(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2015-505668
(P2015-505668A)
(43)公表日　平成27年2月26日(2015.2.26)

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード（参考）
C12Q	1/68	(2006.01)	C12Q	1/68	ZNAA	2G045
C12N	15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A	4B024
C12N	1/15	(2006.01)	C12N	1/15		4B063
C12N	1/19	(2006.01)	C12N	1/19		4B065
C12N	1/21	(2006.01)	C12N	1/21		4C084

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 84 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2014-542394 (P2014-542394)
(86)(22)出願日　平成24年11月14日 (2012.11.14)
(85)翻訳文提出日　平成26年6月24日 (2014.6.24)
(86)国際出願番号　PCT/US2012/064969
(87)国際公開番号　WO2013/074596
(87)国際公開日　平成25年5月23日 (2013.5.23)
(31)優先権主張番号　61/560,627
(32)優先日　平成23年11月16日 (2011.11.16)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　61/704,006
(32)優先日　平成24年9月21日 (2012.9.21)
(33)優先権主張国　米国(US)

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

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ヒトＮＯＴＣＨ受容体変異およびその使用

(57)【要約】
本発明は、受容体シグナル伝達の増強に関連したNOTCH変異の特定および特徴付けを提供する。本発明は、同変異を用いるための方法およびキットを提供する。本発明はさらに、上昇したレベルのNOTCH ICDを固形腫瘍細胞が含む固形腫瘍を有する患者においてがんを処置する方法を提供する。

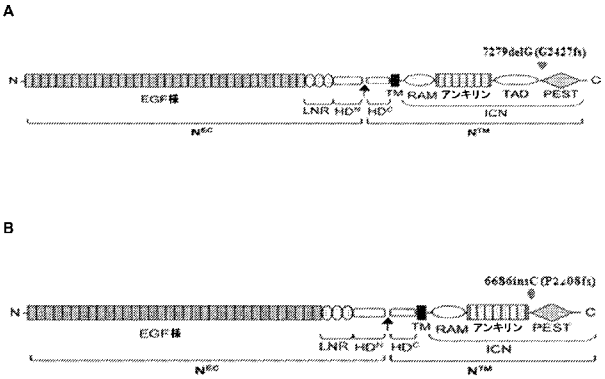
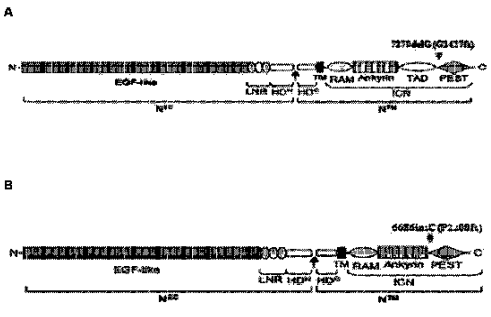


Figure 1



【特許請求の範囲】
【請求項１】
肺腫瘍、神経膠腫、胃腸腫瘍、腎腫瘍、卵巣腫瘍、肝臓腫瘍、結腸直腸腫瘍、子宮内膜腫瘍、腎臓腫瘍、前立腺腫瘍、甲状腺腫瘍、神経芽細胞腫、膵臓腫瘍、多形性膠芽腫、子宮頚腫瘍、胃腫瘍、膀胱腫瘍、肝細胞腫、乳房腫瘍、結腸腫瘍、黒色腫、胆道腫瘍、および頭頸部腫瘍からなる群より選択される固形腫瘍細胞が、ヒトNOTCH受容体のプロリン、グルタミン酸、セリン、トレオニンに富む(PEST)ドメインにおけるまたはヒトNOTCH1のTADドメインにおける変異を含むかどうかを特定する段階を含む、NOTCH受容体シグナル伝達の増大を示す固形腫瘍細胞を特定する方法。
【請求項２】
患者由来の腫瘍細胞がヒトNOTCH受容体のPESTドメインまたはTADドメインの活性化変異を含むかどうか判定する段階を含み、変異が存在する場合、患者がNOTCH阻害剤による処置に対して好ましい反応を有することが予測される、がんと診断された患者にNOTCH阻害剤を投与すべきかどうか判定するための方法。
【請求項３】
NOTCH受容体がNOTCH1またはNOTCH3である、請求項1または2記載の方法。
【請求項４】
変異が、
a) ミスセンス、ナンセンス、もしくはフレームシフト変異;
b) PESTドメインのフレームシフトもしくはナンセンス変異;
c) ヒトNOTCH1遺伝子のヌクレオチド番号7279の位置の欠失;
d) ヒトNOTCH1遺伝子のヌクレオチド番号7279の位置のグアニン(G)欠失(B40変異);
e) TADドメインのミスセンス変異;
f) ヒトNOTCH1遺伝子のヌクレオチド番号6733の位置の置換;
g) ヒトNOTCH1遺伝子のヌクレオチド番号6733の位置のアデニン(A)もしくはシトシン(C)への置換;
h) ヒトNOTCH1遺伝子のヌクレオチド番号6788の位置の置換;
i) ヒトNOTCH1遺伝子のヌクレオチド番号6788の位置のアデニン(A)への置換;
j) ヒトNOTCH3遺伝子の位置番号6622の位置の挿入;
k) ヒトNOTCH3遺伝子の位置番号6622の位置のシトシン(C)挿入(B37変異);
l) ヒトNOTCH3遺伝子の位置番号6096の位置の挿入; および/または
m) ヒトNOTCH3遺伝子の位置番号6096の位置のシトシン(C)挿入
である、請求項1～3のいずれか一項記載の方法。
【請求項５】
変異の存在が、
a) RT-PCR;
b) マイクロアレイ; および/または
c) 直接的核酸配列決定
によって判定される、請求項1～4のいずれか一項記載の方法。
【請求項６】
がんが、肺がん、胃腸がん、腎がん、卵巣がん、肝臓がん、結腸直腸がん、子宮内膜がん、腎臓がん、前立腺がん、甲状腺がん、神経芽細胞腫、膵臓がん、多形性膠芽腫、子宮頚がん、胃がん、膀胱がん、乳がん、結腸がん、黒色腫、胆道がん、および頭頸部がんからなる群より選択される、請求項2～5のいずれか記載の方法。
【請求項７】
NOTCH阻害剤を患者に投与する段階をさらに含む、請求項2～6のいずれか一項記載の方法。
【請求項８】
NOTCH阻害剤の治療的有効量を患者に投与する段階を含み、患者における固形腫瘍細胞の少なくとも1つがヒトNOTCH1またはNOTCH3遺伝子における活性化変異を含む、固形腫瘍

を有する患者においてがんを処置する方法。
【請求項９】
がんが乳がんであり、かつ固形腫瘍が乳房腫瘍である、請求項18記載の方法。
【請求項１０】
a) 患者由来の腫瘍細胞がヒトNOTCH1またはNOTCH3受容体の活性化変異を含むかどうか判定する段階、およびb) NOTCH阻害剤の治療的有効量を患者に投与する段階を含む、固形腫瘍を有する患者においてがんを処置する方法。
【請求項１１】
変異がNOTCHシグナル伝達を増大する、請求項2～10のいずれか一項記載の方法。
【請求項１２】
患者由来の腫瘍細胞の少なくとも約0.1%、少なくとも約1%、少なくとも約2%、または少なくとも約5%が変異を含む、請求項2～11のいずれか一項記載の方法。
【請求項１３】
ヒトNOTCH1受容体の活性化変異が、
a) PESTドメインのものである;
b) TADドメインのものである;
c) NOTCHシグナル伝達を増大する;
d) ヒトNOTCH1遺伝子のヌクレオチド番号7279の位置のグアニン欠失を含む;
e) ヒトNOTCH1遺伝子のヌクレオチド番号6733の位置のアデニン(A)もしくはシトシン(C)への置換を含む; および/または
f) ヒトNOTCH1遺伝子のヌクレオチド番号6788の位置のアデニン(A)への置換を含む、あるいは
ヒトNOTCH3受容体の活性化変異が
g) PESTドメインのものである;
h) NOTCHシグナル伝達を増大する;
i) ヒトNOTCH3遺伝子の位置番号6622の位置のシトシン挿入を含む; および/または
j) ヒトNOTCH3遺伝子の位置番号6096の位置のシトシン挿入を含む、
請求項2～12のいずれか記載の方法。
【請求項１４】
患者由来の固形腫瘍細胞におけるNOTCH ICDのレベルを判定する段階を含み、NOTCH ICDのレベルが参照レベルを上回る場合、患者がNOTCH阻害剤による処置に対して好ましい反応を有することが予測される、がんと診断された患者にNOTCH阻害剤を投与すべきかどうか判定するための方法。
【請求項１５】
NOTCH ICDがNOTCH1 ICDまたはNOTCH3 ICDである、請求項14記載の方法。
【請求項１６】
NOTCH阻害剤を患者に投与する段階をさらに含む、請求項14または15記載の方法。
【請求項１７】
(a) 固形腫瘍細胞におけるNOTCH ICDのレベルを判定する段階、および
(b) 患者にNOTCH阻害剤の治療的有効量を投与する段階
を含む、固形腫瘍を有する患者においてがんを処置する方法。
【請求項１８】
NOTCH ICDがNOTCH1 ICDであり、かつNOTCH阻害剤がNOTCH1阻害剤である、請求項17記載の方法。
【請求項１９】
患者にNOTCH阻害剤の治療的有効量を投与する段階を含み、患者における固形腫瘍細胞が参照レベルを上回るレベルでNOTCH ICDを含む、固形腫瘍を有する患者においてがんを処置する方法。
【請求項２０】
患者が、肺がん、胃腸がん、腎がん、卵巣がん、肝臓がん、結腸直腸がん、子宮内膜が

ん、腎臓がん、前立腺がん、甲状腺がん、神経芽細胞腫、膵臓がん、多形性膠芽腫、子宮頚がん、胃がん、膀胱がん、乳がん、結腸がん、黒色腫、胆道がん、頭頸部がん、小細胞がん、小細胞肺がん、胃がん、食道がん、肝細胞がん、または胆管がんを有する、請求項14～19のいずれか記載の方法。

【請求項２１】

NOTCH ICDのレベルが腫瘍細胞の核内のレベルである、請求項14～20のいずれか記載の方法。

【請求項２２】

NOTCH ICDレベルが、NOTCH ICDに特異的に結合する薬剤を用いて判定される、請求項14～21のいずれか記載の方法。

【請求項２３】

薬剤が抗NOTCH ICD抗体である、請求項22記載の方法。

【請求項２４】

NOTCH ICDのレベルが、放射免疫アッセイ法、免疫蛍光アッセイ法、酵素免疫アッセイ法、化学発光アッセイ法、または免疫組織化学アッセイ法によって判定される、請求項14～23のいずれか記載の方法。

【請求項２５】

NOTCH ICDのレベルがH-スコアによって特徴付けられる、請求項14～24のいずれか記載の方法。

【請求項２６】

患者における固形腫瘍細胞が、抗NOTCH1 ICD抗体を用いた免疫組織化学アッセイ法において約30またはそれ以上のH-スコアによって特徴付けられる、請求項14～25のいずれか記載の方法。

【請求項２７】

NOTCH阻害剤がγ-セクレターゼ阻害剤または抗NOTCH抗体である、請求項2～26のいずれか記載の方法。

【請求項２８】

γ-セクレターゼ阻害剤が、III-31-C; N-[N-(3,5-ジフルオロフェンアセチル)-L-アラニル]S-フェニルグリシンt-ブチルエステル) (DAPT); 化合物E; D-らせん状ペプチド294; イソクマリン; BOC-Lys(Cbz)Ile-Leu-エポキシド; および(Z-LL)2-ケトンからなる群より選択される、請求項27記載の方法。

【請求項２９】

抗NOTCH抗体が抗NOTCH1抗体または抗NOTCH3抗体である、請求項27記載の方法。

【請求項３０】

抗NOTCH1抗体が、

a) NOTCH1受容体へのリガンド結合を遮断する;

b) NOTCH1受容体の切断を遮断する;

c) CDRアミノ酸配列CDR1 (SEQ ID NO:5)、CDR2 (SEQ ID NO:6)、およびCDR3 (SEQ ID NO:7)を含んだ重鎖可変領域、ならびにCDRアミノ酸配列CDR1 (SEQ ID NO:8); CDR2 (SEQ ID NO:9); およびCDR3 (SEQ ID NO:10)を含んだ軽鎖可変領域を含む;

d) SEQ ID NO:14の重鎖可変領域配列およびSEQ ID NO:18の軽鎖可変領域配列を含む; ならびに/または

e) OMP-52M51である、

請求項29記載の方法。

【請求項３１】

抗NOTCH3抗体が、

a) NOTCH3受容体へのリガンド結合を遮断する;

b) NOTCH3受容体の切断を遮断する; ならびに/または

c) CDRアミノ酸配列CDR1 (SEQ ID NO:23)、CDR2 (SEQ ID NO:24)、およびCDR3 (SEQ ID NO:25)を含んだ重鎖可変領域、ならびにCDRアミノ酸配列CDR1 (SEQ ID NO:26); CDR2 (SEQ

ID NO:27); およびCDR3 (SEQ ID NO:28)を含んだ軽鎖可変領域を含む、
請求項29記載の方法。
【請求項３２】
第2の治療剤を投与する段階をさらに含む、請求項2～31のいずれか記載の方法。
【請求項３３】
患者がヒトである、請求項1～32のいずれか記載の方法。
【請求項３４】
患者が、
a) 三重陰性の乳がん細胞を含む;
b) がん治療に以前は失敗している; および/または
c) 化学療法耐性乳がんを有する、
請求項2～33のいずれか記載の方法。
【請求項３５】
a) ヒトNOTCH1遺伝子のヌクレオチド番号7279の位置の欠失;
b) ヒトNOTCH1遺伝子のヌクレオチド番号7279の位置のグアニン(G)欠失;
c) ヒトNOTCH3遺伝子の位置番号6622の位置の挿入;
d) ヒトNOTCH3遺伝子の位置番号6622の位置のシトシン(C)挿入;
e) ヒトNOTCH3遺伝子の位置番号6096の位置の挿入;
f) ヒトNOTCH3遺伝子の位置番号6096の位置のシトシン(C)挿入;
g) ヒトNOTCH1遺伝子の位置番号6733の位置の置換;
h) ヒトNOTCH1遺伝子の位置番号6733の位置のアデニン(A)もしくはシトシン(C);
i) ヒトNOTCH1遺伝子の位置番号6788の位置の置換; および/または
j) ヒトNOTCH1遺伝子の位置番号6788の位置のアデニン(A)
を含む、変異体ヒトNOTCH1またはNOTCH3受容体をコードする単離されたポリヌクレオチド。
【請求項３６】
請求項35記載のポリヌクレオチドによってコードされる単離されたポリペプチド。
【請求項３７】
請求項35記載のポリヌクレオチドを含むベクター。
【請求項３８】
請求項37記載のベクターで形質転換された宿主細胞。
【請求項３９】
(a) 請求項1記載のポリヌクレオチドによってコードされる変異体NOTCH受容体を発現する細胞と試験化合物をγ-セクレターゼの存在下でインキュベーションする段階、(b) 段階(a)での受容体活性の量を、試験化合物の非存在下で行われたインキュベーションの活性と比較する段階、を含み、試験化合物の存在下で観察された活性が試験化合物の非存在下で観察された活性よりも少なければ、試験化合物は細胞成長を阻害する、変異NOTCH受容体の存在によって誘導された異常な細胞成長を阻害する試験化合物を特定する方法。
【請求項４０】
任意で本発明の変異NOTCH受容体を結合する抗体または核酸プローブであってよい、本発明の変異NOTCH受容体を特異的に検出するための少なくとも1つの試薬を含んだキット。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
発明の分野
本発明は、腫瘍学の分野に関し、受容体シグナル伝達の増大をもたらす変異を含むNOTCH受容体の特定および特徴付けを提供する。本発明は同様に、それを用いるための方法およびキットを提供する。本発明は、上昇したレベルのNOTCH ICDを固形腫瘍細胞が含む固形腫瘍を有する患者においてがんを処置する方法をさらに提供する。
【背景技術】

【０００２】
背景
がんは、先進諸国の主要な死因の1つであって、米国だけでも毎年100万人以上ががんと診察され、500,000人が死亡する。通算して、3人に1人よりも多くが一生のうちになんらかの形のがんを発病するであろうと推測される。200種を上回るさまざまな種類のがんが存在し、それらのうちの4つ、すなわち乳房、肺、結腸直腸、および前立腺のがんが全ての新患の半分以上を占める(Jemal et al., Cancer J. Clin. 53:5-26 (2003))。次第に、がんの処置は、全身作用性の細胞毒性薬の使用から、無秩序な細胞成長および生存を可能にする機構に焦点を合わせた、より標的指向性の高い治療を含めるように移行してきている。

【０００３】
NOTCH受容体1～4は、調節されたタンパク質分解に依る経路を通じてシグナルを伝達する膜貫通受容体タンパク質である。リガンド結合にしたがって、この受容体は順に、i) ADAMファミリーのメタロプロテアーゼにより細胞外で切断され(Brou et al., Mol. Cell. 5:207-216 (2000); Mumm et al. Mol Cell 5: 197-206 (2000)); ii) 膜貫通ドメインのすぐ内側にあるリジン残基にてモノユビキチン化され(Gupta-Rossi et al., J. Cell Biol. 166:73-83 (2004)); iii) エンドサイトーシスされ(Gupta-Rossi, 2004)、かつiv) γ-セクレターゼ酵素によってタンパク質分解的に切断される(De Strooper et al., Nature 395:518-522 (1999))。この活性化プロセスの最終段階は、NOTCH受容体の細胞内部分を細胞核へ移行させ、そこでその細胞内部分は転写因子と相互作用して、遺伝子活性を変化させる。NOTCH受容体のシグナル伝達は、細胞の分化および増殖において、ならびにアポトーシスの制御において、つまり新生物の形質転換に関して重要である3つのプロセスにおいて、重要な役割を果たす。

【０００４】
NOTCHタンパク質の調節性の細胞外ドメインは、大部分が、リガンド結合のために必要とされる直列に配列したEGF様リピートからなる(Artavanis-Tsakonas et al. Science, 268:225-232 (1995))。EGF様リピートのC末端側にはLIN12/NOTCHリピート(LNR)と称される、さらに3つのシステインに富むリピートがある。LNRの下流に、フューリン様転換酵素により認識されるタンパク質分解性の切断配列(RXRR)が位置する。NOTCH1の場合、この部位での切断によって180キロダルトンの細胞外ペプチドおよび120キロダルトンの細胞内ペプチドが生じ、これらが共に保持されて、細胞表面でヘテロ二量体受容体を生み出す(Blaumueller et al. Cell 90:281-91 (1997))。

【０００５】
NOTCHの細胞内ドメイン(NOTCH.ICD)は機能喪失型のNOTCH表現型をレスキューし、この形態のNOTCHが構成的にシグナルを伝達することを示している(Fortini, M. E., and S. Artavanis-Tsakonas. Cell 75: 1245-7 (1993))。NOTCHの細胞質ドメインは3つの特定可能なドメイン: RAMドメイン、アンキリンリピートドメインおよびC末端PESTドメインを含む。リガンド活性化によって、NOTCHは2回のさらなるタンパク質分解性の切断を受け、その結果、細胞質ドメインの放出が起こる(Weinmaster, G. Curr Opin Genet Dev. 5:436-42 (1998))。このNOTCHペプチドは核へ移行し、CSL (CBF, Su (H), Lag-2)として公知の転写抑制因子と相互作用し、それを転写活性化因子に変換する。CSL/NOTCH相互作用は、NOTCHのRAMドメインの存在に依存し、一方では、転写活性にはアンキリンリピートの存在も必要になる(Hsieh, J. J. et al. J. Virol. 77: 1938-45 (1997))。インビボでの研究でもインビトロでの研究でも、HESおよびHey遺伝子が、NOTCH/CSL依存性シグナル伝達の直接の標的であることが示唆されている(Nakagawa et al. Proc Natl Acad Sci USA 97: 13655-13660 (2000))。HESおよびHEY遺伝子は、N-ボックスでDNAを結合するbHLH転写抑制因子である。NOTCHは、CSL非依存性の経路によってシグナルを伝達することも提唱されている。実際、いくつかの形態のNOTCHシグナル伝達には、アンキリンリピートドメインのみの発現で必要かつ十分である(Lieber et al. Genes Dev. 7: 1949-1965 (1993))。最後に、PESTドメインは、SEL-10/ユビキチン依存性の経路によるタンパク質代謝回転に関連付け

られている(Greenwald, I. Current Opinion in Genetics & Development 4:556-62 (1994))。

【０００６】

(7;9)転座は、ICDに類似の、アミノ末端が欠失された、構成的に活性なNOTCH-1ポリペプチドをコードするNOTCH-T細胞受容体β融合遺伝子を生み出し(Ellisen et al., Cell 66:649-661 (1991); Aster et al., Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 59: 125-136 (1994))、これらのトランケートされた、かつ構成的に活性な形態のNOTCH-1がマウスモデルにおいてT細胞性急性リンパ芽球性白血病(T-ALL)を誘導する(Aster et al., Mol. Cell. Biol. 20:7505-7515 (2000))ことがこれまでに示されている。実際、NOTCH-1の活性化変異がヒトT-ALLの50%超において報告されている(Weng et al., Science 306:269-271 (2004))。NOTCH-1のHDドメイン内の白血病関連変異は、受容体をリガンド非依存性のタンパク質分解性の活性化に感受性にさせることが示されているが(Malecki et al., Mol. Cell. Biol. 26:4642-4651 (2006))、PESTドメインにおける変異は、CDC4/FBW7を媒介した細胞内切断型NOTCH-1の分解および安定化の低減につながる(Pancewicz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 707: 16619-16624 (2010))。

【０００７】

NOTCH-3、およびNOTCH-4における活性化変異は、ヒトがんでは特定されていないが、その他の哺乳動物でのこれらのNOTCH受容体の機能の異常増加がT-ALL (NOTCH-2およびNOTCH-3, Bellavia et al., Embo J. 19:3337-3348 (2000); Rohn J. Virol. 70:8071-8080 (1996); Weng et al., Mol. Cell. Biol. 23:655-664))、B細胞リンパ腫(NOTCH-2, Lee et al., Cancer Sci. 700:920-926 (2009))、ならびに乳がん(NOTCH-4, Callahan and Rafat, J. Mammary Gland Biol Neoplasia (5:23-36 (2001))を引き起こしうることが知られている。

【０００８】

ヒト固形腫瘍における新規の変異の特定は、がんの存在を特定するための補助において、およびNOTCHシグナル伝達の阻害剤に反応するがん細胞の特定において診断的に有用であり、その結果、NOTCHシグナル伝達経路の阻害剤による合理的ながん処置を指示することが可能になる。

【発明の概要】

【０００９】

本発明は、異常なNOTCH活性に依って制御不能な成長を維持するがん細胞の群の特定を提供する。ある種の態様において、本発明は、これらの細胞が変異NOTCH受容体を含み、これらの変異を診断的に用いて、NOTCH阻害剤による治療またはNOTCH活性を弱める他の因子に反応する可能性が高いがん細胞を特定できることを実証する。

【００１０】

したがって、1つの態様において、本発明は、変異体ヒトNOTCH1受容体をコードする単離されたポリヌクレオチドであって、ヒトNOTCH1遺伝子のヌクレオチド番号7279の位置に欠失を含む該ポリヌクレオチドに関する。別の態様において、変異はヌクレオチド番号7279の位置のグアニン(G)欠失である。

【００１１】

本発明は同様に、変異体ヒトNOTCH3受容体をコードする単離されたポリヌクレオチドであって、ヒトNOTCH3遺伝子の位置番号6622の位置に挿入を含む該ポリヌクレオチドに関する。別の態様において、変異は位置番号6622の位置のシトシン(C)挿入である。

【００１２】

本発明は同様に、変異体ヒトNOTCH3受容体をコードする単離されたポリヌクレオチドであって、ヒトNOTCH3遺伝子の位置番号6096の位置に挿入を含む該ポリヌクレオチドに関する。別の態様において、変異は位置番号6096の位置のシトシン(C)挿入である。

【００１３】

本発明は同様に、変異体ヒトNOTCH1受容体をコードする単離されたポリヌクレオチドであって、ヒトNOTCH1遺伝子の位置番号6733の位置に置換を含む該ポリヌクレオチドに関す

る。別の態様において、変異体ポリヌクレオチドは位置番号6733の位置にアデニン(A)またはシトシン(C)を含む。別の態様において、変異は位置番号6733の位置のグアニン(G)のアデニン(A)へのまたはグアニン(G)のシトシン(C)への置換である。

【００１４】

本発明は同様に、変異体ヒトNOTCH1受容体をコードする単離されたポリヌクレオチドであって、ヒトNOTCH1遺伝子の位置番号6788の位置に置換を含む該ポリヌクレオチドに関する。別の態様において、変異は位置番号6788の位置のアデニン(A)への置換である。別の態様において、変異は位置番号6788の位置のグアニン(G)のアデニン(A)への置換である。

【００１５】

1つの態様において、本発明は、本明細書において記述される変異NOTCH受容体によってコードされる単離されたポリペプチドに関する。さらなる態様において、本発明は、本発明のポリヌクレオチドを含むベクターに関する。1つの態様において、本発明は、本ベクターで形質転換された宿主細胞に関する。

【００１６】

1つの態様において、本発明は、神経膠腫、胃腸腫瘍、腎腫瘍、卵巣腫瘍、肝臓腫瘍、結腸直腸腫瘍、子宮内膜腫瘍、腎臓腫瘍、前立腺腫瘍、甲状腺腫瘍、神経芽細胞腫、膵臓腫瘍、多形性膠芽腫、子宮頚腫瘍、胃腫瘍、膀胱腫瘍、肝細胞腫、乳房腫瘍、結腸腫瘍、黒色腫、胆道腫瘍および頭頸部腫瘍からなる群より選択される固形腫瘍細胞が、プロリン、グルタミン酸、セリン、トレオニンに富む(PEST)ドメインにおけるまたはヒトNOTCH1のTADドメインにおける変異を含むかどうかを特定する段階を含む、NOTCH受容体シグナル伝達の増大を示す固形腫瘍細胞を特定する方法に関する。

【００１７】

別の態様において、本発明は、肺腫瘍、神経膠腫、胃腸腫瘍、腎腫瘍、卵巣腫瘍、肝臓腫瘍、結腸直腸腫瘍、子宮内膜腫瘍、腎臓腫瘍、前立腺腫瘍、甲状腺腫瘍、神経芽細胞腫、膵臓腫瘍、多形性膠芽腫、子宮頚腫瘍、胃腫瘍、膀胱腫瘍、肝細胞腫、結腸腫瘍、黒色腫、胆道腫瘍および頭頸部腫瘍からなる群より選択される固形腫瘍細胞が、ヒトNOTCH2のPESTドメインのまたはTADドメインにおける変異を含むかどうかを特定する段階を含む、NOTCH受容体シグナル伝達の増大を示す固形腫瘍細胞を特定する方法に関する。

【００１８】

別の態様において、本発明は、肺腫瘍、神経膠腫、胃腸腫瘍、腎腫瘍、卵巣腫瘍、肝臓腫瘍、結腸直腸腫瘍、子宮内膜腫瘍、腎臓腫瘍、前立腺腫瘍、甲状腺腫瘍、神経芽細胞腫、膵臓腫瘍、多形性膠芽腫、子宮頚腫瘍、胃腫瘍、膀胱腫瘍、肝細胞腫、乳房腫瘍、結腸腫瘍、黒色腫、胆道腫瘍および頭頸部腫瘍からなる群より選択される固形腫瘍細胞が、ヒトNOTCH3のPESTドメインのまたはTADドメインにおける変異を含むかどうかを特定する段階を含む、NOTCH受容体シグナル伝達の増大を示す固形腫瘍細胞を特定する方法に関する。

【００１９】

別の態様において、本発明は、肺腫瘍、神経膠腫、胃腸腫瘍、腎腫瘍、卵巣腫瘍、肝臓腫瘍、結腸直腸腫瘍、子宮内膜腫瘍、腎臓腫瘍、前立腺腫瘍、甲状腺腫瘍、神経芽細胞腫、膵臓腫瘍、多形性膠芽腫、子宮頚腫瘍、胃腫瘍、膀胱腫瘍、肝細胞腫、乳房腫瘍、結腸腫瘍、黒色腫、胆道腫瘍および頭頸部腫瘍からなる群より選択される固形腫瘍細胞が、ヒトNOTCH4のPESTドメインのまたはTADドメインにおける変異を含むかどうかを特定する段階を含む、NOTCH受容体シグナル伝達の増大を示す固形腫瘍細胞を特定する方法に関する。

【００２０】

1つの態様において、変異はミスセンス、ナンセンス、またはフレームシフト変異である。別の態様において、変異はPESTドメインのフレームシフトまたはナンセンス変異である。別の態様において、変異はヒトNOTCH1遺伝子のヌクレオチド番号7279の位置の欠失である。さらなる態様において、変異はヒトNOTCH1遺伝子のヌクレオチド番号7279の位置のグアニン(G)欠失(B40変異)である。別の態様において、変異はヒトNOTCH3遺伝子の位置番

号6622の位置の挿入である。さらなる態様において、変異はヒトNOTCH3遺伝子の位置番号6622の位置のシトシン(C)挿入(B37変異)である。別の態様において、変異はヒトNOTCH3遺伝子の位置番号6096の位置の挿入である。さらなる態様において、変異はヒトNOTCH3遺伝子の位置番号6096の位置のシトシン(C)挿入(C31変異)である。別の態様において、変異はヒトNOTCH1遺伝子の位置番号6733の位置の置換である。さらなる態様において、変異はヒトNOTCH1遺伝子の位置番号6733の位置のアデニン(A)またはシトシン(C)への置換である。さらなる態様において、変異はヒトNOTCH1遺伝子の位置番号6733の位置のグアニン(G)のアデニン(A)へのまたはグアニン(G)のシトシン(C)への置換(肺_01246変異)である。別の態様において、変異はヒトNOTCH1遺伝子の位置番号6788の位置の置換である。さらなる態様において、変異はヒトNOTCH1遺伝子の位置番号6788の位置のアデニン(A)への置換である。さらなる態様において、変異はヒトNOTCH1遺伝子の位置番号6788の位置のグアニン(G)のアデニン(A)への置換(乳房_H12932T変異)である。

【００２１】

1つの態様において、変異の存在は、抗NOTCH抗体、またはストリンジェントな条件の下で変異体NOTCHポリヌクレオチドとハイブリダイズする核酸プローブを用いて判定される。別の態様において、抗体または核酸プローブは検出可能に標識される。別の態様において、標識は、免疫蛍光標識、化学発光標識、リン光標識、酵素標識、放射性標識、アビジン/ビオチン、コロイド金粒子、着色粒子および磁性粒子からなる群より選択される。別の態様において、変異の存在は、放射免疫アッセイ法、ウエスタンブロットアッセイ法、免疫蛍光アッセイ法、酵素免疫アッセイ法、免疫沈降アッセイ法、化学発光アッセイ法、免疫組織化学アッセイ法、ドットブロットアッセイ法、スロットブロットアッセイ法またはフローサイトメトリーアッセイ法によって判定される。別の態様において、変異の存在はRT-PCRによって判定される。さらなる態様において、変異の存在はマイクロアレイによって判定される。別の態様において、変異の存在は核酸配列決定によって判定される。

【００２２】

本発明は同様に、(a) 患者由来の腫瘍細胞がヒトNOTCH受容体のPESTドメインの活性化変異を含むかどうか判定する段階、および(b) 変異の存在または非存在に基づいて患者集団を階層化する段階を含む、NOTCH阻害剤による処置に向けてがん患者集団を階層化するための方法に関する。

【００２３】

本発明は同様に、(a) 患者由来の腫瘍細胞がヒトNOTCH受容体のPESTドメインの活性化変異を含むかどうか判定する段階、および(b) 腫瘍細胞が変異を含む患者を選択する段階を含む、NOTCH阻害剤による処置に向けて患者を選択するための方法に関する。

【００２４】

本発明は同様に、患者由来の腫瘍細胞がヒトNOTCH受容体のPESTドメインの活性化変異を含むかどうか判定する段階を含み、変異が存在する場合、患者が治療に反応する可能性が高いことが示される、がんと診断された患者がNOTCH阻害剤に基づく治療に反応する可能性が高いかどうか判定するための方法に関する。

【００２５】

本発明は同様に、患者由来の腫瘍細胞がヒトNOTCH受容体のPESTドメインの活性化変異を含むかどうか判定する段階を含み、変異が存在する場合、患者がNOTCH阻害剤による処置に対する好ましい反応を有することが予測される、がんと診断された患者にNOTCH阻害剤を投与すべきかどうか判定するための方法に関する。

【００２６】

本発明は同様に、患者由来の腫瘍細胞がヒトNOTCH受容体のPESTドメインの活性化変異を含むかどうか判定する段階を含み、いずれかの変異が存在する場合、患者が治療に反応する可能性が高いことが示され、変異の存在により、患者がNOTCH阻害剤による処置に対する好ましい反応を有することが予測される、がんと診断された患者にNOTCH阻害剤による処置を続けるべきかどうか判定するための方法に関する。

【００２７】

本発明は同様に、患者由来の腫瘍細胞がヒトNOTCH受容体のPESTドメインの活性化変異を含むかどうか判定する段階を含み、変異の存在はNOTCH阻害剤の治療効力を示す、患者においてがんを処置するためにNOTCH阻害剤の治療効力を判定するための方法に関する。

【００２８】

1つの態様において、患者はヒトである。1つの態様において、変異はNOTCHシグナル伝達を増大する。別の態様において、患者由来の腫瘍細胞の少なくとも約0.1%、少なくとも約1%、少なくとも約2%、または少なくとも約5%が変異を含む。別の態様において、NOTCH受容体はNOTCH1またはNOTCH3である。別の態様において、変異はミスセンス、ナンセンス、またはフレームシフト変異である。さらなる態様において、変異はPESTドメインのフレームシフトまたはナンセンス変異である。別の態様において、変異はヒトNOTCH1遺伝子のヌクレオチド番号7279の位置の欠失である。別の態様において、変異はヒトNOTCH1遺伝子のヌクレオチド番号7279の位置のグアニン(G)欠失(B40変異)である。別の態様において、変異はヒトNOTCH3遺伝子の位置番号6622の位置の挿入である。別の態様において、変異はヒトNOTCH3遺伝子の位置番号6622の位置のシトシン(C)挿入(B37変異)である。別の態様において、変異はヒトNOTCH3遺伝子の位置番号6096の位置の挿入である。さらなる態様において、変異はヒトNOTCH3遺伝子の位置番号6096の位置のシトシン(C)挿入(C31変異)である。別の態様において、変異はヒトNOTCH1遺伝子の位置番号6733の位置の置換である。さらなる態様において、変異はヒトNOTCH1遺伝子の位置番号6733の位置のアデニン(A)またはシトシン(C)への置換である。さらなる態様において、変異はヒトNOTCH1遺伝子の位置番号6733の位置のグアニン(G)のアデニン(A)へのまたはグアニン(G)のシトシン(C)への置換(肺_01246変異)である。別の態様において、変異はヒトNOTCH1遺伝子の位置番号6788の位置の置換である。さらなる態様において、変異はヒトNOTCH1遺伝子の位置番号6788の位置のアデニン(A)への置換である。さらなる態様において、変異はヒトNOTCH1遺伝子の位置番号6788の位置のグアニン(G)のアデニン(A)への置換(乳房_H12932T変異)である。

【００２９】

1つの態様において、本方法は、患者から生体サンプルを得る段階をさらに含む。別の態様において、サンプルは全血、血漿、血清または組織である。別の態様において、がんは、肺がん、胃腸がん、腎がん、卵巣がん、肝臓がん、結腸直腸がん、子宮内膜がん、腎臓がん、前立腺がん、甲状腺がん、神経芽細胞腫、膵臓がん、多形性膠芽腫、子宮頚がん、胃がん、膀胱がん、乳がん、結腸がん、黒色腫、胆道がんおよび頭頸部がんからなる群より選択される。

【００３０】

1つの態様において、変異の存在は、抗NOTCH抗体、またはストリンジェントな条件の下で変異体NOTCHポリヌクレオチドとハイブリダイズする核酸プローブを用いて判定される。別の態様において、抗体または核酸プローブは検出可能に標識される。別の態様において、標識は、免疫蛍光標識、化学発光標識、リン光標識、酵素標識、放射性標識、アビジン/ビオチン、コロイド金粒子、着色粒子および磁性粒子からなる群より選択される。別の態様において、変異の存在は、放射免疫アッセイ法、ウエスタンブロットアッセイ法、免疫蛍光アッセイ法、酵素免疫アッセイ法、免疫沈降アッセイ法、化学発光アッセイ法、免疫組織化学アッセイ法、ドットブロットアッセイ法またはスロットブロットアッセイ法によって判定される。別の態様において、変異の存在はRT-PCRによって判定される。別の態様において、変異の存在はマイクロアレイによって判定される。別の態様において、変異の存在は核酸配列決定によって判定される。

【００３１】

1つの態様において、本方法は、NOTCH阻害剤を患者に投与する段階をさらに含む。別の態様において、NOTCH阻害剤は、γ-セクレターゼ阻害剤または抗NOTCH抗体である。別の態様において、γ-セクレターゼ阻害剤は、III-31-C; N-[N-(3,5-ジフルオロフェンアセチル)-L-アラニル]S-フェニルグリシンt-ブチルエステル) (DAPT); 化合物E; D-らせん状ペプチド294; イソクマリン; BOC-Lys(Cbz)Ile-Leu-エポキシド; および(Z-LL)2-ケトンからなる群より選択される。別の態様において、抗NOTCH抗体は抗NOTCH1抗体である。別

の態様において、抗NOTCH1抗体はNOTCH1受容体へのリガンド結合を遮断する。別の態様において、抗NOTCH1抗体はNOTCH1受容体の切断を遮断する。別の態様において、抗NOTCH1抗体は、CDRアミノ酸配列CDR1 (SEQ ID NO:5)、CDR2 (SEQ ID NO:6)およびCDR3 (SEQ ID NO:7)を含んだ重鎖可変領域、ならびにCDRアミノ酸配列CDR1 (SEQ ID NO:8); CDR2 (SEQ ID NO:9); およびCDR3 (SEQ ID NO:10)を含んだ軽鎖可変領域を含む。別の態様において、抗NOTCH抗体は抗NOTCH3抗体である。別の態様において、抗NOTCH3抗体はNOTCH3受容体へのリガンド結合を遮断する。別の態様において、抗NOTCH3抗体はNOTCH3受容体の切断を遮断する。別の態様において、抗NOTCH3抗体は、CDRアミノ酸配列CDR1 (SEQ ID NO:23)、CDR2 (SEQ ID NO:24)およびCDR3 (SEQ ID NO:25)を含んだ重鎖可変領域、ならびにCDRアミノ酸配列CDR1 (SEQ ID NO:26); CDR2 (SEQ ID NO:27); およびCDR3 (SEQ ID NO:28)を含んだ軽鎖可変領域を含む。

【００３２】

本発明は同様に、患者における固形腫瘍細胞の少なくとも1つがヒトNOTCH1遺伝子における活性化変異を含む、患者に、NOTCH1阻害剤の治療的有効量を投与する段階を含む、固形腫瘍を有する患者においてがんを処置する方法に関する。本発明は同様に、患者における乳房腫瘍細胞の少なくとも1つがヒトNOTCH1遺伝子における活性化変異を含む、患者に、NOTCH1阻害剤の治療的有効量を投与する段階を含む、乳房腫瘍を有する患者において乳がんを処置する方法に関する。1つの態様において、活性化変異はPESTドメインのものである。別の態様において、変異はNOTCHシグナル伝達を増大する。別の態様において、変異はヒトNOTCH1遺伝子のヌクレオチド番号7279の位置のグアニン欠失を含む。さらなる態様において、変異はヒトNOTCH1遺伝子の位置番号6733の位置のグアニン(G)のアデニン(A)へのまたはグアニン(G)のシトシン(C)への置換(肺_01246変異)である。別の態様において、変異はヒトNOTCH1遺伝子の位置番号6788の位置のグアニン(G)のアデニン(A)への置換(乳房_H12932T変異)である。

【００３３】

本発明は同様に、患者における固形腫瘍細胞の少なくとも1つがヒトNOTCH3遺伝子における活性化変異を含む、患者に、NOTCH3阻害剤の治療的有効量を投与する段階を含む、固形腫瘍を有する患者においてがんを処置する方法に関する。本発明は同様に、患者における乳房腫瘍細胞の少なくとも1つがヒトNOTCH3遺伝子における活性化変異を含む、患者に、NOTCH3阻害剤の治療的有効量を投与する段階を含む、乳房腫瘍を有する患者において乳がんを処置する方法に関する。1つの態様において、活性化変異はPESTドメインのものである。別の態様において、変異はNOTCHシグナル伝達を増大する。別の態様において、変異はヒトNOTCH3遺伝子の位置番号6622の位置のシトシン挿入を含む。さらなる態様において、変異はヒトNOTCH3遺伝子の位置番号6096の位置のシトシン(C)挿入(C31変異)である。

【００３４】

1つの態様において、患者はヒトである。1つの態様において、患者由来の腫瘍細胞の少なくとも約0.1%、少なくとも約1%、少なくとも約2%、または少なくとも約5%が変異を含む。別の態様において、NOTCH1阻害剤は、γ-セクレターゼ阻害剤または抗NOTCH1抗体である。別の態様において、γ-セクレターゼ阻害剤は、III-31-C; N-[N-(3,5-ジフルオロフェンアセチル)-L-アラニル]S-フェニルグリシンt-ブチルエステル) (DAPT); 化合物E; D-らせん状ペプチド294; イソクマリン; BOC-Lys(Cbz)Ile-Leu-エポキシド; および(Z-LL)2-ケトンからなる群より選択される。別の態様において、抗NOTCH1抗体はNOTCH1受容体へのリガンド結合を遮断する。別の態様において、抗NOTCH1抗体はNOTCH1受容体の切断を遮断する。

【００３５】

1つの態様において、抗NOTCH1抗体は、CDRアミノ酸配列CDR1 (SEQ ID NO:5)、CDR2 (SEQ ID NO:6)およびCDR3 (SEQ ID NO:7)を含んだ重鎖可変領域、ならびにCDRアミノ酸配列CDR1 (SEQ ID NO:8); CDR2 (SEQ ID NO:9); およびCDR3 (SEQ ID NO:10)を含んだ軽鎖可変領域を含む。1つの態様において、抗NOTCH1抗体は、SEQ ID NO:14の重鎖可変領域配列およびSEQ ID NO:18の軽鎖可変領域配列を含む。別の態様において、抗NOTCH1抗体はOMP-52

