

(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2004-537314

(P2004-537314A)

(43) 公表日 平成16年12月16日(2004.12.16)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A 2 G O 4 5
A 6 1 K 31/00	A 6 1 K 31/00	4 B O 2 4
A 6 1 K 33/00	A 6 1 K 33/00	4 B O 6 3
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/395	N 4 B O 6 5
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395	V 4 C O 8 4
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 310 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-517584 (P2003-517584)	(71) 出願人	504031160
(86) (22) 出願日	平成14年7月25日 (2002.7.25)		ロランティス リミテッド
(85) 翻訳文提出日	平成16年1月26日 (2004.1.26)		イギリス国 シービー4 オビーイー ケ
(86) 国際出願番号	PCT/GB2002/003397		ンブリッジ ケンブリッジ サイエンス
(87) 国際公開番号	W02003/012441		パーク 4 1 O
(87) 国際公開日	平成15年2月13日 (2003.2.13)	(74) 代理人	100107984
(31) 優先権主張番号	0118153.6		弁理士 廣田 雅紀
(32) 優先日	平成13年7月25日 (2001.7.25)	(72) 発明者	ボドゥマー マーク ウィリアム
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		イギリス国 シービー4 オビーイー ケ
(31) 優先権主張番号	0207930.9		ンブリッジ ケンブリッジ サイエンス
(32) 優先日	平成14年4月5日 (2002.4.5)		パーク 4 1 O ロランティス リミテッ
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		ド
(31) 優先権主張番号	0212282.8		
(32) 優先日	平成14年5月28日 (2002.5.28)		
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ノッチシグナル伝達モジュレーターを検出する方法

(57) 【要約】

ノッチシグナル伝達モジュレーターを検出する方法について述べる。本方法は、候補モジュレーター存在下で免疫系細胞におけるノッチシグナル伝達を観察する工程を含む。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

(a) 免疫系細胞におけるノッチシグナル伝達を活性化し、
(b) ノッチシグナル伝達又は免疫シグナル伝達の候補モジュレーターに上記細胞を接触させ、
(c) ノッチシグナル伝達又は免疫シグナル伝達を観察し、また
(d) 候補モジュレーターがノッチシグナル伝達又は免疫シグナル伝達を調節するかどうかを測定する
工程（順不同）からなるノッチシグナル伝達又は免疫シグナル伝達モジュレーターを検出する方法。

10

【請求項 2】

(a) 免疫系細胞を活性化し、
(b) ノッチシグナル伝達又は免疫シグナル伝達の候補モジュレーターに上記細胞を接触させ、
(c) ノッチシグナル伝達又は免疫シグナル伝達を観察し、また
(d) 候補モジュレーターがノッチシグナル伝達又は免疫シグナル伝達を調節するかどうかを測定する
工程（順不同）からなるノッチシグナル伝達又は免疫シグナル伝達モジュレーターを検出する方法。

20

【請求項 3】

(a) 免疫系細胞を活性化し、
(b) 上記細胞におけるノッチシグナル伝達を活性化し、
(c) ノッチシグナル伝達又は免疫シグナル伝達の候補モジュレーターに上記細胞を接触させ、
(d) ノッチシグナル伝達又は免疫シグナル伝達を観察し、また
(e) 候補モジュレーターがノッチシグナル伝達又は免疫シグナル伝達を調節するかどうかを測定する
工程（順不同）からなるノッチシグナル伝達又は免疫シグナル伝達モジュレーターを検出する方法。

30

【請求項 4】

(a) 免疫系細胞におけるノッチシグナル伝達を活性化し、
(b) ノッチシグナル伝達の候補モジュレーターに上記細胞を接触させ、
(c) ノッチシグナル伝達又は免疫シグナル伝達を観察し、また
(d) 候補モジュレーターがノッチシグナル伝達又は免疫シグナル伝達を調節するかどうかを測定する工程（順不同）からなるノッチシグナル伝達モジュレーターを検出する方法。

【請求項 5】

(a) 免疫系細胞におけるノッチシグナル伝達を活性化し、
(b) ノッチシグナル伝達の候補モジュレーターに上記細胞を接触させ、
(c) ノッチシグナル伝達又は免疫シグナル伝達を観察し、また
(d) 候補モジュレーターがノッチシグナル伝達又は免疫シグナル伝達を調節するかどうかを測定する
工程（順不同）からなるノッチシグナル伝達モジュレーターを検出する方法。

40

【請求項 6】

(a) 免疫系細胞を活性化し、
(b) 上記細胞におけるノッチシグナル伝達を活性化させ、
(c) ノッチシグナル伝達の候補モジュレーターに上記細胞を接触させ、
(d) ノッチシグナル伝達又は免疫シグナル伝達を観察し、また
(e) 候補モジュレーターがノッチシグナル伝達又は免疫シグナル伝達を調節するかどうかを測定する

50

工程（順不同）からなるノッチシグナル伝達モジュレーターを検出する方法。

【請求項 7】

ノッチシグナル伝達の候補モジュレーターに細胞を接触させる工程を含む請求項 1～3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

ノッチシグナル伝達を観察する工程を含む先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】

候補モジュレーターがノッチシグナル伝達を調節するかどうかを測定する工程を含む先行請求項のいずれかに方法。

【請求項 10】

ノッチシグナル伝達又は免疫シグナル伝達に関して少なくとも 20% の最適性を示す免疫細胞活性を提供することを含む先行請求項のいずれかに記載の方法。

10

【請求項 11】

ノッチシグナル伝達又は免疫シグナル伝達に関して少なくとも 70% の最適性を示す免疫細胞活性を提供することを含む先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 12】

候補モジュレーターが、有機化合物、無機化合物、ペプチド又はポリペプチド、ポリヌクレオチド、抗体、抗体断片、サイトカイン及びサイトカイン断片からなるグループから選択されることを特徴とする先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 13】

ノッチシグナル伝達の観察工程に少なくとも 1 つの標的遺伝子の発現レベルを観察する工程が含まれることを特徴とする先行請求項のいずれかに記載の方法。

20

【請求項 14】

少なくとも 1 つの標的遺伝子がノッチシグナル伝達の内因性標的遺伝子であることを特徴とする請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

少なくとも 1 つの標的遺伝子が、C B F - 1、H e s - 1、H e s - 5、E (s p l)、I L - 10、C D - 23、D l x - 1、C T L A 4、C D - 4、N u m b、Mastermind 及び D s h からなるグループから選択されることを特徴とする請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

少なくとも 1 つの標的遺伝子がレポーター遺伝子であることを特徴とする請求項 13～15 に記載の方法。

30

【請求項 17】

少なくとも 1 つの標的遺伝子が、酵素活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子、放射標識又は蛍光標識を有する遺伝子、及び所定のポリペプチドエピトープをコードする遺伝子からなるグループから選択されることを特徴とする請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

少なくとも 1 つの標的遺伝子が、ノッチシグナル伝達に感受性を示すプロモーター領域の転写制御下にあることを特徴とする請求項 13～17 のいずれかに記載の方法。

【請求項 19】

ノッチシグナル伝達に感受性を示すプロモーター領域が、C B F - 1、H e s - 1、H e s - 5、E (s p l)、I L - 10、C D - 23、D l x - 1、C T L A 4、C D - 4、N u m b、Mastermind 又は D s h プロモーターであることを特徴とする請求項 18 に記載の方法。

40

【請求項 20】

少なくとも 1 つの標的遺伝子が、

i) ノッチシグナル伝達、及び

ii) 第 2 シグナル、及び / 又は、

iii) 第 3 シグナル

に感受性を示すプロモーター領域の転写制御下にあり、第 2 と第 3 シグナルが異なること

50

を特徴とする請求項 13 ~ 19 のいずれかに記載の方法。

【請求項 21】

第2シグナルが、免疫系細胞に特異的なシグナル伝達経路が活性化する結果生じることを特徴とする請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

免疫系細胞に特異的なシグナル伝達経路がT細胞受容体(TCR)シグナル伝達経路であることを特徴とする請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

免疫系細胞に特異的なシグナル伝達経路がB細胞受容体(BCR)シグナル伝達経路であることを特徴とする請求項 21 に記載の方法。

10

【請求項 24】

免疫系細胞に特異的なシグナル伝達経路がトール様受容体(TLR)シグナル伝達経路であることを特徴とする請求項 21 に記載の方法。

【請求項 25】

第3シグナルが、免疫系細胞に特異的な共刺激であることを特徴とする請求項 20 ~ 24 のいずれかに記載の方法。

【請求項 26】

共刺激が、B7タンパク質であるB7.1-CD80、B7.2-CD86、B7H1、B7H2、B7H3、B7RP1、B7RP2、CTLA4、ICOS、CD2、CD24、CD27、CD30、CD34、CD38、CD40、CD44、CD45、CD49、CD69、CD70、CD95(Fas)、CD134、CD134L、CD153、CD154、4-1BB、4-1BB-L、LFA-1、ICAM-1、ICAM-2、ICAM-3、OX40、OX40L、TRANCE/RANKリガンド、Fasリガンド、MHCクラスII、DEC205-CD205、CD204-スカベンジャー受容体、CD14、CD206(マンノース受容体)、TLR1~9等のトール様受容体(TLR)、CD207(Langerin)、CD209(DC-SIGN)、FC受容体2(CD32)、CD64(FC受容体1)、CD68、CD83、CD33、CD54、BDCA-2、BDCA-3、BDCA-4、ケモカイン受容体、サイトカイン、成長因子及び成長因子受容体アゴニスト、並びにそれらの変異体、誘導体、アナログ及び断片からなるグループから選択されることを特徴とする請求項 25 に記載の方法。

20

30

【請求項 27】

少なくとも1つの標的遺伝子の発現をプロテインアッセイにより観察することを特徴とする請求項 13 ~ 26 のいずれかに記載の方法。

【請求項 28】

少なくとも1つの標的遺伝子の発現を核酸アッセイにより観察することを特徴とする請求項 13 ~ 26 のいずれかに記載の方法。

【請求項 29】

ノッチを活性化することによりノッチシグナル伝達が活性化され、構成的に活性な剪断形態のノッチをもたらすか、活性ノッチICドメインをもたらすことを特徴とする先行請求項のいずれかに記載の方法。

40

【請求項 30】

候補モジュレーターの分子量が約1000未満であることを特徴とする先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 31】

候補モジュレーターの分子量が約500未満であることを特徴とする先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 32】

免疫系細胞がT細胞又はT細胞前駆体であることを特徴とする先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 33】

50

T細胞受容体の活性化によりT細胞が活性化されることを特徴とする請求項32に記載の方法。

【請求項34】

抗原又は抗原決定基によりT細胞が活性化されることを特徴とする請求項33に記載の方法。

【請求項35】

抗CD3抗体又は抗TCR抗体によりT細胞が活性化されることを特徴とする請求項33に記載の方法。

【請求項36】

抗CD3抗体又は抗TCR抗体が支持体に結合していることを特徴とする請求項35に記載の方法。 10

【請求項37】

抗CD3抗体又は抗TCR抗体が特定の支持体に結合していることを特徴とする請求項36に記載の方法。

【請求項38】

T細胞がカルシウムイオノフォアによって活性化されることを特徴とする請求項33に記載の方法。

【請求項39】

T細胞がプロテインキナーゼC又はMAPキナーゼによって活性化されることを特徴とする請求項33に記載の方法。 20

【請求項40】

T細胞が共活性化されることを特徴とする請求項33～39のいずれかに記載の方法。

【請求項41】

T細胞がCD28の活性化によって共活性化されることを特徴とする請求項40に記載の方法。

【請求項42】

T細胞受容体が抗CD28抗体又はCD28リガンドによって共活性化されることを特徴とする請求項41に記載の方法。

【請求項43】

T細胞が、抗CD3抗体又は抗TCR抗体によって活性化され、抗CD28抗体又はCD28リガンドによって共活性化されることを特徴とする請求項33～42のいずれかに記載の方法。 30

【請求項44】

免疫系細胞が抗原提示細胞（APC）であることを特徴とする請求項1～31のいずれかに記載の方法。

【請求項45】

免疫系細胞がB細胞であることを特徴とする請求項1～31のいずれかに記載の方法。

【請求項46】

ノッチ、ノッチの構成的に活性な剪断形態、又はノッチICドメインをコードする発現ベクターを免疫系細胞にトランスフェクトすることを特徴とする先行請求項のいずれかに記載の方法。 40

【請求項47】

ノッチレポーター構築物を免疫細胞にトランスフェクトすることを特徴とする先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項48】

先行請求項のいずれかの方法により同定することが可能なモジュレーター。

【請求項49】

先行請求項のいずれかの方法により同定されたモジュレーター。

【請求項50】

免疫系の疾患又は症状、或いは免疫系に関係のある疾患又は症状の治療用薬剤の調製にお 50

ける請求項 48 又は 49 に記載のモジュレーターの使用。

【請求項 51】

疾患が T 細胞に介在される疾患であることを特徴とする請求項 50 に記載のモジュレーターの使用。

【請求項 52】

疾患が B 細胞に介在される疾患であることを特徴とする請求項 50 に記載のモジュレーターの使用。

【請求項 53】

疾患が APC に介在される疾患であることを特徴とする請求項 50 に記載のモジュレーターの使用。

10

【請求項 54】

請求項 48 又は 49 に記載のモジュレーターの少なくとも 1 つを治療有効量と、薬学上許容される担体、希釈剤及び / 又は賦形剤を含む医薬組成物。

【請求項 55】

ノッチシグナル伝達がノッチリガンドによって活性化されることを特徴とする先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 56】

ノッチリガンドが細胞又は細胞膜上に提示されることを特徴とする請求項に記載の方法。

【請求項 57】

ノッチリガンドが支持体に結合していることを特徴とする請求項 45 に記載の方法。

20

【請求項 58】

特定の支持体マトリックスに結合したデルタ DSL ドメイン及び少なくとも 1 つのデルタ EGF ドメインを有するタンパク質を含む粒子。

【請求項 59】

特定の支持体マトリックスに結合したデルタ細胞外ドメイン又はその活性部分を有するタンパク質を含む粒子。

【請求項 60】

特定の支持体マトリックスがビーズであることを特徴とする請求項 58 又は 59 の粒子。

【請求項 61】

複数の上記タンパク質が特定の支持体マトリックスに結合していることを特徴とする請求項 58 ~ 60 のいずれかに記載の粒子。

30

【請求項 62】

(a) 免疫細胞を活性化し、
(b) 上記細胞内におけるノッチシグナル伝達を活性化し、
(c) 遺伝子発現を観察し、また
(d) どの遺伝子がアップレギュレート又はダウンレギュレートされるかを測定する工程 (順不同) からなり、ノッチシグナル伝達活性化及び免疫細胞活性化の併用に反応して免疫細胞内でアップレギュレートされる遺伝子を検出する方法。

【請求項 63】

(a) 免疫細胞を活性化し、
(b) 上記細胞内におけるノッチシグナル伝達を活性化し、
(c) 遺伝子発現を観察し、
(d) 上記細胞において遺伝子発現がアップレギュレート又はダウンレギュレートされるかどうかを測定し、また
(e) 工程 (d) における遺伝子発現を、細胞が活性化されず又はノッチシグナル伝達が活性化されない対照と比較する
工程 (順不同) からなり、ノッチシグナル伝達活性化又は免疫細胞活性化いずれか単独の場合に比べ、ノッチシグナル伝達活性化及び免疫細胞活性化の併用に反応して免疫細胞内でより顕著にアップレギュレート又はダウンレギュレートされる遺伝子を検出する方法。

40

【請求項 64】

50

マイクロアレイを用いて遺伝子発現を観察することを特徴とする請求項 6 2 又は 6 3 に記載の方法。

【請求項 6 5】

免疫細胞が T 細胞であることを特徴とする請求項 6 2 ~ 6 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6 6】

請求項 6 2 ~ 6 5 のいずれかに記載の方法により検出される遺伝子。

【請求項 6 7】

- (a) 免疫細胞の培養物を提供し、
- (b) ノッチシグナル伝達レポーター構築物を上記細胞にトランスフェクトし、
- (c) 任意で上記細胞に、ノッチ、構成的に活性化剪断形態のノッチ又はノッチ I C ドメインをコードする核酸をトランスフェクトし、
- (d) 任意でノッチリガンドを提供し、
- (e) 試験に供する 1 若しくは 2 以上の化合物に上記細胞を暴露し、また
- (f) 試験に供する化合物に暴露した細胞と未暴露の細胞とにおけるノッチシグナル伝達の違いを測定する

工程（順不同）からなるアッセイ。

【請求項 6 8】

- (a) 免疫細胞の培養物を提供し、
- (b) 任意でノッチシグナル伝達レポーター構築物を上記細胞にトランスフェクトし、
- (c) 上記細胞に、ノッチ、構成的に活性化剪断形態のノッチ又はノッチ I C ドメインをコードする核酸をトランスフェクトし、
- (d) 任意でノッチリガンドを提供し、
- (e) 試験に供する 1 若しくは 2 以上の化合物に上記細胞を暴露し、また
- (f) 試験に供する化合物に暴露した細胞と未暴露の細胞とにおけるノッチシグナル伝達の違いを測定する

工程（順不同）からなるアッセイ。

【請求項 6 9】

免疫細胞を活性化する工程を含む請求項 6 7 又は 6 8 に記載のアッセイ。

【請求項 7 0】

サイトカインの産生を観察することによりノッチシグナル伝達を観察することを特徴とする先行請求項のいずれかに記載の方法又はアッセイ。

【請求項 7 1】

I L - 1 0 の産生を観察することによりノッチシグナル伝達を観察することを特徴とする請求項 7 0 に記載の方法又はアッセイ。

【請求項 7 2】

T N F の産生を観察することによりノッチシグナル伝達を観察することを特徴とする請求項 7 0 に記載の方法又はアッセイ。

【請求項 7 3】

I F N の産生を観察することによりノッチシグナル伝達を観察することを特徴とする請求項 7 0 に記載の方法又はアッセイ。

【請求項 7 4】

I L - 5 の産生を観察することによりノッチシグナル伝達を観察することを特徴とする請求項 7 0 に記載の方法又はアッセイ。

【請求項 7 5】

I L - 1 3 の産生を観察することによりノッチシグナル伝達を観察することを特徴とする請求項 7 0 に記載の方法又はアッセイ。

【請求項 7 6】

- (i) ノッチシグナル伝達レポーター構築物、及び
- (ii) ノッチ、構成的に活性化剪断形態のノッチ又はノッチ I C ドメインをコードする発現ベクター

にトランスフェクトさせた免疫細胞。

【請求項 77】

(i) ノッチシグナル伝達レポーター構築物、及び
(ii) 構成的に活性な剪断形態のノッチをコードする発現ベクター
をトランスフェクトした免疫細胞。

【請求項 78】

(i) ノッチシグナル伝達レポーター構築物、及び
(ii) ノッチ IC ドメインをコードする発現ベクター
をトランスフェクトした免疫細胞。

【請求項 79】

安定にトランスフェクトした請求項 76 ~ 78 のいずれかに記載の免疫細胞。

【請求項 80】

分子量が約 1000 未満の候補モジュレーターの存在下及び不在下で免疫系細胞におけるノッチシグナル伝達を観察し、前記候補モジュレーターがノッチシグナル伝達を調節するかどうかを測定する工程を含むノッチシグナル伝達モジュレーターを検出する方法。

【請求項 81】

(a) 分子量が約 1000 未満の候補モジュレーターに免疫系細胞を接触させ、
(b) ノッチシグナル伝達を観察し、また
(c) 前記候補モジュレーターがノッチシグナル伝達を調節するかどうかを測定する
工程からなるノッチシグナル伝達モジュレーターを検出する方法。

【請求項 82】

候補モジュレーターの分子量が約 500 未満であることを特徴とする請求項 80 又は 81
に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明はノッチシグナル伝達モジュレーターを検出する方法に関する。本発明はまた、かかる方法により同定することが可能な新規モジュレーター及びそれらを療法に使用することにも関する。

【背景技術】

【0002】

ノッチシグナル伝達は、脊椎動物及び無脊椎動物の細胞運命決定に重要な役割を果たしている。ノッチはショウジョウバエの胚段階や幼虫発達段階などの多くの段階で、また神経発生における重要な役割及び中胚葉細胞や内胚葉細胞の分化を含む広汎な機能を包含する種々の細胞で発現される。哺乳類ノッチ遺伝子には少なくとも 4 種類ある (ノッチ 1、ノッチ 2、ノッチ 3、ノッチ 4)。脊椎動物及び低級脊椎動物のタンパク質に最も似ているノッチ 1 は広く発現され、初期発達に重要である。近年、ノッチシグナル伝達が、胸腺における幼弱 T 細胞系譜の決定に貢献していることが明らかになっている。

【0003】

T 細胞は胸腺で成熟する間に、非自己抗原と自己抗原を識別する能力を獲得するが、この過程を「自己寛容」という。しかし、非自己抗原に対する寛容は、特異的条件下において、その抗原を有するペプチド断片で免疫することにより誘導される。多発性硬化症、関節リウマチ、糖尿病などの自己免疫疾患では、寛容の適切な制御が行われない。寛容を再樹立するための改良療法が自己免疫疾患に望まれている。同様にアレルギー症状又はドナー個人からの臓器や組織の移植においても特定の外来抗原又は外来抗原のプロフィールに対する寛容を誘導することが望ましい。

【0004】

ノッチ及びそのリガンドであるデルタ (Delta) 及びセラート (Serrate) が末梢免疫系の成人正常細胞表面で発現されることから、これらのタンパク質が T 細胞の獲得免疫能力に役割を担っていることが示唆される。T 細胞はノッチ 1 mRNA を構成的に発現する。デ

10

20

30

40

50

ルタは、末梢リンパ様組織のT細胞サブセットにおいてのみ発現される。セラートは、抗原提示細胞（APCs）のサブセットに限定して発現される。これらの観察結果からは、ノッチシグナル伝達が末梢での不応答（寛容又はアネルギー）、連結抑制（linked suppression）及び感染性寛容の誘導に中心的役割を果たし、ノッチ受容体リガンドファミリーが胚発達期以降も継続して免疫系における細胞運命決定を調節しているとの知見を支えるものである（Hoyne et al.）。

【0005】

従ってWO98/20142に記載されているように、ノッチシグナル伝達経路を操作して、免疫療法や、T細胞介在型疾患の予防及び/又は治療に用いることができる。特に、アレルギー、自己免疫、移植片拒絶、腫瘍に誘発されるT細胞系の異常、また例えばマラ

10

【0006】

他のT細胞に抗原特異的寛容を伝達し得る調節性T細胞のクラスを創出できることが近年示され、この方法は感染性寛容と呼ばれる（WO98/20142）。これらの細胞の機能的活性は、その細胞表面又は抗原提示細胞表面においてノッチリガンドタンパク質を過剰発現させることにより模倣できる。具体的には、調節性T細胞はノッチリガンドタンパク質のデルタ又はセラートファミリーのメンバーを過剰発現させることにより創出できる

20

【0007】

ノッチリガンドの発現は癌においても役割を担っている。実際、腫瘍細胞の中にはノッチリガンド発現のアプレギュレーションが認められるものがある。かような腫瘍細胞は、特異的抗原による再刺激に対しT細胞を不応答にすることができるが、それにより腫瘍細胞が如何にして正常T細胞の応答を阻止するかが説明できる。T細胞におけるインビボでのノッチシグナル伝達をダウンレギュレーションさせることにより、腫瘍細胞が腫瘍特異的抗原を認識するT細胞に免疫寛容を誘発することを回避できる可能性がある。逆に、T

30

【0008】

本発明者らによるPCT公開公報WO98/20142、WO00/36089、WO0135990にノッチシグナル伝達経路及びそれに影響を受ける疾患に関する記載がある。PCT/GB97/03058（WO98/20142）、PCT/GB99/04233（WO00/36089）、PCT/GB00/04391（WO0135990）のテキストを参考のため本明細書に添付する。

【0009】

しかしながら、免疫系の、又は免疫系に関連する疾患や症状、特に（限定はされないが）T細胞介在型疾患や障害の検出、予防及び治療に有用なさらなる診断又は治療用組成物を提供することが当技術分野で依然として要求されている。本発明では新規なノッチシグナル伝達経路モジュレーターを同定する有効な方法を提供することによりこの問題に対処した。当技術分野では多数のアッセイ法が公知であるが、本発明は、本発明者らのノッチシグナル伝達経路に関する知見に基づき、また新規モジュレーターを検出する上で有効なアッセイは免疫系細胞を用いて実施することが必要であるとの認識に基づいている。

40

【発明の開示】

【0010】

本発明の特徴の1つとして、候補モジュレーターの存在下及び不在下で免疫系細胞におけるノッチシグナル伝達を観察し、上記候補モジュレーターがノッチシグナル伝達を調節するかどうかを測定する工程を含むノッチシグナル伝達モジュレーターを検出する方法を提

50

供する。

【0011】

本発明のさらなる特徴として、

- (a) 免疫系細胞を候補モジュレーターと接触させ、
- (b) ノッチシグナル伝達を観察し、また
- (c) 上記候補モジュレーターがノッチシグナル伝達を調節するかどうかを測定する工程からなるノッチシグナル伝達モジュレーターを検出する方法を提供する。

【0012】

「接触させる」とは、細胞が候補モジュレーターと相互作用することができるように引き合わせることを意味する。かかる接触が水性溶液又は緩衝溶液において行われることが好ましい。

【0013】

本発明のさらなる特徴として、

- (a) 免疫系細胞におけるノッチシグナル伝達を活性化し、
- (b) ノッチシグナル伝達又は免疫シグナル伝達の候補モジュレーターに上記細胞を接触させ、
- (c) ノッチシグナル伝達又は免疫シグナル伝達を観察し、また
- (d) 候補モジュレーターがノッチシグナル伝達又は免疫シグナル伝達を調節するかどうかを測定する工程（順不同）からなるノッチシグナル伝達又は免疫シグナル伝達モジュレーターを検出する方法を提供する。

【0014】

本発明のさらなる特徴として、

- (a) 免疫系細胞を活性化し、
- (b) ノッチシグナル伝達又は免疫シグナル伝達の候補モジュレーターに上記細胞を接触させ、
- (c) ノッチシグナル伝達又は免疫シグナル伝達を観察し、また
- (d) 候補モジュレーターがノッチシグナル伝達又は免疫シグナル伝達を調節するかどうかを測定する工程（順不同）からなるノッチシグナル伝達又は免疫シグナル伝達モジュレーターを検出する方法を提供する。

【0015】

本発明のさらなる特徴として、

- (a) 免疫系細胞を活性化し、
- (b) 上記細胞中のノッチシグナル伝達を活性化し、
- (c) ノッチシグナル伝達又は免疫シグナル伝達の候補モジュレーターに上記細胞を接触させ、
- (d) ノッチシグナル伝達又は免疫シグナル伝達を観察し、また
- (e) 候補モジュレーターがノッチシグナル伝達又は免疫シグナル伝達を調節するかどうかを測定する工程（順不同）からなるノッチシグナル伝達又は免疫シグナル伝達モジュレーターを検出する方法を提供する。

【0016】

本発明のさらなる特徴として、

- (a) 免疫系細胞におけるノッチシグナル伝達を活性化し、
- (b) ノッチシグナル伝達の候補モジュレーターに上記細胞を接触させ、
- (c) ノッチシグナル伝達又は免疫シグナル伝達を観察し、また
- (d) 候補モジュレーターがノッチシグナル伝達又は免疫シグナル伝達を調節するかどうかを測定する工程（順不同）からなるノッチシグナル伝達モジュレーターを検出する方法を提供する。

【0017】

本発明のさらなる特徴として、

- (a) 免疫系細胞を活性化し、

(b) ノッチシグナル伝達の候補モジュレーターに上記細胞を接触させ、
(c) ノッチシグナル伝達又は免疫シグナル伝達を観察し、また
(d) 候補モジュレーターがノッチシグナル伝達又は免疫シグナル伝達を調節するかどうかを測定する工程(順不同)からなるノッチシグナル伝達モジュレーターを検出する方法を提供する。

【0018】

本発明のさらなる特徴として、

(a) 免疫系細胞を活性化し、
(b) 上記細胞におけるノッチシグナル伝達を活性化し、
(c) ノッチシグナル伝達の候補モジュレーターに上記細胞を接触させ、
(d) ノッチシグナル伝達又は免疫シグナル伝達を観察し、また
(e) 候補モジュレーターがノッチシグナル伝達又は免疫シグナル伝達を調節するかどうかを測定する工程(順不同)からなるノッチシグナル伝達モジュレーターを検出する方法を提供する。

10

【0019】

免疫細胞の活性化は、ノッチシグナル伝達又は免疫シグナル伝達に関して少なくとも20%、好ましくは少なくとも70%の最適性を示すことが好適である。

【0020】

候補モジュレーターはいずれの有機化合物又は無機化合物でもよい。候補モジュレーターが、天然型又は合成小分子化合物、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、抗体又は抗体断片、サイトカイン又はサイトカイン断片からなるグループから選択されることが好ましい。

20

【0021】

好適実施態様においてはノッチシグナル伝達の観察工程に少なくとも1つの標的遺伝子の発現レベルを観察する工程が含まれる。かかる標的遺伝子はノッチシグナル伝達経路の内因性標的遺伝子又はレポーター遺伝子のいずれでもよい。

【0022】

ノッチシグナル伝達経路における公知の内因性標的遺伝子には、Deltex、Hes-1、Hes-5、E(spl)、IL-10、CD-23、Dlx-1、CTLA4、CD-4、Numb、Mastermind及びDshからなるグループから選択されることを特徴とする請求項14に記載の方法。

30

【0023】

当技術分野では多数のレポーター遺伝子が標準的となっており、その中には酵素活性をコードする遺伝子、放射標識又は蛍光標識を有する遺伝子、所定のポリペプチドエピトープをコードする遺伝子が含まれる。

【0024】

少なくとも1つの標的遺伝子が、ノッチシグナル伝達に感受性を示すプロモーター領域の転写制御下にあることが好ましい。少なくとも1つの標的遺伝子が、ノッチシグナル伝達及び第2シグナル及び/又は第3シグナル(第2と第3シグナルは異なる)に感受性を示すプロモーター領域の転写制御下にあることが、より好ましい。

【0025】

本発明に用いるシグナルとしては、補助シグナル(当分野でT及びB細胞受容体シグナル伝達における共刺激シグナルとして知られる)の存在下及び不在下において、T細胞受容体(TCR)シグナル伝達経路、B細胞受容体(BCR)シグナル伝達経路、トール様受容体(TLR)シグナル伝達経路等の免疫系細胞に特異的なシグナル伝達経路を活性化する結果生じるシグナルが例示できる。

40

【0026】

本発明に用いるシグナルの他の例としては、B7タンパク質であるB7.1-CD80、B7.2-CD86、B7H1、B7H2、B7H3、B7RP1、B7RP2、CTLA4、ICOS、CD2、CD24、CD27、CD28、CD30、CD34、CD38、CD40、CD44、CD45、CD49、CD69、CD70、CD95(Fas

50

)、CD134、CD134L、CD153、CD154、4-1BB、4-1BB-L、LFA-1、ICAM-1、ICAM-2、ICAM-3、OX40、OX40L、TRANCE/RANKリガンド、Fasリガンド、MHCクラスII、DEC205-CD205、CD204-スカベンジャー受容体、CD14、CD206(マンノース受容体)、TLR1~9等のトール様受容体(TLR)、CD207(Langerin)、CD209(DC-SIGN)、FC受容体2(CD32)、CD64(FC受容体1)、CD68、CD83、CD33、CD54、BDCA-2、BDCA-3、BDCA-4、ケモカイン受容体、サイトカイン、成長因子及び成長因子受容体アゴニスト、並びにそれらの変異体、誘導体、アナログ及び断片等の免疫系細胞に特異的な共刺激が挙げられる。

【0027】

一好適実施態様では、本発明の方法は、T細胞又はT細胞前駆体又は抗原提示細胞(APC)において行われる。APCは、MHCクラスII分子を発現でき、抗原をCD4⁺T細胞に対して提示できる細胞である。APCが、例えばランゲルハンス細胞等の樹状細胞などの骨髄系統細胞、単球又はマクロファージ又は一次細胞又はB系統細胞であることが好ましい。

10

【0028】

少なくとも1つの標的遺伝子の発現はプロテインアッセイ又は核酸アッセイにより観察できる。

【0029】

本発明の別の特徴に従い、

20

(a)免疫系細胞を活性化し、

(b)上記細胞を候補モジュレーターと接触させ、

(c)ノッチシグナル伝達を観察し、(工程(a))、(b))、(c))はどの順番で実施してもよい)また、

(d)上記候補モジュレーターがノッチシグナル伝達を調節するかどうかを測定する工程からなるノッチシグナル伝達モジュレーターを検出する方法を提供する。

【0030】

少なくとも1つの標的遺伝子の発現をプロテインアッセイ又は核酸アッセイにより観察することが好ましい。

【0031】

候補モジュレーターの分子量が約1000未満であることが好適であり、約500未満であることが好適である。

30

【0032】

免疫系細胞がT細胞又はT細胞前駆体であることが好ましい。

【0033】

T細胞受容体の活性化によりT細胞が活性化されることが好ましい。

【0034】

T細胞受容体は、抗原又は抗原決定基により活性化されることが好ましい。

【0035】

T細胞受容体は、支持体に結合していることを好ましくする抗CD3抗体又は抗TCR抗体により、活性化されることが好ましい。抗CD3抗体又は抗TCR抗体が特定の支持体に結合していることが好ましい。

40

【0036】

T細胞が共活性化されることが好ましく、CD28によって活性化されることが好適である。

【0037】

抗CD28抗体、又はB7の活性ドメイン等のCD28リガンドでT細胞受容体が共活性化されることが好ましい。

【0038】

T細胞が、抗CD3抗体で活性化され、抗CD28抗体で共活性化されることが好ましい

50

。

【 0 0 3 9 】

或いはT細胞が、カルシウムイオノフォア、又はプロテインキナーゼC又はMAPキナーゼのアクチベーターによって活性化されてもよい。

【 0 0 4 0 】

ノッチ、ノッチの構成的に活性な剪断形態、又はノッチICドメインをコードする発現ベクター、また所望の場合はノッチレポーター構築物を免疫系細胞にトランスフェクトすることが好適である。

【 0 0 4 1 】

好適な実施態様において本発明の方法は、

10

i) 免疫細胞におけるノッチシグナル伝達をさらなる作用因子で活性化し、また
ii) 候補モジュレーターが、上記ノッチシグナル伝達の活性化及び/又は免疫細胞の活性化を調節するかどうかを測定することからなる。

【 0 0 4 2 】

一実施態様でノッチシグナル伝達は、ノッチリガンド又はノッチリガンドの活性部分、例えばノッチリガンドECドメインで活性化されてもよい。ノッチリガンドは膜又は支持体に結合していることが好適である。

【 0 0 4 3 】

本発明のさらなる特徴として、特定の支持体マトリックスに結合したデルタリガンドの活性部分を有する粒子を提供する。

20

【 0 0 4 4 】

特定の支持体マトリックスがビーズであることが好ましい。ビーズは例えば磁気ビーズ(例; “Dynal” の商標名で市販)又はセファローズビーズ等のポリマー状ビーズが用いることができる。デルタリガンドの複数の活性部分が特定の支持体マトリックスに結合していることが好適である。

【 0 0 4 5 】

本発明のさらなる特徴として、本発明の方法により同定可能な、又は同定されたモジュレーターを提供する。

【 0 0 4 6 】

本発明のさらに別の特徴として、免疫系の疾患又は症状、或いは免疫系に関係のある疾患又は症状の治療用薬剤の調製における本発明モジュレーターの使用を提供する。疾患がT細胞に介在される疾患であることが好ましい。

30

【 0 0 4 7 】

本発明のさらに別の特徴として、治療有効量の本発明モジュレーター少なくとも1つと、薬学上許容される担体、希釈剤及び/又は賦形剤を含む医薬組成物を提供する。

【 0 0 4 8 】

ノッチシグナル伝達経路が、ノッチ受容体活性化能を有する作用因子で活性化されることが好ましい。モジュレーターは、ノッチリガンド又はノッチリガンドの生物的に活性な断片又は誘導体であることが好適である。ノッチリガンドは可溶性、又は細胞上に提示された、又は支持体に結合したもののいずれでもよい。

