式:
%細胞傷害性=100x(実験によるLDH放出-エフェクターLDH自然放出-標的LDH自然放出)/(標的LDH最大放出-標的LDH自然放出)に従って、特異的細胞傷害性のパーセントを計算する。このように、Notch2および/またはNotch3受容体に対する抗体が抗体依存性細胞傷害性を媒介する能力が確かめられる。

【0359】

実施例19

Notch受容体のEGF10(または同等EGF)に対する抗体の作製

動物において腫瘍成長を妨げる、Notch2の10番目のEGF反復およびNotch3の対応するEGF反復(9番目のEGF反復)に特異的に結合する抗体が特定されたことは、非リガンド結合ドメインおよび10番目のEGF反復(またはその同等物)が重要であること、特に、効果的な癌療法に重要であることを示唆している。Notch受容体ファミリーメンバー内のEGF反復10(または同等EGF)を標的とするために、Notch1、Notch2、もしくはNotch4のEGF10に対する抗体、またはNotch3のEGF9に対する抗体を作製し、分析する。具体的には、Notch1(SEQ ID NO:35);Notch2(SEQ ID NO:36)、もしくはNotch4(SEQ ID NO:38)の10番目のEGF反復またはNotch3(SEQ ID NO:37)の9番目のEGF反復を含む抗原で、マウスを免疫化する。特異的Notch受容体を認識する抗体ならびに4つのNotch受容体の異なる組み合わせを認識する抗体を、前記で詳述した、それぞれのNotch受容体でトランスフェクトされたHEK293細胞のFACS分析を用いて特定する。2つのNotch受容体ファミリーメンバーの10番目のEGF反復(または同等EGF)を認識する抗体が想定される(例えば、Notch1 EGF10およびNotch2 EGF10; Notch1 EGF10およびNotch3 EGF9; Notch1 EGF10およびNotch4 EGF10; Notch2 EGF10およびNotch3 EGF9; Notch2 EGF10およびNotch4 EGF10;またはNotch3 EGF9およびNotch4 EGF10を認識する抗体)。3つのNotch受容体ファミリーメンバーの10番目のEGF反復(または同等EGF)を認識する抗体も同様に意図される(例えば、Notch1 EGF10、Notch2 EGF10、およびNotch3 EGF9; Notch1 EGF10、Notch2 EGF10、およびNotch4 EGF10;またはNotch2 EGF10、Notch3 EGF9、およびNotch4 EGF10を認識する抗体)。4つのNotch受容体ファミリーメンバーの10番目のEGF反復(または同等EGF)を認識する抗体も想定される(例えば、Notch1 EGF10、Notch2 EGF10、Notch3 EGF9、およびNotch4 EGF10を認識する抗体)。

【0360】

実施例20

抗Notch受容体抗体を用いたヒト癌の治療

本実施例は、Notch受容体発現が検出されている癌幹細胞および/または腫瘍細胞を含む腫瘍を標的とするNotch受容体に対する抗体を用いて、癌を治療するための方法について述べる。

【0361】

最初に、癌幹細胞マーカー発現の存在は腫瘍生検材料から確かめることができる。癌と診断された患者の生検材料から腫瘍細胞を無菌条件下で取り出す。一部の態様において、組織生検材料を液体窒素に入れて新鮮凍結し、O.C.T.に包埋し、クリオスタットで10 μ m切片として切断してガラススライドに載せる。または、組織生検材料をホルマリン固定し、パラフィン包埋し、ミクロトームで10 μ m切片として切断してガラススライドに載せる。タンパク質発現を検出するために、切片をNotch受容体に対する抗体とインキュベートする。さらに、癌幹細胞の存在を確かめることができる。組織生検試料を小さな断片に切断し、滅菌したナイフを用いて完全に切り刻み、細胞を酵素消化および機械的破壊に供して、単細胞懸濁液を得る。次いで、癌幹細胞を検出するために、解離した腫瘍細胞を、抗ESA抗体、抗CD44抗体、抗CD24抗体、および抗Lin抗体とインキュベートする。ESA+、CD44+、CD24-/low、Lin-腫瘍幹細胞の存在は、前記で詳述したようにフローサイトメトリーによって確かめられる。

【0362】

Notch受容体を発現していると診断された腫瘍を有する癌患者を、抗Notch受容体抗体を用いて治療する。前記のように作製されたヒト化またはヒトモノクローナル抗Notch受容体抗体を精製し、注射のために適切な薬学的な担体と共にPBSに溶解して処方する。患者を、少なくとも10週間にわたって1週間に1回、Notch抗体で治療するが、ある特定の場合では、少なくとも約14週間にわたって1週間に1回、Notch抗体で治療する。抗体の各投与は約2~約100mg/mlの薬学的に有効な用量でなければならず、ある特定の場合では約5~約40mg/mlの薬学的に有効な用量でなければならない。1つまたは複数の種類の化学療法剤、例えば、パクリタキセル、ゲムシタピン、イリノテカン、オキサリプラチン、フルオロウラシル、ロイコボリン、またはストレプトゾシンを用いた標準的な放射線療法レジメンもしくは化学療法レジメンの前、これと同時に、またはこの後に、抗体を投与することができる。このような治療によって抗腫瘍応答が生じたかどうか確かめるために、例えば、腫瘍後退、新たな腫瘍の発生率の低下、腫瘍抗原の低発現、癌幹細胞数の減少、または疾患予後を評価する他の手段に基づいて、患者をモニタリングする。

【0363】

実施例21

Notch1、Notch2、Notch3、および/またはNotch4 EGF反復4に対する抗体の作製

Notch受容体ファミリーメンバー内のEGF反復4を標的とするために、Notch1、Notch2、Notch3、および/またはNOTCH4 EGF反復4に対する抗体を作製し、分析する。具体的には、Notch1 (SEQ ID NO:41)、Notch2 (SEQ ID NO:42)、Notch3 (SEQ ID NO:43)、またはNotch4 (SEQ ID NO:44)の4番目のEGF反復を含む抗原で、マウスを免疫化する。特異的Notch受容体を認識する抗体ならびに4つのNotch受容体の異なる組み合わせを認識する抗体を、前記で詳述した、それぞれのNotch受容体でトランスフェクトされたHEK293細胞のFACS分析を用いて特定する。2つのNotch受容体ファミリーメンバーの4番目のEGF反復を認識する抗体が想定される(例えば、Notch1およびNotch2;Notch1およびNotch3;Notch1およびNotch4;Notch2およびNotch3;Notch2およびNotch4;またはNotch3およびNotch4の4番目のEGF反復を認識する抗体)。3つのNotch受容体ファミリーメンバーの4番目のEGF反復を認識する抗体が想定される(例えば、Notch1、Notch2、およびNotch3;Notch1、Notch2、およびNotch4;またはNotch2、Notch3、およびNotch4の4番目のEGF反復を認識する抗体)。4つのNotch受容体ファミリーメンバーの4番目のEGF反復を認識する抗体が想定される(例えば、Notch1、Notch2、Notch3およびNotch4の4番目のEGF反復を認識する抗体)。

【 0 3 6 4 】

Notch1のEGF4に結合するモノクローナル抗体13M57の例示的な作製および特徴付けの説明は、全体が参照により本明細書に組み入れられる、米国特許出願公開第2008/0131434号において見られる。

【 0 3 6 5 】

実施例22

59R1で治療された腫瘍細胞におけるさらなる遺伝子発現アッセイ

異種移植片モデルの腫瘍細胞における59R1治療に応答した遺伝子発現変化が特定された。

【 0 3 6 6 】

乳房腫瘍T1、PE13、およびB51においてGene Set Enrichment Analysis(Mootha et al., 2003, Nature Genetics 34:267-73; Subramanian et al., 2005, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:15545-50)を用いて、腫瘍細胞において抗体59R1によって調節されるいくつかの経路/遺伝子セットを同定した(表9)。特に、本分析では、細胞周期遺伝子経路、myc活性化遺伝子、およびいくつかの幹細胞遺伝子セットが59R1によって下方調節される。cMycはNotch経路の直接標的であることが示されている(Weng et al., 2006, Genes Dev. 20:2096-109)。59R1によって下方調節される幹細胞遺伝子セットは、5つの異なる集団:ヒト胎児造血幹細胞(HCS)、マウス胎児および成体HSC、神経幹細胞(NSC)、ならびに胚性幹細胞(ESC)(Ivanova et al., 2002, Science 298:601-604)から得られた分子シグネチャーから得、最近述べられたコア ESC遺伝子セット(Ben-Porath et al., 2008, Nature Genetics 40:499-507)およびダウンレギュレーションによって分化を引き起こすESC自己複製遺伝子セット(Hu et al., 2009, Genes Dev. 23:837-48)からも得られた。

【 0 3 6 7 】

(表9)

名称	サイズ	FDR	説明
NGUYEN KERATO UP NOTCH	27	0.0774	マウスおよびヒトの初代ケラチノサイトにおいて活性化Notch1によって同時に調節される遺伝子-UP
CELLCYCLEPATHWAY	22	0.0798	サイクリンはサイクリン依存性キナーゼと相互作用して、進行を調節する活性型キナーゼ複合体を形成する
YU CMYC UP	28	0.0884	Myc活性化遺伝子
HSC STHSC FETAL	27	0.0885	胎仔肝臓に由来するマウス短期機能造血幹細胞(ST-HSC Shared)においてアップレギュレートされる
HSC STHSC SHARED	27	0.0907	成体骨髄の両方に由来するマウス短期機能造血幹細胞においてアップレギュレートされる
WEINBERG ESC EXP2	30	0.1001	8つのプロファイリング研究(Natu)のメタ分析による、hES細胞において特異的に過剰発現している40の遺伝子
ESC SELF RENEWAL	30	0.1087	ゲノムワイドRNAiスクリーニングによって特定された、ダウンレギュレーションによってmESC分化が引き起こされる遺伝子
BRENTANI REPAIR	33	0.1122	DNA修復に関与する癌関連遺伝子

FDR<15%

【 0 3 6 8 】

実施例23

Notch2/3抗体による癌幹細胞頻度の低下

実施例8に記載の類似の実験研究を用いて、限界希釈分析による癌幹細胞頻度の分析をPE13乳癌細胞において行った。PE13乳房腫瘍を有する動物を、対照抗体、タキソール+対照抗体、59R1、またはタキソール+59R1によって3週間治療した。3週間後に腫瘍を採取し、治療された腫瘍におけるCSC頻度を分析した。4種類の治療群それぞれから連続滴定したヒト細胞を、新たな組のマウス(n=10/細胞投与)に移植した。75日間成長させた後の腫瘍成長速度(図19A)を用いて、CSC頻度をL-calcプログラム(Stem Cell Technologies, Inc.)を用いて計算した。対照抗体で治療された腫瘍の、腫瘍を開始する細胞頻度は1:74であると求められた。タキソール単独による治療によって、CSC頻度は1:30まで増加した。対照的に、59R1による治療によって、CSC頻度は1:179まで減少し、59R1+タキソールの組み合わせ

せによって、CSC頻度は1:319まで減少した(図19B)。1個の星印は、対照抗体治療群に対する統計的に有意な差(p<0.05)を示す。2個の星印は、タキソールおよび対照抗体で治療した群に対する有意差を示す。この実験から、単一の剤として、PE13乳房腫瘍の59R1治療によってCSC頻度は低下し、タキソール治療と組み合わせた場合には、さらに劇的にCSC頻度は低下したことが分かった。対照的に、タキソール単独による治療は腫瘍量の低下に有効であったが、治療を受けた腫瘍のCSC頻度を増加させた。このことから、腫瘍を開始する細胞は、この化学療法剤の作用に対して優先的に耐性になっていることが分かる。

【0369】

腫瘍における59R1の作用およびCSC頻度に対する作用を調べることに加えて、タキソールと組み合わせた59R1治療後の遺伝子変化を研究した。59R1単独または59R1+タキソール治療による治療後にCSC頻度が減少することが以前に観察されており(かつ本明細書において説明された)PE13乳房腫瘍において、実験を行った。CSC定量のためにPE13の限界希釈分析を行った同じ実験からの腫瘍に対してマイクロアレイ分析を行った(図19)。PE13乳房腫瘍を有する動物を、59R1+タキソール、対照、およびタキソールを用いて、3週間治療した後に、マイクロアレイ分析のために採取した。タキソール治療を受けた動物の発現値と対照動物の発現値の差の平均、および59R1+タキソール治療を受けた動物の発現値とタキソール治療を受けた動物の発現値の差の平均(一群あたり3匹の動物)を計算した。人目を引くことに、遺伝子発現マイクロアレイデータにおいて、59R1とタキソールの組み合わせは、タキソール単独による治療後に観察された遺伝子変化とは反対の倍率方向で、アポトーシス、低酸素、分化、および幹細胞に関連する遺伝子に影響を及ぼし(表10)、CSC頻度に対するこれらの化合物の作用と一致することが見出された。

【0370】

(表10)

タキソール対対照		59R1 タキソール対タキソール		記号	名称
倍率	p値	倍率	p値		
10.2	6.8E-03	-4.3	2.3E-01	BMPR1B	骨形成タンパク質受容体、IB型
-2.1	4.2E-05	1.8	6.9E-05	BNIP3	BCL2/アデノウイルスE1B 19kDa相互作用タンパク質3
-21.1	1.0E-02	11.9	3.9E-04	EGLN3	egl9ホモログ3
13.4	5.9E-05	-1.8	1.2E-01	HSPB6	熱ショックタンパク質、αクリスタリン関連、B6
2.2	1.5E-02	-2.5	1.9E-03	ITGAM	インテグリン、αM
4.6	3.6E-03	-4.4	5.2E-03	LHX8	LIMホメオボックス8
-9.0	2.0E-06	6.4	1.8E-05	NDRG1	N-myc下流調節遺伝子1
6.4	6.9E-06	-2.2	7.4E-03	RARRES1	レチノイン酸受容体レスポナー1
2.6	3.5E-04	-1.7	1.1E-03	RARRES3	レチノイン酸受容体レスポナー3
4.8	3.9E-05	-2.2	1.6E-02	RBP2	レチノール結合タンパク質2、細胞
10.6	1.3E-10	-1.5	5.9E-02	XAF1	XIAP関連因子1