M51である。

【００３６】

1つの態様において、NOTCH3阻害剤は、γ-セクレターゼ阻害剤または抗NOTCH3抗体から選択される。別の態様において、γ-セクレターゼ阻害剤は、III-31-C; N-[N-(3,5-ジフルオロフェンアセチル)-L-アラニル]S-フェニルグリシンt-ブチルエステル) (DAPT); 化合物E; D-らせん状ペプチド294; イソクマリン; BOC-Lys(Cbz)Ile-Leu-エポキシド; および(Z-LL)2-ケトンからなる群より選択される。別の態様において、抗NOTCH3抗体はNOTCH3受容体へのリガンド結合を遮断する。別の態様において、抗NOTCH3抗体はNOTCH3受容体の切断を遮断する。別の態様において、抗NOTCH3抗体は、CDRアミノ酸配列CDR1 (SEQ ID NO:23)、CDR2 (SEQ ID NO:24)およびCDR3 (SEQ ID NO:25)を含んだ重鎖可変領域、ならびにCDRアミノ酸配列CDR1 (SEQ ID NO:26); CDR2 (SEQ ID NO:27); およびCDR3 (SEQ ID NO:28)を含んだ軽鎖可変領域を含む。(59R5)

【００３７】

1つの態様において、患者は三重陰性の乳がん細胞を含む。

【００３８】

1つの態様において、本方法は第2の治療剤を投与する段階をさらに含む。

【００３９】

別の態様において、患者はがん治療に以前は失敗した。別の態様において、患者は化学療法耐性乳がんを有する。

【００４０】

本発明は同様に、(a) インキュベーションがγ-セクレターゼの存在下で行われる、変異体NOTCH受容体を発現する細胞との試験化合物のインキュベーションを行う段階、(b) 段階(a)での受容体活性の量を、試験化合物の非存在下で行われたインキュベーションの活性と比較する段階を含み、試験化合物の存在下で観察された活性が試験化合物の非存在下で観察された活性に満たないなら、試験化合物は細胞成長を阻害する、変異NOTCH受容体の存在によって誘導された異常な細胞成長を阻害する試験化合物を特定する方法に関する。

【００４１】

本発明は同様に、本発明の変異NOTCH受容体を特異的に検出するための少なくとも1つの試薬を含んだキットに関する。1つの態様において、試薬は、本発明の変異NOTCH受容体を結合する抗体または核酸プローブである。

【００４２】

本発明のさらなる目的および利点は、以降の説明の中で部分的に記載されており、その説明から部分的に明らかになるものと考えられ、または本発明の日常的な実践によって知ることができる。本発明の目的および利点は、添付の特許請求の範囲において特に指摘されている要素および組み合わせによって理解され実現されよう。前述の一般的な説明および後述の詳細な説明の両方ともに例示および説明に過ぎず、主張される本発明を限定するものではないことが理解されるべきである。

【００４３】

本発明は、異常なNOTCH活性に依って制御不能な成長を維持するがん細胞の群の特定をさらに提供する。ある種の態様において、本発明は、これらの細胞が対照サンプルのレベルを上回るまたは別の参照レベルを上回るNOTCH ICDのレベルを含むこと、および腫瘍細胞におけるNOTCH ICDのレベルを診断的に用いて、NOTCH阻害剤による治療またはNOTCH活性を弱める他の因子に反応する可能性が高いがん細胞を特定できることを実証する。

【００４４】

したがって、1つの態様において、本発明は、(a) 患者由来の腫瘍細胞におけるNOTCH ICDのレベルを判定する段階、および(b) 腫瘍細胞におけるNOTCH ICDのレベルに基づいて患者集団を階層化する段階を含む、NOTCH阻害剤による処置に向けてがん患者集団を階層化するための方法に関する。

【００４５】

別の態様において、本発明は、(a) 患者由来の腫瘍細胞におけるNOTCH ICDのレベルを判定する段階、および(b) 腫瘍細胞が対照サンプルのレベルを上回るまたは参照レベルを上回るNOTCH ICDのレベルを含む患者を選択する段階を含む、NOTCH阻害剤による処置に向けて患者を選択するための方法に関する。本発明は同様に、(a) 抗NOTCH1 ICD抗体を用いた免疫組織化学アッセイ法において患者由来の固形腫瘍細胞におけるNOTCH1 ICDのレベルを判定する段階、および(b) 固形腫瘍細胞がアッセイ法において約30またはそれ以上(また、あるいは、アッセイ法において約100またはそれ以上)のH-スコアを受ける患者を処置に向けて選択する段階を含む、NOTCH1阻害剤(例えば、OMP-52M51)による処置に向けてがん患者を選択するための方法を提供する。

【００４６】

別の態様において、本発明は、患者由来の腫瘍細胞におけるNOTCH ICDのレベルを判定する段階を含み、NOTCH ICDのレベルが参照レベルを上回るまたは対照サンプルのレベルを上回る場合、患者が治療に反応する可能性が高いことが示される、がんと診断された患者がNOTCH阻害剤に基づく治療に反応する可能性が高いかどうか判定するための方法に関する。

【００４７】

別の態様において、本発明は、患者由来の腫瘍細胞におけるNOTCH ICDのレベルを判定する段階を含み、NOTCH ICDのレベルが参照レベルを上回るまたは対照サンプルのレベルを上回る場合、患者がNOTCH阻害剤による処置に対する好ましい反応を有することが予測される、がんと診断された患者にNOTCH阻害剤を投与すべきかどうか判定するための方法に関する。

【００４８】

別の態様において、本発明は、患者由来の腫瘍細胞におけるNOTCH ICDのレベルを判定する段階を含み、NOTCH ICDのレベルが参照レベルを上回るまたは対照サンプルのレベルを上回る場合、患者がNOTCH阻害剤による治療に反応する可能性が高いことが示される、がんと診断された患者がNOTCH阻害剤による処置を続けるべきかどうか判定する方法に関する。

【００４９】

別の態様において、本発明は、患者由来の腫瘍細胞におけるNOTCH ICDのレベルを判定する段階を含み、参照レベルを上回るまたは対照サンプルのレベルを上回るNOTCH ICDのレベルは、NOTCH阻害剤の治療効力を示す、患者においてがんを処置するためにNOTCH阻害剤の治療効力を判定するための方法に関する。

【００５０】

いくつかの態様において、NOTCH ICDはNOTCH1 ICDである。代替的な態様において、NOTCH ICDはNOTCH3 ICDである。さらなる態様において、NOTCH ICDのレベルは腫瘍細胞の核内のNOTCH ICDのレベルである。

【００５１】

さらなる態様において、本方法は、患者から生体サンプルを得る段階をさらに含む。さらなる態様において、サンプルは全血、血漿、血清または組織である。

【００５２】

さらなる態様において、がんは、肺がん、胃腸がん、腎がん、卵巣がん、肝臓がん、結腸直腸がん、子宮内膜がん、腎臓がん、前立腺がん、甲状腺がん、神経芽細胞腫、膵臓がん、多形性膠芽腫、子宮頸がん、胃がん、膀胱がん、乳がん、結腸がん、黒色腫、胆道がんおよび頭頸部がんからなる群より選択される。さらなる態様において、がんは乳がんである。さらなる態様において、がんは小細胞がん、小細胞肺がん、胃がん、食道がん、肝細胞がん、または胆管がんである。

【００５３】

さらなる態様において、NOTCH ICDレベルは、NOTCH ICDに特異的に結合する薬剤を用いて判定される。さらなる態様において、薬剤は抗NOTCH ICD抗体である。さらなる態様において、抗NOTCH ICD抗体は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体である。

【００５４】
さらなる態様において、薬剤は検出可能に標識される。さらなる態様において、標識は、免疫蛍光標識、化学発光標識、リン光標識、酵素標識、放射性標識、アビジン/ビオチン、コロイド金粒子、着色粒子および磁性粒子からなる群より選択される。
【００５５】
さらなる態様において、NOTCH ICDのレベルは、放射免疫アッセイ法、免疫蛍光アッセイ法、酵素免疫アッセイ法、化学発光アッセイ法、または免疫組織化学アッセイ法によって判定される。さらなる態様において、NOTCH ICDのレベル(および/またはそのレベルが比較される参照レベル)は、H-スコアによって特徴付けられる。
【００５６】
さらなる態様において、本方法は、NOTCH阻害剤を患者に投与する段階をさらに含む。
【００５７】
別の態様において、本発明は、(a) 固形腫瘍細胞におけるNOTCH ICDのレベルを判定する段階、および(b) 患者にNOTCH阻害剤の治療的有効量を投与する段階を含む、固形腫瘍を有する患者においてがんを処置する方法に関する。ある種の態様において、NOTCH ICDはNOTCH1 ICDであり、NOTCH阻害剤はNOTCH1阻害剤(例えば、OMP-52M51)であり、かつ固形腫瘍細胞は、抗NOTCH1 ICD抗体を用いた免疫組織化学アッセイ法において約30またはそれ以上のH-スコアを有するものと判定される。ある種の代替的な態様において、固形腫瘍細胞は、アッセイ法において約100またはそれ以上のH-スコアを有するものと判定される。
【００５８】
さらなる態様において、NOTCH阻害剤は、γ-セクレターゼ阻害剤または抗NOTCH抗体である。さらなる態様において、γ-セクレターゼ阻害剤は、III-31-C; N-[N-(3,5-ジフルオロフェンアセチル)-L-アラニル]S-フェニルグリシンt-ブチルエステル) (DAPT); 化合物E; D-らせん状ペプチド294; イソクマリン; BOC-Lys(Cbz)Ile-Leu-エポキシド; および(Z-LL)2-ケトンからなる群より選択される。
【００５９】
さらなる態様において、抗NOTCH抗体は抗NOTCH1抗体である。さらなる態様において、抗NOTCH1抗体はNOTCH1受容体へのリガンド結合を遮断する。さらなる態様において、抗NOTCH1抗体はNOTCH1受容体の切断を遮断する。さらなる態様において、抗NOTCH1抗体は、CDRアミノ酸配列CDR1 (SEQ ID NO:5)、CDR2 (SEQ ID NO:6)およびCDR3 (SEQ ID NO:7)を含んだ重鎖可変領域、ならびにCDRアミノ酸配列CDR1 (SEQ ID NO:8); CDR2 (SEQ ID NO:9); およびCDR3 (SEQ ID NO:10)を含んだ軽鎖可変領域を含む。1つの態様において、抗NOTCH1抗体は、SEQ ID NO:14の重鎖可変領域配列およびSEQ ID NO:18の軽鎖可変領域配列を含む。別の態様において、抗NOTCH1抗体はOMP-52M51である。
【００６０】
さらなる態様において、抗NOTCH抗体は抗NOTCH3抗体である。さらなる態様において、抗NOTCH3抗体はNOTCH3受容体へのリガンド結合を遮断する。さらなる態様において、抗NOTCH3抗体はNOTCH3受容体の切断を遮断する。さらなる態様において、抗NOTCH3抗体は、CDRアミノ酸配列CDR1 (SEQ ID NO:23)、CDR2 (SEQ ID NO:24)およびCDR3 (SEQ ID NO:25)を含んだ重鎖可変領域、ならびにCDRアミノ酸配列CDR1 (SEQ ID NO:26); CDR2 (SEQ ID NO:27); およびCDR3 (SEQ ID NO:28)を含んだ軽鎖可変領域を含む。1つの態様において、抗NOTCH3抗体は、SEQ ID NO:30の重鎖可変領域配列およびSEQ ID NO:32の軽鎖可変領域配列を含む。1つの態様において、抗NOTCH3抗体は59R5である。
【００６１】
さらなる態様において、患者はヒトである。
【００６２】
別の態様において、本発明は、患者にNOTCH1阻害剤の治療的有効量を投与する段階を含み、患者における固形腫瘍細胞は、(a) 参照レベルを上回るもしくは対照サンプルにおいて見出されるレベルを上回るレベルでNOTCH1 ICDを含む、または(b) 抗NOTCH1 ICD抗体を用いた免疫組織化学アッセイ法において約30またはそれ以上(また、あるいは、約100また

はそれ以上)のH-スコアによって特徴付けられる、固形腫瘍を有する患者においてがんを処置する方法に関する。

【００６３】

さらなる態様において、NOTCH1阻害剤は、γ-セクレターゼ阻害剤または抗NOTCH1抗体である。さらなる態様において、γ-セクレターゼ阻害剤は、III-31-C; N-[N-(3,5-ジフルオロフェンアセチル)-L-アラニル]S-フェニルグリシンt-ブチルエステル) (DAPT); 化合物E; D-らせん状ペプチド294; イソクマリン; BOC-Lys(Cbz)Ile-Leu-エポキシド; および(Z-LL)2-ケトンからなる群より選択される。

【００６４】

さらなる態様において、抗NOTCH1抗体はNOTCH1受容体へのリガンド結合を遮断する。さらなる態様において、抗NOTCH1抗体はNOTCH1受容体の切断を遮断する。さらなる態様において、抗NOTCH1抗体は、CDRアミノ酸配列CDR1 (SEQ ID NO:5)、CDR2 (SEQ ID NO:6)およびCDR3 (SEQ ID NO:7)を含んだ重鎖可変領域、ならびにCDRアミノ酸配列CDR1 (SEQ ID NO:8); CDR2 (SEQ ID NO:9); およびCDR3 (SEQ ID NO:10)を含んだ軽鎖可変領域を含む。

【００６５】

さらなる態様において、患者はヒトである。

【００６６】

さらなる態様において、本方法は第2の治療剤を投与する段階をさらに含む。

【００６７】

さらなる態様において、患者はがん治療に以前は失敗した。さらなる態様において、患者は三重陰性の乳がん細胞を含む。さらなる態様において、患者は化学療法耐性乳がんを有する。

【００６８】

さらなる態様において、患者は小細胞がん、小細胞肺がん、胃がん、食道がん、肝細胞がん、または胆管がんを有する。

【００６９】

さらなる態様において、NOTCH ICDレベルは、NOTCH ICDに特異的に結合する薬剤を用いて判定される。さらなる態様において、薬剤は抗NOTCH ICD抗体である。さらなる態様において、抗NOTCH ICD抗体は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体である。

【００７０】

さらなる態様において、薬剤は検出可能に標識される。さらなる態様において、標識は、免疫蛍光標識、化学発光標識、リン光標識、酵素標識、放射性標識、アビジン/ビオチン、コロイド金粒子、着色粒子および磁性粒子からなる群より選択される。

【００７１】

さらなる態様において、NOTCH ICDのレベルは、放射免疫アッセイ法、免疫蛍光アッセイ法、酵素免疫アッセイ法、化学発光アッセイ法、または免疫組織化学アッセイ法によって判定される。さらなる態様において、NOTCH ICDのレベルは、H-スコアによって特徴付けられる。

【図面の簡単な説明】

【００７２】

【図１】新たに特定されたOMP-B40およびOMP-B37 NOTCH変異の略図。(A) OMP-B40変異は、ヒトNOTCH1遺伝子のヌクレオチド部位7279の位置でのグアニン(G)のヘテロ接合性の欠失として特徴付けられる。この欠失は、NOTCH1のPESTドメインの読み枠のシフト(G2427fs)を引き起こす。(B) OMP-B37変異は、ヒトNOTCH3遺伝子におけるヌクレオチド部位6622の位置でのシトシン(C)のホモ接合性の挿入として特徴付けられ、これはPESTドメインのアミノ酸位置番号2208での読み枠のシフト(P2208fs)を引き起こす。NOTCHの略図は、Weng et al., Science 306:269-271 (2004)から借用された。

【図２】OMP-B40またはOMP-B37変異を含む異種移植片腫瘍におけるNOTCH発現の分析。(A) 抗NOTCH1.ICD抗体は、切断されたNOTCH1細胞内ドメイン(NOTCH1.ICD)に対して特異的に反応し、OMP-B40異種移植片腫瘍の核画分中の、トランケートされ、切断されたNOTCH1細

胞内ドメインを検出する。(B) 抗NOTCH3.ICD抗体は、切断されたNOTCH3.ICDに対して特異的に反応し、OMP-B37異種移植片腫瘍の核画分中の、トランケートされ、切断されたNOTCH3.ICDを検出する。(C) トランケートされたNOTCH1 ICDおよびトランケートされたNOTCH3 ICDは、OMP-B40およびOMP-B37異種移植片腫瘍の核画分中に主に見出される。これらの2種の腫瘍株は、それぞれ、NOTCH1およびNOTCH3のPESTドメインの変異を保有する。核NOTCH1 ICDおよびNOTCH3 ICDは、野生型NOTCH1を保有するOMP-C31およびOMP-OV38異種移植片腫瘍において検出されないが、しかしOMP-C31はNOTCH3遺伝子の中に6172insC(het) [P2033fs]変異を含む。

【図３】OMP-B40乳房腫瘍におけるNOTCH1アンタゴニストの活性。(A) OMP-B40腫瘍におけるOMP-52M51ヒト化抗NOTCH1抗体の用量依存的活性。(B) 抗NOTCH1抗体OMP-52M51、タキソール、またはOMP-52M51およびタキソールの組み合わせをOMP-B40異種移植片マウスに投与した。OMP-52M51は、単独またはタキソールとの組み合わせのいずれかで、異種移植動物における腫瘍容積を大いに減少させた。(CおよびD) OMP-52M51抗NOTCH1抗体は、NOTCH1活性化変異を有する乳がんモデルにおいてNOTCH1.ICDの蓄積を遮断する。単剤としてまたはタキソールと組み合わせて用いられるOMP-52M51抗NOTCH1は、IHCアッセイ法によって検出されるようにNOTCH1.ICDの蓄積を阻害する。

【図４】抗NOTCH1処置OMP-B40乳房腫瘍の腫瘍形成性。対照抗体で処理された腫瘍およびOMP-52M51ヒト化抗NOTCH1抗体で処理された腫瘍由来の腫瘍細胞を各10匹のマウスへ注射した。腫瘍をさらなる処理なしに92日間成長させた。OMP-B40腫瘍は、対照抗体で処理した細胞を注射したマウス10匹の各々において成長したが、OMP-52M51で予め処理した細胞を注射したマウス10匹のうち2匹しか92日目の時点で検出可能な腫瘍成長を引き起こさず、OMP-52M51による処理が細胞の、その後の腫瘍形成性を低減させることを示唆していた。

【図５】OMP-B37乳房腫瘍におけるNOTCH2/3アンタゴニストの活性。抗NOTCH2/3抗体59R5または対照抗体をOMP-B37異種移植片マウスに投与した。59R5は対照抗体の投与と比べて異種移植動物において腫瘍容積を大いに減少させた。

【図６】OMP-B37乳房腫瘍における抗NOTCH2/3抗体の活性。抗NOTCH2/3抗体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OMP-B37異種移植片マウスに投与した。(A) 59R5は、単独またはタキソールとの組み合わせのいずれかで、異種移植動物における腫瘍容積を大いに減少させた。(B) 59R5抗NOTCH2/3抗体は、E-カドヘリンの発現を増加させ、上皮間葉移行(EMT)の反転を示す。

【図７】(A) OMP-C31におけるNOTCH3フレームシフト変異のサンガークロマトグラム。(B) 肺_01246におけるNOTCH1ミスセンス変異のサンガークロマトグラム。(C) 乳房_H12932TにおけるNOTCH1ミスセンス変異のサンガークロマトグラム。NOTCHの略図は、Weng et al., Science 306:269-271 (2004)から借用された。

【図８】免疫組織化学による活性化NOTCH1-ICDの核局在性。

【図９】(A) 固形腫瘍におけるNOTCH1.ICDスクリーニング。H-スコア ≧ 30を有するサンプルの頻度が示されている。(B) 食道がんサンプルのN1.ICD IHC分析。(C) 胃がんにおけるNOTCH1.ICDスクリーニング。H-スコア ≧ 30を有するサンプルの頻度が示されている。

【図１０】OMP-LU61小細胞肺がんでのOMP-52M51ヒト化抗NOTCH1抗体の活性。

【図１１】OMP-C63結腸がんでのOMP-52M51ヒト化抗NOTCH1抗体の活性。

【図１２】OMP-C11、OMP-C20およびOMP-C40腫瘍細胞におけるイリノテカンとの組み合わせでのOMP-52M51ヒト化抗NOTCH1抗体の活性。

【図１３】NOTCH1およびNOTCH3変異体のルシフェラーゼアッセイ法。(A) PC3細胞に、NOTCH1全長野生型(NOTCH1_WT)ポリペプチドまたはNOTCH1_G2427fs変異体(OMP-B40)ポリペプチドをコードするDNAを一過性に形質移入した。NOTCHシグナル伝達を介したルシフェラーゼ活性を外因性リガンドの非存在下で評価した。(B) PC3細胞およびA549細胞に、NOTCH3全長野生型(NOTCH3_WT)ポリペプチド、NOTCH3_P2033fs変異体(OMP-C31)ポリペプチド、またはNOTCH3_P2208fs変異体(OMP-B37)ポリペプチドをコードするDNAを一過性に形質移入した。NOTCHルシフェラーゼ活性を外因性リガンドの非存在下で評価した。(C) NOTCH3_P2033fs (OMP-C31)ポリペプチドをコードするDNAを一過性に形質移入したPC3細胞におけるJAG

1 (1～500 ng/30μL)の用量反応曲線。(D) NOTCH3_P2208fs (OMP-B37)コードDNAを一過性に形質移入したPC3細胞におけるJAG1 (1～500 ng/30μL)の用量反応曲線。＊ = t-検定を用いたNOTCH全長WT vs N3.変異体のp-値 <.05。

【図１４】A2G1抗NOTCH1抗体による処置はγセクレターゼ阻害剤(GSI)による処置よりも、重症度の低い胃腸毒性を有するOMP-B40乳房腫瘍モデルにおいて腫瘍成長およびNOTCH1 ICD蓄積を阻害する。

【図１５】OMP-C31結腸腫瘍での59R5抗NOTCH2/3抗体の活性。

【図１６】52M51抗NOTCH1抗体は、ルシフェラーゼレポーターアッセイ法で測定したときに、G2427fs (OMP-B40)およびR2328W NOTCH1_変異体ポリペプチドの活性を阻害する。図16AおよびBは、漸増濃度の52M51抗体の存在下、それぞれ、DLL4およびJAG1での刺激後にG2427fs (OMP-B40) NOTCH1_変異体ポリペプチド発現PC3細胞において観察された蛍ルシフェラーゼとウミシイタケルシフェラーゼ活性の比率を示す。図16CおよびDは、漸増濃度の52M51抗体の存在下、それぞれ、DLL4およびJAG1での刺激後にR2328W NOTCH1_変異体ポリペプチド発現PC3細胞において観察された蛍ルシフェラーゼとウミシイタケルシフェラーゼ活性の比率を示す。また、図16A～Dの全てが、組み換えNOTCH1ポリペプチドを発現していなかった対照PC3細胞で得られたデータを含む。

【図１７】OMP-B37乳房腫瘍でのNOTCH2/3アンタゴニストの活性。OMP-59R5抗NOTCH2/3抗体は、NOTCH3活性化変異を有する乳がんモデルでのNOTCH3.ICDの蓄積を遮断する。

【発明を実施するための形態】

【００７３】

態様の説明

I. 定義

本発明の目的のため、以下の用語を下記に定義する。

【００７４】

用語「1つの(a)」または「1つの(an)」実体は、その実体の1つまたは複数をいうことに留意されたい。例えば、「1つのNOTCH受容体ポリペプチド」は、NOTCH受容体アミノ酸を含む1つまたは複数のポリペプチドを表すと理解される。したがって、「1つの(a) (または1つの(an))」、「1つまたは複数の」および「少なくとも1つの」という用語は、本明細書において互換的に用いることができる。

【００７５】

本明細書において用いられる場合、「ポリペプチド」という用語は単数の「ポリペプチド」および複数の「ポリペプチド」を包含するよう意図され、アミド結合(ペプチド結合としても知られる)によって直線的に連結された単量体(アミノ酸)で構成された分子をいう。「ポリペプチド」という用語は、2つまたはそれ以上のアミノ酸の任意の鎖をいい、特定の長さの産物をいうものではない。したがって、ペプチド、ジペプチド、トリペプチド、オリゴペプチド、「タンパク質」、「アミノ酸鎖」または2つもしくはそれ以上のアミノ酸の鎖をいうために用いられるその他任意の用語は、「ポリペプチド」の定義の範囲内に含まれ、「ポリペプチド」という用語はこれらの用語のいずれかに代えて、またはこれらの用語のいずれかと互換的に用いることができる。「ポリペプチド」という用語は同様に、限定されるものではないが、グリコシル化、アセチル化、リン酸化、アミド化、公知の保護基/遮断基による誘導体化、タンパク質分解的切断、または非天然のアミノ酸による修飾を含む、ポリペプチドの発現後修飾の産物をいうよう意図される。ポリペプチドは天然の生物学的供給源に由来してもまたは組み換え技術により産生されてもよいが、必ずしも指定の核酸配列から翻訳されるものではない。ポリペプチドは化学合成によるなどの、いかなる方法によって作出されてもよい。

【００７６】

「単離された」生体成分(核酸分子またはタンパク質のような)は、この成分が天然に存在する生物の細胞中の他の生体成分、すなわち、他の染色体および染色体外のDNAおよびRNA、タンパク質ならびにオルガネラから実質的に分離され、または精製されている。「単離された」核酸およびタンパク質には、標準的な精製方法によって精製された核酸および

タンパク質が含まれる。この用語はまた、宿主細胞での組み換え発現によって調製された核酸およびタンパク質、ならびに化学合成された核酸を包含する。

【００７７】

「ポリヌクレオチド」という用語は、単数形または複数形で用いられる場合、非修飾RNAもしくはDNAまたは修飾RNAもしくはDNAであってよい、任意のポリリボヌクレオチドまたはポリデオキシリボヌクレオチドを一般的にいう。したがって、例えば、本明細書において定義されるポリヌクレオチドは、非限定的に、一本鎖および二本鎖DNA、一本鎖および二本鎖領域を含むDNA、一本鎖および二本鎖RNA、ならびに一本鎖および二本鎖領域を含むRNA、一本鎖もしくは、より典型的には、二本鎖でありうるまたは一本鎖および二本鎖領域を含むDNAおよびRNAを含んだハイブリッド分子を含む。したがって、安定性のためにまたは他の理由のために修飾された骨格を有するDNAまたはRNAは、本明細書において意図される「ポリヌクレオチド」である。さらに、イノシンのような、異常塩基、またはトリチル化塩基のような、修飾塩基を含むDNAまたはRNAは、本明細書において定義される「ポリヌクレオチド」という用語のなかに含まれる。一般に、「ポリヌクレオチド」という用語は非修飾ポリヌクレオチドの、全ての、化学的に、酵素的におよび/または代謝的に修飾された形態を包含する。ポリヌクレオチドは、インビトロでの組み換えDNA媒介技法を含む、種々の方法により、ならびに細胞および生物内でのDNAの発現により作出されうる。

【００７８】

本明細書において用いられる「天然(の)」または「野生型」という用語は、対象物に適用される場合、自然界において対象物を見出すことができるという事実をいう。例えば、天然源から単離でき、かつ人間によって実験室内でまたは別の方法で意図的に改変されていない、生物(ウイルスを含む)に存在するポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列は、「野生型」である。

【００７９】

本明細書において用いられる「変異」は、体細胞変異を通じて生じる変化、例えば、所与の対象において、体質的に見出されるわけではなく、疾患細胞でのみ見出されるものをいう。そのような体細胞的に獲得された変化の例としては、がんの発生に関与するさまざまな遺伝子の機能の変化を高い頻度でもたらす点突然変異が挙げられる。変異のタイプには、塩基置換点突然変異(例えば、転位または塩基転換)、欠失および挿入が含まれる。ミスセンス変異は、コードされるタンパク質の配列の中に異なるアミノ酸を導入するものであり; ナンセンス変異は、新しい停止コドンを導入するものである。挿入または欠失の場合、変異はインフレーム(全体配列のフレームを変化させない)またはフレームシフト変異であることができ、これは、多数のコドンの読み違いをもたらすことがある(代替のフレームにおける停止コドンの存在によって、コードされる産物の異常な終結につながることが多い)。本発明の変異は、対象において片方の対立遺伝子上(ヘテロ接合)にまたは両方の対立遺伝子上(ホモ接合)に見出すことができる。NOTCH受容体のドメイン、特にPESTドメイン(プロリン、グルタミン酸、セリンおよびトレオニンに富む)の機能に影響を及ぼす活性化変異には、切断によりドメインの一部または全部を取り除く変異(例えば、ナンセンスまたはフレームシフト変異)を含めることができる。活性化変異には、ドメインの機能を妨害するドメインそれ自体における(例えば、PESTドメイン内の)ミスセンス変異を含めることもできる。

【００８０】

「活性化変異」は、NOTCHを構成的に活性にさせる、リガンド刺激に高感受性にさせる、または異常に発現させる体細胞変異である。いくつかの態様において、活性化変異は、NOTCHシグナル伝達の増大をもたらす。NOTCHシグナル伝達の量は、当技術分野において公知の方法によって判定することができる。手短に言えば、変異NOTCHポリペプチド由来のシグナル伝達の量を、野生型NOTCHポリペプチド由来のNOTCHシグナル伝達の量と比較する。本明細書において用いられる場合、「NOTCHシグナル伝達の増大」または「NOTCHシグナル伝達の増強」は、野生型NOTCHポリペプチドを含有する細胞でのNOTCHシグナル伝達と比べて変異NOTCHポリペプチドを含有する細胞でのさらに多くのNOTCHシグナル伝達の量をい

う。当技術分野において公知の種々の方法を用いて、NOTCHシグナル伝達を検出することができる。例示的な方法としては、NOTCH ICDウエスタンブロッティングまたは免疫組織化学(IHC)が挙げられるが、これらに限定されることはない(Wu et al., Nature, 464: 1052-1059 (2010)を参照のこと)。一般的に、正常組織での発現/シグナル伝達は、正常レベルを上回るシグナル伝達を判定するための比較標準である。いくつかの態様において、関心対象の細胞に隣接した正常組織由来の細胞を用いて、シグナル伝達レベルを判定する。いくつかのNOTCH ICDアッセイ法において、正常組織でのNOTCH ICDのレベルは検出不能であり、したがって、バックグラウンドを上回るいずれのシグナルも、増大したと考えられよう。

【００８１】

本明細書において用いられる「機能的に連結された」という用語は、構成要素が、意図されたように機能することを可能にする関係にあるような、構成要素の位置決めをいう。コード配列に「機能的に連結された」制御配列は、制御配列に適合する条件の下でコード配列の発現が達成されるように核酸連結されている。

【００８２】

本明細書において用いられる「制御配列」という用語は、それらが核酸連結されているコード配列の発現およびプロセッシングをもたらすために必要なポリヌクレオチド配列をいう。そのような制御配列の性質は宿主生物に依って異なる; 原核生物では、そのような制御配列は一般的に、プロモーター、リボソーム結合部位および転写終結配列を含む; 真核生物では、一般的に、そのような制御配列は、プロモーターおよび転写終結配列を含む。「制御配列」という用語は、最低でも、その存在が発現およびプロセッシングのために不可欠である全ての構成要素を含むよう意図され、その存在が有利となるさらなる構成要素、例えば、リーダー配列および融合パートナー配列を含むこともできる。

【００８３】

2つの核酸配列または2つのアミノ酸配列の間の類似性は、「配列同一性」ともいわれる、配列間の類似性を用いて表される。配列同一性は、同一性(または類似性もしくは相同性)の割合という点で測定されることが多い; 割合が高いほど、それだけ2つの配列は類似している。ヒトNOTCH受容体の相同体または相同分子種、および対応するcDNAまたは遺伝子配列は、標準的な方法を用いて整列化された場合、比較的高度の配列同一性を保有するであろう。この相同性は、オルソロガスなタンパク質または遺伝子またはcDNAが、より遠縁にある種(例えば、ヒトおよび線虫(C. elegans)の配列)と比べて、より近縁にある種(例えば、ヒトおよびチンパンジーの配列)に由来する場合に、より顕著であろう。

【００８４】

比較のための配列のアラインメントの方法は、当技術分野において周知である。さまざまなプログラムおよびアラインメントアルゴリズムが、Smith & Waterman Adv. Appl. Math. 2: 482, 1981; Needleman & Wunsch J. Mol. Biol. 48: 443, 1970; Pearson & Lipman Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444, 1988; Higgins & Sharp Gene, 73: 237-244, 1988; Higgins & Sharp CABIOS 5: 151-153, 1989; Corpet et al. Nuc. Acids Res. 16, 10881-90, 1988; Huang et al. Computer Appls. in the Biosciences 5: 155-65, 1992; およびPearson et al. Meth. Mol. Bio. 24:307-31, 1994に記述されている。Altschul et al. J. Mol. Biol. 275:403-410, 1990には、配列アラインメント法および相同性計算の詳細な検討が提示されている。

【００８５】

配列解析プログラムblastp、blastn、blastx、tblastnおよびtblastxと関連して用いられる、NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul et al. J. Mol. Biol. 275:403-410, 1990)は、全米バイオテクノロジー情報センター(NCBI, Bethesda, Md.)を含む、いくつかの情報源からおよびインターネット上にて入手可能である。例として、約30アミノ酸超のアミノ酸配列の比較の場合、デフォルトのパラメータ(ギャップ存在コスト11、および1残基当たりのギャップコスト1)に設定されたデフォルトのBLOSUM62マトリックスを用いてBlast 2配列関数が利用される。短いペプチド(およそ30アミノ酸より

少ない)のアラインメントを行う場合には、デフォルトのパラメータ(開始ギャップ9、伸長ギャップ1ペナルティ)に設定されたPAM30マトリックスを利用する、Blast 2配列関数を用いてアラインメントが行われる。

【００８６】

2つの核酸分子が密接に関連しているという別の示唆は、2つの分子がストリンジェントな条件の下で互いとハイブリダイズするということである。ストリンジェントな条件は、配列依存的であり、異なる環境パラメータの下では異なる。一般的に、ストリンジェントな条件は、規定のイオン強度およびpHでの特定の配列の熱融解温度(Tm)よりも約5℃から20℃低いように選択される。Tmは、標的配列の50%が、完全にマッチしたプローブまたは相補鎖とハイブリダイズされたままとなる(規定のイオン強度およびpH下の)温度である。核酸ハイブリダイゼーションのための条件およびストリンジェンシーの計算は、Sambrookら(In Molecular Cloning: A Laboratory Manual, CSHL, New York, 1989)およびTijssen (Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes Part I, Chapter 2, Elsevier, New York, 1993)において見出すことができる。ヒトNOTCH受容体をコードする配列とストリンジェントな条件の下でハイブリダイズする核酸分子は、典型的には、50℃で2×SSCの洗浄条件の下で全ヒトNOTCHポリヌクレオチドまたはNOTCHポリヌクレオチドの選択部分のどちらかに基づくプローブとハイブリダイズする。

【００８７】

それでも、遺伝暗号の縮重のため、高度の配列同一性を示さない核酸配列が、類似のアミノ酸配列をコードする場合がある。全てが実質的に同一のタンパク質をコードする複数の核酸分子を産生するために、この縮重を用いて核酸配列の変化が作出されうるものと理解される。

【００８８】

本発明に関連して、いずれかの特定のNOTCH受容体において記載されている変異の「少なくとも1つ」、「少なくとも2つ」、「少なくとも3つ」などという場合、記載されている変異のいずれか1つまたはありとあらゆる組み合わせを意味する。

【００８９】

「NOTCH」は、とりわけ発生での、多くの細胞過程を調節する膜結合型転写因子である。リガンド結合に応じて、その細胞内ドメイン(ICD)が2種のプロテアーゼによって放出される。放出された細胞内ドメインは、核に入り、DNA結合タンパク質と相互作用して、転写を活性化する。NOTCHおよび関連タンパク質の細胞外ドメインは、最大で36個までのEGF様ドメインと、それに続く3つのnotch (DSL)ドメインを含む。細胞内ドメイン(ICD)は、6つのアンキリンリピートと、PESTドメインを含むカルボキシル末端伸長部とを含む。NOTCH1およびNOTCH2 ICDは、トランス活性化ドメイン(TAD)をさらに含む。「NOTCH」は、NOTCH受容体ファミリーの全ての成員を包含する。NOTCHシグナル伝達経路およびそれによって影響を受ける状態に関する記述は、例えば、WO 98/20142およびWO 00/36089において見出すことができる。

【００９０】

本明細書において用いられる「NOTCH阻害剤」、「NOTCHアンタゴニスト」、「抗NOTCH治療剤」または「抗NOTCH剤」は、NOTCH経路の生物学的活性を部分的にまたは完全に遮断する、阻害する、または無力化する任意の化合物を含む。例示的なNOTCH阻害化合物としては、γ-セクレターゼ阻害剤、例えば、III-31-C、N-[N-(3,5-ジフルオロフェンアセチル)-L-アラニル]S-フェニルグリシンt-ブチルエステル) (DAPT)、化合物E、D-らせん状ペプチド294、イソクマリン、BOC-Lys(Cbz)Ile-Leu-エポキシド、および$(Z\text{-}LL)_2$-ケトン(Kornilova et al., J. Biol. Chem. 278: 16479-16473 (2003)を参照のこと); かつWO 01/90084、WO 02/30912、WO 01/70677、WO 03/013506、WO 02/36555、WO 03/093252、WO 03/093264、WO 03/093251、WO 03/093253、WO 2004/039800、WO 2004/039370、WO 2005/030731、WO 2005/014553、WO 2004/089911、WO 02/081435、WO 02/081433、WO 03/018543、WO 2004/031137、WO 2004/031139、WO 2004/031138、WO 2004/101538、WO 2004/101539およ

びWO 02/47671ならびに米国特許出願第2003/0114496号に記述されている化合物が挙げられるが、これらに限定されることはない。特異的なγセクレターゼ阻害剤化合物は、米国特許第6,984,663号および同第7,304,094号においても記述されている。特異抗体NOTCH阻害剤は、本明細書において、ならびにWO 2010/005566およびWO 2010/005567において記述されており、これらの全てが参照により本明細書に組み入れられる。NOTCH阻害剤はまた、NOTCHリガンドアンタゴニストを含む。

【００９１】

「NOTCH阻害剤」、「NOTCHアンタゴニスト」、「抗NOTCH治療剤」または「抗NOTCH剤」はまた、NOTCH受容体を結合する抗体を包含する。「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つの抗原識別部位または抗原結合部位によって、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、糖質、ポリヌクレオチド、脂質または前記の組み合わせのような標的を認識し、かつそれに特異的に結合する免疫グロブリン分子を意味する。本明細書において用いられる場合、「抗体」という用語は、抗体が所望の生物学的活性を示す限り、無傷のポリクローナル抗体、無傷のモノクローナル抗体、抗体断片(Fab、Fab'、F(ab')2およびFv断片のような)、一本鎖Fv (scFv)変種、少なくとも2種の無傷の抗体から作出された二重特異性抗体のような多重特異性抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、抗体の抗原認識部位を含む融合タンパク質、および抗原認識部位を含む改変されたその他任意の免疫グロブリン分子を包含する。抗体は、それぞれα、δ、ε、γおよびμといわれる重鎖定常ドメインの同一性に基づき、5つの主要なクラスの免疫グロブリン：IgA、IgD、IgE、IgGおよびIgM、またはそのサブクラス(アイソタイプ) (例えばIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1およびIgA2)のいずれかでありうる。異なるクラスの免疫グロブリンは、異なる周知のサブユニット構造および三次元構造を有する。抗体はありのままでも、または毒素および放射性同位体を含むが、これらに限定されない、他の分子に結合されていてもよい。

【００９２】

「抗体断片」という用語は、無傷の抗体の一部をいい、無傷の抗体の抗原決定可変領域をいう。抗体断片の例としては、Fab、Fab'、F(ab')2、およびFv断片、直鎖状抗体、一本鎖抗体、ならびに抗体断片から形成された多重特異性抗体が挙げられるが、これらに限定されることはない。

【００９３】

「モノクローナル抗体」という用語は、1つの抗原決定基、またはエピトープの極めて特異的な認識および結合に関わる、均質な抗体集団をいう。これは、異なる抗原決定基に対して作製された異なる抗体の混合物を典型的に含むポリクローナル抗体と対照的である。「モノクローナル抗体」という用語は、無傷のかつ全長のモノクローナル抗体と抗体断片(例えば、Fab、Fab'、F(ab')2、Fv断片)、一本鎖Fv (scFv)変種、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改変されたその他任意の免疫グロブリン分子の両方を包含する。さらに、「モノクローナル抗体」は、ハイブリドーマ産生、ファージ選択、組み換え発現、およびトランスジェニック動物を含むがこれらに限定されない、任意のいくつかの方法で作出されたそのような抗体をいう。

【００９４】

「ヒト化抗体」という用語は、最小限の非ヒト(例えば、マウス)配列を含む特異的な免疫グロブリン鎖、キメラ免疫グロブリン、またはその断片である非ヒト(例えば、マウス)抗体の形態をいう。

【００９５】

「ヒト抗体」という用語は、ヒトによって産生される抗体、または当技術分野において公知の任意の技法を用いて作出された、ヒトによって産生される抗体に対応するアミノ酸配列を有する抗体を意味する。ヒト抗体のこの定義は、無傷のまたは全長の抗体、およびその断片を含む。

【００９６】

「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つまたはそれ以

上の種に由来する抗体をいう。典型的には、軽鎖および重鎖の両方の可変領域は、所望の特異性、親和性および/または能力を有する、1つの哺乳動物種(例えば、マウス、ラット、ウサギなど)に由来する抗体の可変領域に対応するが、定常領域は、別の種(通常はヒト)に由来する抗体中の配列と相同であって、その種での免疫反応の誘発を回避する。

【００９７】

「エピトープ」または「抗原決定基」という用語は、本明細書において互換的に用いられ、特定の抗体により認識され特異的に結合されうる抗原のその部分をいう。抗原がポリペプチドである場合、エピトープは連続的なアミノ酸(「直鎖状エピトープ」といわれることが多い)からも形成され、タンパク質の三次元的折り畳みによって近接して並べられた非連続的なアミノ酸(「立体配座エピトープ」といわれることが多い)からも形成されうる。連続的なアミノ酸から形成されたエピトープは、タンパク質が変性した場合にも典型的には維持されるが、三次元的折り畳みによって形成されたエピトープは、タンパク質が変性すると典型的には失われる。エピトープは、典型的には、独特の空間的配置の中に少なくとも3アミノ酸、より一般的には、少なくとも5アミノ酸または8～10アミノ酸を含む。