40

【 0 0 4 9 】

ノッチシグナル伝達経路のモジュレーターが、融合タンパク質を有するか、コードすることが好適である。例えば、かかるモジュレーターが、ノッチリガンドの細胞外ドメインのセグメント及び免疫グロブリンFcセグメントを有するか、コードしてもよい。

【 0 0 5 0 】

ノッチシグナル伝達経路のモジュレーターが、ノッチリガンドのDSLドメイン及び少なくとも1つのEGFドメイン又はそれらの断片、誘導体、ホモログ、アナログ又は対立変異体を含むタンパク質又はポリペプチドを有するか、コードすることが好適である。

【 0 0 5 1 】

ノッチシグナル伝達経路のモジュレーターが、ノッチリガンドのDSLドメイン、及び少

50

なくとも 1 ~ 20、好適には少なくとも 3 ~ 15、例えば少なくとも 3 ~ 8 の EGF 反復モチーフを有するか、コードすることが好ましい。かかる DSL 及び EGF 配列は哺乳類配列又はそれに相当する配列であることが好適である。好ましい配列にはヒト配列が含まれる。

【0052】

本発明のさらなる特徴として、デルタ DSL ドメイン及び少なくとも 1 つのデルタ EGF ドメインを有するタンパク質を含む粒子を提供する。かかるタンパク質に、特定の支持体マトリックスに結合したデルタ細胞外ドメイン又はその活性部分が含まれることが好適である。一実施態様で特定の支持体マトリックスはビーズである。複数のこれらタンパク質が特定の支持体マトリックスに結合していることが好ましい。

10

【0053】

或いは、又はさらに、ノッチシグナル伝達経路のモジュレーターには、ノッチ細胞内ドメイン (Notch IC) 又はその断片、誘導体、ホモログ、アナログ若しくは対立変異体、ノッチ細胞内ドメインをコードするポリヌクレオチド配列又はその断片、誘導体、ホモログ、アナログ若しくは対立変異体が含まれていてもよい。

【0054】

ノッチシグナル伝達経路のモジュレーターには、デルタ又はその断片、誘導体、ホモログ、アナログ若しくは対立変異体、或いはデルタをコードするポリヌクレオチド又はその断片、誘導体、ホモログ、アナログ若しくは対立変異体が含まれることが好適である。

【0055】

或いは、又はさらに、ノッチシグナル伝達経路のモジュレーターには、セラート/ジャグド又はその断片、誘導体、ホモログ、アナログ若しくは対立変異体、セラート/ジャグドをコードするポリヌクレオチド又はその断片、誘導体、ホモログ、アナログ若しくは対立変異体が含まれていてもよい。

20

【0056】

或いは、又はさらに、ノッチシグナル伝達経路のモジュレーターには、ノッチ又はその断片、誘導体、ホモログ、アナログ若しくは対立変異体、ノッチをコードするポリヌクレオチド又はその断片、誘導体、ホモログ、アナログ若しくは対立変異体が含まれていてもよい。

【0057】

或いは、又はさらに、ノッチシグナル伝達経路のモジュレーターには、ノッチシグナル伝達レプレッサーのドミナントネガティブバージョン、又はノッチシグナル伝達レプレッサーのドミナントネガティブバージョンをコードするポリヌクレオチドが含まれていてもよい。

30

【0058】

或いは、又はさらに、ノッチシグナル伝達経路のモジュレーターには、ノッチリガンド若しくはノッチシグナル伝達経路のダウンストリーム構成因子の発現や活性をアップレギュレートする能力をもつポリペプチド、又はかかるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが含まれていてもよい。

【0059】

ノッチシグナル伝達経路のモジュレーターには、抗体、抗体断片、抗体誘導体、又は抗体、抗体断片、抗体誘導体をコードするポリヌクレオチドが含まれていることが好適である。

40

【0060】

本発明のさらなる特徴として、

(a) 免疫細胞を活性化し、

(b) 上記細胞内におけるノッチシグナル伝達を活性化し、

(c) 遺伝子発現を観察し、また

(d) どの遺伝子がアップレギュレート又はダウンレギュレートされるかを測定する工程 (順不同) からなり、ノッチシグナル伝達活性化及び免疫細胞活性化の併用に反応して免

50

疫細胞内でアップレギュレートされる遺伝子を検出する方法を提供する。

【0061】

本発明のさらなる特徴として、

- (a) 免疫細胞を活性化し、
- (b) 上記細胞内におけるノッチシグナル伝達を活性化し、
- (c) 遺伝子発現を観察し、
- (d) 上記細胞において遺伝子発現がアップレギュレート又はダウンレギュレートされるかどうかを測定し、また
- (e) 工程(d)における遺伝子発現を、細胞が活性化されず又はノッチシグナル伝達が活性化されない対照と比較する

10

工程(順不同)からなり、ノッチシグナル伝達活性化又は免疫細胞活性化いずれか単独の場合に比べ、ノッチシグナル伝達活性化及び免疫細胞活性化の併用に反応して免疫細胞内でより顕著にアップレギュレート又はダウンレギュレートされる遺伝子を検出する方法を提供する。

【0062】

実施態様の1つにおいては、マイクロアレイを用いて遺伝子発現を観察し、好ましくは免疫細胞がT細胞である。

【0063】

本発明のさらなる特徴として、上述の方法により検出される遺伝子を提供する。

【0064】

20

本発明のさらなる特徴として、上述の方法により検出した遺伝子のモジュレーターを免疫疾患の治療に使用することを提供する。

【0065】

本発明のさらなる特徴として、

- (a) 免疫細胞の培養物を提供し、
- (b) ノッチシグナル伝達レポーター構築物を上記細胞にトランスフェクトし、
- (c) 任意で上記細胞に、ノッチ、構成的に活性な剪断形態のノッチ又はノッチICドメインをコードする核酸をトランスフェクトし、
- (d) 任意でノッチリガンドを提供し、
- (e) 試験に供する1若しくは2以上の化合物に上記細胞を暴露し、また
- (f) 試験に供する化合物に暴露した細胞と未暴露の細胞とにおけるノッチシグナル伝達の違いを測定する工程(順不同)からなるアッセイを提供する。

30

【0066】

本発明のさらなる特徴として、

- (a) 免疫細胞の培養物を提供し、
- (b) 任意でノッチシグナル伝達レポーター構築物を上記細胞にトランスフェクトし、
- (c) 上記細胞に、ノッチ、構成的に活性な剪断形態のノッチ又はノッチICドメインをコードする核酸をトランスフェクトし、
- (d) 任意でノッチリガンドを提供し、
- (e) 試験に供する1若しくは2以上の化合物に上記細胞を暴露し、また
- (f) 試験に供する化合物に暴露した細胞と未暴露の細胞とにおけるノッチシグナル伝達の違いを測定する

40

工程(順不同)からなるアッセイを提供する。

【0067】

アッセイに、免疫細胞を活性化するさらなる工程が含まれることが好ましい。

【0068】

サイトカインの産生、例えばIL-10、TNF、IFN、IL-5又はIL-13の産生を観察することによりノッチシグナル伝達を観察することが好適である。

【0069】

本発明のさらなる特徴として、

50

(i) ノッチシグナル伝達レポーター構築物、及び
(ii) ノッチ、構成的に活性な剪断形態のノッチ又はノッチ I C ドメインをコードする発現ベクターをトランスフェクトした免疫細胞を提供する。

【 0 0 7 0 】

本発明のさらなる特徴として、

(i) ノッチシグナル伝達レポーター構築物、及び
(ii) 構成的に活性な剪断形態のノッチをコードする発現ベクター
をトランスフェクトした免疫細胞を提供する。

【 0 0 7 1 】

本発明のさらなる特徴として、

(i) ノッチシグナル伝達レポーター構築物、及び
(ii) ノッチ I C ドメインをコードする発現ベクター
をトランスフェクトした免疫細胞を提供する。

【 0 0 7 2 】

免疫細胞は、安定にトランスフェクトすることが好ましい。

【 0 0 7 3 】

本発明のさらなる特徴として、分子量が約 1 0 0 0 未満の候補モジュレーターの存在下及び不在下で免疫系細胞におけるノッチシグナル伝達を観察し、前記候補モジュレーターがノッチシグナル伝達を調節するかどうかを測定する工程を含むノッチシグナル伝達モジュレーターを検出する方法を提供する。

【 0 0 7 4 】

本発明のさらなる特徴として、

(a) 分子量が約 1 0 0 0 未満の候補モジュレーターに免疫系細胞を接触させ、
(b) ノッチシグナル伝達を観察し、また
(c) 前記候補モジュレーターがノッチシグナル伝達を調節するかどうかを測定する
工程からなるノッチシグナル伝達モジュレーターを検出する方法を提供する。

【 0 0 7 5 】

候補モジュレーターの分子量が約 5 0 0 未満であることが好ましい。

【 0 0 7 6 】

非限定的実施例及び添付の図面を参照しながら、本発明の種々の好ましい特徴や実施態様をより詳細に以下に述べる。

【 0 0 7 7 】

別途特記しない限り本発明の実施には、当技術分野の専門家であれば実施可能な化学、分子生物学、微生物学、組換え D N A 及び免疫学における常法を採用する。かかる技術は文献に収載されている。J. Sambrook, E. F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Books 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F. M. et al. (1995 and periodic supplements; Current Protocols in Molecular Biology, ch. 9, 13, and 16, John Wiley & Sons, New York, N. Y.); B. Roe, J. Crabtree, and A. Kahn, 1996, DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques, John Wiley & Sons; J. M. Polak and James O'D. McGee, 1990, In Situ Hybridization: Principles and Practice; Oxford University Press; M. J. Gait (Editor), 1984, Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, Irl Press; and, D. M. J. Lilley and J. E. Dahlberg, 1992, Methods of Enzymology: DNA Structure Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA Methods in Enzymology, Academic Press. を参照のこと。一般的なこれらの教本を参考文献として添付する。

【 0 0 7 8 】

本発明は、ノッチシグナル伝達モジュレーターを検出するアッセイ法に関する。

【 0 0 7 9 】

ノッチシグナル伝達

ここに用いる「ノッチシグナル伝達」なる用語は、「ノッチシグナル伝達経路」なる表現

10

20

30

40

50

と同義であり、ノッチ受容体の活性化をもたらす、或いは活性化によってもたらされる（又は活性化を含む）1若しくは2以上の上流又は下流のイベントを指す。

【0080】

ノッチシグナル伝達経路は胚における二細胞期の運命決定を指示する。ノッチはショウジョウバエにおいて2種の異なるリガンドであるデルタとセラートの受容体として機能する膜透過タンパク質として初めて見い出された。脊椎動物は複数のノッチ受容体及びリガンドを発現する。これまでに少なくとも4種類のノッチ受容体（ノッチ1、ノッチ2、ノッチ3、ノッチ4）がヒト細胞で同定されている。

【0081】

ノッチタンパク質は、Furin様転換酵素により分解する単一のポリペプチド前駆体として合成される。Furin様転換酵素は2本のポリペプチド鎖をもたらす、かかるポリペプチド鎖は成熟受容体を形成すべくさらにプロセッシングされる。細胞膜に存在するノッチ受容体には、2つのノッチタンパク質分解産物であるヘテロダイマーが含まれ、その1つには細胞外ドメイン、膜透過ドメイン及び細胞内ドメインの一部からなるN末端断片が含まれ、他方には細胞ドメインの大部分が含まれる。受容体を活性化するノッチのタンパク質分解過程が生じ、Furin様転換酵素に促進される。

【0082】

ノッチ受容体は、36個までの上皮成長因子（EGF）様反復を有する細胞外ドメインと細胞膜ドメインとを有する膜透過サブユニットからなるジスルフィド様ヘテロダイマー分子として膜に挿入する。ノッチの細胞質ドメインcytoplasmicは、6個のアンキリンankyrin様反復、ポリグルタミンのストレッチ（OPA）及びPEST配列を有する。RAM23と名付けられたさらなるドメインがアンキリン反復の近傍に位置し、アンキリン様反復と同様に、ショウジョウバエのHairless [Su(H)] 及び脊椎動物のCBF1 (Tamura) の抑制因子として知られる転写因子との結合に関与している。ノッチリガンドはその細胞外ドメインにおいて、全てのノッチリガンドの特徴であるシステインリッチDSL (Delta-Serrate-Lag2) ドメインと共に複数のEGF様反復も示す (Atravanis-Tsakonas)。

【0083】

ノッチ受容体は、デルタ、セラート、スカブロウ (Scabrous) 等の細胞外リガンドが、ノッチの細胞外ドメインにおけるEGF様反復に結合することによって活性化される。デルタが活性化するためには分解が必要である。デルタはADAM ディスインテグリンメタロプロテアーゼ (disintegrin metalloprotease) Kuzbanianによって細胞表面で分解し、この分解現象により可溶性及び活性型のデルタが放出される。TAN-1としても知られ、細胞外ドメインが切断されているヒトノッチ1タンパク質の発癌性変異体は構造的に活性であり、T細胞リンパ性白血病に関与していることが明らかになっている。

【0084】

cdc10 / アンキリン細胞内ドメイン反復は、細胞内シグナル伝達タンパク質との物理的相互作用を促進する。最も顕著には、cdc10 / アンキリン反復は、Hairless [Su(H)] のサブプレッサーと相互作用を行う。Su(H) は、B細胞のEpstein-Barr virusに誘導される不死化に関与する哺乳類DNA結合タンパク質であるCプロモーター結合因子-1 [CBF-1] のショウジョウバエにおけるホモログである。少なくとも培養細胞においてSu(H) は、細胞質でcdc10 / アンキリン反復と会合し、ノッチ受容体とそのリガンドであるデルタと隣接細胞上で相互作用するのを受け、核内へと移行することが示されている。Su(H) は、数種の遺伝子のプロモーター内でみられる応答エレメントを有し、ノッチシグナル伝達経路における重要な下流タンパク質であることがわかっている。Su(H) の転写への関与はHairlessによって調節されと考えられている。

【0085】

ノッチ (Notch1C) の細胞内ドメインもまた直接的な核機能を有している (Lieber)。近年の研究により、ノッチの活性化には、ノッチの細胞内ドメインにおける6個のcdc10 / アンキリン反復が核に到達して転写活性に参加することが必要であることが実際に示されている。ノッチの細胞内尾部におけるタンパク質開裂部位はgly1743及びva

10

20

30

40

50

1 1 7 4 4 (部位 3 又は S 3 と呼ばれる) の間で同定されている (Schroeter) 。核への進入のためにNotchICを放出するタンパク質開裂過程はプレセニリン (Presenilin) 活性に依存する。

【 0 0 8 6 】

細胞内ドメインは核内で蓄積して、核内においてC S Lファミリータンパク質C B F 1 (Hairless、ショウジョウバエのS u (H)、線虫のL a g - 2) と転写活性複合体を形成することが示されている (Schroeter; Struhl) 。NotchIC - C B F 1 複合体は次に、b H L Hタンパク質H E S (split様のhairyエンハンサー) 1 及び 5 等の標的遺伝子を活性化する (Weinmaster) 。かかるノッチの機能は哺乳類ノッチホモログについても報告されている (Lu) 。

10

【 0 0 8 7 】

ノッチリガンドのデルタ又はセラート/ジャグド (Jagged) との結合に応答した場合にのみNotchICプロセッシングが生じる。ゴルジ (Munro; Ju) における発生期ノッチ受容体における翻訳後修飾は、2 種類のリガンドのどちらが細胞表面で発現されるかを少なくとも部分的に制御しているようである。ノッチ受容体は、Notch/Linモチーフに結合するグリコシルトランスフェラーゼ酵素であるフリンジ (Fringe) により、その細胞外ドメインにおいて修飾される。フリンジは、E G F 様反復にO 結合フコース基を付加することによってノッチを修飾する (Moloney; Bruckner) 。フリンジによる修飾はリガンド結合を回避するものではないが、リガンドに誘導されるノッチの構造変化に影響する可能性がある。また、フリンジの作用はノッチを修飾してノッチがセラート/ジャグドリガンドと機能的に相互作用を行うことを妨げるが、優先的にデルタと相互作用させることが近年の研究から示唆されている (Panin; Hicks) 。ショウジョウバエは単一のフリンジ遺伝子をもつが、脊椎動物は複数の遺伝子を発現することが知られている (Radical, Manic and Lunatic Fringes) (Irvine) 。

20

【 0 0 8 8 】

従ってノッチ受容体からのシグナルトランスダクションは種々の経路を介してもたらされる。よりよく定義された経路には、ノッチの細胞内ドメイン (NotchIC) のタンパク質開裂が含まれ、かかるドメインは核まで移動してC S Lファミリータンパク質のC B F 1 (ショウジョウバエのhairless、S u (H)、線虫のL a g - 2 の抑制因子) と転写活性複合体を形成する。NotchIC - C B F 1 複合体は次にb H L Hタンパク質H E S (split様のhairyエンハンサー) 1 及び 5 等の標的遺伝子を活性化する。ノッチはまた、細胞質亜鉛フィンガーを有するタンパク質Deltexを伴うC B F 1 非依存型様式でシグナルを送ることもできる (図 3) 。C B F 1 とは異なりDeltexはノッチ活性化を受けて核に移行することではなく、その代わりにG r b 2 と相互作用してR a s - J N Kシグナル伝達経路を調節する。

30

【 0 0 8 9 】

上述したとおり、ノッチの内因性モジュレーターはいくつか既に知られている。ノッチリガンドのデルタやセラートがその例である。本発明の目的は、新規ノッチシグナル伝達モジュレーターを見い出すことである。

【 0 0 9 0 】

40

候補モジュレーター

ここにおいて、「調節する」なる用語は、T細胞シグナル伝達経路又はその標的シグナル伝達経路における生物活性の変化若しくは改変を意味する。「モジュレーター」なる用語は、ノッチシグナル伝達におけるアンタゴニスト又はインヒビターを意味する。すなわち、ノッチシグナル伝達経路の正常な生物活性を阻害する、少なくともある程度まで阻害する化合物を意味する。便宜上かかる化合物を本発明においてはインヒビター又はアンタゴニストと称する。或いは、「モジュレーター」は、ノッチシグナル伝達のアゴニスト、すなわち、ノッチシグナル伝達経路の正常な生物活性を少なくともある程度まで刺激又はアップレギュレーションする化合物を意味する。便宜上かかる化合物をアップレギュレーター又はアゴニストと称する。

50

【0091】

「候補モジュレーター」なる用語は、ノッチシグナル伝達モジュレーターとして機能し得る、又はし得ると考えられる1若しくは2以上の分子に言及する場合に用いられる。かかる分子としては例えば有機「小分子」又はポリペプチドがある。これら分子やポリペプチドが候補分子に複数若しくはライブラリーとして含まれることが好適である。これらの分子は公知のモジュレーターに由来していてもよい。「由来する」とは、公知のノッチシグナル伝達モジュレーターである開始配列から完全に又は部分的に無作為抽出したポリペプチドがその候補モジュレーター分子に好ましくは含まれることを意味する。所定のパラメーターを使用するBLASTアルゴリズムを用いた場合に、1若しくは2以上の公知ノッチモジュレーター分子に対する候補分子の相同性を少なくとも40%有するポリペプチドが含まれることが最も好ましく、かかる相同性が少なくとも60%あることがより好ましく、少なくとも75%あることがより一層好ましく、又は例えば85%若しくは90%、ひいては95%を超える相同性を示すことがさらに一層好ましい。

【0092】

本発明の候補モジュレーターは、有機化合物又は他の化学物資であってよい。本実施態様では、候補モジュレーターは、2又は3以上のヒドロカルビル基をもつ有機化合物である。ここにおいて「ヒドロカルビル基」なる用語は、少なくとも炭素原子又は水素原子を含み、また任意に他の好適置換基を1若しくは2以上含む基を意味する。かかる置換基としては、ハロ基、アルコキシ基、ニトロ基、アルキル基、環式基などが例示される。置換基が環式基である可能性に加え、置換基の組合せが環式基を形成してもよい。ヒドロカルビル基が炭素原子を2個以上有する場合、それら炭素は必ずしも互いに結合していなくてもよい。例えば、炭素のうち少なくとも2個が適切なエレメント又は基を介して結合していてもよい。従ってヒドロカルビル基にヘテロ原子が含まれていてもよい。当業者には好適なヘテロ原子は明らかであり、硫黄、窒素及び酸素が例示される。候補モジュレーターには環式基が少なくとも一つ含まれていてもよい。環式基は、非融合多環式基等の多環式基であってもよい。別のヒドロカルビル基に結合した環式基が作用因子に少なくとも一つ含まれている適用例がいくつかある。

【0093】

好適実施態様の一つにおいて、候補化合物はアミノ酸配列又はその化学的誘導体、或いはそれらの組合せである。別の好適実施態様においては、候補化合物はヌクレオチド配列であり、かかるヌクレオチド配列はセンス配列若しくはアンチセンス配列のいずれでもよい。候補モジュレーターは抗体であってもよい。

【0094】

「抗体」なる用語には無処理の分子と共に、エピトープ決定基との結合能を有するFab、F(ab')₂、Fv及びscFv等、上記分子の断片が含まれる。これらの抗体断片には、その抗原又は受容体と選択的に結合する能力が保持され、以下のものが列举できる。

【0095】

(i) 抗体分子の一価抗原結合断片を含む断片Fabは、全抗体を酵素パパインで消化し、無処理のL鎖及び一本のH鎖の一部を得て作製できる。

(ii) 抗体分子の断片F(ab')₂は、全抗体をペプシン処理し、次いで還元することにより、無処理のL鎖及びH鎖の一部が作出されて得られる。抗体分子1個から2個のF(ab')₂断片を得る。

(iii) F(ab')₂は、全抗体を酵素ペプシンで処理し、その後還元させないで得られる抗体断片である。F(ab')₂は、2個のジスルフィド結合によって保持されるFab断片2個のダイマーである。

(iv) 融合1本鎖分子としてH鎖及びL鎖の可変領域を有する遺伝子工学的に得た断片を含むscFv。

【0096】

上述の断片を得る一般的な作製法については当技術分野で公知である(例えば本明細書に

参考として添付したHarlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1988) を参照のこと)。

【0097】

モジュレーターは合成化合物であっても自然に単離した化合物であってもよい。

【0098】

ノッチシグナル伝達に關与するタンパク質とは、ノッチ活性化、ノッチシグナル伝達経路の下流でのイベント、下流標的遺伝子の転写調節及び下流における他の非転写イベント（例えば既存タンパク質の翻訳後修飾）を含むシグナル伝達にノッチ受容体を介して参加する分子を意味する。より具体的には上記タンパク質は、ノッチシグナル伝達経路の標的遺伝子を活性化するドメイン、又はそれをコードするポリヌクレオチド配列である。

10

【0099】

ノッチシグナル伝達経路における非常に重要な構成因子はノッチ受容体/ノッチリガンドの相互作用である。従ってノッチシグナル伝達は、ノッチリガンド又は受容体又はそれらの分解産物の発現、性質、活性量の変化に關係している。またノッチシグナル伝達は、ノッチシグナル伝達経路膜タンパク質、Gタンパク質、プロテアーゼやキナーゼ（例；セリン/トレオニンキナーゼ）、フォスファターゼ、リガーゼ（例；ユビキチンリガーゼ）、グリコシルトランスフェラーゼの発現、性質、活性量の変化に關係している。或いはノッチシグナル伝達は、転写因子等のDNA結合エレメントの発現、性質、活性量の変化に關係している。

【0100】

本発明においてノッチシグナル伝達は特異的シグナル伝達を意味し、これは検出されたシグナルが、サイトカインシグナル伝達などのように有意の妨害若しくは競合要因からよりも、実質的に若しくは少なくともプレドミナントにノッチシグナル伝達経路から、好ましくはノッチ/ノッチリガンド相互作用からもたらされることを意味する。実施態様の1つにおいて「ノッチシグナル伝達」なる用語はサイトカインのシグナル伝達は意味しない。ノッチシグナル伝達経路については以下に詳述する。

20

【0101】

タンパク質やポリペプチドは「成熟」タンパク質の形態でも、又は融合タンパク質や前駆体等の大きなタンパク質でもよい。例えば、分泌配列又はリーダー配列又はプロ配列（HISオリゴマー、免疫グロブリンFc、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、FLAG等）を含む付加アミノ酸配列を有することが精製をする上で好都合である。同様にかかる付加配列は、組換えによる作製過程において安定性を増すために望ましい場合がある。かかる場合、最終産物を得るために付加配列が開裂（例えば化学的に又は酵素により）してもよい。しかし場合によっては、付加配列が所望の薬理学的プロフィールをも付与するものであってもよく（IgFc融合タンパク質の場合のように）、その場合、投与する際の最終産物に付加配列が存在するように除去されないことが好ましい。

30

【0102】

一実施態様においてノッチを活性化するノッチリガンドは細胞上又は細胞膜上（細胞由来が好適）で発現されてもよい。

【0103】

候補モジュレーターは合成化合物であっても自然に単離した化合物であってもよい。合成又は天然型モジュレーターの種々の例を以下に列挙する。

40

【0104】

候補モジュレーター：アンタゴニスト

ノッチシグナル伝達に対するアンタゴニストには、ノッチ、ノッチシグナル伝達経路又は1若しくは2以上のノッチシグナル伝達経路構成因子に対する阻害能を有する分子が全て含まれる。

【0105】

ノッチシグナル伝達を阻害する候補モジュレーターとしては、ノッチシグナル伝達の活性化能又は伝達能を有する化合物のドミナントネガティブ種が挙げられる。或いは、ノッチ

50

シグナル伝達の候補モジュレーターは、ノッチシグナル伝達の活性化能又は伝達能を有する化合物を抑制することができる。さらに別の実施態様では、モジュレーターはノッチシグナル伝達のインヒビターである。

【0106】

特にある実施態様においてモジュレーターは、ノッチ又はノッチリガンド発現を減少させ又は阻止する能力をもつ。このようなモジュレーターは、ノッチ又はノッチリガンド発現を減少させ又は阻止する核酸配列であってもよい。かかる内因性モジュレーターには、トール様受容体タンパク質ファミリー、IL-12、IFN-、TNF-等のサイトカイン、骨形成タンパク質(BMP)等の成長因子、BMP受容体やアクチビン類から選択されるポリペプチドをコードする核酸配列が含まれる。候補モジュレーターには上記いずれかの誘導体、断片、変異体、模倣体、アナログ及びホモログが含まれる。

10

【0107】

好適実施態様においてモジュレーターは、ノッチリガンドの発現を亢進させる能力をもつ化合物の産生を低減又は阻止するポリペプチド、又はかかるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドであることが好ましい。このタイプの内因性化合物には、Noggin、Chordin、Follistatin、Xnr3、線維芽細胞成長因子が含まれる。候補モジュレーターには、上記いずれかの誘導体、断片、変異体、模倣体、アナログ及びホモログが含まれる。

【0108】

或いはかかる核酸配列は、ノッチリガンド、又はNoggin、Chordin、Follistatin、Xnr3、線維芽細胞成長因子、それらの誘導体、断片、変異体及びホモログ等のノッチリガンドの発現をアップレギュレーションさせる能力をもつポリペプチドから選択されるポリペプチドをコードするセンスヌクレオチド配列由来のアンチセンス構築物である。

20

【0109】

別の好適実施態様でノッチシグナル伝達障害の候補モジュレーターは、ノッチ-ノッチリガンド相互作用の調節能をもつ分子である。ある分子がノッチとそのリガンドの相互作用を、好ましくは治療に奏功するに十分な程度に障害することができるとき、かかる分子はノッチ-ノッチリガンド相互作用を調節するとみなされる。かかる実施態様でモジュレーターは、トール様受容体、IL-12、IFN-、TNF-等のサイトカイン、BMP等の成長因子、BMP受容体やアクチビン類、それらの誘導体、断片、変異体、模倣体、ホモログ及びアナログから選択されるポリペプチド又はかかるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドであってよい。モジュレーターが、Noggin、Chordin、Follistatin、Xnr3、線維芽細胞成長因子、それらの誘導体、断片、変異体、模倣体、ホモログ及びアナログ等のノッチリガンドの発現を亢進させることができる作用因子の産生を低減又は阻止することが好ましい。

30

【0110】

モジュレーターが、受容体又は受容体をコードする核酸配列の場合、その受容体は活性化されることが好ましい。従って例えば、作用因子が核酸配列の場合、その受容体は発現されると構成的に活性となる。

【0111】

ノッチシグナル伝達障害のモジュレーターには、ノッチシグナル伝達経路のダウンストリームモジュレーター(例; Dsh、Numb、及びそれらの誘導体、断片、変異体、模倣体、ホモログ、アナログなど)、ノッチ標的遺伝子の発現を回避し、又はノッチシグナル伝達経路に抑制される遺伝子発現を誘導する化合物、及びノッチシグナル伝達分子のドミナントネガティブバージョン(Notch IC、Deltex、及びそれらの誘導体、断片、変異体、模倣体、ホモログ、アナログなど)ノッチシグナル伝達を障害するタンパク質には、シグナル伝達経路を伝達するよりむしろブロックするように修飾したノッチシグナル伝達経路の野生型構成因子の変異体もまた含めるものとする。かかるモジュレーターの例としては、細胞内ドメインのタンパク質分解が最早不可能となるように修飾されたノッチ受容体が挙げられる。

40

【0112】

50

候補モジュレーター：アゴニスト

ノッチシグナル伝達のアゴニストには、ノッチ、ノッチシグナル伝達経路、又は1若しくは2以上のノッチシグナル伝達経路構成因子をアップレギュレートできる分子であれば全て含まれる。ノッチシグナル伝達経路をアップレギュレーションする候補モジュレーターには、ノッチシグナル伝達経路の伝達能や活性化能を有する化合物が含まれる。

【0113】

ノッチシグナル伝達モジュレーターには、ノッチ活性化、ノッチシグナル伝達経路のダウンストリームイベント、ダウンストリーム標的遺伝子の転写調節及び他の非転写ダウンストリームイベント（例えば既存タンパク質の翻訳後修飾）を含むシグナル伝達にノッチ受容体を介して参加する分子が含まれる。より具体的には、かかるモジュレーターはノッチシグナル伝達経路の標的遺伝子を活性化させる。

10

【0114】

本発明の特徴の1つとしてモジュレーターはノッチのポリペプチド若しくはポリヌクレオチド、又はノッチ又はノッチアナログのシグナル伝達能を保持する上記ポリペプチド若しくはポリヌクレオチドの断片、変異体、誘導体、模倣体又はホモログであってよい。本発明でノッチという場合、ノッチ1、ノッチ2、ノッチ3、ノッチ4及びこれら以外のノッチのホモログやアナログのことを指す。ノッチのアナログには、EBNA2、BARF0、LMP2A等のEpstein Barr virus (EBV) 由来のタンパク質が含まれる。特に好適な実施態様では、モジュレーターはノッチ細胞内ドメイン (NotchIC) 又はそのサブ断片、変異体、誘導体、模倣体、アナログ又はホモログである。

20

【0115】

ノッチシグナル伝達を活性化するモジュレーターには、ノッチ、ノッチシグナル伝達経路、又はノッチシグナル伝達経路の1若しくは2以上の構成因子を活性化することができる分子が含まれる。

【0116】

上記モジュレーターとしては、ノッチシグナル伝達レプレッサーのドミナントネガティブバージョンでもよい。別の実施態様においてモジュレーターは、ノッチシグナル伝達レプレッサーに対する阻害能を有する。さらに別の実施態様ではノッチシグナル伝達活性化のモジュレーターはノッチシグナル伝達のポジティブアクチベーターである。

【0117】

ある実施態様においてモジュレーターは、ノッチ又はノッチリガンドの発現を誘導又は亢進する能力を有する。かかる分子としては、ノッチ又はノッチリガンドの発現を誘導又は亢進する能力を有する核酸配列でもよい。

30

【0118】

一実施態様でモジュレーターは、標的細胞においてノッチ又はノッチリガンドをコードする内因性遺伝子の発現をアップレギュレーションすることができる。かかるモジュレーターは特に、標的細胞において内因性ノッチ又はノッチリガンドの発現をアップレギュレーションすることができる免疫抑制サイトカイン、又はこのようなサイトカインをコードするポリヌクレオチドであってよい。免疫抑制サイトカインにはIL-4、IL-10、IL-13、TGF- β 及びFLT3リガンドが含まれる。従って候補モジュレーターにはさらに上記いずれかの断片、誘導体、変異体、模倣体、アナログ及びホモログが含まれる。

40

【0119】

内因性アゴニストとしては、Noggin、Chordin、Follistatin、Xnfr3、線維芽細胞成長因子が列挙できる。従って候補モジュレーターには、それらの誘導体、断片、変異体、模倣体、アナログ及びホモログ、或いは上記の1若しくは2以上をコードするポリヌクレオチドが含まれる。

【0120】

別の実施態様では、かかるモジュレーターはノッチリガンド、又はノッチリガンドをコードするポリヌクレオチドであってよい。ノッチリガンドには、造血幹細胞を例とする種々

50

の哺乳類細胞の膜上に存在するノッチ受容体ポリペプチドとの結合能を一般的に有する内因性ノッチリガンドが含まれる。これまでに同定されている哺乳類ノッチリガンドの具体例としては、デルタ又はデルタ様1 (Genbank Accession No. AF003522-Homo sapiens)、デルタ3 (Genbank Accession No. AF084576-Rattus norvegicus) 及びデルタ様3 (Mus musculus) (Genbank Accession No. NM_016941-Homo sapiens)、及び米国特許第6 121 045号 (Millennium)、デルタ4 (Genbank Accession Nos. AB043894 and AF253468-Homo sapiens)、及び例えばセラート1とセラート2 (WO 97 / 01571、WO 96 / 27610、WO 92 / 19734) のセラートファミリー、ジャグド1 (Jagged-1) (Genbank Accession No. U73936-Homo sapiens) 及びジャグド2 (Genbank Accession No. AF029778-Homo sapiens)、及びLAG-2が挙げられる。ファミリーメンバー間における相同性は高い。

10

【0121】

実施態様の1つにおいてモジュレーターは、構成的に活性なノッチ受容体又はノッチ細胞内ドメイン、又はかかる受容体や細胞内ドメインをコードするポリヌクレオチドである。

【0122】

別の実施態様でノッチシグナル伝達のもジュレーターは、ノッチ受容体のダウストリームで機能する。従って、例えばノッチシグナル伝達のアクチベーターは、構成的に活性なDeltexポリペプチド又はかかるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドであってよい。ノッチシグナル伝達経路の他のダウストリーム構成因子には、Deltex-1、Deltex-2、Deltex-3、Deltexのサブレッサー (S u D x)、Numb及びそのアイソフォーム、Numb会合キナーゼ (N A K)、Notchless、Dishevelled (D s h)、emb 5、フリンジ遺伝子 (Radical、Lunatic及びManic等)、P O N、L N X、Disabled、Numlike、N u r 7 7、N F k B 2、Mirror、Warthog、Engrailed-1 及びEngrailed-2、Lip-1及びそれらのホモログ、Deltexに調節されるR a s / M A P Kカスケードに関与するポリペプチド、ノッチのタンパク質分解に関与するプレセニリン (Presenilin) 等のポリペプチド、ノッチの標的遺伝子の転写調節に関与するポリペプチドが含まれる。従って本発明に用いる候補モジュレーターには、上記いずれかの構成的に活性な形態、それらのアナログ、ホモログ、誘導体、変異体、模倣体及び断片が含まれる。

20

【0123】

ノッチシグナル伝達を活性化するモジュレーターはまた、ノッチが活性化される結果として発現されるポリペプチド、かかるポリペプチドの発現に関与するポリペプチド、かかるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの全てを指す。

30

【0124】

ノッチシグナル伝達の活性化は、ノッチシグナル伝達経路のインヒビターを抑制することによっても達成される。その場合、候補モジュレーターにはノッチシグナル伝達インヒビターを抑制できる分子が含まれる。かかる分子としては、ノッチ、ノッチリガンド又はノッチシグナル伝達経路のダウストリーム構成因子の発現を減少させることができる化合物の産生や活性を低減又は妨害するポリペプチドや、かかるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドであることが好ましい。好適実施態様の1つにおいて上記モジュレーターは、トール様受容体タンパク質ファミリー、I L - 1 2、I F N - 、T N F - 等のサイトカイン、骨形成タンパク質 (B M P) 等の成長因子、B M P受容体やアクチビン類のポリペプチドを抑制する能力をもつ。