【0371】

このデータセットにおいて調節されるアポトーシス関連遺伝子には、BNIP3、NDRG1 HSP B6、およびXAF1が含まれる。BNIP3(Bcl-2/E1B 19kDa相互作用タンパク質)は、腫瘍の低酸素領域において発現されるBcl-2ファミリーのアポトーシス促進性メンバーである(Kothari et al., 2003, Oncogene 22:4734-44)。BNIP3は、タキソール単独によって下方調節され、併用療法によって上方調節される。このことは、59R1+タキソールがアポトーシスを促進し得ることを示唆している。この考えと一致するのは、タキソールで治療された腫瘍においてHSPB6が下方調節されるという観察である。HSPB6過剰発現は一部の生物系においてアポトーシスを防ぎ得る(Fan et al., 2005, Trends Cardiovasc. Med. 15:138-41)。NDRG1(N-myc downstream regulated gene1)は併用治療において上方調節され、p53依存性アポトーシスに必要である(Stein et al., 2004, J. Biol. Chem. 279:48930-40)。興味深いことに、NDRG1もまた結腸直腸癌転移の推定抑制因子である。この高発現は、前立腺癌および乳癌における生存改善と関連している(Shah et al., 2005, Clin. Cancer Res. 11:3296-302)。さらに、NDRG1は分化促進に関与している。NDRG1の発現は、十分に分化した膀胱癌細胞では高発現しており、低分化の腫瘍細胞では発現していないことが示されている(Angst et al., 2006, Br. J. Cancer 95:307-13)。他の幹細胞関連遺伝子、例えば、B

MPR1B、およびホメオボックスを含む遺伝子、LHX8がタキソール単独で上方調節され、次いで、タキソールと組み合わせた59R1治療によって下方調節されることも観察された。

【0372】

レチノイド代謝に関与する、いくつかの遺伝子(RARRES1、RARRES3、RBP2)は、推定幹細胞マーカーALDH1a1と機能的に類似し、タキソールによって上方調節され、次いで、タキソール+59R1治療によって下方調節された。レチノイン酸シグナル伝達は細胞分化と関連することが示されている(Appel and Eisen, 2003, Neuron 40:461-4)。まとめると、これらのデータから、59R1はPE13乳房腫瘍細胞における遺伝子発現に有意な影響を及ぼし、59R1およびタキソール併用療法による治療後に、この腫瘍において観察された癌幹細胞頻度減少の基礎となる機構の一部を解明し始める可能性があることが分かる。

10

【0373】

別の態様において、PN4膵臓腫瘍モデルを用いて、59R1治療後の癌幹細胞頻度の低下を試験した。対照抗体、抗Notch2/3 59R1、ゲムシタピン、または59R1およびゲムシタピンの組み合わせを用いて、3週間にわたって、PN4膵臓腫瘍を治療した。抗体は、10mg/kg、週2回投与し、ゲムシタピンは、50mg/kg、週2回投与した。各群からの腫瘍を採取し、処理して、単細胞懸濁液を得た。異種移植片にあるヒト腫瘍細胞を単離し、計数した。滴定した細胞(30個、90個、または210個の細胞)をNOD-SCIDマウス(一群あたりn=10)に注射した。腫瘍成長を84日目にアッセイし、腫瘍を開始する細胞頻度を腫瘍生着率(tumor take rate)から計算した。対照抗体で治療された腫瘍の、腫瘍を開始する細胞頻度は1:137であると求められた。ゲムシタピン単独による治療によってCSC頻度は1:61に増加した。対照的に、59R1による治療によってCSC頻度は1:281に減少し、59R1+ゲムシタピンの組み合わせによってCSC頻度は1:675に減少した(図19C)。1個の星印は、対照抗体治療群に対する統計的に有意な差(p<0.05)を示す。2個の星印は、ゲムシタピンおよび対照抗体で治療した群に対する有意差を示す。

20

【0374】

別の態様において、PE13乳房腫瘍モデルを用いて、59R5治療後の癌幹細胞頻度の低下を試験した。対照抗体、抗Notch2/3 59R5、タキソール、または59R5およびタキソールの組み合わせを用いて、3週間にわたって、PE13乳房腫瘍を治療した。抗体は、20mg/kg、週1回投与し、タキソールは、15mg/kg、週2回投与した。各群からの腫瘍を採取し、処理して、単細胞懸濁液を得た。異種移植片にあるヒト腫瘍細胞を単離し、計数した。滴定した細胞(50個、150個、または450個の細胞)をNOD-SCIDマウス(一群あたりn=10)に再注射した。腫瘍成長を39日目にアッセイし、腫瘍を開始する細胞頻度を腫瘍生着率から計算した。対照抗体で治療された腫瘍の、腫瘍を開始する細胞頻度は1:70であると求められた。タキソール単独による治療によってCSC頻度は1:30に増加した。対照的に、59R5による治療によってCSC頻度は1:202に減少し、59R5+タキソールの組み合わせによってCSC頻度は1:382に減少した(図19D)。1個の星印は、対照抗体治療群に対する統計的に有意な差(p<0.05)を示す。2個の星印は、タキソールおよび対照抗体で治療した群に対する有意差を示す。

30

【0375】

他の実験において観察されたように、これらの結果から、PN4膵臓腫瘍の59R1治療およびPE13乳房腫瘍の59R5治療は1種類の剤としてCSC頻度を低下させ、ゲムシタピン治療またはタキソール治療それぞれと組み合わせた場合には、さらに劇的にCSC頻度を低下させることが分かった。対照的に、タキソール単独またはゲムシタピン単独による治療は腫瘍量の低下に有効であったが、治療を受けた腫瘍のCSC頻度を増加させた。このことから、腫瘍を開始する細胞は、これらの化学療法剤の作用に対して優先的に耐性になっていることが分かる。

40

【0376】

上記の明細書において言及した全ての刊行物および特許は、参照により本明細書に組み入れられる。本発明の範囲および精神から逸脱することなく、説明した本発明の方法およびシステムの様々な変更および変形が当業者には明らかであろう。本発明を具体的な態様に関連して説明してきたが、特許請求の範囲に記載される本発明は、このような具体的な

50

態様に過度に制限されるべきではないものと理解されるはずである。実際に、説明した本発明を実施するための様式の、当業者にとって明らかな種々の変更は、以下の特許請求の範囲に入るものと意図される。

【 0 3 7 7 】

配列

ヒト抗Notch2/3抗体配列

SEQ ID NO:1: 抗Notch2/3 IgG2 59R1重鎖+シグナル配列をコードするヌクレオチド配列。
シグナル配列をコードする配列には下線を引いた。

ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTCCCTGTCCCAG
GTGCAATTGGTGGAAAGCGGCGGCCTGGTGAACCGGGCGGCAGCCTGCGTCTGAGC 10
 TGC GCGGCCTCCGGATTTACCTTTTCTTCTTCTGGTATGTCTTGGGTGCGCCAAGCCCT
 GGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGTTATCGCTTCTTCTGGTAGCAATACCTATTATGCG
 GATAGCGTGAAAGGCCGTTTTACCATTTACGTTGATAATTGAAAAACACCTGTATCTG
 CAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGCCGTGATTATTGCGCGCGTGGTATTTTT
 TTTGCTATTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCAGCCAGCACAAAGGGCCCT
 AGCGTCTTCCCTCTGGCTCCCTGCAGCAGGAGCACCAGCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGC
 TGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCGTGGAACTCAGGCGCTCTG
 ACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCAGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGC
 AGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGAT
 CACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTCGAGTGC
 CCACCGTGCC CAGCACCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCC
 AAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACGTCGCGTGGTGGACGTGAGC
 CACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC
 AAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAGCGTCCTCACC
 GTTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGC
 CTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAG
 GTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGC
 CTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCG
 GAGAACAACACTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTAC
 AGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCCTTCTCATGCTCCGTG
 ATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
 TGA

10

20

30

SEQ ID NO:16: 抗Notch2/3 59R1 IgG2重鎖+シグナル配列の推定タンパク質配列。

シグナル配列には下線を引いた。

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIA
SSGSNTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGIFFAIWGQGLTVTVSSASTKGPSV
FPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQ
TYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECPPCAPPVAGPSVFLFPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQ
PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:3: 抗Notch2/3 59R1軽鎖+シグナル配列をコードするヌクレオチド配列。

シグナル配列をコードする配列には下線を引いた。

ATGGTGTTCAGACCCAGGCTTCATTTCTCTGTTGCTCTGGATCTCTGGTGCCTACGGG
GATATCGTGTGCTGACCCAGAGCCCGGCGACCCTGAGCCTGTCTCCGGGCGAACGTGCGACC
CTGAGCTGACAGCGAGCCAGTCTGTTCTGTTCTAATTATCTGGCTTGGTACCAGCAGAAA
CCAGGTCAAGCACCGCGTCTATTAATTTATGGTGCTTCTTCTCGTGCAACTGGGGTCCCCG
GCGCGTTTTAGCGGCTCTGGATCCGGCACGGATTTTACCCTGACCATTAGCAGCCTGGAA
CCTGAAGACTTTGCGGTTTATTATTGCCAGCAGTATTCTAATTTTCCTATTACCTTTGGC
CAGGGTACGAAAGTTGAAATTAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCCG
CCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTC
TATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC
CAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTG
ACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAG
GGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAG

10

20

SEQ ID NO:18: 抗Notch2/3 59R1軽鎖+シグナル配列の推定タンパク質配列。

シグナル配列には下線を引いた。

MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIVLTSQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSNYLAWYQQKPGQAPRLLIYG
ASSRATGVPARFSGSGSGTDFLTLSISLEPEDFAVYYCQQYSNFPITFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS
DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEEKHKVY
ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:5: 59R1重鎖CDR1

SSSGMS

30

SEQ ID NO:6: 59R1重鎖CDR2

VIASSGSNTYYADSVKG

SEQ ID NO:7: 59R1重鎖CDR3

GIFFAI

SEQ ID NO:8: 59R1軽鎖CDR1

RASQSVRSNYLA

SEQ ID NO:9: 59R1軽鎖CDR2

GASSRAT

40

SEQ ID NO:10: 59R1軽鎖CDR3

QQYSNFP I

SEQ ID NO:11: 59R1 Fabの59R1軽鎖VL+シグナル配列。

シグナル配列には下線を引いた。

MKKTAIAlAVALAGFATVAQADIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSNYLAWYQQKPGQAPRLLIY
GASSRATGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQYSNFPITFGQGTKVEIKR

SEQ ID NO:12: 59R1 Fabの59R1重鎖VH+シグナル配列。

シグナル配列には下線を引いた。

MKQSTIALALLPLLFTPVTKAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSV
IASSGSNTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGIFFAIWGQGLVTVSSA

SEQ ID NO:13: 59R1 IgG抗体の59R1軽鎖VL

DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSNYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGVPARFSGSGSGTD
FTLTISSLEPEDFAVYYCQQYSNFPITFGQGTKVEIKR

10

SEQ ID NO:14: 59R1 IgG抗体の59R1重鎖VH

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYYADSVKGRFTIS
RDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGIFFAIWGQGLVTVSSA

SEQ ID NO:39: 59R1軽鎖VL+哺乳動物シグナル配列(下線)

MVLQQTQVFISLLLWISGAYGDIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSNYLAWYQQK
PGQAPRLLIYGASSRATGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQYSNFPITFG
QGTKVEIKR

20

SEQ ID NO:40: 59R1重鎖VH+哺乳動物シグナル配列(下線)

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAP
GKGLEWVSVIASSGSNTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGIF
FAIWGQGLVTVSSA

SEQ ID NO:15: 抗Notch2/3 59RGV IgG2 抗体(59R1の生殖系列異型)の重鎖+シグナル配列を
コードするヌクレオチド配列。シグナル配列をコードする配列には下線を引いた。

ATGAAGCACCTGTGGTTCCTTCTGCTGCTGGTCGCCGCTCCTAGATGGGTGCTGTCCGAG
GTGCAGCTGGTCGAGTCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCTCCCTGAGACTGTCC
TGCGCTGCCTCCGGCTTACCTTCTCCTCCTCCGGCATGTCTGGGTGCGCCAGGCTCCC
GGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGTCCGTGATCGCCTCCAGCGGCTCCAACACCTACTACGCC
GACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGACAACCTCCAAGAACACCTGTACCTG
CAGATGAACCTCCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGACTACTGCGCCAGGGGCATCTTC
TTCGCCATCTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGTCTCCTCCGCTCCACCAAGGGCCCT
TCCGTGTTCCCTCTGGCCCTTGCTCCCGGTCCACCTCCGAGTCCACCGCCGCTCTGGGC
TGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACAGTGTCTGGAACCTCTGGCGCCCTG
ACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCTCCTCCGCTGTACTCCCTGTCC
TCCGTGGTGCAGTGCCTTCCCTCCAACCTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTGGAC
CACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGACCGTGGAGCGGAAGTGTGCGTGGAGTGC
CCTCCTTGCCCTGCCCTCCTGTGGCTGGCCCTAGCGTGTTCCTGTTCCCTCCTAAGCCT
AAGGACACCCTGATGATCTCCCGACCCCTGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCC
CACGAGGACCCTGAGGTGCAGTTC AATTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCC
AAGACCAAGCCTCGGGAGGAACAGTTCAACTCCACCTTCCGGGTGGTGTCCGTGCTGACC
GTGGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGCAAAGTCTCCAACAAGGGC
CTGCCTGCCCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGACCAAGGGCCAGCCTCGCGAGCCTCAG
GTGTACACCCTGCCTCCATCCAGGGAGGAAATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGT
CTGGTGAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGTCCAACGGCCAGCCT
GAGAACAAC TACAAGACCACCCCTCCTATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTGTAC

30

40

TCCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTG
 ATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGAGCCCTGGCAAG
 TAG

SEQ ID NO:2: 抗Notch2/3 59RGV(59R1の生殖系列異型)の重鎖+シグナル配列の推定タンパク質配列。
 シグナル配列には下線を引いた。

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIA
SSGSNTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGIFFAIWQGTLVTVSSASTKGPSV
 FPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQ
 TYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDP
 EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPI EKTISKTKGQ
 PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVD
 KSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

SEQ ID NO:17: 抗Notch2/3 59RGV抗体(59R1の生殖系列異型)+シグナル配列のヌクレオチド配列。
 シグナル配列をコードする配列には下線を引いた。

ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGCCTACGGC
GAGATCGTGCTGACCCAGTCCCCTGCCACACTGAGCCTGAGCCCTGGCGAGAGAGCCACC
 CTGAGCTGCAGGCGGGCCTCCAGTCCGTGCGGTCCAACCTGGCTTGGTATCAGCAG
 AAACCCGGACAGGCCCTCGGCTGCTGATCTACGGCGCCTCCTCCCGGGCTACCGGCATC
 CCTGCCCGGTTCTCCGGCTCCGGCAGCGGCACCGACTTACCCTGACCATCTCCTCCCTG
 GAGCCTGAGGACTTCGCCGTGTA TACTGCCAGCAGTACTCCAACCTCCCTATCACCTTC
 GGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAGCGGACCGTGGCCGCTCCTTCCGTGTTTCATCTTC
 CCCCTTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTGCCTGCTGAACAAC
 TTCTACCCTCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAAC
 TCCCAGGAATCCGTCACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCCTCCACC
 CTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCAC
 CAGGGCCTGTCCAGCCCTGTGACCAAGTCCTTCAACCGGGGCGAGTGCTAG

20

SEQ ID NO:4: 抗Notch2/3 59RGV抗体(59R1の生殖系列異型)の軽鎖+シグナル配列の推定タンパク質配列。
 シグナル配列には下線を引いた。

MVLQQTQVFISL LLLWISGAYGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRRASQSVRSNYLAWYQQKPGQAPRLLIY
GASSRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQYSNFPITFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP
 SDEQLKSGTASVVC LLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV
 YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

30

SEQ ID NO:19: 59RGV抗体(59R1の生殖系列異型)の59R1軽鎖VL

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRRASQSVRSNYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPARFSGSGSGT
 DFTLTISSLEPEDFAVYYCQQYSNFPITFGQGTKVEIKR

SEQ ID NO:20: 59RGV抗体(59R1の生殖系列異型)の59R1重鎖VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYYADSVKGRFTISR
 RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGIFFAIWQGTLVTVSSA

SEQ ID NO:22 (別の重鎖CDR3)

SIFYPT

40

SEQ ID NO:23 (別の重鎖CDR3)

SSFFAS

SEQ ID NO:24 (別の重鎖CDR3)

SSFYAS

SEQ ID NO:25 (別の重鎖CDR3)
SSFFAT

SEQ ID NO:26 (別の重鎖CDR3)
SIFYPS

SEQ ID NO:27(別の重鎖CDR3)
SSFFAN

SEQ ID NO:30 (重鎖CDR3コンセンサス配列):
(G/S) (I/S) F (F/Y) (A/P) (I/T/S/N)

10

SEQ ID NO:47: 59R5軽鎖ヌクレオチド配列(シグナル配列なし)

GACATCGTGTGCTGACCCAGTCCCCCGCCACACTGTCCCTGTCTCCCGGCGAGAGAGCCACC
CTGAGCTGTCGGGCCCTCCAGTCCGTGCGGTCCAACCTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAG
CCCGGCCAGGCCCTCGGCTGCTGATCTACGGCGCCTCCTCCAGGGCTACCGGCGTGCTT
GCCCGGTTCTCCGGCTCCGGCTCTGGCACCAGACTTACCCTGACCATCTCCAGCCTGGAG
CCTGAGGACTTCGCCGTGTAATACTGCCAGCAGTACTCCAACCTCCCTATCACCTTCGGC
CAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAGCGGACCGTGGCCGCTCCTTCCGTGTTTCATCTTCCCC
CCTTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACCTTC
TACCCTCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCC
CAGGAGTCCGTACCGAGCAGGACTCCAAGGACTCTACCTACTCCCTGTCTCCACCCTG
ACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAG
GGCCTGTCTCTCCCGTGACCAAGTCTTCAACCGGGGCGAGTGC

20

SEQ ID NO:48: 59R5重鎖ヌクレオチド配列(シグナル配列なし)

GAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCTCCCTGAGACTG
TCCTGCGCCGCTTCCGGCTTACCTTCTCCTCCAGCGGCATGTCTGGGTGCGCCAGGCA
CCTGGCAAAGGACTCGAGTGGGTGTCCGTGATCGCCTCCTCCGGCTCCAACACCTACTAC
GCCGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGGACAACCTCCAAGAACACCCTGTAC
CTGCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTAATACTGCGCCCGGTCCATC
TTCTACACCACCTGGGGCCAGGGCACCTGGTACCCTGTCTCCTCCGCCTCCACCAAGGGC
CCCTCCGTGTTCCCTCTGGCCCTTGCTCCCGGTCCACCTCTGAGTCTACCGCCGCTCTG
GGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACCCTGTCTTGGAACTCTGGCGCC
CTGACCTCTGGCGTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCTCCGGCCTGTACTCCCTG
TCCTCCGTGGTACCCTGCCTTCCCTCCAACCTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTG
GACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGACCGTGGAGCGGAAGTGTCTGCGTGGAG
TGCCCTCCTTGTCTGCTCCTCCTGTGGCTGGCCCTTCTGTGTTCCCTCCTAAG
CCTAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTG
TCCCACGAGGACCCTGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCCTGGAGGTGCACAAC
GCCAAGACCAAGCCTCGGGAGGAACAGTTCAACTCCACCTTCCGGGTGGTGTCTGTGCTG
ACCGTGGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATAACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAG
GGCCTGCCTGCCCCTATCGAAAAGACCATCTCTAAGACCAAGGGCCAGCCTCGCGAGCCT
CAGGTCTACACCCTGCCTCCTAGCCGGGAGGAAATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACC
TGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGTCTAACGGCCAG
CCTGAGAACAACCTACAAGACCACCCTCCTATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCCTG
TACTCCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCC
GTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGTCTCCTGGC
AAG

30

SEQ ID NO:49: 59R5重鎖

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYY
ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRRAEDTAVYYCARSIFYTTWGQGLVTVSSASTKG
PSVFPPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPK

40

PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVL
TVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:50: 59R5重鎖可変領域
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYY
ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSIFYTTWGQGLVTVSSAST

SEQ ID NO:51: 59R5重鎖CDR3
SIFYTT

SEQ ID NO:52: 異型59R1重鎖可変領域
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYYADSVKGRFTISR
DN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSIFYPYTWGQGLVTVSSA

SEQ ID NO:53: 異型59R1重鎖可変領域
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYYADSVKGRFTISR
DN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSSFFASWGQGLVTVSSA

SEQ ID NO:54: 異型59R1重鎖可変領域
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYYADSVKGRFTISR
DN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSSFYASWGQGLVTVSSA

SEQ ID NO:55: 異型59R1重鎖可変領域
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYYADSVKGRFTISR
DN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSSFFATWGQGLVTVSSA

SEQ ID NO:56: 異型59R1重鎖可変領域
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYYADSVKGRFTISR
DN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSIFYPSWGQGLVTVSSA

SEQ ID NO:57: 異型59R1重鎖可変領域
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYYADSVKGRFTISR
DN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSSFFANWGQGLVTVSSA

SEQ ID NO:58: 59R5重鎖可変領域ヌクレオチド配列(シグナル配列なし)

GAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCTCCCTGAGACTG
TCCTGCGCCGCTTCCGGCTTACCTTCTCCTCCAGCGGCATGTCTGGGTGCGCCAGGCA
CCTGGCAAAGGACTCGAGTGGGTGTCCGTGATCGCTCCTCCGGCTCCAACACCTACTAC
GCCGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGACAACCTCCAAGAACACCCTGTAC
CTGCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCCGGTCCATC
TTCTACACCACCTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGTCTCCTCCGCTCCACC

SEQ ID NO:59: 59R1軽鎖可変領域ヌクレオチド配列(シグナル配列なし)

GATATCGTGCTGACCCAGAGCCCGGCGACCTGAGCCTGTCTCCGGCGAACGTGCGACC
CTGAGCTGCAGAGCGAGCCAGTCTGTTTCGTTCTAATTATCTGGCTTGGTACCAGCAGAAA
CCAGGTCAAGCACCGCTCTATTAATTTATGGTGCTTCTTCTCGTGCAACTGGGGTCCCCG
GCGGTTTTAGCGGCTCTGGATCCGGCACGGATTTTACCCTGACCATTAGCAGCCTGGAA
CCTGAAGACTTTGCGGTTTATTATTGCCAGCAGTATTCTAATTTTCTATTACCTTTGGC
CAGGGTACGAAAGTTGAAATTAACGT

SEQ ID NO:60: 59R1重鎖可変領域ヌクレオチド配列(シグナル配列なし)
CAGGTGCAATTGGTGGAAGCGGCGGCGCCTGGTGCAACCGGGCGGCAGCCTGCGTCTG

10

20

30

40

AGCTGCGCGCCTCCGGATTTACCTTTTCTTCTTCTGGTATGTCTTGGGTGCGCCAAGCC
CCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGTTATCGCTTCTTCTGGTAGCAATACCTATTAT
GCGGATAGCGTGAAAGGCCGTTTTACCATTTACCGTGATAATTCGAAAAACACCCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGCCGTGATTATTGCGCGCGTGGTATT
TTTTTTGCTATTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCAGCC

ヒトNotch関連配列:

SEQ ID NO:21: Notch2 (EGF1-12)Fc融合タンパク質アミノ酸配列

MPALRPALLWALLALWLCCAAPAHALQCRDGYEPCVNEGMCVTYHNGTG YCKCPEGFLGEYCQHRDPCEKN
RCQNGGTCVAQAMLGKATCRCASGFTGEDCQYSTSHPCFVSRPCLNNGTCHMLSRDTYECTCQVGF
TGKEC QWTDACL SHPCANGSTCTTVANQF SCKCLTGFTGQKCE TDVNECDI PGHCQHGGTCLNLP
GSIYQCQCPQGF TGQYCD SLYVPCAPSPCVNNGGTCRQTGDFTFECNCLPGFEGSTCERNIDDC
PNHRCQNGGV CVDGVNTYNC RCPPQWTGQFCTEDVDECLLPNACQNGGTCANRNGGYGCV
CVNGWSGDDCSENIDDCAFASCTPGSTCID RVASFSCMCPEGKAGLLCHLDDACISNP
CHKGALCDTNPLNGQYICTCPQGYKGADCTEDVDECAMANSNP CEHAGKCVNTDGA
FHCECLKGYAGPRCEMDINECHSDPCQNDATCLDKIGGFTCLCMPGFKGVHCELGRAD
KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

SEQ ID NO:28 (ヒトNotch2のEGF10内にある59R1結合部位の潜在的な成分): HKGAL

SEQ ID NO:29 (ヒトNotch2 EGF10内にある59R1結合部位の潜在的な成分に対応する、
ヒトNotch3 EGF9内の部位): HEDAI

20

SEQ ID NO:45: hNotch1

アミノ酸1-1732位 細胞外ドメイン、(下線)

アミノ酸372-414位 EGF反復10(二重下線およびイタリック体)

MPPLLAPLLCLALLPALAARGPRCSQPGETCLNNGKCEAANGTEACVCGGAFVGPRCQDPNPCLSTPCKNA
GTCHVVDRRGVADYACSCALGFSGPLCLTPLDNACLTNPCRNGGTCDLLTLTEYKCRCPPGWSGKSCQQAD
PCASNPCANGGQCLPFEASYICHCPPSFHGPTCRQDVNECGQKPLCRHGGTCHNEVGSYRCVCRATHTGP
NCERPYPVPCSPSPCQNGGTCRPTGDVTHEACLPGF TGQNCENIDDCPGNCKNGGACVDGVNTYNCRCP
PEWTGQYCTEDVDECQLMPNACQNGGTC HNTHGGYNCV CVNGWTGEDCSENIDDCASAACFHGATCHDRVA
SFYCECPHGRTGLLCHLNDACISNPCNEGSNCDTNPVNGKAICTCPSGYTGPACSQDVDECSLGANPCEHA
GKCINTLGSFECQLQGYTGPRCEIDVNECVSNPCQNDATCLDQIGEFQICMPGYEGVHCEVNTDECASS
PCLHNGRCLDKINEFQCECPTGFTGHL CQYDVDECASTPCKNGAKCLDGPNTYTCVCTEGYTGTHCEVDID
ECDPDPCHYGSKKDGVATFTCLCRPGYTGHHCETNINECSSQPCRHGGTCQDRDNAYLCFCLKGTTGPNCE
INLDDCASSPCDSGTCLDKIDGYECACEPGYTGSMCNINIDECAGNPCHNGGTCEDGINGFTCRCPEGYHD
PTCLSEVNECN SNP CVHGACRDSLNGYKCD CDPGWSGTNCDINNNECESNPCVNGGTCKDMTSGYVCTRE
GFSGPNCQTNINECASNPCLNQGT CIDDVAGYKCNCLLPYTGATCEVVLAPCAPSPCRNGGECRQSEEDYES
FSCVCPTGWQQTCEVDINECVLSPCRHGASCQNT HGGYRCHCQAGYSGRNCETDIDDCRPNPCHNGGSCT
DGINTAFCDCLPGFRGTFCEEDINECASDPCRNGANCTDCVDSYTCCTCPAGFSGIHCENNTPDCTESSCFN
GGTCVDGINSFTCLCPPGFTGSYQHDVNECDSQPCLHGGTCQDGCYSYRCTCPQGYTGPNCQNLVHWCDS
SPCKNGGKCWQHTHTQYRCECPSGWTGLYCDVPSVSCVAAQRQGV DVARLCQHGGLCVDAGNTHHCRQAG
YTGSYCEDLVDECS P PCQNGATCTDYLG GYSCKCVAGYHGVCNSEEIDECLSHPCQNGGTCLDLPNTYK
SCPRGTQGVHCEINVDDCNPPVDPVSRSPKCFNNGTCVDQVGGYSCTCPPGFVGERCEGDVNECLSNPCDA
RGTQNCVQVRVNDFHCECRAGHTGRRCESVINGCKGKPKCKNGGTCAVASNTARGFICKCPAGFEGATCENDA
RTCGLRCLNNGT C ISGPRSP T CLCLGPFTGPECQFPASSPCLGGNPCYNQGTCEPTSESPFYRCLCPAKF
NGLLCHILDYSGGGAGRDI PPPLIEEACELPECQEDAGNKVCSLQCNHACGWDGDCSLNFNDFWKNCT
QSLQCWKYFSDGHCD SQNSAGCLFDGFDQRAEGQCNP LYDQYCKDHFSDGHCDQGCNSAECEWDGLDCA
EHVPERLAAGTLVVVVLMPPEQLRNSSFHFLRELSRVLHTNVVFKRDAHGQOMIFPYYGREEELRKHPIKR
AAEGWAAPDALLGQVKASLLPGGSEGGRRRRELDPMDVRSIVYLEIDNRQCVQASSQCFQSATDVAAFLG