【００９８】

「特異的に結合する」または「特異的な結合」という用語は、結合剤または抗体が、関連のないタンパク質を含めて、別の物質とよりもエピトープまたはタンパク質と高頻度に、迅速に、長い持続時間で、高い親和性で、または前記のいくつかの組み合わせで反応または結合することを意味する。ある種の態様において、「特異的に結合する」とは、例えば、抗体が約0.1 mMまたはそれ以下、しかし、より通常には、約1μM未満のKDでタンパク質に結合することを意味する。ある種の態様において、「特異的に結合する」とは、抗体が、時には、少なくとも約0.1μMまたはそれ以下、またある時には、少なくとも約0.01μMまたはそれ以下のKDでタンパク質に結合することを意味する。

【００９９】

本明細書において用いられる場合、「階層化する」という用語は、特定の病状または病態の特徴に基づいて異なるクラスまたは階層に対象を分類することをいう。例えば、NOTCH媒介性のがんを有する対象の集団を階層化することは、変異の存在(腫瘍分類)で、および/または疾患の重症度(例えば、軽度、中等度、進行性など)に基づいて対象を割り当てることを伴う。

【０１００】

「対象」という用語は、特定の処置のレシピエントとなるべき、ヒト、非ヒト霊長類、げっ歯類などを含むが、これに限定されない任意の動物(例えば、哺乳動物)をいう。典型的には、ヒト対象に関して、本明細書では「対象」および「患者」という用語が互換的に用いられる。定量的および定性的データのために本明細書において用いられる「正常」対象または「正常」対象由来のサンプルは、NOTCH媒介性の細胞増殖障害または異常なNOTCHシグナル伝達によって特徴付けられる障害を有しないと医師によって評価されている、または評価されるものと考えられる対象をいう。

【０１０１】

「対照サンプル」は、一般的に無病である比較可能な対照細胞由来の別個のサンプルを意味する。それは、同じ対象由来であってもよく、あるいは正常である別の対象、または病的サンプルもしくは試験サンプルを得る同じ疾患を呈していない別の対象由来であってもよい。

【０１０２】

「予後」という用語は、NOTCH媒介性のがんのような新生物疾患の再発、転移拡散、および薬物耐性を含む、がんに起因する死または進行の可能性の予測をいうように本明細書において用いられる。本明細書において用いられる場合、「予測する」または「予測」という用語は、対象について、好ましくない予後に対して好ましい予後を有するという転帰の蓋然性が著しく増強または低減されているという所見を下すことをいう。これは、NOTCH阻害剤が治療的であるとは認められないという可能性に対する、治療的に有効でありう

る可能性を含むこともできる。この用語は、患者が薬物または薬物のセットに好ましくまたは好ましくなく反応する可能性、およびまた、その反応の程度、あるいは患者が、原発腫瘍の外科的切除および/または化学療法の後に、ある一定期間、がんの再発なく生存する可能性をいうために用いられることもある。本発明の予測方法を臨床的に用いて、任意の特定の患者に最も適した処置法を選択することにより処置法を決定することができる。このような目的で、本発明の予測方法は、患者が所与の薬物または薬物の組み合わせ、例えばγセクレターゼ阻害剤または別のNOTCH阻害剤による化学療法のような、NOTCHに基づく処置計画に好ましく反応する可能性が高いかどうか、あるいはNOTCH阻害剤による処置プロトコルおよび/または化学療法もしくは他の処置法の終結の後の、患者の長期生存の可能性が高いかどうかを予測するうえで有益な手段である。

【０１０３】

「がん」および「がん性」という用語は、典型的には無秩序な細胞成長によって特徴付けられる、哺乳動物における生理学的状態をいうまたは記述する。

【０１０４】

がんの「病変」は、患者の健康を損なう全ての現象を含む。これには、限定されるものではないが、異常なまたは制御不能な細胞成長、転移、隣接する細胞の正常な機能への干渉、異常なレベルのサイトカインまたはその他の分泌産物の放出、炎症反応または免疫反応の抑制または増悪、新生物、前悪性、悪性腫瘍、周囲のまたは遠位の組織または臓器、例えばリンパ節の浸潤などが含まれる。「患者の反応」は、(1) 減速および完全な成長停止を含む、腫瘍成長の、ある程度の、阻害; (2) 腫瘍細胞数の低減; (3) 腫瘍サイズの低減; (4) 腫瘍細胞の、隣接する末梢器官および/または組織への浸潤の阻害(すなわち低減、減速または完全な停止); (5) 転移の阻害(すなわち低減、減速または完全な停止); (6) 必ずしもそうでなければならないわけではないが、腫瘍の退行もしくは拒絶を生じうる、抗腫瘍免疫反応の増強; (7) 腫瘍に関連する1つまたは複数の症状の、ある程度の、軽減; (8) 処置後の生存の長さの増加; ならびに/あるいは(9) 処置後の所与の時点での死亡率の減少を含むが、これらに限定されない、患者に対する利益を示す任意のエンドポイントを用いて評価することができる。

【０１０５】

「新補助療法」は、最初の(主な)治療の前に与えられる補助的なまたは補助の治療法である。新補助療法には、例えば、化学療法、放射線療法、およびホルモン療法が含まれる。したがって、化学療法は、腫瘍を縮小させるために手術の前に投与されてもよく、その結果、手術がより有効となるか、または以前には処置不能であった腫瘍の場合も可能となりうる。

【０１０６】

本明細書において用いられる「反応する」という用語は、RECIST (固形腫瘍の治療効果判定のためのガイドライン(Response Evaluation Criteria in Solid Tumors))によれば、薬剤を投与した後に患者または腫瘍が完全奏効または部分奏効を示すことを意味する。本明細書において用いられる「無反応」という用語は、RECISTによれば、薬剤を投与した後に患者または腫瘍が安定している疾患または進行性疾患を示すことを意味する。RECISTは、例えば、Therasse et al., February 2000,「New Guidelines to Evaluate the Response to Treatment in Solid Tumors」, J. Natl. Cancer Inst. 92(3): 205-216に記述されており、これはその全体が参照により本明細書に組み入れられる。例示的な薬剤としては、NOTCHに対する抗体を含むがこれに限定されない、NOTCHポリペプチドに対する特異的な結合剤が挙げられる。

【０１０７】

「障害」は、1つまたは複数の処置から恩恵を受ける任意の状態である。これには、哺乳動物を該当する障害にかかりやすくさせる病理学的状態を含む、慢性および急性の障害または疾患が含まれる。本明細書において処置される障害の非制限的な例としては、良性および悪性腫瘍、特に乳がん、直腸がん、卵巣がん、胃がん、子宮内膜がん、唾液腺がん、腎臓がん、大腸がん、甲状腺がん、膵臓がん、前立腺がんまたは膀胱がんが挙げられる

。

【０１０８】

「処置」または「治療」は、治療上の処置および予防的手段または防止的手段の両方をいう。「治療的有効量」という用語は、哺乳動物における疾患または障害を処置するのに有効な薬物の量をいう。がんの場合、治療的有効量の抗NOTCH処置は、非限定的な例として、がん細胞の数を低減しうる; 腫瘍サイズを低減しうる; 周辺器官へのがん細胞の浸潤を阻害しうる(すなわち、ある程度まで緩徐化させ、好ましくは、停止させうる); 腫瘍の転移を阻害しうる(すなわち、ある程度まで緩徐化させ、好ましくは、停止させうる); ある程度まで、腫瘍の成長を阻害しうる; および/または、ある程度まで、この障害に関連した1つもしくは複数の症状を軽減しうる。薬物が成長を抑止させ、および/または既存のがん細胞を死滅化させうる程度まで、薬物は細胞増殖抑制性および/または細胞毒性でありうる。がん治療の場合、インビボでの効力は、例えば、腫瘍量または腫瘍容積、疾患の進行の所要時間(TTP)を評価することによって、および/または反応速度(RR)を判定することによって測定することができる。

【０１０９】

II. 活性化NOTCH変異の特定

本明細書において開示されるのは、活性化NOTCHタンパク質の産生を引き起こすNOTCH受容体における変異であり、その産生は、回りまわって、受容体シグナル伝達の増大につながる。これらの変異は、がんのような新生物疾患と関連しており、したがって、例えば、がん患者がNOTCHアンタゴニスト治療に反応するかどうかを評価するために用いられうる

。

【０１１０】

哺乳動物においてはNOTCHファミリーの4つの成員: NOTCH1 (TAN1)、NOTCH2、NOTCH3およびNOTCH4/Int-4が存在する。ヒトNOTCHタンパク質の例示的な配列としては、Genbankアクセッション番号NM_017617.3として記載されているmRNA配列によりコードされ、かつGenbankアクセッション番号NP_060087として記載されているアミノ酸配列を有する、ヒトNOTCH1; Genbankアクセッション番号NM_024408として記載されているmRNA配列によりコードされ、かつGenbankアクセッション番号NP_077719として記載されているアミノ酸配列を有する、ヒトNOTCH2; Genbankアクセッション番号NM_000435.2のmRNA配列によりコードされ、かつGenbankアクセッション番号NP_000426のアミノ酸配列を有する、ヒトNOTCH3; およびGenbankアクセッション番号NM_004557のmRNA配列によりコードされ、かつGenbankアクセッション番号NP_004548のアミノ酸配列を有する、ヒトNOTCH4が挙げられるが、これらに限定されることはない。NOTCH1～4の代表的な野生型配列が、それぞれ、SEQ ID NO: 1～4に示されている。本明細書において提供されるNOTCH1変異の位置は、参照配列としてNM_017617.3を用いて決定された。本明細書において提供されるNOTCH3変異の位置は、参照配列としてNM_000435.2を用いて決定された。ヌクレオチド位置は、NOTCH開始コドンの位置から始めて付番されており、この場合には、開始ATGコドンのアデニン(例えば、NM_017617.3の残基番号1およびNM_000435.2の残基番号77)が位置番号1に対応する。

【０１１１】

NOTCHは、1回貫通ヘテロ二量体受容体として細胞表面上に発現される。そのリガンドも、隣接細胞上だけでなく、NOTCH受容体を発現しているまさにその細胞上にも発現されうるDSL (Delta/Serrate/LAG-2)ファミリーの膜貫通タンパク質である。受容体とリガンドとの相互作用は、膜貫通ドメイン近傍の細胞外S2部位での、およびS3部位でのタンパク質分解を誘因する。TNF-α変換酵素(TACE)およびプレセニリン-1-依存性γ-セクレターゼは、それぞれ、部位S2およびS3でのタンパク質分解プロセッシングに関与するものと考えられている。最終の切断によって、核局在化シグナルに隣接された7つのアンキリンリピートを含むカルボキシ末端の細胞内ドメイン(ICD)、プロリン、グルタミン、セリン、トレオニンに富む(PEST)ドメインおよびトランス活性化ドメイン(TAD)が放出される。ICDは次に、核へ移行し、mastermindおよびp300のような補助活性化因子を動員し、CSL (CBF/Suppressor of Hairless/LAG-1)因子に結合する。NOTCHシグナル伝達がない場合、補抑制因

子と結び付いたCSLタンパク質は、標的遺伝子の転写を抑制する。このように、NOTCHシグナル伝達は、CSL標的遺伝子の転写抑制から転写活性化への切り替えを引き起こす。

【０１１２】

したがって、1つの態様において、本発明は、少なくとも一部分のものが、NOTCHシグナル伝達の増大をもたらす活性化NOTCH変異を含む、腫瘍細胞の特定を対象とする。1つの態様において、変異はNOTCHのPESTドメインのものである。PESTドメインの変異は、最小のPESTドメインそれ自体のなかに生じるもの、およびそのドメインの上流に生じて、PESTドメインの排除(例えば停止コドンの挿入)、またはPESTドメインの配列を変化させるようなフレームシフトのどちらかをもたらすものである。最小のPESTドメイン配列は、表1に示されている。別の態様において、変異はNOTCHのトランス活性化ドメイン(TAD)のものである。

【０１１３】

（表１）最小のNOTCH受容体PESTドメイン

供給源	参照配列	AA 配列	ヌクレオチド位置	アミノ酸位置
NOTCH1	CCDS43905	FLTPSPESP (SEQ ID NO:33)	7525-7550	2509-2517
NOTCH2	CCDS908	YLTPSPESP (SEQ ID NO:34)	7240-7266	2414-2422
NOTCH3	CCDS12326	YLTPSPESP (SEQ ID NO:34)	6730-6756	2244-2252
NOTCH4	NM_004557.3	LTPSPE (SEQ ID NO:35)	5914-5931	1972-1977

【０１１４】

別の態様において、本発明は、ヌクレオチド部位7279の位置にヘテロ接合性の欠失を含む単離された変異体ヒトNOTCH1ポリヌクレオチドを対象とする。さらなる態様において、変異体NOTCH1は、ヌクレオチド部位7279 (RefSeq NM_017617.3; SEQ ID NO:1)の位置にグアニン(G)のヘテロ接合性の欠失を含む。このNOTCH1変異は、本明細書においてOMP-B40といわれる。OMP-B40変異は、NOTCH1のPESTドメインにおける読み枠のシフト(G2427fs)を引き起こす。

【０１１５】

別の態様において、本発明は、ヌクレオチド部位6622の位置にホモ接合性の挿入を含む単離された変異体ヒトNOTCH3ポリヌクレオチドを対象とする。さらなる態様において、変異体NOTCH3は、ヌクレオチド部位6622 (RefSeq NM_000435.2; SEQ ID NO:3)の位置にシトシン(C)のホモ接合性の挿入を含む。このNOTCH3変異は、本明細書においてOMP-B37といわれる。この挿入は、PESTドメインのアミノ酸位置番号2208での読み枠のシフト(P2208fs)を引き起こす。

【０１１６】

別の態様において、本発明は、ヌクレオチド部位6096の位置にヘテロ接合性の挿入を含む単離された変異体ヒトNOTCH3ポリヌクレオチドを対象とする。さらなる態様において、変異体NOTCH3は、ヌクレオチド部位6096 (RefSeq NM_000435.2; SEQ ID NO:3)の位置にシトシン(C)のヘテロ接合性の挿入を含む。このNOTCH3変異は、本明細書においてOMP-C31といわれる。この挿入は、ANKドメインにおけるアミノ酸位置番号2033での読み枠のシフト(P2033fs)を引き起こす。

【０１１７】

別の態様において、本発明は、ヌクレオチド部位6733の位置にヘテロ接合性の置換を含

む単離された変異体ヒトNOTCH1ポリヌクレオチドを対象とする。さらなる態様において、変異体NOTCH1は、ヌクレオチド部位6733 (RefSeq NM_017617.3; SEQ ID NO:1)の位置にグアニン(G)のアデニン(A)へのヘテロ接合性の置換を含む。このNOTCH1変異は、本明細書において肺_01246といわれる。この置換は、TADドメインのアミノ酸位置番号2245でのGlyのArgへのミスセンス変異(G2245R)を引き起こす。

【０１１８】

別の態様において、本発明は、ヌクレオチド部位6788の位置にヘテロ接合性の置換を含む単離された変異体ヒトNOTCH1ポリヌクレオチドを対象とする。さらなる態様において、変異体NOTCH1は、ヌクレオチド部位6788 (RefSeq NM_017617.3; SEQ ID NO:3)の位置にシトシン(C)のチミン(T)へのヘテロ接合性の置換を含む。このNOTCH1変異は、本明細書において乳房_H12932Tといわれる。この置換は、TADドメインのアミノ酸位置番号2263でのArgのGlnへのミスセンス変異(R2263Q)を引き起こす。

【０１１９】

（表２）NOTCH変異

変異	NOTCH 受容体	アミノ酸位置	ヌクレオチド配列変化
B40	NOTCH1	2427でのフレームシフト	ヌクレオチド番号7279でのグアニン(G)のヘテロ接合性欠失
B37	NOTCH3	2208でのフレームシフト	ヌクレオチド部位6622でのシトシン(C)の挿入
C31	NOTCH3	2033でのフレームシフト	ヌクレオチド部位6096でのシトシン(C)のヘテロ接合性挿入
肺_01246	NOTCH1	ミスセンスG2245R	ヌクレオチド部位6733でのグアニン(G)のアデニン(A)へのヘテロ接合性ヌクレオチド置換
乳房_H12932T	NOTCH1	ミスセンスR2263Q	ヌクレオチド番号6788でのシトシン(C)のチミジン(T)へのヘテロ接合性ヌクレオチド置換

【０１２０】

本発明のポリペプチドは、ポリメラーゼ連鎖方法(PCR)のような、DNA増幅方法を用いてクローニングすることができる(例えば、Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbour, N.Y.; Berger & Kimmel (1987) Methods in Enzymology. Vol. 152を参照のこと)。したがって、例えば、変異体NOTCHポリペプチドをコードする核酸分子は、1つの制限部位を含むセンスプライマーおよび別の制限部位を含むアンチセンスプライマーを用いてPCR増幅することができる。これによって

、末端制限部位を有する所望の配列または部分配列をコードする核酸が産生される。この核酸を次いで、対応する適切な制限部位を有するベクターへ容易に核酸連結することができる。適当なPCRプライマーは、発現される配列に基づき当業者によって容易に選択される。適切な制限部位を部位特異的突然変異誘発法によって付加することもできる(Gillman & Smith Gene 8: 81-97(1979); Roberts et al. Nature 328: 731-4 (1987)を参照のこと)。

【０１２１】

外来核酸を宿主細胞へ導入する方法は、当技術分野において周知であり、用いられる宿主細胞によって変わるであろう。適当な技法には、デキストランを介した形質移入、リン酸カルシウム沈殿、ポリブレンを介した形質移入、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション、ウイルス感染、リポソーム中でのポリヌクレオチドのカプセル封入、および核へのDNAの直接マイクロインジェクションが含まれるが、これらに限定されることはない。

【０１２２】

ある種の態様において、ポリヌクレオチドは、例えば、宿主細胞からのポリペプチドの発現および分泌を補助するポリヌクレオチド(例えば細胞からのポリペプチドの輸送を制御するための分泌配列として機能するリーダー配列)に同じ読み枠で融合されたキメラポリペプチドのコード配列を含む。リーダー配列を有するポリペプチドはプレタンパク質であり、宿主細胞により切断されてポリペプチドの成熟型を形成するリーダー配列を有することができる。ポリヌクレオチドは、成熟タンパク質に加えてさらなる5'アミノ酸残基であるプロタンパク質をコードすることもできる。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、タンパク質の不活性型である。プロ配列が切断されると、活性な成熟タンパク質が残る。

【０１２３】

ある種の態様において、ポリヌクレオチドは、例えば、コードされるポリペプチドの精製を可能にするマーカー配列に同じ読み枠で融合された成熟ポリペプチドのコード配列を含む。例えば、マーカー配列は、細菌宿主の場合、マーカーに融合された成熟ポリペプチドの精製をもたらすためにpQE-9ベクターによって供給されるヘキサヒスチジンタグとすることができ、またはマーカー配列は、哺乳動物宿主(例えばCOS-7細胞)が用いられる場合、インフルエンザヘマグルチニンタンパク質に由来するヘマグルチニン(HA)タグとすることができる。

【０１２４】

本発明の変異体ポリペプチドは、典型的には、発現ベクターを用いて発現され、精製される。発現ベクターは、自己複製染色体外ベクターまたは宿主ゲノムに組み込まれるベクターのどちらかであることができる。一般に、発現ベクターには、標的タンパク質をコードする核酸に機能的に連結された転写および翻訳調節核酸配列が含まれる。機能的に連結されたDNA配列は、連続的または不連続的であることができる。DNA配列を連結させるための方法は、当技術分野において周知であり、ポリメラーゼ連鎖反応および核酸連結の使用を含む。転写および翻訳調節核酸は一般に、標的タンパク質を発現させるのに用いられる宿主細胞に適しているであろう; 例えば、大腸菌(E. coli)において標的タンパク質を発現させるためには、大腸菌由来の転写および翻訳調節核酸配列が好ましく用いられる。

【０１２５】

種々の宿主細胞に向けて、多数のタイプの適切な発現ベクター、および適当な調節配列が当技術分野において公知である。ポリペプチドを発現させるための方法は、当技術分野において周知である(例えば、Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed., vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory; Berger and Kimmel (1987) Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology, vol. 152, Academic Press, Inc., San Diego, Calif; Ausubel et al. (1995) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., NY)。

【０１２６】

一般に、転写および翻訳調節配列は、プロモーター配列、リボソーム結合部位、転写開始配列および転写停止配列、翻訳開始配列および翻訳停止配列、ならびに転写促進因子または活性化因子配列を含むことができるが、これらに限定されることはない。プロモーター配列は、構成性または誘導性プロモーターをコードする。プロモーターは、天然プロモーターまたはハイブリッドプロモーターであることができる。2つ以上のプロモーターの要素を組み合わせるハイブリッドプロモーターも、当技術分野において公知である。

【０１２７】

発現ベクターはさらなる要素を含むことができる。例えば、発現ベクターは、2種の複製系を有し、かくして、発現のために2種の生物内で、例えば哺乳動物または昆虫細胞内で、ならびにクローニングおよび増幅のために原核生物宿主内で維持されることを可能にしうる。さらに、発現ベクターを組み込むため、発現ベクターは、宿主細胞ゲノム中の配列に相同な少なくとも1つの配列を含み、好ましくは、発現構築体に隣接する2つの相同配列を含む。組み込み用ベクターは、ベクター中に含めるのに適した相同配列を選択することにより、宿主細胞における特定の遺伝子座に向けることができる。組み込み用ベクターのための構築体は、当技術分野において周知である。

【０１２８】

さらに、発現ベクターは、形質転換された宿主細胞の選択を可能にする選択マーカー遺伝子を含むことができる。選択遺伝子は、当技術分野において周知であり、用いられる宿主細胞に依って変化するであろう。

【０１２９】

本発明のポリペプチドは、変異体NOTCHポリペプチドをコードする核酸を含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞を、変異体ポリペプチドの発現を誘導するのにまたは引き起こすのに適した条件の下で培養することにより産生することができる。タンパク質の発現に適した条件は、発現ベクターおよび宿主細胞の選択によって変化し、日常の実験を用いて当業者により容易に確定されよう。例えば、発現ベクターの中で構成性プロモーターを用いる場合、宿主細胞の成長および増殖を最適化することができ、誘導性プロモーターを用いる場合、誘導に適した成長条件を提供する。さらに、いくつかの態様において、例えば、バキュロウイルス系を用いる場合、収集のタイミングが重要である。当業者は、選択した宿主細胞での発現のためにコード配列を最適化できることを認識するであろう。

【０１３０】

適切な宿主細胞には、酵母細胞、細菌細胞、古細菌細胞、真菌細胞および昆虫細胞、ならびに哺乳動物細胞を含む、動物細胞が含まれる。宿主細胞には、キイロショウジョウバエ(Drosophila melanogaster)細胞、サッカロマイセス・セレヴィシエ(Saccharomyces cerevisiae)および他の酵母、大腸菌、枯草菌(Bacillus subtilis)、Sf9細胞、C129細胞、293細胞、アカパンカビ(Neurospora)、BHK細胞、CHO細胞、COS細胞、HeLa細胞、Hep G2細胞、ならびにヒト細胞および細胞株が含まれるが、これらに限定されることはない。

【０１３１】

本発明の変異体NOTCHポリペプチドは、当技術分野において周知である技法を用いて、融合タンパク質として作出することもできる。例えば、NOTCHポリペプチドは、発現を増加させるために、血清中半減期を増加させるために、または抗タグ抗体が選択的に結合できるエピトープを提供するタグポリペプチドとNOTCHポリペプチドを連結させるために融合タンパク質として作出することができる。例示的なタグまたは融合パートナーには、mycエピトープ、免疫グロブリンFcドメイン、および6-ヒスチジンが含まれる。エピトープタグは一般に、標的タンパク質のアミノ末端またはカルボキシル末端に配置される。標的タンパク質の、そのようなエピトープタグ付きの形態の存在は、タグポリペプチドに対する抗体を用いて検出することができる。したがって、エピトープタグは、抗タグ抗体またはエピトープタグに結合する別のタイプのアフィニティーマトリックスを用いてアフィニティー精製により、標的タンパク質を容易に精製可能にする。

【０１３２】

本発明のNOTCHポリペプチドは、発現後に精製または単離することができる。純度およ

び均一性は、典型的には、ポリアクリルアミドゲル電気泳動または高性能液体クロマトグラフィーのような分析化学技法を用いて判定される。調節物中に存在する主たる種であるタンパク質が実質的に精製される。「精製された」という用語は、タンパク質が電気泳動ゲル中で本質的に1本のバンドを生ずることを意味する。例えば、それは、タンパク質が少なくとも85%純粋、例えば少なくとも95%純粋、例えば少なくとも99%純粋であることを意味する。

【０１３３】

本発明のNOTCHポリペプチドは、サンプル中に他にどんな成分が存在するかに依って、当業者に公知の種々の方法で単離または精製することができる。標準的な精製方法には、電気泳動技法、分子的技法、免疫学的技法、ならびにイオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーおよび逆相HPLCクロマトグラフィーを含むクロマトグラフィー技法や、クロマトフォーカシングが含まれる。例えば、アフィニティーカラムを用いて標的タンパク質を精製することができる。限外ろ過および血液透析ろ過技法も、タンパク質濃縮との関連で、有用である。適当な精製技法は、当技術分野において標準的なものである(一般的にはR. Scopes (1982) Protein Purification, Springer-Verlag, N.Y.; Deutcher (1990) Methods in Enzymology vol. 182: Guide to Protein Purification, Academic Press, Inc. N.Y.を参照のこと)。必要な精製度は、ポリペプチドの使用に依って変わるであろう。場合によっては、精製が不必要なこともある。

【０１３４】

ある種の態様において、NOTCHポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、異種アミノ酸配列またはNOTCHポリペプチドと通常は結び付いていない1つもしくは複数の他の部分(例えば、抗菌剤、治療剤、プロドラッグ、ペプチド、タンパク質、酵素、脂質、生物学的反応修飾物質、医薬品、リンホカイン、異種抗体もしくはその断片、検出可能な標識、ポリエチレングリコール(PEG)、およびいずれかの作用物質の2つもしくはそれ以上の組み合わせ)を含むことができる。さらなる態様において、NOTCHポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、酵素、蛍光標識、化学発光標識、生物発光標識、放射性標識、またはいずれかの検出可能な標識の2つもしくはそれ以上の組み合わせからなる群より選択される検出可能な標識を含むことができる。

【０１３５】

本発明は同様に、NOTCH受容体の変異型に特異的に結合する抗体およびそのような抗体を産生するためのプロセスを包含する。「変異体NOTCH受容体に特異的に結合する」抗体は、野生型の形態に対するよりも変異体の形態の受容体に対して少なくとも100倍高い親和性を有するものと定義される。そのような抗体を産生するためのプロセスは、変異体受容体タンパク質を適切な動物へ注射することまたは、好ましくは、変異を起こしている領域を含む短いペプチドを注射することのいずれかを伴いうる。ペプチドは、長さが少なくとも5個のアミノ酸とすべきであり、個別にまたは組み合わせで注射されうる。

【０１３６】

抗体を作出および選択するための方法は、Harlow, et al., Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1988); Klein, Immunology: The Science of Self-Nonself Discrimination (1982); ; Kennett, et al., Monoclonal Antibodies and Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses (1980); およびCampbell, 「Monoclonal Antibody Technology」: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology (1984)中などの標準的な参考文献からも明らかなように当業者に周知である。

【０１３７】

本明細書において用いられる「抗体」という用語は、無傷の分子ならびにFabおよび$F(ab)_2$断片のような、抗原を結合するその能力を保持している断片を含むように意図される。ポリクローナル抗体は、適切な抗原で免疫された動物の血清に由来する。モノクローナル抗体は、Hammerling, et al., Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas, Elsev

ier, N.Y., pp. 563-681 (1981)中などの参考文献によって教示されるようにハイブリドーマ技術を用いて調製することができる。一般に、この技術は、免疫応答性動物、典型的にはマウスを、無傷のタンパク質またはそれに由来する断片のいずれかで免疫することを伴う。次いで、脾細胞を免疫動物から抽出し、SP2O細胞などの、適当な骨髄腫細胞と融合する。その後、得られたハイブリドーマ細胞をHAT培地中で選択的に維持し、次いで限界希釈によりクローニングする(Wands et al., Gastroenterology 50:225-232 (1981))。次いで、そのような選択を通して得られた細胞をアッセイして、NOTCH1、NOTCH3の変異体の形態、または他のNOTCH受容体の変異体の形態に選択的に結合する抗体を分泌するクローンを特定することができる。

【０１３８】

変異体NOTCH受容体に対する抗体を、無傷の受容体またはこれらの受容体の断片のいずれかの精製において用いることもできる(一般的には、Dean, et al., Affinity Chromatograph, A Practical Approach, IRLP Press (1986)を参照のこと)。典型的には、抗体をセファロース4Bのような、クロマトグラフィーのマトリックス上に固定化する。次いで、マトリックスをカラムへ充填し、変異体受容体を含有する調製物を、結合を促進する条件の下で、例えば、低塩の条件の下でカラムに通す。次いで、カラムを洗浄し、結合した受容体が、抗体からの解離を促進する緩衝液(例えば、変化させたpHまたは塩濃度を有する緩衝液)を用いて溶出させる。溶出された受容体タンパク質を、例えば透析により、選択の緩衝液へ移し入れ、保管または直接使用することができる。精製された受容体を、下記の免疫アッセイ法において、またはアッセイ法において用いるための抗体の作出のために用いることができる。

【０１３９】

NOTCH受容体の配列における活性化変異の発見によって、さらなる態様である種々の診断的、予後診断的および治療的方法が可能になる。また、活性化変異の特定によって、NOTCHアンタゴニスト治療に特に感受性がある腫瘍を有する対象の早期の特定が可能になる。本明細書において記述される活性化変異の特定によって、早期処置および特定処置の選択の機会が得られる。

【０１４０】

III. 診断的用途

NOTCHの変異体アイソフォームは、がんに存在する場合、NOTCH阻害剤、免疫療法および他の新規の標的手法の治療標的となる。活性化NOTCH変異は全ての腫瘍において見出されるわけではないので、変異体NOTCH受容体を標的化する治療に向けて患者を選択することは、NOTCH遺伝子変異の存在についての、がん細胞の治療前分析によって最適化されよう。

【０１４１】

本発明のNOTCH変異を検出するための方法は、核酸レベルまたはタンパク質レベルのいずれかで変異の存在を判定する任意の方法を含む。そのような方法は、当技術分野において周知であり、ウエスタンブロット法、ノザンブロット法、サザンブロット法、ELISA、免疫沈降法、免疫蛍光法、フローサイトメトリー法、免疫細胞化学的方法、核酸配列決定法、核酸ハイブリダイゼーション技法、核酸逆転写法、およびPCRのような、核酸増幅法を含むが、これらに限定されることはない。ある種の態様において、診断分析は、例えば以下の手法: ゲル電気泳動によるサイズ分画、直接配列決定、一本鎖構造多型(SSCP)、高圧液体クロマトグラフィー(部分変性HPLCを含む)、対立遺伝子特異的なハイブリダイゼーション、増幅抵抗変異スクリーニング、オリゴヌクレオチド・マイクロアレイによるNOTCH変異スクリーニング、制限断片長多型、MALDI-TOF質量分析、またはさまざまな関連技術の1つまたは複数を用いた、これらの変異についての、PCRに基づくアッセイ法に基づくことができる(Abu-Duhier et al., Br. J. Haematol., 113: 983-988, 2001; Kottaridis et al., Blood, 98: 1752-1759, 2001; Choy et al., Ann. Hum. Gen., 63: 383-391, 1999; Grompe, Nature Genetics, 5: 111-117, 1993; Perlin & Szabady, Hum. Mutat, 19: 361-373, 2002; Amos & Patnaik, Hum. Mutat., 19: 324-333, 2002; Cotton, Hum. Muta

t., 19: 313-314, 2002; Stirewalt et al., Blood, 97: 3589-3595, 2001; Hung et al., Blood Coagul. Fibrinolysis, 13: 117-122, 2002; Larsen et al., Pharmacogenomics, 2: 387-399, 2001; Shchepinov et al., Nucleic Acids Res., 29: 3864-3872, 2001)。

【０１４２】

特定の態様において、NOTCHタンパク質における変異(これはNOTCHシグナル伝達の増加を引き起こす)は、例えば、変異NOTCH受容体に対して作製された抗体、または下流のNOTCHシグナル伝達タンパク質を用いて、タンパク質レベルで検出される。これらの抗体は、ウエスタンブロット、ELISA、免疫沈降または免疫細胞化学の技法などの、さまざまな方法において用いることができる。

【０１４３】

免疫アッセイ法

1つの態様において、変異体NOTCHタンパク質に特異的な抗体は、生体サンプルにおけるNOTCH変異の存在を検出するために用いられる。本明細書において用いられる「生体サンプル」という語句は、NOTCH変異の存在が検出されうる細胞、組織または体液を含む任意のサンプルが意図される。そのような生体サンプルの例としては、血液、リンパ液、尿、婦人科学的体液、生検、羊水および塗抹標本が挙げられるが、これらに限定されることはない。生体サンプルは、種々の技法によって患者から得ることができる。さまざまな生体サンプルを回収するための方法は、当技術分野において周知である。いくつかの態様において、この方法は、患者から生体サンプルを得る段階、および変異体NOTCHタンパク質に対して作製された少なくとも1種の抗体と生体サンプルを接触させる段階を含む。そのような免疫アッセイ法は、手作業でまたは自動化された形で行うことができる。

【０１４４】

抗体結合を検出するための技法は、当技術分野において周知である。変異体NOTCHタンパク質への抗体の結合は、抗体結合のレベルに対応する、および、したがって、変異NOTCHタンパク質の存在に対応する検出可能なシグナルを生じる化学試薬の使用によって検出することができる。1つの態様において、抗体の結合は、標識された重合体に結合されている二次抗体の使用によって検出される。標識された重合体の例としては、重合体と酵素の結合体が挙げられるが、これに限定されることはない。これらの複合体における酵素は、典型的には、抗原・抗体結合部位での色素原の沈着を触媒し、それによって関心対象の変異の発現レベルに対応する細胞染色をもたらすために用いられる。特に関心対象の酵素には、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)およびアルカリホスファターゼ(AP)が含まれる。例えばDako Envision+システム(Dako North America, Inc., Carpinteria, Calif.)およびMach 3システム(Biocare Medical, Walnut Creek, Calif)のような、市販の抗体検出系を用いて、本発明を実践することができる。

【０１４５】

抗体結合の検出は、抗体を検出可能な物質にカップリングさせることによって容易にすることができる。検出可能な物質の例としては、さまざまな酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、生物発光物質および放射性物質が挙げられる。適当な酵素の例としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、β-ガラクトシダーゼまたはアセチルコリンエステラーゼが挙げられ; 適当な補欠分子族複合体の例としては、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンが挙げられ; 適当な蛍光物質の例としては、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、塩化ダンシルまたはフィコエリトリンが挙げられ; 発光物質の例としてはルミノールが挙げられ; 生物発光物質の例としては、ルシフェラーゼ、ルシフェリンおよびエクオリンが挙げられ; ならびに適当な放射性物質の例としては、^{125}I、^{131}I、^{35}Sまたは^{3}Hが挙げられる。

【０１４６】

免疫アッセイ法は、その最も単純および直接的な意味において、結合アッセイ法である。いくつかの態様において、免疫アッセイ法は、当技術分野において公知のさまざまなタ

イプの酵素結合免疫測定法(ELISA)および放射免疫アッセイ法(RIA)である。検出はそのような技法に限定されず、ウエスタンブロッティング、ドットブロッティング、FACS分析なども使用されうることが容易に理解されるであろう。

【０１４７】

核酸に基づく技法

他の態様において、NOTCH変異の存在は、核酸レベルで検出される。NOTCH変異の発現および特定を評価するための核酸に基づく技法は、当技術分野において周知である。1つの態様において、NOTCH変異は直接的な核酸配列決定によって特定される。多くの発現検出法では、単離されたRNAを用いる。mRNAの単離に不利な選択をする方向に働かない任意のRNA単離技法を、生体サンプルからのRNAの精製に利用することができる(例えば、Ausubel, ed., 1999, Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, New Yorkを参照のこと)。さらに、例えば、Chomczynski (米国特許第4,843,155号)の単一段階RNA単離プロセスのような、当業者に周知の技法を用いて、多数の組織サンプルを容易に加工処理することができる。

【０１４８】

「プローブ」という用語は、特に意図された標的生体分子、例えば、変異体NOTCHタンパク質によりコードされるまたは変異体NOTCHタンパク質に対応するヌクレオチド転写産物またはタンパク質に選択的に結合しうる任意の分子をいう。プローブは、公知の技法を用いて当業者により合成されることができ、または適切な生体調製物から導出されることができる。プローブは、検出可能な標識で標識されるように特別にデザインされてもよい。プローブとして使用できる分子の例としては、RNA、DNA、タンパク質(ペプチドを含む)、抗体および有機分子が挙げられるが、これらに限定されることはない。

【０１４９】

変異体NOTCHタンパク質に由来する単離されたmRNAは、mRNA配列決定法、サザンまたはノザン分析、ポリメラーゼ連鎖反応分析およびプローブアレイを含むが、これらに限定されない、ハイブリダイゼーションアッセイ法または増幅アッセイ法において検出することができる。mRNAレベルの検出のための1つの方法は、単離されたmRNAを、検出される遺伝子によりコードされるmRNAとハイブリダイズしうる核酸分子(プローブ)と接触させる段階を伴う。核酸プローブは、例えば、全長cDNA、またはその一部分、例えば長さが少なくとも7、15、30、50、100、250もしくは500ヌクレオチドの、かつ本発明の変異体NOTCHポリペプチドをコードするmRNAもしくはゲノムDNAとストリンジェントな条件の下で特異的にハイブリダイズするのに十分なオリゴヌクレオチドでありうる。mRNAとプローブとのハイブリダイゼーションから、当該変異が発現されていることが示唆される。

【０１５０】

1つの態様において、mRNAは、例えば、単離されたmRNAをアガロースゲル上で泳動し、mRNAをゲルからニトロセルロースのような、膜へ転写することにより、固体表面に固定化され、プローブと接触される。代替的な態様において、プローブは固体表面に固定化され、mRNAは、例えば、Affymetrix遺伝子チップアレイ(Santa Clara, Calif.)において、プローブと接触される。本発明のNOTCH変異の存在の検出で用いるために、公知のmRNA検出方法を容易に適合することができる。

【０１５１】

サンプルにおける変異体NOTCH mRNAの存在を判定するための代替的な方法は、例えばRT-PCR (Mullis, 1987, 米国特許第4,683,202号に記載されている実験の態様)、リガーゼ連結反応(Barany, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 189 193)、自家持続配列複製(Guatelli, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 1874 1878)、転写増幅系(Kwoh, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 1173 1177)、Q-ベータレプリカーゼ(Lizardi, 1988, Bio/Technology, 6:1197)、ローリングサークル複製(Lizardi, 米国特許第5,854,033号)またはその他任意の核酸増幅方法による、核酸増幅のプロセスに続いて、当業者に周知の技法を用いた増幅分子の検出を伴う。これらの検出スキームは、そのような分子が非常に少ない数で存在するなら、核酸分子の検出にとりわけ有用である。本発明の特定の局

面において、NOTCH変異の存在は、定量的蛍光発生RT－PCR（すなわち、TaqMan(登録商標) System)によって評価される。そのような方法では、典型的には、関心対象のNOTCH変異を含む領域に隣接するオリゴヌクレオチドプライマーの対を用いる。公知の配列に特異的なオリゴヌクレオチドプライマーをデザインするための方法は、当技術分野において公知である。

【０１５２】

マイクロアレイ

本発明の1つの態様において、生体サンプルにおけるNOTCH変異の存在を検出するためにマイクロアレイが用いられる。マイクロアレイは、その再現性のため、この目的に特によく適している。DNAマイクロアレイは、関心対象の分子の異なる部分に対して作製された多数のオリゴヌクレオチドプローブまたは多数の遺伝子の発現レベルの同時測定のための1つの方法を提供する。各アレイは、固体支持体に付着された、再現性のあるパターンの捕捉プローブからなる。標識されたRNAまたはDNAがアレイ上の相補プローブとハイブリダイズされ、その後、例えばレーザースキャニングによって検出される。アレイ上の各プローブに対するハイブリダイゼーション強度を判定し、相対的な遺伝子発現レベルを表す定量値に変換する。米国特許第6,040,138号、同第5,800,992号および同第6,020,135号、同第6,033,860号、ならびに同第6,344,316号を参照されたく、これらは参照により本明細書に組み入れられる。高密度オリゴヌクレオチドアレイは、サンプル中の多数のRNAに対する遺伝子発現プロファイルを判定するのに特に有用である。

【０１５３】

機械的合成方法を用いるこれらのアレイの合成のための技法は、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第5,384,261号に記述されている。平面アレイ表面が好ましいが、アレイを実質的に任意の形状の表面またはさらには複数の表面上で製造することができる。アレイは、ビーズ、ゲル、重合体表面、光ファイバーのような繊維、ガラスまたは他の任意の適切な基材上のペプチドまたは核酸とすることができ、米国特許第5,770,358号、同第5,789,162号、同第5,708,153号、同第6,040,193号および同第5,800,992号を参照されたく、これらはそれぞれ、その全体が本明細書に組み入れられる。アレイは、診断または包括的装置の他の操作を可能にするような様式で包装することができる。例えば、参照により本明細書に組み入れられる米国特許第5,856,174号および同第5,922,591号を参照されたい。

【０１５４】

変異体NOTCHタンパク質をコードする核酸は、チップ(例えば、DNAチップまたはマイクロチップ)上のような、基材上のアレイに配置することができる。これらのアレイは、マイクロタイタープレート、ビーズまたはマイクロスフェアのような、他の基材上に配置することもできる。核酸を適当な基材に連結させる方法および基材そのものが、例えば、米国特許第5,981,956号; 同第5,922,591号; 同第5,994,068号(Gene Logic's Flow-thru Chip0 Probe Arrays0); 米国特許第5,858,659号; 同第5,753,439号; 同第5,837,860号ならびにLuminexのFlowMetrix技術(例えば、マイクロスフェア)（米国特許第5,981,180号および同第5,736,330号)に記述されている。

【０１５５】

本発明の方法によるゲノム材料のサンプルにおける複数の変異のスクリーニングは一般的に、オリゴヌクレオチドプローブのアレイを用いて行われる。これらのアレイは一般的に、多数の特異的変異について「タイルされ」うる。「タイリング」とは一般的に、関心対象の標的配列、および予め選択されたその配列のバラツキ、例えば基本セットの単量体、すなわちヌクレオチドの1つまたは複数の成員による1つまたは複数の位置での置換に相補的な配列から構成されるオリゴヌクレオチドプローブの定義済みのセットの合成を意味する。タイリング戦略は、全ての目的で全体が参照により本明細書に組み入れられるPCT出願公開番号WO 95/11995に詳細に論じられている。「標的配列」とは、関心対象の変異体ポリペプチドまたはその部分をコードすると特定された配列を意味する。