40

【0125】

ノッチシグナル伝達に関与するポリペプチド及びポリヌクレオチド

ノッチシグナル伝達経路は胚における二細胞期の運命決定を指示する。ノッチはショウジョウバエにおいて2種の異なるリガンドであるデルタとセラートの受容体として機能する膜透過タンパク質として初めて見いだされた。脊椎動物は複数のノッチ受容体及びリガンドを発現する (後述する)。これまでに少なくとも4種類のノッチ受容体 (Notch-1、Notch-2、Notch-3、Notch-4) がヒト細胞で同定されている (例として、GenBank Accession Nos. AF308602, AF308601, U95299 - Homo sapiensを参照)。

50

【0126】

ノッチタンパク質は、フーリン (Furin) 様転換酵素により分解する単一のポリペプチド前駆体として合成される。フーリン様転換酵素は2本のポリペプチド鎖をもたらし、かかるポリペプチド鎖は成熟受容体を形成すべくさらにプロセシングされる。細胞膜に存在するノッチ受容体には、2つのノッチタンパク質分解産物であるヘテロダイマーが含まれ、その1つには細胞外ドメイン、膜透過ドメイン及び細胞内ドメインの一部からなるN末端断片が含まれ、他方には細胞ドメインの大部分が含まれる。受容体を活性化するノッチのタンパク質分解過程は、ゴルジ装置で生じ、フーリン様転換酵素に促進される。

【0127】

ノッチ受容体は、36個までの上皮成長因子 (EGF) 様反復 [Notch1 / 2 = 36、Notch3 = 34、Notch4 = 29] を有する細胞外ドメイン、3個のシステインリッチ反復 (Lin-Notch (L/Nリピート)、及び細胞膜ドメインを有する膜透過サブユニットからなるジスルフィド結合ヘテロダイマー分子として膜に挿入する。ノッチの細胞質ドメインは、6個のアンキリン (ankyrin) 様反復、ポリグルタミンのストレッチ (OPA) 及びPEST配列を有する。RAM23と名付けられたさらなるドメインがアンキリン反復の近傍に位置し、ショウジョウバエのHairless [Su(H)] 及び脊椎動物のCBF1 (Tamura) のサプレッサーとして知られる転写因子との結合に関与している。ノッチリガンドはその細胞外ドメインにおいて、全てのノッチリガンドの特徴であるシステインリッチDSL (Delta-Serrate Lag2) ドメインと共に複数のEGF様反復も示す (Artavanis-Tsakonas)。

10

20

【0128】

ノッチ受容体は、デルタ、セラート、スカブロウ (Scabrous) 等の細胞外リガンドが、ノッチの細胞外ドメインにおけるEGF様反復に結合することによって活性化される。デルタが活性化するためには分解が必要である。デルタはADAM ディスインテグリンメタロプロテアーゼ (disintegrin metalloprotease) Kuzbanianによって細胞表面で分解し、この分解現象により可溶性及び活性型のデルタが放出される。TAN-1としても知られ、細胞外ドメインが切断されているヒトノッチ1タンパク質の発癌性変異体は構造的に活性であり、T細胞リンパ性白血病に関与していることが明らかになっている。

【0129】

cdc10 / アンキリン細胞内ドメイン反復は、細胞内シグナル伝達タンパク質との物理的相互作用を促進する。最も顕著には、cdc10 / アンキリン反復は、Hairless [Su(H)] の抑制因子と相互作用を行う。Su(H) は、B細胞のEpstein-Barr virusに誘導される不死化に関与する哺乳類DNA結合タンパク質であるCプロモーター結合因子-1 [CBF-1] のショウジョウバエにおけるホモログである。少なくとも培養細胞においてSu(H) は、細胞質でcdc10 / アンキリン反復と会合し、ノッチ受容体とそのリガンドであるデルタと隣接細胞上で相互作用するのを受け、核内へと移行することが示されている。Su(H) は、数種の遺伝子のプロモーター内でみられる応答エレメントを有し、ノッチシグナル伝達経路における重要なダウンストリームタンパク質であることがわかっている。Su(H) の転写への関与はHairlessによって調節されと考えられている。

30

40

【0130】

ノッチ (Notch1C) の細胞内ドメインもまた直接的な核機能を有している (Lieber)。近年の研究により、ノッチの活性化には、ノッチの細胞内ドメインにおける6個のcdc10 / アンキリン反復が核に到達して転写活性に参加することが必要であることが実際に示されている。ノッチの細胞内尾部におけるタンパク質開裂部位はgly1743及びval1744 (部位3又はS3と呼ばれる) の間で同定されている (Schroeter)。核への進入のためにcdc10 / アンキリン反復を放出するタンパク質開裂過程はプレセニリン (Presenilin) 活性に依存する。

【0131】

細胞内ドメインは核内で蓄積して、核内においてCSLファミリータンパク質CBF1 (

50

Hairless、ショウジョウバエの *Su(H)*、線虫の *Lag-2*) と転写活性複合体を形成することが示されている (Schroeter; Struhl)。NotchIC - CBF1 複合体は次に、bHLH タンパク質 *HEs* (split 様の hairy エンハンサー) 1 及び 5 等の標的遺伝子を活性化する (Weinmaster)。かかるノッチの機能は哺乳類ノッチホモログについても報告されている (Lu)。

【0132】

ノッチリガンドのデルタ又はセラート/ジャグド (Jagged) との結合に応答した場合にのみ S3 プロセッシングが生じる。ゴルジにおける発生期ノッチ受容体における翻訳後修飾 (Munro; Ju) は、2 種類のリガンドのどちらが細胞表面で発現されるかを少なくとも部分的に制御しているようである。ノッチ受容体は、Notch/Lin モチーフに結合するグリコシルトランスフェラーゼ酵素であるフリンジ (Fringe) により、その細胞外ドメインにおいて修飾される。フリンジは、EGF 様反復に O 結合フコース基を付加することによってノッチを修飾する (Moloney; Bruckner)。フリンジによる修飾はリガンド結合を回避するものではないが、リガンドに誘導されるノッチの構造変化に影響する可能性がある。また、フリンジの作用はノッチを修飾してノッチがセラート/ジャグドリガンドと機能的に相互作用を行うことを妨げるが、優先的にデルタと結合させることが近年の研究から示唆されている (Panin; Hicks)。ショウジョウバエは単一のフリンジ遺伝子をもつが、脊椎動物は複数の遺伝子を発現することが知られている (Radical, Manic and Lunatic Fringes) (Irvine)。

10

【0133】

ノッチ受容体からのシグナル伝達は 2 種類の異なる経路を介してもたらされる (図 1)。よりよく定義された経路には、ノッチの細胞内ドメイン (NotchIC) のタンパク質開裂が含まれ、かかるドメインは核まで移動して CSL ファミリータンパク質の CBF1 (ショウジョウバエの Hairless、*Su(H)*、線虫の *Lag-2* の抑制因子) と転写活性複合体を形成する。NotchIC - CBF1 複合体は次に bHLH タンパク質 *HEs* (split 様の hairy エンハンサー) 1 及び 5 等の標的遺伝子を活性化する。ノッチはまた、細胞質亜鉛フィンガーを有するタンパク質 Deltex を伴う CBF1 非依存型様式でシグナルを送ることもできる。CBF1 とは異なり Deltex はノッチ活性化を受けて核に移行することではなく、その代わりに Grb2 と相互作用して Ras - JNK シグナル伝達経路を調節する。

20

【0134】

従ってノッチ受容体からのシグナル伝達は 2 種類の異なる経路を介して生じる。それらの経路を図 1 に図示する。ノッチシグナル伝達経路の標的遺伝子には Deltex、*He s* ファミリー遺伝子 (特に *He s - 1*)、Split のエンハンサー [*E(spl)*] 複合体遺伝子、IL - 10、CD - 23、CD - 4 及び D11 - 1 が含まれる。

30

【0135】

細胞内結合タンパク質の Deltex は、その相互作用部位を離れる際に *Su(H)* をノッチの細胞内尾部と置き換える。Deltex は亜鉛フィンガーをもつ細胞質タンパク質である (Artavanis-Tsakonas; Osborne)。Deltex はノッチの細胞内ドメインにおけるアンキリン反復と相互作用を行う。Deltex が Grb2 との相互作用により Ras - JNK シグナル伝達経路を調節し、ノッチ経路活性化を促進することが研究の結果示されている (Matsuno)。Deltex はまた *Su(H)* がノッチ細胞内尾部と結合することを阻止する結合タンパク質としても作用する。従って *Su(H)* は核内へと放出され、核内において転写モジュレーターとして作用する。脊椎動物の B 細胞系において *Su(H)* ホモログの CBF1 よりむしろ Deltex の方が E47 機能を阻止することに関与していることが近年の研究結果から示唆されている (Ordentlich)。ポジティブフィードバックループにおいてノッチが活性化される結果、Deltex の発現がアップレギュレートされる。ヒト Deltex (DTX1) mRNA の配列は、GenBank Accession No. AF053700 に登録されている。

40

【0136】

He s - 1 (Split-1 の Hump エンハンサー) (Takebayashi) は基本的なヘリックス - ループ - ヘリックス構造を有する転写因子である。*He s - 1* は CD4 サイレンサーにおける

50

重要な機能部位に結合し、C D 4 遺伝子発現を抑制する。従ってH e s - 1 はT細胞の運命決定に深く関与している。H e s ファミリーの他の遺伝子には、H e s - 5 (Splitホモログの哺乳類エンハンサー)とH e s - 3 が含まれ、H e s - 5 の発現もまたノッチ活性化によりアップレギュレーションされる。H e s - 1 の発現はノッチが活性化されることによりアップレギュレートされる。Mus musculus H e s - 1 の配列はGenBankに登録番号D 1 6 4 6 4 として登録されている。

【0137】

E (s p l) 遺伝子複合体 [E (s p l) - C] (Leimeister) には7種の遺伝子が含まれるが、そのうちE (s p l) とGrouchoだけが変異体となったときに目に見える表現型を示す。E (s p l) は、そのSplit変異を増強する能力から命名され、Splitはノッチの別名である。実際E (s p l) - C 遺伝子は、achaete - scute複合遺伝子発現を調節することによりデルタを抑制する。E (s p l) の発現は、ノッチが活性化する結果としてアップレギュレーションされる。

10

【0138】

インターロイキン - 1 0 (I L - 1 0) は、T h 1 細胞によるサイトカインの産生を抑制する能力をもち、T h 2 細胞が産生する因子として最初にマウスで特徴付けられた。その後、マクロファージ、角化細胞、B細胞、T h 0、及びT h 1 細胞など、他の種々の細胞型によってI L - 1 0 が産生されることが明らかになった。I L - 1 0 は、ウイルス性I L - 1 0 と命名されているEpstein-Barr b c r f 1 遺伝子と高い相同性を示す。I L - 1 0 の免疫刺激効果は僅かなりとも報告されてはいるが、主として免疫抑制サイトカインとして位置づけられている。I L - 1 0 によるT細胞応答の阻害は、主として抗原提示細胞の補機能が減少することによって促進される。I L - 1 0 は、マクロファージが多数の前炎症性サイトカインを産生することを抑制し、共刺激分子及びM H C クラスIIの発現を阻害することが明白に報告されている。I L - 1 0 はまた、好中球及びエオシン好性白血球等の他の脊髄細胞に対して抗炎症効果を発揮する。B細胞上においてI L - 1 0 はアイソタイプのスイッチング及び増殖に影響する。さらに近年になって、I L - 1 0 が調節性T細胞の誘導に関与し、調節性T細胞の抑制効果に対するメディエーターである可能性が報告された。I L - 1 0 がノッチシグナル伝達経路にとって直接的なダウンストリーム標的であるか否かは明らかでないが、その発現はノッチの活性化に伴って著しくアップレギュレートされることが見い出されている。I L - 1 0 のm R N A 配列は、GenBankにG I 1 0 4 1 8 1 2 として登録されている。

20

30

【0139】

C D 2 3 は、ヒト白血球分化抗原C D 2 3 (F C E 2) のことであり、B細胞の活性化及び増殖にとって肝要な分子である。C D 2 3 はI g E に対し、低親和性受容体である。また、切断化分子が分泌されて潜在的な分裂成長因子として機能する。C D 2 3 の配列は、GenBankにG I 1 7 8 3 3 4 4 として登録されている。

【0140】

D l x - 1 (distalless - 1) (McGuiness) の発現はノッチ活性化に伴いダウンレギュレートされる。D l x 遺伝子の配列は、GenBankにU 5 1 0 0 0 - 3 として登録されている。

40

【0141】

C D 4 の発現はノッチ活性化に伴いダウンレギュレートされる。C D 4 抗原の配列は、GenBankにX M 0 0 6 9 6 6 として登録されている。

【0142】

ノッチシグナル伝達経路に関与する上述以外の遺伝子 (例えばNumb、Mastermind、D s h)、及びその発現がノッチ活性化により調節される全ての遺伝子は本発明の範囲に含まれる。

【0143】

ノッチシグナル伝達を活性化するポリペプチド及びポリヌクレオチド

これまでに同定されている哺乳類ノッチリガンドの具体例としては、デルタ1 (Genbank

50

Accession No. AF003522-Homo sapiens)、デルタ3 (Genbank Accession No. AF084576-Rattus norvegicus) 及びデルタ様3 (Mus musculus) などのデルタファミリー、セラート1 及びセラート2 (WO 97/01571、WO 96/27610、WO 92/19734) などのセラートファミリー、ジャグド1 (Jagged-1) 及びジャグド2 (Genbank Accession No. AF029778-Homo sapiens)、並びにLAG-2が挙げられる。ファミリーメンバー間における相同性は高い。例えばヒトジャグド2はセラートに対し、同一性が40.6%、類似性が58.7%である。

【0144】

標準的手法を用いて既知の哺乳類ノッチリガンドのさらなるホモログを同定してもよい。「ホモログ」なる用語は、例えば上述したもののようにより既知のノッチリガンドのいずれかとの配列ホモロジー(アミノ酸若しくは核酸配列のホモロジーのどちらか)を示す遺伝子産物を意味する。通常、既知ノッチリガンドのホモログは、かかる既知ノッチリガンドにおいて少なくとも10、好ましくは少なくとも20、好ましくは少なくとも50、好適には少なくとも100アミノ酸長の配列、或いは上記ノッチリガンド配列の全長において、アミノ酸レベルで少なくとも20%、好ましくは少なくとも30%一致する。2若しくは3以上のアミノ酸若しくは核酸配列間の配列ホモロジーを計算する方法又はソフトウェアは当技術分野で公知である(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> www.ncbi.nlm.nih.gov. 及び Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (1995), John Wiley & Sons, Inc.を参照)。

10

【0145】

これまでに同定されているノッチリガンドには、同タンパク質のアミノ末端に、20~22アミノ酸からなる診断用DSLドメイン(D. Delta, S. Serate, L. Lag2)が、またその細胞外表面に14個以下若しくはそれ以上のEGF様反復が存在する。従って、ノッチリガンドのホモログには、N末端にDSLドメイン、細胞外表面に14個以下若しくはそれ以上のEGF様反復が含まれることが好ましい。

20

【0146】

さらにノッチリガンドの好適ホモログは、ノッチ受容体への結合能を有する。インビトロ結合アッセイ等の当技術分野で公知の種々の方法により結合を調べることができる。

【0147】

ノッチリガンドのホモログは多数の方法で同定することができ、例えば中程度から高度なストリンジェンシー下(例えば、約50~約60にて0.03Mの塩化ナトリウム及び0.03Mのクエン酸ナトリウム)において、ノッチリガンドをコードする核酸の全部又は一部を含むプローブを用いてゲノムライブラリー又はcDNAライブラリーをプローブする方法が挙げられる。或いは、保存アミノ酸配列をコードする変異体やホモログ内の配列を標的とするように設計したプライマーを一般に用いる変性PCRを用いてホモログを得てもよい。かかるプライマーには1若しくは2以上の変性部分が含まれ、既知配列に対する単一配列プライマーを用いて配列をクローニングする際の条件より緩やかなストリンジェンシー条件で使用する。

30

【0148】

ポリペプチド物質は、適当な宿主細胞で組換え発現させて得た哺乳類細胞、又は市販の哺乳類細胞から精製してよい。或いは、ポリペプチドをコードする核酸構築物を用いてもよい。さらなる実施例として、セラートやデルタ遺伝子等の内因性遺伝子を活性化できる核酸構築物を導入することにより、ノッチ、又はデルタやセラート等のノッチリガンドを過剰発現させてもよい。特に、標的細胞のゲノムにおいてセラートやデルタプロモーター等の天然型プロモーターの場所に異種プロモーターを挿入する異種組換えを行うことにより遺伝子を活性化させることができる。

40

【0149】

本発明の活性化分子は、別の実施態様においてノッチタンパク質の発現若しくは細胞膜上での提示、又はシグナル伝達経路を調節する能力をもつ。標的細胞表面において完全に機能的なノッチタンパク質の提示を強化する薬剤には、ショウジョウバエのKuzbanian遺伝

50

子産物及び他のADAMALYSIN遺伝子ファミリーメンバー等のマトリックスメタロプロテイナーゼが含まれる。

【0150】

ノッチシグナル伝達を阻害するポリペプチド及びポリヌクレオチド

好適核酸配列には、例えばノッチリガンド発現のアップレギュレーション因子の発現を減少させ若しくは阻害するように設計したアンチセンス構築物と並び、アンチセンスノッチリガンド構築物をコードする核酸配列などのアンチセンス構築物が含まれる（上記を参照）。アンチセンス核酸は合成1本鎖DNA等のオリゴヌクレオチドでもよい。しかしアンチセンスが、遺伝的ベクターの導入により患者自身の細胞で産生されるアンチセンスRNAであることがより好ましい。かかるベクターは、宿主細胞へのベクター導入後における所望の特異性をもつアンチセンスRNAの産生に關与している。

10

【0151】

好ましくは本発明に用いる核酸配列はセラート及びデルタ、好ましくは樹状細胞等のAPCsにおいてデルタ1、デルタ3及びデルタ4の発現と共にセラート1及びセラート2の発現を阻害する能力をもつ。特にかかる核酸配列はAPCs又はT細胞においてセラートの発現阻害能を有しても、デルタ発現に対する阻害能はもたず、又はデルタの発現阻害能を有しても、セラート発現に対する阻害能はもたない。或いは本発明に用いる核酸配列は、CD4⁺ヘルパーT細胞等のT細胞又はデルタを発現する他の免疫系細胞（例えば細胞表面受容体による刺激に応答して）におけるデルタ発現に対する阻害能を有する。特に、T細胞において核酸配列はデルタ発現を阻害する能力を有してもよいが、セラート発現を阻害することはできない。特に好適な実施態様では核酸配列が、T細胞とAPCsの両方においてノッチリガンド発現を、例えばAPCsでセラート発現を、T細胞においてデルタ発現を阻害できる。

20

【0152】

ノッチシグナル伝達を阻害する分子にも、細胞膜上やシグナル伝達経路におけるノッチタンパク質の発現又は提示を調節する能力をもつポリペプチド又はかかるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが含まれる。完全に機能的な細胞膜タンパク質としての提示を低減又は阻止する分子には、ヒドロキシム酸に基づくインヒビター等のMMP阻害剤が含まれる。

【0153】

ノッチとノッチリガンドとの間の相互作用を低減させるのに用いる物質としては他にも外因性ノッチ若しくはノッチリガンド又はそれらの機能的誘導体がある。このようなノッチリガンド誘導体は、N末端にDSLドメインを有することが好ましく、細胞外表面において約14個まで、又はそれを超える、例えば約3～8個のEGF様反復を有することが好ましい。ヒトジャグド1のデルタ/セラート/LAG-2ドメインに相当するペプチド、及びヒトジャグド1の細胞外部分の可溶形態を発現するCOS細胞から得た上清は、ノッチ1の阻害においてジャグド1の効果を模倣することが判明している（Li）。

30

【0154】

他のノッチシグナル伝達経路アンタゴニストには、ノッチシグナル伝達経路の構成因子間の相互作用を阻害する抗体、例えばノッチリガンドに対する抗体が含まれる。

40

【0155】

ある物質が、ノッチ-ノッチリガンド発現の調節に用いることができるかどうかについては適当なスクリーニングアッセイにより調べられる。

【0156】

ノッチシグナル伝達はプロテインアッセイ又は核酸アッセイにより観察できる。ノッチ受容体の活性化により、その細胞質ドメインにタンパク質開裂が生じ、細胞核へと移入する。ここにおける「検出可能なシグナル」とは、ノッチの開裂した細胞内ドメインの存在に起因する検出可能な発現のことである。従ってノッチシグナル伝達の亢進は、開裂したノッチドメインの細胞内濃度を測定することによりタンパク質レベルでの検定が可能である。ノッチ受容体の活性化もまた一連のダウンストリームでの反応を触媒し、よく定義され

50

た遺伝子の発現レベルの変化をもたらす。従って、ノッチシグナル伝達の亢進は、例えば特異的 mRNA の細胞内濃度を測定することにより、核酸レベルで検定することができる。本発明の一好適実施態様で行うアッセイはプロテインアッセイである。本発明の一好適実施態様で行うアッセイは核酸アッセイである。

【0157】

核酸アッセイを採用する利点は、このアッセイが高感度であり、小試料の分析も可能だという点にある。

【0158】

所定の時間に測定する特定 mRNA の細胞内濃度は、その時間における相当遺伝子の発現レベルを反映するものである。従って、ノッチシグナル伝達経路のダウンストリーム標的遺伝子の mRNA レベルは、免疫系 T 細胞の間接的アッセイを行うことによって測定できる。例えば、Deltex、HES - 1 及び / 又は IL - 10 の mRNA は例えばアレルギーの誘導を示し、IFN - mRNA、又は IL - 2、IL - 5、IL - 13 等のサイトカインをコードする mRNA のレベルは応答性の向上を示す。

10

【0159】

本発明において同定した多くの化合物は薬剤開発に有用なリード化合物である。有用なリード化合物には、抗体やペプチドが含まれ、遺伝子療法の意味するところにおいて細胞内で発現される細胞内抗体も含まれ、ペプチド又は低分子量治療薬の開発用モデルとして用いられる。本発明の好適な特徴として、リード化合物において認められた相互作用を模倣する好適低分子量化合物の設計を容易にするため、リード化合物及びノッチ受容体若しくはノッチリガンド、又は他の標的ペプチドを共結晶化してもよい。

20

【0160】

T 細胞シグナル伝達経路の調節能をもつ化合物及び / 又は標的分子を種々の薬剤スクリーニング法のいずれかで同定するのに、1 若しくは 2 以上の適切な標的（アミノ酸配列及び / 又はヌクレオチド配列など）を使用する。かかる試験に使用する標的は、溶液中で遊離の状態、固体支持体に固定させた状態、細胞表面に担持されている状態、又は細胞内に局在する状態のいずれであってもよい。

【0161】

本発明はまた、標的への結合能を有する中和抗体が標的に特異的に結合する際に、かかる結合に関して試験化合物と競合させるという競合的薬剤スクリーニングアッセイの使用も意図するものである。

30

【0162】

ノッチシグナル伝達経路の構成因子に対する結合能及び / 又は調節能を有する抗体、ペプチド模倣体及び小有機分子等の薬剤をスクリーニングし開発する方法は当技術分野で公知である。これらの方法には、シグナル伝達タンパク質を発現させるファージ提示系を使用するもの、トランスフェクトさせた大腸菌や他の微生物の培養物を用いて結合能及び / 又は調節能をもつ化合物を調べるものが含まれる（例として、G. Cesarini, FEBS Letters, 307 (1): 66-70 (July 1992); H. Gram et al., J. Immunol. Meth., 161: 169-176 (1993); and C. Summer et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89: 3756-3760 (May 1992) を参照）。さらなるライブラリー及びスクリーニング法が例えば米国特許第 6 2 8 1 3 4 4 号（Phyllos）に記載されている。

40

【0163】

ノッチリガンド

上述したとおり、ノッチリガンドは多数の異なるドメインを有する。種々の天然型ヒトノッチリガンドにおける予測 / 潜在的ドメイン位置（前駆タンパク質のアミノ酸番号に基づく）をいくつか以下に示す。

【0164】

【表 1】

ヒトデルタ 1

構成要素	アミノ酸	推定機能／ドメイン
SIGNAL	1-17	シグナル
CHAIN	18-723	デルタ様タンパク質 1
DOMAIN	18-545	細胞外
TRANSMEM	546-568	膜透過
DOMAIN	569-723	細胞質
DOMAIN	159-221	D S L
DOMAIN	226-254	E G F 様 1
DOMAIN	257-285	E G F 様 2
DOMAIN	292-325	E G F 様 3
DOMAIN	332-363	E G F 様 4
DOMAIN	370-402	E G F 様 5
DOMAIN	409-440	E G F 様 7
DOMAIN	485-516	E G F 様 8

10

20

【 0 1 6 5 】

【 表 2 】

ヒトデルタ 3

構成要素	アミノ酸	推定機能／ドメイン
DOMAIN	158-248	D S L
DOMAIN	278-309	E G F 様 1
DOMAIN	316-350	E G F 様 2
DOMAIN	357-388	E G F 様 3
DOMAIN	395-426	E G F 様 4
DOMAIN	433-464	E G F 様 5

30

【 0 1 6 6 】

【 表 3 】

ヒトデルタ4

構成要素	アミノ酸	推定機能／ドメイン	
SIGNAL	1-26	シグナル	
CHAIN	27-685	デルタ様タンパク質4	
DOMAIN	27-529	細胞外	
TRANSMEM	530-550	膜透過	
DOMAIN	551-685	細胞質	10
DOMAIN	155-217	D S L	
DOMAIN	218-251	E G F様1	
DOMAIN	252-282	E G F様2	
DOMAIN	284-322	E G F様3	
DOMAIN	324-360	E G F様4	
DOMAIN	362-400	E G F様5	
DOMAIN	402-438	E G F様6	
DOMAIN	440-476	E G F様7	20
DOMAIN	480-518	E G F様8	

【 0 1 6 7 】

【 表 4 】

ヒトジャグド1

構成要素	アミノ酸	推定機能／ドメイン	
SIGNAL	1-33	シグナル	
CHAIN	34-1218	ジャグド1	
DOMAIN	34-1067	細胞外	
TRANSMEM	1068-1093	膜透過	
DOMAIN	1094-1218	細胞質	
DOMAIN	167-229	D S L	10
DOMAIN	234-262	E G F 様 1	
DOMAIN	265-293	E G F 様 2	
DOMAIN	300-333	E G F 様 3	
DOMAIN	340-371	E G F 様 4	
DOMAIN	378-409	E G F 様 5	
DOMAIN	416-447	E G F 様 6	
DOMAIN	454-484	E G F 様 7	
DOMAIN	491-522	E G F 様 8	20
DOMAIN	529-560	E G F 様 9	
DOMAIN	595-626	E G F 様 1 0	
DOMAIN	633-664	E G F 様 1 1	
DOMAIN	671-702	E G F 様 1 2	
DOMAIN	709-740	E G F 様 1 3	
DOMAIN	748-779	E G F 様 1 4	
DOMAIN	786-817	E G F 様 1 5	
DOMAIN	824-855	E G F 様 1 6	30
DOMAIN	863-917	VON WILLEBRAND FACTOR C	

【 0 1 6 8 】

【 表 5 】

ヒトジャグド2

構成要素	アミノ酸	推定機能／ドメイン
SIGNAL	1-26	シグナル
CHAIN	27-1238	ジャグド2
DOMAIN	27-1080	細胞外
TRANSMEM	1081-1105	膜透過
DOMAIN	1106-1238	細胞質
DOMAIN	178-240	D S L
DOMAIN	249-273	E G F様1
DOMAIN	276-304	E G F様2
DOMAIN	311-344	E G F様3
DOMAIN	351-382	E G F様4
DOMAIN	389-420	E G F様5
DOMAIN	427-458	E G F様6
DOMAIN	465-495	E G F様7
DOMAIN	502-533	E G F様8
DOMAIN	540-571	E G F様9
DOMAIN	602-633	EGF-LIKE 10
DOMAIN	640-671	EGF-LIKE 11
DOMAIN	678-709	EGF-LIKE 12
DOMAIN	716-747	EGF-LIKE 13
DOMAIN	755-786	EGF-LIKE 14
DOMAIN	793-824	EGF-LIKE 15
DOMAIN	831-862	EGF-LIKE 16
DOMAIN	872-949	VON WILLEBRAND FACTOR C

10

20

【 0 1 6 9 】

30

D S L ドメイン

通常の D S L ドメインには、以下のコンセンサスアミノ酸配列の殆ど又は全てが含まれていてもよい。

【 0 1 7 0 】

【表 6】

Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa **Cys** Xaa Xaa Xaa **Cys** Xaa Xaa
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa **Cys** Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 Xaa **Cys** Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa **Cys**

40

D S L ドメインには、以下のコンセンサスアミノ酸配列の殆ど又は全てが含まれていることが好ましい。

【 0 1 7 1 】

【表 7】

Cys Xaa Xaa Xaa ARO ARO Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Cys BAS NOP
 BAS ACM ACM Xaa ARO NOP ARO Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa NOP Xaa Xaa
 Xaa Cys Xaa Xaa NOP ARO Xaa NOP Xaa Xaa Cys

配列表中、AROは、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン又はヒスチジン等の芳香族アミノ酸残基である。

NOPは、グリシン、アラニン、プロリン、ロイシン、イソロイシン又はバリン等の非極性アミノ酸残基である。

BASは、アルギニン又はリシン等の塩基性アミノ酸残基である。また、

ACMは、アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン又はグルタミン等の酸性アミノ酸残基又はアミドアミノ酸残基である。

DSLドメインには、以下のコンセンサスアミノ酸配列の殆ど又は全てが含まれていることが好ましい。

10

【 0 1 7 2 】

【 表 8 】

Cys Xaa Xaa Xaa Tyr Tyr Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Cys Arg Pro
 Arg Asx Asp Xaa Phe Gly His Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Xaa
 Xaa Cys Xaa Xaa Gly Trp Xaa Gly Xaa Xaa Cys

20

(配列表中、Xaaはどのアミノ酸でもよく、Asxはアスパラギン酸又はアスパラギンである。)

種々のソース由来のノッチリガンドにおけるDSLアラインメントを図32に示す。

【 0 1 7 3 】

使用するDSLドメインは、例えばショウジョウバエ、アフリカツメガエル、ラット、マウス、ヒトなど、いかなる好適種に由来するものであってもよい。DSLは脊椎動物、好ましくは哺乳類、好ましくはヒトノッチリガンド配列に由来することが好ましい。

30

【 0 1 7 4 】

例えば、本発明に使用するDSLドメインは、ヒトジャグド1のDSLドメインに対し、少なくとも30%、好ましくは少なくとも50%、好ましくは少なくとも60%、好ましくは少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%のアミノ酸配列同一性を有することが好適である。

【 0 1 7 5 】

或いは、本発明に使用するDSLドメインは、ヒトジャグド2のDSLドメインに対し、例えば少なくとも30%、好ましくは少なくとも50%、好ましくは少なくとも60%、好ましくは少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%のアミノ酸配列同一性を有していてもよい。

40

【 0 1 7 6 】

或いは、本発明に使用するDSLドメインは、ヒトデルタ1のDSLドメインに対し、例えば少なくとも30%、好ましくは少なくとも50%、好ましくは少なくとも60%、好ましくは少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%のアミノ酸配列同一性を有していてもよい。

【 0 1 7 7 】

或いは、本発明に使用するDSLドメインは、ヒトデルタ3のDSLドメインに対し、例えば少なくとも30%、好ましくは少なくとも50%、好ましくは少なくとも60%、好ましくは少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%

50

、好ましくは少なくとも 95 % のアミノ酸配列同一性を有していてもよい。

【0178】

或いは、本発明に使用する DSLドメインは、ヒトデルタ4のDSLドメインに対し、例えば少なくとも30%、好ましくは少なくとも50%、好ましくは少なくとも60%、好ましくは少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%のアミノ酸配列同一性を有していてもよい。

【0179】

EGF様ドメイン

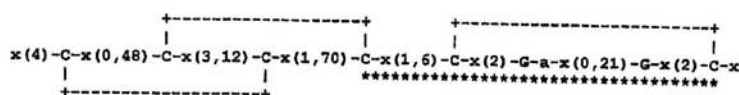
EGFやノッチやノッチリガンドと同様に、EGF様モチーフも種々のタンパク質で見出されており、その中には血液凝固カスケードに関与するものも含まれる (Furie and Furie, 1988, Cell 53: 505-518)。例えばこのモチーフは、血液凝固因子IX及びX (Rees et al., 1988, EMBO J. 7: 2053-2061; Furie and Furie, 1988, Cell 53: 505-518) 等の細胞外タンパク質、他のショウジョウバエ遺伝子 (Knust et al., 1987 EMBO J. 7: 761-766; Rothberg et al., 1988, Cell 55: 1047-1059)、及びトロンプモジュリン等いくつかの細胞表面受容体タンパク質 (Suzuki et al., 1987, EMBO J. 6: 1891-1897)、及びLDL受容体 (Sudhof et al., 1985, Science 228: 815-822) で観察されている。トロンプモジュリンやウロキナーゼのEGF反復ドメインにタンパク質結合部位がマッピングされている (Kurosawa et al., 1988, J. Biol. Chem 263: 5993-5996; Appella et al., 1987, J. Biol. Chem. 262: 4437-4440)。

【0180】

PROSITEで報告されているようにEGFドメインには、ジスルフィド結合に関与することがわかっている (EGFにおいて) 6個のシステイン残基が通常含まれる。2本鎖シートからループでC末端における2本鎖短シートに続く主要構造が提唱されているが、それは必要条件ではない。以下のEGF様ドメインの概略図に示すように保存されたシステイン間のサブドメインは、それぞれ長さが大きく異なっている。

【0181】

【表9】



図中、

‘C’: ジスルフィド結合に関与する保存されたシステイン

‘G’: しばしば保存されているグリシン

‘a’: しばしば保存されている芳香族アミノ酸

‘*’: 両パターンの位置

‘X’: 任意の残基

5番目と6番目のシステインの間の領域には2個の保存されたグリシンが含まれ、少なくともそのいずれか1個は殆どのEGF様ドメインに普通存在している。

【0182】

用いるEGF様ドメインは、好適な種からであれば何に由来していてもよく、ショウジョウバエ、アフリカツメガエル、ラット、マウス又はヒト等が列挙できる。EGF様ドメインは脊椎動物、好ましくは哺乳類、好ましくはヒトノッチリガンド配列に由来することが好ましい。

【0183】

例えば、本発明に用いるEGF様ドメインは、ヒトジャグド1のEGF様ドメインに対し

、少なくとも 30 %、好ましくは少なくとも 50 %、好ましくは少なくとも 60 %、好ましくは少なくとも 70 %、好ましくは少なくとも 80 %、好ましくは少なくとも 90 %、好ましくは少なくとも 95 % のアミノ酸同一性を示す。

【0184】

或いは、本発明に用いる EGF 様ドメインは、ヒトジャグド 2 の EGF 様ドメインに対し、例えば少なくとも 30 %、好ましくは少なくとも 50 %、好ましくは少なくとも 60 %、好ましくは少なくとも 70 %、好ましくは少なくとも 80 %、好ましくは少なくとも 90 %、好ましくは少なくとも 95 % のアミノ酸同一性を示す。

【0185】

或いは、本発明に用いる EGF 様ドメインは、ヒトデルタ 1 の EGF 様ドメインに対し、例えば少なくとも 30 %、好ましくは少なくとも 50 %、好ましくは少なくとも 60 %、好ましくは少なくとも 70 %、好ましくは少なくとも 80 %、好ましくは少なくとも 90 %、好ましくは少なくとも 95 % のアミノ酸同一性を示す。

10

【0186】

或いは、本発明に用いる EGF 様ドメインは、ヒトデルタ 3 の EGF 様ドメインに対し、例えば少なくとも 30 %、好ましくは少なくとも 50 %、好ましくは少なくとも 60 %、好ましくは少なくとも 70 %、好ましくは少なくとも 80 %、好ましくは少なくとも 90 %、好ましくは少なくとも 95 % のアミノ酸同一性を示す。

【0187】

或いは、本発明に用いる EGF 様ドメインは、ヒトデルタ 4 の EGF 様ドメインに対し、例えば少なくとも 30 %、好ましくは少なくとも 50 %、好ましくは少なくとも 60 %、好ましくは少なくとも 70 %、好ましくは少なくとも 80 %、好ましくは少なくとも 90 %、好ましくは少なくとも 95 % のアミノ酸同一性を示す。