30

40

ALASLGSLNIPYKIEAVQSETVEPPPPAQLHFMVAAAAFVLLFFVCGVLLSRKRRRQHGQLWFPPEGFKV
 SEASKKKRREPLGEDSVGLKPLKNASDGMDDNQNNEWGDEDLETKKFRFEEPVVLPDLDQTDHRQWTQQ
 HLDAADLRMSAMAPTTPQGEVDADCMDVNVRGPDGFTPLMIASCSGGLETGNSEEEEDAPAVISDFIYQG
 ASLHNQTDRTGETALHLAARYSRSDAAKRLLEASADANIQDNMGRTPHAAVSADAQGVFQILIRNRATDL
 DARMHDGTTPLILAAARLAVEGMLEDLINSHADVNAVDDLGKSALHWAAAVNNVDAAVVLLKNGANKDMQNN
 REETPLFLAAREGSYETAKVLLDHFANRDI TDHMDRLPRDIAQERMHHDIVRLLDEYNLVRSPQLHGAPLG
 GTPTLSPPLCSPNGYLGSLKPGVQGKKVRKPKSSKGLACGSKEAKDLKARRKKSQDGKGLDSSGMLSPVD
 SLESPHGYLSDVASPPLLSPPFQQSPSVPLNHLPGMPDTHLIGHLNVAAPPEMAALGGGRLAFETGPPR
 LSHLPVASGTSTVLGSSSGGALNFTVGGSTSLNGQCEWLSRLQSGMVPNQYNPLRGSVAPGPLSTQAPSLQ
 HGMVGPLHSSLAASALSQMSYQGLPSTRLATQPHLVQTOQVQPONLQMQQONLQPANIQQQQSLQPPPPP
 PPHLGVSSAASGHLGRSFLSGEPSQADVQPLGPSSLAVHTILPQESPALPTSLPSSLVPPVTAQAQFLTPP
 SQHSYSSPVDNTPSHQLQVPEHPFLTPSPESPQWSSSSPHSNVSDWSEGVSSPPTSMQSQIARIPEAFK

10

SEQ ID NO:31: ヒトNotch2

アミノ酸1-1677位:細胞外ドメイン(下線)

アミノ酸375-417位:EGF反復10(二重下線およびイタリック体)

MPALRPALLWALLALWLCCAAPAHALQCRDGYEPCVNEGMCVTYHNGTGYCKCEGFLGEYCQHRDPCEKN
RCQNGGTCVAQAMLGKATCRCASGFTGEDCQYSTSHPCFVSRPCLNGGTCHMLSRDTYEECTQVGF
QWTDACLSHPCANGSTCTTVANQFSKCLTGFTGQKCETDVNECDIPGHCQHGGTCLNLPGSYQCQCPQGF
TGOYCDSLYVPCAPSPCVNGGTCRQTGDFTECNCLPGFEGSTCERNIDDCPNHRCQNGGVCVDG
VNTYNCRCPPQWTGQFCTEDVDECLLQPNACQNGGTCANRNGGYGCVCVNGWSGDDCSENIDDCAFASCT
PGSTCIDRVASFSCMCPEGKAGLLCHLDDACISNPCHKGALCDTNPLNGOYICTCPOGYK
GADCTEDVDECAMANSNPCEHAGKCVNTDGAFHCECLKGYAGPRCEMDINECHSDPCQNDATCLDKIGGFTCLCMPGF
KGVHCELEINECQSNPCVNNQCVDKVNRFQCLCPGFTG
PVCQIDIDDCSSTPCLNGAKCIDHPNGYECQCATGFTG
VLCEENIDNCDPDPCHHGQCQDGDSYTCINPGYMGAICSDQIDECYSSPCLNDGRCIDL
VNGYQCNCQPGTSGVNCEINFDDCASNPCIHGICMDGINRYSVCVSPGFTG
QRCNIDIDECASNPCRKGATCINGVNGFR
CICPEGPHHPSCYSQVNECLSNPCIHGNCTGGLSGYKCLCDAGWVG
INCEVDKNECLSNPCQNGGTCDNLVNGYRCTCKKGF
KGYNCQVNIDECASNPCLNQGTCFDDISGYTCHCVLPYT
GKNCQTVLAPCSPNPCENAAVCKESPNFESYTCLCAPGWQQRCTID
IDECISKPCMNHGLCHNTQGSYMCECPPGFSGMDCEEDIDDCLANPCQNG
GSCMDGVNTFSCLCPGFTGDKCQTDMNECLSEPCKNGGTCSDYVNSYTCKCQAGFD
GVHCENNINECTESSCFNGGTCVDGINSFSCLCPVGFTGSFCLHEINECSSHPCLNEGTCVDGL
GTYRCSCPLGYTGKNCQTLVNLCSRSPCKNKGTCVQKKAESQCLCP
SGWAGAYCDVPNVSCDIAASRRGVLVEHLCQHSGVCINAGNTHY
CQCPLGYTGSYCEEQLDECASNPCQHGATCSDF
IGGYRCECVPGYQGVNCEYEVDECQNQPCQNGGTCIDL
VNHFKCSCPPGTRGLLCEENIDDCARGPHCLNGGQ
CMDRIGGYSCRCLPGFAGERCEGDINECLSNPCS
SEGSLDCIQLTNDYLCVCRSAFTGRHCET
FVDVCPQMPCLNGGTCAVASNMPDGFICRCPPGF
SGARCQSSCGQVKCRKGEQCVHTASGPRCF
SPRDCESGCASSPCQHGGSCHPQRQPPY
SCQCAPPFSGSRCELYTAP
PSTPPATCLSQYCADKARDGVCDEACNSHACQWDG
GDCSLTMENPWANCSSPLPCWDYINNQC
DELCNTVECLFDNFECQGN
SKTKYDKYCADHFKDNHCDQGCN
SEECGWDGLDCAADQ
PENLAEGTLVIVLMPPEQL
LQDARSFLRALGTL
LHTNLRIKRDSQ
GELMVYPY
YGEKSAAMKKQRM
TRSLPGEQE
QEVAGSKV
FLEIDNRQCV
QDS
DHCFKNTDAAAALLASHAIQ
GTLSYPLSVVSESLT
PERTQLLYLLAVAVVILFI
LLGVIMAKRKR
KHGS
LWLP
PEGFTLRRDASNHKRE
VPVQDAVGLK
NLSVQVSEANLIG
GTGTSEHWV
DDEGPQPKK
VKA
ED
EA
LLSEEDDPIDRRPWTQ
QHLEAADIRRTPSLALT
PPQAEQEVDVLDV
NVRGPDGCTPLMLASLR
GGSSDLSD
EDEDAEDSSANIITDLVYQ
ASLQAQTDRTGEMALHLAARYSR
ADAAKRLLDAGADANAQDNMGR
CPLHAA
VAADAQGVFQILIRNRVTDLD
ARMNDGTTPLILAAARLAVEGM
VAELINCQADVNAVDDH
GKSALHWAAAVN
NVEATLLLLKNGANRDMQDNKEET
PLFLAAREGSYEA
AKILLDHFANRDI
TDHMDRLPRDVARDRMHHDIV
RLLDEYNVTPSPPGTVLTSALS
PVICGPNRSF
LSLKH
TPMGKKSRRPSAKST
MPTSLPNLAKEAKDAK
GS
R
RKKS
LS
SEK
VQ
LESSVTLSPVDSLES
PHTYVSDTTSSPMITSPGILQAS
PNMLATAAPPAPVHAQHALSF
SNLHEMQPLAHGASTVLP
SVS
QLLSHHHIVSPGSGSAGSL
SRLHPVPVPADWMNRMEVNETQYNEM
FGMVL
APAEGTHPGIAPQSRPPEGKHIT
TPREPLPIVTFQLIPKGSIAQ
PAGAPQ
QSTCPPAVAGPLPTMYQIP
EMARLPSVAFPTAMPQODGQVAQTIL
PAYHFPASV
GYPTPPSQHSYASSNA
ERTPSHSGHLQGEHPY
LTPSPESPQWSSSSPHSASDWS
DVTTSP
PGGAGGGQ
RGP
GTHMSEPPHNNMQVYA

20

30

40

SEQ ID NO:32: ヒトNotch3

アミノ酸1-1640位:細胞外ドメイン(下線)

アミノ酸351-393位:EGF反復9(二重下線およびイタリック体)

MGPGARGRRRRRRPMSPPPPPPVVRALPLLLLLLAGPGAAAPPCLDGSPCANGGRCTQLPSREAACLCPPGW
VGERCQLEDPCSHSGPCAGRGVCQSSVVAGTARFSCRCPRGFRGPDCLPDPCLSSPCAHGARCSVGPDGRF
LCSCPPGYQGRSCRSDVDECRVGEPCRHHGGTCLNTPGSFRCQCPAGYTGPLCENPAVPCAPSPCRNGGTCR
QSGDLTYDCACLPGFEGQNCENVVDDCPGHRCLNNGTCTVDGVNTYNCQCPPEWTGQFCTEDVDECQLQPN
CHNGGTCFNLTGGHSCVVCVNGWTGESCSQNIDDCATAVCFHGATCHDRVASFYCACPMGKTGLLCHLDDAC
VSNPCHEDAICTNPNVNGRAICTCPPGFTGGACDQDVDECSIGANPCEHLGRCVNTQGSFLCQCGRGYTG
RCETDVNECLSGPCRNOATCLDRIGQFTICIMAGFTGTYCEVDIDECQSSPCVNGGVCKDRVNGFSCTCPS
GFSGSTCQLDVDECASTPCRNGAKCVDQPDGYECCRAEGFEGTLCDRNVDDCSPDPCHHGRCVDGIASFSC
ACAPGYTGTRCESQVDECRSQPCRHHGGKCLDLVDKYLRCPSGTTGVNCEVNIDDCASNPTFGVCRDGIN
RYDVCVQPGFTGPLCNVEINECASSPCGEGGSCVDGENGFRCLCPPGSLPPLCLPPSHPCAHEPCSHGICY
DAPGGFRVCPEPGWSGPRCSQSLARDACESQPCRAGGTCSSDGMGFHCTCPPGVQGRQCELLSPCTPNPCE
HGGRCESAPGQLPVCSCPQGWQGPCQQDVDEECAGPAPCGPHGICTNLAGSFSCTCHGGYTGPSCDQDIND
CDPNPCLNGGSCQDGVGSFSCSCLPGFAGPRCARDVDECLSNPCGPGTCTDHVASFTCTCPPGYGGFHCEQ
DLPDCSPSSCFNGGTCVDGVNSFSLCRPGYTGAHCQHEADPCLSRPCLHGGVCSAAHPGFRCTCLESFTG
PQCOTLVDWCSRQPCQNGGRCVQTGAYCLCPPGWSGRLCDIRSLPCREAAAQIGVRLEQLCQAGGQCVDED
SSHVCVPEGRTGSHCEQEVDPCLAQPCQHGCTCRGYMGGYMCCLPGYNGDNCEDDVDECASQPCQHGGS
CIDLVARYLCSPPGTLGVLCINEDDCGPGPPLDSGPRCLHNGTCTVDLVGGFRCTCPPGYTGLRCEADIN
ECRSGACHAAHTRDCLQDPGGGFRCLCHAGFSGPRCQTVLSPCESQPCQHGQCRPSPGPGGGLTFTCHCA
QPFWGPCRERVARSRELQCPVGVPCQQTTPRGPRCACPPGLSGPSCRSPGSPGASNASCAAAPCLHGGG
CRPAPLAPFFRCACAQGWTPRCEAPAAAPEVSEEPRCPRAACQAKRGDQRCDRECNSPGCGWDGGDCSLS
VGDPWRQCEALQCWRLFNNRCDPACSSPACLYDNFDCHAGGRERTCNPVYEKYCADHFADGRCDQGCNTE
ECCWDGLDCASEVPALLARGVLVLTVLLPPEELLRSSADFLQRLSAILRTSLRFLDAHGQAMVFPYHRPS
PGSEPRARRELAPEVIGSVVMLEIDNRLCLQSPENDHCFDAQSAADYLGALSAVERLDFPYPLRDVRGEP
LEPPEPSVPLLPLLAVAGVLLLVILVLGVMVARRKREHSTLWFPEGFSLHKDVASGHKGRREPVGQDALGM
KNMAKGESLMGEVATDWMDETEPEAKRLKVEEPMGAEAEAVDCRQWTQHHLVAADIRVAPAMALTPPQDA
DADGMDVNVVRGPDGFTPLMLASFCCGALEPMPTEEDEADTSASISDLICQGAQLGARTDRGTETALHLA
ARYARADAARKRLLDAGADTNAQDHSGRTPHHTAVTADAQGVFQILIRNRSTDLDARMADGSTALILAARLA
VEGMVEELIASHADVNAVDELGKSALHWAANNVEATLALLKNGANKMDQDSKEETPLFLAAREGSYEA
KLKLDHFANREITDHLDRLPDVAQERLHQDIVRLLDQPSGPRSPPGPHGLGPLLCPGAFPLPGLKAAQSG
SKKSRPPPGKAGLGPQGRGRGKTLTACPGPLADSSVTLSPVDSLSPRPFGGPPASPGGFPLEGYPYAAA
TATAVSLAQLGGPGRAGLGRQPPGGCVLSLGLLNPVAVPLDWARLPPPAPPGPSFLLPLAPGPQLLNPGTP
VSPQERPPPYLAVPGHGEEYPVAGAHSSPPKARFLRVPSEHPYLTSPSPESPEHWASPSPPSLSDWSESTPS
PATATGAMATTTGALPAQPLPLSVPSLSLAQAQTQLGPQPEVTPKRQVLA

10

20

30

SEQ ID NO:46: hNotch4

アミノ酸1-1444位 細胞外ドメイン(下線)