【０１５６】

特定の局面において、アレイはいくつかの特異的な、特定されたNOTCH変異についてタイルされる。具体的には、アレイは、各検出ブロックが特定の変異または変異のセットに特異的である、いくつかの検出ブロックを含むようにタイルされる。例えば、検出ブロックは、特異的な変異または変異のセットを含む配列セグメントに及ぶいくつかのプローブを含むようにタイルすることができる。各変種に相補的であるプローブを確実とするために、プローブは、例えば、両対立遺伝子の塩基の位置で異なっている二つ一組で合成される。

【０１５７】

最適なタイリング構成は、比較分析により任意の特定の変異について判定することができる。例えば、そのような最適なタイリング戦略を選択するために、三つ組またはさらに大きな検出ブロックを容易に利用することができる。

【０１５８】

さらに、アレイは一般的に、読み出しおよび分析の容易さを提供するようにタイルされる。例えば、検出ブロック内にタイルされるプローブは一般的に、プローブがタイルされる検出ブロックにわたって連続的に読み出しがあるように、すなわち、標的配列に沿って一度に1つまたは複数のヌクレオチドを進行するように並べられる。

【０１５９】

変異のセットについてアレイが適切にタイルされたら、標的核酸をアレイとハイブリダイズさせ、スキャンする。すでに特定された1つまたは複数の変異を含む、標的核酸配列を、周知の増幅技法、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって増幅させる。典型的には、これは、変異から上流および下流の両方の標的配列の2つの鎖に相補的であるプライマー配列の使用を伴う。非対称PCR技法を用いることもできる。一般的には標識を組み入れてある、増幅された標的を次に、適切な条件の下でアレイとハイブリダイズさせる。アレイのハイブリダイゼーションおよび洗浄が完了次第、アレイをスキャンして、標的配列がハイブリダイズしているアレイ上の位置を判定する。スキャンから得られるハイブリダイゼーションデータは、典型的には、アレイ上の位置に応じた蛍光強度の形態である。

【０１６０】

単一の検出ブロックに関して、例えば、単一の変異の検出について主に記述されているが、いくつかの態様において、本発明のアレイは、複数の検出ブロックを含み、かくして、複数の特異的な変異を分析することができる。

【０１６１】

代替的な並べ方では、検出ブロックを単一のアレイ内でまたは複数の、別個のアレイ中でグループ化することができ、その結果、アレイとの標的のハイブリダイゼーションの間に種々の、最適な条件が用いられうることが一般的に理解されよう。例えば、ＡＴに富むセグメントに含まれる多型とは別に、ゲノム配列のＧＣに富むストレッチに含まれる多型の検出を提供することが望ましいことも多い場合がある。これによって、状況ごとのハイブリダイゼーション条件の個別の最適化が可能になる。

【０１６２】

1つの手法では、サンプルから単離された全mRNAを、標識されたcRNAまたはcDNAに変換し、その後、本発明の1つまたは複数の変異を含むオリゴヌクレオチドアレイとハイブリダイズさせる。各サンプルを別個のアレイとハイブリダイズさせる。相対的な転写産物のレベルを、アレイ上におよびサンプル中に存在する適切な対照を参照することにより計算することができる。

【０１６３】

変異体NOTCHタンパク質の直接的な検出に加えて、活性化NOTCH変異体は、全体的な遺伝子発現プロファイルまたはさまざまなシグナル伝達中間体の活性化分析によって検出されうる独特のシグナル伝達プロファイル(例えば、シグナル伝達の増加)をもたらすものと予想される。

【０１６４】

個々の変異は有用な診断バイオマーカーであるが、1つの態様において、変異の組み合

わせを用いて、特定の治療状態の予測値を提供することができる。具体的には、サンプルにおける複数の変異の検出は、試験の感度および/または特異性を高めることができる。少なくとも2種の変異の組み合わせは、「変異プロファイル」または「変異フィンガープリント」といわれることもある。

【０１６５】

血液系腫瘍および固形腫瘍の両方を含む、悪性腫瘍の一部の病因は、腫瘍細胞におけるNOTCH媒介性のシグナル伝達の増大と関連付けられている。NOTCH媒介性のシグナル伝達の増大は、活性化NOTCH変異、例えば、本明細書において記述されるNOTCH変異の存在と関連付けることができる。NOTCH媒介性のシグナル伝達の増大は、NOTCHシグナル伝達の負の調節因子の活性を低減するまたはなくす変異と関連付けることもできる。例えば、Westhoff et al., Proc Natl Acad Sci 2009 December 29; 106(52): 22293-22298を参照されたい。NOTCH媒介性のシグナル伝達の増大は、NOTCH ICDの過剰発現と関連付けることができる。NOTCHシグナル伝達の活性化は、全ての腫瘍と関連付けられるわけではないので、NOTCHシグナル伝達を標的化する治療に向けて患者を選択することは、NOTCH ICDのレベル増大の存在についての、がん細胞の治療前分析によって最適化されよう。

【０１６６】

腫瘍細胞におけるNOTCH ICDのレベルを検出するための方法は、生体サンプル中のNOTCH ICDポリペプチドの存在を検出する任意の方法を含むことができる。そのような方法は、当技術分野において周知であり、ウエスタンブロット法、スロットブロット法、ELISA、免疫沈降法、免疫蛍光法、フローサイトメトリー法、免疫細胞化学的方法、免疫組織化学(IHC)法、および質量分析法を含むが、これらに限定されることはない。1つの態様において、腫瘍サンプル中のNOTCH ICDのレベルは、IHCを用いて判定される。

【０１６７】

1つの態様において、NOTCH ICDのレベルは、NOTCH ICDに特異的に結合する薬剤を用いて判定される。NOTCH ICDへの特異的な結合を示す任意の分子的実体を利用して、サンプル中のNOTCH ICDのレベルを判定することができる。特異的な結合剤には、抗体、抗体模倣体およびポリヌクレオチド(例えば、アプタマー)が含まれるが、これらに限定されることはない。当業者は、必要とされる特異性の度合が、NOTCH ICDを検出するために用いられる特定のアッセイ法によって判定されることを理解している。例えば、全長NOTCHおよびNOTCH ICDの両方に特異的に結合する薬剤は、サイズに基づくポリペプチドの分離を伴う方法、例えばウエスタンブロット法において用いることができる。

【０１６８】

1つの態様において、方法には、NOTCH1 ICD、NOTCH2 ICD、NOTCH3 ICDまたはNOTCH4 ICDに特異的に結合する薬剤を利用して、それぞれ、NOTCH1 ICD、NOTCH2 ICD、NOTCH3 ICDまたはNOTCH4 ICDのレベルを判定する。別の態様において、方法には、NOTCH1 ICD、NOTCH2 ICD、NOTCH3 ICDおよびNOTCH4 ICDの少なくとも2つ、少なくとも3つ、または全4つに特異的に結合する薬剤を利用して、薬剤によって特異的に結合されたNOTCH ICDの複合レベルを判定する。1つの態様において、方法には、NOTCH1 ICDに特異的に結合する薬剤を利用して、サンプル中のNOTCH1 ICDのレベルを判定する。さらなる態様において、方法には、NOTCH3 ICDに特異的に結合する薬剤を利用して、サンプル中のNOTCH3 ICDのレベルを判定する。

【０１６９】

1つの態様において、NOTCH ICDのレベルは、NOTCH ICDに特異的な抗体を用いて判定される。別の態様において、抗体はモノクローナル抗体である。抗NOTCH ICD特異抗体は、当業者に公知の任意の方法にしたがって作出することができる。例えば、Tagami et al., Mol. Cell.Biol.28(1):165-176を参照されたい。抗NOTCH ICD特異抗体は、商業的供給源から入手することもできる。例えば、R&D Systems, Anti-human NOTCH-2 Intracellular Domain Antibody、カタログ番号BAF3735を参照されたい。1つの態様において、抗NOTCH ICD特異抗体は、NOTCH ICDに特異的に結合するが、しかしNOTCHに特異的に結合しない。別の態様において、抗NOTCH ICD特異抗体は、NOTCH1 ICD、NOTCH2 ICD、NOTCH3 ICDまたはN

OTCH4 ICDに特異的に結合する。別の態様において、抗NOTCH ICD特異抗体は、NOTCH1 ICD、NOTCH2 ICD、NOTCH3 ICDまたはNOTCH4 ICDの少なくとも2つ、少なくとも3つまたは全4つに特異的に結合する。抗NOTCH ICD抗体は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、キメラ抗体またはその抗原結合断片であることができる。さらなる態様において、抗体は、固定かつ包埋された組織サンプル中のNOTCH ICDに特異的に結合する。組織サンプルは、ホルマリン固定された組織サンプルであることができる。組織サンプルは、パラフィン包埋された組織サンプルであることができる。

【０１７０】

1つの態様において、NOTCH ICDに特異的に結合する薬剤、例えば、抗体は、生体サンプル中のNOTCH ICDのレベルを判定するために用いられる。本明細書において用いられる「生体サンプル」という語句は、NOTCH ICDのレベルが検出されうる細胞、組織または体液を含む任意のサンプルが意図される。そのような生体サンプルの例としては、血液、リンパ液、尿、婦人科学的体液、生検、組織、羊水、外科的切除によって得られる固形組織サンプル、病理標本、保管されたサンプル、それに由来する組織培養物または細胞およびその子孫、ならびにこれらの供給源のいずれかから調製された切片または塗抹標本が挙げられるが、これらに限定されることはない。生体サンプルは、種々の技法によって患者から得ることができる。さまざまな生体サンプルを回収するための方法は、当技術分野において周知である。この用語には、個体に存在するサンプルおよび個体から得られるサンプルまたは個体に由来するサンプルも含まれる。例えば、サンプルは、生検により得られた標本の組織切片、または組織培養に置かれているまたは組織培養に適合されている細胞であることができる。サンプルはさらに、細胞下画分もしくは抽出物、または未精製のもしくは実質的に純粋な核酸分子もしくはタンパク質抽出物であることができる。いくつかの態様において、本方法は、患者から生体サンプルを得る段階、およびNOTCH ICDに特異的に結合する少なくとも1種の抗体と生体サンプルを接触させる段階を含む。そのような免疫アッセイ法は、手作業でまたは自動化された形で行うことができる。

【０１７１】

抗体結合を検出するための技法は、当技術分野において周知である。NOTCH ICDへの抗体の結合は、抗体結合のレベルに対応する、および、したがって、NOTCH ICDのレベルに対応する検出可能なシグナルを生じる化学試薬の使用によって検出することができる。1つの態様において、NOTCH ICD抗体結合は、標識された重合体に結合されている二次抗体の使用によって検出される。標識された重合体の例としては、重合体と酵素の結合体が挙げられるが、これに限定されることはない。これらの複合体における酵素は、典型的には、抗原・抗体結合部位での色素原の沈着を触媒し、それによって関心対象の変異の発現レベルに対応する細胞染色をもたらすために用いられる。特に関心対象の酵素には、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)およびアルカリホスファターゼ(AP)が含まれる。例えばDako Envision+システム(Dako North America, Inc., Carpinteria, Calif.)およびMach 3システム(Biocare Medical, Walnut Creek, Calif.)のような、市販の抗体検出系を本発明の方法において用いることができる。

【０１７２】

抗体結合の検出は、NOTCH ICD抗体を検出可能な標識にカップリングさせることによって容易にすることができる。検出可能な標識の例としては、さまざまな酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、生物発光物質および放射性物質が挙げられる。適当な酵素の例としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、β-ガラクトシダーゼまたはアセチルコリンエステラーゼが挙げられ; 適当な補欠分子族複合体の例としては、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンが挙げられ; 適当な蛍光物質の例としては、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、塩化ダンシルまたはフィコエリトリンが挙げられ; 発光物質の例としてはルミノールが挙げられ; 生物発光物質の例としては、ルシフェラーゼ、ルシフェリンおよびエクオリンが挙げられ; ならびに適当な放射性物質の例としては、125I、131I、35Sまたは3Hが挙げられる。

【０１７３】
NOTCH ICDへの抗体の結合のレベルは、当技術分野において公知のさまざまな方法、例えば、酵素結合免疫測定法(ELISA)、免疫蛍光法、免疫組織化学法および放射免疫アッセイ法(RIA)によって定量化することができる。NOTCH ICDレベルの検出はそのような技法に限定されず、ウエスタンブロッティング、ドットブロッティング、FACS分析なども使用されうる。

【０１７４】
1つの態様において、本方法は、細胞内区画中の、例えば、細胞質ゾル中のまたは核中のNOTCH ICDのレベルを判定する段階を含む。1つの態様において、本明細書において記述される方法は、核中のNOTCH ICDのレベルを判定する段階を含む。1つの態様において、核NOTCH ICDのレベルは、サンプルから核タンパク質画分を単離することによって判定することができる。別の態様において、核NOTCH ICDのレベルは、顕微鏡検査によって判定される。そのような核NOTCH ICDの判定方法は、手作業でまたは自動化された形で行うことができる。

【０１７５】
1つの態様において、腫瘍細胞核中のNOTCH ICDのレベルは、顕微鏡検査によって判定される。NOTCH ICDレベルは、例えば、免疫蛍光法、免疫組織化学法および放射免疫アッセイ法によって判定することができる。1つの態様において、核NOTCH ICDのレベルは、免疫組織化学法(IHC)によって判定される。サンプル中の核NOTCH ICDのレベルは、当業者に公知の任意のスコアリングシステムによって表すことができる。

【０１７６】
腫瘍サンプル中のNOTCH ICDのレベルは、NOTCH ICD特異的染色の強度に基づいてまたはNOTCH ICD陽性細胞の割合に基づいてスコア化されうる。1つの態様において、腫瘍サンプル中の核NOTCH ICDのレベルは、検出可能な量のNOTCH ICDを含むサンプル内の細胞の比率、例えば、割合として表される。例えば、サンプル中の核NOTCH ICDのレベルは、NOTCH ICD陽性である腫瘍サンプル中の核10%、20%、30%、40%などとして表すことができる。別の態様において、腫瘍サンプル中の核NOTCH ICDのレベルは、腫瘍サンプル中の核の染色強度を評価することによって判定される。例えば、腫瘍サンプルは、核のNOTCH ICD特異的な染色強度に基づいて陰性、弱い染色、および中くらいまたは強い染色と特徴付けることができる。

【０１７７】
さらなる態様において、腫瘍サンプル中の核NOTCH ICDのレベルは、NOTCH ICD特異的なものの強度および頻度の両方を評価することによって判定される。1つの態様において、腫瘍サンプル中の核NOTCH ICDレベルを特徴付けるために、H-スコアが用いられる。染色なしの場合の0から最も強い染色の場合の3+に及ぶ半定量的な強度尺度を用いて、サンプル中の核に染色強度スコアを割り当てる。各分類上の区分、すなわち、0、1+、2+および3+に分類される核の割合をカウントする。H-スコアは、以下の式を用い核の染色について計算することができる: H-スコア = (0の%) ＊ 0 + (1+の%) ＊ 1 + (2+の%) ＊ 2 + (3+の%) ＊ 3。H-スコアは、0から300に及ぶ連続型変数をもたらす。

【０１７８】
本明細書において記述される方法の別の局面は、試験サンプルにおいて検出されたNOTCH ICDのレベルを所定の標準または参照レベル、例えば、対照サンプルのNOTCH ICDレベルと比較することである。対照サンプルは、試験サンプルと同じような方法で患者から得られたサンプルであることができ、ここで対照サンプルは腫瘍細胞を含まない。対照サンプルは、腫瘍またはがんを有していない対象由来の試験サンプルと同じような方法で得ることもできる。

【０１７９】
1つの態様において、本方法は、NOTCH ICDのレベルを所定の標準、または参照レベル、または対照レベルと比較する段階を含む。「所定の標準」、「参照レベル」および「対照レベル」という用語は、場合によっては、本明細書において互換的に用いられる。1つの

態様において、所定の標準は、比較可能な対照サンプル、例えば、腫瘍またはがん細胞を含まないサンプルにおいて測定されたNOTCH ICDのベースラインレベルである。別の態様において、所定の標準は、上昇したレベルのNOTCH ICDを発現しないがん細胞を含んだサンプルにおいて測定されたNOTCH ICDのベースラインレベルである。さらなる態様において、所定の標準は、NOTCHアンタゴニストまたは阻害剤、例えば、抗NOTCH抗体による処置に応答しないがん細胞を含んだサンプルにおいて測定されたNOTCH ICDのベースラインレベルである。別の態様において、所定の標準は、単離された細胞株において測定されたNOTCH ICDのベースラインレベルである。細胞株はがんサンプルに由来することができる。細胞株を組み換えにより操作して、NOTCHまたはNOTH ICDを発現させることができる。

【０１８０】

ある種の代替的な態様において、参照レベルまたは所定の標準は、正常細胞におけるNOTCH ICDレベルに基づくのではなく、むしろ参照レベルまたは所定の標準は、腫瘍細胞におけるNOTCH ICDレベルに基づく。

【０１８１】

いくつかの態様において、NOTCH ICD (例えば、NOTCH1 ICD)のレベルが比較される参照レベルまたは所定の標準は、H-スコア値である。いくつかの態様において、参照レベルは約10、約20、約30、約50または約100のH-スコアである。いくつかの態様において、参照レベルは約30のH-スコアである。いくつかの態様において、H-スコアは、抗NOTCH1 ICD抗体による免疫組織化学アッセイ法(「NOTCH1 ICD IHCアッセイ法」)由来である。

【０１８２】

ある種の態様において、患者の腫瘍がNOTCH1 ICD IHCアッセイ法において約30またはそれ以上のH-スコアを有するなら、患者は処置に向けて選択され、かつ/または抗NOTCH1抗体もしくは本明細書において記述される他の抗NOTCH治療剤で処置される。いくつかのそのような態様において、患者は処置に向けて選択され、かつ/あるいはOMP-52M51、またはOMP-52M51の6つのCDRおよび/もしくは可変領域を含む抗体で処置される。いくつかの代替的な態様において、患者の腫瘍がNOTCH1 ICD IHCアッセイ法において約50またはそれ以上のH-スコアを有するなら、患者は処置に向けて選択され、かつ/または抗NOTCH1抗体もしくは本明細書において記述される他の抗NOTCH治療剤で処置される。いくつかのそのような態様において、患者は処置に向けて選択され、かつ/またはOMP-52M51、OMP-52M51の6つのCDRおよび/もしくは可変領域を含む抗体で処置される。いくつかの代替的な態様において、患者の腫瘍がNOTCH1 ICD IHCアッセイ法において約100またはそれ以上のH-スコアを有するなら、患者は処置に向けて選択され、かつ/または抗NOTCH1抗体もしくは本明細書において記述される他の抗NOTCH治療剤(OMP-52M51またはOMP-52M51の6つのCDRおよび/もしくは可変領域を含む抗体を含むが、これらに限定されない)で処置される。

【０１８３】

IV. 抗NOTCH剤

抗NOTCH治療剤は、NOTCHシグナル伝達またはNOTCHリガンドとの相互作用を遮断または低減するアンタゴニストである。NOTCH受容体活性化は、リガンド誘導性のタンパク質分解に依る。DSLリガンドの結合は、NTMの細胞外部分におけるS2の位置での切断につながる。部位3でのγ-セクレターゼ複合体によるさらなる切断は、N(商標)の細胞内ドメイン(ICD)の放出をもたらし、このドメインの核への移行を可能にする。核内で、ICDは多タンパク質複合体を形成し、これが、補助活性化因子を動員する、Mastermind-like-1-3のような足場タンパク質および転写因子への結合により標的遺伝子の転写を活性化する。核ICDは、短命であり、全てのNOTCH受容体に共通するPESTドメインのカルボキシ末端破壊ボックスに関連した機構による破壊の標的とされる。したがって、抗NOTCH治療剤は、リガンド結合領域およびLNR HDドメインを標的とする薬剤を含むが、これに限定されない、NOTCH活性化を阻害する任意の薬剤であることができる。ある種の態様において、抗NOTCH治療剤は、NOTCH受容体に特異的に結合する抗体(すなわち、抗NOTCH抗体)のような、抗体である。ある種の態様において、抗体は、ヒトNOTCH受容体に特異的に結合する。

【０１８４】

一般に、抗NOTCH剤は、活性化変異を持つ少なくともNOTCH受容体によるシグナル伝達を標的とする。例えば、抗NOTCH1治療剤は、NOTCH1活性化変異を持つ患者の処置において用いられる。

【０１８５】

別の態様において、抗NOTCH剤は、所定の標準または参照レベルのレベルを上回るICD発現レベルを有するNOTCH受容体によるシグナル伝達を標的とする。例えば、抗NOTCH1治療剤は、所定の標準または参照レベルを上回るNOTCH1 ICDのレベルを含む腫瘍細胞を有する患者の処置において用いられる。

【０１８６】

ある種の態様において、抗NOTCH剤は、γ-セクレターゼの阻害剤である。γ-セクレターゼ阻害剤はNOTCH受容体活性化を抑止することもできるので、いくつかの形態のγ-セクレターゼ阻害剤が抗腫瘍効果について試験されている。最初に、オリジナルのγ-セクレターゼ阻害剤IL-X (cbz-IL-CHO)は、Rasで形質転換された線維芽細胞においてNOTCH1依存性の抗新生物活性を有することが示された。トリペプチドγ-セクレターゼ阻害剤(z-Leu-leu-Nle-CHO)は、黒色腫およびカポジ肉腫由来のマウス体内の異種移植片および/または細胞株における腫瘍成長を抑制することが報告された(Curry CL et al,. Oncogene 24:6333-44(2005))。ジペプチドγ-セクレターゼ阻害剤N-[N-(3,5-ジフルオロフェンアセチル)-L-アラニル]-S-フェニルグリシンt-ブチルエステル(DAPT)による処置も、髄芽腫成長の著しい低減を引き起こし、T-ALL動物モデルにおいてG0-G1細胞周期停止およびアポトーシスを誘導した(O'Neil J. et al., Blood 107:781-5 (2006))。別のγ-セクレターゼ阻害剤ジベンザゼピンは、Apc-/- (min)マウスの腸腺腫において上皮細胞の増殖を阻害すること、および杯細胞の分化を誘導することが示されている(van Es JH, et al., Nature 435:959-63 (2005))。つい最近では、トリペプチドγ-セクレターゼ阻害剤またはNOTCH3特異的な低分子干渉RNAによるNOTCH3の機能的不活化から、NOTCH3を過剰発現した腫瘍細胞株で細胞増殖の抑制およびアポトーシスの誘導が引き起こされているが、しかし必要最低限量のNOTCH3発現を有するものでは引き起こされていない(Park JT et al., Cancer Res. 66: 6312-8 (2006))。さらに、NOTCH阻害剤MK0752 (Merck, Whitehouse Station, NJにより開発された)に対する第I相臨床試験が、再発性または難治性T-ALL患者および進行性乳がんに対して開始されている。

【０１８７】

抗NOTCH抗体は、NOTCH受容体へのNOTCHリガンドへのNOTCH受容体の結合の遮断によりNOTCHアンタゴニストとして作用することもできる。抗NOTCH剤は、NOTCHリガンドに特異的に結合する抗体(抗NOTCHリガンド抗体)を包含することもできる。本発明のNOTCH受容体/リガンド抗体は、当技術分野において知られる任意の従来の手段によって調製することができる。

【０１８８】

ある種の態様において、抗NOTCH抗体はモノクローナル抗体である。モノクローナル抗体は、当技術分野において公知の任意の手段によって調製することができる(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, 1986)。モノクローナル抗体はKohler and Milstein (1975) Nature 256:495によって記述されているものなどの、ハイブリドーマ法を用いて調製することができる。モノクローナル抗体は、米国特許第4,816,567号に記述されているように組み換えDNA法を用いて作出することもできる。所望の種の組み換えモノクローナル抗体またはその断片は、当技術分野において公知の技法を用いて所望の種のCDRを発現するファージディスプレイライブラリから単離することもできる(McCafferty et al., Nature, 345:552-554 (1990); Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991); およびMarks et al., J. Mol Biol, 222:581-597 (1991))。

【０１８９】

いくつかの態様において、抗NOTCH抗体はヒト化抗体である。ヒト化抗体は、可変領域内に非ヒト(例えば、マウス)抗体由来の最小限の配列を含む抗体である。そのような抗体は、ヒト対象に投与された時に抗原性およびHAMA (ヒト抗マウス抗体)反応を低減するた

め、治療的に用いられる。ヒト化抗体は、当技術分野において公知のさまざまな技法を用いて産生することができる(Jones et al., Nature, 327:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536 (1988))。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で置き換えることによりヒト化することができる。ヒト化抗体を、可変ヒトフレームワーク領域中および/または置き換えられた非ヒト残基内のさらなる残基の置換によりさらに改変して、抗体の特異性、親和性および/または能力を改良および最適化することができる。

【０１９０】

他の態様において、抗NOTCH抗体は完全ヒト抗体である。ヒト抗体は当技術分野において公知のさまざまな技法を用いて調製することができる。標的抗原に対して作製された抗体を産生する免疫個体から単離されたまたはインビトロで免疫された不死化ヒトBリンパ球を作出することができる(例えば、Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner et al., 1991, J. Immunol., 147 (1):86-95; および米国特許第5,750,373号を参照のこと)。また、ヒト抗体を発現するファージライブラリーから、ヒト抗体を選択することができる(Vaughan et al., 1996, Nat. Biotech., 14:309-314; Sheets et al., 1998, Proc. Nat'l. Acad. Sci., 95:6157-6162; Hoogenboom and Winter, 1991, J. Mol. Biol., 227:381; Marks et al., 1991, J. Mol. Biol., 222:581)。ヒト抗体は、免疫によって、内因性免疫グロブリンを産生せずに、ヒト抗体の広範なレパートリーを産生できるヒト免疫グロブリン遺伝子座を含む遺伝子導入マウスにおいて作出することもできる。この手法は、米国特許第5,545,807号; 同第5,545,806号; 同第5,569,825号; 同第5,625,126号; 同第5,633,425号; および同第5,661,016号に記述されている。

【０１９１】

1つの態様において、抗NOTCH抗体は、NOTCH受容体のリガンド結合領域を特異的に結合する。他の態様において、抗NOTCH抗体は、NOTCH受容体のリガンド結合領域を包含しない1つまたは複数のEGF様ドメインに結合する。別の態様において、抗NOTCH抗体は、NOTCH受容体のLNR-HD陰性調節領域中のエピトープに特異的に結合する。別の態様において、抗NOTCH抗体は、NOTCH受容体の切断を遮断する。

【０１９２】

ある種の態様において、抗NOTCH剤は、デルタ様リガンドおよびJaggedタンパク質を含む、NOTCHリガンドを特異的に結合する抗体である。1つの態様において、抗NOTCH剤は、デルタ様リガンド4 (DLL4)を結合する抗体である。1つの態様において、抗NOTCH剤は、Jagged 1または2を結合する抗体である。

【０１９３】

ある種の態様において、抗NOTCH抗体は、2008年8月7日付でATCCに寄託されたハイブリドーマにより産生され、かつ「マウス52M51」としても公知の、ATCC寄託番号PTA-9405を有する抗体である。マウス52M51抗体は、参照により全体が本明細書に組み入れられる、2009年7月8日付で出願されかつWO 2010/005567として公開された、国際特許出願PCT/US2009/003995に詳細に記述されている。

【０１９４】

ある種の態様において、抗NOTCH抗体は、CDRアミノ酸配列CDR1 (SEQ ID NO:5); CDR2 (SEQ ID NO:6); およびCDR3 (SEQ ID NO:7)を含んだ重鎖可変領域; ならびにCDRアミノ酸配列CDR1 (SEQ ID NO:8); CDR2 (SEQ ID NO:9); およびCDR3 (SEQ ID NO:10)を含んだ軽鎖可変領域を含むヒト化抗NOTCH抗体である。1つの態様において、ヒト化抗NOTCH抗体は、SEQ ID NO:14の重鎖可変領域配列およびSEQ ID NO:18の軽鎖可変領域配列を含む。

【０１９５】

ある種の態様において、抗NOTCH抗体は、「52M51 H4L3」としても公知の、ATCC寄託番号PTA-9549を有する、2008年10月15日付でATCCに寄託されたプラスミドによりコードされるOMP-52M51ヒト化抗体である。「52M51 H4L3」、「OMP-52M51」および「52M51」という

用語は、通常、本明細書において互換的に用いられる。52M51 H4L3はまた、2009年7月8日付で出願されかつWO 2010/005567として公開された、国際特許出願PCT/US2009/003995、および米国特許出願公開第2011/0311552号に詳細に記述されており、このどちらもその全体が参照により本明細書に組み入れられる。OMP-52M51は、SEQ ID NO:14の重鎖可変領域配列およびSEQ ID NO:18の軽鎖可変領域配列を含む。

【０１９６】

ある種の態様において、抗NOTCH抗体は、ヒトNOTCH1への特異的結合について、抗体OMP-52M51と競合する抗体である。

【０１９７】

ある種の態様において、抗NOTCH抗体は、2009年7月6日付でATCCに寄託されたハイブリドーマにより産生され、かつ59R5としても公知の、ATCC寄託番号PTA-10170を有する抗体である。59R5抗体は、参照により全体が本明細書に組み入れられる、2009年7月8日付で出願されかつ米国特許出願公開第2010/0111958号として公開された、米国特許出願第12/499,627号に詳細に記述されている。

【０１９８】

抗NOTCH抗体59R5は、CDRアミノ酸配列CDR1 (SEQ ID NO:23); CDR2 (SEQ ID NO:24); およびCDR3 (SEQ ID NO:25)を含んだ重鎖可変領域; ならびにCDRアミノ酸配列CDR1 (SEQ ID NO:26); CDR2 (SEQ ID NO:27); およびCDR3 (SEQ ID NO:28)を含んだ軽鎖可変領域を含む。1つの態様において、59R5抗体は、SEQ ID NO:30の重鎖可変領域配列およびSEQ ID NO:32の軽鎖可変領域配列を含む。

【０１９９】

ある種の態様において、抗NOTCH抗体は、ヒトNOTCH2またはNOTCH3への特異的結合について、抗体59R5と競合する抗体である。

【０２００】

他の抗NOTCH抗体は、当技術分野において公知である。抗NOTCH抗体は、商業的供給源から入手可能である(例えば、Santa Cruz Biotechnology, Inc. カタログ番号sc-6014は、ヒトNOTCH1の細胞外ドメインに結合するヤギポリクローナル抗体である)。いくつかの態様において、NOTCHアンタゴニストは、2008年5月31日付で出願された米国特許第7,919,092号; 2008年1月24日付で出願されかつ米国特許出願公開第2009/0047285号として公開された米国特許出願第12/010,421号; 2011年1月13日付で出願されかつ国際出願公開番号WO 2011/088215として公開された国際出願番号PCT/US2011/021135; 2008年6月3日付で出願されかつ米国特許出願公開第2009/0258026号として公開された米国特許出願第12/156,590号; 2007年12月17日付で出願されかつ米国特許出願公開第2008/0226621号として公開された米国特許出願第11/958,099号に記述されている抗NOTCH抗体の1つであることができる。

【０２０１】

V. スクリーニングアッセイ法における変異NOTCHポリペプチドの使用

本発明の方法には、同様に他の用途がある。例えば、変異NOTCHポリペプチドを用いて、インビトロでまたはインビボでNOTCHの発現を調節する化合物をスクリーニングすることができ、これらの化合物を、患者におけるがんの処置または予防に有用とすることができる。別の例において、変異NOTCHポリペプチドを用いて、がんの処置に対する反応をモニターすることができる。

【０２０２】

本開示はさらに、いくつかの態様において、試験化合物を、新生物、とりわけ前がん病変を処置する、検出する、分析する、改善する、回復に向かわせる、および/または予防するその能力についてスクリーニングするための新規の方法に関する。特に、本開示は、前がん病変を含む、新生物を処置する、改善する、回復に向かわせる、および/または予防するために使用できる試験化合物を特定するための方法を提供する。関心対象の化合物は、本明細書において記述される新規の活性化NOTCH変種を化合物に曝露することによって試験することができ、化合物がNOTCH変種の1つを阻害するなら、この化合物を次に、その抗新生物特性についてさらに評価する。これらの化合物は、低分子阻害剤、核酸および

抗体を含むことができるが、これらに限定されることはない。1つの局面では、新生物を処置する、予防するまたは改善するのに有効な化合物を特定するためのスクリーニング方法を伴い、この方法は、化合物が異種移植片モデルにおいてNOTCH変種腫瘍細胞の成長を阻害するかどうかを判定する段階を含む。

【０２０３】

関連する態様において、表1の変異NOTCHポリペプチドの1つまたは複数の活性を阻害する試験化合物の能力を測定することができる。当業者は、特定のNOTCH変異体バイオマーカーの活性を測定するために用いられる技法が、変異体の機能および特性に依って異なることを認識するであろう。

【０２０４】

表1の変異NOTCHポリペプチドのいずれかの活性を調節することが可能な試験化合物は、がんに苦しんでいるまたはがんを発症するリスクがある患者に投与することができる。

【０２０５】

VI. 処置方法

制御不能な成長が本明細書において記述のNOTCH受容体変異と関連している場合のがん細胞を処置するために、γ-セクレターゼ阻害剤および抗NOTCH受容体/リガンド抗体のような、抗NOTCH治療剤を用いることができる。抗NOTCH治療剤は、本明細書において記述されるように所定の標準を上回るNOTCH ICDを含むがん細胞を処置するために用いることもできる。ある種の態様において、抗NOTCH剤は、腫瘍成長の阻害、分化の誘導、および/または腫瘍容積の低減に有用である。さらに、本発明は、NOTCH活性化変異を有するおよび/または活性化NOTCHを有する対象に抗NOTCH剤の治療的有効量を投与する段階を含む、対象における腫瘍の腫瘍形成性を低減する方法を提供する。1つの態様において、腫瘍細胞は活性化NOTCH変異を含む。別の態様において、腫瘍細胞は活性化NOTCHを含む。腫瘍細胞のNOTCHは、さまざまな機構を通じて活性化されうる。例えば、腫瘍細胞のNOTCHは、腫瘍細胞がNOTCH調節因子、例えば、限定されるものではないが、FBW7における変異を含むために活性化されうる。別の非限定的な例において、NOTCH活性化はNUMB発現の喪失によるものでありうる。ある種の態様において、腫瘍はがん幹細胞を含む。ある種の態様において、腫瘍内のがん幹細胞の頻度は、抗NOTCH剤の投与によって低減される。

【０２０６】

1つの態様において、腫瘍細胞の少なくとも約1%、少なくとも約2%、少なくとも約3%、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約25%または少なくとも約50%がNOTCH受容体における活性化変異を含む腫瘍を処置するために、抗NOTCH治療剤を用いることができる。別の態様において、腫瘍細胞の少なくとも約0.1%、少なくとも約1%、少なくとも約2%または少なくとも約5%が本発明の活性化変異を含む腫瘍を処置するために、抗NOTCH剤を用いることができる。

【０２０７】

別の態様において、腫瘍細胞核の少なくとも約1%、少なくとも約2%、少なくとも約3%、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約25%または少なくとも約50%が弱い、中くらいまたは強いNOTCH ICD特異的IHC染色を含む腫瘍を処置するために、抗NOTCH治療剤を用いることができる。さらなる態様において、本明細書において記述されるように免疫組織化学染色手順を用いて少なくとも約10、少なくとも約20、少なくとも約30、少なくとも約40、少なくとも約50または少なくとも約100の抗NOTCH ICD H-スコアにより特徴付けられる腫瘍を処置するために、抗NOTCH剤を用いることができる。別の態様において、本明細書において記述されるように免疫組織化学染色手順を用いて約10超の、約20超の、約30超の、約40超の、約50超のまたは約100超の抗NOTCH ICD H-スコアにより特徴付けられる腫瘍を処置するために、抗NOTCH剤を用いることができる。

【０２０８】

ある種の態様において、抗NOTCH治療剤で処置されるがんは、肺がん、胃腸がん、腎がん、卵巣がん、肝臓がん、結腸直腸がん、子宮内膜がん、腎臓がん、前立腺がん、甲状腺がん、神経芽細胞腫、膵臓がん、多形性膠芽腫、子宮頚がん、胃がん、膀胱がん、乳がん

、結腸がん、黒色腫、胆道がんおよび頭頸部がんからなる群より選択される固形腫瘍である。さらなる態様において、がんは乳がんである。1つの態様において、三重陰性(エストロゲン受容体(ER-)、プロゲステロン受容体(PR-)およびHER2 (HER2-))乳がん細胞(TNBC)を処置するために、抗NOTCH治療剤を用いることができる。さらなる態様において、がんは小細胞がんである。さらなる態様において、がんは、小細胞肺がん、胃がん、食道がん、肝細胞がん、または胆管がんである。別の態様において、がんは胆道がんである。

【０２０９】

1つの態様において、抗NOTCH治療剤は、なんらかの処置形態を既に受けている患者の処置において特に有用である。別の態様において、抗NOTCH剤は、がん治療でこれまでに失敗した患者を処置するために用いられる。失敗したがん治療は、化学療法、補助療法、術前補助療法およびそれらの組み合わせを含むことができるが、これらに限定されることはない。1つの態様において、抗NOTCH剤は、化学療法耐性腫瘍を処置するために用いられる。別の態様において、抗NOTCH剤は、化学療法耐性乳がんを処置するために用いられる。別の態様において、抗NOTCH剤は、化学療法耐性TNBCを処置するために用いられる。いくつかの態様において、抗NOTCH剤は、以前のがん治療に失敗している患者における乳がん、小細胞肺がん、胃がん、食道がん、肝細胞がんまたは胆管がんを処置するために用いられる。

【０２１０】

1つの態様において、処置方法は、患者から切除されたがん細胞を含有する生体サンプルを最初に試験して、NOTCH受容体の変異型が存在するかどうか、またはそれらが所定の標準を上回るNOTCH ICDのレベルを含むかどうかを判定する段階を伴う。サンプルが変異の存在またはNOTCH ICDの上昇の証拠を示す患者が次に、NOTCH受容体活性を妨害するNOTCH阻害剤を用いて処置されよう。投与される投与量は、処置されている特定の状態、投与の経路、および当技術分野において周知である臨床的考察に依るであろう。投与量は、有益な効果、例えば、腫瘍成長の緩徐化が検出されるまで、徐々に増やすことができる。NOTCH阻害剤はひいては、単回または複数回の投与計画で提供されてもよく、単独でまたは他の治療剤との組み合わせで与えられてもよい。

【０２１１】

変異体NOTCH受容体に関連したがんの処置は、任意の投与経路および投薬形態に適合する。処置されている特定の状態に依って、ある種の投薬形態は他のものよりも簡便または有効である傾向がある。例えば、皮膚がんの処置には局所投与が好ましいかもしれないが、固形腫瘍の場合には非経口投与が好ましいかもしれない。非経口調製物および局所調製物は別として、薬剤は口腔内に、経口的に、内服的に、鼻腔内に、直腸に、経膣的に、舌側におよび経皮的に投与されうる。具体的な投与形態には、錠剤、丸剤、カプセル、粉末、エアロゾル、坐剤、皮膚パッチ、非経口剤(parenterals)、ならびに懸濁液、溶液および乳濁液を含む経口液体が含まれる。徐放性投薬形態が用いられてもよい。全ての投薬形態は、当技術分野において標準的である方法を用いて調製することができる(例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th ed., Easton, Pa. (1980)を参照のこと)。

【０２１２】

ある種の態様において、抗NOTCH治療剤(例えば、抗NOTCH抗体)の投与は、静脈内注射によるまたは静脈内によるものでありうる。いくつかの態様において、投与は静脈内注入によるものである。いくつかの態様において、抗NOTCH剤の投与は非静脈内経路によるものでありうる。

【０２１３】

抗NOTCH抗体または他の抗NOTCH治療剤の適切な投与量は、処置されている疾患のタイプ、疾患の重篤度および経過、疾患の応答性、抗体または薬剤が治療目的または予防目的で投与されているかどうか、以前の療法、患者の病歴などに依り、全て、処置を行っている医師の自由裁量で決まる。抗体または他の薬剤は、一回で投与されてもよく、または数日～数ヶ月続く一連の処置にわたって投与されてもよく、あるいは治癒が達成され、または疾患状態の減退が達成される(例えば、腫瘍のサイズが縮小する)まで投与されてもよい。

最適な投薬計画は、患者の体内の薬物蓄積の測定から計算することができ、個々のアンタゴニストの相対効力に依って変化するであろう。投与を行っている医師は、最適な投与量、投薬方法および反復率を容易に決定することができる。一般に、投与量は、体重1 kgあたり0.01μg～100 mgであり、1日に、1週間に、1ヶ月にまたは1年に1回または複数回与えることができる。処置を行っている医師は、測定された滞留時間および体液または組織中の抗体または薬剤の濃度に基づいて、投薬のための反復率を評価することができる。

【０２１４】

当業者によって知られるように、用いられる用量は、達成されるべき臨床目標に依って変化するであろう。いくつかの態様において、抗NOTCH抗体の各用量は、約0.25 mg/kg～約15 mg/kgである。いくつかの態様において、各用量は、約0.25、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20 mg/kgである。ある種の態様において、各用量は、約0.5 mg/kgである。ある種の態様において、各用量は、約1 mg/kgである。ある種の態様において、各用量は、約2.5 mg/kgである。ある種の態様において、各用量は、約5 mg/kgである。ある種の態様において、各用量は、約7.5 mg/kgである。ある種の態様において、各用量は、約10 mg/kgである。ある種の態様において、各用量は、約12.5 mg/kgである。ある種の態様において、各用量は、約15 mg/kgである。

【０２１５】

ある種の態様において、場合によっては抗NOTCH抗体または薬剤の投与に関連した副作用および/または毒性を低減しうる間欠投薬レジメンを使い、本明細書において記述される方法において用いられる抗NOTCH抗体または他の抗NOTCH治療剤が患者に投与される。本明細書において用いられる場合、「間欠投薬」は、週1回超の投薬間隔を用いた投薬レジメン、例えば、2週間に1回、3週間に1回、4週間に1回などの投薬をいう。いくつかの態様において、ヒト患者においてがんを処置するための方法は、間欠投薬レジメンにしたがって抗NOTCH抗体または薬剤の有効な用量を患者に投与する段階を含む。いくつかの態様において、ヒト患者においてがんを処置するための方法は、間欠投薬レジメンにしたがって抗NOTCH抗体または薬剤の有効な用量を患者に投与する段階、および抗NOTCH抗体または薬剤の治療指数を増加させる段階を含む。いくつかの態様において、間欠投薬レジメンは、患者に抗NOTCH治療剤の初回用量を投与する段階、および約2週間に1回、抗NOTCH治療剤の後続用量を投与する段階を含む。いくつかの態様において、間欠投薬レジメンは、患者に抗NOTCH治療剤の初回用量を投与する段階、および約3週間に1回、抗NOTCH治療剤の後続用量を投与する段階を含む。いくつかの態様において、間欠投薬レジメンは、患者に抗NOTCH治療剤の初回用量を投与する段階、および約4週間に1回、抗NOTCH治療剤の後続用量を投与する段階を含む。