20

【0188】

実際問題として、あるアミノ酸配列が別の配列と少なくとも X % の相同性を示すかどうかについては、従来用いられている公知のコンピュータプログラムによって決定できる。例えば、全体的配列アラインメント (global sequence alignment) とも言われる照会配列と対象配列との間の最良総一致性は、Brutlag et al (Comp. App. Biosci. (1990) 6 :237-245) のアルゴリズムに基づく F A S T D B コンピュータプログラムなどのプログラムを用いて決定できる。配列アラインメントでは照会配列と対象配列は、いずれもヌクレオチド配列であるか、或いはいずれもアミノ酸配列である。全体的配列アラインメントの結果は同一性の割合 (%) として得られる。F A S T D B アミノ酸アラインメントに用いる好適なパラメータは次のとおり。マトリックス = P A M 0、k-tuple = 2、ミスマッチペナルティ = 1、ジョイニングペナルティ = 20、ランダム化グループの長さ = 0、カットオフスコア = 1、ウィンドウサイズ = 配列の長さ、ギャップペナルティ = 5、ギャップサイズペナルティ = 0.05、ウィンドウサイズ = 500 又は対象アミノ酸配列の長さのいずれか短い方。

30

【0189】

ポリペプチド配列

ここに用いる「ポリペプチド」なる用語は、「アミノ酸配列」及び/又は「タンパク質」なる用語と同義である。「ポリペプチド」なる用語が「ペプチド」という用語と同義の場合もある。

40

【0190】

「ペプチド」は通常、10 ~ 40 アミノ酸長、好ましくは 10 ~ 35 アミノ酸長である短いアミノ酸配列を指す。

【0191】

ポリペプチド配列は適当なソースから調製し、単離してよく、或いは合成して作製してもよく、また組換え DNA 法を用いて調製してもよい。

【0192】

ポリヌクレオチド配列

50

ここにおいて「ポリヌクレオチド配列」なる用語は、「ポリヌクレオチド」及び／又は「ヌクレオチド配列」という用語と同義である。

【0193】

ポリヌクレオチド配列は、ゲノム又は合成又は組換え起源のDNA若しくはRNAでよい。これらはまた標準的手法によってクローニングされたものでもよい。ポリヌクレオチド配列は2本鎖又はセンス若しくはアンチセンス鎖のいずれかを表す1本鎖、或いはそれらの組合せであってよい。

【0194】

「ポリヌクレオチド」とは、長さが少なくとも10塩基から1000塩基、又は1000塩基を超えるヌクレオチドのポリマー態のことである。より長いポリヌクレオチド配列は、例えばPCR（ポリメラーゼ鎖反応）クローニング法を用いる組換え法で作製するのが一般的である。この方法は、クローニングさせたい標的配列の領域にフランキング（隣接）する一対のプライマー（例；約15～30ヌクレオチド）を作製し、それらのプライマーを動物若しくはヒト細胞から得たmRNA若しくはcDNAと接触させ、所望の領域を増幅させる条件下でポリメラーゼ鎖反応（PCR）を行い、増幅した断片を単離し（例えば反応混合物をアガロースゲル上で精製することにより）、そして増幅DNAを回収することからなる。上記プライマーは、増幅DNAが好適なクローニングベクターにクローニングされるように適切な制限酵素認識部位を有するように設計する。

【0195】

核酸はRNA又はDNAでよく、DNAが好ましい。RNAを使用する場合は、cDNA中間体を介して操作を行う。通常は第1領域をコードする核酸配列を調製し、5'及び／又は3'末端に適切な制限部位を設ける。便宜上、pBR322又はpUC19に基づくプラスミドベクターなどの標準的な実験用ベクターにおいて配列を操作する（以下参照）。好適な手法の詳細についてはMolecular Cloning by Sambrook et al. (Cold Spring Harbor, 1989)や、類似の標準的参考文献が参考となる。

【0196】

公開文献又はGenBank等のデータベースを参考にして核酸のソースを確定する。所望の第1又は第2配列をコードする核酸は学術用又は商業用のソースからの材料入手が可能であればそこから得ればよく、又は配列データのみが入手可能である場合は適した配列を合成又はクローニングして得られる。この場合は通常、対象遺伝子のクローニングに関する説明がある文献ソースを参考にして実施する。

【0197】

或いは限られた配列データしか得られない場合、又は公知の核酸と相同若しくは関連する核酸を発現させることを望む場合、その核酸例は当技術分野で公知の核酸配列とハイブリダイズするヌクレオチド配列として特徴付けられる。

【0198】

ポリヌクレオチド配列には例えば、タンパク質コーディングドメイン、アンチセンス配列、又はタンパク質結合ドメイン等の機能的モチーフが含まれ、それらの変異体、誘導体、アナログ及び断片も含まれる。ポリヌクレオチド配列なる用語は、かかるポリヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドをも指す。

【0199】

本発明に有用なDNAポリヌクレオチド等のヌクレオチド配列は、組換え、合成又は当業者が実行可能ないずれの方法によっても作製できる。標準的な手法でクローニングしてもよい。

【0200】

一般的にプライマーは、所望の核酸配列を1ヌクレオチドずつ作出するステップワイズ手法を含む合成法で作製する。この方法で行うための自動化技術を用いる技術は当技術分野では容易に実現可能である。

【0201】

より長いヌクレオチド配列は、例えばPCR（ポリメラーゼ鎖反応）クローニング法を用

10

20

30

40

50

いる組換え法で作製するのが一般的である。この方法は、クローニングさせたい標的配列の領域をフランキング（隣接）する一対のプライマー（例；約15～30ヌクレオチド）を作製し、そのプライマーを動物若しくはヒト細胞から得たmRNA若しくはcDNAと接触させ、所望の領域を増幅させる条件下でポリメラーゼ鎖反応（PCR）を行い、増幅した断片を単離し（例えば反応混合物をアガロースゲル上で精製することにより）、そして増幅DNAを回収することからなる。上記プライマーは、増幅DNAが好適なクローニングベクターにクローニングされるように適切な制限酵素認識部位を有するように設計する。

【0202】

組換え作製法では宿主細胞に、本発明の発現系又はポリヌクレオチドを取り込むように遺伝子工学に基づく操作を施すことができる。宿主細胞へのポリヌクレオチドの導入法としては、Davis et al and Sambrook et al等、多くの標準的実験室マニュアルに記載されている例えば、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、トランスフェクション、マイクロインジェクション、カチオン性脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、トランスダクション、スクレープローディング（scrape loading）、弾丸導入（ballistic introduction）、感染等の方法が有効である。これらの方法は、薬物送達系としてインビトロ又はインビボで採用することができる。

10

【0203】

好適な宿主の代表的な例としては、レンサ球菌（streptococci）、ブドウ球菌（staphylococci）、大腸菌、ストレプトミセス、枯草菌等の細菌細胞や、酵母細胞、アスペルギルス細胞等の真菌細胞や、ドロソフィラS2、スポドプテラSf9等の昆虫細胞や、CHO、COS、NSO、HeLa、C127、3T3、BHK293、Bowesメラノーマ細胞等の動物細胞や、植物細胞が挙げられる。

20

【0204】

本発明に有用なポリペプチドの作製には極めて多様な発現系が使用できる。このようなベクターとしては例えば、染色体、エピソーム及びウイルスに由来するベクター、例えば、細菌プラスミド由来、バクテリオファージ由来、トランスポゾン由来、酵母エピソーム由来、挿入エレメント由来、酵母染色体エレメント由来、またバキュロウイルス、SV40のようなパポバウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルス、レトロウイルス等のウイルス由来のベクター、並びにこれらの組合せに由来するベクター、例えばコスミドやファージミドのようにプラスミドとバクテリオファージの遺伝的要素に由来するものが含まれる。この発現系構築物は発現を起こさせるだけでなく発現を調節する制御領域を含んでいてもよい。宿主内でポリヌクレオチドを保持、増殖又は発現させる、及び/又は宿主内でポリペプチドを発現させるのに適していれば通常いかなる系又はベクターでも発現に使用してよい。例えば、Sambrook et alの方法等、十分公知のルーティンな方法に従って適切なDNA配列を発現系に挿入してよい。

30

【0205】

翻訳されたタンパク質を小胞体の内腔に、ペリプラズム空間に、又は細胞外環境に分泌するためには、発現したポリペプチドに適切な分泌シグナルを導入することができる。かかるシグナルは、ポリペプチドに対し内因性でも異種シグナルでもよい。

40

【0206】

本発明に用いる活性作用因子は、広く公知の方法を用いることにより、組換え細胞培養物から回収・精製することができる。これらの方法としては、硫酸アンモニウム又はエタノール沈殿、酸抽出、アニオン又はカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用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、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィー及びレクチンクロマトグラフィーなどがある。最も好ましくは、高速液体クロマトグラフィーが精製に用いられる。ポリペプチドが単離及び/又は精製の過程で変性した場合は、十分公知の方法によりタンパク質のリフォールディングを行って活性構造を再生する。

50

【0207】

変異体、誘導体、アナログ、ホモログ及び断片

本明細書に記載ある特異的ポリペプチド及びポリヌクレオチド配列に加え、本発明はまたそれらの変異体、誘導体、アナログ、ホモログ、模倣体及び断片をも包含する。

【0208】

本発明において、所定の配列の変異体とは、残基（アミノ酸残基であれ、核酸残基であれ）の特異的配列が、目的のポリペプチド又はポリヌクレオチドがその内因性機能を少なくとも1つは保持する形で修飾されている配列のことをいう。変異配列は、天然型タンパク質に存在する少なくとも1つの残基の付加、欠失、置換、修飾、交換及び/又は変異により修飾できる。

10

【0209】

本発明のタンパク質又はポリペプチドとの関連において用いる「誘導体」なる用語には、その結果得られるタンパク質又はポリペプチドがその内因性機能の少なくとも1つを保持する限りにおいて、配列に対してアミノ酸残基1個（又は2個以上）を置換、変異、修飾、交換、欠失及び/又は付加することを含む。

【0210】

ここにおいてポリペプチド又はポリヌクレオチドとの関連で用いる「アナログ」なる用語は、内因性ポリペプチド又はポリヌクレオチドの機能を少なくとも1つ保持するポリペプチド又はポリヌクレオチドを含むが、通常それらの進化起源は異なる。

【0211】

ここにおいてポリペプチド又はポリヌクレオチドとの関連で用いる「模倣体」なる用語は、それが模倣するポリペプチド又はポリヌクレオチドの内因性機能を少なくとも1つ有する化学化合物のことを指す。

20

【0212】

通常アミノ酸の置換は、ノッチシグナル伝達調節に必要な輸送活性若しくは能力を修飾配列が保持する限りにおいて、例えば1、2若しくは3から10若しくは20個の置換を行う。アミノ酸の置換には、人為的アナログを使用してもよい。

【0213】

本発明で用いるタンパク質には、サイレントな変化をもたらすアミノ酸残基の欠失、挿入又は置換があってもよく、それにより、機能的に同等なタンパク質が得られる。アミノ酸の意図的な置換は、極性、電荷、可溶性、疎水性、親水性、及び/又は両親媒性における類似性を基にし、輸送又は調節機能が保持される限りにおいて行われる。例えば負電荷アミノ酸には、アスパラギン酸及びグルタミン酸が含まれ、正電荷アミノ酸にはリシン及びアルギニンが含まれ、また同様の親水価をもつ極性ヘッド無電荷グループのアミノ酸には、ロイシン、イソロイシン、バリン、グリシン、アラニン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、フェニルアラニン、及びチロシンが含まれる。

30

【0214】

便宜上、主要な天然型アミノ酸（及びその関連するコドン）に対する1文字コードと3文字コードを以下に記す。

【0215】

40

【表10】

Symbol	3-letter	Meaning	Codons	
-----	-----	-----	-----	
A	Ala	Alanine	GCT, GCC, GCA, GCG	
B	Asp, Asn	Aspartic, Asparagine	GAT, GAC, AAT, AAC	
C	Cys	Cysteine	TGT, TGC	
D	Asp	Aspartic	GAT, GAC	
E	Glu	Glutamic	GAA, GAG	10
F	Phe	Phenylalanine	TTT, TTC	
G	Gly	Glycine	GGT, GGC, GGA, GGG	
H	His	Histidine	CAT, CAC	
I	Ile	Isoleucine	ATT, ATC, ATA	
K	Lys	Lysine	AAA, AAG	
L	Leu	Leucine	TTG, TTA, CTT, CTC, CTA, CTG	
M	Met	Methionine	ATG	
N	Asn	Asparagine	AAT, AAC	
P	Pro	Proline	CCT, CCC, CCA, CCG	
Q	Gln	Glutamine	CAA, CAG	20
R	Arg	Arginine	CGT, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG	
S	Ser	Serine	TCT, TCC, TCA, TCG, AGT, AGC	
T	Thr	Threonine	ACT, ACC, ACA, ACG	
V	Val	Valine	GTT, GTC, GTA, GTG	
W	Trp	Tryptophan	TGG	
X	Xxx	Unknown		
Y	Tyr	Tyrosine	TAT, TAC	
Z	Glu, Gln	Glutamic, Glutamine	GAA, GAG, CAA, CAG	
*	End	Terminator	TAA, TAG, TGA	30

例えば下記の表に基づき、保存的置換を行うことができる。第2カラムの同じブロック内のアミノ酸同士、及び好ましくは第3カラムの同じ行にあるアミノ酸同士は、互いに置換させてもよい。

【0216】

【表11】

脂肪族	非極性	GAP
		ILV
	極性無電荷	CSTM
		NQ
	極性電荷	DE
		KR
芳香族		HFYW

40

ここに用いる「タンパク質」なる用語には、個々の構成ポリペプチドが共有若しくは非共有手段によって結合している複数ポリペプチド複合体とともに1本鎖ポリペプチド分子も含まれる。ここに用いる「ポリペプチド」及び「ペプチド」なる用語は、モノマーがアミノ酸であり、かつペプチド結合若しくはジスルフィド結合によって結び付いているものを

50

指す。サブユニット及びドメインなる用語もまた生物機能を有するポリペプチド及びペプチドを指す。

【0217】

「断片」もまた変異体であり、この用語は、機能的に目的とするポリペプチド又はポリヌクレオチド、又は例えば結合アッセイにおける目的ポリペプチド又はポリヌクレオチドの選択領域のことを通常指す。従って「断片」とは、完全長ポリペプチド又はポリヌクレオチドの部分であるアミノ酸配列又は核酸配列のことである。

【0218】

かかる変異体は、site-directed mutagenesis等の標準的な組換えDNA法により調製できる。挿入を行う場所に、挿入部位の片側において天然型配列に相当する5'及び3'フランキンク領域と共に挿入物をコードする合成DNAを挿入する。配列が適当な酵素（1若しくは2以上）で切断され、合成DNAが切断部に結合するように、フランキンク領域には天然型配列における部位に相当する便宜的な制限部位が含まれる。次にこのDNAは、本発明に従って発現され、コードされたタンパク質を産生する。これらの方法は、DNA配列操作法として当技術分野で公知の無数の標準的な手法の例であり、他の公知の手法を用いることもできる。

10

【0219】

ポリヌクレオチドの変異体はコドン最適化配列を有することが好ましい。コドン最適化は、RNAの安定性を、ひいては遺伝子発現を増強する手法として当技術分野で公知である。遺伝子コードの縮重とは、いくつかの異なるコドンが同じアミノ酸をコードすることを意味する。例えばロイシン、アルギニン及びセリンはそれぞれ6種類の異なるコドンによってコードされる。異なるコドンを使用する際の優先順位が異なる生物ごとにみられる。例えばHIV等のウイルスは希少コドンを数多く用いる。希少コドンを、汎用され相当する哺乳類コドンで代替するようにヌクレオチド配列を変化させることにより、哺乳類標的細胞における配列の発現が増強されることになる。哺乳類細胞や他の種々の生物に関するコドン使用表が当技術分野で公知となっている。配列の少なくとも一部のコドンが最適化されていることが好ましい。配列がその全体にわたってコドン最適化されていることがより好ましい。

20

【0220】

「相同性」なる用語は、「同一性」という言葉と同じ意味をもつ。相同配列には、対象とする配列と、少なくとも75、85若しくは90%の同一性を示し、好ましくは少なくとも95若しくは98%の同一性を示すアミノ酸配列が含まれると解される。特に相同性は通常、活性に重要であることが知られている配列中の領域（51、56及び57番目のアミノ酸など）との関連で検討される。相同性は類似性として捉えることもできるが（すなわち、アミノ酸残基が類似の化学特性・機能を有する）、本発明の文脈においては相同性が配列の同一性を表すことが好ましい。

30

【0221】

相同性の比較は、肉眼により、さらに一般的には、容易に入手可能な配列比較プログラムの助けを借りて行うことができる。これら市販コンピュータプログラムにより、2若しくは3以上の配列間における相同性の割合（%）が計算できる。

40

【0222】

相同性の割合は、隣接する配列を基に計算される。すなわち、一方の配列を他方の配列と並べ、一方の配列中の各アミノ酸を、他方の配列中の対応するアミノ酸と直接、一残基毎に比較するのである。これは、「ギャップなし（ungapped）」アラインメントと呼ばれる。通常、このようなギャップなしアラインメントは、比較的残基数の少ない場合に行われる。

【0223】

この方法は、非常に簡便かつ堅実な方法であるが、1つの挿入部又は欠失部以外は同一な2つの配列において、かかる挿入部又は欠失部以降のアミノ酸残基がアラインメントから外れてしまう結果になるということが考慮されず、その結果、全体のアラインメントが終

50

了したときの相同性の割合が大きく低下してしまう可能性がある。結果的に殆どの配列比較法は、全体としての相同性スコアを不当に損なうことなく、可能性のある挿入部又は欠失部を考慮に入れた最適化アラインメントを作出するように設計されている。これは、局所相同性を最大化することを意図して、配列アラインメントに「ギャップ」を挿入することにより実現される。

【0224】

しかしながら、より複雑なこれらの方法は、アラインメントで生じるそれぞれのギャップに「ギャップペナルティ」を課すことになり、同数の同一アミノ酸に対し、配列アラインメント内のギャップ数が少なければ少ないほど（比較する2つの配列間における高い関連性を反映して）、ギャップ数の多い場合より高いスコアが得られる。ギャップの存在に対し相対的に高いコストを課し、ギャップ内に続く残基の各々に、より少ないペナルティを課す「アフィンギャップコスト」が通常使用される。これは最も一般的に使用されるギャップスコアリングシステムである。当然のことながら高いギャップペナルティは、より少ないギャップで最適化アラインメントをもたらす。殆どのアラインメントプログラムは、ギャッププログラムに修正を加えることを認めている。しかし、そのようなソフトウェアを配列比較に用いる際には、初期値を使用することが好ましい。例えば、GCG Wisconsin Bestfit packageを使う場合のアミノ酸配列に対する初期ギャップペナルティは、ギャップ1個につき - 12で、各ギャップ延長につき - 4である。

10

【0225】

従って相同性割合（％）の最大値を計算するには、まず、ギャップペナルティを考慮した上で最適化アラインメントを作製する必要がある。かかるアラインメントを実現するのに適したコンピュータープログラムは、GCG Wisconsin Bestfit package (Devereux) である。配列比較を行えるソフトウェアの例としては他にも、BLAST package、FASTA (Atschul)、及びGENEWORKの比較ツールセットがあるが、これらに限定されない。BLAST及びFASTAはいずれもオフライン及びオンラインでのサーチに利用できる。しかしGCG Bestfitプログラムを使用することが好ましい。

20

【0226】

最終的な相同性割合は同一性に換算して求められものの、通常アラインメントプロセス自体は、オールオアナッシング (all-or-nothing) という考えに依拠して2つの配列を比較するものではない。その代わり、化学的類似性又は進化論的距離に基づき、2つ1組の比較にスコアを与える類似性スコア拡大縮小マトリックス (scaled similarity score matrix) が一般的に使用される。そのようなマトリックスの中でよく用いられるものとして、BLASTプログラムセットの初期マトリックスであるBLOSUM62 matrixが例示される。GCG Wisconsinプログラムには一般的に公開初期値を、カスタムシンボル比較表 (custom symbol comparison table) (詳細はユーザーマニュアルを参照) がある場合は、それらのいずれかを使用する。GCG packageには公開初期値を、また他のソフトウェアには、BLOSUM62などの初期マトリックスを用いることが好ましい。

30

【0227】

ソフトウェアが一旦最適化アラインメントを作製すると、相同性割合、好ましくは配列同一性割合を計算することが可能になる。通常ソフトウェアは配列比較の一部として上記計算を行い、数字で結果を出す。

40

【0228】

本発明に用いる配列の相同ヌクレオチド配列又は変異ヌクレオチド配列は、例えば種々のソースから作製したDNAライブラリーをプローブするなど、数多くの方法により得ることができる。また、他のウイルス性/細菌性、若しくは細胞性ホモログ、特に哺乳類細胞（例：ラット、マウス、ウシ及び霊長類細胞）からの細胞性ホモログを得てもよく、通常かかるホモログやその断片は、本明細書にある配列リストに示す配列と選択的にハイブリダイズすることができる。これら配列は、それが作製されたcDNAライブラリーから、又は他の動物種のゲノムDNAライブラリーをプローブし、また中程度から高度なストリンジェンシー下で対象ヌクレオチド配列の全部又は一部を含むプローブでかかるライブラ

50

リーをプローブすることによって得られる。本発明に有用なアミノ酸及び／又はヌクレオチド配列の種ホモログ及び対立変異体を得る際にも同様の方法論を適用する。

【0229】

変異体及び株／種ホモログもまた、本発明に用いる配列中の保存アミノ酸配列をコードする変異体及びホモログ内の配列を標的とするように設計されたプライマーを用いる縮重PCRにより得られる。保存配列は、例えばいくつかの変異体／ホモログにおけるアミノ酸配列を整列させることによって予測できる。配列アラインメントは当技術分野で公知のコンピュータソフトウェアを用いて実行できる。例えばGCG Wisconsin PileUp programは広く使われている。縮重PCRで用いるプライマーには1若しくは2以上の縮重位置があり、公知の配列に対する単一配列プライマーで配列をクローニングするのに用いられるストリンジェンシー条件より低い条件で使用される。

10

【0230】

或いは、特徴付けられた配列にsite-directed mutagenesisを行うことにより上記ヌクレオチド配列を得てもよい。この方法は、例えばヌクレオチド配列が発現している特定宿主細胞に対するコドン優先度を最適化するためにサイレントなコドン変化が配列に要求される場合に有用である。制限酵素認識部位を導入するため、又はポリヌクレオチド若しくはコードされたポリペプチドの活性を改変するために、他の配列変化が必要になる場合もある。

【0231】

本発明の第一段階では、上述の候補モジュレーターの1若しくは2以上の免疫系細胞と接触させる。本発明で用いる免疫系細胞については下記に述べる。

20

【0232】

ノッチという場合、本発明者らはノッチ1、ノッチ2、ノッチ3、ノッチ4及びその他のノッチホモログやアナログを意味する。「Notch1C」なる用語には、ノッチの完全細胞内ドメイン又はかかるドメインの活性部分が含まれる。例えば上記配列は、ヒトノッチ1における第1848～2202アミノ酸を少なくとも含むかコードする配列であり、或いは上記配列と、少なくとも70%、好ましくは少なくとも75%、好ましくは少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%好ましくは少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%のアミノ酸配列相同性又は同一性を示す配列である。上記配列としては、ヒトノッチ2、ヒトノッチ3又はヒトノッチ4に由来するものも好適である。ノッチ配列には、少なくともノッチアンキリン反復ドメインを、また任意でノッチLNRドメイン、ノッチRAMドメイン、ノッチOPADドメイン及び／又はノッチPEST配列が含まれることが好適である。

30

【0233】

免疫系細胞

本発明で使用する細胞は、ノッチシグナル伝達経路を変換する能力を有する免疫系細胞である。

【0234】

本発明に用いるのに最適なものはT細胞である。T細胞には、CD4⁺及びCD8⁺成熟T細胞、末端及び胸腺由来の幼若T細胞、並びにNK-T細胞が含まれるが、これらに限定されない。

40

【0235】

或いは、上記免疫系細胞は、抗原提示細胞(APC)でもよい。APCには、指間状(interdigitating)樹状細胞、濾胞樹状細胞、ランゲルハンス細胞、PBMC、マクロファージ、Bリンパ球、Tリンパ球等の樹状細胞(DC)、或いは上皮細胞や線維芽細胞や内皮細胞のようにその表面にMHCクラスII分子を連続的に発現させる又は発現させるための活性を有する他の細胞型が含まれる。APCの前駆体には、CD34⁺細胞、単球、線維芽細胞、内皮細胞が含まれる。培養条件を利用してAPC又は前駆体を修飾してもよく、或いは1若しくは2以上の遺伝子をトランスフェクトさせるなどの遺伝子修飾を施してもよい。

50

【0236】

T細胞及びAPCは患者から単離してもよく、又はドナー個体若しくは別の個体から単離してもよい。ヒト細胞やマウス細胞等の哺乳類細胞が好ましい。ヒト由来の細胞であることが好ましい。APC又はAPC前駆体は、樹立細胞株又は初代細胞培養物等の培養による細胞増殖から得られる。例としてハイブリドーマ細胞株、L細胞、及びMRC-5等のヒト線維芽細胞が挙げられる。本発明で用いるのに好適な細胞株には、Jurkat、H9、CEM、EL4の各T細胞、ヒトHA1.7やマウスD10細胞等の長期T細胞クローン、DO11.10細胞等のT細胞ハイブリドーマ、U937やTHP1細胞等のマクロファージ様細胞、Raji、A20及びM1細胞などのEBV形質転換細胞等のB細胞株が含まれる。

10

【0237】

樹状細胞(DC)は、多様な手法で単離・精製することができ、かかる手法としては、例えばDC細胞を抹消血から直接精製するもの、GM-CSFで処理して抹消血に動員した後にCD34⁺前駆細胞から作出するもの、或いは骨髓から直接作出するものがある。抹消血から作出する場合は、接着性前駆体をGM-CSF/IL-4混合物(Inaba et al)で処理することができ、又は骨髓から作出する場合は、非接着性CD34⁺細胞をGM-CSFとTNF- α で処理することができる(Caux et al)。DCはまた、Sallusto and Lanzavecchia J Exp Med (1994) 179(4) 1109-18の方法にそのまま習い、精製末梢血単核球(PBMC)を用いて接着性T細胞をGM-CSFとIL-4で2時間処理することにより、ヒトボランティアの末梢血からルーティンで調製できる。必要に応じて、磁気ビーズを用いてCD19⁺B細胞及びCD3⁺T細胞、CD2⁺T細胞を上記から除去してもよい(Coffin et al)。培養条件としては、維持のためにGM-CSFやIL-4等の他のサイトカインが、及び/又は樹状細胞や他の抗原提示細胞の活性が含まれる。

20

【0238】

本発明に用いるT細胞及びB細胞は、リンパ腫又は白血病細胞株等の細胞株、T細胞ハイブリドーマやB細胞ハイブリドーマから得ることが好ましいが、免疫系疾患の患者若しくは移植手術の被移植者から、又は関係のある若しくは無関係のドナー個体から単離してもよい。T細胞及びB細胞は、血液若しくは他の材料(リンパ節、脾臓又は骨髓など)から得てもよく、標準的な手法により増強若しくは精製してよい。或いは、全血液を使用してよく、白血球を増強した血液若しくはT細胞の材料としての精製白血球や、他の細胞型を用いてもよい。ヘルパーT細胞(CD4⁺)を使用することが特に好ましい。或いは、CD8⁺T細胞等の他のT細胞を用いてもよい。

30

【0239】

本発明で用いる候補モジュレーターを上述の免疫系細胞と接触させる。その後の段階で、候補モジュレーターに誘起されるノッチシグナル伝達調節を検出する。ノッチシグナル伝達における調節を検出するアッセイについて以下に説明する。これらアッセイの多くは、「標的遺伝子」の発現を観察することを含む。

【0240】

標的遺伝子

本発明で用いる標的遺伝子は内因性標的遺伝子(すなわちノッチシグナル伝達経路の内因性標的遺伝子)又は合成レポーター遺伝子のいずれでもよい。

40

【0241】

内因性標的遺伝子

ノッチシグナル伝達経路の内因性標的遺伝子にはDeltex、Hesファミリー遺伝子(特にHes-1)、Splitのエンハンサー[E(spl)]複合体遺伝子、IL-10、CD-23、Dlx-1、CTLA4、CD-4、Dll-1、Numb、Mastermind、Dshが含まれる。ノッチ活性化により発現が調節される遺伝子は全て本発明の目的に用いられるが、好ましい内因性標的遺伝子としては以下のものが挙げられる。

【0242】

細胞内結合タンパク質のDeltexは、図1に示すようにその相互作用部位を離れる際にSu

50

(H) をノッチの細胞内尾部と置き換える。Deltexは亜鉛フィンガーをもつ細胞質タンパク質である (Artavanis-Tsakonas; Osborne)。Deltexはノッチの細胞内ドメインにおけるアンキリン反復と相互作用を行う。DeltexがGrb2との相互作用によりRas-JNKシグナル伝達経路を調節し、ノッチ経路活性化を促進することが研究の結果示されている (Matsuno)。DeltexはまたSu(H)がノッチ細胞内尾部と結合することを阻止する結合タンパク質としても作用する。従ってSu(H)は核内へと放出され、核内において転写モジュレーターとして作用する。脊椎動物のB細胞系においてSu(H)ホモログのCBF1よりむしろDeltexの方がE47機能を阻止することに関与していることが近年の研究結果から示唆されている (Ordentlich)。ポジティブフィードバックループにおいてノッチが活性化される結果、Deltexの発現がアップレギュレートされる。ヒトDeltex(DTX1)mRNAの配列は、GenBank Accession No. AF053700に登録されている。

10

【0243】

Hes-1 (Split-1のHumpエンハンサー) (Takebayashi) は基本的なヘリックス-ループ-ヘリックス構造を有する転写因子である。Hes-1はCD4サイレンサーにおける重要な機能部位に結合し、CD4遺伝子発現を抑制する。従ってHes-1はT細胞の運命決定に深く関与している。Hesファミリーの他の遺伝子には、Hes-5 (Splitホモログの哺乳類エンハンサー) とHes-3が含まれ、Hes-5の発現もまたノッチ活性化によりアップレギュレーションされる。Hes-1の発現はノッチが活性化されることによりアップレギュレートされる。ヒトHes-1の配列はGenBankに登録番号AK000415及びAF264785として登録されている。

20

【0244】

E(spl) 遺伝子複合体 [E(spl)-C] (Leimeister) には7種の遺伝子が含まれるが、そのうちE(spl)とGrouchoだけが変異体となったときに目に見える表現型を示す。E(spl)は、そのSplit変異を増強する能力から命名され、Splitはノッチの別名である。実際E(spl)-C遺伝子は、achaete-scute複合遺伝子発現を調節することによりデルタを抑制する。E(spl)の発現は、ノッチが活性化する結果としてアップレギュレーションされる。

【0245】

IL-10 (インターロイキン-10) は、Th2ヘルパーT細胞が産生する因子である。IL-10は、マスト細胞増殖におけるコレギュレーターであり、Epstein-Barr bcrfi遺伝子と高い相同性を示す。IL-10がノッチシグナル伝達経路にとって直接的なダウンストリーム標的であるか否かは明らかでないが、その発現はノッチの活性化に伴って著しくアップレギュレートされることが見い出されている。IL-10のmRNA配列は、GenBankにGI1041812として登録されている。

30

【0246】

CD23は、ヒト白血球分化抗原CD23 (FCE2) のことであり、B細胞の活性化及び増殖にとって肝要な分子である。CD23はIgEに対し、低親和性受容体である。また、切断化分子が分泌されて潜在的な分裂成長因子として機能する。CD23の配列は、GenBankにGI1783344として登録されている。

40

【0247】

Dlx-1 (distalless-1) (McGuiness) の発現はノッチ活性化に伴いダウンレギュレートされる。Dlx遺伝子の配列は、GenBankにU51000-3として登録されている。

【0248】

CTLA4 (細胞毒性Tリンパ球活性化タンパク質4) はT細胞表面で見い出される補助分子であり、アレルゲン吸入後における気道での炎症性細胞の動員やTヘルパー細胞の分化に関与している。CTLA4をコードする遺伝子のプロモーター領域には、CBF1応答エレメントがあり、その発現はノッチ活性化によってアップレギュレートする。CTLA4の配列はGenBankにL15006として登録されている。

50

【0249】

C D 4 の発現はノッチ活性化に伴い、ダウンレギュレートする。C D 4 抗原の配列は、GenBankに X M 0 0 6 9 6 6 として登録されている。

【0250】

上記以外に有用な標的遺伝子には、下記に列挙するアネルギー会合性遺伝子が含まれる (GenBank登録番号を付記する)。

G R G 4 (groucho関連タンパク質 - U 6 1 3 6 3)、Ikaros (L 0 3 5 4 7)、Jumonji (D 3 1 9 6 7)、Caspase 3 (U 5 4 8 0 3)、S O C S 2 (U 8 8 3 2 7)、T r a f 5 (D 7 8 1 4 1)、R P T P (Sigma - D 2 8 5 3 0)、R P T P (Kappa - L 1 0 1 0 6)、P T P - 1 B (U 2 4 7 0 0)、A G K (A A 0 6 6 0 3 2)、L D H A (Y 0 0 3 0 9)、P g a m 1 (ホスホグリセリン酸ムターゼ - A A 1 6 1 7 9 9)、G B P - 3 (グアニル酸結合タンパク質 3 - U 4 4 7 3 1)、R G S - 2 (G タンパク質シグナル伝達レギュレーター 2 - U 6 7 1 8 7)、R a b 1 0 (A A 1 1 9 1 9 4)、C D 9 8 (U 2 5 7 0 8)、4 - 1 B B - L (L 1 5 4 3 5)、F a s L (U 0 6 9 4 8)、H i f - 1 (低酸素症誘導因子 1 - A F 0 0 3 6 9 5)、S A T B 1 (核マトリックス接着性 D N A 結合タンパク質 - U 0 5 2 5 2)、E l f - 1 (U 1 9 6 1 7)、N F I L 3 (U 8 3 1 4 8)、R N F 1 9 (G E G - 1 5 4 と呼ばれる - X 7 1 6 4 2)、M l p (Markcks様タンパク質 - A A 2 4 5 2 4 2)、L a d / T S A d (p56lck会合性アダプタータンパク質 - E T 6 2 4 1 9)、Z A P - 7 0 (U 0 4 3 7 9)、Serp1b (A A 1 2 5 3 1 0)、シトスタチン C (M 5 9 4 7 0)、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (X 5 7 0 2 4)、C D 3 エプシロン (J 0 2 9 9 0)、カチオン依存性マンノース - 6 - リン酸受容体 (X 6 4 0 6 8)、 - アミノ酪酸受容体会合タンパク質様タンパク質 1 (Z 3 1 1 3 7)、テトラサイクリントランスポーター様タンパク質 (D 8 8 3 1 5)、M C S F (M 2 1 9 5 2)、カルシクリン (M 3 7 7 6 1)、ヘムオキシゲナーゼ 2 a (Z 3 1 2 0 2) 及び O s p 9 4 (浸透圧ストレスタンパク質 9 4 - U 2 3 9 2 1)。

標的 / レポーター遺伝子が I L - 2 又は N F A T ではないことが好ましい。

【0251】

合成レポーター遺伝子

本発明の他の実施態様では、標的遺伝子はレポーター遺伝子である。好適実施態様においてレポーター遺伝子は、ノッチシグナル伝達に感受性のプロモーター領域又は応答エレメント (1 又は 2 以上) の転写制御下にある。

【0252】

本発明のアッセイ法には種々多様なレポーターを用いることができるが (スクリーニング法同様に)、都合よく検出可能な (例えば分光法により) シグナルを発するものが好ましい。例を挙げると、レポーター遺伝子は、吸光性を変化させる反応を触媒する酵素をコードするものでよい。

【0253】

他の手法には、酵素免疫吸着測定法 (E L I S A)、放射免疫測定法 (R I A)、蛍光活性化セルソーティング (F A C S) などがある。互いに干渉しない 2 つのエピトープに反応するモノクローナル抗体を用いる 2 部位 (two-site) におけるモノクローナル抗体に基づく免疫測定法を利用してもよい。これらのアッセイ法、或いは他のアッセイ法に関する記載は種々の文献にみられるが、中でも Hampton R et al (1990, Serological Methods, A Laboratory Manual, APS Press, St Paul MN) 及び Maddox DE et al (1983) J Exp Med 15(8): 121-1 によく収載されている。