アミノ酸392-434位 EGF反復10(二重下線およびイタリック体)

MQPPSLLLLLLLLLLLLLVCVSVVRPRGLLCSGFPEPCANGGTCLSLSLGQGTQCQAPGFLGETCQFPDPCQNA
QLCQNGGSCQALLPAPLGLPSSPSPLTPSFLCTCLPGFTGERCQAKLEDPCPPSFCSKRGRCHIQASGRPQ
CSCMPGWTGEQCQLRDFCSANPCVNGGVCLATYPQIQCHCPPGFEGHACERDVNECFQDPGPCPKGTSCHN
TLGSFQCLCPVQGEPRCEL RAGPCPPRGCSNGGTCQLMPEKDSTFHLCLCPPGFIGPDCEVNPDCVSHQ
CQNGGTCQDGLDITYTCLCPETWTGWDCSEVDDECETQGPPhCRNGGTCQNSAGSFHCVCVSGWGGTSCEN
LDDCIAATCAPGSTCIDRVGSFSLCPPGRTGLLCHLEDMLCSQPCHGDAQCSTNPLTGSTLCLCQPGYSG
PTCHQDLDECLMAQQGSPCEHGGSCLNTPGSFNCLCPPGYTGSRCADHNECLSQPCHPGSTCLDLLATF
HCLCPPGLEQLCEVETNECASAPCLNHADCHDLLNGFQICLPGFSGTRCEEDIDECRSSPCANGGQCQD
QPGAFHCKCLPGFEGPRCQTEVDECLSDPCVVGASCLDLPGAFFCLCPSGFTGQLCEVPLCAPNLCQPKQI
CKDQKDKANCLCPDGSFGCAPPEDNCTCHHGHCCQRSSCVCDVGTGPECEAELGGCISAPCAHGGTCYPQP
SGYNCTCPTGYTGPTCSEEMTACHSGPCLNNGGSCNPSPGGYCTCPPSHTGPPCQOTSTDYCVSAPCFNGGT
CVNRPGTFSCLCAMGFQGRCEGKLRPSCADSPCRNRATCQDSPQGPRLCPTGYTGGSCQTLMDLCAQKP
CPRNSHCLQTGPSFHCLCLQGWTPGLCNLPLSSCQKAALSQGIDVSSLCHNGGLCVDSGSPSYFCHCPPGFQ
GSLCQDHVNPCESRPCQNGATCMAQPSGYLCCAPGYDQNCSEKELDACQSQPCHNHGTCTPKPGGFHCA

40

PPGFVGLRCEGDVDECLDQPCHTGTAAACHSLANAFYCQCLPGHTGQWCEVEIDPCHSQPCFHGGTCEATA
 GSPLGFIHCHPKGFEGPTCSHRAPSCGFHHCHHGGLCLPSPKPGFPPRCACLSGYGGPDCLTPPAPKGC
 PSPCLYNGSCSETTGLGGPGFRCSPPHSSPGPRCQKPGAKGCEGRSGDGACDAGCSGPGGNWDGGDCSLGV
 PDPWKGCPSHSRCWLLFRDQCHPQCDSEELFDGYDCETPPACTPAYDQYCHDFHNGHCEKGCNTAECG
 WGGDCRPEGDPEWGPSLALLVLSPPALDQQLFALARVLSLTLRVGLWVRKDRDGRDMVYPYPGARAE
 KGGTRDPTYQERAAPQTQPLGKETDLSLGSAGFVVMGVDLRSCGPDHPASRCPWDPGLLLRFLAAMA
 VGLLEPLLPGLLAVPHAGTAPPANQLPWPVLCSPVAGVILLALGALLVLQLIRRRRREHGALWLP
 PGFTRRPRTQSAPHRRRPPLGEDSIGLKLKPKAEVDEEDGVVMCSGPEEGEEVQAEETGPPSTCQLWSLSGGCGALP
 QAAMLTTPQESEMEAPDLDRGPDGVTPLMSAVCCGEVQSGTFQGAWLGCPEPWEPLLDGGAC
 PQAHTVGTGETPLHLAARFSRPTAARRLLEAGANPNQPDRAGRTPHAAVAADAREVCQLLLRSRQTA
 VDARTEDGTPMLAARLAVEDLVEELIAAQADVARDKWGKTALHWAAAVNNARAARSLQAGADKDAQDNREQT
 PLFLAAREGAVEVAQLLLGLGAARELRDQAGLAPADVAHQRNHWDLTLLEGAGPPEARHKATPGREAGPF
 PRARTVSVSVPPHGGGALPRCRTLSAGAGPRGGACLQARTWSVDLAARGGAYSHCRSLSGVGAGGGPT
 PRGRFSAAGMRGPRNPAIMRGRYGAAGRGRVSTDDWPCDWVALGACGSASNIPIPPCLTPSPERGS
 PQLDCGPPALQEMPINQGGEGKK

10

SEQ ID NO:33: ヒトNotch2 EGF1-12をコードするポリヌクレオチド配列

ATGCCCCGCCCTGCGCCCCGCTCTGCTGTGGGCGCTGCTGGCGCTCTGGCTGTGCTGCGCG
 GCCCCCCGCGCATGCATTGCAGTGTGAGATGGCTATGAACCCTGTGTAAATGAAGGAATG
 TGTGTTACCTACCACAATGGCACAGGATACTGCAAATGTCCAGAAGGCTTCTTGGGGGAA
 TATTGTCAACATCGAGACCCCTGTGAGAAGAACCCTGCCAGAATGGTGGGACTTGTGTG
 GCCCAGGCCATGCTGGGGAAAGCCACGTGCCGATGTGCCTCAGGGTTTACAGGAGAGGAC
 TGCCAGTACTCAACATCTCATCCATGCTTTGTGTCTCGACCCTGCCTGAATGGCGGCACA
 TGCCATATGCTCAGCCGGGATACCTATGAGTGCACCTGTCAAGTCGGGTTTACAGGTAAG
 GAGTGCCAATGGACGGATGCCTGCCTGTCTCATCCCTGTGCAAATGGAAGTACCTGTACC
 ACTGTGGCCAACCAGTTCTCCTGCAAATGCCTCACAGGCTTACAGGGCAGAAATGTGAG
 ACTGATGTCAATGAGTGTGACATTCCAGGACACTGCCAGCATGGTGGCACCTGCCTCAAC
 CTGCCTGGTTCTTACCAGTGCCAGTGCCCTCAGGGCTTACAGGCCAGTACTGTGACAGC
 CTGTATGTGCCCTGTGCACCCTCACCTTGTGTCAATGGAGGCACCTGTCCGCAGACTGGT
 GACTTCACTTTTGTGAGTCAACTGCCTTCCAGGTTTGAAGGGAGCACCTGTGAGAGGAAT
 ATTGATGACTGCCCTAACCACAGGTGTGAGAATGGAGGGGTTTGTGTGGATGGGGTCAAC
 ACTTACAACCTGCCGCTGTCCCCACAATGGACAGGACAGTTCTGCACAGAGGATGTGGAT
 GAATGCCTGCTGCAGCCCAATGCCTGTCAAATGGGGGCACCTGTGCCAACCGCAATGGA
 GGCTATGGCTGTGTATGTGTCAACGGCTGGAGTGGAGATGACTGCAGTGAGAACATTGAT
 GATTGTGCCTTCGCCTCCTGTACTCCAGGCTCCACCTGCATCGACCCTGTGGCCTCCTTC
 TCTTGCATGTGCCAGAGGGGAAGGCAGGTCTCCTGTGTGATCTGGATGATGCATGCATC
 AGCAATCCTTGCCACAAGGGGGCACTGTGTGACACCAACCCCTAAATGGGCAATATATT
 TGCACCTGCCACAAGGCTACAAGGGGCTGACTGCACAGAAGATGTGGATGAATGTGCC
 ATGGCCAATAGCAATCCTTGTGAGCATGCAGGAAAATGTGTGAACACGGATGGCGCCTTC
 CACTGTGAGTGTCTGAAGGTTATGCAGGACCTCGTTGTGAGATGGACATCAATGAGTGC
 CATTGAGACCCCTGCCAGAATGATGCTACCTGTCTGGATAAGATTGGAGGCTTACATGT
 CTGTGCATGCCAGGTTTCAAAGGTGTGCATTGTGAATTA

20

30

SEQ ID NO:34: ヒトNotch2 EGF1-12ポリペプチド配列

MPALRPALLWALLLWLLCAAPAHALQCRDGYEPCVNEGMCVITYHNGTGYCKCPEGFLGE
 YCQHRDPCEKNRCQNGGTCVAQAMLGKATCRCASGFTGEDCQYSTSHPCFVSRPCLNGGT
 CHMLSRDTYPECTCQVGFTEGKQCQWTDACLSPCANGSTCTTVANQFCKCLTGFTGQKCE
 TDVNECDIPGHQHGTTCLNLPGSYQCQCPQGFQYQYCDLSLYVPCAPSPCVNGGTCRQTG
 DFTFECNCLPGFEGSTCERNIDDCPNHRCQNGGVCVDGVNTYNCRCPPQWTGQFCTEDVD
 ECLLQPNACQNGGTCANRNGGYGCVVNGWSGDDCSENIDDAFASCTPGSTCIDRVASF
 SCMCPEGKAGLLCHLDDACISNPCHKGALCDTNPLNGQYICTCPQGYKGADCTEDVDECA
 MANSNPCEHAGKCVNTDGAHFCECLKGYAGPRCEMDINECHSDPCQNDATCLDKIGGFTC
 LCMPGFKGVHCEL

40

SEQ ID NO:35: ヒトNotch1 EGF10
LNDACISNPCNEGSNCDTNPVNGKAICTCPSGYTGPACSDVD

SEQ ID NO:36: ヒトNotch2 EGF10
LDDACISNPCHKGALCDTNPLNGQYICTCPQGYKGADCTEDVD

SEQ ID NO:37: ヒトNotch3 EGF9 (EGF9は、Notch2を含む他のNotch受容体の
EGF10に対応するヒトNotch3 EGFである)
LDDACVSNPCHEDAICDTNPVNGRAICTCPPGFTGGACDQDVD

SEQ ID NO:38: ヒトNotch4 EGF10
LEDMCLSQPCHGDAQCSTNPLTGSTLCLCQPGYSGPTCHQDL

10

SEQ ID NO:41: Notch1 EGF反復4
QADPCASNPCANGGQCLPFEASYICHCPPSFHGPTCRQ

SEQ ID NO:42: Notch2 EGF反復4
TDACLSHPCANGSTCTTVANQFSCKCLTGFTGQKCET

SEQ ID NO:43: Notch3 EGF反復4
SDVDECRVGEPCRHHGTCLNTPGSFRCQCPAGYTGPLCEN

SEQ ID NO:44: Notch4 EGF反復4
RDFCSANPCVNGGVCLATYPQIQCHCPPGFEGHACER

20

【 0 3 7 8 】

出願人または代理人のファイル参照 2293.049PC03	国際出願番号 PCT/US2009/003994
----------------------------------	-----------------------------

寄託された微生物または他の生物材料に関する表示

(PCT規則13条の2)

A. 8、9、36ページ、__行の記載において言及されている寄託微生物または他の生物材料に関して以下に表示する。	
B. 寄託物の識別 さらなる寄託物が追加シートにおいて明示されている <input type="checkbox"/>	
寄託機関名 アメリカン タイプ カルチャーコレクション (American Type Culture Collection)	
寄託機関住所 (郵便番号および国名を含む) 米国 バージニア州 20110-2209 マナスス Boulevard 大学 10801	
寄託日 2009年7月6日	アクセッション番号 PTA-10170
C. 追加の表示 (該当しない場合は空欄で残してください) 本情報は追加シートに続く <input type="checkbox"/>	
ヒト DNA インサート 59R5 を含む、大腸菌から単離されたプラスミド	
D. 表示の対象指定国 (全ての指定国に対する表示でない場合)	
E. 表示の別個の提供 (該当しない場合は空欄で残してください)	
以下に列記される表示は後ほど国際事務局に提出される (「寄託物のアクセッション番号」などの一般的な表示の特定)	

10

20

受領官庁のみ使用	国際事務局のみ使用
<input type="checkbox"/> 本シートは国際出願と共に受領した	<input type="checkbox"/> 本シートは_____ 付けて国際事務局が受領した
担当官 TYETTA STATON	担当官

30

様式 PCT/RO/134 (1998年7月; リプリント 2004年1月)

40

【0379】

オーストラリア

本出願人は、本発明の利害関係人でなければ、特許付与前、または本願の失効、拒絶、もしくは取り下げの前にしか微生物試料の提供が当業者になされないことを通知する(オーストラリア特許施行規則の規則3.25(3))。

【0380】

カナダ

本出願人は、本願に基づいてカナダ特許が発行されるまで、または本願が拒絶され、放棄され、かつ回復の可能性がなくなり、もしくは取り下げられるまでは、本願において言及された寄託された生物材料の試料の提供がカナダ特許庁長官により指定された第三者の専門家にしかなされないことを求める。

50

【0381】

クロアチア

本出願人は、本願において言及された寄託された生物材料の試料が、出願公開から特許付与まで第三者の専門家にしか入手できないことを求める。試料は、特許が有効な期間の間は、生物材料を請求した第三者の専門家が次の義務を負う場合にのみ入手可能である。すなわち、該当する場合、特許出願人または特許権者が明白に権利を放棄しない限り、寄託された生物材料またはそれに由来する生物材料を第三者に入手可能にさせず、かつ、これらの生物材料またはそれに由来する生物材料を試験または研究の目的にのみ利用すること。

【0382】

デンマーク

本出願人は、本願が(デンマーク特許庁によって)公衆の閲覧に供されるまで、または公衆の閲覧に供されることなく、デンマーク特許庁によって最終的な決定が下されるまで、試料の提供は、当技術分野における専門家にのみなされることを求める。試料の提供のために第三者によってなされた如何なる請求も、利用しようとする専門家を示す。専門家は、デンマーク特許庁の作成する、承認された専門家の一覧に記載された如何なる者でも、または個々の場合において本出願人が認可した如何なる者でもよい。