【０２１６】

ある種の態様において、本方法において用いられる抗NOTCH抗体はOMP-52M51、またはOMP-52M51の6つのCDRおよび/もしくは可変領域を含む抗体であり、この抗体はおよそ3週ごとに約0.25 mg/kg～約10 mg/kgの投与量で対象の静脈内に投与される。

【０２１７】

いくつかの代替的な態様において、本方法において用いられる抗NOTCH抗体はOMP-59R5、またはOMP-59R5の6つのCDRおよび/もしくは可変領域を含む抗体であり、この抗体はおよそ2～3週ごとに約2.5 mg/kg～約7.5 mg/kg（例えば、約2.5 mg/kg、約5 mg/kgまたは約7.5 mg/kg)の投与量で対象の静脈内に投与される。

【０２１８】

ある種の態様において、抗NOTCH抗体のような抗NOTCH治療剤を投与する段階に加えて、前記の方法または処置は、少なくとも1種のさらなる治療剤または治療を投与する段階をさらに含む。さらなる治療剤または治療は抗NOTCH治療剤の投与の前に、抗NOTCH治療剤の投与と同時に、および/または抗NOTCH治療剤の投与の後に投与することができる。いくつかの態様において、少なくとも1種のさらなる治療剤または治療は、1種、2種、3種またはそれ以上のさらなる治療剤または治療を含む。

【０２１９】

少なくとも2種の治療剤による併用療法では、異なる作用機序によって働く薬剤を用いることが多いが、これは必要とされない。異なる作用機序を有する薬剤を用いた併用療法は、相加効果または相乗効果をもたらしうる。併用療法は単剤療法において用いられるよりも各薬剤の用量を低くすることを可能にし、それによって毒性副作用を低減しうる。併用療法は、耐性がん細胞が発現する可能性を減らしうる。

【０２２０】

抗NOTCH治療剤およびさらなる治療剤または治療の組み合わせを、任意の順番で、または同時に投与できることが理解されよう。いくつかの態様において、抗NOTCH治療剤は、第2の治療剤または治療による処置を以前に受けたことがある患者に投与される。ある種の他の態様において、抗NOTCH治療剤および第2の治療剤または治療は、実質的に同時にまたは時を同じくして投与される。例えば、対象は、第2の治療剤(例えば、化学療法)による一連の処置を受けると同時に、抗NOTCH治療剤を投与されることができる。ある種の態様において、抗NOTCH治療剤は、第2の治療剤による処置の1年以内に投与される。ある種の代替的な態様において、抗NOTCH治療剤は、第2の治療剤による任意の処置の10ヶ月以内、8ヶ月以内、6ヶ月以内、4ヶ月以内または2ヶ月以内に投与される。ある種の他の態様において、抗NOTCH治療剤は、第2の治療剤による任意の処置の4週間以内、3週間以内、2週間以内または1週間以内に投与される。いくつかの態様において、抗NOTCH治療剤は、第2の治療剤による任意の処置の5日以内、4日以内、3日以内、2日以内または1日以内に投与される。さらに、数時間または数分のうちに(すなわち、実質的に同時に)、2種(またはそれ以上)の薬剤または処置を対象に投与できることが理解されよう。

【０２２１】

ある種の態様において、場合によっては抗NOTCH治療剤の投与に関連した副作用および/または毒性を低減しうる間欠投薬レジメンを使い、抗NOTCH治療剤が患者に投与される。本明細書において用いられる場合、「間欠投薬」は、週1回超の投薬間隔を用いた投薬レジメン、例えば、2週間に1回、3週間に1回、4週間に1回などの投薬をいう。いくつかの態様において、ヒト患者においてがんを処置するための方法は、間欠投薬レジメンにしたがって抗NOTCH治療剤の有効な用量を患者に投与する段階を含む。いくつかの態様において、ヒト患者においてがんを処置するための方法は、間欠投薬レジメンにしたがって抗NOTCH治療剤の有効な用量を患者に投与する段階、および抗NOTCH治療剤の治療指数を増加させる段階を含む。いくつかの態様において、間欠投薬レジメンは、患者に抗NOTCH治療剤の初回用量を投与する段階、および約2週間に1回、抗NOTCH治療剤の後続用量を投与する段階を含む。いくつかの態様において、間欠投薬レジメンは、患者に抗NOTCH治療剤の初回用量を投与する段階、および約3週間に1回、抗NOTCH治療剤の後続用量を投与する段階を含む。いくつかの態様において、間欠投薬レジメンは、患者に抗NOTCH治療剤の初回用量を投与する段階、および約4週間に1回、抗NOTCH治療剤の後続用量を投与する段階を含む。

【０２２２】

当業者によって知られるように、用いられる用量は、達成されるべき臨床目標に依って変化するであろう。いくつかの態様において、抗NOTCH抗体の各用量は、約0.25 mg/kg～約15 mg/kgである。いくつかの態様において、各用量は、約0.25、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20 mg/kgである。ある種の態様において、各用量は、約0.5 mg/kgである。ある種の態様において、各用量は、約1 mg/kgである。ある種の態様において、各用量は、約2.5 mg/kgである。ある種の態様において、各用量は、約5 mg/kgである。ある種の態様において、各用量は、約7.5 mg/kgである。ある種の態様において、各用量は、約10 mg/kgである。ある種の態様において、各用量は、約12.5 mg/kgである。ある種の態様において、各用量は、約15 mg/kgである。

【０２２３】

がんの処置のために用いられる治療剤には、抗生物質、例えばダウノルビシン、ドキソルビシン、ミトキサントロンおよびイダルビシン；トポイソメラーゼ阻害剤、例えばエトポシド、テニポシドおよびトポテカン；DNA合成阻害剤、例えばカルボプラチン；DNA損傷

剤、例えばシクロホスファミド、ベンダムスチン、クロラムブシル、プロカルバジン、ダカルバジンおよびイホスファミド；細胞毒性酵素、例えばアスパラギナーゼおよびペグアスパラガーゼ；チロシンキナーゼ阻害剤、例えばメシル酸イマチニブ、ダサチニブ、ポナチニブおよびニロチニブ；代謝拮抗物質、例えばアザシチジン、クロファラビン、シタラビン、クラドリビン、フルダラビン、ヒドロキシウレア、メルカプトプリン、メトトレキセート、チオグアニン、プララトレキセートおよびネララビン；合成ホルモン、例えばプレドニゾン、プレドニゾロンおよびデキサメタゾン；抗有糸分裂剤、例えばビンクリスチンおよびビンブラスチン；モノクローナル抗体、例えばリツキシマブ(例えば、リツキサン(RITUXAN))、アレムツズマブおよびオファツムマブ；放射免疫治療剤、例えばヨウ素I 131トシツモマブ(例えば、ベキサール(BEXXAR))またはイブリツモマブチウキセタン(例えば、ゼバリン(ZEVALIN))；mTor阻害剤、例えばテムシロリムス；ヒストンデアセチラーゼ阻害剤、例えばボリノスタットおよびロミデプシン；造血幹細胞動員剤、例えばプレリキサフォル；細胞毒性組み換えタンパク質、例えばデニロイキンジフチトクス；タンパク質合成阻害剤、例えばオマセタキシン；免疫調節薬、例えばサリドマイドおよびレナリドミド；サイクリン依存性キナーゼ阻害剤、例えばフラボピリドール；ならびにプロテアソーム阻害剤、例えばボルテゾミブ(例えば、ベルケード(VELCADE))のほかに、それらの組み合わせが含まれるが、これらに限定されることはない。

【０２２４】

抗NOTCH治療剤と組み合わせて投与されうる治療剤には、上記名の治療剤および他の化学療法剤が含まれる。したがって、いくつかの態様において、前記の方法または処置は、抗NOTCH治療剤および化学療法剤または複数の異なる化学療法剤のカクテルの併用投与を伴う。抗NOTCH治療剤による処置は、化学療法の施行の前に、化学療法の施行と同時に、または化学療法の施行の後に行ってもよい。併用投与は、1種類の薬学的処方物に入れた、もしくは別個の処方物を用いた同時投与を含んでもよく、またはどちらの順番でもよいが、活性剤の全てがその生物学的活性を同時に発揮できるように、一般的にある期間内で行われる、連続投与を含んでもよい。そのような化学療法剤の調製および投薬計画は、製造業者の指示にしたがってまたは当業者により実験的に決定されるように用いられうる。そのような化学療法剤の調製および投薬計画はまた、Chemotherapy Service Editor M. C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992)に記述されている。

【０２２５】

本発明において有用な化学療法剤には、アルキル化剤、例えば、チオテパおよびシクロホスファミド；アルキルスルホネート、例えば、ブスルファン、インプロスルファン、およびピポスルファン；アジリジン、例えば、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)；アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチレンチオホスホラミド、およびトリメチローロメラミン(trimethylolomelamime)を含む、エチレンイミンおよびメチルアメラミン(methylamelamine)；ナイトロジェンマスタード、例えば、クロランブシル、クロルナファジン、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、メクロレタミン、塩酸メクロレタミンオキシド、メルファラン、ノベムビシン(novembichin)、フェネステリン(phenesterine)、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスタード；ニトロソ尿素、例えば、カルムスチン、クロロゾトシン、ホテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、ラニムスチン；抗生物質、例えば、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、アウスラマイシン(authramycin)、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カリチアマイシン、カラビシン(carabicin)、カミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ドキソルビシン、エピルビシン、エソルビシン、イダルビシン、マルセロマイシン(marcellomycin)、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)、ロドルビシン(rodorubicin)、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ユベニメックス、ジノスタチン、ゾルビシン；

代謝拮抗物質、例えば、メトトレキセートおよび5-フルオロウラシル(5-FU); 葉酸類似体、例えば、デノプテリン、メトトレキセート、プテロプテリン、トリメトレキセート; プリン類似体、例えば、フルダラビン、6-メルカプトプリン、チアミプリン(thiamiprine)、チオグアニン; ピリミジン類似体、例えば、アンシタビン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフール、シトシンアラビノシド、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; アンドロゲン、例えば、カルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトン; 抗副腎剤、例えば、アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタン; 葉酸補充剤、例えば、フォリン酸; 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; ビサントレン; エダトレキサート(edatraxate); デフォファミン(defofamine); デメコルチン; 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; ピラルビシン; ポドフィリニック酸; 2-エチルヒドラジド; プロカルバジン; PSK; ラゾキサン; シゾフラン(sizofuran); スピロゲルマニウム; テヌアゾン酸; トリアジクオン; 2,2',2''-トリクロロトリエチルアミン; ウレタン; ビンデシン; ダカルバジン; マンノムスチン; ミトブロニトール; ミトラクトール; ピポプロマン; ガシトシン(gacytosine); アラビノシド(Ara-C); タキソイド、例えば、パクリタキセルおよびドセタキセル; クロランブシル; ゲムシタビン; 6-チオグアニン; メルカプトプリン; メトトレキセート; 白金類似体、例えば、シスプラチンおよびカルボプラチン; ビンブラスチン; 白金; エトポシド; イホスファミド; マイトマイシンC; ミトキサントロン; ビンクリスチン; ビノレルビン; ナベルビン; ノバントロン; テニポシド; ダウノマイシン; アミノプテリン; ゼローダ; イバンドロン酸; 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; レチノイン酸; エスペラミシン; カペシタビン; および前記のいずれかの薬学的に許容される塩、酸または誘導体が含まれるが、これらに限定されることはない。化学療法剤にはまた、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働く抗ホルモン剤、例えば、タモキシフェン、ラロキシフェン、アロマターゼ阻害4(5)-イミダゾール、4-ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン(trioxifene)、ケオキシフェン、LY117018、オナプリストン、およびトレミフェン(Fareston)を含む抗エストロゲン、ならびにフルタミド、ニルタミド、ビカルタミド、ロイプロリド、およびゴセレリンなどの抗アンドロゲン、ならびに前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まれる。

【０２２６】

ある種の態様において、化学療法剤は、トポイソメラーゼ阻害剤である。トポイソメラーゼ阻害剤は、トポイソメラーゼ酵素(例えば、トポイソメラーゼIまたはII)の作用を妨害する化学療法剤である。トポイソメラーゼ阻害剤には、ドキソルビシンHCl、クエン酸ダウノルビシン、ミトキサントロンHCl、アクチノマイシンD、エトポシド、トポテカンHCl、テニポシドおよびイリノテカン、ならびにこれらのいずれかの薬学的に許容される塩、酸または誘導体が含まれるが、これらに限定されることはない。

【０２２７】

ある種の態様において、化学療法剤は、代謝拮抗物質である。代謝拮抗物質は、正常な生化学反応に必要な代謝産物に似ているが、細胞の1つまたは複数の正常機能、例えば、細胞分裂を妨害するのに十分に異なる構造を有する化学物質である。代謝拮抗物質には、ゲムシタビン、フルオロウラシル、カペシタビン、メトトレキセートナトリウム、ラリトレキセド、ペメトレキセド、テガフール、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、酸または誘導体が含まれるが、これらに限定されることはない。

【０２２８】

ある種の態様において、化学療法剤は、チューブリンに結合する薬剤を含むが、これに

限定されない、有糸分裂阻害剤である。いくつかの態様において、薬剤はタキサンである。ある種の態様において、薬剤は、パクリタキセルもしくはドセタキセル、またはパクリタキセルもしくはドセタキセルの薬学的に許容される塩、酸もしくは誘導体である。ある種の代替的な態様において、有糸分裂阻害剤は、ビンカアルカロイド、例えば、ビンクリスチン、ビンブラスチン、ビノレルビン、もしくはビンデシン、またはその薬学的に許容される塩、酸もしくは誘導体を含む。

【０２２９】

ある種の態様において、処置は、本明細書において記述される抗NOTCH治療剤および放射線療法の併用投与を伴う。抗NOTCH治療剤による処置は、放射線療法の投与の前に、放射線療法の投与と同時に、または放射線療法の投与の後に行ってもよい。当業者は、このような放射線療法の投薬計画を決定することができる。いくつかの態様において、抗NOTCH抗体または他の抗NOTCH治療剤は、放射線処置の後に投与される。いくつかの態様において、抗NOTCH抗体または他の抗NOTCH治療剤は、放射線療法とともに投与される。

【０２３０】

いくつかの態様において、第2の治療剤は抗体を含む。したがって、処置は、本発明の抗NOTCH治療剤と、EGFR、ErbB2、DLL4またはNF-κBに結合する抗体を含むが、これらに限定されない、さらなる腫瘍関連抗原に対する他の抗体との併用投与を伴ってもよい。例示的な抗DLL4抗体は、例えば、米国特許第7,750,124号に記述されている。さらなる抗DLL4抗体は、例えば、国際特許公開番号WO 2008/091222およびWO 2008/0793326、ならびに米国特許出願公開第2008/0014196号; 同第2008/0175847号; 同第2008/0181899号; および同第2008/0107648号に記述されている。併用投与は、1種類の薬学的処方物に入れた、もしくは別個の処方物を用いた同時投与を含んでもよく、またはどちらの順番でもよいが、活性剤の全てがその生物学的活性を同時に発揮できるように、一般的にある期間内で行われる、連続投与を含んでもよい。

【０２３１】

さらに、本明細書において記述される抗NOTCH治療剤による処置は、1つまたは複数のサイトカイン(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)による併用処置を含んでもよく、あるいは腫瘍、がん細胞の外科的除去によって、または処置を行っている医師により必要とみなされた他の任意の療法によって達成されてもよい。

【０２３２】

VII. キット

本発明の方法を実践するためのキットがさらに提供される。「キット」とは、本発明の変異NOTCH受容体を特異的に検出するための、またはNOTCH ICDを特異的に検出するための少なくとも1つの試薬、例えば、抗体、核酸プローブなどを含む任意の製造物(例えば、包装または容器)を意図する。キットは、本発明の方法を行うためのユニットとして販売促進、配布、または販売することができる。さらに、キットは、キットについて記述したおよびその使用のための教材を含んだ添付文書を含んでもよい。

【０２３３】

1つの態様において、本発明の方法を実践するためのキットが提供される。そのようなキットは、手動スクリーニングおよび自動スクリーニングの両方に適合する。免疫アッセイ分析のため、キットは、変異NOTCH受容体に対して作製された少なくとも1つの抗体またはNOTCH ICDに対して作製された少なくとも1つの抗体および変異NOTCH受容体またはNOTCH ICDに結合している抗体の検出のための化学物質を含む。抗原・抗体結合を検出する任意の化学物質が本発明の実践において用いられうる。いくつかの態様において、検出化学物質は、二次抗体に結合されている標識された重合体を含む。例えば、抗原・抗体結合部位で色素原の沈着を触媒する酵素に結合されている二次抗体が、提供されうる。抗体結合の検出におけるそのような酵素およびその使用のための技法は、当技術分野において周知である。1つの態様において、キットは、HRP標識された重合体に結合されている二次抗体を含む。結合された酵素に適合する色素原(例えば、HRP標識二次抗体の場合にはDAB)、およ

び非特異的染色をブロッキングするための、過酸化水素のような、溶液が、さらに提供されうる。

【０２３４】

本発明のキットは、ペルオキシダーゼブロッキング試薬(例えば、過酸化水素)およびタンパク質ブロッキング試薬(例えば、精製カゼイン)をさらに含みうる。

【０２３５】

さらに、キットは、固体支持体上のマイクロビーズのような、マイクロアレイを用いて、またはオリゴヌクレオチドプライマーおよびDNAポリメラーゼを含めて、核酸増幅によって本発明の方法を実践するための試薬を含みうる。

【０２３６】

陽性および/または陰性対照をキットに含めて、本発明により利用される試薬の活性および正しい用法を確証することができる。対照は、関心対象のNOTCH変異もしくはNOTCH ICDの存在について陽性もしくは陰性のいずれかであることが知れている、組織切片、スライドグラス上に固定された細胞などのような、サンプル、または変異NOTCH受容体もしくはNOTCH ICDを含む他のサンプルを含むことができる。対照のデザインおよび使用は、標準的であり、十分に当業者の日常能力の範囲内である。

【０２３７】

本発明の方法における任意のまたは全ての段階は、人員によって実行されてもよくまた、あるいは、自動化された形で行われてもよいことがさらに理解されよう。したがって、生体サンプル調製、サンプル染色、NOTCH変異またはNOTCH ICDの検出の段階を自動化することができる。

【０２３８】

本開示の態様を、以下の実施例を参照してさらに明確にすることができる。本開示の範囲から逸脱することなく、材料と方法の両方に多くの変更を加えることができることは当業者には明らかであろう。

【実施例】

【０２３９】

実施例1: OMP-B40およびOMP-B37 NOTCH変異の特定

ヒト原発腫瘍に由来する継代数が低い異種移植片腫瘍を、既述(Dylla et al, PLoS ONE. 2008, 36:e2428)のように収集し、細分化し、HBSS培地中のコラゲナーゼおよびトリプシンを用いて消化した。マウス細胞を枯渇させるため、新たに調製した単個細胞を氷上で、ビオチン化抗マウスH-2K^{d} (クローンSF1-1.1, Biolegend)および抗マウスCD45 (30-F11, Biolegend)とともにインキュベートした。FACS緩衝液(1×ハンクス緩衝生理食塩水溶液(HBSS)、2%熱不活性化ウシ胎仔血清および25 mM HEPES pH 7.4)で2回洗浄することによって、未結合の抗体を除去した。ストレプトアビジン磁性ビーズ(88817; Pierce)を次いで、単個細胞懸濁液に加え、4℃でインキュベートした。未結合のヒト腫瘍細胞を回収し、Bioneer AccuPrep Genomic DNA Extraction Kit (Bioneer CA)を用いて精製腫瘍細胞から全ゲノムDNAを抽出した。製造元のプロトコル(Qiagen CA)に基づいてQiagen Repli-G全ゲノム増幅キットを用い、DNAを増幅および精製した。

【０２４０】

3730x1 DNA配列決定装置(Applied Biosystems)を用いてNOTCH1の第26エクソン(432 nt)、第32エクソン(148 nt)および第34エクソン(1488 nt)ならびにNOTCH3の第33エクソン(1053 nt)の配列決定を行った。配列決定の結果をNOTCH1 (NM_017617.3)、NOTCH2 (NM_024408.2)およびNOTCH3 (NM_000435.2)のRefSeqヌクレオチド配列に対して整列させた。Mutation Surveyor (SoftGenetics PA)およびSequencher (GeneCods MI)ソフトウェアを用いて変異を特定した。

【０２４１】

ヒトNOTCH1遺伝子では、OMP-B40-p2乳房腫瘍においてヌクレオチド部位7279 (RefSeq NM_017617.3)の位置のグアニン(G)のヘテロ接合性の欠失としてOMP-B40変異が特定された(図1A)。OMP-B40-p2乳房腫瘍は、化学療法による処置後にがんが進行した患者由来の、最

小限に継代された乳房腫瘍サンプルである。この乳房腫瘍は三重陰性であり、小細胞型の乳房腫瘍である。分析されたサンプルにおいて、機能的意義を持たないと考えられるヌクレオチド部位4735の位置でのTGGの多型ヘテロ接合性挿入も特定された。G欠失は、NOTCH1のPEST (G2427fs)ドメインにおける読み枠のシフトを引き起こす。PESTドメインのフレームシフト変異は、NOTCH1の細胞内ドメイン(ICD)を安定化し、NOTCH経路の活性化を引き起こしうる。ヒトNOTCH3遺伝子では、PESTドメインのアミノ酸位置番号2208での読み枠のシフト(P2208fs)を引き起こす、OMP-B37-p2乳房腫瘍におけるヌクレオチド部位6622 (NM_000435.2)の位置でのシトシン(C)のホモ接合性の挿入としてOMP-B37変異が特定された(図1B)。OMP-B37-p2乳房腫瘍は、最小限に継代された、三重陰性の乳房腫瘍サンプルである。PESTドメインのフレームシフト変異は、NOTCH3の細胞内ドメイン(ICD)を安定化し、それゆえに、この腫瘍において機能獲得型のNOTCH経路活性化を引き起こしうる。

【０２４２】

タンパク質の発現および局在性を分析するため、293T細胞に対照ベクター、NOTCH1.ICD発現プラスミド、NOTCH2.ICD発現プラスミド、NOTCH3.ICD発現プラスミド、NOTCH1.全長(FL)発現プラスミド、またはNOTCH3.FL発現プラスミドを一過性に形質移入した。NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Kit (Thermo Scientific)を用いて形質移入細胞および異種移植片腫瘍の核画分および細胞質画分を調製し、4～12%のトリス-グリシンゲル上で分離し、PVDF膜に転写した。1レーンあたり総タンパク質100μgを負荷した。切断型のNOTCH1細胞内ドメイン(ICD)およびNOTCH3 ICDに対する抗体を、それぞれ、NOTCH1ペプチド

(VLLSRKRRRQHGQLW; SEQ ID NO:36)

およびNOTCH3ペプチド

(VMVARRKREHSTLW; SEQ ID NO:37)

でウサギを免疫することによって作出した。ウエスタンブロットをウサギ抗NOTCH1.ICD抗体(60 ng/ml)、抗NOTCH3.ICD抗体(400 ng/ml)、抗全長NOTCH1抗体(Cell Signaling Technology、1000分の1)、抗全長NOTCH3抗体(Cell Signaling Technology、1000分の1)および抗β-アクチン抗体(Sigma-Aldrich, 5000分の1)により、その後、HRP結合抗ウサギ二次抗体またはHRP結合抗マウス二次抗体(Cell Signaling Technology, 3000分の1)によりプローブした。図2に示されるように、抗NOTCH1.ICD抗体は、切断されたNOTCH1細胞内ドメイン(NOTCH1.ICD)に対して特異的に反応し、OMP-B40異種移植片腫瘍の核画分中の、トランケートされ、切断されたNOTCH1細胞内ドメインを検出する(図2A)。図2Bは、抗NOTCH3.ICD抗体が、切断されたNOTCH3.ICDに対して特異的に反応し、OMP-B37異種移植片腫瘍の核画分中の、トランケートされ、切断されたNOTCH3.ICDを検出することを示す。図2Cは、トランケートされたNOTCH1 ICDおよびトランケートされたNOTCH3 ICDが、OMP-B40およびOMP-B37異種移植片腫瘍の核画分中に主に見出されることを示す。これらの2種の腫瘍株は、それぞれ、NOTCH1およびNOTCH3のPESTドメインの変異を保有する。核NOTCH1 ICDおよびNOTCH3 ICDは、野生型NOTCH1を保有するOMP-C31およびOMP-OV38異種移植片腫瘍において検出されないが、しかしOMP-C31はNOTCH3遺伝子の中に、活性化変異であるとは考えられない6172insC(het) [P2033fs]変異を含む(データは示されていない)。

【０２４３】

実施例2: OMP-B40腫瘍におけるNOTCH1アンタゴニストの活性

B40 p3腫瘍細胞を6～7週齢雌性NOD/SCIDマウスの左脇腹に皮下注射した(細胞300,000個/マウス)。マウスを毎週モニターし、腫瘍がおよそ140 mm^3となる(注射から78日後)まで腫瘍を成長させた。マウスを無作為に5つの処置群に分け、対照抗体、または異なる用量(0.3 mg/kg、1 mg/kg、3 mg/kg、10 mg/kg)のOMP-52M51ヒト化抗NOTCH1抗体で処置した。抗体を週2回腹腔内に投薬した。腫瘍成長を週1回カリパス測定によってモニターした。OMP-52M51処置は、試験した全ての用量で対照と対比して腫瘍容積の低減を引き起こした(図3A)。

【０２４４】

バラバラにしたOMP-B40 p3腫瘍細胞を注射培地(100 ng/mL VEGFおよび100 ng/mL bFGF

を含有するPBSならびに0.5×マトリゲル)に再懸濁し、6～7週齢雌性NOD/SCIDマウスの左脇腹に皮下注射した(細胞300,000個/マウス)。マウスを毎週モニターし、腫瘍がおよそ140 mm^3となる(注射から78日後)まで腫瘍を成長させた。マウスを無作為に4つの処置群(マウスn=10/群)に分け、対照抗体、抗NOTCH1抗体OMP-52M51、タキソールまたはOMP-52M51とタキソールとの組み合わせで処置した。抗体は15 mg/kgで週2回腹腔内に投薬し、タキソールは20 mg/kgで週1回腹腔内に投薬した。腫瘍成長を週1回カリパス測定によってモニターした。タキソールおよびOMP-52M51処置群は対照と対比して腫瘍容積の57.3% (p<0.03)および21.8% (p<0.0001)の低減を引き起こしたが、タキソール+52M51処置マウス併用群は対照と対比して18.4% (p<0.0001)およびタキソール単独と対比して32.1% (P<0.03)の腫瘍容積の低減を示した(図3B)。OMP-52M51処置群も、以下の実施例7に記述されているように、IHCアッセイ法によって検出されるNOTCH1.ICDの低減を示した(図3CおよびD)。B40腫瘍モデルにおいてOMP-52M51が実証した抗腫瘍活性のレベルは、驚くほど高い活性レベルであった。

【０２４５】

OMP-B40腫瘍においてがん幹細胞頻度に及ぼすNOTCH1処理の効果も分析した。OMP-B40乳房腫瘍を対照mAbまたはOMP-52M51 (15 mg/kg 週2回)のいずれかで処理し、単離し、単個細胞へバラバラにし、抗マウス抗体を用いた陰性選択によって異種移植片中のヒト腫瘍細胞を精製した。対照およびOMP-52M51処理腫瘍由来の腫瘍細胞1000個を各10匹のマウスへ注射した。腫瘍をさらなる処理なしに92日間成長させた。対照群(黒四角)およびOMP-52M51群(灰色丸)について図4に92日目の腫瘍容積を示す。OMP-B40腫瘍は、対照抗体で処理した細胞を注射したマウス10匹の各々において成長したが、OMP-52M51で予め処理した細胞を注射したマウス10匹のうち2匹しか92日目の時点で検出可能な腫瘍成長を引き起こさず、OMP-52M51による処理が細胞の、その後の腫瘍形成性を低減させることを示唆していた。

【０２４６】

実施例3: OMP-B37腫瘍におけるNOTCH3アンタゴニストの活性

バラバラにした系統枯渇OMP-B37 p4腫瘍細胞を注射培地(PBSおよび0.5×マトリゲル)に再懸濁し、6～7週齢雌性NOD/SCIDマウスの右脇腹に皮下注射した(細胞27,000個/マウス)。マウスを毎週モニターし、腫瘍がおよそ80 mm^3となる(注射から49日後)まで腫瘍を成長させた。マウスを無作為に2つの処置群(マウスn=11/群)に分け、それらに15 mg/kgの対照抗体、または20 mg/kgの抗NOTCH2/3抗体59R5を週1回投薬した(図5)。腫瘍成長を週1回カリパス測定によってモニターした。処置5週後に59R5処置群において56.6% (p<0.003)の腫瘍容積の低減が認められた。

【０２４７】

OMP-B37乳房腫瘍におけるタキソールとの組み合わせでの抗NOTCH2/3の活性。抗NOTCH2/3抗体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OMP-B37異種移植片腫瘍に投与した。最初に、B37 p2腫瘍細胞を6～7週齢雌性NOD/SCIDマウスの右脇腹に皮下注射した。マウスを毎週モニターし、腫瘍がおよそ80 mm^3となるまで腫瘍を成長させた。マウスに次いで、対照抗体、59R5抗NOTCH2/3抗体、タキソールまたは59R5抗NOTCH2/3抗体およびタキソールの組み合わせを投与した(図6)。腫瘍成長を週1回カリパス測定によってモニターした。59R5は、単独またはタキソールとの組み合わせのいずれかで、異種移植動物における腫瘍容積を大いに減少させた(図6A)。59R5処置はまた、E-カドヘリンの発現を増加させ、上皮間葉移行(EMT)の反転を示す(図6B)。

【０２４８】

実施例4: OMP-C31変異の特定

ヒト原発結腸直腸腫瘍に由来する継代数が低い(p-2) OMP-C31異種移植片腫瘍を、既述(Dylla et al, PLoS ONE. 2008, 36:e2428)のように収集し、細分化し、HBSS培地中のコラゲナーゼおよびトリプシンを用いて消化した。マウス細胞を枯渇させるため、新たに調製した単個細胞を氷上で、ビオチン化抗マウスH-$2K^d$ (クローンSF1-1.1, Biolegend, CA)および抗マウスCD45 (30-F11, Biolegend, CA)とともにインキュベートした。FACS緩衝液(1

×ハンクス緩衝生理食塩水溶液(HBSS)、2%熱不活性化ウシ胎仔血清および25 mM HEPES pH 7.4)で2回洗浄することによって、未結合の抗体を除去した。Dynabeads(登録商標)ストレプトアビジン磁性ビーズ(Invitrogen, CA)を次いで、単個細胞懸濁液に加え、4℃でインキュベートした。未結合のヒト腫瘍細胞を回収し、Bioneer AccuPrep Genomic DNA Extraction Kit (Bioneer CA)を用いて精製腫瘍細胞から全ゲノムDNAを抽出した。製造元のプロトコル(Qiagen, CA)に基づいてQiagen Repli-G全ゲノム増幅キットを用い、DNAを増幅および精製した。

【０２４９】

ヒトNOTCH3の第25エクソン、第26エクソンおよび第33エクソン(1053 nt)の配列決定をABI 3730x1 DNA Analyzer (Applied Biosystems, CA)にて行った。フォワードおよびリバースプライマーを用いておよそ500 bpの単位複製配列を配列決定した。

【０２５０】

配列決定の結果をSequencher v4.10 (Gene Codes, MI)によりNOTCH3 RefSeqヌクレオチド配列(NM_000435.2)に対して整列させた。変異/挿入欠失(InDel)を、Mutation Surveyor (SoftGenetics, PA)を用いて特定し、Sequencherソフトウェアにて手動でチェックした。

【０２５１】

OMP-C31-p2結腸直腸腫瘍においてヒトNOTCH3遺伝子のヌクレオチド部位6096 (NM_000435.2)の位置に、ANKドメインにおけるアミノ酸位置番号2033での読み枠のシフト(P2033fs)を引き起こす、システイン(C)のヘテロ接合性の変異/挿入が特定された(図7A)。このフレームシフト変異は、NOTCH3 ICNの安定性の増大をもたらす活性化変異である。

【０２５２】

実施例5: 肺_01246変異の特定

120例のヒト乳房腫瘍由来の全DNAサンプルを入手し、製造元のプロトコル(Qiagen, CA)に基づいてQiagen Repli-G全ゲノム増幅キットを用い、DNAを増幅および精製した。NOTCH1の第26エクソン(432 nt)および第34エクソン(1488 nt)の配列決定をABI 3730x1 DNA Analyzer (Applied Biosystems, CA)にて行った。フォワードおよびリバースプライマーを用いておよそ500 bpの単位複製配列を配列決定した。

【０２５３】

配列決定の結果をSequencher v4.10 (Gene Codes, MI)によりNOTCH1 RefSeqヌクレオチド配列(NM_017617.3)に対して整列させた。変異/挿入欠失(InDel)を、Mutation Surveyor (SoftGenetics, PA)を用いて特定し、Sequencherソフトウェアにて手動でチェックした。

【０２５４】

腫瘍サンプル中のごく一部の腫瘍細胞において存在する可能性がある変異を検出するために、Illumina HiSeq2000を用いてNOTCH1の第26エクソンおよび第34エクソンの標的化配列決定を行った。手短に言えば、その2つのNOTCH1エクソンのゲノム領域を、5'末端に固有のバーコードを付けてデザインされた特異的PCRプライマーによってPCR増幅させた。サンプルをQiagen PCR精製キットの浄化に供した後に、PCR産物をプールし、Illuminaプロトコル(Illumina, CA)にしたがってバーコードを付けたアダプタを用い対末端（paired-end）ライブラリを構築した。Illumina HiSeq2000にて100 bpの対末端配列決定を行った。

【０２５５】

配列データを作出した後に、Fastqcプログラム(Babraham Institute, UK)によってデータの質を評価した。Burrows-Wheeler Alignment (BWA)を用いて、配列の読み取りをUCSCヒトゲノムhg19アッセンブリにマッピングした。二重の読み取りを除いた後に、ヌクレオチド変異をSamtools (Li et al, 2009, Bioinformatics, 25:2078)およびVarscan (Koboldt et al, 2009, Bioinformatics, 25:2283)またはGATK (McKenna et al, 2010, Genome Res, 20: 1297)によって呼び出し、ANNOVAR (Wang et al, 2010, Nucleic Acids Research, 38:e164)によって注釈付けした。

【０２５６】

ヘテロ接合性のミスセンス変異G6733A (p.G2245R, NM_000435.2)が肺腫瘍の1つ(肺_01246)において特定された(図7B)。この変異はNOTCH1 TADドメインにある。T細胞性急性リンパ芽球性白血病において変異が報告されている(Gutierrez et al, 2009, Blood, 114:647)。Illumina HiSeq2000による標的化配列決定によっても、Integrative Genomics Viewer (IGV)からコード逆鎖においてこのミスセンス変異(C→T)が特定された。

【０２５７】

実施例6: 乳房_H12932T変異の特定

80例のヒト乳房腫瘍由来の全DNAサンプルを入手し、製造元のプロトコル(Qiagen, CA)に基づいてQiagen Repli-G全ゲノム増幅キットを用い、DNAを増幅および精製した。NOTCH1の第26エクソン(432 nt)および第34エクソン(1488 nt)の配列決定をABI 3730x1 DNA Analyzer (Applied Biosystems, CA)にて行った。フォワードおよびリバースプライマーを用いておよそ500 bpの単位複製配列を配列決定した。

【０２５８】

配列決定の結果をSequencher v4.10 (Gene Codes, MI)によりNOTCH1 RefSeqヌクレオチド配列(NM_017617.3)に対して整列させた。変異/挿入欠失(InDel)を、Mutation Surveyor (SoftGenetics, PA)を用いて特定し、Sequencherソフトウェアにて手動でチェックした。

【０２５９】

腫瘍サンプル中のごく一部の腫瘍細胞において存在する可能性がある変異を検出するために、Illumina HiSeq2000を用いてNOTCH1の第26エクソンおよび第34エクソンの標的化配列決定を行った。手短に言えば、その2つのNOTCH1エクソンのゲノム領域を、5'末端に固有のバーコードを付けてデザインされた特異的PCRプライマーによってPCR増幅させた。サンプルをQiagen PCR精製キットの浄化に供した後に、PCR産物をプールし、Illuminaの標準プロトコル(Illumina, CA)にしたがってバーコードを付けたアダプタを用い対末端ライブラリを構築した。Illumina HiSeq2000にて100 bpの対末端配列決定を行った。

【０２６０】

配列データを作出した後に、Fastqcプログラム(Babraham Institute, UK)によってデータの質を評価した。Burrows-Wheeler Alignment (BWA)を用いて、配列の読み取りをUCSCヒトゲノムhg19アッセンブリにマッピングした。二重の読み取りを除いた後に、ヌクレオチド変異をSamtools (Li et al, 2009, Bioinformatics, 25:2078)およびVarscan (Koboldt et al, 2009, Bioinformatics, 25:2283)またはGATK (McKenna et al, 2010, Genome Res, 20: 1297)によって呼び出し、ANNOVAR (Wang et al, 2010, Nucleic Acids Research, 38:e164)によって注釈付けした。

【０２６１】

ヘテロ接合性のミスセンス変異G6788A (p.R2263Q, NM_000435.2)が乳房腫瘍の1つにおいて特定された(図7C)。この変異はNOTCH1 TADドメインにある。Illumina HiSeq2000による標的化配列決定によっても、Integrative Genomics Viewer (IGV)からコード逆鎖においてこのミスセンス変異(C→T)が特定された。

【０２６２】

実施例7: 活性化NOTCH1の免疫組織化学

NOTCH1の切断部位に結合し、かつ核内の活性化NOTCH1を特異的に検出する、アフィニティー精製されたNOTCH1.ICD (N1.ICD)ウサギポリクローナル抗体を作った。

【０２６３】

NOTCH1.ICDの免疫組織化学(IHC)染色は、標準的なIHCプロトコルにチラミドシグナル増幅(TSA)の修正を加えて行った。スライドを脱ろうし、再水和し、その後、BioCare Decloaker卓上加圧調理器内で加熱および加圧の下、DAKO TRS溶液(DAKO # S1699)中での抗原回復に供した。内因性ペルオキシダーゼをリン酸緩衝生理食塩水中6%のH2O2でブロッキングし、その後、プロテインブロックを適用した(CASブロック, Invitrogen # 008120)。一次抗体を適切に希釈して4℃で終夜インキュベートした。切片を次いで、DAKOウサギHRP重合体(DAKO # K4011)、その後にFITC標識TSA基質(Perkin Elmer # NEL701001KT)とともにイ

ンキュベートした。FITCを次に、HRP結合抗FITC抗体(Rockland # RL700-103-096)で検出し、DAB基質(DAKO # K3468)を加えて、抗体-検出複合体を可視化した。

【０２６４】

実施例2において記述されるように、30万個のOMP-B40腫瘍細胞を皮下に注射し、150 mm^3の平均容積にまで成長させた。その時点で、つまり試験開始から78日後に、マウスを無作為に分けて、処置を開始した。マウスに、週1回20 mg/kgのパクリタキセル有りまたは無しで、週2回15 mg/kgの対照抗体または15 mg/kgのOMP-52M51ヒト化抗体のいずれかを投与し、全てIP注射によって投与した。平均±SEM、1群あたり動物n=10。52M51は、単独またはパクリタキセルとの組み合わせのいずれかで、異種移植動物における腫瘍容積を大いに減少させた(図3B)。

【０２６５】

OMP-B40腫瘍をパクリタキセル有りまたは無しの対照およびOMP-52M51処置マウスから収集した。NOTCH1-ICDを特異的に認識するウサギポリクローナル抗体を用いIHC分析をOMP-B40由来の腫瘍に行って、活性化型のNOTCH1を検出した。OMP-52M51、およびOMP-52M51に加えてタキソールでは、核内でのNOTCH-ICDの蓄積が遮断される(図3D)。このように、NOTCH1-ICD IHCアッセイ法は、OMP-52M51の主要なバイオマーカーとして役立ち、腫瘍組織での薬力学反応およびNOTCH経路の活性をモニターするために用いることができる。

【０２６６】

実施例8: 免疫組織化学による活性化NOTCH1の核局在性

活性化型のNOTCH1受容体を検出するNOTCH1-ICDアッセイ法を用いて、腫瘍のパネルをスクリーニングした。OMP-B40乳房腫瘍、OMP-LU61肺腫瘍、OMP-C63結腸腫瘍およびOMP-LU33肺腫瘍においてNOTCH1-ICDが検出された(図8)。OMP-LU61およびOMP-C63は、既知のNOTCH1変異を有していない。IHCは定量的とし、H-スコアとして報告した。H-スコア = (3×(3+核の%)) + (2×(2+ 核の%)) + (1×(1+ 核の%))。図9は、食道がんサンプルを含む、固形腫瘍のNOTCH1.ICDスクリーニングの結果を示す。H-スコア ≧ 30を有するサンプルの頻度を示す。

【０２６７】

OMP-B40、OMP-LU61およびOMP-C63を含めてNOTCH1-ICDの上昇を伴う腫瘍は、OMP-52M51ヒト化抗NOTCH1抗体による処置に対して有意な感受性を示した(図9、10および11)。対照的に、NOTCH1-ICD染色のない腫瘍(例えばOMP-LU33)は、OMP-52M51抗NOTCH1抗体による処置に対して有意な感受性を示さなかった(データは示されていない)。これらのデータは、OMP-52M51処置に反応すると考えられる患者を選定するための予測バイオマーカーとしてNOTCH1-ICDアッセイ法を使用できることを示している。