【0254】

当技術分野の専門家であれば、特異的レポーター遺伝子のアイデンティティーは、当然種々に異なることを認識している。当技術分野でこれまで使用されてきたレポーター遺伝子には、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (C A T) 遺伝子、グリーン蛍光タンパク質 (G F P)、ルシフェラーゼ (l u c)、 - ガラクトシダーゼ、インベルターゼ (invertase)、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、グルクロニダーゼ、エキ

ソグルカナーゼ (exo-glucanase)、グルコアミラーゼ、又はアルカリホスファターゼが含まれるが、これらに限定されることはない。或いはレポーター遺伝子は、放射標識、又は F I T C、ローダミン、ランタンナイドホスホル (lanthanide phosphor)、グリーン蛍光融合タンパク質等の蛍光標識を有していてもよい (Stauber et alを参照)。或いはレポーター遺伝子は、ロイシンジッパーペア配列、二次抗体の結合部位、金属結合ドメイン又はエピトープタグのように二次レポーターによって認識され得る規定のポリペプチドエピトープを有していてもよい。当技術分野の専門家であれば、本発明で開示する方法に用いる特異的レポーター遺伝子 (1 若しくは複数) には色々な種類があり、また採用する個々のモデル系によっても異なるので、本発明で開示する方法は何ら特定のレポーター遺伝子 (1 若しくは複数) に限定されるものではないことは十分理解するところである。

10

【0255】

さらに例を挙げると、Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ)、Promega (Madison, WI)、US Biochemical Corp (Cleveland, OH) 等、数多くの企業がアッセイ用としてキットやプロトコルを市販している。好適なレポーター分子又は標識としては、基質、補因子、阻害剤、磁気ビーズなどと同様に、放射性核種、酵素、蛍光剤、化学発光剤又は発色剤が含まれる。このような標識の使用については、米国特許 A 3 8 1 7 8 3 7 号、同 A 3 8 5 0 7 5 2 号、同 A 3 9 3 9 3 5 0 号、同 A 3 9 9 6 3 4 5 号、同 A 4 2 7 7 4 3 7 号、同 A 4 2 7 5 1 4 9 号、同 A 4 3 6 6 2 4 1 号などに教示がある。

【0256】

本発明の方法に用いるレポーター遺伝子は、ノッチシグナル伝達に敏感なプロモーター領域及び/又は応答エレメントの内少なくとも1つの転写制御下にある。ノッチシグナル伝達に敏感なプロモーター領域及び/又は応答エレメントには、H E S プロモーター、Delt ex プロモーター、ノッチプロモーター、ノッチリガンドプロモーター、I L - 1 0 プロモーター等、内因性ノッチ標的遺伝子の調節エレメントが含まれる。本発明に用いる調節エレメントにはまた、単一の又は複数の C B F 1 部位、C T L A 4 プロモーター及び A I R E プロモーターが含まれる。かかる調節エレメントは、ノッチシグナル伝達経路の活性化によりレポーター遺伝子の発現が増加するように配置する。

20

【0257】

当技術分野で公知の手法により、レポーター遺伝子の1若しくは2以上の複製を宿主細胞に挿入してもよい。本発明において「宿主細胞」なる用語は、本発明における作用因子の標的を有することができる細胞を全て含むものである。ポリヌクレオチドを原核細胞、又は酵母細胞、昆虫細胞、哺乳類細胞等の真核細胞に導入してもよい。宿主細胞が上述の免疫系細胞であることが好ましい。

30

【0258】

トランスフェクション、形質転換、電気泳動等の当技術分野で公知の種々の方法を用いることにより、本発明のポリヌクレオチドを好適な宿主細胞に導入してもよい。本発明のポリヌクレオチドを動物に投与する場合は、例えばレトロウイルス、単純ヘルペスウイルス、アデノウイルス等の組換えウイルスベクターによる感染、核酸の直接注入、或いは遺伝子銃を用いた形質転換などいくつかの方法が当技術分野で知られている。

【0259】

本発明では、宿主細胞は哺乳類細胞であることが好ましく、またポリペプチドは、細胞内において細胞膜上で発現させるか、或いは適切なリーダー配列に先導されるのであれば培養培地中に分泌させる。

40

【0260】

標的遺伝子 (内因性であれ、合成レポーター遺伝子であれ) の発現は、ノッチシグナル伝達単独に、又はノッチシグナル伝達と1若しくは2以上のさらなる刺激シグナルとの組合せに依存する。

【0261】

刺激シグナル

本発明で使用する標的遺伝子 (内因性又はレポーター遺伝子) の発現又は抑制はノッチシ

50

グナル伝達に依存する。好適実施態様では、標的遺伝子の発現若しくは抑制はさらに、補助シグナル（又は「共刺激」）の存在下又は不在下で、免疫細胞に特異的な第2刺激に依存する。

【0262】

実施態様の1つにおいて第2刺激は、免疫細胞受容体の活性化により生じる。免疫細胞受容体には、例えばT細胞受容体（TCR）、B細胞受容体（BCR）、トール様受容体（TLR）などがある。TCR又はBCRシグナルを誘発する能力を有する分子としては、上記各受容体に対する特異的抗原、TSS1、SEA、SEB、SEC、SED、SEE等のスーパー抗原や、Fab、F(ab)₂断片、ファージ提示ペプチド、ScFV等のTCR鎖に対する抗体や、及び鎖を含むCD3タンパク質に対する抗体や、抗CD28抗体や、抗BCR抗体や、LPS及び他の細菌産物や、Fc受容体、補体受容体、マンノース受容体、他のスカベンジャー受容体等の食作用に関与する細胞受容体や、CD36及びv5等のアポトーシスを起こした細胞の浄化に関与する受容体や、DEC205及びDC-light等の樹状細胞受容体や、PMA、イオノマイシン、キナーゼ阻害剤等のTCR及び/又はBCRシグナル伝達経路の活性剤が列挙される。これらの分子は単独で又は併用して使用してよく、抗原提示細胞上に提示される。

【0263】

本発明の実施態様の1つにおいて、以下の工程からなるノッチシグナル伝達モジュレーターの検出法を提供する。

- (a) 免疫系細胞を活性化し、
- (b) 上記細胞を候補モジュレーターと接触させ、
- (c) ノッチシグナル伝達を観察し、(工程(a))、(b)、(c)はどの順番で行ってもよい)、また
- (d) 上記候補モジュレーターがノッチシグナル伝達を調節しているかどうかを測定する。

【0264】

上記アクチベーターは、抗CD3抗体又は抗CD28抗体であることが好ましい。より詳細に述べるとT細胞活性化には、細胞表面のTCR/CD3複合体に端を発する複数の細胞内シグナル伝達イベントが含まれる。抗CD3抗体によりTCR/CD3複合体が交差結合するとT細胞の活性化が誘導され、その結果、IL-2等のサイトカインが産生される。IL-2は、その高親和性受容体に結合して細胞増殖を促進する。さらに、CD28等の共刺激表面分子は、T細胞活性化に補助シグナルをもたらす、例えば抗CD3抗体と結合した場合にIL-2産生を増強する。CD28は、T細胞表面で発現する抗原であり、T細胞の活性化にも関与している。

【0265】

免疫細胞受容体シグナル伝達における補助又は共刺激シグナルには、B7.1-CD80、B7.2-CD86、B7H1、B7H2、B7H3、B7RP1、B7RP2等のB7タンパク質、CTLA4、ICOS、CD2、CD24、CD27、CD28、CD30、CD34、CD38、CD40、CD44、CD45、CD49、CD69、CD70、CD95(Fas)、CD134、CD134L、CD153、CD154、4-1BB、4-1BB-L、LFA-1、ICAM-1、ICAM-2、ICAM-3、OX40、OX40L、TRANCE/RANKリガンド、Fasリガンド、MHCクラスII、DEC205-CD205、CD204-スカベンジャー受容体、CD14、CD206(マンノース受容体)、TLR1~9等のトール様受容体(TLR)、CD207(Langerin)、CD209(DC-SIGN)、Fc受容体2(CD32)、CD64(Fc受容体1)、CD68、CD83、CD33、CD54、BDCA-2、BDCA-3、BDCA-4、ケモカイン受容体、サイトカイン、増殖因子、増殖因子受容体アゴニスト、並びにこれらの変異体、誘導體、アナログ及びそれらの断片が含まれる。

【0266】

実施態様の1つにおいて第2刺激は共刺激である。別の実施態様では、標的遺伝子の発現

は、ノッチシグナル伝達、免疫細胞シグナル伝達及び共刺激という3種類の異なる刺激に依存している。これらの刺激については上述した。これらのシグナルは全て同時に、或いは決められた間隔をおいて（数時間ずらして、或いは数日間ずらしてもよい）伝達してもよい。シグナルは実質的に同時に伝達されることが好ましい。

【0267】

免疫細胞活性化

免疫細胞の活性化は、当業者に公知の好適な方法であればいずれの方法で観察してもよい。例えば細胞毒性活性を観察する方法がある。ナチュラルキラー（NK）細胞においては、活性化後4時間以内に細胞毒性活性が増強される。かかる細胞毒性活性は18時間後に最大となる。

10

【0268】

一旦活性化された白血球は、新たに種々の細胞表面抗原を発現させる。例えばNK細胞は活性化後に、トランスフェリン受容体HLA-DR及びCD25IL-2受容体を発現させる。従って、これらの抗原の発現を観察することにより活性化のアッセイを行うことができる。

【0269】

Hara et al.の「ヒトT細胞活性化：III, 12-0-ホルボール-13-酢酸テトラデカノイルによるリン酸化28kD/32kDジスルフィド結合早期活性化抗原（EA-1）の迅速な誘導、マイトジェン及び抗原（Human T-cell Activation: III, Rapid Induction of a Phosphorylated 28kD/32kD Disulfidelinked Early Activation Antigen (EA-1) by 12-0-tetradecanoyl Phorbol-13-Acetate, Mitogens and Antigens）」（J. Exp. Med., 164: 1988 (1986)）、及び Cosulich et al.の「T細胞活性化初期に関与する抗原（MLR3）の機能の特徴化（Functional Characterization of an Antigen (MLR3) Involved in an Early Step of T-Cell Activation）」（PNAS, 84: 4205 (1987)）は、活性化後まもなくT細胞上で発現される細胞表面抗原について説明している。これらの抗原EA-1及びMLR3は、それぞれ28kD及び32kDの主要構成要素を有する糖タンパク質である。EA-1とMLR3はHLAクラスII抗原ではなく、MLR3モノクローナル抗体はIL-1との結合を阻止する。これらの抗原は、活性化後18時間以内に活性化T細胞上に出現し、48時間後においても依然として出現が継続している。

20

【0270】

上記の抗原は、白血球の活性化を検出する上でも有用である。白血球活性化はさらに、欧州特許第325489号（参考のため本明細書に添付）の記載に従って観察してもよい。この方法の概略は、ATCC No. HB-9627と命名されたハイブリドーマによって産生されたモノクローナル抗体が認識する細胞抗原と相互作用するモノクローナル抗体（「抗Leu23抗体」）を用いる方法である。

30

【0271】

抗Leu23抗体は、活性化され、かつ抗原で刺激された白血球の細胞表面抗原を認識する。Leu23抗原は、活性化後4時間以内に活性化NK細胞上で発現し、活性化から72時間経過してもなお発現が継続している。Leu23は、N-結合型糖鎖を少なくとも2つ有し、24kDのサブユニットからなるジスルフィド結合二量体である。

40

【0272】

NK細胞上におけるLeu23の出現が、細胞毒性の発生と相関していること、また数種のT細胞上におけるLeu23の出現が、T細胞抗原受容体複合体の刺激と相関していることから、抗Leu23抗体は白血球における活性や刺激を観察する上で有用である。免疫細胞の活性を観察する方法の詳細についてはさらに、'The Natural Killer Cell' Lewis C. E. and J. O'D. McGee 1992. Oxford University Press; Trinchieri G. 'Biology of Natural Killer Cells' Adv. Immunol. 1989 vol 47 pp187-376; 'Cytokines of the Immune Response' Chapter 7 in "Handbook of Immune Response Genes". Mak T. W. and J. J. L. Simard 1998 に記載されており、参考のため本明細書に添付する。

【0273】

50

免疫細胞は、カルシウムシグナル伝達因子（イオノマイシン等のカルシウムイオノフォアなど）及び／又はホルボールミリスターアセタート（PMA）等のプロテインキナーゼ（例；プロテインキナーゼC又はMAPキナーゼ）アクチベーターで活性化されることが好適である。或いは、例えばフィトヘマグルチニン（PHA）等のレクチンもまたT細胞の活性化に用いられる（Nowell, P. C. (1990) Cancer Res. 20: 462-466）。或いは例えば、抗CD3抗体、抗T細胞受容体抗体（抗TCR抗体）及び／又は抗CD28抗体等の抗体も用いられる。B細胞抗原B7の共活性化ドメインを有するタンパク質などのCD28リガンドも用いられる。

【0274】

イオノマイシン等のカルシウムイオノフォアをアクチベーターとして用いる場合、約5 μ g/ml未満、好ましくは約1000 ng/ml未満、好ましくは約250 ng/ml未満、好ましくは約200 ng/ml未満、好ましくは約100 ng/ml未満の濃度で用いる。従って濃度は、例えば約0.01 ng/ml～約5 μ g/mlの範囲、好ましくは約0.1 ng/ml～約1000 ng/ml、好適には約0.1 ng/ml～約250 ng/ml、好ましくは約1 ng/ml～約200 ng/mlの範囲にある。

10

【0275】

イオノマイシン等のカルシウムイオノフォアをアクチベーターとして用いる場合、約10 μ M未満、好ましくは約5 μ M未満、好ましくは約2 μ M未満、好ましくは約0.5 μ M未満、好ましくは約0.1 μ M未満の濃度で用いる。約0.001～10 μ M、例えば約0.01～0.5 μ Mの範囲でイオノフォアを用いることが好適である。

20

【0276】

プロテインキナーゼアクチベーターは、カルシウムイオノフォアに加えて、或いはカルシウムイオノフォアに代えて細胞活性化に用いることができる。キナーゼアクチベーターは、MAPキナーゼアクチベーター（MAPKKK、MAPKK、MAPKの各ファミリーにおける1若しくは2以上のメンバー、及びそれらの会合ホスファターゼ（例；p38、Erk及びJnk経路のアクチベーター））、又はプロテインキナーゼCアクチベーター（例えばPMA又はTPAに対するホルボールエステル）であることが好適である。

【0277】

プロテインキナーゼを用いる場合、約50 nM未満、好ましくは約20 nM未満、好ましくは約10 nM未満、好ましくは約1 nM未満、好ましくは約0.1 nM未満の濃度で用いる。例えば約0.001～10 nM、例えば約0.01～0.5 nMの範囲でイオノフォアを用いることが好適である。

30

【0278】

免疫細胞は、ノッチ又は免疫シグナル伝達のレベルが、少なくとも30%の最適レベル、好ましくは少なくとも50%の最適レベル、好ましくは少なくとも70%の最適レベル、好ましくは少なくとも80%の最適レベル、好ましくは少なくとも90%の最適レベル、好ましくは少なくとも95%の最適レベルを示すように活性化されることが好ましい。「最適」とは、用いる系における応答（例えばレポーターの顕現によって測定する）を最大化する活性レベルを意味する。x%の最適とは、用いる系における最適応答のうち少なくともx%をもたらす活性レベルを意味する。

40

【0279】

最適な免疫細胞活性を用いてスクリーニングを行うことが望ましい場合もあるが（例えばノッチシグナル伝達のインヒビターをより簡便に同定するため）、それ以外の場合においては、準最適な免疫細胞活性を用いてスクリーニングを行うことが望ましい（例えばノッチシグナル伝達のアクチベーターをより簡便に同定するため）。

【0280】

同様にノッチシグナル伝達活性について、最適なノッチ活性を用いてスクリーニングを行うことが望ましい場合もあるが（例えばノッチシグナル伝達のインヒビターをより簡便に同定するため）、それ以外の場合においては、準最適なノッチ活性を用いてスクリーニングを行うことが望ましい（例えばノッチシグナル伝達のアクチベーターをより簡便に同定

50

するため)。

【0281】

ノッチシグナル伝達活性化は、ノッチ又は免疫シグナル伝達が少なくとも30%の最適レベル、好ましくは少なくとも50%の最適レベル、好ましくは少なくとも70%の最適レベル、好ましくは少なくとも80%の最適レベル、好ましくは少なくとも90%の最適レベル、好ましくは少なくとも95%の最適レベルを示すような活性化が好ましい。「最適」とは、用いる系における応答(例えばレポーターの顕現によって測定する)を最大化する活性レベルを意味する。x%の最適とは、用いる系における最適応答のうち少なくともx%をもたらす活性レベルを意味する。

【0282】

ノッチ活性化

ノッチシグナル伝達は、種々の方法により免疫細胞において活性化される。例えば免疫細胞が既にノッチを発現していてもよく、その場合、例えばノッチリガンド若しくはその活性部分によってノッチを活性化することによりノッチシグナル伝達が活性化される。

【0283】

免疫細胞が自然にノッチを発現することがない場合、或いは発現(従ってシグナルも)を亢進させたい場合、かかる免疫細胞にノッチをトランスフェクトし、また例えばノッチリガンド又はその活性部分によってノッチシグナル伝達を活性化する。

【0284】

或いは、構成的に活性なノッチの剪断形態を免疫細胞にトランスフェクトする。その場合、ノッチシグナル伝達を樹立するためにノッチリガンド等による活性化は必要ではない。このような剪断型ノッチは例えば参考文献として添付したLu et al, PNAS Vol 93, pp5663-5667 (May 1996)からも知られている。この文献には細胞外ドメインが欠失した剪断型ノッチについての記載がある(N1(EC))。

【0285】

或いは、ノッチ細胞内ドメイン(NotchIC)又はその活性部分を発現させる発現ベクターを免疫細胞にトランスフェクトしてもよく、それにより、ノッチシグナル伝達を樹立するためのノッチリガンドなどによる活性化はやはり不要となる。

【0286】

免疫シグナル伝達

ここに用いる「免疫シグナル伝達」なる用語には、免疫系細胞を活性化するシグナル伝達経路が含まれ、かかる免疫系細胞としては白血球が好ましく、リンパ球がより好ましく、T細胞がより好ましい。免疫シグナル伝達は、T細胞受容体、B細胞受容体又はトール様受容体の活性化によって活性化されるシグナル伝達経路と関連していることが好ましい。免疫シグナル伝達は、T細胞受容体複合体の活性化によって活性化される細胞内シグナル伝達経路のいずれかに関連していることが好ましく、ここで複合体という用語は、共刺激シグナルを発生する膜タンパク質と並びT細胞受容体及びCD3分子の両方のタンパク質鎖をも包含する。これらの免疫シグナル伝達経路は、膜受容体複合体の構成因子に対する生理学的若しくは遺伝子工学的に操作されたリガンドや、他にも細胞質及び/又は核といった細胞内で作用するシグナル伝達経路タンパク質のアクチベーターによって活性化される。

【0287】

リンパ球の活性化は、抗原/MHC複合体や受容体構成因子に対する抗体によってリンパ球の抗原受容体がクラスター化されることにより刺激される(一般論としては例えば、Immunobiology (4th Edition, 1999), Janeway, Travers, Walport and Capra, Elsevier Science出版を参照)。

【0288】

シグナル伝達は、受容体複合体と会合するタンパク質チロシンキナーゼが活性化されることにより開始される。受容体のクラスター化により酵素同士が、また酵素と受容体構成因子とが極めて接近し、上記キナーゼと、受容体タンパク質鎖の細胞質尾部との双方におけ

10

20

30

40

50

るチロシン残基のリン酸化をもたらす。これらのリン酸化イベントは、シグナル伝達に關与する他のタンパク質のための、また酵素作用の活性化のための相互作用部位をもたらすのに寄与している。チロシン残基からホスホ基を取り除くチロシンホスファターゼもまた活性化イベントと活性化の程度を調節することの双方に關与している。

【0289】

s r cファミリーのチロシンキナーゼは、上記の受容体が仲介する活性化に關与する最初のキナーゼ類を代表するものである。T細胞においてはl c k及びf y nが主要な開始機能を有し、Z A P - 7 0等、他のチロシンキナーゼの活性化に寄与する。同様にB細胞ではf y n、b l k及びl y nが同様の機能を果たしてキナーゼS y kを活性化する。T細胞受容体複合体(C D 3)又はB細胞受容体複合体(I g / I g)の受容体シグナル伝達鎖は、I T A M s (immunoreceptor tyrosine-based activation motifs; 免疫受容体チロシンを基礎とする活性化モチーフ)と呼ばれる配列を有するチロシンにおいてチロシンリン酸化される。I T A Mは、Y X X [L / V] X₇₋₁₁ Y X X [L / V]という標準配列を有し、Yはチロシン、Lはロイシン、Vはバリンであり、Xはどのアミノ酸を示すものでもよい。これらのI T A M sは、S H 2ホスホ - チロシン結合ドメインを介して結合する他のシグナル伝達タンパク質において「ドッキング部位」として機能する。

10

【0290】

数種の異なるクラスのタンパク質が、上述の活性化受容体に動員される。ホスフォリパーゼc (P L C)が動員され、活性化されてイノシトールトリホスファート(I P₃)とジアシルグリセロール(D A G)という2種類の主要シグナル伝達メディエーターが産生される。I P₃によって、カルシウムイオン(C a⁺⁺)が細胞内の貯蔵部分から細胞質へと放出され、その結果、膜におけるカルシウムチャネルが開き、より多くのC a⁺⁺が細胞内へと流れ込む。核へのシグナル伝達に協働して重要な役割を果たし、遺伝子転写イベントを調節するカルモジュリン及びカルシノイリンを含む多数のカルシウム結合タンパク質が、カルシウム流入により活性化され、特に転写因子のN F A Tファミリーメンバーが活性化される。D A Gは、セリントレオニンキナーゼのプロテインキナーゼc (P K C)ファミリーにおける種々のメンバー(そのいくつかはC a⁺⁺によっても活性化される)の活性化に關与する。P K Cは、種々のシグナル伝達カスケードにおいて別のタンパク質を多数リン酸化し、特に転写因子のN F Bファミリーメンバーの活性化により、やはり核へのシグナル伝達を促進する。

20

30

【0291】

小G T P結合タンパク質(“小Gタンパク質”)もまたチロシンキナーゼによって活性化される受容体からのシグナル伝達に關与している。最もよく知られているのがR a sである。

【0292】

上記小Gタンパク質R a sは、G T Pに結合するか、或いはG D Pに結合するかという2種類の状態で存在している。R a sのG T P結合型は、このタンパク質の活性型であり、G D P結合型は不活型である。R a s自体もG T P a s e活性をもっているため、リン酸を除去し、R a sを不活型に転化することができる。小Gタンパク質は通常、不活型で見い出され、その活性化にはG D PのG T Pへの交換を促すグアニンヌクレオチド交換因子(G E F)が必要である。リンパ球では、I T A M sに動員されたアダプタータンパク質によって、R a s、及びR a c等の他の小Gタンパク質が、活性化された受容体に動員される。G E F sもまた上記アダプターに結合し、これらGタンパク質の活性化に寄与する。

40

【0293】

リンパ球シグナル伝達に關与するアダプタータンパク質としては多数列挙できる。T細胞に關して主要な2例がL A T及びS l p - 7 6である。チロシンリン酸化によって活性化されるL A Tは、膜の脂質ラフトに局在し、G r b 2、S O S、R a s等の多数かつ種々のアダプター・シグナル伝達分子に直接又は間接に結合する。B細胞においてはB L N Kが同様のアダプター機能を有する。やはりGタンパク質活性をもち、V a vと呼ばれる別

50

のアダプタータンパク質はB細胞シグナル伝達において重要な役割を担っている。

【0294】

Ras等の活性化Gタンパク質は、マイトジェン活性化タンパク質キナーゼカスケード(MAPキナーゼ経路)として知られるタンパク質キナーゼカスケード数種の活性化に関与している。これらのカスケードは種々の転写因子のリン酸化及び活性化をもたらし、その結果、シグナルを送達して核内における遺伝子発現イベントを導く。例えば、fos及びjunのメンバーのヘテロダイマーである転写因子のAP-1ファミリーは、上記MAPキナーゼシグナル伝達経路の重要な標的である。

【0295】

MAPキナーゼシグナル伝達カスケードは、MAPキナーゼキナーゼキナーゼ(MAPKKK)と呼ばれるカスケード上の1番目のキナーゼにおける作用を介して活性化された小Gタンパク質によって活性化されると一般的に説明される。同様にして次にMAPキナーゼキナーゼ(MAPKK)がリン酸化及び活性化され、次いで単一アミノ酸によって分離したチロシンとトレオニンの2つの部位で作用が生じ、MAPキナーゼ(MAPK)タンパク質がリン酸化及び活性化される。2部位でリン酸化したMAPKはいずれも酵素的に活性となり、核への移行が可能となり、核において転写因子をリン酸化する。これまでに3種類の主要MAPキナーゼカスケードが定義されており、それらは全てリンパ球において活性であり、MAPキナーゼであるErk(特にリンパ球におけるErk1及びErk2)、p38及びJnk(特にリンパ球におけるJNK1及びJNK2)の活性化をもたらす。Erk1及びErk2のアクチベーターはMeK1及びMeK2と呼ばれる。

10

20

【0296】

種々の共受容体は、抗原-受容体に仲介されるリンパ球活性化の増強や調節に役割を担っている。T細胞においてはCD2、CD4、CD8及びCD45、B細胞においてはCD19、CD21及びCD81が例示される。またさらに、共刺激分子もまた免疫シグナル伝達の増強や修飾に機能を果たす。例えばCD28、CD40、OX40などは、細胞応答性の質及び量の両方を測定する上で役立つキーシグナルを生じさせることができる。これらの分子はまた、リンパ球抗原受容体/共受容体複合体から拡散するシグナルによって統合されるシグナル伝達経路を活性化し、小Gタンパク質仲介カスケードだけでなくチロシン/トレオニンキナーゼ及びセリン/トレオニンキナーゼを有する。

30

【0297】

種々のサイトカイン(例:IL-2、IL-4、IL-10、IFNγ、IL-15等)もまたリンパ球の応答性を調節する上で重要な役割を担っている。これらのサイトカインに対する受容体は、他の経路の中でもJanusキナーゼ(JAKS)と呼ばれ、受容体によって活性化されるキナーゼを含むシグナル伝達経路を用いる。JAKSには、JAK1、2、3及びTyk2が含まれる。これらは、シグナルトランスデューサー・転写アクチベーター(STATS)と呼ばれるタンパク質ファミリーをリン酸化する。かかるリン酸化により、STATSのホモダイマー化及びヘテロダイマー化が、STATホスフォチロシンモチーフに結合するSTATS自身のSH2ドメインによって促進される。上記ダイマーはその後核へと移行し、核において種々のサイトカイン反応性遺伝子を活性化する。かかる活性化経路はSOCSタンパク質(例;SOCS1、2及び3)と呼ばれる阻害タンパク質集団によって調節される。種々のサイトカインが種々のSTATSを活性化する。例えば、IL-4受容体はSTAT6を活性化し、STAT6はCD23等のIL-4反応性遺伝子を活性化する機能をもつ。IL-12は、IFNγ遺伝子発現を調節する役割を有するSTAT4を活性化する。

40

【0298】

種々のシグナルの統合及びそれらの相対的強度が、転写反応の特徴、遺伝子/タンパク質発現プロファイル、キネティクスを決定し、また、それらが細胞における反応性の全体としての特長を決定する。例えばT細胞では、上記統合及び強度が、エフェクターT細胞及び記憶T細胞の反応発生、種々のサイトカインプロファイルや他のエフェクター機能に影響し、或いは不応答性又はアネルギー状態にT細胞を誘導する。別型のT細胞もまた、

50

それらの異なる潜在反応状態に対して異なる量的及び質的要件を示す。

【0299】

A P C sにおいては異なる受容体が、A P Cの活性化及び機能を調節するシグナルを伝達することもできる。例えば病理材料に結合させたF c受容体、スカベンジャー受容体及びトール様受容体(T L R s)は、リンパ球が病原体を排除するために最も有効な反応を示せるように、リンパ球に正しいシグナルを伝達することを促す反応をA P Cに誘導するシグナルを発生させることができる。この点に関してはT L R sが特に重要である。T L R s(例; T L R 1、T L R 2、T L R 3など)は、異なる分子集団(病原体由来のことが多い。例; L P S、ウイルス性R N A、C p Gモチーフ)が結合することにより活性化される。その結果、M y D 8 8と呼ばれるアダプタータンパク質がT L Rの細胞質尾部に結合し、さらにその結果、キナーゼカスケードの活性化がもたらされ、転写因子(特にN F Bファミリー)の活性化に至る。然る後に上記の現象は、リンパ球、特にT細胞(例; B 7ファミリーの表面タンパク質、I L - 1 2等のサイトカインなど)の活性化と分化を促進する分子をコードする遺伝子の発現調節機能を示す。

10

【0300】

アッセイ

1若しくは2以上の標的遺伝子の発現を観察するアッセイ、及びノッチシグナル伝達における調節を検出する他の方法について以下に述べる。

【0301】

本発明は、化合物のノッチシグナル伝達調節能を調べるスクリーニングに用いるセルベースアッセイ(cell-based assay)を提供することを好ましくする。一実施態様において本発明は、以下の工程からなるアッセイを提供する。

20

(a)免疫細胞培養物を提供し;

(b)上記細胞に任意にレポーター構築物をトランスフェクトし;

(c)上記細胞に任意にノッチ遺伝子をトランスフェクトし;

(d)上記細胞を1若しくは2以上の試験化合物に暴露し;及び

(e)試験化合物に暴露した細胞と、未暴露の細胞におけるノッチシグナル伝達の違いを測定する。

【0302】

本発明のアッセイは、免疫系細胞におけるノッチシグナル伝達に対する候補調節因子による阻害又は増強のいずれかを検出するように設定されている。その方法は、必要に応じて合成レポーター遺伝子で形質転換やトランスフェクションなどを行った免疫系細胞を、適切な緩衝液中で十分量の候補調節因子と混合し、ノッチシグナル伝達を観察するというものである。調節因子としては、小分子、タンパク質、抗体、又は上述したように他のリガンドでもよい。標準的なアッセイ技術及び適切な対照を用いることにより、標的遺伝子(これについても上述した)の活性量を各試験化合物について測定する。検出したシグナルを基準シグナルと比較し、基準シグナルからみて何らかの調節が生じていればそれを測定することが好ましい。

30

【0303】

本アッセイは、ノッチシグナルを救済する能力をもつ化合物を同定するため、ノッチシグナル伝達経路における既知のアンタゴニストの存在下において実施してもよい。

40

【0304】

種々多様な薬剤スクリーニング法のいずれかをを用いて、免疫系細胞におけるノッチシグナル伝達経路の調節能を有する化合物を同定する際に、好適標的(アミノ酸配列及び/又はヌクレオチド配列など)の1若しくは2以上を使用してよい。そのような試験に供する標的は、溶液中で遊離の状態、固体支持体に固定させた状態、細胞表面に担持されている状態、又は細胞内に局在する状態のいずれであってもよい。本発明のアッセイは、セルベースアッセイである。

【0305】

本発明のアッセイは、多数の作用因子を試験するスクリーニング法である。特徴の1つと

50

して、本発明のアッセイ法は、ハイスループットスクリーニングである。

【0306】

薬剤のスクリーニング法は、Geysen (欧州特許第0138855号、1984年9月13日発行)に記載の方法に基づいたものでもよい。概略を述べると、多数の異なる小ペプチド候補調節因子を、プラスチックピン又は他の物の表面などの固体基質上で合成する。これらのペプチド試験化合物を好適な標的又はその断片と反応させ、洗浄する。その後、当技術分野で公知の方法を適切に実施するなどして、結合した物質を検出する。精製した標的もまた、プレートに直接コーティングして薬剤スクリーニング法に用いることができる。ハイスループットスクリーニング (HTS; 高処理能力スクリーニング) に用いるプレートは、マルチウエルプレートであり、1プレートあたり96個、384個、若しくは384個を超えるウエルがあることが好ましい。細胞は「ローン (lawn)」として播種できる。或いは、非中和抗体を使用してペプチドを捕捉し、固体支持体上に固定することができる。合成化合物のスクリーニングに用いる上述のハイスループットスクリーニングはまた、有機候補調節因子の同定にも用いることができる。

10

【0307】

本発明はまた、標的への結合能を有する中和抗体が標的に特異的に結合する際に、かかる結合に関して試験化合物と競合するという競合的薬剤スクリーニングアッセイの使用も意図するものである。

【0308】

本発明によるアッセイ方法は定量アッセイにおけると同様に、試験化合物の小規模及び大規模いずれのスクリーニングにも適していると期待される。

20

【0309】

種々の核酸アッセイもまた知られている。公知の、又は後に開示されている従来法であればどれを採用してもよい。好適な核酸アッセイとしては以下に説明する増幅法、PCR、RT-PCR、RNaseプロテクション法、プロット法、分光分析、レポーター遺伝子アッセイ、遺伝子チップアレイ法、またこれら以外のハイブリダイゼーション法などが列挙される。

【0310】

標的遺伝子の存在、増幅、及び/又は発現は、適切に標識されたプローブを用い、例えば、従来式サザンブロッティング、標的mRNAの転写量を測定するノーザンブロッティング、ドットブロッティング (DNA又はRNA分析)、又はインサイチューハイブリダイゼーションにより試料から直接測定される。当技術分野の専門家であれば、所望する場合、これらの方法に如何なる変更を加えればよいかを容易に構想できる。

30

【0311】

分析を行うために試料から核酸を作製するには、通常核酸増幅を行うことが必要となる。多くの増幅法が、酵素鎖反応 (ポリメラーゼ鎖反応、リガーゼ鎖反応、又は自己維持的配列複製)、又はベクター自身がクローニングされたベクターの全体又は部分の複製に依存している。本発明における増幅法は、ポリメラーゼ鎖反応に例示される指数関数的増幅であることが好ましい。

【0312】

多くの標的及びシグナル増幅法が文献に記載されており、例えば、Landegren, U., et al., Science 242: 229-237 (1988) 及びLewis, R., Genetic Engineering News 10: 1, 54-55 (1990) に、それらの方法についての概説が見い出せる。これらの増幅法を本発明の方法に用いてもよく、ポリメラーゼ鎖反応 (PCR)、インサイチューでのPCR、リガーゼ増幅反応 (LAR; ligase amplification reaction)、リガーゼハイブリダイゼーション、Qbetaバクテリオファージレプリカーゼ法、転写に基づく増幅系 (TAS; transcription-based amplification system)、転写産物配列決定によるゲノム増幅 (GAWTS; genomic amplification with transcript sequencing)、核酸配列に基づく増幅法 (NASBA; nucleic acid sequence-based amplification)、インサイチューでのハイブリダイゼーションが含まれる。種々の増幅法に用いるのに適したプライマーは、当技

40

50

術分野で公知の方法により調製できる。

【0313】

PCRは、DNAポリメラーゼが創出するプライマー伸張反応の反復サイクルからなり、特に米国特許第4683195号及び同4683202号で説明されている核酸増幅法である。PCRは元々、不純試料からDNAを増幅する手段として開発された。この技術は反応液を繰り返し熱したり冷却したりの温度サイクルを基礎とし、それによりプライマーを標的配列にアニーリングさせ、これらプライマーを伸張することにより、娘鎖の複製を形成するものである。RT-PCRは、逆転写酵素を用いて第1鎖cDNAを作製する際にRNA鋳型を使用する。次にこのcDNAを標準的なPCRプロトコールに則って増幅する。合成と変性のサイクルを反復して行うことにより、作製する標的DNAの複製数が指数関数的に増加する。しかし反応成分が限られてくるに従って増幅速度が低下し、やがて停滞期に達し、PCR産物における純増加は殆ど或いは全く認められなくなる。反応開始時点における核酸標的の複製数が多いほど、かかる「終点」に早く到達する。PCRは、診断分野において、あらゆる既知の核酸の増幅に用いることができる(Mok et al., (1994), Gynaecologic Oncology, 52: 247-252)。