【0383】

フィンランド

本出願人は、フィンランド国家特許・登記局による特許を付与する旨の告示が公表されるまで、またはフィンランド国家特許・登記局によって特許が付与されることなく本願の最終的な決定が下された場合は、出願日から20年間、試料の提供は、当技術分野における専門家にのみなされることを求める。試料の提供のために第三者によってなされた如何なる請求も、利用しようとする専門家を示す。専門家は、フィンランド国家特許・登記局の作成する、承認された専門家の一覧に記載された如何なる者でも、または個々の場合において本出願人が認可した如何なる者でもよい。

【0384】

ドイツ

本出願人は、特許が付与されるまで、または本願が拒絶され、または取り下げられた場合は、出願日から20年間、本出願人によって指定された第三者の専門家にのみ試料が分譲されることを求める。

【0385】

アイスランド

本出願人は、特許が付与されるまで、特許とならなかった出願に関しては最終的な決定がアイスランド特許庁により下されるまで、試料の提供は、当技術分野における専門家にのみなされることを求める。試料の提供のために第三者によってなされた如何なる請求も、利用しようとする専門家を示す。専門家は、アイスランド特許庁の作成する、承認された専門家の一覧に記載された如何なる者でも、または個々の場合において本出願人が認可した如何なる者でもよい。

【0386】

ノルウェー

本出願人は、本願が(ノルウェー特許庁によって)公衆の閲覧に供されるまで、または公衆の閲覧に供されることなく、ノルウェー特許庁によって最終的な決定が下されるまで、試料の提供は、当技術分野における専門家にのみなされることを求める。試料の提供のために第三者によってなされた如何なる請求も、利用しようとする専門家を示す。専門家は、ノルウェー特許庁の作成する、承認された専門家の一覧に記載された如何なる者でも、または個々の場合において本出願人が認可した如何なる者でもよい。

【0387】

シンガポール

本出願人は、微生物試料の提供が専門家にしか利用できないことを求める。

10

20

30

40

50

【0388】

スペイン

本出願人は、スペイン特許を付与する旨の告示が公表されるまで、あるいは本願が拒絶され、または取り下げられた場合は、出願日から20年間、条文45 SPLに規定するように生物材料が、第三者の専門家に試料を分譲することによってのみ入手可能なことを求める。

【0389】

スウェーデン

本出願人は、スウェーデン特許庁により特許が付与されるまで、または特許が付与されることなく本願の最終的な決定が下された場合、試料の提供は当技術分野における専門家にのみなされることを求める。出願日から20年以内に本願が拒絶された、または取り下げられた場合にも適用される。

10

【0390】

スイス

本出願人は、第三者への試料の提供には、第三者が寄託者情報のために名前および住所を寄託機関に示し、次の義務を負うことを条件とする場合があることを求める。すなわち、(a)寄託された培養物またはそれに由来する培養物を第三者に入手可能にさせないこと；(b)法律の範囲外で培養物を利用しないこと；(c)係争の場合には、条項(a)および(b)による義務に反しなかったという証拠を提出すること。

【0391】

マケドニア旧ユーゴスラビア共和国

本出願人は、第三者への試料の提供には、第三者が、(a)生きている生物材料または微生物材料の試料が入手可能になることを要求する権利を有すること；(b)特許の規定された有効期間の満了前に、寄託された生きている生物材料または微生物材料の試料の取得を如何なる第三者にも本出願人が認めないことを確実なものとする義務を負っていることを条件とする場合があることを求める。

20

【0392】

イギリス

本出願人は、微生物試料の提供が専門家にしか利用できないことを求める。

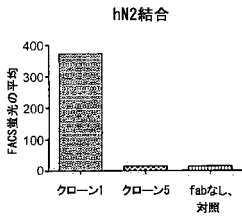
【0393】

欧州特許庁

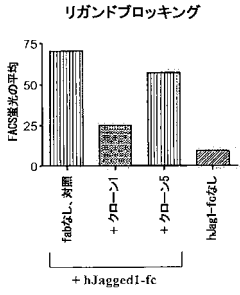
本出願人は、欧州特許を付与する旨の告示が公表されるまで、あるいは本願が拒絶され、または取り下げられ、もしくは取り下げられたものとみなされた場合は、出願日から20年間、規則28(3)EPCに規定するように生物材料が、請求人により指名された専門家に試料を分譲することによってのみ入手可能なことを求める(規則28(4)EPC)。