【０２６８】

実施例9: OMP-52M51ヒト化抗体およびイリノテカンを用いた併用療法

2万個のOMP-C11腫瘍細胞を、PBSおよび0.5×マトリゲルから構成される注射培地中に再懸濁し、マウスへ皮下注射した。OMP-C11細胞のN1.ICD IHC H-スコアは、およそ34である。OMP-C11細胞はFBW7についてヘテロ接合性の変異体である。処置は腫瘍細胞の注射から1日後に開始し、実験の期間中、継続した。マウスに、単剤療法として、または週1回投与される7.5 mg/kgのイリノテカンと組み合わせて、週2回、15 mg/kgのLZ1対照抗体またはOMP-52M51抗NOTCH1抗体のいずれかを投与した。抗体およびイリノテカンはIP注射によって投与された。実験の結果を図12に提示する。腫瘍容積は、平均±SEM、1群あたり動物n=10として示されている。OMP-52M51単独では、対照抗体処置群において観察された腫瘍成長の53%にまで腫瘍成長が低減された(54日目、p=0.046)。OMP-52M51に加えてイリノテカンの併用処置では、イリノテカンとの組み合わせで対照抗体を投与された群において観察された腫瘍成長の44%にまで腫瘍成長が低減された(96日目、p=0.044)。

【０２６９】

18万個のOMP-C20腫瘍細胞を、PBSおよび0.5×マトリゲルから構成される注射培地中に再懸濁し、皮下注射した。OMP-C20細胞のN1.ICD IHC H-スコアは、およそ58である。OMP-C20細胞はFBW7についてヘテロ接合性の変異体である。処置は腫瘍細胞の注射から1日後に

開始し、実験の期間中、継続した。マウスに、単剤療法として、または週1回投与される7.5 mg/kgのイリノテカンと組み合わせて、週2回、15 mg/kgの1B7.11対照抗体またはOMP-52M51抗NOTCH1抗体のいずれかを投与した。抗体およびイリノテカンはIP注射によって投与された。実験の結果を図12に提示する。腫瘍容積は、平均±SEM、1群あたり動物n=10として示されている。OMP-52M51単独では、対照抗体処置群において観察された腫瘍成長の34%にまで腫瘍成長が低減された(70日目、p=<0.001)。OMP-52M51に加えてイリノテカンの併用処置では、イリノテカンとの組み合わせで対照抗体を投与された群において観察された腫瘍成長の41%にまで腫瘍成長が低減された(111日目、p=0.0001)。

【０２７０】

実質的には上記の通りのインビボ異種移植片モデルを用いて、単独またはイリノテカンとの組み合わせでのOMP-52M51抗NOTCH1抗体処置に対するOMP-C40腫瘍細胞の感受性も判定された。OMP-C20細胞のN1.ICD IHC H-スコアは、およそ23である。OMP-C40細胞はFBW7遺伝子の野生型コピー2つを保有する。実験の結果を図12に提示する。OMP-52M51処置群と対照抗体処置群との間で腫瘍成長の有意差はなかった。

【０２７１】

実施例10: 変異体NOTCH1およびNOTCH3ポリペプチドによるシグナル伝達

NOTCH変異体発現プラスミドの構築:

Agilent QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent; La Jolla, CA)を用いてNOTCH1およびNOTCH3変異体を作出した。Agilentプライマーデザインサイトを用いてPCRプライマーを作出した。PCR反応をプロトコルにしたがってpcDNA3.1中のdsDNA NOTCH野生型鋳型50 ngおよび他の反応溶液を用いて行った。十分な増幅のため、サーモサイクラーを68℃で2.5分/kbプラスミド長に調整した。増幅されたDNAを次に、Dpn I制限酵素で消化し、XL10-Gold Ultracompetent Cellを用いて形質転換した。DNAをLB-アンピシリンプレート上にプレーティングし、終夜成長させた。コロニーを選別し、配列決定のためにElimBio (Hawyard, CA)に供して、変異の存在を確認した。変異陽性のクローンをマキシプレップして、さらなるDNAをもたらした。全長の配列決定を陽性クローンに対し行って、さらなる変異が存在しないことを確実にした。

【０２７２】

ルシフェラーゼアッセイ法:

PC3細胞、HeLa細胞およびA549細胞を10 cmディッシュ(細胞1mil/培地9 mL)上にプレーティングし、37℃/5% CO2で終夜成長させた。細胞培地はDMEM+高グルコース、10% FBS、1% HEPESおよび1%ペニシリン/ストレプトマイシン(Invitrogen; Carlsbad, CA)であった。OptiMEM、FuGENE 6、hNOTCH.WTまたはpcDNAまたはNOTCH.変異体2μg、pGL4_8xCBS 2μg、pcDNA3_Mammal 2μgおよびpGL3_RL.CMV 0.5μgを用いてDNA形質移入の準備を行った。形質移入試薬を混合し、細胞に添加する前に15分間室温でインキュベートした。形質移入されたPC3細胞を37℃/5% CO2で終夜インキュベートした。形質移入と同時に、96ウェルプレートを1ウェルあたりPBS 30μL中のhJAG1 (31.25～500 ng) (R&D Systems; Minneapolis, MN)またはリガンドなしでコーティングした。コーティングしたプレートを4℃で終夜貯蔵した。24時間の一過性形質移入の後に、細胞を回収し、70μL/ウェルを96ウェルのコーティング済みのプレートに添加した後に、37℃/5% CO2で終夜インキュベートした。Dual-Gloルシフェラーゼ・アッセイシステム(Assay System) (Promega; Madison, WI)を用いてNOTCH活性を評価した。蛍ルシフェラーゼとウミシイタケルシフェラーゼの比率をとり、NOTCH活性を計算した。

【０２７３】

PC3細胞に、NOTCH1全長野生型(NOTCH_1 WT)またはNOTCH1_G2427fs (OMP-B40)変異体のポリペプチドをコードするDNAを一過性に形質移入した。Dual-gloルシフェラーゼシステムを用いて外因性リガンドの非存在下でNOTCH媒介性のルシフェラーゼ活性化を評価した。

【０２７４】

PC3細胞およびA549細胞に、NOTCH3全長野生型(NOTCH3_WT)、NOTCH3_P2033fs (OMP-C31)

またはNOTCH3_P2208fs (OMP-B37)のポリペプチドをコードするDNAを一過性に形質移入した。PC3細胞もA549細胞もともに、DLL4またはJAG1のような、内因性NOTCHリガンドのレベルが非常に低い。Dual-gloルシフェラーゼシステムを用いて外因性リガンドの非存在下でNOTCH媒介性のルシフェラーゼ活性化を評価した。実験の結果を図13Bに示す。NOTCH3_P2033fs (6096insC, OMP-C31)およびNOTCH3_P2208fs (6620insC, OMP-B37)は、両細胞株における活性化変異である。

【０２７５】

NOTCH3_P2033fs (OMP-C31)をコードするDNAを形質移入したPC3細胞においてJAG1 (1～500 ng/30μL)に対し用量反応曲線を作成した(図13C)。NOTCH3_P2208fs (OMP-B37)をコードするDNAを形質移入したPC3細胞においてJAG1 (1～500 ng/30μL)に対し用量反応曲線を作成した(図13D)。NOTCH3_P2033fs (OMP-C31)およびNOTCH3_P2208fs (OMP-B37)のポリペプチドによるJAG1媒介性のシグナル伝達は、野生型NOTCH3によるシグナル伝達よりも有意に高い。

【０２７６】

実施例10: 変異体NOTCH1およびNOTCH3ポリペプチドによるシグナル伝達

NOTCH変異体発現プラスミドの構築:

Agilent QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent; La Jolla, CA)を用いてNOTCH1およびNOTCH3変異体を作出した。Agilentプライマーデザインサイトを用いてPCRプライマーを作出した。PCR反応をプロトコルにしたがってpcDNA3.1中のdsDNA NOTCH野生型鋳型50 ngおよび他の反応溶液を用いて行った。十分な増幅のため、サーモサイクラーを68℃で2.5分/kbプラスミド長に調整した。増幅されたDNAを次に、Dpn I制限酵素で消化し、XL10-Gold Ultracompetent Cellを用いて形質転換した。DNAをLB-アンピシリンプレート上にプレーティングし、終夜成長させた。コロニーを選別し、配列決定のためにElimBio (Hawyard, CA)に供して、変異の存在を確認した。変異陽性のクローンをマキシプレップして、さらなるDNAをもたらした。全長の配列決定を陽性クローンに対し行って、さらなる変異が存在しないことを確実にした。

【０２７７】

実施例11: OMP-B40腫瘍におけるNOTCH1アンタゴニストの活性

γ-セクレターゼ阻害剤と比べて抗NOTCH1抗体の効果を試験するため、本発明者らは、NOTCH1における活性化変異を担持するOMP-B40乳房腫瘍モデルを利用した。75,000個のOMP-B40乳房腫瘍細胞をNod-Scidマウスに注射した。腫瘍を、120 mm^3の平均容積に達するまで、50日間成長させた。腫瘍担持マウス(群n=10)を対照抗体(1B7.11, 10 mg/kg)により毎週もしくは1週間おきに; 抗NOTCH1 (A2G1、マウスNOTCH1およびヒトNOTCH1の両方を認識する抗NOTCH1抗体)により、3 mg/kgもしくは10 mg/kgで、毎週もしくは1週間おきに; またはγセクレターゼ阻害剤(GSI)により150 mg/kgもしくは300 mg/kgのいずれかで、1週間に5回処置した。抗体をIP注射によって投薬し、GSI化合物を経口胃管栄養法によって投薬した。示された日に腫瘍容積を測定した。データは平均 + SEMとしてプロットされている。GSIもA2G1抗NOTCH1抗体もともに、それぞれ、図14AおよびBに示されるように腫瘍成長を阻害した。毎週10 mg/kgでのA2G1および300 mg/kgでのGSIによる腫瘍成長阻害の程度は、類似していた。

【０２７８】

切断型のNOTCH1 ICDを選択的に認識する抗体を用いたウエスタンブロットにより活性化NOTCH1の存在について腫瘍溶解物を分析した(図14C)。A2G1抗NOTCH1抗体は、NOTCH1活性化のγ-セクレターゼ阻害剤よりも効果的な阻害剤であった。

【０２７９】

組織学的分析により胃腸毒性に及ぼす効果についても調べた(図14D)。毎週10 mg/kgでのA2G1抗NOTCH1抗体では、300 mg/kgでのGSI (qdX5)よりも重症度の低い胃腸毒性が引き起こされた。このように、活性化NOTCH1変異を担持する腫瘍におけるNOTCH1シグナル伝達の阻害で、モノクローナル抗体による選択的なNOTCH1阻害は、GSIよりも耐性が高く、効果的である。

【０２８０】
実施例12: OMP-C31結腸腫瘍での59R5抗NOTCH2/3抗体の活性
NOTCH3における活性化変異を担持する腫瘍に及ぼす59R5抗NOTCH2/3抗体の効果を試験するために、OMP-C31結腸腫瘍モデルを利用した。5,000個のOMP-C31結腸腫瘍細胞をNod-Scidマウスに皮下注射した。腫瘍細胞の注射から2日後に投薬を開始した。腫瘍担持マウス(群n=10)を、対照抗体(1B7.11)または59R5抗NOTCH2/3抗体のいずれかで処置した。実験の期間中、毎週、10 mg/kgでIP注射により抗体を投薬した。示された日に腫瘍容積を測定した。データは平均 + SEMとしてプロットされている(図15)。59R5抗NOTCH2/3抗体は、対照抗体処置群と比べてOMP-C31腫瘍成長を阻害した(p = 0.0005)。

【０２８１】
実施例13: 52M51抗NOTCH1抗体は、G2427fsおよびR2328W変異体NOTCH1ポリペプチドによるリガンド媒介性のシグナル伝達を阻害する
ある種の態様において、52M51 NOTCH1受容体抗体がG2427fsおよびR2328W変異体NOTCH1ポリペプチドによるリガンド媒介性のシグナル伝達を遮断する能力(Westhoff et al., Proc Natl Acad Sci 2009 December 29; 106(52): 22293-22298)を判定した。PC3細胞に、(a) G2427fs、R2328Wまたは野生型NOTCH1を発現するベクター、(b) 蛍ルシフェラーゼレポーター遺伝子上流のNOTCH応答性プロモーターを含むpGL4_8xCBSベクター、(c) NOTCHの転写補因子MAMLを発現するpcDNA3_Mammalベクター、および(d) ウミシイタケルシフェラーゼを発現するpGL3_RL.CMVベクターを同時に形質移入した。対照細胞には、(a)の代わりに空のベクターを形質移入した。OptiMEM, FuGENE 6を用いてDNA形質移入の準備を行った。形質移入試薬を混合し、細胞に添加する前に15分間室温でインキュベートした。形質移入されたPC3細胞を37℃/5% CO_2で終夜インキュベートした。形質移入試薬を細胞に加える時に、96ウェルプレートを1ウェルあたりPBS 30μL中のhDLL4 (12.5 ng)もしくはhJAG1 (12.5 ng) (R&D Systems; Minneapolis, MN)またはリガンドなしでコーティングした。コーティングしたプレートを4℃で終夜貯蔵した。24時間の一過性形質移入の後に、細胞を回収し、70μL/ウェルを96ウェルのコーティング済みのプレートに添加した後に、37℃/5% CO_2で終夜インキュベートした。形質移入細胞を加える少なくとも1時間前に、10 uL/ウェル(1.6～1000 ng/mL)の52M51抗NOTCH1抗体を96ウェルプレートに加えた。Dual-Gloルシフェラーゼ・アッセイシステム(Assay System) (Promega; Madison, WI)を用いてNOTCH活性を評価した。蛍ルシフェラーゼとウミシイタケルシフェラーゼの活性の比率を判定することにより、NOTCH活性を計算した。

【０２８２】
図16AおよびBは、それぞれ、DLL4およびJAG1での刺激後にG2427fs (OMP-B40) NOTCH1変異体ポリペプチド発現PC3細胞において観察された蛍ルシフェラーゼとウミシイタケルシフェラーゼ活性の比率を示す。図16CおよびDは、それぞれ、DLL4およびJAG1での刺激後にR2328W NOTCH1変異体ポリペプチド発現PC3細胞において観察された蛍ルシフェラーゼとウミシイタケルシフェラーゼ活性の比率を示す。G2427fsまたはR2328W NOTCH1を発現するPC3細胞は、組み換えNOTCH1を発現しない細胞よりも有意に高い、蛍ルシフェラーゼとウミシイタケルシフェラーゼ活性の比率を有していた。さらに、52M51抗NOTCH1抗体は、G2427fsおよびR2328W NOTCH1ポリペプチドを介した蛍ルシフェラーゼとウミシイタケルシフェラーゼ活性の比率の増加を、用量依存的に低減した。

【０２８３】
実施例14: 処置されたOMP-B37乳房腫瘍のNOTCH3 ICD IHC分析
NOTCH2/3アンタゴニストおよび/または化学療法による処置後の、NOTCH3活性化変異を含むOMP-B37腫瘍細胞におけるNOTCH3.ICDの蓄積をIHCによって調べた。上記実施例3の第2段落において記述されるようにOMP-59R5抗NOTCH2/3抗体、タキソールまたはOMP-59R5およびタキソールの組み合わせで処置されたOMP-B37異種移植片マウスから腫瘍サンプルを単離した。NOTCH3の切断部位に結合し、かつ核内の活性化NOTCH3を検出する、NOTCH3 ICD (「N3.ICD」)ウサギモノクローナル抗体を作った。N3.ICD抗体とTarget Retrieval Solution pH 9 (DAKO)中での抗原回復、終夜4℃での抗体インキュベーションならびにペルオキ

シダーゼに基づくEnVision(商標)+重合体(DAKO)およびDAB+ (DAKO)による検出を用いた標準的なIHCプロトコルとを用いて腫瘍サンプルに対しNOTCH3 ICD IHCを行った。統計的有意性をボンフェローニ調整を伴う一元配置分散分析（One Way ANOVA）によって判定した。得られた結果を図17に示す。OMP-59R5抗NOTCH2/3抗体処理により、PBS処理細胞でのNOTCH3.ICDの蓄積と比べてOMP-B37乳房腫瘍細胞でのNOTCH3.ICDの蓄積が有意に阻害された。OMP-59R5抗NOTCH2/3に加えてタキソールの併用処理により、タキソールのみで処理された細胞で検出された蓄積と比べてOMP-B37細胞でのNOTCH3.ICDの蓄積が有意に阻害された。

【０２８４】

配列

SEQ ID NO:1

ヒトNOTCH1遺伝子(野生型)

atgccgccgctcctggcgcccctgctctgcctggcgctgctgcccgcgctcgccgcacgaggcccgcg
atgctcccagcccggtgagacctgcctgaatggcgggaagtgtgaagcggccaatggcacggaggcct
gcgtctgtggcggggccttcgtgggcccgcgatgccaggaccccaacccgtgcctcagcacccctgc
aagaacgccgggacatgccacgtggtggaccgcagaggcgtggcagactatgcctgcagctgtgccct
gggcttctctgggcccctctgcctgacacccctggacaatgcctgcctcaccaaccctgccgcaacg
ggggcacctgcgacctgctcacgctgacggagtacaagtgccgctgcccgcccggctggtcagggaaa
tcgtgccagcaggctgacccgtgcgcctccaaccctgcgccaacggtggccagtgcctgcccttcga
ggcctcctacatctgccactgcccacccagcttccatggccccacctgccggcaggatgtcaacgagt
gtggccagaagcccgggctttgccgccacggaggcacctgccacaacgaggtcggctcctaccgctgc
gtctgccgcgccacccacactggccccaactgcgagcggccctacgtgccctgcagcccctcgccctg
ccagaacgggggcacctgccgccccacgggcgacgtcacccacgagtgtgcctgcctgccaggcttca
ccggccagaactgtgaggaaaatatcgacgattgtccaggaaacaactgcaagaacgggggtgcctgt
gtggacggcgtgaacacctacaactgccgctgcccgccagagtggacaggtcagtactgtaccgagga
tgtggacgagtgccagctgatgccaaatgcctgccagaacggcgggacctgccacaacacccacggtg
gctacaactgcgtgtgtgtcaacggctggactggtgaggactgcagcgagaacattgatgactgtgcc
agcgccgcctgcttccacggcgccacctgccatgaccgtgtggcctccttctactgcgagtgtcccca
tggccgcacaggtctgctgtgccacctcaacgacgcatgcatcagcaacccctgtaacgagggctcca
actgcgacaccaaccctgtcaatggcaaggccatctgcacctgcccctcggggtacacgggcccggcc
tgcagccaggacgtggatgagtgctcgctgggtgccaacccctgcgagcatgcgggcaagtgcatcaa
cacgctgggctccttcgagtgccagtgtctgcagggctacacgggcccccgatgcgagatcgacgtca
acgagtgcgtctcgaacccgtgccagaacgacgccacctgcctggaccagattggggagttccagtgc
atctgcatgcccggctacgagggtgtgcactgcgaggtcaacacagacgagtgtgccagcagcccctg
cctgcacaatggccgctgcctggacaagatcaatgagttccagtgcgagtgccccacgggcttcactg
ggcatctgtgccagtacgatgtggacgagtgtgccagcacccccctgcaagaatggtgccaagtgcctg
gacggacccaacacttacacctgtgtgtgcacggaagggtacacggggacgcactgcgaggtggacat
cgatgagtgcgaccccgacccctgccactacggctcctgcaaggacggcgtcgccaccttcacctgcc
tctgccgcccaggctacacgggccaccactgcgagaccaacatcaacgagtgctccagccagccctgc
cgccacgggggcacctgccaggaccgcgacaacgcctacctctgcttctgcctgaaggggaccacagg
acccaactgcgagatcaacctggatgactgtgccagcagcccctgcgactcgggcacctgtctggaca
agatcgatggctacgagtgtgcctgtgagccgggctacacagggagcatgtgtaacatcaacatcgat
gagtgtgcgggcaacccctgccacaacgggggcacctgcgaggacggcatcaatggcttcacctgccg
ctgccccgagggctaccacgaccccacctgcctgtctgaggtcaatgagtgcaacagcaacccctgcg
tccacggggcctgccgggacagcctcaacgggtacaagtgcgactgtgaccctgggtggagtgggacc
aactgtgacatcaacaacaatgagtgtgaatccaacccttgtgtcaacggcggcacctgcaaagacat
gaccagtggctacgtgtgcacctgccgggagggcttcagcggtcccaactgccagaccaacatcaacg
agtgtgcgtccaacccatgtctgaaccagggcacgtgtattgacgacgttgccgggtacaagtgcaac
tgcctgctgccctacacaggtgccacgtgtgaggtggtgctggccccgtgtgccccccagcccctgcag
aaacggcggggagtgcaggcaatccgaggactatgagagcttctcctgtgtctgccccacgggctggc
aagggcagacctgtgaggtcgacatcaacgagtgcgttctgagcccgtgccggcacggcgcatcctgc
cagaacacccacggcggctaccgctgccactgccaggccggctacagtgggcgcaactgcgagaccga
catcgacgactgccggcccaacccgtgtcacaacgggggctcctgcacagacggcatcaacacggcct
tctgcgactgcctgcccggcttccggggcactttctgtgaggaggacatcaacgagtgtgccagtgac
ccctgccgcaacggggccaactgcacggactgcgtggacagctacacgtgcacctgccccgcaggctt
cagcgggatccactgtgagaacaacacgcctgactgcacagagagctcctgcttcaacggtggcacct
gcgtggacggcatcaactcgttcacctgcctgtgtccacccggcttcacgggcagctactgccagcac
gatgtcaatgagtgcgactcacagccctgcctgcatggcggcacctgtcaggacggctgcggctccta
caggtgcacctgcccccagggctacactggccccaactgccagaaccttgtgcactggtgtgactcct
cgccctgcaagaacggcggcaaatgctggcagacccacacccagtaccgctgcgagtgccccagcggc
tggaccggcctttactgcgacgtgcccagcgtgtcctgtgaggtggctgcgcagcgacaaggtgttga
cgttgcccgcctgtgccagcatggagggctctgtgtggacgcgggcaacacgcaccactgccgctgcc
aggcgggctacacaggcagctactgtgaggacctggtggacgagtgctcacccagcccctgccagaac

10

20

30

40

ggggccacctgcacggactacctgggcggctactcctgcaagtgcgtggccggctaccacggggtgaa
ctgctctgaggagatcgacgagtgcctctcccacccctgccagaacgggggcacctgcctcgacctcc
ccaacacctacaagtgctcctgcccacggggcactcagggtgtgcactgtgagatcaacgtggacgac
tgcaatcccccccgttgaccccgtgtcccggagccccaagtgctttaacaacggcacctgcgtggacca
ggtgggcggctacagctgcacctgcccgccgggcttcgtgggtgagcgctgtgaggggatgtcaacg
agtgcctgtccaatccctgcgacgcccgtggcacccagaactgcgtgcagcgcgtcaatgacttccac
tgcgagtgccgtgctggtcacaccgggcgccgctgcgagtccgtcatcaatggctgcaaaggcaagcc
ctgcaagaatgggggcacctgcgccgtggcctccaacaccgcccgcgggttcatctgcaagtgccctg
cgggcttcgagggcgccacgtgtgagaatgacgctcgtacctgcggcagcctgcgctgcctcaacggc
ggcacatgcatctccggcccgcgcagccccacctgcctgtgcctgggccccttcacgggccccgaatg
ccagttcccggccagcagcccctgcctgggcggcaaccccctgctacaaccaggggacctgtgagccca
catccgagagccccttctaccgttgcctgtgccccgccaaattcaacgggctcttgtgccacatcctg
gactacagcttcgggggtggggccgggcgcgacatccccccgccgctgatcgaggaggcgtgcgagct
gcccgagtgccaggaggacgcgggcaacaaggtctgcagcctgcagtgcaacaaccacgcgtgcggct
gggacggcggtgactgctccctcaacttcaatgacccctggaagaactgcacgcagtctctgcagtgc
tggaagtacttcagtgacggccactgtgacagccagtgcaactcagccggctgcctcttcgacggctt
tgactgccagcgtgcggaaggccagtgcaacccccctgtacgaccagtactgcaaggaccacttcagcg
acgggcactgcgaccagggctgcaacagcgcggagtgcgagtgggacgggctggactgtgcggagcat
gtacccgagaggctggcggccggcacgctggtggtggtggtgctgatgccgccggagcagctgcgcaa
cagctccttccacttcctgcgggagctcagccgcgtgctgcacaccaacgtggtcttcaagcgtgacg
cacacggccagcagatgatcttcccctactacggccgcgaggaggagctgcgcaagcaccccatcaag
cgtgccgccgagggctgggccgcacctgacgccctgctgggccaggtgaaggcctcgctgctccctgg
tggcagcgagggtgggcggcggcggagggagctggaccccatggacgtccgcggctccatcgtctacc
tggagattgacaaccggcagtgtgtgcaggcctcctcgcagtgcttccagagtgccaccgacgtggcc
gcattcctgggagcgctcgcctcgctgggcagcctcaacatcccctacaagatcgaggccgtgcagag
tgagaccgtggagccgcccccgccggcgcagctgcacttcatgtacgtggcggcggccgcctttgtgc
ttctgttcttcgtgggctgcggggtgctgctgtcccgcaagcgccggcggcagcatggccagctctgg
ttccctgagggcttcaaagtgtctgaggccagcaagaagaagcggcgggagcccctcggcgaggactc
cgtgggcctcaagcccctgaagaacgcttcagacggtgccctcatggacgacaaccagaatgagtggg
gggacgaggacctggagaccaagaagttccggttcgaggagcccgtggttctgcctgacctggacgac
cagacagaccaccggcagtggactcagcagcacctggatgccgctgacctgcgcatgtctgccatggc
ccccacaccgccccagggtgaggttgacgccgactgcatggacgtcaatgtccgcgggcctgatggct
tcaccccgctcatgatcgcctcctgcagcgggggcggcctggagacgggcaacagcgaggaagaggag
gacgcgccggccgtcatctccgacttcatctaccagggcgccagcctgcacaaccagacagaccgcac
gggcgagaccgccttgcacctggccgcccgctactcacgctctgatgccgccaagcgcctgctggagg
ccagcgcagatgccaacatccaggacaacatgggccgcaccccgctgcatgcggctgtgtctgccgac
gcacaaggtgtcttccagatcctgatccggaaccgagccacagacctggatgcccgcatgcatgatgg
cacgacgccactgatcctggctgcccgcctggccgtggagggcatgctggaggacctcatcaactcac
acgccgacgtcaacgccgtagatgacctgggcaagtccgccctgcactgggccgccgccgtgaacaat
gtggatgccgcagttgtgctcctgaagaacggggctaacaaagatatgcagaacaacagggaggagac
acccctgtttctggccgcccgggagggcagctacgagaccgccaaggtgctgctggaccactttgcca
accgggacatcacggatcatatggaccgcctgccgcgcgacatcgcacaggagcgcatgcatcacgac
atcgtgaggctgctggacgagtacaacctggtgcgcagcccgcagctgcacggagccccgctgggggg
cacgcccaccctgtcgcccccgctctgctcgcccaacggctacctgggcagcctcaagcccggcgtgc
agggcaagaaggtccgcaagcccagcagcaaaggcctggcctgtggaagcaaggaggccaaggacctc
aaggcacggaggaagaagtcccaggacggcaagggctgcctgctggacagctccggcatgctctcgcc
cgtggactccctggagtcaccccatggctacctgtcagacgtggcctcgccgccactgctgccctccc
cgttccagcagtctccgtccgtgcccctcaaccacctgcctgggatgcccgacacccacctgggcatc
gggcacctgaacgtggcggccaagcccgagatggcggcgctgggtgggggcggccggctggcctttga
gactggcccacctcgtctctcccacctgcctgtggcctctggcaccagcaccgtcctgggctccagca
gcggaggggccctgaatttcactgtgggcgggtccaccagtttgaatggtcaatgcgagtggctgtcc
cggctgcagagcggcatggtgccgaaccaatacaaccctctgcgggggagtgtggcaccaggccccct
gagcacacaggcccctccctgcagcatggcatggtaggcccgctgcacagtagccttgctgccagcg
ccctgtcccagatgatgagctaccagggcctgcccagcacccggctggccacccagcctcacctggtg

cagacccagcaggtgcagccacaaaacttacagatgcagcagcagaacctgcagccagcaaacatcca
gcagcagcaaagcctgcagccgccaccaccaccaccacagccgcaccttggcgtgagctcagcagcca
gcggccacctgggccggagcttcctgagtggagagccgagccaggcagacgtgcagccactgggcccc
agcagcctggcggtgcacactattctgccccaggagagccccgccctgcccacgtcgctgccatcctc
gctggtcccacccgtgaccgcagcccagttcctgacgccccctcgcagcacagctactcctcgcctg
tggacaacacccccagccaccagctacaggtgcctgagcacccccttcctcaccccgtcccctgagtcc
cctgaccagtggtccagctcgtccccgcattccaacgtctccgactggtccgagggcgtctccagccc
tcccaccagcatgcagtcccagatcgcccgcattccggaggccttcaagtaaacggcgcgccccacga
gaccccggcttcctttcccaagccttcgggcgtctgtgtgcgctctgtggatgccagggccgaccaga
ggagccttttaaaacacatgtttttatacaaaataagaacgaggattttaatttttttttagtattta
tttatgtacttttatttttacacagaaacactgccttttttatttatatgtactgttttatctggcccca
ggtagaaacttttatctattctgagaaaacaagcaagttctgagagccagggttttcctacgtaggat
gaaaagattcttctgtgtttataaaatataaacaaagattcatgatttataaatgccatttatttatt
gattccttttttcaaaatccaaaaagaaatgatgttggagaagggaagttgaacgagcatagtccaaa
aagctcctggggcgtccaggccgcgccctttccccgacgcccacccaaccccaagccagcccggccgc
tccaccagcatcacctgcctgttaggagaagctgcatccagaggcaaacggaggcaaagctggctcac
cttccgcacgcggattaatttgcatctgaaataggaaacaagtgaaagcatatgggttagatgttgcc
atgtgttttagatggtttcttgcaagcatgcttgtgaaaatgtgttctcggagtgtgtatgccaagag
tgcacccatggtaccaatcatgaatctttgtttcaggttcagtattatgtagttgttcgttggttata
caagttcttggtccctccagaaccaccccggccccctgcccgttcttgaaatgtaggcatcatgcatg
tcaaacatgagatgtgtggactgtggcacttgcctgggtcacacacggaggcatcctacccttttctg
gggaaagacactgcctgggctgaccccggtggcggccccagcacctcagcctgcacagtgtcccccag
gttccgaagaagatgctccagcaacacagcctgggccccagctcgcgggacccgacccccgtgggct
cccgtgttttgtaggagacttgccagagccgggcacattgagctgtgcaacgccgtgggctgcgtcct
ttggtcctgtccccgcagccctggcaggggcatgcggtcgggcaggggctggagggaggcgggggct
gcccttgggccacccctcctagtttgggaggagcagatttttgcaataccaagtatagcctatggcag
aaaaaatgtctgtaaatatgtttttaaaggtggattttgtttaaaaaatcttaatgaatgagtctgtt
gtgtgtcatgccagtgagggacgtcagacttggctcagctcggggagccttagccgcccatgcactgg
ggacgctccgctgccgtgccgcctgcactcctcagggcagcctcccccggctctacgggggccgcgtg
gtgccatccccaggggcatgaccagatgcgtcccaagatgttgatttttactgtgttttataaaata
gagtgtagtttacagaaaaagactttaaaagtgatctacatgaggaactgtagatgatgtatttttt
catctttttgttaactgatttgcaataaaaatgatactgatggtgaaaaaaaaaaaaaaa

SEQ ID NO:2

ヒトNOTCH2遺伝子(野生型)

gcgaccgagaagatgcccgccctgcgccccgctctgctgtgggcgctgctggcgctctggctgtgctg
cgcgacccccgcgcatgcattgcagtgtcgagatggctatgaaccctgtgtaaatgaaggaatgtgtg
ttacctaccacaatggcacaggatactgcaaatgtccagaaggcttcttgggggaatattgtcaacat
cgagacccctgtgagaagaaccgctgccagaatggtgggacttgtgtggcccaggccatgctggggaa
agccacgtgccgatgtgcctcagggtttacaggagaggactgccagtactcgacatctcatccatgct
ttgtgtctcgaccctgcctgaatggcggcacatgccatatgctcagccgggatacctatgagtgcacc
tgtcaagtcgggtttacaggtaaggagtgccaatggaccgatgcctgcctgtctcatccctgtgcaaa
tggaagtacctgtaccactgtggccaaccagttctcctgcaaatgcctcacaggcttcacagggcaga
aatgtgagactgatgtcaatgagtgtgacattccaggacactgccagcatggtggcacctgcctcaac
ctgcctggttcctaccagtgccagtgccttcagggcttcacaggccagtactgtgacagcctgtatgt
gccctgtgcaccctcgccttgtgtcaatggaggcacctgtcggcagactggtgacttcacttttgagt
gcaactgccttccaggttttgaagggagcacctgtgagaggaatattgatgactgccctaaccacagg
tgtcagaatggaggggtttgtgtggatggggtcaacacttacaactgccgctgtcccccacaatggac
aggacagttctgcacagaggatgtggatgaatgcctgctgcagcccaatgcctgtcaaaatgggggca
cctgtgccaaccgcaatggaggctatggctgtgtatgtgtcaacggctggagtggagatgactgcagt
gagaacattgatgattgtgccttcgcctcctgtactccaggctccacctgcatcgaccgtgtggcctc
cttctcttgcatgtgcccagaggggaaggcaggtctcctgtgtcatctggatgatgcatgcatcagca
atccttgccacaaggggcactgtgtgacaccaaccccctaaatgggcaatatatttgcacctgccca
caaggctacaaaggggctgactgcacagaagatgtggatgaatgtgccatggccaatagcaatccttg
tgagcatgcaggaaaatgtgtgaacacggatggcgccttccactgtgagtgtctgaagggttatgcag

gacctcgttgtgagatggacatcaatgagtgccattcagacccctgccagaatgatgctacctgtctg
gataagattggaggcttcacatgtctgtgcatgccaggtttcaaaggtgtgcattgtgaattagaaat
aaatgaatgtcagagcaacccttgtgtgaacaatgggcagtgtgtggataaagtcaatcgtttccagt
gcctgtgtcctcctggtttcactgggccagtttgccagattgatattgatgactgttccagtactccg
tgtctgaatggggcaaagtgtatcgatcacccgaatggctatgaatgccagtgtgccacaggtttcac
tggtgtgttgtgtgaggagaacattgacaactgtgaccccgatccttgccaccatggtcagtgtcagg
atggtattgattcctacacctgcatctgcaatcccgggtacatgggcgccatctgcagtgaccagatt
gatgaatgttacagcagcccttgcctgaacgatggtcgctgcattgacctggtcaatggctaccagtg
caactgccagccaggcacgtcaggggttaattgtgaaattaattttgatgactgtgcaagtaacccctt
gtatccatggaatctgtatggatggcattaatcgctacagttgtgtctgctcaccaggattcacaggg
cagagatgtaacattgacattgatgagtgtgcctccaatccctgtcgcaagggtgcaacatgtatcaa
cggtgtgaatggtttccgctgtatatgccccgagggaccccatcaccccagctgctactcacaggtga
acgaatgcctgagcaatccctgcatccatggaaactgtactggaggtctcagtggatataagtgtctc
tgtgatgcaggctgggttggcatcaactgtgaagtggacaaaaatgaatgcctttcgaatccatgcca
gaatggaggaacttgtgacaatctggtgaatggatacaggtgtacttgcaagaagggctttaaaggct
ataactgccaggtgaatattgatgaatgtgcctcaaatccatgcctgaaccaaggaacctgctttgat
gacataagtggctacacttgccactgtgtgctgccatacacaggcaagaattgtcagacagtattggc
tccctgttccccaaaccttgtgagaatgctgctgtttgcaaagagtcaccaaattttgagagttata
cttgcttgtgtgctcctggctggcaaggtcagcggtgtaccattgacattgacgagtgtatctccaag
ccctgcatgaaccatggtctctgccataacacccagggcagctacatgtgtgaatgtccaccaggctt
cagtggtatggactgtgaggaggacattgatgactgccttgccaatccttgccagaatggaggttcct
gtatggatggagtgaatactttctcctgcctctgccttccgggtttcactggggataagtgccagaca
gacatgaatgagtgtctgagtgaaccctgtaagaatggagggacctgctctgactacgtcaacagtta
cacttgcaagtgccaggcaggatttgatggagtccattgtgagaacaacatcaatgagtgcactgaga
gctcctgtttcaatggtggcacatgtgttgatgggattaactccttctcttgcttgtgccctgtgggt
ttcactggatccttctgcctccatgagatcaatgaatgcagctctcatccatgcctgaatgagggaac
gtgtgttgatggcctgggtacctaccgctgcagctgccccctgggctacactgggaaaaactgtcaga
ccctggtgaatctctgcagtcggtctccatgtaaaaacaaaggtacttgcgttcagaaaaaagcagag
tcccagtgcctatgtccatctggatgggctggtgcctattgtgacgtgcccaatgtctcttgtgacat
agcagcctccaggagaggtgtgcttgttgaacacttgtgccagcactcaggtgtctgcatcaatgctg
gcaacacgcattactgtcagtgccccctgggctatactgggagctactgtgaggagcaactcgatgag
tgtgcgtccaacccctgccagcacggggcaacatgcagtgacttcattggtggatacagatgcgagtg
tgtcccaggctatcagggtgtcaactgtgagtatgaagtggatgagtgccagaatcagccctgccaga
atggaggcacctgtattgaccttgtgaaccatttcaagtgctcttgcccaccaggcactcggggccta
ctctgtgaagagaacattgatgactgtgccccggggtccccattgccttaatggtggtcagtgcatgga
taggattggaggctacagttgtcgctgcttgcctggctttgctggggagcgttgtgagggagacatca
acgagtgcctctccaacccctgcagctctgagggcagcctggactgtatacagctcaccaatgactac
ctgtgtgtttgccgtagtgcctttactggccggcactgtgaaaccttcgtcgatgtgtgtccccagat
gccctgcctgaatggagggacttgtgctgtggccagtaacatgcctgatggtttcatttgccgttgtc
ccccgggattttccggggcaaggtgccagagcagctgtggacaagtgaaatgtaggaaggggggagcag
tgtgtgcacaccgcctctggaccccgctgcttctgccccagtccccgggactgcgagtcaggctgtgc
cagtagcccctgccagcacgggggcagctgccaccctcagcgccagcctccttattactcctgccagt
gtgccccaccattctcgggtagccgctgtgaactctacacggcacccccccagcacccctcctgccacc
tgtctgagccagtattgtgccgacaaagctcgggatggcgtctgtgatgaggcctgcaacagccatgc
ctgccagtgggatgggggtgactgttctctcaccatggagaaccccctgggccaactgctcctccccac
ttccctgctgggattatatcaacaaccagtgtgatgagctgtgcaacacggtcgagtgcctgtttgac
aactttgaatgccaggggaacagcaagacatgcaagtatgacaaatactgtgcagaccacttcaaaga
caaccactgtgaccaggggtgcaacagtgaggagtgtggttgggatgggctggactgtgctgctgacc
aacctgagaacctggcagaaggtaccctggttattgtggtattgatgccacctgaacaactgctccag
gatgctcgcagcttcttgcgggcactgggtaccctgctccacaccaacctgcgcattaagcgggactc
ccaggggggaactcatggtgtacccctattatggtgagaagtcagctgctatgaagaaacagaggatga
cacgcagatcccttcctggtgaacaagaacaggaggtggctggctctaaagtctttctggaaattgac
aaccgccagtgtgttcaagactcagaccactgcttcaagaacacggatgcagcagcagctctcctggc
ctctcacgccatacaggggaccctgtcataccctcttgtgtctgtcgtcagtgaatccctgactccag
aacgcactcagctcctctatctccttgctgttgctgttgtcatcattctgtttattattctgctgggg

gtaatcatggcaaaacgaaagcgtaagcatggctctctctggctgcctgaaggtttcactcttcgccg
agatgcaagcaatcacaagcgtcgtgagccagtgggacaggatgctgtggggctgaaaaatctctcag
tgcaagtctcagaagctaacctaattggtactggaacaagtgaacactgggtcgatgatgaagggccc
cagccaaagaaagtaaaggctgaagatgaggccttactctcagaagaagatgaccccattgatcgacg
gccatggacacagcagcaccttgaagctgcagacatccgtaggacaccatcgctggctctcacccctc
ctcaggcagagcaggaggtggatgtgttagatgtgaatgtccgtggcccagatggctgcaccccattg
atgttggcttctctccgaggaggcagctcagatttgagtgatgaagatgaagatgcagaggactcttc
tgctaacatcatcacagacttggtctaccagggtgccagcctccaggcccagacagaccggactggtg
agatggccctgcaccttgcagcccgctactcacgggctgatgctgccaagcgtctcctggatgcaggt
gcagatgccaatgcccaggacaacatgggccgctgtccactccatgctgcagtggcagctgatgccca
aggtgtcttccagattctgattcgcaaccgagtaactgatctagatgccaggatgaatgatggtacta
caccccctgatcctggctgcccgcctggctgtggagggaatggtggcagaactgatcaactgccaagcg
gatgtgaatgcagtggatgaccatggaaaatctgctcttcactgggcagctgctgtcaataatgtgga
ggcaactcttttgttgttgaaaaatggggccaaccgagacatgcaggacaacaaggaagagacacctc
tgtttcttgctgcccgggaggggagctatgaagcagccaagatcctgttagaccattttgccaatcga
gacatcacagaccatatggatcgtcttccccgggatgtggctcgggatcacatgcaccatgacattgt
gcgccttctggatgaatacaatgtgaccccaagccctccaggcaccgtgttgacttctgctctctcac
ctgtcatctgtgggcccaacagatctttcctcagcctgaagcacaccccaatgggcaagaagtctaga
cggcccagtgccaagagtaccatgcctactagcctccctaaccttgccaaggaggcaaaggatgccaa
gggtagtaggaggaagaagtctctgagtgagaaggtccaactgtctgagagttcagtaactttatccc
ctgttgattccctagaatctcctcacacgtatgtttccgacaccacatcctctccaatgattacatcc
cctgggatcttacaggcctcacccaaccctatgttggccactgccgcccctcctgccccagtccatgc
ccagcatgcactatctttttctaaccttcatgaaatgcagcctttggcacatggggccagcactgtgc
ttccctcagtgagccagttgctatcccaccaccacattgtgtctccaggcagtggcagtgctggaagc
ttgagtaggctccatccagtcccagtcccagcagattggatgaaccgcatggaggtgaatgagaccca
gtacaatgagatgtttggtatggtcctggctccagctgagggcacccatcctggcatagctccccaga
gcaggccacctgaagggaagcacataaccacccctcgggagcccttgccccccattgtgactttccag
ctcatccctaaaggcagtattgcccaaccagcgggggctccccagcctcagtccacctgccctccagc
tgttgcgggccccctgcccaccatgtaccagattccagaaatggcccgtttgcccagtgtggctttcc
ccactgccatgatgccccagcaggacgggcaggtagctcagaccattctcccagcctatcatcctttc
ccagcctctgtgggcaagtaccccacacccccttcacagcacagttatgcttcctcaaatgctgctga
gcgaacacccagtcacagtggtcacctccagggtgagcatccctacctgacaccatccccagagtctc
ctgaccagtggtcaagttcatcaccccactctgcttctgactggtcagatgtgaccaccagccctacc
cctgggggtgctggaggaggtcagcggggacctgggacacacatgtctgagccaccacacaacaacat
gcaggtttatgcgtgagagagtccacctccagtgtagagacataactgacttttgtaaatgctgctga
ggaacaaatgaaggtcatccgggagagaaatgaagaaatctctggagccagcttctagaggtaggaaa
gagaagatgttcttattcagataatgcaagagaagcaattcgtcagtttcactgggtatctgcaaggc
ttattgattattctaatctaataagacaagtttgtggaaatgcaagatgaatacaagccttgggtcca
tgtttactctcttctatttggagaataagatggatgcttattgaagcccagacattcttgcagcttgg
actgcattttaagccctgcaggcttctgccatatccatgagaagattctacactagcgtcctgttggg
aattatgccctggaattctgcctgaattgacctacgcatctcctcctccttggacattcttttgtctt
catttggtgcttttggttttgcacctctccgtgattgtagccctaccagcatgttatagggcaagacc
tttgtgcttttgatcattctggcccatgaaagcaactttggtctcctttcccctcctgtcttcccggt
atcccttggagtctcacaaggtttactttggtatggttctcagcacaaacctttcaagtatgttgttt
ctttggaaaatggacatactgtattgtgttctcctgcatatatcattcctggagagagaaggggagaa
gaatacttttcttcaacaaattttgggggcaggagatcccttcaagaggctgcaccttaatttttctt
gtctgtgtgcaggtcttcatataaactttaccaggaagaagggtgtgagtttgttgtttttctgtgta
tgggcctggtcagtgtaaagttttatccttgatagtctagttactatgaccctccccacttttttaaa
accagaaaaaggtttggaatgttggaatgaccaagagacaagttaactcgtgcaagagccagttaccc
acccacaggtccccctacttcctgccaagcattccattgactgcctgtatggaacacatttgtcccag
atctgagcattctaggcctgtttcactcactcacccagcatatgaaactagtcttaactgttgagcct
ttcctttcatatccacagaagacactgtctcaaatgttgtaccttgccatttaggactgaactttcc
ttagcccaagggacccagtgacagttgtcttccgtttgtcagatgatcagtctctactgattatcttg
ctgcttaaaggcctgctcaccaatctttctttcacaccgtgtggtccgtgttactggtatacccagta
tgttctcactgaagacatggactttatatgttcaagtgcaggaattggaaagttggacttgttttcta

tgatccaaaacagccctataagaaggttggaaaaggaggaactatatagcagcctttgctattttctg
ctaccatttcttttcctctgaagcggccatgacattccctttggcaactaacgtagaaactcaacaga
acatttttcctttcctagagtcacctttttagatgataatggacaactatagacttgctcattgttcaga
ctgattgcccctcacctgaatccactctctgtattcatgctcttggcaatttctttgactttctttta
agggcagaagcattttagttaattgtagataaagaatagttttcttcctcttctccttgggccagtta
ataattggtccatggctacactgcaacttccgtccagtgctgtgatgcccatgacacctgcaaaataa
gttctgcctgggcattttgtagatattaacaggtgaattcccgactcttttggtttgaatgacagttc
tcattccttctatggctgcaagtatgcatcagtgcttcccacttacctgatttgtctgtcggtggccc
catatggaaaccctgcgtgtctgttggcataatagtttacaaatggtttttcagtcctatccaaatt
tattgaaccaacaaaaataattacttctgccctgagataagcagattaagtttgttcattctctgctt
tattctctccatgtggcaacattctgtcagcctctttcatagtgtgcaaacattttatcattctaaat
ggtgactctctgcccttggacccatttattattcacagatggggagaacctatctgcatggacctctg
tggaccacagcgtacctgccccctttctgccctcctgctccagccccacttctgaaagtatcagctact
gatccagccactggatattttatatcctccctttttccttaagcacaatgtcagaccaaattgcttgtt
tctttttcttggactactttaatttggatcctttgggtttggagaaagggaatgtgaaagctgtcatt
acagacaacaggtttcagtgatgaggaggacaacactgcctttcaaacttttttactgatctcttagat
tttaagaactcttgaattgtgtggtatctaataaaagggaaggtaagatggataatcactttctcatt
tgggttctgaattggagactcagtttttatgagacacatcttttatgccatgtatagatcctcccctg
ctatttttggtttatttttattgttataaatgctttctttctttgactcctcttctgcctgcctttgg
ggataggttttttgtttgtttatttgcttcctctgttttgttttaagcatcattttcttatgtgagg
tggggaagggaaaggtatgagggaaagagagtctgagaattaaaatattttagtataagcaattggct
gtgatgctcaaatccattgcatcctcttattgaatttgccaatttgtaatttttgcataataaagaac
caaaggtgtaatgttttgttgagaggtggtttagggattttggccctaaccaatacattgaatgtatg
atgactatttgggaggacacatttatgtacccagaggccccctactaataagtggtactatggttactt
ccttgtgtacatttctcttaaaagtgatattatatctgtttgtatgagaaacccagtaaccaataaaa
tgaccgcatattcctgactaaacgtagtaaggaaaatgcacactttgtttttacttttccgtttcatt
ctaaaggtagttaagatgaaatttatatgaaagcatttttatcacaaaataaaaaaggtttgccaagc
tcagtggtgttgtatttttttattttccaatactgcatccatggcctggcagtgttacctcatgatgtc
ataatttgctgagagagcaaatttttcttttctttctgaatcccacaaagcctagcaccaaacttcttt
ttttcttcctttaattagatcataaataaatgatcctggggaaaaagcatctgtcaaataggaaacat
cacaaaactgagcactcttctgtgcactagccatagctggtgacaaacagatggttgctcagggacaa
ggtgccttccaatggaaatgcgaagtagttgctatagcaagaattgggaactgggatataagtcataa
tattaattatgctgttatgtaaatgattggtttgtaacattccttaagtgaaatttgtgtagaactta
atatacaggattataaaataatattttgtgtataaatttgttataagttcacattcatacatttattt
ataaagtcagtgagatatttgaacatgaaaaaaaaaa