10

【0314】

自己維持的配列複製(3SR)はTASの変化型であり、酵素カクテル及び適切なオリゴヌクレオチドプライマーに促進されて逆転写酵素(RT)、ポリメラーゼ及びヌクレアーゼの各活性が連続的に繰り返し展開する核酸鋳型の等温下での増幅が含まれる(Guatelli et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1874)。RNA/DNAの異種2本鎖におけるRNAの酵素分解を熱変性の代わりに利用する。RNase H及び他の全酵素を反応に加え、全工程が単一温度の下で行われ、さらに試薬を加えることもしない。この方法に従えば、42℃ 1時間で $10^6 \sim 10^9$ の増幅が行われる。

20

【0315】

ライゲーション(連結)増幅反応又はライゲーション増幅系では、DNAリガーゼ及びオリゴヌクレオチド4個(標的鎖について2個ずつ)を用いる。この技術に関しては、Wu, D. Y. and Wallace, R. B. (1989) Genomics 4: 560に記載がある。上記4個のオリゴヌクレオチドは、標的DNA上の隣接配列とハイブリダイズしリガーゼによって結合する。この反応は、熱変性及びサイクル反復によって行われる。

【0316】

本発明では、他の増幅技術も利用する。例えば、ローリングサークル増幅法(Lizardi et al., (1998) Nat Genet 19: 225)は市販の増幅技術(RCATTM)であり、DNAポリメラーゼによって実行され、線状又は幾何学状キネティックスのいずれかを有する環状オリゴヌクレオチドプローブを等温条件下で複製できる。

30

【0317】

好適に設計されたプライマー2本の存在下においてDNA鎖置換及び大量分枝化(hyperbranching)によって幾何学的増幅が生じ、1時間で各環の複製を 10^{12} 以上作製する。

【0318】

1本のプライマーを使用する場合、RCATでは、標的に共有結合して何千個もがタンデムに結合する、該標的のDNA複製の線状鎖が数分間のうちに作製される。

40

【0319】

さらに、鎖置換増幅法(SDA; strand displacement amplification、Walker et al., (1992) PNAS (USA) 80: 392)という技術は、特定標的に独特な、特異的に定義された配列から開始する。しかし温度サイクルに依拠する他の方法と異なり、SDAは、一連のプライマー、DNAポリメラーゼ及び制限酵素を使用することにより、上述の独特な核酸配列を指数関数的に増幅させる等温法である。

【0320】

SDAは、標的作製期と指数関数的増幅期の両方を有する。

【0321】

標的作製においては、2本鎖DNAを熱変性させて1本鎖の複製を2本得る。特別に作出

50

した一連のプライマー（塩基配列を複製する増幅プライマー及び新たに作成した鎖を置換するバンパープライマー）がDNAポリメラーゼと結び付くことにより、指数関数的増幅が可能な改変型標的が形成される。

【0322】

指数関数的増幅の過程は、標的作製期から改変型標的（制限酵素認識部位を有する1本鎖部分DNA鎖）により開始する。

【0323】

増幅プライマーは、その相補DNA配列において各鎖に結合する。次にDNAポリメラーゼは、改変型標的を個々のヌクレオチドを付加するための鋳型として使用し、プライマーをその3'側から伸張させる位置を決める。従って伸張したプライマーは、両末端に完全な制限酵素認識部位を有する2本鎖DNAセグメントを形成する。

10

【0324】

次に、制限酵素を上記2本鎖DNAセグメントに、その制限酵素認識部位で結合させる。制限酵素は、上記2重鎖（double-sided）セグメントの一方の鎖だけを開裂してニックを形成した後に上記認識部位から解離する。DNAポリメラーゼはニックを認識してその部位から鎖を伸張し、既に作製済の鎖を置換する。認識部位はこのように繰り返しニックされ、制限酵素とDNAポリメラーゼとにより標的セグメントを有するDNA鎖を繰り返し置換しながら修復される。

【0325】

次に、置換された各鎖は、上述のように増幅プライマーとのアニーリングに供される。このプロセスは新しいDNA鎖においてニック形成、伸張及び置換を繰り返しながら連続し、その結果、元のDNA標的が指数関数的に増幅される。

20

【0326】

別の実施態様で本発明は、RNAレベルでの遺伝子発現の検出法を提供する。リボ核酸ハイブリダイゼーションを利用する一般的なアッセイフォーマットには、核ラン-オン（run-on）アッセイ、RT-PCR、RNaseプロテクションアッセイ（Melton et al., Nuc. Acids Res. 12: 7035）が含まれる。採用可能な検出法には、放射活性標識、酵素標識、化学発光（ケミルミネセンス）標識、蛍光標識、また他の適切な標識法が含まれる。

【0327】

リアルタイムPCRは、蛍光タグ又は蛍光染色で標識したプローブを使用し、サイクルを規定回数行った後の産物蓄積量の測定というよりむしろ蓄積していくPCR産物の検出に用いられるという点で、定量アッセイに用いる終点PCRとは異なる。蛍光が有意な増加を示すことに基づいて標的配列の増幅が最初に検出されたのが、サイクル中のどの時点であるかによって反応が特徴付けられる。

30

【0328】

リボ核酸プロテクション（RNaseプロテクション）アッセイは、溶液中の特異的RNAの定量法として非常に高感度な方法である。リボ核酸プロテクションアッセイは、標的としての全細胞RNA又はポリ（A）選択性mRNAで行うことができる。リボ核酸プロテクションアッセイの感度は、高度に特異的な活性に対して放射標識された相補的インビトロ転写プローブを使用することに基づいている。かかるプローブと標的RNAを溶液中でハイブリダイズさせた後、この混合物をリボヌクレアーゼ（RNase）で希釈し、処理し、残存する1本鎖RNAを全て分解する。プローブのハイブリダイズした部分は分解から保護され、上記混合物を、変性ポリアクリルアミドゲル上における電気泳動後さらにオートラジオグラフィーにかけることにより、ハイブリダイズした部分を視覚化できる。保護された断片は高分解能ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分析されるので、リボ核酸プロテクションアッセイはmRNAの特性を正確にマッピングするために採用できる。標的RNAに対して過剰なモル下でプローブがハイブリダイズされる場合、得られるシグナルは試料中の相補RNA量と正比例する。

40

【0329】

例えば、Sambrook et al., 1989 の第14章に記載されているように、PCR技術では、

50

標的核酸配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプローブを使用することが必要とされる。オリゴヌクレオチドを選択するストラテジーについて以下に記載する。

【0330】

本明細書においてプローブは、例えば、10～50個、好ましくは15～30個、最も好ましくは少なくとも20個ほどで、均等物と同一の（又は相補の）連続塩基又はそれより多くの連続塩基を含むヌクレオチド配列を有する1本鎖DNA又はRNAである。プローブとして選択される核酸配列は、擬陽性の結果が出ることを最小限にするために十分な長さを有し、十分に明瞭でなければならない。ヌクレオチド配列は通常、保存された又は高度な相同性を有するヌクレオチド配列又はポリペプチド領域に基づいている。プローブとして用いる核酸は、1若しくは2以上の位置において変性していてもよい。

10

【0331】

プローブを構築する領域として好ましいものには、5'及び/又は3'コード配列、リガンド結合部位をコードすることが予測される配列などが含まれる。例えば、本発明で開示している完全長cDNAクローンやその断片のいずれもプローブとして使用できる。本発明の核酸プローブは、ハイブリダイゼーション後に容易に検出できるように適切な標識手段により標識されていることが好ましい。例えば適切な標識手段としては放射標識がある。DNA断片を標識する好適な方法は、当技術分野では十分公知のように、ランダムプライム反応においてDNAポリメラーゼのKlenow断片とともに³²P dATPを取り込むことによる方法である。通常オリゴヌクレオチドは、³²P標識ATP及びポリヌクレオチドキナーゼで末端標識されている。しかし、断片又はオリゴヌクレオチドの標識には他の方法（例；非放射標識）も用いられ、酵素標識、適切な蛍光体による蛍光標識、ビオチン化がそれに含まれる。

20

【0332】

好ましいのは、高度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする配列やプローブである。

【0333】

ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーとは、ポリ核酸ハイブリッドが安定を保つことができる条件のことを指す。かかる条件は当技術分野の専門家には自明である。当技術分野の専門家には明らかなように、ハイブリッドの安定性は、そのハイブリッドの融点（T_m）に反映され、配列相同性が1%低下する毎に融点が約1～1.5%低下する。一般的にハイブリッドの安定性はナトリウムイオン濃度と温度との関係で決まる。通常はさらに高度なストリンジェンシー条件下でハイブリダイゼーション反応を行い、その後、種々のストリンジェンシー条件下で洗浄を行う。

30

【0334】

ここに用いる高度なストリンジェンシーとは、65～68℃下で1MのNa⁺において安定ハイブリッドを形成する核酸配列だけがハイブリダイゼーションできる条件のことである。高度なストリンジェンシー条件は、例えば6×SSC、5×Denhardt's、1%SDS（硫酸ドデシルナトリウム）、0.1M Na⁺ピロリン酸及び非特異的コンペティターとして変性鮭精子DNA 0.1mg/mlを含む水性溶液におけるハイブリダイゼーションによって得られる。ハイブリダイゼーション後、高度なストリンジェンシーにおける洗浄を数段階にわけて行い、最終洗浄（約30分間）は0.2～0.1×SSC、0.1%SDSでのハイブリダイゼーション温度で行う。

40

【0335】

上記の条件は、種々の緩衝液（例；ホルムアミドを基剤とする緩衝液）及び温度を用いて採用し、繰り返し行うものであると理解される。Denhardt's溶液及びSSCは、他の好適ハイブリダイゼーション緩衝液と同様に当業者には広く知られている（Sambrook, et al., eds. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York or Ausubel, et al., eds. (1990) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc.を参照）。ハイブリダイズするペアの長さやGC含有量もまた影響するので、最適なハイブリダイゼーション条件は実験的に決定しなけれ

50

ばならない。

【0336】

遺伝子発現はレポーター系を使用して検出してもよい。かかるレポーター系には、発現系（例えば観察を行っている遺伝子の発現系）の制御下において容易に同定できるマーカーが含まれる。FACSによる検出及びソーティングが可能な蛍光マーカーが好ましい。特に好ましいのはGFPとルシフェラーゼである。好ましいレポーターとしては他にも細胞表面マーカー、すなわち細胞表面で発現するので容易に同定できるタンパク質がある。従ってセルベーススクリーニングアッセイは、レポータータンパク質（すなわち - ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）又はルシフェラーゼなどの容易にアッセイ可能なタンパク質）の発現がノッチ活性に依存する細胞株を構築することにより設計できる。例えば、上記各種ポリペプチドのいずれか1つをコードするレポーター遺伝子を、ノッチシグナル伝達により特異的に活性化される応答エレメントの制御下に置いてよい。これ以外のアッセイフォーマットには、生物系における反応を直接評価するアッセイが含まれる。セルベースアッセイを採用する場合は、同定した試験化合物（1若しくは2以上）をさらにインビボで試験して、ノッチシグナル伝達経路に及ぼすその効果を測定する。

10

【0337】

一般的に、レポーター遺伝子を発現させてノッチシグナル伝達を測定する上で有用なレポーター構築物は、Sambrook et al (1989) の一般的教示に従って構築してよい。本発明における構築物は通常、目的とする遺伝子の（すなわち内因性標的遺伝子の）プロモーター、並びにGFPやルシフェラーゼなどの所望のレポーター構築物をコードするコーディング配列を有している。GFP及びルシフェラーゼをコードするベクターは当技術分野では公知であり市販もされている。レポーター遺伝子については以下に詳述する。

20

【0338】

標的遺伝子の発現を検出することによる細胞ソーティングは、当技術分野で公知の上記いずれの手法で実施してもよい。例えば細胞をフローサイトメトリーすなわちFACSでソーティングしてもよい。全般的な内容に関しては、Flow Cytometry and Cell Sorting: A Laboratory Manual (1992) A. Radbruch (Ed.), Springer Laboratory, New York を参照のこと。

【0339】

フローサイトメトリーは、細胞の研究及び精製において強力な手法である。フローサイトメトリーは広範に、特に免疫学や細胞生物学の分野において利用されているが、FACSの能力は、生物学の他の多くの分野において利用できる。頭文字のF.A.C.S.は、Fluorescence Activated Cell Sortingを表し、「フローサイトメトリー」と互換性のある用語である。FACSの原理は、液体の細い流れに保持された個別の細胞を1若しくは2以上のレーザービームに通すことにより光を散乱させ、種々の頻度で蛍光染色を発光させるといったものである。光電子増倍管（PMT）は光を電子シグナルに転換し、この電子シグナルをソフトウェアで解析して細胞のデータを作成する。定義付けされた特徴を有する細胞サブ集団が同定され、極めて高純度（～100%）にて懸濁液から自動的にソーティングされる。

30

40

【0340】

FACSは、ポリペプチドをコードする組換えDNAをトランスフェクトした細胞における標的遺伝子の発現を測定するのに用いられる。これは、かかるタンパク質産物を標識することにより直接、或いは構築物中のレポーター遺伝子を使用して間接的に行うことができる。レポーター遺伝子としては、 - ガラクトシダーゼやグリーン蛍光タンパク質（GFP）が例示される。 - ガラクトシダーゼの活性は、フルオレセインジガラクトシダーゼ（FDG）等の蛍光基質を用いるFACSによる検出が可能である。FDGは、低張性ショックを与えることによって細胞内に導入され、酵素によって開裂して蛍光産物を作り出す。この蛍光産物は細胞内に留め置かれる。従って1種の酵素で大量の蛍光産物を産出できるのである。GFP構築物を発現する細胞は、基質を加えることなく蛍光発色する。

50

励起頻度が異なっても同一チャンネルで蛍光発色する G F P 変異体は利用可能である。Two-laser F A C S 機器では、異なるレーザー光線によって励起される細胞の識別が可能であり、よってトランスフェクション 2 種類のアッセイを同時に行うことができる。

【 0 3 4 1 】

別のセルソーティング法を利用してもよい。例えば、本発明には、m R N A に相補的な核酸プローブの使用も含まれる。かかるプローブは、別々にポリペプチドを発現する細胞を同定することに用いられ、それらの細胞はその後マニュアルソーティング法又は F A C S ソーティング法によりソーティングされる。m R N A に相補的な核酸プローブは、Sambrook et al (1989) の一般的なプロトコルを用いる上述の教示に従って調製する。

【 0 3 4 2 】

好適実施態様において本発明には、F A C S セルソーティング法で用いる蛍光体に結合させ、標的 m R N A に相補的なアンチセンス核酸分子の使用も含まれる。

【 0 3 4 3 】

所謂遺伝子チップアレイや高密度 D N A アレイを使用して、遺伝子の発現や同一性に関する情報を得る各種方法についての記載もある (Chee)。これらの高密度アレイは、診断及び予防の目的で特に有用である。In Vivo Expression Technology (I V E T) (Camilli) も使用してもよい。I V E T では、例えば治療や疾患の過程において実験培養の場合と比較してアップレギュレートされた標的遺伝子を同定する。

【 0 3 4 4 】

本発明はまた、ポリペプチドの検出法を提供するものである。プロテインアッセイ (タンパク質測定法) を使用することの利点は、ノッチの活性を直接測定できることである。ポリペプチドレベルを測定するために利用可能なアッセイ技術は、当技術分野の専門家には十分公知である。そのようなアッセイ法には、放射免疫測定法、競合結合測定法、タンパク質ゲル測定法、ウエスタンブロット分析、抗体サンドイッチアッセイ、抗体検出法、F A C S、E L I S A が含まれる。例えばポリペプチドは、タンパク質ゲル上における微分型電気移動度から、或いは質量分光法等の他のサイズ分析法により検出できる。検出法は配列特異的であってよい。例えば、ポリペプチドを特異的に認識するポリペプチド又は R N A 分子をインビボ又はインビトロで開発することができる。

【 0 3 4 5 】

例えば S E L E X により R N A アプタマーを作製できる。S E L E X は、標的分子への高度に特異的な結合性を有する核酸分子をインビトロで進化させる方法である。この方法については例えば、米国特許第 5 6 5 4 1 5 1 号、同 5 5 0 3 9 7 8 号、同 5 5 6 7 5 8 8 号、同 5 2 7 0 1 6 3 号、また P C T 公報 W O 9 6 / 3 8 5 7 9 号に記載されている。

【 0 3 4 6 】

本発明はいくつかの実施態様において、ポリペプチドを特異的に認識して結合する抗体を含む。

【 0 3 4 7 】

抗体は免疫した動物の血清から回収できる。モノクローナル抗体は従来法に従い、免疫化動物の細胞から調製してよい。

【 0 3 4 8 】

本発明の抗体は、観察対象の遺伝子を発現させる細胞を同定するのに有用である。

【 0 3 4 9 】

本発明による抗体は、I g E 及び I g M 抗体等の天然型に分類される全抗体でよいが、I g G 抗体が好ましい。さらに本発明には、F a b、F (a b ') 2、F v、S c F v 等の抗体断片が含まれる。F v 及び S c F v 等の小断片は、そのサイズの小ささ故に組織における分布性に優れており、診断及び治療への適用に好都合である。

【 0 3 5 0 】

抗体は標識を含んでいてもよい。特に好適なのは、インビボの神経細胞における抗体の画像化を可能にする標識である。このような標識としては、組織内で容易に視覚化できる放射活性標識又は金属粒子等の放射オパーク (radioopaque) 標識を採用してよい。さらに

10

20

30

40

50

蛍光標識や、組織内における視覚化が可能でセルソーティングに用いられる他の標識でもよい。

【0351】

より詳細に述べると、本発明に用いる抗体は標識等のエフェクタータンパク質を含む改変抗体であってもよい。特に好適なのは、インビボでの抗体分布を画像化できる標識である。かかる標識としては、患者の体内で容易に視覚化できる放射活性標識又は金属粒子等の放射オパーク標識がある。さらに蛍光標識や、組織上での視覚化が可能な他の標識でもよい。

【0352】

本明細書記載の抗体は、細胞培養から作製することができる。細菌培養や好ましくは哺乳類細胞培養による抗体の作製には、確立した手法に基づいた組換えDNA技術が利用できる。抗体産物は非分泌細胞から単離できるが、選択した細胞培養系は任意に抗体産物を分泌する。

10

【0353】

ハイブリドーマ細胞又は哺乳類宿主細胞のインビトロでの増殖は、好適な培養培地で行う。かかる培養培地は、ダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)又はRPMI 1640培地を例とする通常の標準培養培地であり、それらは哺乳類血清(例えばウシ胎児血清)又は微量元素及び増殖維持補助剤(例えば、正常マウス腹膜滲出細胞等の支持細胞、脾臓細胞、骨髓マクロファージ、2-アミノエタノール、インシュリン、トランスフェリン、低密度リポタンパク質、オレイン酸など)を任意に補充されている。細菌細胞や酵母細胞である宿主細胞の増殖も同様に当技術分野で公知の好適培養培地で行われる。細菌の場合は、LB、NZCYM、NZYM、NZM、Terrific Broth、SOB、SOC、2xYT、又はM9最小培地等の培地が例示され、酵母の場合は、YPD、YE PD、最小培地、又は完全最小Dropout培地等の培地が例示される。

20

【0354】

インビトロで作製すると、比較的純粋な抗体調製物が得られ、所望の抗体を大量に得るためのスケールアップが可能となる。細菌細胞、酵母又は哺乳類細胞の培養技術は当技術分野では公知であり、均一浮遊培養(例;エアリフトリアクター又は連続攪拌リアクターにおいて)、或いは固定化又は封込み(entrapped)細胞培養(例;中空糸やマイクロカプセル中で、アガロースマイクロビーズやセラミックカートリッジ上で)などがある。

30

【0355】

哺乳類細胞をインビボで増殖させることによって所望の抗体を大量に得ることができる。そのために、所望の抗体を産生するハイブリドーマ細胞を組織適合性哺乳動物に注入して抗体産生腫瘍の増殖を惹起する。この注入に先立ち、任意でこれらの動物を炭化水素、特にプリスタン(テトラメチル-ペンタデカン)等の鉱物油で初回免疫(プライム)してもよい。1~3週間後に上記哺乳動物の体液から抗体を単離する。例えば、好適骨髓腫細胞をBalb/cマウスの抗体産生脾臓細胞と融合させて得たハイブリドーマ細胞、又は所望の抗体を産生するハイブリドーマSp2/0細胞株由来のトランスフェクト細胞を、プリスタンで任意に前処理したBalb/cマウスに腹腔内注入し、1~2週間後にそれらの動物から腹水を回収する。

40

【0356】

前述の、或いは他の方法について、例えばKohler and Milstein, (1975) Nature 256: 495-497; 米国特許第4376110号; Harlow and Lane, Antibodies: a Laboratory Manual, (1988) Cold Spring Harbor で検討されており、それらを参考文献として本明細書に添付する。組換え抗体分子の調製法は上記参考文献に記載されており、また例えば、欧州特許第0623679号、同0368684号、同0436597号にも記載があり、これらも本明細書に添付する。

【0357】

細胞培養上清を、好ましくは、例えばサンドイッチアッセイ又はドットアッセイ等の酵素免疫測定法、或いは放射免疫測定法によってスクリーニングし、所望の抗体を得る。

50

【0358】

抗体を単離するには、培養上清中又は腹水中の免疫グロブリンを、例えば硫酸アンモニウムと共沈させたり、ポリエチレングリコール等の吸湿性材料に対して透析したり、選択性膜で濾過したりなどして濃縮する。必要に応じて、及び/又は所望する場合には、例えばゲル濾過法、イオン交換クロマトグラフィー、DEAE-セルロース上でのクロマトグラフィー、及び/又は標的抗原やプロテインAを用いるアフィニティークロマトグラフィー等の(免疫)アフィニティークロマトグラフィーなどの通常のクロマトグラフィー法により抗体を精製する。

【0359】

抗体は、抗体の検出法と共に提供されることが好ましく、かかる方法としては酵素法、蛍光法、放射性同位体法や他の手法が可能である。抗体及びその検出法は、同時に、同時かつ別々に、又は連続して用いるようなキットとして提供できる。

【0360】

当技術分野で公知のいずれかの手法により、本発明における抗体の免疫特異的結合性のアッセイを行う。採用される免疫測定法には、ウエスタンブロッティング、放射免疫測定法、ELISA、サンドイッチ免疫測定法、免疫沈降測定法、沈降反応法、ゲル分散沈降反応、免疫分散測定法、凝集測定法、補体固定測定法、免疫放射定量測定法、蛍光免疫測定法、プロテインA免疫測定法等の技術を用いる競合的及び非競合的アッセイ系を含むが、これらに限定はされない。これらのアッセイは当技術分野ではルーティンである(本明細書にその全容を添付したAusubel et al, eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York を例として参照)。免疫測定法の典型例を簡潔に下述する。

【0361】

免疫沈降プロトコールは通常以下の工程で行われる。すなわち、プロテインホスファターゼ及び/又はプロテアーゼ阻害剤(例; EDTA、PMSE、アプロチニン、パナジン酸ナトリウム)を加えたRIPA緩衝液(1%NP-40又はTritonX-100、1%デオキシコール酸ナトリウム、0.1%SDS、0.15M NaCl、0.01M リン酸ナトリウム(pH7.2)、1%トラジロール(Trasyolol))等の溶解緩衝液に細胞集団を溶解し、この細胞溶解液に目的抗体を加え、一定時間(例えば1~4時間)4 でインキュベーションし、プロテインA及び/又はプロテインGセファロースビーズを細胞溶解液に加え、およそ1時間強4 でインキュベーションし、これらビーズを溶解緩衝液中で洗浄してSDS/試料緩衝液に再懸濁することからなる工程である。目的抗体が、特定抗原を免疫沈降させる能力は、例えばウエスタンブロット分析により評価できる。

【0362】

ウエスタンブロット分析は通常以下の工程で行われる。すなわち、タンパク質試料を調製し、ポリアクリルアミドゲル(例; 抗原の分子量に応じて8%~20%SDS-PAGE)において上記タンパク質試料を電気泳動に付し、これらタンパク質試料をポリアクリルアミドゲルから、ニトロセルロース、PVDF又はナイロン等の膜に移し、その膜を、ブロッキング溶液(例; 3%BSA又は無脂肪乳を添加したPBS)中でブロックし、洗浄緩衝液(例; PBS-Tween20)で洗浄し、ブロッキング緩衝液で希釈した一次抗体(目的抗体)に暴露し、洗浄緩衝液で洗浄し、ブロッキング緩衝液で希釈した酵素基質(例; ホースラディッシュペルオキシダーゼ又はアルカリホスファターゼ)や放射活性分子(例; ^{32}P 又は ^{125}I)で標識した二次抗体(例えば抗ヒト抗体などの一次抗体を認識するもの)に露出し、洗浄緩衝液で洗浄した後に抗原の存在を検出することからなる工程である。

【0363】

ELISAは通常、抗原を調製し、この抗原で96ウエルマイクロタイタープレートのウエルをコーティングし、酵素基質(例; ホースラディッシュペルオキシダーゼ又はアルカリホスファターゼ)等の検出可能な化合物で標識した目的抗体をウエルに加え、一定時間インキュベーションし、抗原の存在を検出する工程からなる方法である。ELISAでは

、目的抗体は必ずしも検出可能な化合物と共役していなくてもよく、代わりに二次抗体（目的抗体を認識するもの）を検出可能な化合物と共役させてウエルに加えることができる。さらに抗原でウエルをコーティングする代わりに、抗体をウエルにコーティングしてもよい。この場合、コーティング済みのウエルに目的抗原を加えた後に、検出可能な化合物と共役させた二次抗体を加えることができる。

【0364】

アッセイを行う際に1若しくは2以上の反応物質を固定化しておくことが好都合である。本発明の場合は、候補調節因子、ノッチリガンド、免疫細胞活性化因子、又は免疫細胞共刺激因子（costimulus）のいずれか1若しくは2以上を固定化することが好都合である。固定化する手法には、アミン結合、表面チオール結合、リガンドチオール結合、アルデヒド結合等を用いる共有固定化、或いは固定化した捕捉分子に対するリガンドの高親和結合に依拠する高親和性捕捉化が含まれる。捕捉分子としては、ストレプトアビジン、抗マウスIg抗体、リガンド特異的抗体、プロテインA、プロテインG、タグ特異的捕捉剤が列挙される。一実施態様においては支持体、とりわけビーズ状であることを好ましくする特定の支持体に結合させることにより固定化を図っている。

10

【0365】

臨床適用するための寛容T細胞の観察又は検出に係るアッセイでは、細胞内ドメインの開裂により発生するシグナルの検出工程に先立って試料を患者から取り出すことが一般に行われている。

【0366】

本発明さらに、ノッチシグナル伝達の候補調節因子を得るためのスクリーニング方法を提供する。この方法は、その開裂を観察するために検出手段で好適に標識された適量のノッチを緩衝液中で候補リガンドの試料と混合し、ノッチにみられる開裂を観察するものである。

20

【0367】

ここに用いる「試料」なる用語は、天然に見い出された（例；生物標本又は他の標本から）、或いは人工的に構築された（実験室で見い出された及び／又は作製された因子）集団における、無機分子、有機分子又は生化学分子を指す。生物試料は生物全体を意味すると捉えてもよいが、より一般的な概念としては、その生物の組織、細胞又は構成部分（例；血液、粘液、唾液、尿を含むがそれらに限定はされない体液）のサブセットを意味する。

30

【0368】

本発明は、ノッチシグナル伝達の新規調節因子の検出方法を提供する。同定した調節因子は治療用薬剤として使用される。すなわち治療に適用される。

【0369】

TH2調節

一般的に免疫系における体液性／TH2ブランチにおいては、B細胞が抗体を産生することにより、細菌や寄生虫などの細胞外免疫原に対する防御を指示し、他方、細胞性／TH1ブランチにおいては、一般的にナチュラルキラー細胞、細胞毒性Tリンパ球及び活性化マクロファージの活性化により、ウイルスや癌などの細胞内免疫原を対象とする（米国特許第6039969号）。TH2細胞は、好酸球増多症の原因となり得る好酸球の動員、増殖、分化、維持及び生存に関与すると共に、IgE抗体の産生を刺激するサイトカインを産生すると考えられている。好酸球増加症は、喘息、アレルギー、アトピー性皮膚炎等の多くのTH2介在型疾患の特徴である。

40

【0370】

TH2免疫応答、IL-4／IL-5サイトカインの誘導、及び／又は好酸球増加症によって実質的に誘発／介在されると考えられる疾患には、喘息、アレルギー性鼻炎、全身性エリテマトーデス、Ommen's症候群（過好酸球増多症候群）、また皮膚及び全身性リーシュマニア症、トキソプラズマ感染症、トリパノソーマ感染症などの寄生虫感染症、またカンジダ症及びヒストプラズマ症などの真菌感染症、ハンセン病及び結核などの細胞内細菌感染症が含まれる。また、ウイルスや癌にそもそも由来するものの、TH2も大きく病理

50

に関係している疾患もまた本発明により良好な治療が見込まれることは画期的である。

【0371】

近年の研究から、免疫系は2本の大きなアーム、すなわち体液性アームと細胞性アームとに分岐することが示されている。体液性アームは、B細胞によって抗体を産生することにより、細菌及び寄生虫等の細胞外病原を排除する上で重要である。他方、細胞性アームは、ナチュラルキラー細胞、細胞毒性Tリンパ球及び活性化マクロファージの活性化によりウイルスなどの細胞内病原を排除する上で重要である。これらの2種類のアームが異なるTヘルパー細胞(T_H)集団及びそれらの異なるサイトカイン産生プロファイルによって活性化することが近年明らかになっている。Tヘルパー1型(T_H1)細胞は、免疫応答の細胞性アームを増強し、サイトカインであるIL-2及びIFNをブレドミナントに産生すると考えられている。他方、Tヘルパー2(T_H2)細胞は免疫応答の体液性アームを増強し、インターロイキン-3(IL-3)、インターロイキン-4(IL-4)、インターロイキン-5(IL-5)及び顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)等のサイトカインを産生すると考えられている。T_H2の場合、IL-3、IL-5及びGM-CSFが、好酸球生成を刺激すると考えられている。また、IL-5は、好酸球の終末分化及び細胞増殖を容易にし、好酸球の生存、バイアピリティー及び移動性を促進する。これに対してIL-4はIgEクラス抗体の産生を刺激する。IgEはアレルギー及び喘息における重要な要素である。IL-5もまた好酸球を初回免疫して、それに続く他のメディエーターの作用を引き起こす。

10

【0372】

一方、T_H1サイトカインであるIL-2及びIFNは、マクロファージ、NK細胞及びCTL(細胞毒性Tリンパ球)の活性化に重要である。IFNもまた、ウイルス感染した細胞を排除するためにB細胞を刺激して細胞親和性抗体を特異的に分泌する。マクロファージ由来サイトカインであるIFNは、T_H2型応答に拮抗することが示されているのは興味深い。IFNもまたT_H2細胞の増殖やサイトカイン産生を阻害し、T_H1によるIFN産生を増強する。IFNは、IgE産生、並びに抗原に誘導されるIL4 mRNAレベルの亢進も阻害すると考えられる。

20

【0373】

多くのT_H2介在型疾患に共通する特徴は、好酸球増多症と呼ばれる好酸球の蓄積である。例えば、好酸球浸潤を伴う慢性肺炎症は、気管支喘息の極めて特徴的な症状である。喘息患者の血液、気管支肺胞洗浄液及び肺組織から好酸球の増加が認められるが、アレルギーや前炎症反応を起こしている肺組織における好酸球の動員及び調節に関する機構は未だ完全には解明されていない。Tリンパ球由来のメディエーター及びサイトカイン、並びに好塩基球、マスト細胞、マクロファージ及び好酸球等のエフェクター細胞は、好酸球の細胞成熟、化学走性及び活性化の増強に関与している。免疫系(特にCD4⁺T細胞)と、好酸球及び好酸球動員との間には関係があることが証明されている。このことは、喘息の研究及びアレルギー性肺応答に関する動物モデルの研究の結果から、気道におけるT細胞と活性化好酸球の数が密接に相関していることが証明されていることから支持される。

30

【0374】

本発明に従い、T_H2応答を低減させることにより治療が見込まれる疾患としては、喘息、アレルギー、アトピー性皮膚炎、初期HIV疾患、伝染性単核細胞症、全身性エリテマトーデス、また皮膚及び全身性リ－シュマニア症、トキソプラズマ感染症、トリパノソーマ感染症などの寄生虫感染症、またカンジダ症及びヒストプラズマ症などの真菌感染症、ハンセン病及び結核などの細胞内細菌感染症が列挙される。

40

【0375】

TNF調節

特にTNFアルファ(TNF α)及びTNFベータ(TNF β 若しくはリンボトキシン)という少なくとも2種類のTNFがこれまでに報告されており、それぞれトリマー分子として活性であり、受容体同士を交叉結合させることによって細胞シグナル伝達を開始すると考えられている(Engelmann et al. (1990), J. Biol. Chem., 265: 14497-14504)。

50

【 0 3 7 6 】

実証例のいくつかからは、TNF と TNF が主要な炎症性サイトカインであることが示唆されている。これら公知の TNF は、感染や外傷といった種々の刺激に対する炎症応答に関与する多種多様な標的細胞に重要な生理学的効果を及ぼす。これらのタンパク質はいずれも、線維芽細胞及び滑液細胞に潜在的コラゲナーゼ及びプロスタグランジン E₂ を分泌させ、また骨細胞に骨再吸収を刺激させる。またこれらのタンパク質は、好中球に対する上皮細胞の表面接着性を亢進させる。また上皮細胞に凝血活性を分泌させて、血塊を溶解させる能力を低減させる。さらに TNF 及び TNF タンパク質はいずれも、酵素であるリボタンパク質リパーゼの発現を阻害することにより、脂肪細胞の活性を、脂質を貯蔵することから変更させる。TNF はまたピロゲン（発熱物質）として視床下部に作用する「急性相反応物質」として知られるタンパク質のクラスを肝細胞に合成させる（Selby et al. (1988), Lancet, 1 (8583): 483; Starnes, Jr. et al. (1988), J. Clin. Invest., 82: 1321; Oliff et al. (1987), Cell, 50: 555; and Waage et al. (1987), Lancet, 1 (8529): 355）。

10

【 0 3 7 7 】

本発明により治療が期待できる疾患を以下に列挙する。

（A）全身性エリテマトーデス（SLE）、関節リウマチ、リウマチ脊椎炎、変形性関節症、通風性関節症又は他の関節疾患、甲状腺炎、移植片対宿主疾患、強皮症、糖尿病、グレーブス病、ベーチェット病などの急性及び慢性の免疫及び自己免疫病理。

（B）敗血症候群、全身敗血症、グラム陰性敗血症、敗血症性ショック、内毒素性ショック、毒性ショック症候群、悪液質、急性又は慢性細菌感染による循環虚脱及びショック、急性及び慢性寄生虫性及び／又は HIV や AIDS（悪液質、自己免疫疾患、AIDS 痴呆症候群及び感染症）等の感染性疾患（細菌、ウイルス、真菌）、細菌若しくはウイルス感染症による発熱及び筋痛などの感染症。但しこれらに限定されない。

20

（C）サルコイドーシス、慢性炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎及びクローン病等の慢性炎症性病理、並びに播種性血管内凝固症候群、粥状硬化症及び川崎病等の（これらに限定はされない）血管炎症性病理を含む慢性炎症性病理や血管炎症性病理などの炎症性疾患。

（D）多発性硬化症及び急性横断性脊髄炎等の脱髄疾患を含む（限定はされない）神経変性疾患；皮質脊髄路系の病巣等の錐体外路及び小脳の疾患；基底ガングリア又は小脳の疾患；ハンチントン舞踏病及び老年舞踏病等の多動性疾患；CNS ドーパミン受容体を阻止する薬剤に誘発される薬剤誘発性運動障害；パーキンソン病等の運動機能減退症；進行性核上性麻痺；小脳の structural 病巣等の小脳及び脊髄小脳障害；脊髄小脳変性症（脊髄失調、フリードリッヒ失調症、小脳皮質変性症、多系変性症（Mencel, Dejerine-Thomas, Shi-Drager, Mechadojoseph））；並びに全身性障害（Refsum 病、無リボたんぱく血症、運動失調症、毛細血管拡張症、及びミトコンドリア多系障害）；多発性硬化症、急性横断性脊髄炎等の脱髄部障害；神経性筋萎縮症（筋萎縮性側索硬化症、小児脊髄性筋萎縮症、若年性脊髄性筋萎縮症等の前角細胞変性症）等の運動ユニットの障害；アルツハイマー病；中年期ダウン症候群；びまん性 Lewy 小体病；Lewy 小体型老年痴呆；Wernicke-Korsakoff 症候群；慢性アルコール依存症；Creutzfeldt-Jakob 病；亜急性硬化性全脳炎、Hallerorden-Spatz 病；及びパンチドランカー症候群（Dementia pugilistica）、又はそれらいずれかのサブセット。