30

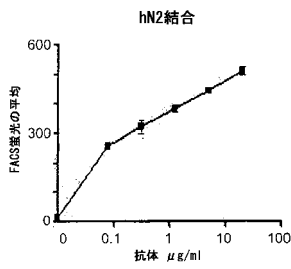
【 図 1 A 】



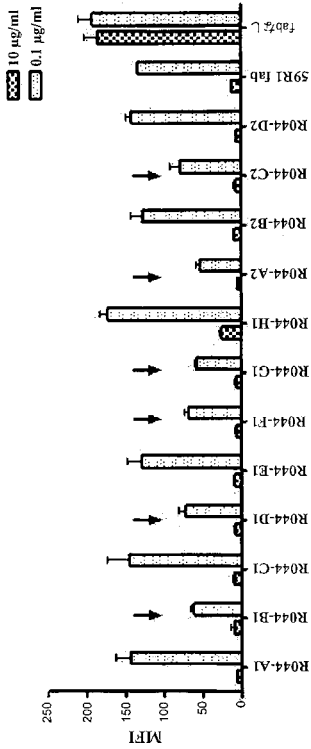
【 図 1 B 】



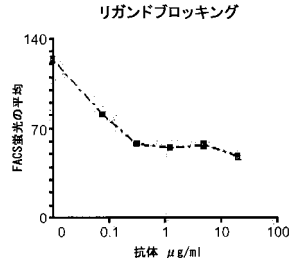
【 図 1 C 】



【 図 1 F 】



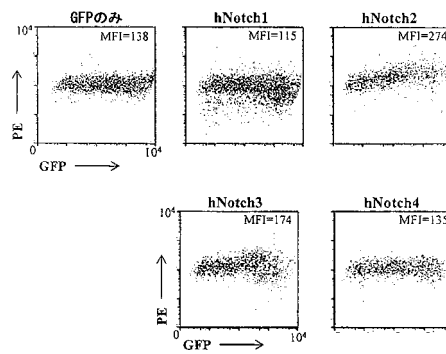
【 図 1 D 】



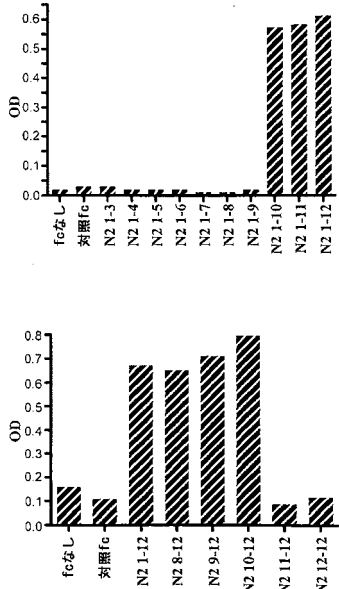
【 図 1 E 】

G	I	F	F	A	I
S	T	Y	S	T	
R	S		T	S	
N			P	N	

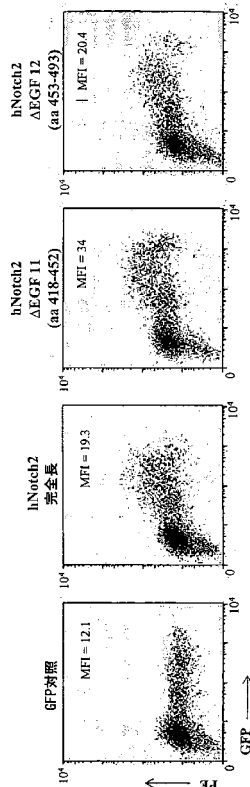
【 図 2 】



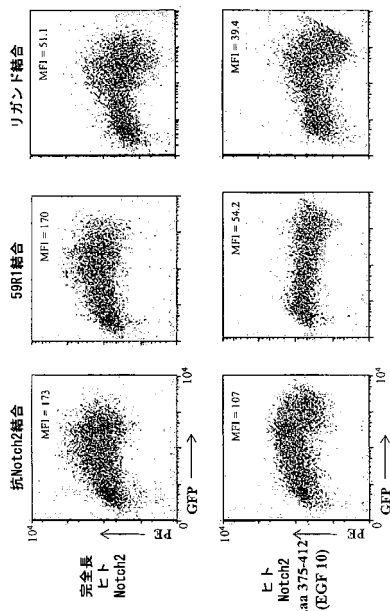
【 3 A 】



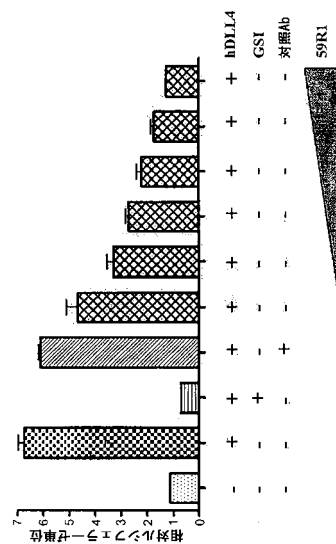
【 3 B 】



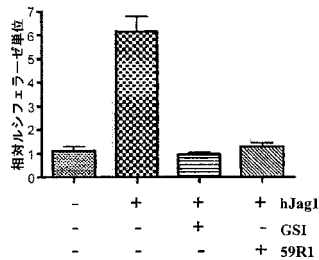
【 3 C 】



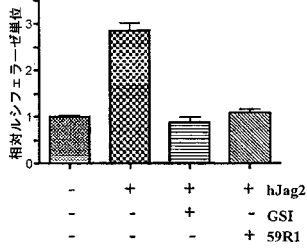
【 4 A 】



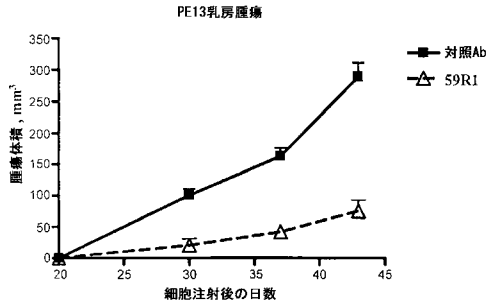
【 4 B 】



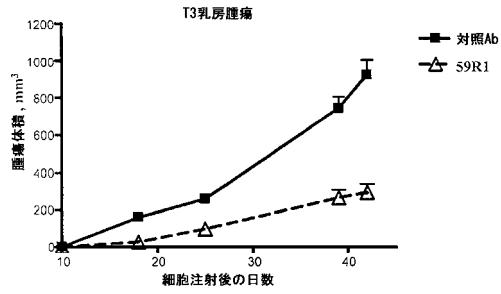
【図4C】



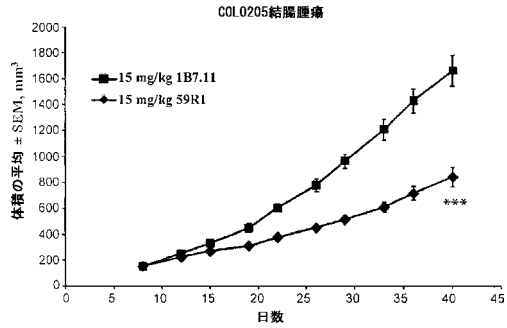
【図5A】



【図5B】

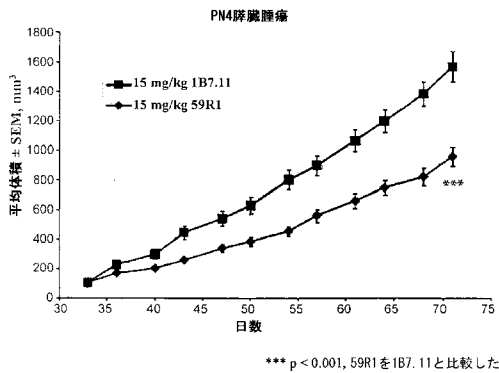


【図5C】



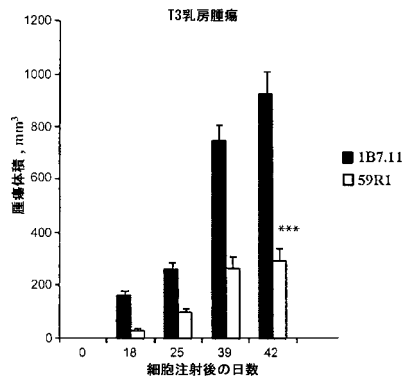
*** p < 0.001, 59R1を1B7.11と比較した

【図5D】



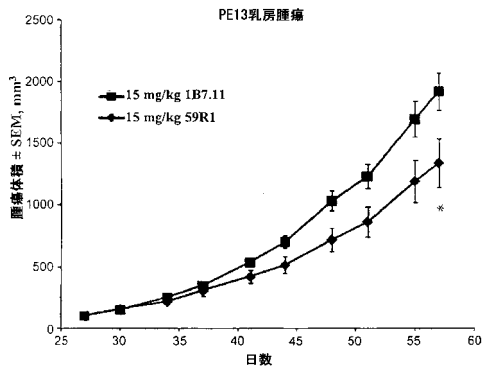
*** p < 0.001, 59R1を1B7.11と比較した

【図5F】



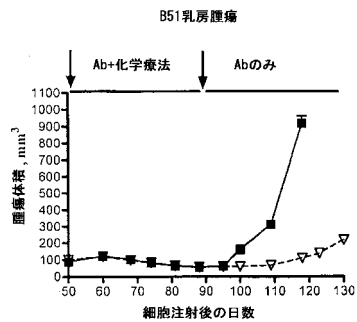
*** p < 0.001, 59R1を1B7.11と比較した

【図5E】



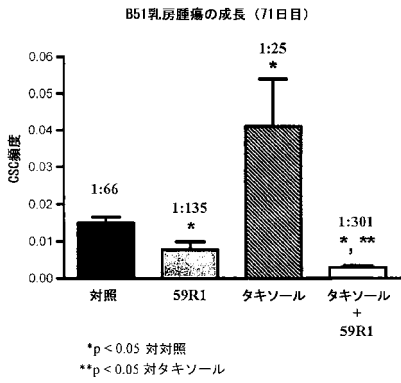
* p < 0.05, 59R1を1B7.11と比較した

【図6】

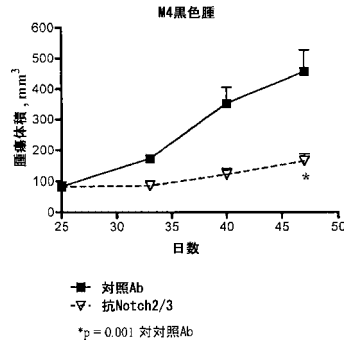


■ 対照Ab+パクリタキセル→対照Ab
 ▽ 抗Notch2/3+パクリタキセル→抗Notch2/3

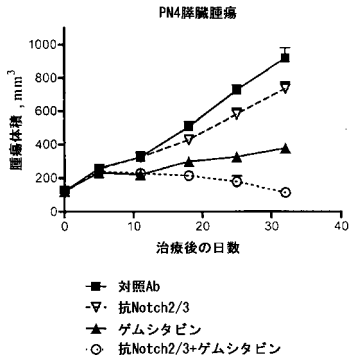
【 図 7 】



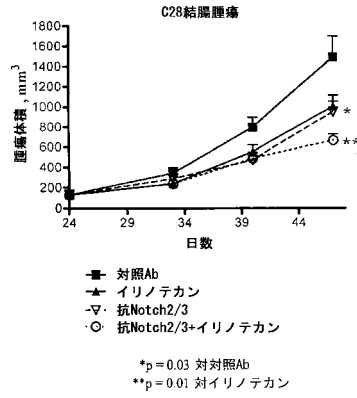
【 図 9 】



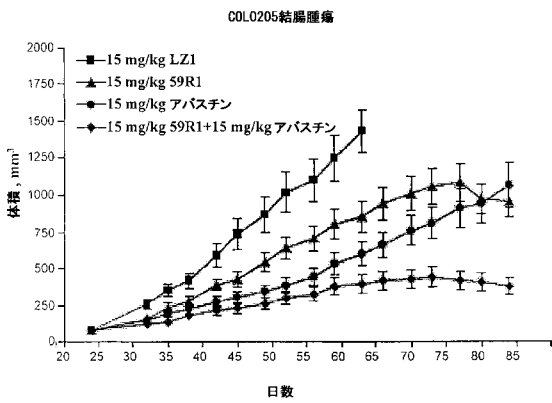
【 図 8 】



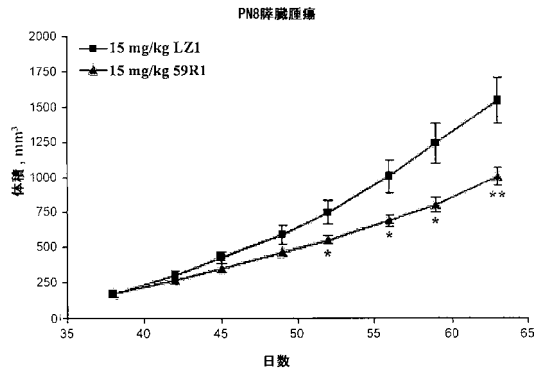
【 図 10 】



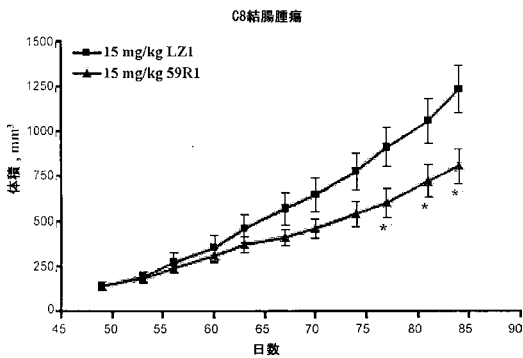
【 図 11 A 】



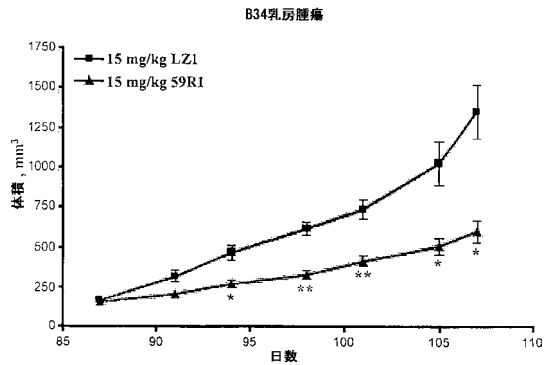
【 図 11 C 】



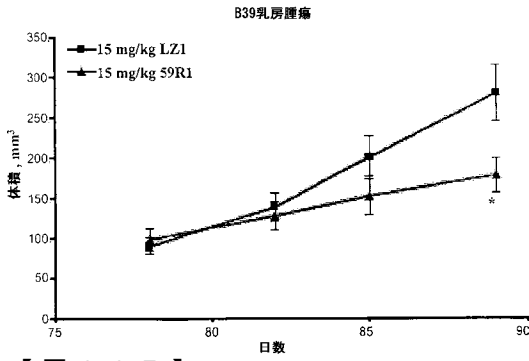
【 図 11 B 】



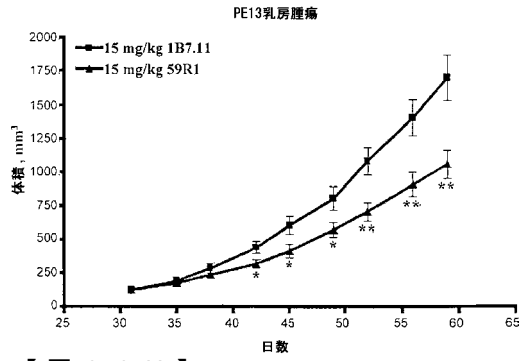
【 図 11 D 】



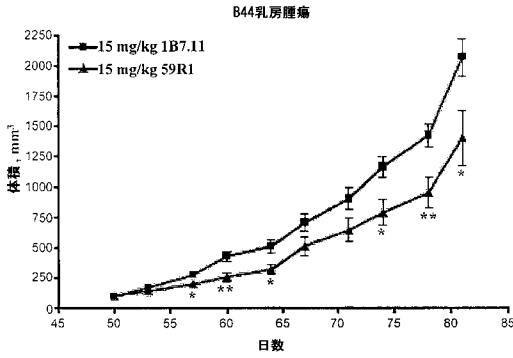
【 図 1 1 E 】



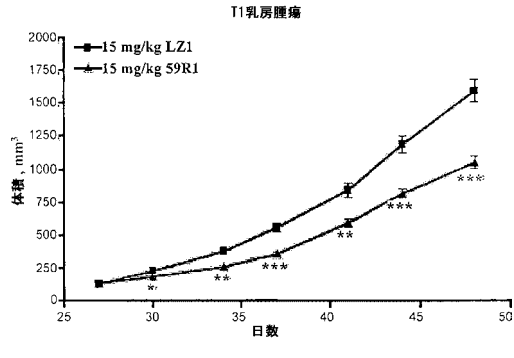
【 図 1 1 G 】



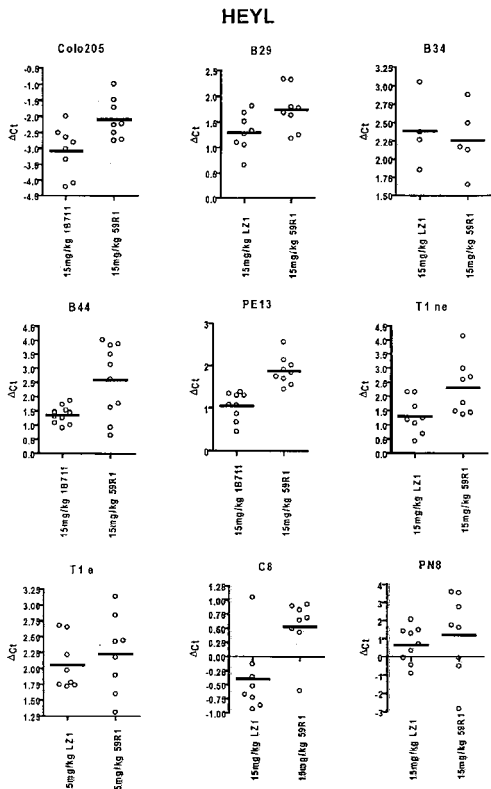
【 図 1 1 F 】



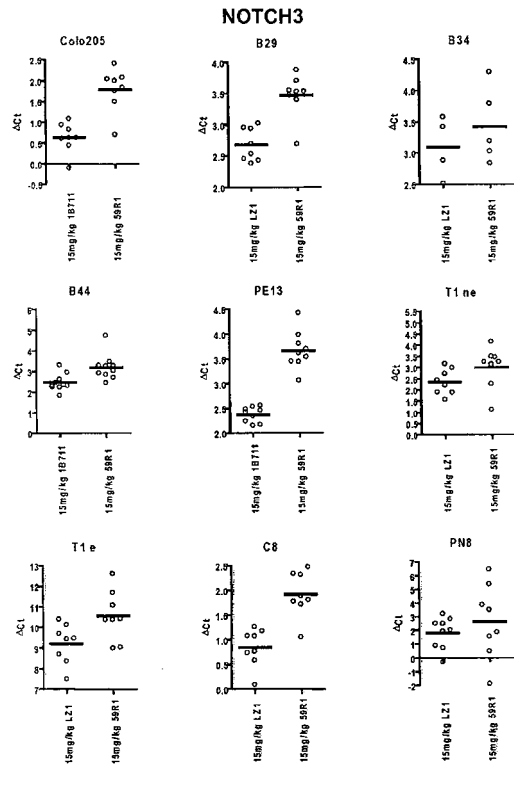
【 図 1 1 H 】



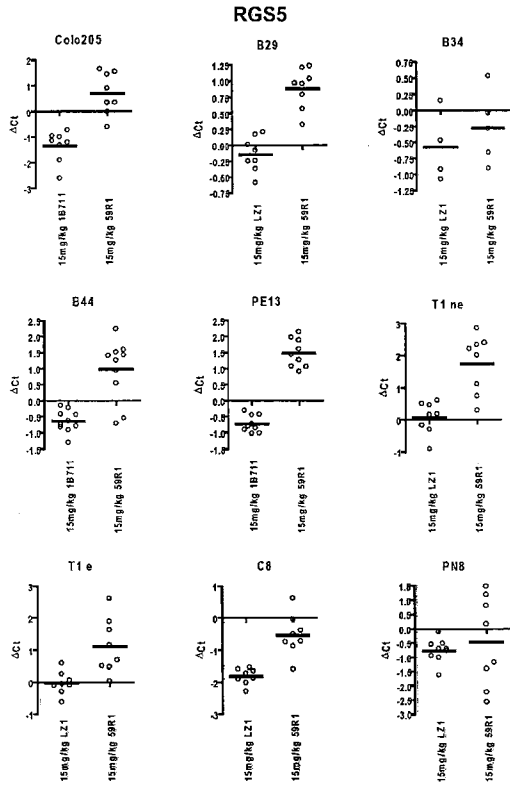
【 図 1 2 A 】



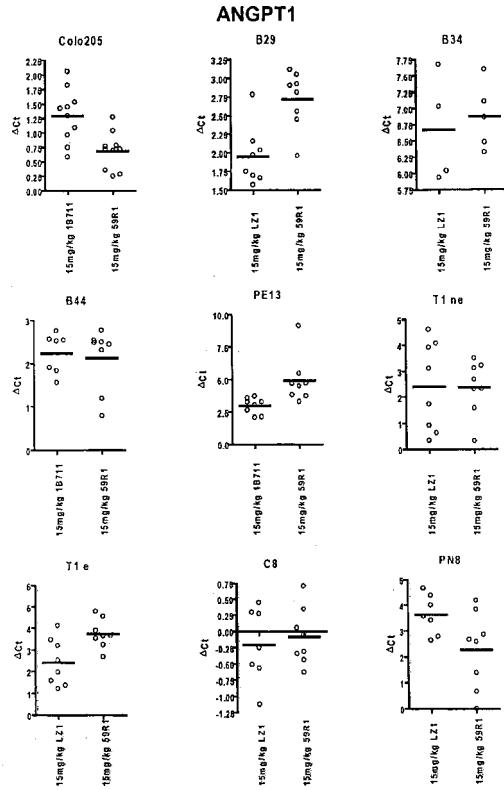
【 図 1 2 B 】



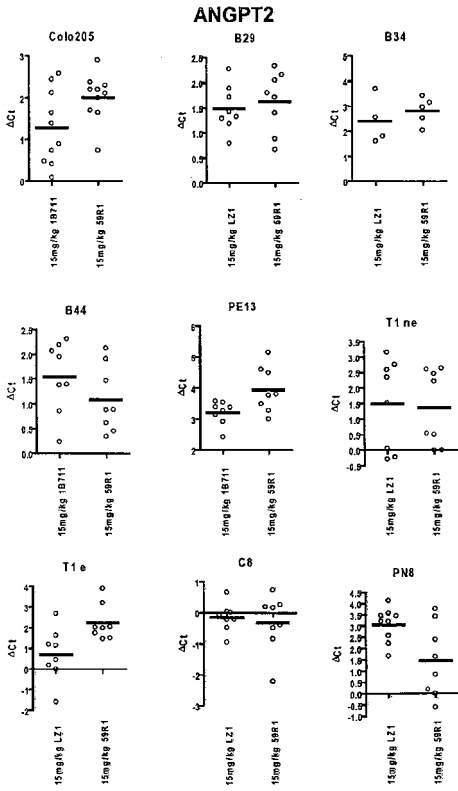
【 1 2 C 】



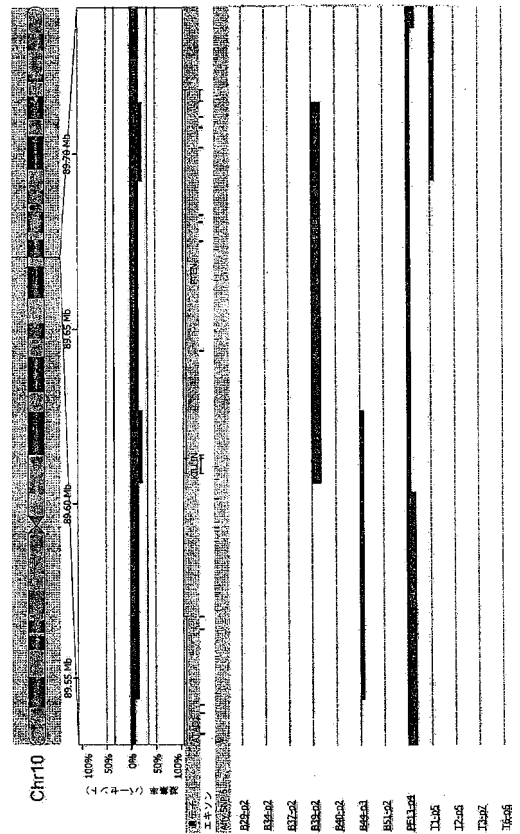
【 1 2 D 】

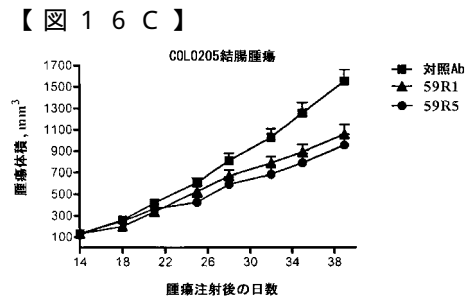
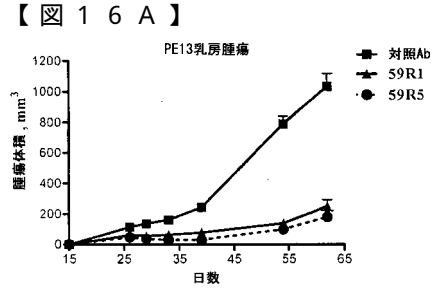
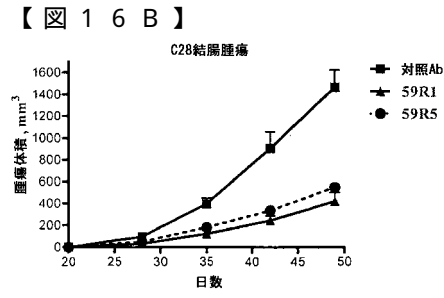
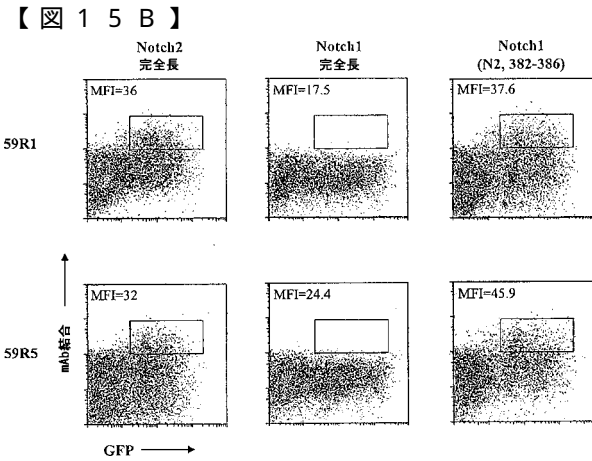
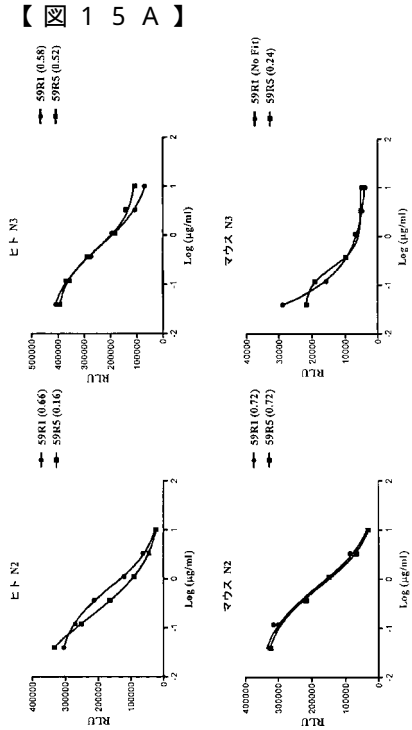
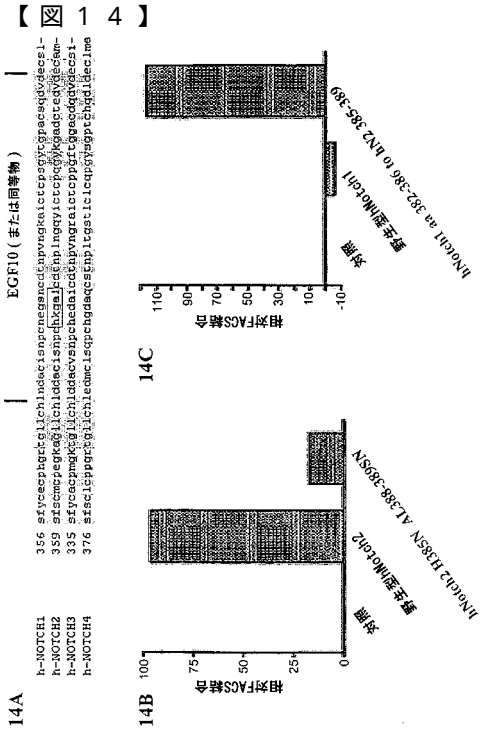


【 1 2 E 】

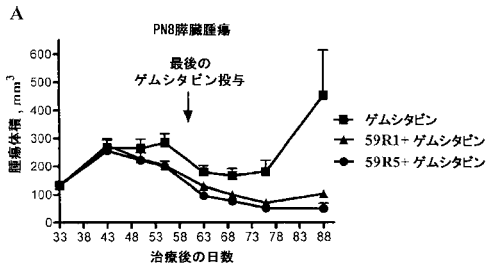


【 1 3 】

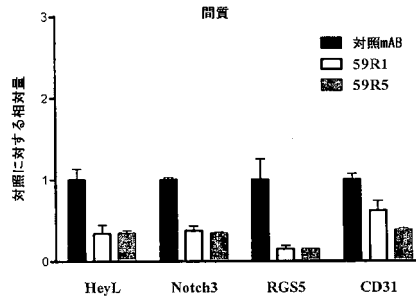




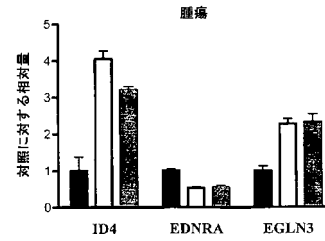
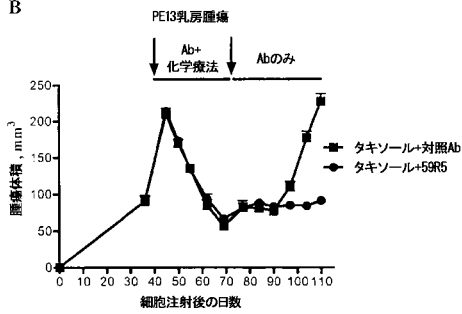
【図17】



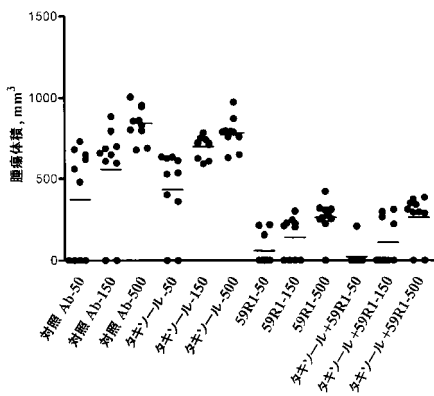
【図18】



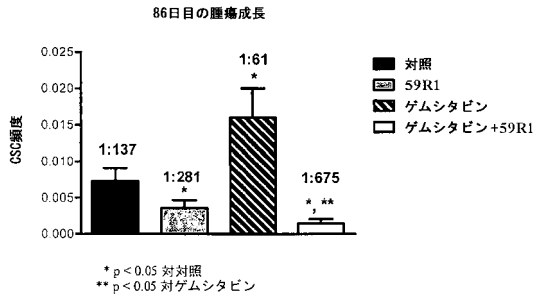
B



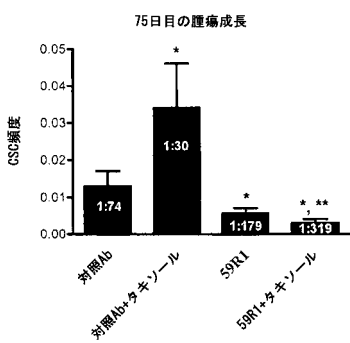
【図19A】



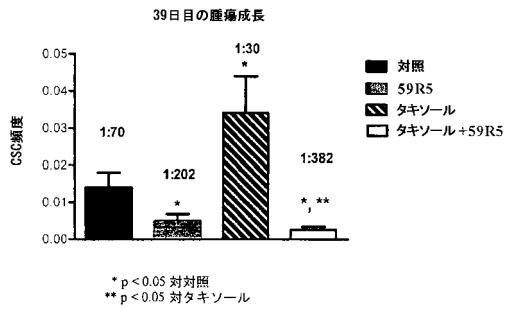
【図19C】



【図19B】



【図19D】



【手続補正書】

【提出日】平成23年4月27日(2011.4.27)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2012501625000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 09/03994
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C07K 16/28; C12P 21/08 (2010.01) USPC - 530/388.22, 530/387.9 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) USPC: 530/388.22, 387.9 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Electronic Databases: PubWEST DB=PGPB,USPT,USOC,EPAB,JPAB; PLUR=NO; OP=ADJ; Google Patent, Google Scholar Search Terms Used: antagonist, Notch2, Notch3, angiogenesis, EGF repeat 10, EGF repeat 9, PTA-9547, 59R1, extracellular domain, antibody		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X ---- A	US 20080131434 A1 (Lawicki et al.) 05 June 2008 (05.06.2008) esp: abstract, paras [0020], [0021], [0032], [0041], [0094], [0097], [0101], [0105], [0124], [0229], [00245]-[0247], claim 3.	1-3, 5, 20-22, 24, 49-51 ----- 4, 23, 30-43, 77-81
X	US 20060030694 A1 (Kitajewski et al.) 09 February 2006 (09.02.2006) esp: paras [0002], [0020], [0111], [0113], [0117].	82-84
A	US 20080076670 A1 (Sivan et al.) 27 March 2008 (27.03.2008) esp: SEQ ID NO: 27.	37-39
A	US 20020086014 A1 (Koman et al.) 04 July 2002 (04.07.2002) esp: SEQ ID NO: 30.	37-39