SEQ ID NO:3

ヒトNOTCH3遺伝子(野生型)

gcggcgcggaggctggcccgggacgcgcccggagcccagggaaggagggaggaggggagggtcgcggc
cggccgccatggggccgggggcccgtggccgccgccgccgccgtcgcccgatgtcgccgccaccgcca
ccgccacccgtgcgggcgctgcccctgctgctgctgctagcggggccgggggctgcagccccccttg
cctggacggaagcccgtgtgcaaatggaggtcgttgcacccagctgccctcccgggaggctgcctgcc
tgtgcccgcctggctgggtgggtgagcggtgtcagctggaggacccctgtcactcaggcccctgtgct
ggccgtggtgtctgccagagttcagtggtggctggcaccgcccgattctcatgccggtgcccccgtgg
cttccgaggccctgactgctccctgccagatccctgcctcagcagcccttgtgcccacggtgcccgct
gctcagtggggcccgatggacgcttcctctgctcctgcccacctggctaccagggccgcagctgccga
agcgacgtggatgagtgccgggtgggtgagccctgccgccatggtggcacctgcctcaacacacctgg
ctccttccgctgccagtgtccagctggctacacagggccactatgtgagaaccccgcggtgccctgtg
caccctcaccatgccgtaacgggggcacctgcaggcagagtggcgacctcacttacgactgtgcctgt
cttcctgggtttgagggtcagaattgtgaagtgaacgtggacgactgtccaggacaccgatgtctcaa
tgggggggacatgcgtggatggcgtcaacacctataactgccagtgccctcctgagtggacaggccagt
tctgcacggaggacgtggatgagtgtcagctgcagcccaacgcctgccacaatgggggtacctgcttc
aacacgctgggtggccacagctgcgtgtgtgtcaatggctggacaggcgagagctgcagtcagaatat

10

20

30

40

cgatgactgtgccacagccgtgtgcttccatggggccacctgccatgaccgcgtggcttctttctact
gtgcctgccccatgggcaagactggcctcctgtgtcacctggatgacgcctgtgtcagcaacccctgc
cacgaggatgctatctgtgacacaaatccggtgaacggccgggccatttgcacctgtcctcccggctt
cacgggtggggcatgtgaccaggatgtggacgagtgctctatcggcgccaacccctgcgagcacttgg
gcaggtgcgtgaacacgcagggctccttcctgtgccagtgcggtcgtggctacactggacctcgctgt
gagaccgatgtcaacgagtgtctgtcggggccctgccgaaaccaggccacgtgcctcgaccgcatagg
ccagttcacctgtatctgtatggcaggcttcacaggaacctattgcgaggtggacattgacgagtgtc
agagtagcccctgtgtcaacggtggggtctgcaaggaccgagtcaatggcttcagctgcacctgcccc
tcgggcttcagcggctccacgtgtcagctggacgtggacgaatgcgccagcacgccctgcaggaatgg
cgccaaatgcgtggaccagcccgatggctacgagtgccgctgtgccgagggctttgagggcacgctgt
gtgatcgcaacgtggacgactgctcccctgacccatgccaccatggtcgctgcgtggatggcatcgcc
agcttctcatgtgcctgtgctcctggctacacgggcacacgctgcgagagccaggtggacgaatgccg
cagccagccctgccgccatggcggcaaatgcctagacctggtggacaagtacctctgccgctgccctt
ctgggaccacaggtgtgaactgcgaagtgaacattgacgactgtgccagcaacccctgcacctttgga
gtctgccgtgatggcatcaaccgctacgactgtgtctgccaacctggcttcacagggccccttttgtaa
cgtggagatcaatgagtgtgcttccagcccatgcggcgagggaggttcctgtgtggatggggaaaatg
gcttccgctgcctctgcccgcctggctccttgcccccactctgcctccccccgagccatccctgtgcc
catgagccctgcagtcacggcatctgctatgatgcacctggcgggttccgctgtgtgtgtgagcctgg
ctggagtggcccccgctgcagccagagcctggcccgagacgcctgtgagtcccagccgtgcagggccg
gtgggacatgcagcagcgatggaatgggtttccactgcacctgcccgcctggtgtccagggacgtcag
tgtgaactcctctcccccctgcaccccgaacccctgtgagcatgggggccgctgcgagtctgcccctgg
ccagctgcctgtctgctcctgcccccagggctggcaaggcccacgatgccagcaggatgtggacgagt
gtgctggccccgcaccctgtggccctcatggtatctgcaccaacctggcagggagtttcagctgcacc
tgccatggagggtacactggcccttcctgcgatcaggacatcaatgactgtgaccccaacccatgcct
gaacggtggctcgtgccaagacggcgtgggctccttttcctgctcctgcctccctggtttcgccggcc
cacgatgcgcccgcgatgtggatgagtgcctgagcaacccctgcggcccgggcacctgtaccgaccac
gtggcctccttcacctgcacctgcccgccaggctacggaggcttccactgcgaacaggacctgcccga
ctgcagccccagctcctgcttcaatggcgggacctgtgtggacggcgtgaactcgttcagctgcctgt
gccgtcccggctacacaggagcccactgccaacatgaggcagacccctgcctctcgcggccctgccta
cacgggggcgtctgcagcgccgcccaccctggcttccgctgcacctgcctcgagagcttcacgggccc
gcagtgccagacgctggtggattggtgcagccgccagccttgtcaaaacgggggtcgctgcgtccaga
ctggggcctattgcctttgtccccctggatggagcggacgcctctgtgacatccgaagcttgccctgc
agggaggccgcagcccagatcggggtgcggctggagcagctgtgtcaggcgggtgggcagtgtgtgga
tgaagacagctcccactactgcgtgtgcccagagggccgtactggtagccactgtgagcaggaggtgg
acccctgcttggcccagccctgccagcatgggggggacctgccgtggctatatgggggctacatgtgt
gagtgtcttcctggctacaatggtgataactgtgaggacgacgtggacgagtgtgcctcccagccctg
ccagcacgggggttcatgcattgacctcgtggcccgctatctctgctcctgtcccccaggaacgctgg
gggtgctctgcgagattaatgaggatgactgcggcccaggcccaccgctggactcagggccccggtgc
ctacacaatggcacctgcgtggacctggtgggtggtttccgctgcacctgtcccccaggatacactgg
tttgcgctgcgaggcagacatcaatgagtgtcgctcaggtgcctgccacgcggcacacacccgggact
gcctgcaggacccaggcggaggtttccgttgcctttgtcatgctggcttctcaggtcctcgctgtcag
actgtcctgtctccctgcgagtcccagccatgccagcatggaggccagtgccgtcctagcccgggtcc
tgggggtgggctgaccttcacctgtcactgtgcccagccgttctggggtccgcgttgcgagcgggtgg
cgcgctcctgccgggagctgcagtgcccggtgggcgtcccatgccagcagacgccccgcgggccgcgc
tgcgcctgccccccagggttgtcgggaccctcctgccgcagcttcccggggtcgccgccgggggccag
caacgccagctgcgcggccgccccctgtctccacgggggctcctgccgccccgcgccgctcgcgccct
tcttccgctgcgcttgcgcgcagggctggaccgggccgcgctgcgaggcgcccgccgcggcacccgag
gtctcggaggagccgcggtgcccgcgcgccgcctgccaggccaagcgcggggaccagcgctgcgaccg
cgagtgcaacagcccaggctgcggctgggacggcggcgactgctcgctgagcgtgggcgacccctggc
ggcaatgcgaggcgctgcagtgctggcgcctcttcaacaacagccgctgcgaccccgcctgcagctcg
cccgcctgcctctacgacaacttcgactgccacgccggtggccgcgagcgcacttgcaacccggtgta
cgagaagtactgcgccgaccactttgccgacggccgctgcgaccagggctgcaacacggaggagtgcg
gctgggatgggctggattgtgccagcgaggtgccggccctgctggcccgcggcgtgctggtgctcaca
gtgctgctgccgccagaggagctactgcgttccagcgccgactttctgcagcggctcagcgccatcct
gcgcacctcgctgcgcttccgcctggacgcgcacggccaggccatggtcttcccttaccaccggccta

10 20 30 40

gtcctggctccgaaccccgggcccgtcgggagctggcccccgaggtgatcggctcggtagtaatgctg
gagattgacaaccggctctgcctgcagtcgcctgagaatgatcactgcttccccgatgcccagagcgc
cgctgactacctgggagcgttgtcagcggtggagcgcctggacttcccgtacccactgcgggacgtgc
gggggagccgctggagcctccagaacccagcgtcccgctgctgccactgctagtggcgggcgctgtc
ttgctgctggtcattctcgtcctgggtgtcatggtggcccggcgcaagcgcgagcacagcaccctctg
gttccctgagggcttctcactgcacaaggacgtggcctctggtcacaagggccggcgggaacccgtgg
gccaggacgcgctgggcatgaagaacatggccaagggtgagagcctgatgggggaggtggccacagac
tggatggacacagagtgcccagaggccaagcggctaaaggtagaggagccaggcatgggggctgagga
ggctgtggattgccgtcagtggactcaacaccatctggttgctgctgacatccgcgtggcaccagcca
tggcactgacaccaccacagggcgacgcagatgctgatggcatggatgtcaatgtgcgtggcccagat
ggcttcaccccgctaatgctggcttccttctgtgggggggctctggagccaatgccaactgaagagga
tgaggcagatgacacatcagctagcatcatctccgacctgatctgccaggggggctcagcttggggcac
ggactgaccgtactggcgagactgctttgcacctggctgcccgttatgcccgtgctgatgcagccaag
cggctgctggatgctggggcagacaccaatgcccaggaccactcaggccgcactcccctgcacacagc
tgtcacagccgatgcccagggtgtcttccagattctcatccgaaaccgctctacagacttggatgccc
gcatggcagatggctcaacggcactgatcctggcggcccgcctggcagtagagggcatggtggaagag
ctcatcgccagccatgctgatgtcaatgctgtggatgagcttgggaaatcagccttacactgggctgc
ggctgtgaacaacgtggaagccactttggccctgctcaaaaatggagccaataaggacatgcaggata
gcaaggaggagacccccctattcctggccgcccgcgagggcagctatgaggctgccaagctgctgttg
gaccactttgccaaccgtgagatcaccgaccacctggacaggctgccgcgggacgtagcccaggagag
actgcaccaggacatcgtgcgcttgctggatcaacccagtgggccccgcagccccccccggtccccacg
gcctggggcctctgctctgtcctccaggggccttcctccctggcctcaaagcggcacagtcggggtcc
aagaagagcaggaggcccccccgggaaggcggggctggggccgcaggggccccgggggcggggcaagaa
gctgacgctggcctgcccgggcccccctggctgacagctcggtcacgctgtcgcccgtggactcgctgg
actccccgcggcctttcggtgggcccccctgcttcccctggtggcttcccccttgaggggccctatgca
gctgccactgccactgcagtgtctctggcacagcttggtggcccaggccgggcgggtctagggcgcca
gccccctggaggatgtgtactcagcctgggcctgctgaaccctgtggctgtgcccctcgattgggccc
ggctgcccccacctgcccctccaggcccctcgttcctgctgccactggcgccgggaccccagctgctc
aacccagggacccccgtctccccgcaggagcggcccccgccttacctggcagtcccaggacatggcga
ggagtacccggcggctggggcacacagcagcccccaaaggcccgcttcctgcgggttcccagtgagc
acccttacctgaccccatcccccgaatcccctgagcactgggccagcccctcacctccctcctctca
gactggtccgaatccacgcctagcccagccactgccactggggccatggccaccaccactggggcact
gcctgcccagccacttcccttgtctgttcccagctcccttgctcaggcccagacccagctggggcccc
agccggaagttacccccaagaggcaagtgttggcctgagacgctcgtcagttcttagatcttgggggc
ctaaagagacccccgtcctgcctcctttctttctctgtctcttccttcctttagtctttttcatcct
cttctctttccaccaaccctcctgcatccttgccttgcagcgtgaccgagataggtcatcagcccagg
gcttcagtcttcctttatttataatgggtgggggctaccacccaccctctcagtcttgtgaagagtct
gggacctccttcttccccacttctctcttccctcattcctttctctctccttctggcctctcatttcc
ttacactctgacatgaatgaattattattatttttatttttctttttttttttacattttgtatagaa
acaaattcatttaaacaaacttattattattatttttttacaaaatatatatatggagatgctccctcc
ccctgtgaaccccccagtgcccccgtggggctgagtctgtgggcccattcggccaagctggattctgt
gtacctagtacacaggcatgactgggatcccgtgtaccgagtacacgacccaggtatgtaccaagtag
gcacccttgggcgcacccactggggccaggggtcgggggagtgttgggagcctcctccccaccccacc
tccctcacttcactgcattccagatgggacatgttccatagccttgctggggaagggcccactgccaa
ctccctctgccccagccccacccttggccatctccctttgggaactagggggctgctggtgggaaatg
ggagccagggcagatgtatgcattcctttgtgtccctgtaaatgtgggactacaagaagaggagctgc
ctgagtggtactttctcttcctggtaatcctctggcccagcctcatggcagaatagaggtatttttag
gctatttttgtaatatggcttctggtcaaaatccctgtgtagctgaattcccaagccctgcattgtac
agccccccactcccctcaccacctaataaaggaatagttaacactcaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

SEQ ID NO:4

ヒトNOTCH4遺伝子(野生型)

agacgtgaggcttgcagcaggccgaggaggaagaagaggggcagtgggagcagaggaggtggctcctg
ccccagtgagagctctgagggtccctgcctgaagagggacagggaccggggcttggagaaggggctgt
ggaatgcagccccccttcactgctgctgctgctgctgctgctgctgctatgtgtctcagtggtcag

acccagagggctgctgtgtgggagtttcccagaaccctgtgccaatggaggcacctgcctgagcctgt
ctctgggacaagggacctgccagtgtgcccctggcttcctgggtgagacgtgccagtttcctgacccc
tgccagaacgcccagctctgccaaaatggaggcagctgccaagccctgcttcccgctcccctagggct
ccccagctctccctctccattgacacccagcttcttgtgcacttgcctccctggcttcactggtgaga
gatgccaggccaagcttgaagacccttgtcctccctccttctgttccaaaaggggccgctgccacatc
caggcctcgggccgcccacagtgctcctgcatgcctggatggacaggtgagcagtgccagcttcggga
cttctgttcagccaacccatgtgttaatggaggggtgtgtctggccacatacccccagatccagtgcc
actgcccaccgggcttcgagggccatgcctgtgaacgtgatgtcaacgagtgcttccaggacccagga
ccctgccccaaaggcacctcctgccataacaccctgggctccttccagtgcctctgccctgtggggca
ggagggtccacgttgtgagctgcgggcaggaccctgccctcctaggggctgttcgaatgggggcacct
gccagctgatgccagagaaagactccacctttcacctctgcctctgtcccccaggtttcataggccca
gactgtgaggtgaatccagacaactgtgtcagccaccagtgtcagaatgggggcacttgccaggatgg
gctggacacctacacctgcctctgcccagaaacctggacaggctgggactgctccgaagatgtggatg
agtgtgagacccagggtccccctcactgcagaaacgggggcacctgccagaactctgctggtagcttt
cactgcgtgtgtgtgagtggctggggcggcacaagctgtgaggagaacctggatgactgtattgctgc
cacctgtgccccgggatccacctgcattgaccgggtgggctctttctcctgcctctgcccacctggac
gcacaggactcctgtgccacttggaagacatgtgtctgagccagccgtgccatggggatgcccaatgc
agcaccaaccccctcacaggctccacactctgcctgtgtcagcctggctattcggggcccacctgcca
ccaggacctggacgagtgtctgatggcccagcaaggcccaagtccctgtgaacatggcggttcctgcc
tcaacactcctggctccttcaactgcctctgtccacctggctacacaggctcccgttgtgaggctgat
cacaatgagtgcctctcccagccctgccacccaggaagcacctgtctggacctacttgccaccttcca
ctgcctctgcccgccaggcttagaagggcagctctgtgaggtggagaccaacgagtgtgcctcagctc
cctgcctgaaccacgcggattgccatgacctgctcaacggcttccagtgcatctgcctgcctggattc
tccggcacccgatgtgaggaggatatcgatgagtgcagaagctctccctgtgccaatggtgggcagtg
ccaggaccagcctggagccttccactgcaagtgtctcccaggctttgaagggccacgctgtcaaacag
aggtggatgagtgcctgagtgacccatgtcccgttggagccagctgccttgatcttccaggagccttc
ttttgcctctgcccctctggtttcacaggccagctctgtgaggttcccctgtgtgctcccaacctgtg
ccagcccaagcagatatgtaaggaccagaaagacaaggccaactgcctctgtcctgatggaagccctg
gctgtgccccacctgaggacaactgcacctgccaccacgggcactgccagagatcctcatgtgtgtgt
gacgtgggttggacggggccagagtgtgaggcagagctaggggctgcatctctgcaccctgtgccca
tgggggacctgctacccccagccctctggctacaactgcacctgccctacaggctacacaggaccca
cctgtagtgaggagatgacagcttgtcactcagggccatgtctcaatggcggctcctgcaaccctagc
cctggaggctactactgcacctgccctccaagccacacagggccccagtgccaaaccagcactgacta
ctgtgtgtctgccccgtgcttcaatggggtacctgtgtgaacaggcctggcaccttctcctgcctct
gtgccatgggcttccagggcccgcgctgtgagggaaagctccgccccagctgtgcagacagcccctgt
aggaatagggcaacctgccaggacagccctcagggtccccgctgcctctgccccactggctacaccgg
aggcagctgccagactctgatggacttatgtgcccagaagccctgcccacgcaattcccactgcctcc
agactgggccctccttccactgcttgtgcctccagggatggaccgggcctctctgcaaccttccactg
tcctcctgccagaaggctgcactgagccaaggcatagacgtctcttccctttgccacaatggaggcct
ctgtgtcgacagcggcccctcctatttctgccactgccccccctggattccaaggcagcctgtgccagg
atcacgtgaacccatgtgagtccaggccttgccagaacggggccacctgcatggcccagcccagtggg
tatctctgccagtgtgccccaggctacgatggacagaactgctcaaaggaactcgatgcttgtcagtc
ccaaccctgtcacaaccatggaacctgtactcccaaacctggaggattccactgtgcctgccctccag
gctttgtggggctacgctgtgagggagacgtggacgagtgtctggaccagccctgccaccccacaggc
actgcagcctgccactctctggccaatgccttctactgccagtgtctgcctggacacacaggccagtg
gtgtgaggtggagatagacccctgccacagccaaccctgctttcatggagggacctgtgaggccacag
caggatcacccctgggtttcatctgccactgccccaagggttttgaaggccccacctgcagccacagg
gccccttcctgcggcttccatcactgccaccacggaggcctgtgtctgccctcccctaagccaggctt
cccaccacgctgtgcctgcctcagtggctatgggggtcctgactgcctgaccccaccagctcctaaag
gctgtggccctccctccccatgcctatacaatggcagctgctcagagaccacgggcttgggggggccca
ggctttcgatgctcctgccctcacagctctccagggccccggtgtcagaaacccggagccaaggggtg
tgagggcagaagtggagatggggcctgcgatgctggctgcagtggcccgggaggaaactgggatggag
gggactgctctctgggagtcccagacccctggaagggctgcccctcccactctcggtgctggcttctc
ttccgggacgggcagtgccacccacagtgtgactctgaagagtgtctgtttgatggctacgactgtga
gacccctccagcctgcactccagcctatgaccagtactgccatgatcacttccacaacgggcactgtg

agaaaggctgcaacactgcagagtgtggctgggatggaggtgactgcaggcctgaagatggggaccca
gagtgggggccctccctggccctgctggtggtactgagcccccagccctagaccagcagctgtttgc
cctggcccgggtgctgtccctgactctgagggtaggactctgggtaaggaaggatcgtgatggcaggg
acatggtgtacccctatcctggggcccgggctgaagaaaagctaggaggaactcgggaccccacctat
caggagagagcagcccctcaaacgcagcccctgggcaaggagaccgactccctcagtgctgggtttgt
ggtggtcatgggtgtggatttgtcccgctgtggccctgaccacccggcatcccgctgtccctgggacc
ctgggcttctactccgcttccttgctgcgatggctgcagtgggagccctggagcccctgctgcctgga
ccactgctggctgtccaccctcatgcagggaccgcacccccctgccaaccagcttccctggcctgtgct
gtgctccccagtggccggggtgattctcctggccctaggggctctttctcgtcctccagctcatccggc
gtcgacgccgagagcatggagctctctggctgccccctggtttcactcgacggcctcggactcagtca
gctccccaccgacgccggcccccactaggcgaggacagcattggtctcaaggcactgaagccaaaggc
agaagttgatgaggatggagttgtgatgtgctcaggccctgaggagggagaggaggtgggccaggctg
aagaaacaggcccaccctccacgtgccagctctggtctctgagtggtggctgtggggcgctccctcag
gcagccatgctaactcctccccaggaatctgagatggaagcccctgacctggacacccgtggacctga
tggggtgacacccctgatgtcagcagtttgctgtggggaagtacagtccgggaccttccaaggggcat
ggttgggatgtcctgagccctgggaacctctgctggatggaggggcctgtccccaggctcacaccgtg
ggcactggggagacccccctgcacctggctgcccgattctcccggccaaccgctgcccgccgcctcct
tgaggctggagccaaccccaaccagccagaccgggcagggcgcacacccccttcatgctgctgtggctg
ctgatgctcgggaggtctgccagcttctgctccgtagcagacaaactgcagtggacgctcgcacagag
gacgggaccacacccttgatgctggctgccaggctggcggtggaagacctggttgaagaactgattgc
agcccaagcagacgtgggggccagagataaatgggggaaaactgcgctgcactgggctgctgccgtga
acaacgcccgagccgcccgctcgcttctccaggccggagccgataaagatgcccaggacaacagggag
cagacgccgctattcctggcggcgcgggaaggagcggtggaagtagcccagctactgctggggctggg
ggcagcccgagagctgcgggaccaggctgggctagcgccggcggacgtcgctcaccaacgtaaccact
gggatctgctgacgctgctggaaggggctgggccaccagaggcccgtcacaaagccacgccgggccgc
gaggctgggcccttcccgcgcgcacggacggtgtcagtaagcgtgcccccgcatgggggcggggctct
gccgcgctgccggacgctgtcagccggagcaggccctcgtgggggcggagcttgtctgcaggctcgga
cttggtccgtagacttggctgcgcgggggggcggggcctattctcattgccggagcctctcgggagta
ggagcaggaggaggcccgacccctcgcggccgtaggttttctgcaggcatgcgcgggcctcggcccaa
ccctgcgataatgcgaggaagatacggagtggctgccgggcgcggaggcagggtctcaacggatgact
ggccctgtgattgggtggccctgggagcttgcggttctgcctccaacattccgatcccgcctccttgc
cttactccgtccccggagcggggatcacctcaacttgactgtggtcccccagccctccaagaaatgcc
cataaaccaaggaggagagggtaaaaaatagaagaatacatggtagggaggaattccaaaaatgatta
cccattaaaaggcaggctggaaggccttcctggttttaagatggatcccccaaaatgaagggttgtga
gtttagtttctctcctaaaatgaatgtatgcccaccagagcagacatcttccacgtggagaagctgca
gctctggaaagagggtttaagatgctaggatgaggcaggcccagtcctcctccagaaaataagacagg
ccacaggagggcagagtggagtggaaataccctaagttggaaccaagaattgcaggcatatgggatg
taagatgttctttcctatatatggtttccaaagggtgcccctatgatccattgtccccactgcccaca
aatggctgacaaatatttattgggcacctactatgtgccaggcactgtgtaggtgctgaaaagtggcc
aagggccacccccgctgatgactccttgcattccctcccctcacaacaaagaactccactgtggggat
gaagcgcttcttctagccactgctatcgctatttaagaaccctaaatctgtcacccataataaagctg
atttgaagtgttaaaaaaaaaaaaaaaaa

SEQ ID NO:5

52M51重鎖CDR1

RGYWIE

SEQ ID NO:6

52M51重鎖CDR2

QILPGTGRTNYNEKFKG

SEQ ID NO:7

52M51重鎖CDR3

FDGNYGYYAMDY

SEQ ID NO:8

52M51軽鎖CDR1

RSSTGAVTTSNYAN

SEQ ID NO:9

52M51軽鎖CDR2

GTNNRAP

SEQ ID NO:10

52M51軽鎖CDR3

ALWYSNHWVFGGGTKL

ヒト化52M51配列:

SEQ ID NO:11

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

ATGGATTGGACATGGAGGGTGTTCTGCCTCCTCGCTGTGGCTCCTGGAGTCCTGAGCCAG
GTCCAGCTCGTCCAGAGCGGGGCTGAAGTCAAGAAGCCTGGCGCTAGCGTCAAAATCAGC
TGTAAGGTCAGCGGATACACACTGAGGGGATACTGGATCGAGTGGGTGAGGCAGGCTCCA
GGAAAGGGCCTGGAATGGATCGGCCAGATCCTGCCTGGAACCGGAAGGACAAATTACAAT
GAGAAGTTTAAGGGAAGGGTCACAATGACAGCAGACACAAGCACAGACACAGCTTATATG
GAACTCAGCTCCCTCAGATCCGAGGACACCGCTGTCTACTATTGTGCCAGGTTCGATGGA
AATTACGGATACTATGCCATGGATTACTGGGGACAGGGGACAACGGTCACCGTGAGCTCA
GCCAGCACAAAGGGCCCTAGCGTCTTCCCTCTGGCTCCCTGCAGCAGGAGCACCAGCGAG
AGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCG
TGGAACTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCAGCTGTCCTACAGTCCTCA
GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACC
TACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGC
AAATGTTGTGTCGAGTGCCCACCGTGCCCAGCACCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTC
CTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGC
GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC
GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGT
GTGGTCAGCGTCCTCACCGTTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGC
AAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGG
CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAAC
CAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG
GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGAC
GGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC
GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTC
TCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

SEQ ID NO:12

52M51 H4重鎖アミノ酸配列(推定上のシグナル配列に下線を引いた)

MDWTWRVFCLLAVAPGVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKVSGYTLRGYWIEWVRQAP
GKGLEWIGQILPGTGRTNYNEKFKGRVTMTADTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCARFDG
NYGYYAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVER
KCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKG
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:13

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

MDWTWRVFCLLAVAPGVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKVSGYTLRGYWIEWVRQAP
GKGLEWIGQILPGTGRTNYNEKFKGRVTMTADTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCARFDG
NYGYYAMDYWGQGTTVTVSSA

SEQ ID NO:14

推定上のシグナル配列を有しない52M51-H4重鎖可変領域アミノ酸配列

QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKVSGYTLRGYWIEWVRQAPGKGLEWIGQILPGTGRTNY
NEKFKGRVTMTADTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCARFDGNYGYYAMDYWGQGTTVTVS
SA

SEQ ID NO:15

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

ATGAGCGTCCCTACAATGGCTTGGATGATGCTCCTGCTGGGACTCCTGGCTTATGGAAGC
GGAGTGGATAGCCAGGCCGTCGTCACACAGGAACCTAGCCTCACCGTTAGCCCTGGAGGA
ACAGTCACACTGACCTGTAGGAGCTCCACAGGAGCTGTGACAACAAGCAATTACGCTAAC
TGGTTCCAGCAGAAGCCCGGTCAAGCCCCTAGAACCCTCATCGGCGGCACCAATAACAGA
GCTCCCGGAGTCCCCGCCAGGTTCTCCGGCTCCCTCCTGGGTGGCAAGGCTGCTCTGACA
CTCAGCGGTGCCCAGCCAGAGGATGAAGCGGAGTACTACTGTGCACTGTGGTACAGCAAC
CATTGGGTTTTCGGAGGCGGAACAAAGTTAACCGTCCTCGGGCAGCCTAAGGCTGCTCCT
AGCGTCACACTGTTCCCCCCATCTAGCGAGGAGCTGCAGGCTAACAAGGCAACCCTCGTC
TGCCTGGTTAGCGACTTCTACCCTGGCGCTGTCACAGTGGCCTGGAAAGCTGACGGCTCC
CCTGTGAAAGTTGGCGTCGAAACCACAAAGCCTTCTAAGCAGAGCAATAATAAATATGCC
GCAAGCTCCTACCTCTCCCTGACTCCTGAGCAGTGGAAAAGCCATAGGAGCTACTCCTGC
CGGGTCACACACGAAGGAAGCACAGTGGAAAAGACAGTCGCCCCTGCTGAGTGTAGCTGA

SEQ ID NO:16
52M51-L3軽鎖アミノ酸配列(推定上のシグナル配列に下線を引いた)
MSVPTMAWMMLLLGLLAYGSGVDSQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYAN
WFQQKPGQAPRTLIGGTNNRAPGVPARFSGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSN
HWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLVSDFYPGAVTVAWKADGS
PVKVGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCRVTHEGSTVEKTVAPAECS

SEQ ID NO:17
52M51-L3軽鎖可変領域アミノ酸配列(推定上のシグナル配列に下線を引いた)
MSVPTMAWMMLLLGLLAYGSGVDSQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYAN
WFQQKPGQAPRTLIGGTNNRAPGVPARFSGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSN
HWVFGGGTKLTVLG

SEQ ID NO:18
推定上のシグナル配列を有しない52M51-L3軽鎖可変領域アミノ酸配列
SGVDSQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWFQQKPGQAPRTLIGGTNN
RAPGVPARFSGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVLG

SEQ ID NO:19
52M51-L4軽鎖ポリヌクレオチド配列(推定上のシグナル配列に下線を引いた)
ATGAGCGTCCCTACAATGGCTTGGATGATGCTCCTGCTGGGACTCCTGGCTTATGGAAGC
GGAGTGGATAGCCAGACCGTCGTCACACAGGAACCTAGCTTTTCCGTTAGCCCTGGAGGA
ACAGTCACACTGACCTGTAGGAGCTCCACAGGAGCTGTGACAACAAGCAATTACGCTAAC
TGGTATCAGCAGACTCCCGGTCAAGCCCCTAGAACCCTCATCGGCGGCACCAATAACAGA
GCTCCCGGAGTCCCCGACAGGTTCTCCGGCTCCATCCTGGGAAATAAAGCTGCTCTGACA
ATCACAGGTGCCCAGGCTGACGATGAAAGCGACTACTACTGTGCACTGTGGTACAGCAAC
CATTGGGTTTTCGGAGGCGGAACAAAGTTAACCGTCCTCGGGCAGCCTAAGGCTGCTCCT
AGCGTCACACTGTTCCCCCCATCTAGCGAGGAGCTGCAGGCTAACAAGGCAACCCTCGTC
TGCCTGGTTAGCGACTTCTACCCTGGCGCTGTCACAGTGGCCTGGAAAGCTGACGGCTCC
CCTGTGAAAGTTGGCGTCGAAACCACAAAGCCTTCTAAGCAGAGCAATAATAAATATGCC
GCAAGCTCCTACCTCTCCCTGACTCCTGAGCAGTGGAAAAGCCATAGGAGCTACTCCTGC
CGGGTCACACACGAAGGAAGCACAGTGGAAAAGACAGTCGCCCCTGCTGAGTGTAGCTGA

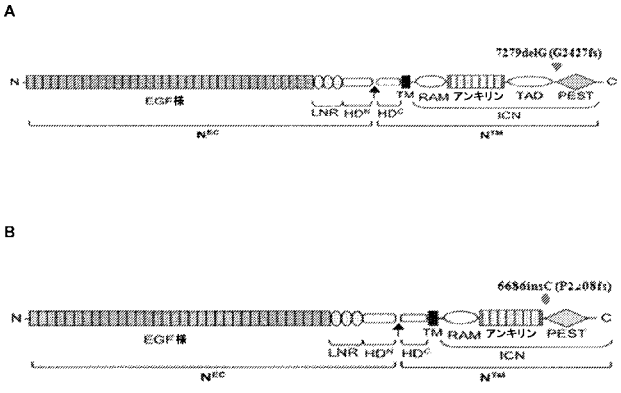
SEQ ID NO:20
52M51-L4軽鎖アミノ酸配列(推定上のシグナル配列に下線を引いた)
MSVPTMAWMMLLLGLLAYGSGVDSQTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYAN
WYQQTPGQAPRTLIGGTNNRAPGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDESDYYCALWYSN
HWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLVSDFYPGAVTVAWKADGS
PVKVGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCRVTHEGSTVEKTVAPAECS

SEQ ID NO:21
52M51-L4軽鎖可変領域アミノ酸配列(推定上のシグナル配列に下線を引いた)
MSVPTMAWMMLLLGLLAYGSGVDSQTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYAN
WYQQTPGQAPRTLIGGTNNRAPGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDESDYYCALWYSN
HWVFGGGTKLTVLG

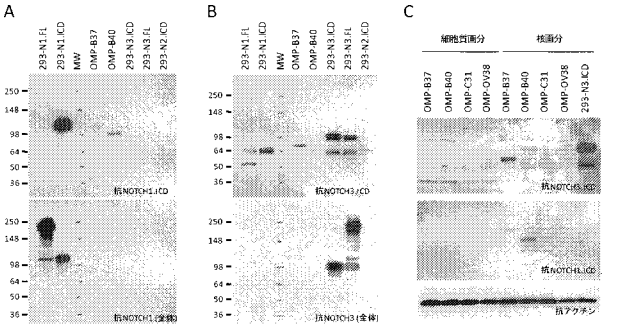
SEQ ID NO:22
推定上のシグナル配列を有しない52M51-L4軽鎖可変領域アミノ酸配列
SGVDSQTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWYQQTPGQAPRTLIGGTNN
RAPGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDESDYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVLG
SEQ ID NO:23
59R5重鎖CDR1
SSSGMS
SEQ ID NO:24
59R5重鎖CDR2
VIASSGSNTYYADSVKG
SEQ ID NO:25
59R5重鎖CDR3
SIFYTT
SEQ ID NO:26
59R5軽鎖CDR1
RASQSVRSNYLA
SEQ ID NO:27
59R5軽鎖CDR2
GASSRAT
SEQ ID NO:28
59R5軽鎖CDR3
QQYSNFPI
SEQ ID NO:29
59R5重鎖
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYY
ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSIFYTTWGQGTLVTVSSASTKG
PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPK
PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVL
TVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO:30
59R5重鎖可変領域
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYY
ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSIFYTTWGQGTLVTVSSAST
SEQ ID NO:31
抗NOTCH2/3 59R5軽鎖の予測されるタンパク質配列とシグナル配列。シグナル配列に下線を引いた。
MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSNYLAWYQQKPGQAPRLL
IYGASSRATGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQYSNFPITFGQGTKVEIKRTVAAPSV
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK
ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO:32
59R5 IgG抗体の59R1軽鎖VL
DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSNYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGVPARFSGSGS
GTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQYSNFPITFGQGTKVEIKR
SEQ ID NO:33
最小のNOTCH1受容体PESTドメイン
FLTPSPESP
SEQ ID NO:34

最小のNOTCH2/3受容体PESTドメイン
YLTPSPESP
SEQ ID NO:35
最小のNOTCH4受容体PESTドメイン
LTPSPE
SEQ ID NO:36
NOTCH1 ICDペプチド
VLLSRKRRRQHGQLW
SEQ ID NO:37
NOTCH3 ICDペプチド
VMVARRKREHSTLW