30

40

（E）TNF 分泌腫瘍を含む悪性疾患、又は白血病（急性、慢性骨髄性、慢性リンパ性及び／又は骨髄異形成症候群）等の（しかしそれらに限定されない）TNF が関与する他の悪性疾患、リンパ腫（悪性リンパ腫等（Burkitt リンパ腫又は菌状息肉症）のホジキン及び非ホジキンリンパ腫）；癌（大腸癌等）及びその転移；癌性血管形成；小児血管腫。

（F）アルコール性肝炎

（G）眼血管新生、乾癬、十二指腸潰瘍、婦人生殖管における血管新生等の血管新生や VEGF / VPF に関連する他の疾患。

（H）粥状硬化症、鬱血性心不全、脳卒中及び血管炎等の心血管疾患。或いは、

（I）成人呼吸窮迫症候群（ARDS）、慢性肺炎症疾患、珪肺症、アスベスト症及び肺

50

サルコイドーシス等の肺疾患

本発明の一実施態様は、「TNF介在型疾患」の治療への使用を意図している。自発的又は実験的疾患が、体液中又は疾患部位隣接組織中又は体内指標におけるTNFレベルの上昇を伴う場合、かかる疾患又は医学症状は「TNF介在型疾患」とであるとみなされる。

【0378】

関節リウマチ及び乾癬性関節炎等の疾患は程度の差はあれ、世界中の何百万人もの人々を苦しめ、障害を残す慢性関節疾患である。関節リウマチは、滑膜由来でパヌス(pannus)と呼ぶ増殖性かつ浸潤性結合組織によって軟骨と骨が緩やかに磨耗していく関節部の疾患である。この疾患は、皮下、心臓血管系、肺、脾臓、リンパ節、骨格筋、神経系(中枢及び末梢)及び眼等の関節外組織と同様に、滑液胞、腱鞘及び腱等の関節周囲構造に関係があると考えられる(Silberberg (1985), Anderson's Pathology, Kissane (ed.), 11: 1828)。

10

【0379】

疾患の重症度は多岐にわたるが、多くの患者は一進一退を繰り返しながら、全体としては関節の破壊や変形が徐々に進行していく。臨床所見には、痛み、脆弱さ、腫脹及び罹患関節の機能喪失を伴う末梢関節の対称性多発性関節炎；朝のこわばり；及び軟骨消失、骨質糜爛、及び持続的炎症後の関節亜脱臼が含まれる。関節外の臨床所見には、リウマチ結節、リウマチ血管炎、強膜肺炎症、強膜炎、乾燥症候群、フェルティ症候群(Felty's syndrome)(脾腫及び好中球減少症)、持続的炎症後の関節亜脱臼が含まれる。関節外臨床所見には、リウマチ結節、リウマチ血管炎、強膜肺炎症、強膜炎、乾燥症候群、フェルティ症候群(脾腫及び好中球減少症)、骨粗鬆症及び体重減少が含まれる(Katz (1985), Am. J. Med., 79: 24 and Krane and Simon (1986), Advances in Rheumatology, Synderman (ed.), 70(2): 263-284)。これらの臨床症状は罹患率が高く、患者の日常生活に困難をもたらす。

20

【0380】

療法

「療法」なる用語には、治療効果、軽減効果、及び予防効果が含まれる。本療法は、ヒト又は動物いずれにも適用される。

【0381】

本発明のアッセイ法により同定されたモジュレーターは、免疫系の障害及び/又は疾患の治療に用いられる。特に本発明化合物は、T細胞介在型疾患又は障害の治療に用いることができる。ノッチシグナル伝達経路及びそれにより影響を受ける疾患については、本発明者らのWO98/20142、WO00/36089及びWO/00135990に詳細に記載がある。

30

【0382】

T細胞介在型として示される疾患又は感染症としては、喘息、アレルギー、移植片拒絶反応、自己免疫症、腫瘍を原因とするT細胞系の異常、並びにマラリヤ病原虫(Plasmodium sp.)、ミクロフィラリア、蠕虫、マイコバクテリア、HIV、サイトメガロウイルス、シュドモナス、トキソプラズマ、エキノコックス、B型インフルエンザ、麻疹、C型肝炎、トキソカラの1若しくは2以上が含まれるが、これらに限定されない。T細胞が介在する疾患のうち、治療若しくは予防が可能であると思われるものには、多発性硬化症、関節リウマチ、又は糖尿病が含まれる。本発明は臓器移植又は骨髄移植にも用いられる。本発明は自己免疫疾患又は異種移植片移植等の移植拒絶反応等の免疫障害を治療する上で有用である。

40

【0383】

治療が可能と考えられる疾患例には一般的に自己免疫疾患と呼ばれるグループが含まれる。自己免疫疾患の範囲には臓器特異的疾患(甲状腺炎、膵島炎、多発性硬化症、虹彩毛様体炎、ブドウ膜炎、精巢炎、肝炎、アジソン病、重症筋無力症など)から関節リウマチやエリテマトーデス等の全身性疾患に及ぶ。他の疾患には、アレルギー反応等の免疫性過敏症が含まれる。

50

【0384】

より詳細には臓器特異的自己免疫疾患には、多発性硬化症、インシュリン依存性糖尿病、数タイプの貧血（再生不良性、溶血性）、自己免疫性肝炎、甲状腺炎、膵島炎、虹彩毛様体炎、強膜炎、ブドウ膜炎、精巣炎、重症筋無力症、特発性血小板減少性紫斑病、炎症性腸疾患（クローン病、潰瘍性大腸炎）が含まれる。

【0385】

全身性自己免疫疾患には、関節リウマチ、若年性関節炎、強皮症及び全身性硬化症、シェーグレン症候群、未分化結合組織症候群、抗リン脂質抗体症候群、各種形態の脈管炎（結節性多発動脈炎、アレルギー性肉芽腫性血管炎、ウェゲネル肉芽腫症、川崎病、過敏性脈管炎、ヘノッホ・シェーンライン紫斑病（Henoch-Schoenlein purpura）、ベーチェット症候群、高安動脈炎、巨細胞性動脈炎、閉塞性血栓血管炎）、エリテマトーデス、リウマチ性多発筋痛症、本態性（混合）クリオグロブリン血症、尋常性乾癬、及び乾癬性関節炎、好酸球性若しくは非好酸球性の広汎性筋膜炎、多発性筋炎及び他の特発性炎症性筋疾患、再発性脂肪組織炎、再発性多発性軟骨炎、リンパ腫様肉芽腫、結節性紅斑、強直性脊髄炎、ライター症候群（Reiter's syndrome）、種々の病型の炎症性皮膚炎が含まれる。

10

【0386】

障害をさらに詳細に以下列挙する。関節炎（関節リウマチを含む）を含む望ましくない免疫反応及び炎症、過敏症を伴う炎症、アレルギー反応、喘息、全身性エリテマトーデス、コラーゲン疾患や他の自己免疫疾患、アテローム性動脈硬化症を伴う炎症、動脈硬化症、アテローム性動脈硬化性心疾患、再灌流障害、心停止、心筋梗塞、血管性炎症疾患、呼吸窮迫症候群又は他の心肺疾患、消化器潰瘍を伴う炎症、潰瘍性大腸炎や他の消化管疾患、肝硬変や他の肝疾患、甲状腺炎や他の腺疾患、糸球体腎炎や他の腎臓及び泌尿器疾患、耳炎や他の耳鼻咽喉疾患、皮膚炎や他の皮膚疾患、歯周病や他の歯疾患、精巣炎又は副睾丸炎（精巣上体炎）、不妊症、睾丸外傷並びに他の免疫性精巣疾患、胎盤機能障害、胎盤機能不全、習慣性流産、子癇、子癇前症並びに他の免疫及び／又は炎症性婦人科疾患、後部ブドウ膜炎、中間部ブドウ膜炎、前部ブドウ膜炎、結膜炎、網脈絡膜炎、ブドウ膜炎（uveoretinitis）、視神経炎、眼内炎（例；網膜炎又は嚢胞様黄斑腫）、交感性眼炎、強膜炎、網膜色素変性症、変性眼圧疾患の免疫及び炎症構成要素、眼外傷の炎症構成要素、感染性眼炎症、増殖性硝子網膜症、急性虚血性視神経障害、過剰形成瘢痕（例；緑内障濾過手術後の）、眼組織移植に対する免疫及び／又は炎症反応、並びに他の免疫関連眼疾患、中枢神経系（CNS）又は他の臓器の両方において免疫及び／又は炎症を抑制することが有効である自己免疫疾患若しくは症状若しくは障害に伴う炎症、パーキンソン病、パーキンソン病治療による合併症及び／又は副作用、AIDS痴呆症候群、HIV脳症、デビック病（Devic's disease）、シデナム舞踏病（Sydenham's chorea）、アルツハイマー病並びに他の変性疾患、中枢神経系の疾患又は障害、脳卒中による炎症構成要素、ポリオ後症候群、精神疾患の免疫及び炎症構成要素、脊髄炎、脳炎、亜急性硬化性全脳炎、脳脊髄炎、急性神経障害、亜急性神経障害、慢性神経障害、Guillain-Barre症候群、シデナム舞踏病、重症筋無力症、偽脳腫瘍、ダウン症候群、ハンチントン舞踏病、筋萎縮性側索硬化症、中枢神経系圧迫又は中枢神経系外傷又は中枢神経系感染による炎症構成要素、筋萎縮症又は筋ジストロフィーによる炎症構成要素、さらに中枢及び末梢神経系における免疫及び炎症疾患又は症状又は障害、外傷後炎症、敗血症性ショック、感染症、手術又は臓器移植後の炎症性合併症又は副作用、遺伝子療法による炎症性及び／又は免疫性合併症及び副作用（例；ウイルス担体による感染のため）、或いはAIDSに伴う炎症、液性及び／又は細胞性免疫反応の抑制又は阻害、単球又はリンパ球を減少させることにより単球又は白血球増殖性疾患（例；白血病）を治療若しくは軽減すること、天然若しくは人工の細胞や、角膜、骨髄、臓器、水晶体、ペースメーカー、天然若しくは人工の皮膚組織等の組織や臓器を移植する場合の移植片拒絶反応の予防及び／又は治療。

20

30

40

【0387】

本発明は癌治療にも有用であり、特に上皮細胞が癌へと転化する疾患の治療に有用である。ノッチシグナル伝達のインヒビターを用いて主要サイトカインの産生を調節することに

50

より、癌に対する免疫応答を亢進させるのに本発明は特に有用である。本発明は特に小細胞肺癌、及び腎臓癌、子宮癌、前立腺癌、膀胱癌、卵巣癌、結腸癌、乳癌等の腺癌について有用である。従って本出願は悪性かつ前腫瘍性疾患の治療に適用できる。本発明は特に小細胞肺癌、及び腎臓癌、子宮癌、前立腺癌、膀胱癌、卵巣癌、結腸癌、乳癌等の腺癌について有用である。例えば本発明によって治療可能となる悪性疾患には、急性及び慢性白血病、リンパ腫、骨髄腫や、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、リンパ血管内皮肉腫（lymphoendotheliosarcom）、血管肉腫、内皮肉腫、軟骨肉腫、骨原性肉腫、脊索腫、リンパ管肉腫、滑膜腫、胸膜中皮腫、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、大腸癌、卵巣癌、前立腺癌、膵臓癌、乳癌、鱗細胞癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、脂腺癌、乳頭状癌、乳頭腺癌、嚢胞腺癌、甲状腺髄様癌、気管支原性癌、絨毛癌、腎細胞癌、肝臓癌、胆管癌精上皮腫、胎生期癌、子宮頸癌、精巣癌、肺癌、小細胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神経膠腫（グリオーマ）、星細胞腫、上衣細胞腫、松果体腫、血管芽腫、聴神経腫瘍、髄芽腫、頭蓋咽頭腫、乏突起膠細胞腫、髄膜腫、メラノーマ、神経芽細胞腫、網膜芽腫等の肉腫が含まれる。

10

【0388】

医薬組成物

本発明は、本発明の方法により同定された化合物の少なくとも1種を治療有効量と、薬学上許容される担体、希釈剤若しくは賦形剤（それらを併用することも含めて）とを投与することからなる医薬組成物を提供する。

【0389】

上記医薬組成物は、ヒト医学及び獣医学におけるヒト及び動物への使用に供され、通常1若しくは2以上の薬学上許容される希釈剤、担体若しくは賦形剤を含んでいる。治療に使用する上で許容される担体又は希釈剤は薬学分野では十分公知であり、例えばRemington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A.R. Gennaro edit. 1985) に、それらに関する記載がみられる。医薬担体、賦形剤若しくは希釈剤は、意図する投与経路及び標準的な薬学的運用例に基づいて選択される。医薬組成物には、担体、賦形剤若しくは希釈剤として（或いはそれらに加えて）、（1若しくは2以上の）適切な結合剤、潤滑剤、懸濁化剤、コーティング剤又は可溶化剤が含まれていてもよい。

20

【0390】

保存料、安定剤、染料、さらには香料が医薬組成物に含まれることもある。保存料としては、安息香酸ナトリウム、ソルビン酸、p-ヒドロキシ安息香酸のエステルが例示される。酸化防止剤及び懸濁化剤も用いられる。

30

【0391】

送達系が異なると、異なる組成物/処方要件が必要とされる場合もある。例を挙げると本発明の医薬組成物を、例えば吸入用若しくは摂取可能溶液用の鼻腔スプレー若しくはエアゾールとして、ミニポンプを用いて投与又は粘膜経路から投与すべく処方し、或いは、非経口経路により投与するために、例えば静脈内、筋肉内若しくは皮下経路により送達するために組成物を注入可能な剤型に処方する。或いはこれら両方の経路から送達するような処方を設計することもできる。

【0392】

胃腸粘膜から粘膜を通じて化合物を送達する場合、胃腸管を通過する間に化合物の安定性が保たれなければならない。例えばタンパク質分解に耐性であり、酸性pHに対し安定であり、胆汁の洗浄効果に耐性でなければならない。

40

【0393】

本発明医薬組成物は必要に応じて吸入により、又は座剤やペッサリーの剤型で、又はローション、液剤、クリーム、軟膏、又は粉剤の剤型で、又はスキンパッチを用い、局所的に塗布して投与することも可能である。また澱粉又はラクトース等の賦形剤を含む錠剤の剤型で、カプセル剤若しくは胚珠（ovule）剤を単独で又は賦形剤と混合して、或いは香料又は色素を含有するエリキシル剤、液剤又は懸濁剤の剤型で、経口投与することも可能であり、また例えば静脈内、筋肉内、又は皮下へ非経口に注入することもできる。非経口投与の場合は、組成物を無菌水性溶液の剤型で使用することが最適であり、かかる溶液を血

50

液と等張とするために例えば十分量の塩又は単糖類など、他の物質を含んでいてもよい。口腔内又は舌下に投与する場合、常法により処方可能な錠剤又はトローチ剤の剤型で組成物を投与してよい。

【0394】

投与

通常医師は、個々の患者にとって最適な実際の投与量を決めるが、それは個別の患者の年齢、体重、反応性によって異なる。以下の投与量は、平均的なケースを挙げたものである。個々の症例に応じて当然平均より高量投与若しくは低量投与が奏功する場合もある。

【0395】

本発明の組成物は直接注入することにより投与してもよい。組成物は非経口、粘膜、筋肉内、静脈内、皮下、眼内又は経皮投与用として処方してもよい。 10

【0396】

「投与する」なる用語には、ウイルス又は非ウイルス方法による送達が含まれる。ウイルス送達機構には、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター、ヘルペスウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、及びバキュロウイルスベクターが含まれるが、これらに限定されない。非ウイルス送達機構には、脂質仲介トランスフェクション、リポソーム、免疫リポソーム、リポフェクチン、カチオン性界面両親媒性物質(CFAs)、及びそれらを組み合わせたものが含まれる。このような送達機構には、粘膜、鼻腔、経口、非経口、胃腸、局所、又は舌下の経路が含まれるが、これらに限定されることはない。 20

【0397】

「投与する」なる用語には、例えば吸入用若しくは摂取可能溶液用の鼻腔スプレー若しくはエアゾールとして粘膜経路からの送達や、例えば静脈内、筋肉内、皮内、関節内、髄腔内、腹腔内又は皮下経路等、或いは消化管経路(例えばPeyers patchesから)等の非経口経路からの注入による送達が含まれるが、これらに限定されない。

【0398】

専門家であれば個々の患者にとって、例えば年齢、体重及び症状に応じて最適な投与経路や投与量を容易に決めることができるので、これまでに説明した投与経路及び投与量は単に指針としてのものである。医薬組成物が単位投与形態であることが好ましい。本発明には、ヒト及び動物の両方への適用が含まれる。 30

【0399】

初回免疫したAPCs及びリンパ球の調製

本発明の特徴の1つによれば、免疫細胞を使用して抗原又はアレルゲンを提示し、及び/又は免疫細胞を処理してノッチ、ノッチリガンド若しくはノッチシグナル伝達経路の発現や相互作用を調節する。従って例えば抗原提示細胞(APCs)をDMEMや他の定義された培地等の好適な培養培地において、任意にウシ胎児血清等の血清存在下で培養する。サイトカインの最適濃度は滴定によって決定できる。一般的には次に、ノッチシグナル伝達経路をアップレギュレート又はダウンレギュレートすることが可能な1若しくは2以上の物質を目的抗原と共に培養培地に加える。この抗原は物質(1若しくは複数)添加の前、後、若しくは実質的に同時に加えてよい。通常、上記物質(1若しくは複数)及び抗原の共存下で細胞を少なくとも1時間、好ましくは少なくとも3時間、必要に応じて少なくとも12時間以上37℃でインキュベーションする。必要に応じ、上述のとおり少量の細胞を検定して標的遺伝子の調節された発現を調べてもよい。或いはWO98/20142に記載があるように、表面マーカー、サイトカインの分泌や増殖を観察してT細胞活性化の阻害を調べることにより細胞活性を測定してもよい。セラートなどの発現を指示する核酸構築物でトランスフェクトしたAPCsを対照としてもよい。 40

【0400】

上述したとおり、ポリペプチドをコードする核酸構築物/ウイルスベクターを、APCにおける該ポリペプチド発現が可能な条件下で細胞に導入することによって該ポリペプチド物質を上記APCに投与してもよい。同様に、抗原をコードする核酸構築物をトランスフ 50

エクシオン、ウイルス感染、又はウイルス形質導入によってAPCsに導入してもよい。その結果得られるノッチシグナル伝達のレベルが上昇したAPCsは直ちに使用に供することができる。

【0401】

後述する技術はT細胞との関連で説明するが、B細胞にも同じように適用できる。用いる技術は、T細胞を通常APCsと共培養する以外は基本的にAPCs単独に対するものと同じである。しかし、まず初回免疫（初回抗原投与）したAPCsを調製し、次にそれらのAPCsをT細胞共存下でインキュベートすることが好ましい。例えば、初回免疫したAPCsを一旦調製した後、新鮮培養培地に再懸濁する前にかかるAPCsをペレット状にしてPBSで洗浄してよい。この方法は、例えばAPCに用いるものとは異なる、プレセニリンを調節できる物質（1若しくは複数）でT細胞を処理することが望まれる場合に利点があり、その場合T細胞は、APCに用いた異なる物質（1若しくは複数）と接触することはない。或いは、ノッチシグナル伝達を調節するためにT細胞を第1物質（又は物質のセット）とコインキュベートし、洗浄し、再懸濁して、APC調節に用いる物質（1若しくは複数）及びT細胞調節に用いる物質（1若しくは複数）の両方の不在下かつ初回免疫したAPC共存下にてインキュベーションする。或いはT細胞をAPCs不在下で、抗TCR抗体（例；抗CD3抗体）等のAPC代替物を用いて、共刺激分子（例；抗CD28抗体）に対する抗体の存在下又は不在下で培養し、初回免疫する。又はMHC-ペプチド複合体（例；テトラマー）を用いてT細胞を活性化する。

10

【0402】

インキュベーションは通常少なくとも1時間、好ましくは少なくとも3若しくは6時間、37℃下で好適培地にて行う。次いでT細胞を抗原で追加免疫し、APCsに暴露しなかった対照細胞との比較においてIL-2産生量を測定することにより、免疫寛容が誘導されたかどうかを調べる。

20

【0403】

上記の方法で初回免疫したT細胞又はB細胞を本発明に従って用いることにより、他のT細胞又はB細胞に免疫寛容を誘導する。

本発明をさらに以下の非限定的実施例を参照しながら説明する。

【実施例1】

【0404】

CD4⁺細胞の精製

マウス（Balb/c 雌、8～10週齢、C57B/6 雌、8～10週齢、CARD1 雌、8～10週齢（DO11.10トランスジェニック、CARトランスジェニック））から脾臓を摘出し、0.2μM細胞ストレイナーを通して20mlのR10F培地（10%ウシ胎児血清に2mM L-グルタミン、50μg/mlペニシリン、50μg/mlストレプトマイシン、 5×10^{-5} M β-メルカプト-エタノールを加えたR10F-RPMI 1640培地（Gibco Cat No 22409））に移した。細胞懸濁液を遠心分離にかけ（1150rpm、5分間）、培地を除去した。

30

【0405】

脾臓1個毎に5mlのACK溶解緩衝液（二重蒸留水に0.15M NH₄Cl、1.0M K₂HCO₃、0.1mM Na₂EDTA）を用いて上記細胞を4分間インキュベーションした（赤血球を溶解させるため）。これらの細胞をR10F培地で一度洗浄し、計数した。製造者マニュアルに従い、Magnetic Associated Cell Sorter（MACS）カラム（Miltenyi Biotec, Bisley, UK: Cat No 130-042-401）上で、CD4（L3T4）ビーズ（Miltenyi Biotec Cat No 130-049-201）を用いてポジティブ選択を行い、懸濁液からCD4⁺細胞を精製した。

40

【実施例2】

【0406】

抗体のコーティング

以下のプロトコールにより、96ウェルの平底プレートに抗体をコーティングした。

50

【0407】

A) $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の抗 CD 3 抗体 (Pharmingen, San Diego, US: Cat No 553058, Clone No 145-2C11) と $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の抗 Ig G 4 抗体 (Pharmingen Cat No 555878) を添加したダルベッコリン酸緩衝生理食塩水 (DPBS) をプレートにコーティングした。コーティング混合物 $100 \mu\text{l}$ を各プレートにコーティングした。プレートを一晚 4℃ でインキュベーションし、DPBS で洗浄した。次に各ウエルに、 $100 \mu\text{l}$ DPBS、又は $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ノッチリガンド (マウスデルタ 1 細胞外ドメイン / Ig 4 Fc 融合タンパク質; Fc-デルタ) を加えた $100 \mu\text{l}$ DPBS のいずれかを添加した。上記プレートを 37℃ で 2 ~ 3 時間インキュベーションし、細胞 (実施例 1 同様に調製したもの) を加える前に DPBS で洗浄した。

10

【0408】

B) 或いは、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の抗ハムスター Ig G 抗体 (Pharmingen Cat No 554007) と $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の抗 Ig G 4 抗体を添加した DPBS でプレートをコーティングした。各ウエルにコーティング混合物を $100 \mu\text{l}$ 加えた。プレートを一晚 4℃ でインキュベーションした後に DPBS で洗浄した。次に、抗 CD 3 抗体 ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) を加えた $100 \mu\text{l}$ の DPBS、又は抗 CD 3 抗体 ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) と Fc-デルタ ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) を加えた $100 \mu\text{l}$ の DPBS のいずれかを各ウエルに添加した。これらのプレートを 37℃ で 2 ~ 3 時間インキュベーションし、細胞 (実施例 1 同様に調製したもの) を加える前に DPBS で再度洗浄した。

【実施例 3】

20

【0409】

初回ポリクローナル刺激

実施例 2 (A) 又は 2 (B) に従って事前コーティングした 96 ウエルの平底プレートで CD 4⁺ 細胞を培養した。細胞を計数した後、 $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ の抗 CD 28 抗体 (Pharmingen Cat No 553294, Clone No 37.51) を加えた R 10 F 培地に $2 \times 10^6/\text{ml}$ で再懸濁した。各ウエルに $100 \mu\text{l}$ の細胞懸濁液を加えた。次に各ウエルに R 10 F 培地 $100 \mu\text{l}$ を加えて最終容量を $200 \mu\text{l}$ (2×10^5 細胞 / ウエル、抗 CD 28 抗体の最終濃度は $2 \mu\text{g}/\text{ml}$) とした。これらのプレートを 37℃ で 72 時間インキュベーションした。

【0410】

30

次に $125 \mu\text{l}$ の上清を各ウエルから除去し、R & D Systems (Abingdon, UK) 製の抗体ペアを用いる ELISA で IL-10、IFN γ 及び IL-13 を調べるまで -20℃ で貯蔵した。次にこれらの細胞を新しいウエルに 3 等分して (コーティングせず) 播き、組換えヒト IL-2 ($2.5 \text{ ng}/\text{ml}$ 、Pepro Tech Inc, London, UK: Cat No 200-02) を加えた R 10 F 培地で培養した。

結果を図 7 に示す。

【実施例 4】

【0411】

初回刺激した CD 4⁺ 細胞のリアルタイム PCR 分析

実施例 3 においてマウス (Balb/c) で刺激した CD 4⁺ T 細胞を 4、16 及び 24 時間後に回収した。RNeasyTM RNA 単離キット (Qiagen, Crawley, UK) を製造者指針に従って用い、全細胞 RNA を単離した。

40

【0412】

それぞれの場合において、オリゴ dT₍₁₂₋₁₈₎ 又はランダムデカマー (decamer) 混合物を用い、製造者指針に従って SuperScriptTM II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Paisley, UK) を使用して全 RNA $1 \mu\text{g}$ を逆転写した。合成後、オリゴ dT₍₁₂₋₁₈₎ と、ランダムにデカマーで初回免疫した cDNA を等量ずつ混合し、リアルタイム定量 PCR 分析に用いる試験用 cDNA 試料を得た。

【0413】

Roche LightcyclerTM system (Roche, UK) 及び SYBR グリーン検出化学法を製造者指

50

針に従って使用し、リアルタイム定量PCRを行った。cDNA特異的増幅(5'から3')には、HPLCで精製した以下のプライマーペアを用いた。

【0414】

【表12】

mouse 18s rRNA: **Forward** GTAACCCGTTGAACCCATT

Reverse CCATCCAATCGGTAGTAGCG

mouse Hes-1:

Forward GGTGCTGATAACAGCGGAAT

Reverse ATTTTGGAAATCCTTCACGC

10

【0415】

リアルタイムPCR定量に用いた終点(endpoint)であるCrossing Point(C_p)は、アルゴリズムに定義されるシグナル閾値を交差するPCRサイクル回数として定義される。遺伝子特異的cDNAの定量分析は、まず、プラスミドベクター(pCR2.1、Invitrogen社製)に既にクローニングした連続希釈遺伝子特異的増幅産物のセットから、C_psを用いてスタンダードセットを作製して行う。これらの連続希釈物は、cDNA試料のC_psの比較対象である標準曲線の範囲内にある。この系を用い、各cDNA試料について18S rRNAハウスキーピング遺伝子の発現レベルを作製した。次に同様の方法で連続希釈Hes-1特異的スタンダードを用いてHes-1を分析し、かかるHes-1値を18S rRNA値で割り、各cDNA試料におけるHes-1の相対的発現を表す値を得た。全てのC_p分析には、Lightcyclerシステムソフトウェアに含まれるSecond Derivative Maximum algorithmを用いた。

20

【0416】

図8に結果(Fc-デルタの存在下及び不在下での18S rRNA発現に対するHES-1の相対的発現)を示す。

【実施例5】

30

【0417】

分極条件下でのスクリーニング

実施例2(A)と同様にしてプレートをコーティングし、CD4⁺細胞を加えた。次に実施例3の手順に従ったが、実施例3では各ウェルに100μlのR10F培地を添加していたのに代え、各ウェルに以下のとおりにして100μlの分極カクテルを加えた。

【0418】

非分極細胞: R10F培地

Th1分極細胞: R10F培地 + 抗IL-4抗体(10μg/ml、Pharmin Gen Cat No 554432) + IL-12(10ng/ml、Peptidech 210-12)

Th2分極細胞: R10F培地 + 抗IL-12抗体(10μg/ml、Pharmin Gen Cat No 554475) + 抗IFNγ抗体(1μg/ml、Pharmin Gen Cat No 554408) + IL-4(10ng/ml、Peptidech Cat No 214-14)

40

【0419】

次に実施例3の記載と同様に、細胞を刺激してサイトカイン(IL-10、IFN 及びIL-13)をELISAで測定した。結果を図9に示す。

【実施例6】

【0420】

可溶性リガンド

実施例2(A)(リガンドをプレートに添加しない点が異なる)及び実施例3(R10F培地に可溶性Fc-デルタを添加する点が異なる)の手順に従い、可溶性Fc-デルタと

50

プレートに結合したFc-デルタを対照と比較した。結果を図10に示す。

【実施例7】

【0421】

二次刺激

一次刺激の7日後に全ての細胞を回収して計数し、以下の3通りの方法のいずれか1つの方法によって刺激した。

【0422】

再刺激

細胞を一次刺激と全く同様にして再刺激した(実施例3)。

【0423】

抗CD3/CD28抗体による追加免疫

1 μ g/mlの抗CD3抗体を添加したPBSで96ウエル平底プレートをコーティングした。これらのプレートを一晩4℃でインキュベーションし、DPBSで洗浄した。

【0424】

上記の細胞を、抗CD28抗体(4 μ g/ml)を添加したR10F培地に 2×10^6 /mlで最懸濁した。各ウエルに100 μ lの細胞懸濁液を加えた。次にR10F培地100 μ lを各ウエルに加え、最終容量を200 μ lとした(2×10^5 細胞/ウエル、抗CD28抗体の最終濃度は2 μ g/ml)。次にこれらのプレートを37℃で72時間インキュベーションした。実施例3と同様に、72時間後に上清を除去してELISAにかけた(一次刺激)。

【0425】

APCと抗CD3抗体による再刺激

実施例3において一次刺激を行った細胞を7日後に回収し、同株のAPCs(2×10^4 /ウエル)と抗CD3抗体とで再刺激した。

【0426】

実施例1と同様にマウス脾臓細胞を単離して計数した。次にThy-1.2抗体結合細胞をMACSカラム上で除去し、フロースルーを回収してミトマイシン-Cで45分間処理し、100 μ l R10F培地の入った96ウエルプレートに、実施例3と同数の細胞及び0.5 μ g/mlの抗CD3抗体と共に加えた。

【0427】

Roche Molecular Biochemicals社製のキットであるCell Proliferation ELISA, BrdU (chemiluminescent) 1669915を製造者マニュアルに従って使用し、細胞増殖を測定した。72時間後にプレートをパルス化し、ルミノメーターで読み取った。

【0428】

サイトカイン(IL-10及びIFN- γ)は実施例3と同様に測定した。結果を図11に示す。

【実施例8】

【0429】

CHO-N2(N27)ルシフェラーゼレポーターアッセイ

A) ルシフェラーゼレポータープラスミド10xCBF1-Luc(pLOR91)

BglII及びHindIII凝集性末端をもつアデノウイルス主要後期プロモーターTATA-boxモチーフを以下のようにして作製した。

【0430】

【表13】

10

20

30

40

BglII

HindIII

GATCTGGGGGGCTATAAAAGGGGGTA

ACCCCCGATATTTTCCCCCATTCGA

これをプラスミドpGL3-Basic (Promega社製) にBglIIとHindIII部位との間にクローニングしてプラスミドpGL3-AdTATAを作製した。

【0431】

10

BamHI及びBglII凝集性末端を有するATP1プロモーター配列(TP1; CBF1の2回反復に相当)を以下のようにして作製した。

【0432】

【表14】

BamHI

BglII

5' GATCCCGACTCGTGGGAAAATGGCGGAAGGGCACCGTGGGAAAATAGTA 3'

3' GGCTGAGCACCTTTTACCCGCCTTCCCGTGGCACCTTTTATCATCTAG 5'

20

【0433】

BglII部位に繰り返し挿入することにより上記配列をペンタマー(5量体)とし、得られたTP1ペンタマー(CBF1の10回反復に相当)をBglII部位においてpGL3-AdTATAに挿入してプラスミドpLOR91を作製した。

【0434】

B) 完全長ノッチ2を発現する安定なCHO細胞レポーター細胞株及び10xCBF1-Lucレポーターカセットの作成

ヒトノッチ2遺伝子(例としてGenBank登録番号AF315356を参照)の完全コーディング配列を網羅するcDNAクローンを以下のようにして構築した。細胞内ドメインの全体及び細胞外ドメインの一部をコードする3'cDNA断片をヒト胎盤cDNAライブラリー(OriGene Technologies Ltd., USA)からPCRベーススクリーニング法(PCR-based screening strategy)により単離した。残存5'コーディング配列をRACE(Rapid Amplification of cDNA Ends; cDNA末端の迅速増幅)法により単離し、両方の断片に共通の独特な制限部位(ClaI)を用いて既存3'断片と結合させた。その結果得られた完全長cDNAを次に哺乳類発現ベクターpcDNA3.1-V5-HisA(Invitrogen社製)にストップコドンなしでクローニングし、プラスミドpLOR92を作製した。従って、pLOR92は哺乳類細胞で発現されると、その細胞内ドメインの3'末端にV5及びHisタグを有する完全長ヒトノッチ2タンパク質を発現する。

30

40

【0435】

Lipfectamine2000TM(Invitrogen社製)を用いて野生型CHO-K1細胞(例としてATCC No. CCL61)にpLOR92(pcDNA3.1-FLNotch2-V5-His)をトランスフェクトし、完全長ヒトノッチ2(N2)を発現する安定なCHO細胞クローンを作製した。トランスフェクトしたクローンは、限界希釈を用いる96ウェルプレートにおいて、10%熱不活化ウシ胎児血清((HI)FCS)とグルタミンとペニシリン-ストレプトマイシン(P/S)と1mg/ml G418(GeneticinTM, Invitrogen社製)を添加したダルベッコ修飾イーグル培地(DMEM; Dulbecco's Modified Eagle Medium)から選択した。個々のコロニーを、10%(HI)FCSとグルタミンとP/Sと0.5mg/ml G418を添加したDMEMで増殖させた。抗V5モノクローナル抗体(Invitrogen社製)を用

50

いるウエスタンブロッティングに細胞溶解物を供してN2の発現を調べた。陽性クローンをレポーターベクターpLOR91(10×CBF1-Luc)で一時的にトランスフェクションし、完全長ヒトデルタ様リガンド1(DLL1; 例としてGenBank登録番号AF196571号を参照)を発現する安定CHO細胞クローン(CHO-デルタ)と共培養することにより試験した。(CHOノッチ2クローンと同様にしてCHO-デルタを調製したが、ノッチ2の代わりにヒトDLL1を使用した。抗V5モノクローナル抗体を使用し、細胞溶解物をウエスタンブロッティングにかけて著しく陽性を示したクローンを選択した。)

【0436】

CHO-N2安定クローンの1つであるN27にpLOR91(10×CBF1-Luc)を一時的にトランスフェクションし、完全長ヒトDLL1を発現する安定CHO細胞クローン(CHO-デルタ)と共培養したところ、高レベルな誘導を示したことが明らかになった。BamH1とSal1を用いてヒグロマイシン遺伝子カセット(pcDNA3.1/hygro、Invitrogen社製)をpLOR91(10×CBF1-Luc)に挿入し、このベクター(10×CBF1-Luc-hygro)をLipfectamine2000(Invitrogen社製)を用いてCHO-N2安定クローン(N27)にトランスフェクトした。トランスフェクトしたクローンを、限界希釈を用いる96ウエルプレートにおいて、10%(HI)FCSとグルタミンとP/Cと0.4mg/mlヒグロマイシンB(Invitrogen社製)と0.5mg/mlG418(Invitrogen社製)を添加したDMEMから選択した。10%(HI)FCSとグルタミンとP/Sと0.2mg/mlヒグロマイシンB(Invitrogen社製)と0.5mg/mlG418(Invitrogen社製)を添加したDMEMにおいて個々のクローンを増殖させた。