X,P	US 20080187532 A1 (Gurney et al.) 07 August 2008 (07.08.2008) entire document.	1-5, 20-24, 30-43, 49-51, 77-84
X,P	US 20080226621 A1 (Fung et al.) 18 September 2008 (18.09.2008) entire document.	1-5, 20-24, 30-43, 49-51, 77-84
A	US 20080131908 A1 (Li et al.) 05 June 2008 (05.06.2008) entire document.	1-5, 20-24, 30-43, 49-51, 77-84
A	US 20080118520 A1 (Li et al.) 22 May 2008 (22.05.2008) entire document.	1-5, 20-24, 30-43, 49-51, 77-84
A	EP0662827 B2 (ARTAVANIS-TSAKONAS et al.) 19 July 1995 (19.07.1995) entire document.	1-5, 20-24, 30-43, 49-51, 77-84
A	WO2008057144 A2 (Blacklow et al.) 15 May 2008 (15.05.2008) entire document.	1-5, 20-24, 30-43, 49-51, 77-84
A	US 6090922 A (ARTAVANIS-TSAKONAS et al.) 18 July 2000 (18.07.2000) entire document.	1-5, 20-24, 30-43, 49-51, 77-84
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 20 July 2010 (20.07.2010)		Date of mailing of the international search report 23 JUL 2010
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/AUS 09/03994

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:

a. (means)

- on paper
 in electronic form

b. (time)

- in the international application as filed
 together with the international application in electronic form
 subsequently to this Authority for the purposes of search

2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 09/03994

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

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

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: 6-19, 25-29, 44-48, 52-76, 85-89
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 09/03994

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Pei et al. Competition between Delta and the Ahruplex domain of Notch. BMC Developmental Biology 21 Jan 2008, 8:4 (available online at <http://www.biomedcentral.com/1471-213X/8/4>) entire document.	1-5, 20-24, 30-43, 49-51, 77-84
A	Luo et al. Isolation and functional analysis of a cDNA for human Jagged2, a gene encoding a ligand for the Notch1 receptor. MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, Vol. 17, No. 10, Oct. 1997, p. 6057-6067. entire document.	1-5, 20-24, 30-43, 49-51, 77-84

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 6
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1	4 H 0 4 5
A 6 1 K 31/337 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 31/7076 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	
A 6 1 K 31/4745 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	
	A 6 1 K 31/337	
	A 6 1 K 31/7076	
	A 6 1 K 31/4745	
	C 1 2 P 21/08	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74) 代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74) 代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74) 代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74) 代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74) 代理人 100130845

弁理士 渡邊 伸一

(74) 代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74) 代理人 100114889

弁理士 五十嵐 義弘

(74) 代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72) 発明者 ガーニー . オースティン エル .

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サンフランシスコ ダイヤモンド ストリート 9 4 6

(72) 発明者 ホーイ ティモシー チャールズ

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ヒルズボロー ダレル ロード 2 0 0

(72) 発明者 トウン パン デール ホースト エドワード セイン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 パロ アルト オーク クリーク ドライブ 1 7 8 8 #
3 1 4

(72) 発明者 サトウ アーロン ケン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 バーリンゲーム アルベマール ウェイ 1 6 3 6

(72) 発明者 リュウ ユアン チン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 フレモント サンライズ ドライブ 1 1 0 8

(72) 発明者 ブルーンズ モーリーン フィッチ

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サンマテオ 第 4 2 アベニュー 6 3 2

(72)発明者 レウィッキ ジョン エー .

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ロス ガトス エスコパール アベニュー 308

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA41 CA01 DA02 GA11 HA01

4B064 AG27 CA19 CC24 DA01

4B065 AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA25 CA44

4C084 AA17 MA02 NA14 ZB262 ZC752

4C085 AA13 AA14 BB01 CC23 DD63 EE01 EE03

4C086 AA01 AA02 AA03 BA02 CB22 EA17 MA01 MA02 MA04 NA14

ZB26 ZC75

4H045 AA11 BA10 CA40 DA76 EA20 EA28 FA74