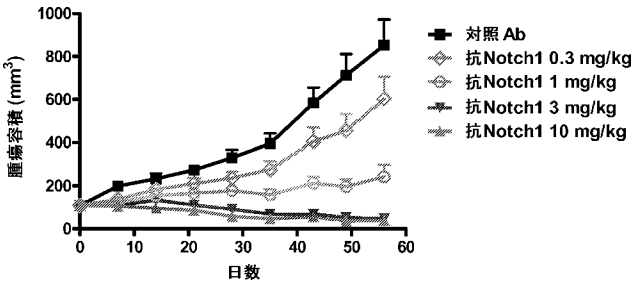
【図１】



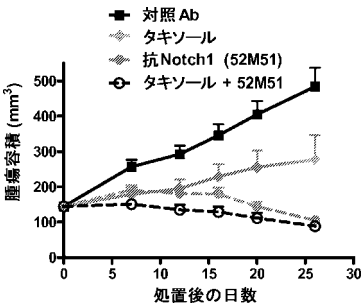
【図２】



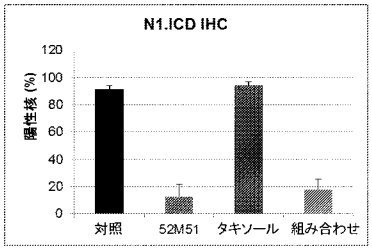
【図３Ａ】



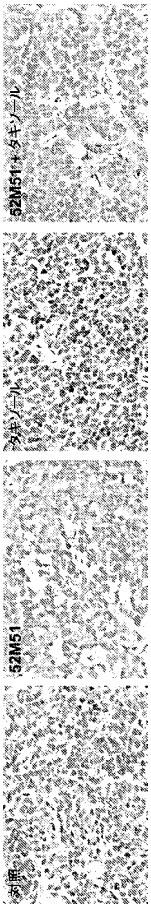
【図３Ｂ】



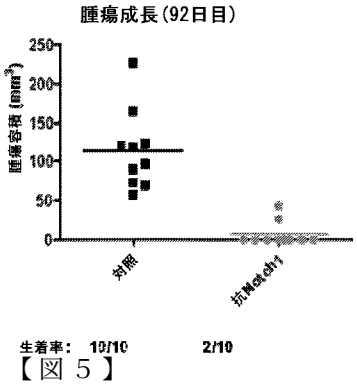
【図３Ｃ】



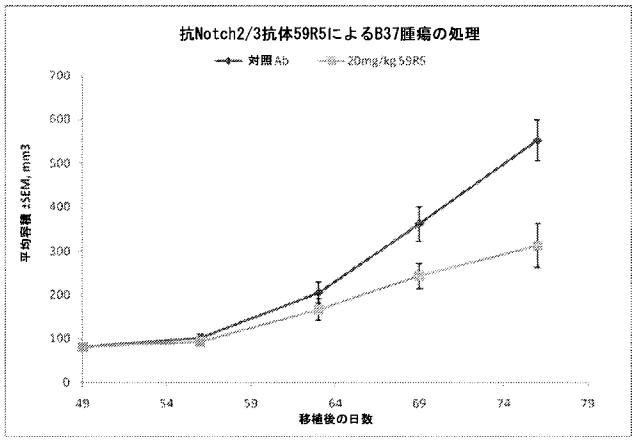
【図３Ｄ】



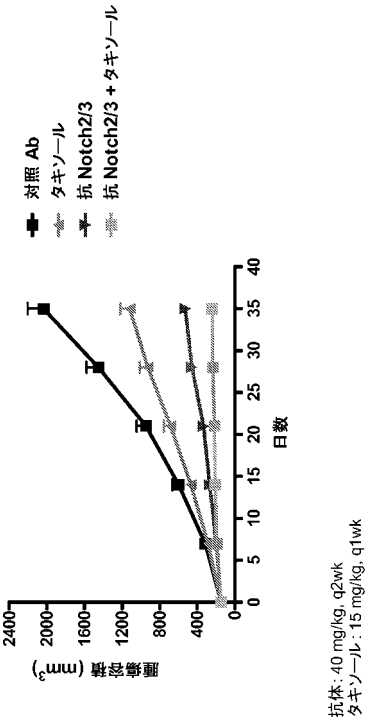
【図４】



【図５】

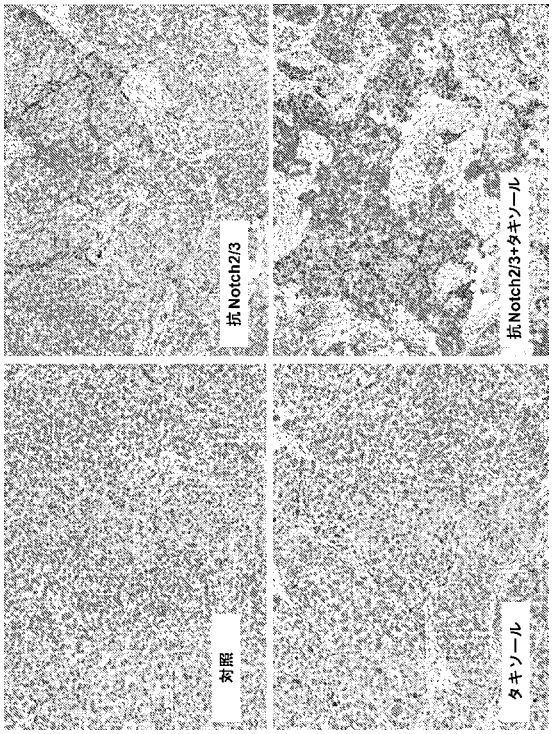


【図６Ａ】

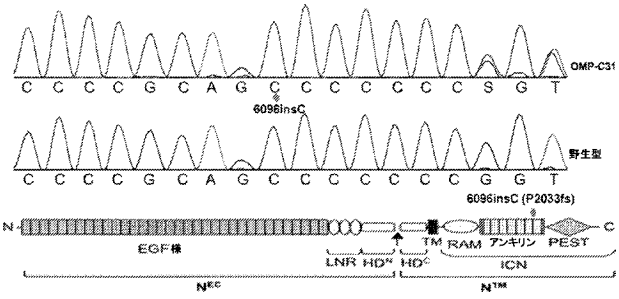


抗体: 40 mg/kg, q2wk
タキソール: 15 mg/kg, q1wk

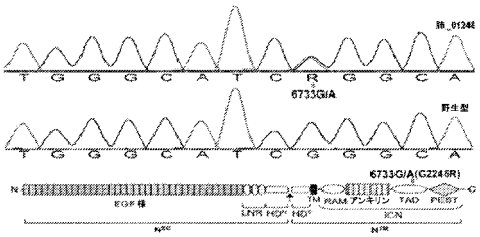
【図６Ｂ】



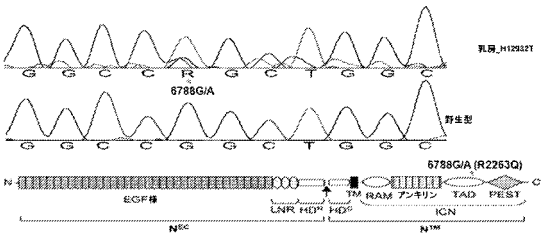
【図７Ａ】



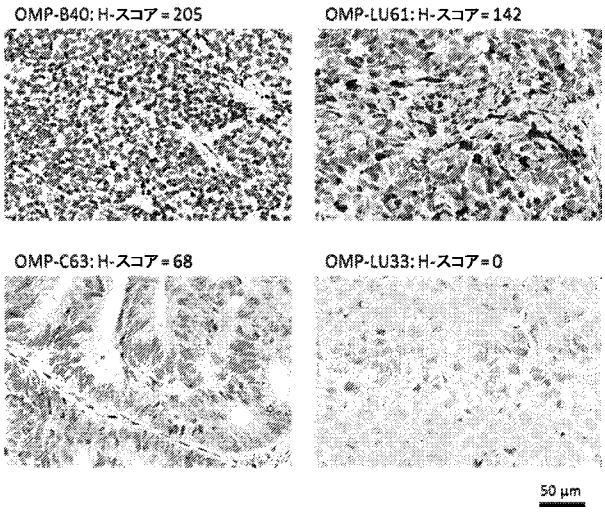
【図７Ｂ】



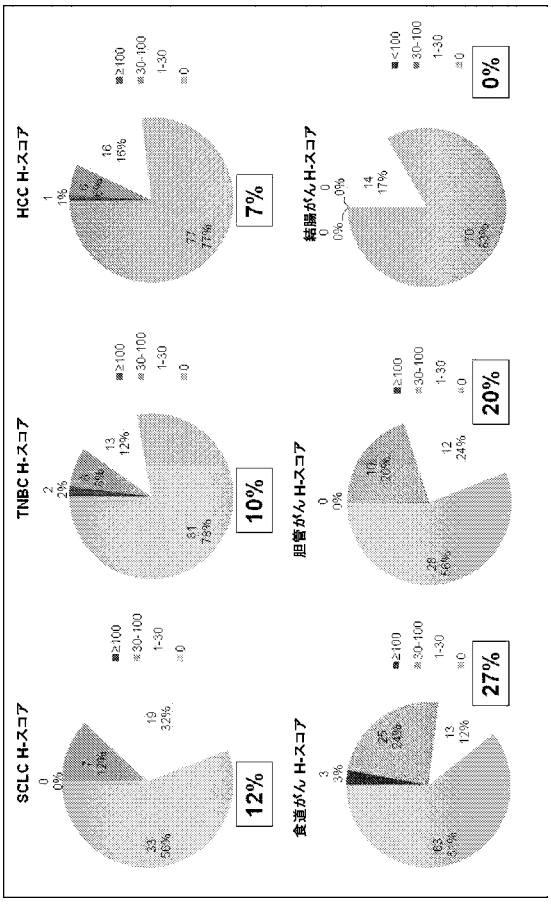
【図７Ｃ】



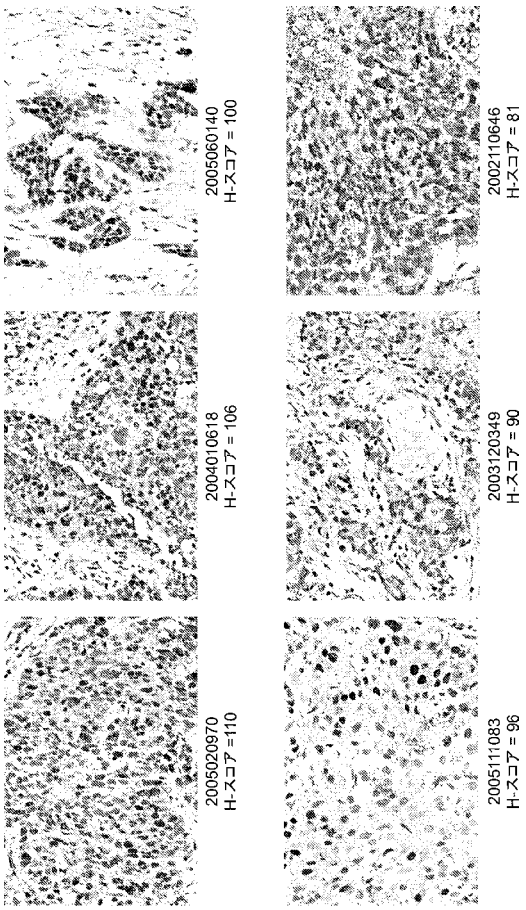
【図８】



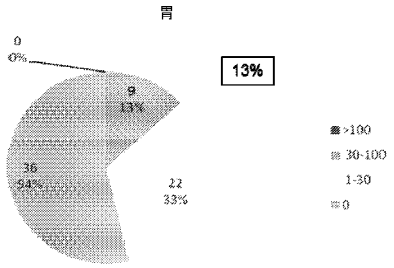
【図９Ａ】



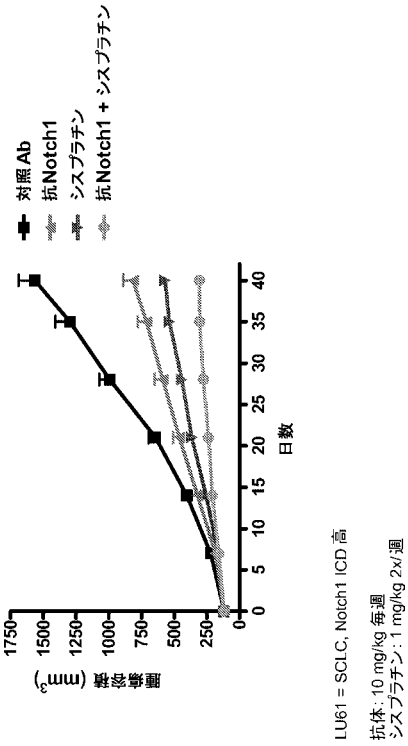
【図９Ｂ】



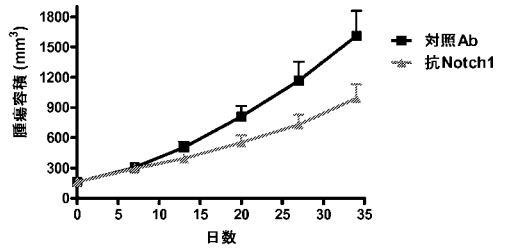
【図９Ｃ】



【図１０】

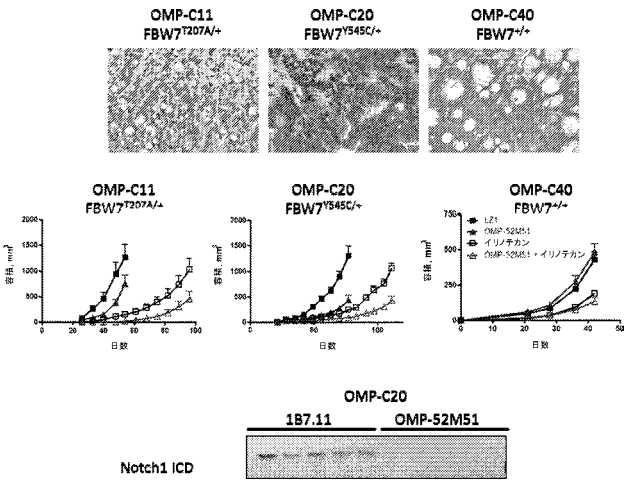


【図１１】

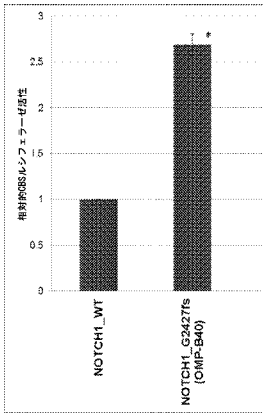


抗体 : 10 mg/kg 毎週

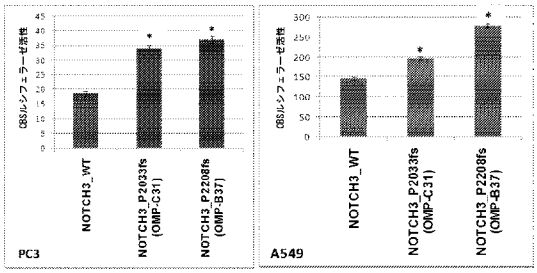
【図１２】



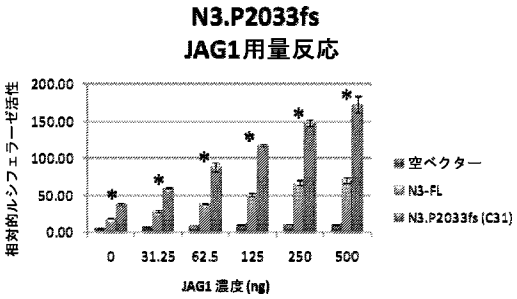
【図１３Ａ】



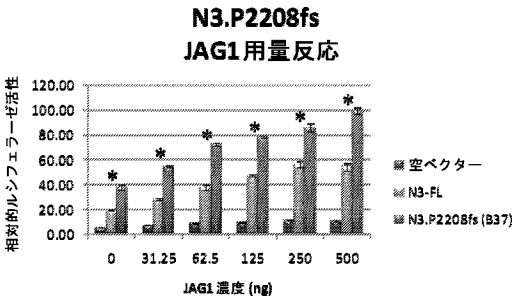
【図１３Ｂ】



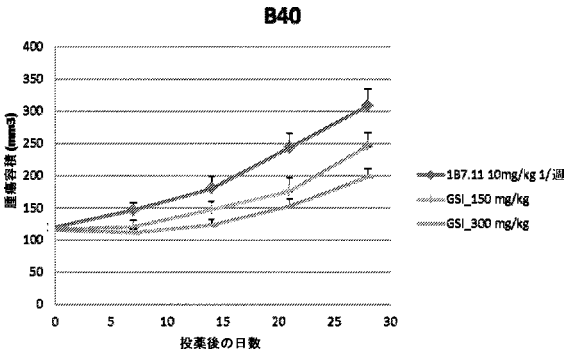
【図１３Ｃ】



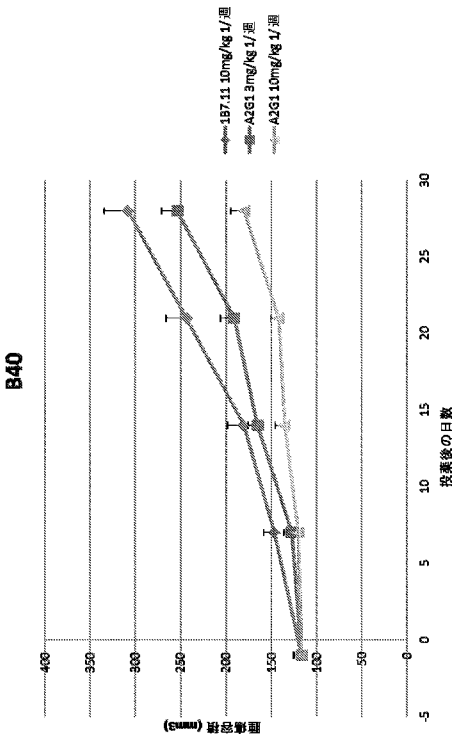
【図１３Ｄ】



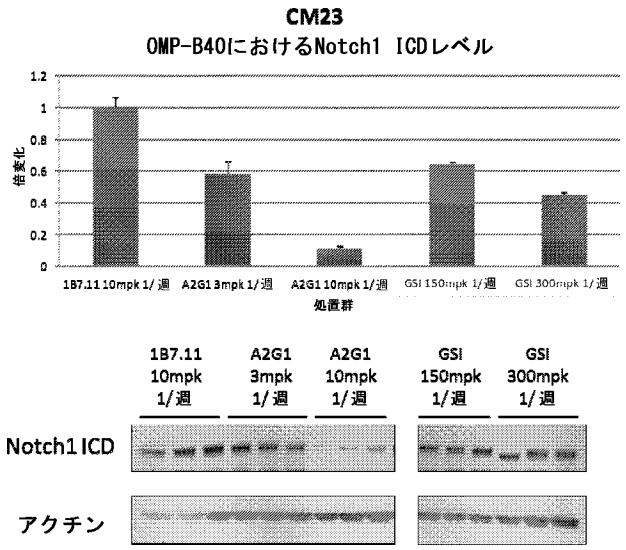
【図１４Ａ】



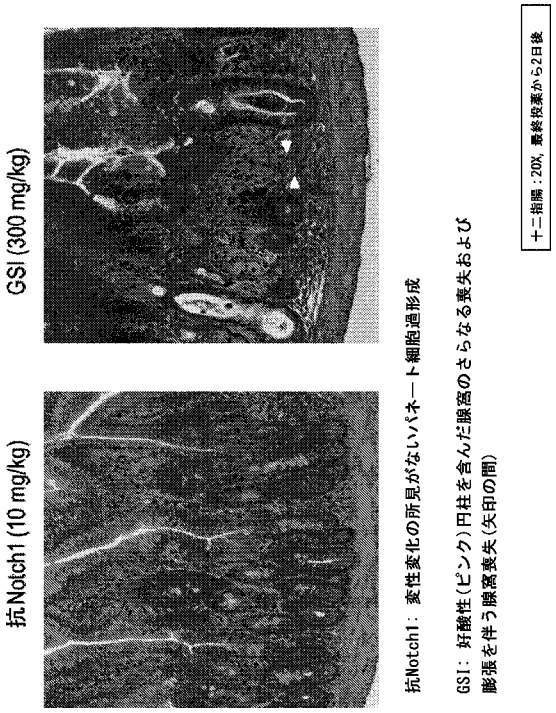
【図１４Ｂ】



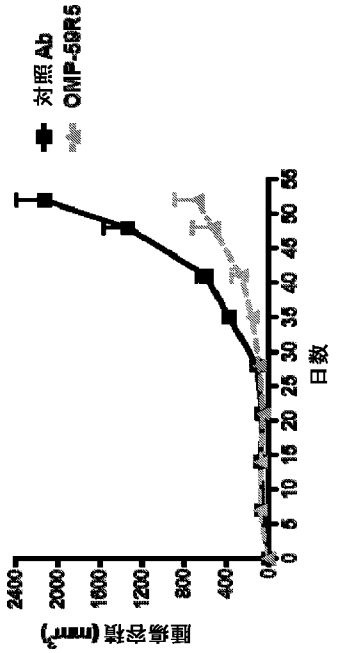
【図１４Ｃ】



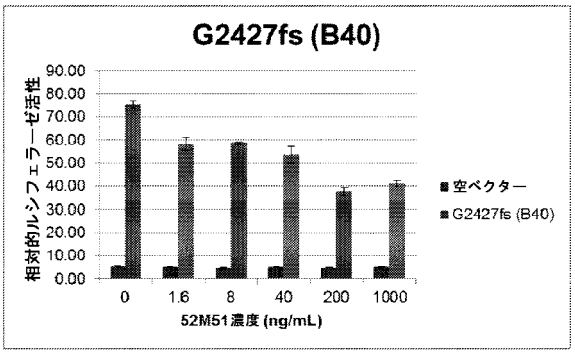
【図１４Ｄ】



【図１５】

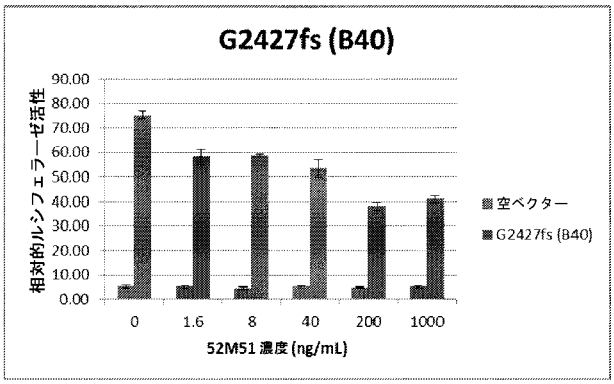


【図１６Ａ】



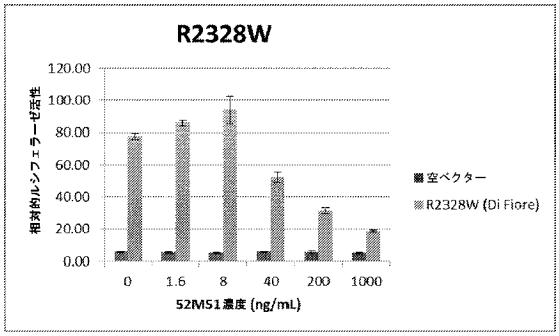
DLL4（12.5 ng）で刺激された形質移入PC3細胞

【図１６Ｂ】



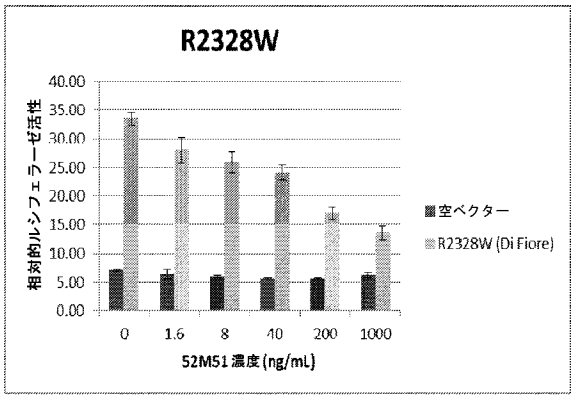
JAG1（125 ng）で刺激された形質移入PC3細胞

【図１６Ｃ】



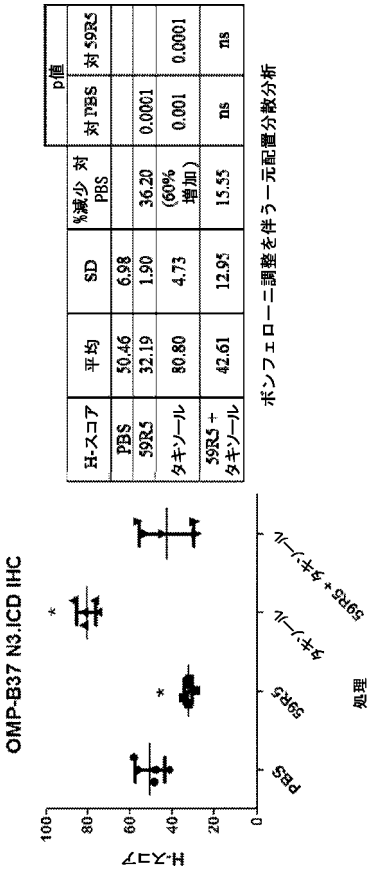
DLL4（12.5 ng）で刺激された形質移入PC3細胞

【図１６Ｄ】



JAG1（125 ng）で刺激された形質移入PC3細胞

【図１７】



H-スコア	平均	SD	%減少 対 PBS	p値 対 PBS	p値 対 59R5
PBS	50.46	6.98			
59R5	32.19	1.90	36.20	0.0001	
タキソール	80.80	4.73	(60% 増加)	0.001	0.0001
59R5＋タキソール	42.61	12.95	15.55	ns	ns

【配列表】
2015505668000001.xml
【手続補正書】
【提出日】平成26年9月25日(2014.9.25)
【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】
2015505668000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 12/64969

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - C07H 21/00, G01N 33/48 (2013.01)
USPC - 536/23.5, 435/6.11
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)
IPC(8):C07H 21/00, G01N 33/48 (2013.01)
USPC:536/23.5, 435/6.11

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)
PatBase; Google Patents; Google Scholar; Search terms used: isolated nucleic acid human Notch1, Notch1 mutation nucleotide 7279, Notch1 PEST domain mutant, Anti Notch antibody cancer, NOTCH secretase inhibitor therapy, NOTCH1 inhibitor therapy, Notch-1 mutation elevate ICD, human Notch PEST mutation, Notch-1 mutation, Notch-3 mutation, IHC H-scor

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2010/0087358 A1 (ASTER et al.) 8 April 2010 (08.04.2010); para [0010], [0011], [0028], [0036], [0059], [0060], [0066], [0105], [0111], [0115], Figs. 3D, 3E, 6-2, 6-3	1, 2, 11-13, 115
A	US 2011/0166028 A1 (BERGSTROM et al.) 7 July 2011(07.07.2011); Abstract, para [0056]-[0058], [0215]	1, 2, 11-13, 115
A	US 2009/0137470 A1 (STYLIANOU) 28 May 2009 (28.05.2009); para [0009], [0081], [0082], [0089]	1, 2, 11-13

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐

* 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	Date of mailing of the international search report
1 April 2013 (01.04.2013)	11 APR 2013
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

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 12/64969

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.: 31-37, 45-82, 88-91, 96-114, 125-138, 140-150 and 158-166
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:
This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Groups I+: claims 1-13 and 115, directed to a polynucleotide encoding a mutant human NOTCH receptor, wherein the polynucleotide may comprise a substitution or insertion mutation; wherein the first invention is limited to a polynucleotide comprising a deletion at nucleotide 7279 of the human NOTCH1 gene (claims 1, 2, 11-13 and 115)(applicants may opt for additional polynucleotides to be searched by specifying the mutation site, and paying an additional invention search fee for each elected polynucleotide).

- Please see extra sheet for continuation -

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.:
1, 2, 11-13 and 115: limited to a deletion of nucleotide 7279 of NOTCH1

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 12/64969

Continuation of Box III: lack of Unity of Invention

Groups II+: claims 14-30, directed to a method of identifying solid tumor cells that exhibit increased NOTCH receptor signaling, comprising identifying whether said cells contain a mutation in the proline, glutamate, serine, threonine-rich (PEST) domain of human NOTCH or in the TAD domain of human NOTCH, wherein said solid tumor cells are selected from the group consisting of: a glioma, a gastrointestinal tumor, a renal tumor, an ovarian tumor, a liver tumor, a colorectal tumor, an endometrial tumor, kidney tumor, prostate tumor, thyroid tumor, neuroblastoma, pancreatic tumor, glioblastoma multiforme, cervical tumor, stomach tumor, bladder tumor, hepatoma, breast tumor, colon tumor, melanoma, biliary tract tumor, and head and neck tumor; wherein the first invention is limited to a method of identifying solid tumor cells that exhibit increased NOTCH1 receptor signaling, comprising identifying whether said cells contain a mutation in the proline, glutamate, serine, threonine-rich (PEST) domain of human NOTCH1 (claims 14 and 18-26)(applicants may opt for additional human NOTCH receptors and associated specific mutations to be searched by specifying the NOTCH receptor, and paying an additional invention search fee for each elected NOTCH receptor)

Group III: claims 38-44, directed to methods for stratifying a cancer patient population for treatment with a NOTCH inhibitor, selecting a cancer patient for treatment with a NOTCH inhibitor, determining whether a patient diagnosed with cancer is likely to respond to a NOTCH inhibitor-based therapy, determining whether a patient diagnosed with cancer should be administered a NOTCH inhibitor, determine whether a patient diagnosed with cancer should continue treatment with a NOTCH inhibitor, or determining the therapeutic efficacy of a NOTCH inhibitor for treating cancer in a patient, the method comprising: (a) determining whether tumor cells from said patient contain an activating mutation of the PEST domain or the TAD domain of a human NOTCH receptor, and (b) selecting the patient whose tumor cells contain said mutation.

Groups IV+: claims 83-87, and 92-95, directed to a method of treating breast cancer in a patient having a breast tumor comprising: a) determining whether tumor cells from said patient contain an activating mutation of the human NOTCH receptor, wherein at least one of the breast tumor cells in said patient comprises an activating mutation in the human NOTCH gene; and b) administering to said patient a therapeutically effective amount of a NOTCH inhibitor; wherein the first invention is limited to the NOTCH1 receptor (claims 83-87) (Applicants may opt for the NOTCH3 receptor to be searched by paying an additional invention search fee for said search).

Group V: claims 116 and 117, directed to a kit comprising at least one reagent for specifically detecting a mutated NOTCH receptor.

Group VI: claims 118-124, 139, and 151-157, directed to a method for selecting a cancer patient for treatment with a NOTCH inhibitor, determining whether a patient diagnosed with cancer is likely to respond to a NOTCH inhibitor-based therapy, determining whether a patient diagnosed with cancer should be administered a NOTCH inhibitor, determine whether a patient diagnosed with cancer should continue treatment with a NOTCH inhibitor, or determining the therapeutic efficacy of a NOTCH inhibitor for treating cancer in a patient, the method comprising: (a) determining the level of NOTCH intracellular domain (ICD) in solid tumor cells from said patient; and (b) selecting for treatment the patient whose solid tumor cells comprise a level of NOTCH ICD above a reference level; or treating cancer in a patient having a solid tumor comprising: (a) determining the level of NOTCH ICD in the solid tumor cells; and (b) administering to said patient a therapeutically effective amount of a NOTCH inhibitor.

The inventions listed as Groups I+, II+, III, IV+, V and VI do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The special technical features of the claims of Groups I+, II+, III, IV+, V and VI are indicated above in the Group descriptions.

The only common technical element shared by all of the above groups is that they are related to NOTCH receptor mutants. The subgroups of Groups I+ share the common technical elements of being related to a polynucleotide encoding a mutant human NOTCH receptor, wherein the polynucleotide may comprise a substitution or insertion. Groups I+, II+, IV+ and VI are related to NOTCH1 mutants. Groups I+, II+ and IV+ are related to NOTCH3 mutants. These common technical elements do not represent an improvement over the prior art of US 2010/0087358 A1 to Aster et al. (hereinafter "Aster"), which teaches isolated polynucleotides encoding Notch1 mutants (para [0028], [0038]), wherein the Notch1 is human Notch1 (para [0052]), including substitution mutations (para [0016]) and deletion/insertion mutations (para [0105]), as well as mutations in NOTCH3 (para [0030]- [0031], [0048]).

The subgroups of Groups II+ share the common technical elements of being related to a method of identifying solid tumor cells that exhibit increased NOTCH receptor signaling, comprising identifying whether said cells contain a mutation in the proline, glutamate, serine, threonine-rich (PEST) domain of human NOTCH or in the TAD domain of human NOTCH, wherein said solid tumor cells are selected from the group consisting of: a glioma, a gastrointestinal tumor, a renal tumor, an ovarian tumor, a liver tumor, a colorectal tumor, an endometrial tumor, kidney tumor, prostate tumor, thyroid tumor, neuroblastoma, pancreatic tumor, glioblastoma multiforme, cervical tumor, stomach tumor, bladder tumor, hepatoma, breast tumor, colon tumor, melanoma, biliary tract tumor, and head and neck tumor. Groups II+, III and VI+ share the common technical element of being related to a mutation in a PEST domain of a human NOTCH receptor. Groups II+, III, VI+, V and VI share the common technical element of being related to detecting, determining the presence of, or identifying a NOTCH mutant. These common technical elements do not improve upon the prior art of US 2011/0166028 A1 to Bergstrom et al. (hereinafter "Bergstrom"), which teaches a method of identifying solid tumor cells that exhibit increased NOTCH receptor signaling (identify tumors/ disease states that have high levels of Notch signaling; para [0030]), wherein said solid tumor cells are selected from the group consisting of: a glioma, a gastrointestinal tumor, a renal tumor, an ovarian tumor, a liver tumor, a colorectal tumor, an endometrial tumor, kidney tumor, prostate tumor, thyroid tumor, neuroblastoma, pancreatic tumor, glioblastoma multiforme, cervical tumor, stomach tumor, bladder tumor, hepatoma, breast tumor, colon tumor, melanoma, biliary tract tumor, and head and neck tumor (para [0093]). Although Bergstrom does not explicitly recite wherein the identification of solid tumor cells exhibiting increased Notch receptor signaling comprises identifying whether said cells contain a mutation in the proline, glutamate, serine, threonine-rich (PEST) domain of a human NOTCH receptor or in the TAD domain of a human NOTCH receptor, Bergstrom teaches wherein "studies have identified mutations in the heterodimerization domain or PEST domain of the NOTCH1 gene in T-ALL cell lines and patient samples resulting in increased NICD and presumably activation of the NOTCH signaling pathway" (para [0215]). It would have been obvious to a person of ordinary skill in the art to identify solid tumor cells exhibiting inreased Notch receptor signaling by identifying whether said cells contain a mutation in the proline, glutamate, serine, threonine-rich (PEST) domain of a human NOTCH receptor or in the TAD domain of a human NOTCH receptor, based on the teaching of Bergstrom.

- Please see next extra sheet for continuation-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 12/64969

Continuation of First Extra Sheet: Lack of Unity of Invention

The claims of Groups III and VI share the common technical elements of being related to a method for selecting a cancer patient for treatment with a NOTCH inhibitor, determining whether a patient diagnosed with cancer is likely to respond to a NOTCH inhibitor-based therapy, determining whether a patient diagnosed with cancer should be administered a NOTCH inhibitor, determine whether a patient diagnosed with cancer should continue treatment with a NOTCH inhibitor, or determining the therapeutic efficacy of a NOTCH inhibitor for treating cancer in a patient, and administering to said patient a therapeutically effective amount of a NOTCH inhibitor. These common technical elements also do not improve upon the prior art of Bergstrom, which teaches selecting subjects afflicted with a Notch mediated cancer who will likely respond to treatment with a gamma-secretase inhibitor or another Notch inhibiting agent (abstract), a method of determining or predicting if an individual requiring drug or chemotherapeutic treatment or therapy for a disease state, or a cancer or tumor of a particular type will successfully respond or will not respond to the drug or chemotherapeutic treatment or therapy prior to the administration of such treatment or chemotherapy (para [0053]), wherein if a patient's response becomes one that is responsive to treatment by a Notch inhibitor compound, based on a correlation of the expression profile of the predictor biomarker, the patient's treatment prognosis can be qualified as favorable and treatment can continue (para [0057]) and to assess therapeutic efficacy of a Notch inhibitor...one or more of the target genes are over expressed in patients with Notch mediated cancers and their gene expression levels before and after treatment with a Notch-inhibitor may used a to assess the therapeutic efficacy of the particular Notch inhibitors (para [0072]); as well as administering to said patient a therapeutically effective amount of a NOTCH inhibitor (para [0096]).

The subgroups of Groups IV+ share the common technical elements of being related to a method of treating breast cancer in a patient having a breast tumor comprising: a) determining whether tumor cells from said patient contain an activating mutation of the human NOTCH receptor, wherein at least one of the breast tumor cells in said patient comprises an activating mutation in the human NOTCH gene; and b) administering to said patient a therapeutically effective amount of a NOTCH inhibitor. These common technical elements further do not improve upon the prior art of Bergstrom, which teaches a method of treating (para [0096]) breast cancer (cancer can be any types of cancer...Notch mediated cancers include cancer cells and tumors expressing aberrant notch signaling. Representative disorders of this type include breast cancer; para [0093]) in a patient (para [0096]) having a breast tumor comprising: administering to said patient a therapeutically effective amount of a NOTCH inhibitor (para [0096]). Although Bergstrom does not expressly recite wherein the method comprises a) determining whether tumor cells from said patient contain an activating mutation of the human NOTCH1 receptor, wherein at least one of the breast tumor cells in said patient comprises an activating mutation in the human NOTCH1 gene prior to said administering, Bergstrom, as above, teaches wherein the breast cancer is Notch mediated (para [0093]), and also discloses wherein mutations in the PEST domain of Notch1 result in increased activation of the NOTCH signaling pathway (para [0215]). It would have been obvious to a person of ordinary skill in the art to verify the presence of an activating NOTCH mutation in tumor cells prior to administering a NOTCH inhibitor to treat said tumor, without undue experimentation.

Therefore, the inventions of Group I+, II+, III, IV+, V and VI lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
C12N	*5/10*	*(2006.01)*	C12N	5/00	101	4C085
G01N	*33/53*	*(2006.01)*	G01N	33/53	M	4H045
G01N	*37/00*	*(2006.01)*	G01N	37/00	102	
G01N	*33/50*	*(2006.01)*	G01N	33/50	Z	
G01N	*33/15*	*(2006.01)*	G01N	33/15	Z	
G01N	*33/48*	*(2006.01)*	G01N	33/48	P	
G01N	*33/574*	*(2006.01)*	G01N	33/53	Y	
A61K	*45/00*	*(2006.01)*	G01N	33/574	A	
A61K	*39/395*	*(2006.01)*	G01N	33/574	D	
A61P	*35/00*	*(2006.01)*	A61K	45/00		
C12N	*9/99*	*(2006.01)*	A61K	39/395	E	
C07K	*16/28*	*(2006.01)*	A61K	39/395	T	
			A61P	35/00		
			C12N	9/99		
			C07K	16/28		

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,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,RS,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,BN,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,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC

(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 渡邉 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 カイン ジェニファー アン
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 レッドウッド シティ ホイップル アベニュー １２１２ ＃３０８
(72)発明者 ワン ミン
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 バーリンゲーム チュラ ビスタ アベニュー １１２８ ユニット ２
(72)発明者 カポン アン エム.

アメリカ合衆国　カリフォルニア州　マウンテン　ビュー　エーホーン　アベニュー　６８６
(72)発明者　ヘイ　ティモシー　シー.
アメリカ合衆国　カリフォルニア州　ヒルズボロ　ダレル　ロード　２００

Ｆターム(参考) 2G045 AA02 AA24 AA26 AA29 AA40 BA13 BA14 BB24 CA25 CA26
CB01 CB02 CB17 DA13 DA14 DA36 FA16 FA37 FB01 FB02
FB03 FB08 FB12 FB13 FB14 FB15 GC12 GC15
4B024 AA11 BA63 CA02 CA09 DA03 EA04 HA12
4B063 QA01 QA19 QQ43 QR32 QR48 QR55 QR62 QS25 QS34 QX02
4B065 AA93X AA93Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA46
4C084 AA17 NA05 ZB262
4C085 AA13 AA14 BB01 CC22 CC23 EE01
4H045 AA10 AA30 BA10 CA40 DA50 DA76 EA51 FA74

专利名称(译)	人类NOTCH受体突变及其应用		
公开(公告)号	JP2015505668A	公开(公告)日	2015-02-26
申请号	JP2014542394	申请日	2012-11-14
[标]申请(专利权)人(译)	昂考梅德药品有限公司		
申请(专利权)人(译)	オンコメッドファーマシューティカルズインコーポレイテッド		
[标]发明人	カインジェニファーアン ワンミン カポンアンエム ヘイティモシーシー		
发明人	カイン ジェニファー アン ワン ミン カポン アン エム. ヘイ ティモシー シー.		
IPC分类号	C12Q1/68 C12N15/09 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 G01N33/53 G01N37/00 G01N33/50 G01N33/15 G01N33/48 G01N33/574 A61K45/00 A61K39/395 A61P35/00 C12N9/99 C07K16/28		
CPC分类号	C07K14/705 A61K31/551 A61K45/06 A61K2039/505 C07K16/28 C07K2317/24 C07K2317/565 C07K2317/76 G01N33/57484 A61K2300/00 C12Q1/6844 A61K38/55 A61K39/39558 C12Q1/6886 C12Q2600/106 C12Q2600/156 G01N33/5011 G01N33/57415 G01N33/57492 G01N2500/10 G01N2800/52		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A C12N15/00.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 G01N33/53.M G01N37/00.102 G01N33/50.Z G01N33/15.Z G01N33/48.P G01N33/53.Y G01N33/574.A G01N33/574.D A61K45/00 A61K39/395.E A61K39/395.T A61P35/00 C12N9/99 C07K16/28		
F-TERM分类号	2G045/AA02 2G045/AA24 2G045/AA26 2G045/AA29 2G045/AA40 2G045/BA13 2G045/BA14 2G045/BB24 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/CB01 2G045/CB02 2G045/CB17 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FA16 2G045/FA37 2G045/FB01 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB08 2G045/FB12 2G045/FB13 2G045/FB14 2G045/FB15 2G045/GC12 2G045/GC15 4B024/AA11 4B024/BA63 4B024/CA02 4B024/CA09 4B024/DA03 4B024/EA04 4B024/HA12 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ43 4B063/QR32 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 4B065/AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA46 4C084/AA17 4C084/NA05 4C084/ZB262 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB01 4C085/CC22 4C085/CC23 4C085/EE01 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA76 4H045/EA51 4H045/FA74		
代理人(译)	清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 渡边真一 正人大关 五十岚弘		
优先权	61/560627 2011-11-16 US 61/704006 2012-09-21 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了与增强的受体信号转导相关的NOTCH突变的鉴定和表征。 本发明提供了使用相同突变的方法和试剂盒。 本发明进一步提供了一种在患有实体瘤的患者中治疗癌症的方法，该实体瘤的实体瘤细胞中NOTCH ICD水平升高。

（表１）最小のNOTCH受容体PESTドメイン

供給源	参照配列	AA配列	ヌクレオチド位置	アミノ酸位置
NOTCH1	CCDS43905	FLTPSPESP (SEQ ID NO:33)	7525-7550	2509-2517
NOTCH2	CCDS908	YLTPSPESP (SEQ ID NO:34)	7240-7266	2414-2422
NOTCH3	CCDS12326	YLTPSPESP (SEQ ID NO:34)	6730-6756	2244-2252
NOTCH4	NM_004557.3	LTPSPE (SEQ ID NO:35)	5914-5931	1972-1977