【0437】

FLヒトDLL1を発現する安定CHO細胞クローンと共培養することによりクローンを試験した。N27#11、N27#17、N27#36の3種類の安定レポーター細胞株を作製した。ノッチシグナル伝達不在下におけるバックグラウンドシグナルが低く、そのためシグナル伝達が始まると誘導が高倍率で生じることから、N27#11を選択した。10%(HI)FCSとグルタミンとP/Sを添加したDMEMを1ウエルあたり100μl入れた96ウエルプレートにおいて、ウエル毎に 2×10^4 のN27#11細胞を播いてアッセイを行った。

【0438】

C) CHO-N2細胞に対する10×CBF1-Lucの一時的トランスフェクション
また、一時的トランスフェクションを行うために、10%(HI)FCSとグルタミンとP/Sと0.5mg/mlG18を添加したDMEMでCHO-N2(クローンN27)細胞を維持し、CHO-N2細胞のT₈₀フラスコに対し、以下のようにしてトランスフェクションを行った。細胞上の培地を、10%(HI)FCSとグルタミンとP/Sを添加したDMEM新鮮培地8mlと交換した。pLOR91(10×CBF1-Luc)が入った無菌小容器(bijou)に、10μgのOptiMem(Invitrogen社製)を最終容量が1mlとなるように加え、混合した。2個目の無菌小容器に、20μlのLipofectamine2000試薬をOptiMem980μlに加えて混合した。

【0439】

各小容器の内容物を混合し、室温で20分間放置した。トランスフェクション混合物2mlを培地8mlが入った細胞入りのフラスコに加え、得られた混合物を一晩CO₂インキュベーターに放置した後、トランスフェクト細胞を取り出して不動化ノッチリガンドタンパク質の入った96ウエルプレートに加えた。

【0440】

その翌日に0.02%EDTA溶液(Sigma社製)を用いてトランスフェクトCHO-N2細胞を取り出し、遠心分離して10%(HI)FCSとグルタミンとP/Sを添加したDMEM10mlに再懸濁した。10μl中の細胞数を数え、10%(HI)FCSとグルタミンとP/Sを添加した新鮮DMEMにおける細胞密度を 2.0×10^5 細胞/mlに調整した。マルチチャンネルピペットを用いて96ウエル組織培養プレート(平底)の各

10

20

30

40

50

ウエルに $100\ \mu\text{l}$ を加え、すなわち 1 ウエルあたり 2.0×10^4 個のトランスフェクト細胞とし、このプレートを一晩インキュベーションした。

【0441】

D) 96 ウエル組織培養プレートへ直接ノッチリガンドタンパク質を固定する

精製ノッチリガンドタンパク質 $10\ \mu\text{g}$ を無菌エッペンドルフ型 (Eppendorf) 管中の無菌 PBS に加え、最終容量を $1\ \text{ml}$ とした。このうち $500\ \mu\text{l}$ を $500\ \mu\text{l}$ の無菌 PBS が入った無菌エッペンドルフ型管に加え、連続して 1 : 2 の希釈液を作り、 $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $5\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $2.5\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $1.25\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $0.625\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $0\ \mu\text{g}/\text{ml}$ の各希釈液を作製した。

【0442】

上記プレートの蓋をパラフィルムで密封し、プレートを 4℃ で一晩又は 37℃ 下で 2 時間放置した。その後タンパク質を除去し、プレートを PBS $200\ \mu\text{l}$ で洗浄した。

【0443】

E) A20 - デルタ細胞

IVS、IRES、Neo 及び pA の各エレメントをプラスミド pIRESneo2 (Clontech 社製、USA) から取り出し、pUC クローニングベクター内のニワトリ β -アクチンプロモーター (例として GenBank 登録番号 E02199 を参照) のダウンストリームに挿入した。マウスデルタ 1 (例として GenBank 登録番号 NM_007865 を参照) をアクチンプロモーターと IVS エレメントとの間に挿入し、3 つのリーディングフレームの全てに複数のストップコドンが含まれる配列をデルタと IVS エレメントとの間に挿入した。

【0444】

その結果得られた構築物をエレクトロポレーションと G418 を用いて A20 細胞にトランスフェクトし、マウスデルタ 1 をその表面に発現する A20 細胞を得た (A20 - デルタ)。

【0445】

F) CHO 及び CHO - hデルタ1 - V5 - His アッセイ対照

10% (HI) FCS とグルタミンと P/S を添加した DMEM において CHO 細胞を維持し、10% (HI) FCS とグルタミンと P/S と $0.5\ \text{mg}/\text{ml}$ G418 を添加した DMEM において CHO - hデルタ1 - V5 - His (クローン #10) 細胞を維持した。

【0446】

0.02% EDTA 溶液 (Sigma 社製) を用いて細胞を取り出し、遠心分離にかけ、10% (HI) FCS とグルタミンと P/S を添加した DMEM $10\ \text{ml}$ に再懸濁した。 $10\ \mu\text{l}$ 中の細胞数を数え、10% (HI) FCS とグルタミンと P/S を添加した新鮮 DMEM における細胞密度を 5.0×10^5 細胞 / ml に調整した。 5.0×10^5 細胞 / ml と調整した各細胞株の $300\ \mu\text{l}$ を 96 ウエルの組織培養プレートのウエル 2 個ずつに加えた。10% (HI) FCS とグルタミンと P/S を添加した DMEM $150\ \mu\text{l}$ を各ウエルの下のウエル 5 個 (縦列に 5 個) に加えた。細胞 $150\ \mu\text{l}$ を次のウエル 4 個に連続希釈していき、それぞれ 5.0×10^5 細胞 / ml 、 2.5×10^5 細胞 / ml 、 1.25×10^5 細胞 / ml 、 0.625×10^5 細胞 / ml 、 0.3125×10^5 細胞 / ml 、 0 細胞 / ml の細胞密度の希釈液を得た。

【0447】

$10 \times \text{CBF1-Luc}$ にトランスフェクトさせた CHO - N2 細胞 (2.0×10^4 トランスフェクト CHO - N2 細胞 / ウエル) $100\ \mu\text{l}$ を含有する 96 ウエルプレートに、上記各ウエルから $100\ \mu\text{l}$ を添加し、このプレートを一晩インキュベーターに静置した。

【0448】

G) 細胞共培養

5×10^4 CHO - N2 細胞を 96 ウエルプレート上に播いた。CHO - デルタ細胞又は A20 - デルタ細胞を必要に応じて滴定した (CHO - N2 : CHO - デルタの最大比率

10

20

30

40

50

は1 : 1で、CHO - N2 : A20 - デルタの最大比率は1 : 2)。上記混合物を一晩インキュベーションした後にルシフェラーゼアッセイを行った。

【0449】

H) ルシフェラーゼアッセイ

全ウエルから上清を除去した。PBS 100 μ lとSteadyGloTMルシフェラーゼアッセイ試薬(Promega社製) 100 μ lを加え、細胞を5分間室温に放置した。この混合物をピペットで上下に2回操作して取り出し、各ウエルからの細胞溶解物と内容物が白色96ウエルOptiPlateTM(Packard社製)に確実に移した。化学発光(ルミネセンス)はTopCountTM係数器(Packard社製)で測定した。

【0450】

試料アッセイの結果(上述の安定CHO - ノッチ2 - 10 x CBF1 - Lucレポーター細胞株と、(A)プレートに固定したヒトデルタ1 / Ig4Fc融合タンパク質、(B)プレートに固定したマウスデルタ1 / Ig4Fc融合タンパク質、(C)CHO / CHO - ヒトデルタ1共培養細胞、及び(D)対応する対照にたいするアクチベーターとしてA20 / A20 - マウスデルタ1共培養細胞とを用いる)を図12A ~ Dに示す。

【実施例9】

【0451】

ノッチリガンド活性を検出するダイナビーズルシフェラーゼアッセイ法

Fcで標識したノッチリガンドを以下のようにして、ビオチン化 - IgG - 4 (Pharmingen [Cat. No. 555879] のクローンJDC14を0.5 mg / mlで)と共にストレプトアビジン - ダイナビーズ (Dyna1 (UK) Ltd; beadsのCELLlection Biotin Binder Dynabeads [Cat. No. 115.21] を4.0 x 10⁸ ビーズ / ml)上に固定した。

【0452】

アッセイに供する各試料に、2.5 x 10⁷ ビーズ (62.5 μ lのビーズを4.0 x 10⁸ ビーズ / mlで)及び5 μ gのビオチン化 - IgG - 4を用いた。上記ビーズにPBSを加えて1 mlとし、この混合物を13000 rpmで1分間遠心分離にかけた。さらに1 mlのPBSで混合物を洗浄し、再度遠心分離にかけた。無菌エッペンドルフ管においてビオチン化 - IgG - 4を含有する最終容量100 μ lのPBSにビーズを再懸濁し、室温で30分間振盪器に入れた。PBSを加えて1 mlとした混合物を13000 rpmで1分間遠心分離にかけ、PBSをさらに1 ml加えて2回洗浄した。

【0453】

上記混合物を13000 rpmで1分間遠心分離にかけ、各試料あたり50 μ lのPBSにビーズを再懸濁した。ビオチン化 - IgG - 4でコーティングしたビーズ50 μ lを各試料に加え、この混合物を一晩4℃で回転振盪器においてインキュベーションした。この管を1000 rpmで5分間、室温にて遠心分離にかけた。

【0454】

上記ビーズを10 mlのPBSで洗浄し、遠心分離し、1 mlのPBSに再懸濁し、無菌エッペンドルフ管に移し、さらに1 mlのPBSで2回(2 x 1 ml)洗浄し、遠心分離し、10% (HI) FCSとグルタミンとP/Sを添加した最終容量が250 μ lのDMEMに再懸濁した(1.0 x 10⁵ ビーズ / μ l)。

【0455】

実施例8における安定N27 # 11細胞(T₈₀フラスコ)を、0.02% EDTA溶液(Sigma社製)を用いて除去し、遠心分離し、10% (HI) FCSとグルタミンとP/Sを添加したDMEM 10 mlに再懸濁した。10 μ l中の細胞数を計数し、10% (HI) FCSとグルタミンとP/Sを添加した新鮮DMEMを用いて細胞密度を1.0 x 10⁵ 細胞 / mlに調整した。これら細胞1.0 x 10⁵個を10% (HI) FCSとグルタミンとP/Sを添加したDMEM 1 ml容量の24ウエルプレートの各ウエルに播き、インキュベーターに置き、少なくとも30分間寝かせた。

【0456】

ビーズ100 μ lをウエルの最初の2個にそれぞれ加えて1.0 x 10⁷ ビーズ / ウエル

10

20

30

40

50

(100 ビーズ/細胞)とした。次の(2番目の)ウエル2個にビーズ20 μ lをそれぞれ加えて2.0 \times 10⁶ ビーズ/ウエル(20 ビーズ/細胞)とした。3番目のウエル2個組にビーズ4 μ lをそれぞれ加えて4.0 \times 10⁵ ビーズ/ウエル(4 ビーズ/細胞)とした。また、4番目のウエル2個組には0 μ lのビーズを加えた。このプレートを一晚CO₂インキュベーターに置いた。

【0457】

ルシフェラーゼアッセイ

全ウエルから上清を除去し、PBS 150 μ lとSteadyGloルシフェラーゼアッセイ試薬(Promega社製)を加えて得た混合物を室温で5分間置いた。

【0458】

上記混合物をピペットで上下に2回操作して取り出し、各ウエルからの細胞溶解物と内容物を確実にエッペンドルフ管に移し、13000 rpmで1分間遠心分離し、ビーズペレットは残して清澄上清を白色96ウエルOptiPlateTM(Packard社製)に移した。TopCountTM(Packard社製)カウンターでルミネセンスを読み取った。

10

【実施例10】

【0459】

ノッチリガンド活性を検出するダイナビーズELISAアッセイ法

抗ハムスターIgG1ビオチン化モノクローナル抗体、抗ヒトIgG4ビオチン化モノクローナル抗体、又はこれら両方の抗体で、M450ストレプトアビジンダイナビーズをコーティングし、室温で2時間攪拌した。

20

【0460】

上記ビーズをPBS(1ml)で3回洗浄した。抗ハムスターIgG1ビーズを抗CD3鎖モノクローナル抗体の共存下でさらにインキュベーションし、抗ヒトIgG4ビーズをさらにFc-デルタ共存下でインキュベーションし、両方の抗体でコーティングしたビーズは、抗CD3鎖モノクローナル抗体とFc-デルタ両方の共存下でインキュベーションした。これらのビーズを一晚4で攪拌し、PBS(1ml)で3回洗浄して再懸濁した。

【0461】

T細胞アッセイは、CD4⁺T細胞とビーズを用いて行った。72時間後に上清を除去し、実施例3と同様にしてサイトカインをELISAにより測定した。結果を図13に示す。

30

【実施例11】

【0462】

DynaIマイクロビーズ上に固定したデルタ1-hIgG4存在下におけるヒトCD4⁺T細胞によるサイトカイン産生の調節

フィコールパーク分離培地(Pharmacia社製)を用い、ヒト末梢血単核球細胞(PBMC)を精製した。簡潔に述べると、血液28mlをフィコールパーク分離培地21mlの上に載せ、18~20下、40分間400gで遠心分離にかけた。界面からPBMCを回収し、3回洗浄してからCD4⁺T細胞精製に用いた。

【0463】

Miltenyi Biotech社製の抗CD4マイクロビーズを製造者マニュアルに従って用い、ポジティブ選択を行ってヒトCD4⁺T細胞を単離した。

40

上記ヒトCD4⁺T細胞を、10%FCS、グルタミン、ペニシリン、ストレプトマイシン及び₂-メルカプトエタノールを含むRPMI培地の入った96ウエルプレート(平底)のウエル3個において10⁵CD4/ウエル/200 μ l条件下でインキュベーションした。

【0464】

DynaIの抗CD3/CD28抗体T細胞増殖ビーズを細胞に対して1:1の割合(ビーズ/細胞)で用いて、又はプレートに結合した抗CD3抗体(クローンUCHT1、BD Biosciences社製、5 μ g/ml)及び可溶性抗CD28抗体(クローンCD28.2、BD B

50

iosciences社製、 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$)を用いて刺激することにより、サイトカイン産生を誘導した。マウスデルタ1 E C ドメイン - h I g G 4 融合タンパク質(上述と同様に調製したが、ヒト I g G 4 共存下でのインキュベーションは室温で30～40分間で、デルタ - F c 共存下でのインキュベーションは室温で2時間だった点異なる)でコーティングしたビーズ、又は対照ビーズをウエルのいくつかに10:1の割合(ビーズ/細胞)で加えた。インキュベーションから3又は4日後に、 $37 \pm 5\%$ CO_2 /湿気条件下で上清を除去し、製造者マニュアルに従って、Pharmingen社製のキットである OptEIA Set human IL10 (catalog No. 555157)、OptEIA Set human IL5 (catalog No. 555202)、及び OptEIA Set human IFNg (catalog No. 555142)をそれぞれ I L - 10、I L - 5 及び I F N g に用い、R&D Systems社製の human TNFa DuoSet (catalog No. DY210)を T N F a に用いる E L I S A により、サイトカインの産生を評価した。

結果を図14～図18に示す。

10

20

30

40

50

【実施例12】

【0465】

ビーズ：細胞の割合

実施例11の手順に従ったが、対照ビーズと細胞の割合及びマウスデルタ1 - h I g G 4 融合タンパク質でコーティングしたビーズと細胞の割合を、16:1から0.25:1(16:1、8:1、4:1、2:1、1:1、0.5:1、0.25:1)の間で種々に変更した点が実施例11とは異なり、また比較のために、ヒトデルタ1 - h I g G 4 融合タンパク質でコーティングしたビーズも同じ割合で使用した。

結果を図19に示す。

【実施例13】

【0466】

C D 4 5 R O ⁺ (記憶細胞) 及び C D 4 5 ⁻ (ナイーブ細胞)

刺激前にヒト C D 4 ⁺ T 細胞を C D 4 5 R O ⁺ (記憶細胞) と C D 4 5 R O ⁻ (ナイーブ細胞、データはスライド上に示さず)に分けたこと以外は、実施例11の手順に従った。磁気による分離は、Miltenyi Biotech社製の抗 C D 4 抗体 Multisort マイクロビーズ (cat. No. 551-01)、続けて抗 C D 4 5 R O 抗体 マイクロビーズを用いて Miltenyi のプロトコールに従って行った。

結果を図20に示す。

【実施例14】

【0467】

分極条件下での刺激マウス C D 4 ⁺ 細胞におけるサイトカイン産生量の測定

(i) C D 4 ⁺ 細胞の精製

マウス (Balb/c 雌、8～10週齢、C57B/6 雌、8～10週齢、C A R D 1 雌、8～10週齢 (D O 1 1、10トランスジェニック、C A R トランスジェニック)) から脾臓を摘出し、 $0.2 \mu\text{M}$ 細胞ストレイナーを通して 20 ml の R 1 0 F 培地 (10% ウシ胎児血清に 2 mM L - グルタミン、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ペニシリン、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ストレプトマイシン、 $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ - メルカプト - エタノールを加えた R 1 0 F - R P M I 1640 培地 (Gibco Cat No 22409))に移した。細胞懸濁液を遠心分離にかけ (1150 rpm 、5分間)、培地を除去した。

【0468】

脾臓1個毎に 5 ml の A C K 溶解緩衝液 (二重蒸留水に 0.15 M NH_4Cl 、 1.0 M KHCO_3 、 0.1 mM Na_2EDTA)を用いて上記細胞を4分間インキュベーションした(赤血球を溶解させるため)。これらの細胞を R 1 0 F 培地で一度洗浄し、計数した。製造者マニュアルに従い、Magnetic Associated Cell Sorter (M A C S) カラム (Miltenyi Biotec, Bisley, UK: Cat No 130-042-401) 上で、C D 4 (L 3 T 4) ビーズ (Miltenyi Biotec Cat No 130-049-201)を用いてポジティブ選択を行い、懸濁液から C D 4 ⁺ 細胞を精製した。

【0469】

(ii) 抗体のコーティング

1 μ g / ml の抗 C D 3 抗体 (PharMingen, San Diego, US: Cat No 553058, Clone No 145-2C11) と 1 μ g / ml の抗 I g G 4 抗体 (PharMingen Cat No 555878) を添加したダルベッコリン酸緩衝生理食塩水 (D P B S) を 96 ウェルの平底プレートにコーティングした。コーティング混合物 100 μ l を各プレートに用いた。プレートを一晩 4℃ でインキュベーションし、D P B S で洗浄した。次に各ウェルに、100 μ l D P B S、又は 10 μ g / ml ノッチリガンド (マウスデルタ 1 細胞外ドメイン / I g G 4 F c 融合タンパク質; F c - デルタ) を加えた 100 μ l D P B S のいずれかを添加した。これらのプレートを 37℃ で 2 ~ 3 時間インキュベーションし、細胞 ((i) と同様にして調製したもの) を添加する前に D P B S で再度洗浄した。

【0470】

(iii) 初回ポリクローナル刺激

上述の (ii) に従って事前コーティングした 96 ウェルの平底プレートで C D 4⁺ 細胞を培養した。細胞を計数した後、4 μ g / ml の抗 C D 28 抗体 (PharMingen Cat No 553294, Clone No 37.51) を加えた R 10 F 培地に 2×10^6 / ml で再懸濁した。各ウェルに 100 μ l の細胞懸濁液を加えた。次に以下に示すように、各ウェルに 100 μ l の分極培地又は対照培地を加えて最終容量を 200 μ l (2×10^5 細胞 / ウェル、抗 C D 28 抗体の最終濃度は 2 μ g / ml) とした。

非分極細胞: R 10 F 培地

T h 1 分極細胞: R 10 F 培地 + 抗 I L - 4 抗体 (10 μ g / ml、PharMingen Cat No 554432) + I L - 12 (10 ng / ml、Peprotech 210-12)

T h 2 分極細胞: R 10 F 培地 + 抗 I L - 12 抗体 (10 μ g / ml、PharMingen Cat No 554475) + 抗 I F N g 抗体 (1 μ g / ml、PharMingen Cat No 554408) + I L - 4 (10 ng / ml、Peprotech Cat No 214-14)

これらのプレートを 37℃ で 72 時間インキュベーションした。

【0471】

次に 125 μ l の上清を各ウェルから除去し、R & D Systems (Abingdon, UK) 製の抗体ペアを用いる E L I S A で I L - 10 及び T N F を調べるまで -20℃ で貯蔵した。次にこれらの細胞を 3 等分して新しいウェル 3 個 (コーティングせず) に播き、組換えヒト I L - 2 (2.5 ng / ml、Pepro Tech Inc, London, UK: Cat No 200-02) を加えた R 10 F 培地で培養した。

結果を図 21 に示す。

【実施例 15】

【0472】

遺伝子発現のプロフィール化(i) 細胞培養、処理及び R N A 抽出

2 mM グルタミン (GibcoBRL 社製)、ペニシリン - ストレプトマイシン 50 ユニット / ml (GibcoBRL 社製) 及び 10 % ウシ胎児血清 (F B S) (Biochrom KG 社製) を添加した R P M I 1640 (GibcoBRL 社製) で Jurkat 細胞を培養した。

【0473】

抗 V 5 抗体 (Invitrogen 社製) 及び抗 C D 3 抗体 (ヒト)、抗 C D 28 抗体 (ヒト) (全て PharMingen 社製) を、5 μ g / ml のリン酸緩衝生理食塩水 (Gibco BRL) の入った 6 ウェル組織培養プレート (1 ml P B S / ウェル) に 5 μ g / ml で一晩置いた。各ウェルに抗 V 5 抗体を加え、抗 C D 3 抗体又は抗 C D 28 抗体を適用しなかったウェルにマウス I g G₁ アイソタイプ対照を 10 μ g / ml で加えた。翌日 P B S でウェルを 3 回洗浄し、デルタ - V 5 - H i s タンパク質を 5 μ g / ml の P B S に加えた (1 ml / ウェル)。次にプレートを 37℃ で 2 時間インキュベートし、P B S で 3 回洗浄した。その後 Jurkat 細胞を、 2×10^6 細胞 / ml の濃度でプレートに播き、37℃ でインキュベーションした。適当なウェルにイオノマイシン (Sigma 社製) を 1 μ g / ml の濃度で加えた。2、4、8、18、24、36、48 時間後に細胞を取り出し、P B S にて 4℃ で一度

10

20

30

40

50

洗浄し、300～600 μ l RLT溶解液 (Qiagen社製) に回収した。刺激効率を確保するため、FACS分析により、T細胞活性マーカーの正確な発現を調べた。この実験で用いた全ての細胞は、抗CD3抗体及び抗CD28抗体による活性化の48時間後にCD69 (初期活性マーカー) を発現していた。

【0474】

RNA Easy miniprep kit (Qiagen社製) を製造者指針に従って用い、RNAを抽出した。推奨されているが任意のDNase工程も行った。フェノール抽出工程を行って、RNAにおいてタンパク質が完全に消失していることを確認した。次にMessageAmp aRNA Kit (Ambion社製) を製造者指針に基づいて使用し、RNAを増幅した。その手順を簡潔に述べると、T7プロモーターを有するオリゴ (dT) プライマーを用いて逆転写を行い、T7 RNAポリメラーゼを用いて得られたDNAのインビトロ転写を行い、試料中の各mRNAのアンチセンスRNA (RNA) の複製を数百、数千と作製するものである。

10

【0475】

ここに用いる用語は以下のとおりである。V5単独処理したウエルに播いた細胞由来のRNAは「V5」、抗V5抗体及びデルタ-V5-Hisで処理したウエルに播いた細胞由来のRNAは「デルタ」と表記した。抗V5抗体、抗CD3抗体、抗CD28抗体で処理したウエルに播いた細胞由来のRNAは「CD3CD28」、抗V5抗体、抗CD3抗体、抗CD28抗体、デルタ-V5-Hisで処理したウエルに播いた細胞由来のRNAは「CD3CD28デルタ」と表記した。同様に、抗V5抗体で処理し、さらにイオノマイシンで処理したプレートに播いた細胞由来のRNAは「イオノマイシン」、抗V5抗体、デルタ-V5-Hisで処理し、さらにイオノマイシンで処理したプレートに播いた細胞由来のRNAは「イオノマイシン-デルタ」と表記した。

20

【0476】

(ii) 遺伝子発現プロファイル

精製PCR産物をガラススライド上に滴下してマイクロアレイを作製した。dCTP-Cy3又はdCTP-Cy5で標識したヌクレオチドを取り入れる逆転写反応により RNA 2 μ g を標識してマイクロアレイプローブを調製した。次にプローブの標識及び精製を、Hedge P, Qi R, Abernathy K, Gay C, Dharap S, Gaspard R, Hughes JE, Snesrud E, Lee N, Quackenbush J: A concise guide to cDNA microarray analysis (2000). Biotechniques 29: 548-50, 552-4, 556 passimに記載されているとおりに通常に行った。

30

【0477】

次に精製したプローブをアレイ上に42℃下、10×SSC、50%ホルムアミド、0.2%SDS溶液中で一晩ハイブリダイゼーションした。スライドを、2×SSC、0.2%SDSにおいて42℃で7分2回洗浄し、0.1SSC/0.2%SDSにおいて室温で5分2回洗浄し、最後に0.2%SSCにおいて室温で1回洗浄した。「V5」と表記した試料をdCTP-Cy3で標識し、dCTP-Cy5で標識した「デルタ」と表記した試料と同じスライド上で各時点においてハイブリダイズさせた。同様に、CD3CD28と表記した試料をdCTP-Cy3で標識し、dCTP-Cy5で標識した「CD3CD28デルタ」と名付けた試料と同じスライド上でハイブリダイズさせた。最後に「イオノマイシン」と名付けた試料をdCTP-Cy3で標識し、dCTP-Cy5で標識した「イオノマイシンデルタ」と表記した試料と同じスライド上でハイブリダイズさせた (表Iを参照)。

40

【0478】

【表15】

表 I

	標識 1 (Cy3-dCTP)	標識 2 (Cy5-dCTP)
スライド	V 5	デルタ
スライド	CD 3 CD 2 8	CD 3 CD 2 8 デルタ
スライド	イオノマイシン	イオノマイシンデルタ

10

【 0 4 7 9 】

乾燥後スライドをGSI Lumonics共焦点スキャナーにかけ、100%レーザー出力及び65～75%の光電子増倍管効率（バックグラウンドに依存する）でスキャンした。スライド画像は次のようにして処理した。個々に滴下したクローンに伴うシグナルを示すアレイスポットをQuantarrayアプリケーション（GSI Lumonic社製）により同定し、定量した。遺伝子発現強度を示す数値は上記アプリケーションに搭載のヒストグラム法により計算した。値は、各スポットの画素シグナル分布の積分として計算し、局所バックグラウンド値を減算した（生データ）。

【 0 4 8 0 】

(iii) データプロセッシング

20

全てのデータ分析にGeneSpring package（Silicon Genetics社製）を使用した。Quantarrayで得た生データをGeneSpringに移し、各遺伝子についてシグナルと対照の強度の比率を各時点において計算した。「デルタ」又は「CD 3 CD 2 8 デルタ」又は「イオノマイシンデルタ」と表記した試料の遺伝子強度を「シグナル」とみなし、「V 5」又は「CD 3 CD 2 8」又は「イオノマイシン」のいずれかで表記した試料の遺伝子強度を「対照」とみなした。

比率 = 「デルタ」における遺伝子のシグナル強度 / 「V 5」における遺伝子の対照強度

比率 = 「CD 3 CD 2 8 デルタ」における遺伝子のシグナル強度 / 「CD 3 CD 2 8」における遺伝子の対照強度

比率 = 「イオノマイシンデルタ」における遺伝子のシグナル強度 / 「イオノマイシン」における遺伝子の対照強度 30

比の値が2を超えるとき、その遺伝子はアップレギュレーションされたとみなし、比の値が0.5未満のとき、その遺伝子はダウンレギュレーションされたとみなした。

【 0 4 8 1 】

デルタ単独で活性化したプロトコールを示す概略図、及びデルタ活性化のみに反応して発現が亢進する遺伝子の数を示すVennグラフをそれぞれ図22A及び22Bに示し、対応する経時発現プロファイルを図23に示す。

【 0 4 8 2 】

デルタと抗CD 3 / CD 2 8抗体の両方で活性化するプロトコールを示す概略図、及びデルタによる活性化と抗CD 3 / CD 2 8抗体による活性化を併用したときに反応して発現 40
が亢進するが、デルタによる活性化単独では発現が亢進しなかった遺伝子の数を示すVennグラフをそれぞれ図24A及び24Bに示し、対応する経時発現プロファイルを図25に示す。

【 0 4 8 3 】

デルタによる活性化単独の場合と比較して、デルタによる活性化と抗CD 3 / CD 2 8抗体による活性化を併用したときに反応して発現が亢進する特異的遺伝子のいくつかを図26に示す。

【 実施例 1 6 】

【 0 4 8 4 】

Jurkat細胞株を用いるレポーターアッセイ

50

Jurkat細胞は単一の限界希釈液でクローニングすることができないため、メチルセルロース含有培地 (ClonaCellTMTCS) を用いた。

【0485】

ClonaCellTM Transfected Cell Selection (TCS) 培地 (StemCell Technologies, Vancouver, Canada and Meylan, France) を製造者ガイドラインに従って使用し、Jurkat E6.1細胞 (リンパ芽球細胞株; ATCC No TIB-152) をクローニングした。

【0486】

Biorad Gene Pulser II electroporatorを用い、以下のようにしてプラスミドpLOR92 (上述のとおり調製) をJurkat E6.1細胞にエレクトロポレーションした。

活発に分裂している細胞を遠心分離にかけ、10% 熱不活化 FCS とグルタミンとペニシリン / ストレプトマイシンを含有する氷温の RPMI 培地 (完全 RPMI) に 2.0×10^7 細胞 / ml で再懸濁した。氷上での10分後、0.5 ml の細胞 (すなわち 1×10^7 細胞) を、20 μ g のプラスミド DNA (滅菌水に溶かした Endo-free Maxiprep DNA) を含有する事前冷却済みの4 mm エレクトロポレーション用キュベットに移した。これらの細胞に300 V 及び950 μ F でエレクトロポレーションを行い、エッペンドルフ管に入った0.5 ml の保温完全 RPMI 培地に直ちに移した。かかる細胞を小型微量遠心機 (microfuge) 中にて3000 rpm で1分間遠心分離にかけ、37℃ で15分間放置してエレクトロポレーション状態から脱却させた。次に上清を除去し、完全 RPMI 培地4 ml の入った6ウェルディッシュのウェルに移し、37℃ で48時間放置して抗生物質耐性マーカーを発現させた。

【0487】

48時間後に細胞を遠心分離し、新鮮完全 RPMI 培地10 ml に再懸濁した。これを 10×15 ml のファルコン管に分割し、事前に温めた ClonaCell-TCS 培地8 ml を加え、続いて選択に用いる抗生物質を $10 \times$ 最終濃度で1 ml 加えた。G418の選択には、G418の最終濃度を1 mg / ml としたため、RPMI の10 mg / ml 溶液を調製し、このうち1 ml を各管に加えた。これらの管を反転させてよく混合し、室温で15分間落着かせてから10 cm の組織培養ディッシュに移した。これらを14日間CO₂ インキュベーターに入れ、14日目に可視コロニーを調べた。

【0488】

顕微鏡で視認可能なコロニーをプレートから取り出し、これらのコロニーを96ウェルプレートから24ウェルプレートへ、更にT25フラスコへと増殖させた。

【0489】

得られたクローンを、リポフェクタミン2000試薬を用いてそれぞれpLOR91に一時的にトランスフェクトさせ、プレートに結合している不動化 hDLL1-Fc (上述のようにして調製) を含有する96ウェルプレート上に置いた。状態のよいクローン4個を選択して、さらに調べた。

【0490】

次に、プレート結合不動化 hDLL1-Fc の存在下及び不在下において、また50 ng / ml PMA と1 μ g / ml イオノマイシンを最終濃度とした PMA / イオノマイシン (両方ともSigma社製) の存在下及び不在下において、上記4個のクローンのそれぞれについてルシフェラーゼアッセイを行った。図27に結果を示す (無処理のJurkat E6.1細胞の結果も比較のために示す)。

【0491】

図28に、選択したクローン2個におけるプレート結合不動化 hDLL1-Fc に対する用量反応を示し、無処理のJurkat E6.1細胞の結果も比較のために示す。

【実施例17】

【0492】

種々のイオノマイシン濃度下でのレポーターアッセイ

実施例16の手順を、1000、500、250、125及び62.5 ng / ml のイオノマイシン濃度と対照を用いて繰り返し行った。結果を図29に示す。

【実施例 18】

【0493】

Notch1Cによるノッチシグナル伝達を用いるレポーターアッセイ

Notch1C構築物

ヒトノッチ1細胞内ドメイン (NIC1) を発現ベクターpcDNA3.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA and Paisley, UK) にNotI/EcoRI断片としてクローニングした。

【0494】

ヒトノッチ1 - ICは以下のようにしてクローニングした。

【0495】

ヒト胎盤のアレイ化cDNAライブラリー (Origene社製) を以下のヒトノッチ1の細胞内ドメインに特異的なプライマーペアを用いるPCRによりスクリーニングした。 10

【0496】

【表16】

hN1F: CAC CCC ATG GCT ACC TGT CAG

hN1R: GGC TGC ACC TGC TGG GTC TGC

【0497】

PCRにはMJ TetradPCR機器を使用し、HotStar Taqポリメラーゼ (Qiagen社製) と以下のサイクルパラメーターを用いて行った。 20

95 , 15分

94 , 30秒

65 , 30秒

72 , 45秒

上記の最後3工程を30サイクル行い、続いて、

72 , 10分

16 , ソーク (soak)

上記の条件下において、プライマーはヒトノッチ1cDNA標的から500bpの特異的診断用産物を作製する。このPCRスクリーニングプロトコルを用いることにより、ポジティブなヒトノッチ1クローン (#3) を同定し、配列決定を行い、その同一性を確認した。その後、以下のプライマーを用い、#3から細胞内ドメインを増幅した。 30

【0498】

【表17】

hN1-IC1759: AAA GGA TTC ACC **ATG** GCA CGC AAG CGC CGG CGC AGT CAT (太字の開始メチオニンを含む)

hN1-IC 2556: GCG CTC GAG *TTA* CTT GAA CGC CTC CGG GAT GCG (イタリック文字のストップコドンを含む)

40

【0499】

PCRにはMJ TetradPCR機器を使用し、PfuDNAポリメラーゼ (Stratagene社製) と以下のサイクルパラメーターを用いて行った。

94 , 2分

94 , 45秒

58 , 45秒

72 , 3分

上記の最後3工程を20サイクル行い、続いて、

72 , 10分

50

16 , ソーク

これにより、ヒトノッチ1の細胞内ドメインに相当する約2.6 kbの特異的産物が作製される。このPCR産物はBamHI及びXhoI(これらの部位はアンプライマー内に存在する)によって消化させ、哺乳類発現ベクターpcDNA3.1(Invitrogen社製)内に、このベクターの複数クローニング部位に存在するBamHI及びXhoI部位を用いてクローニングした。ヒトノッチ1-ICの配列を配列決定して確認したところ、このクローニング配列がコードするタンパク質配列は以下のとおりである。

【0500】

【表18】

```

MARKRRRQHGQLWFPEGFKVSEASKKKRREPLGEDSVGLKPLKNASDGALMDDNQNEWGDEDLETKKFRF
EEPVVLPDLDDQTDHRQWTQQHLDAADLRMSAMAPTPPQGEVDADCMDVNVVRGPDGFTPLMIASCSGGGL
ETGNSEEEEDAPAVISDFIYQGASLHNQTDRTGETALHLAARYSRSDAAKRLLEASADANIQDN
MGRTPLHAAVSADAQGVFQILIRNRATDLARMHDGTTPLILAARLAVEGMLEDLINSHADVNAVDDLKG
SALHWAAAVNNVDAAVLLKNGANKDMQNNREETPLFLAAREGSYETAKVLLDHFANRDTIDHMDRLPRD
IAQERMHHDIVRLLEYNLVRSPQLHGAPLGGTPTLSPPLCSPNGYLGSLKPGVQGKKVRKPSSKGLACG
SKEAKDLKARRKKSQDGKGLDSSGMLSPVDSLESHPHYLSDVASPPLPSPFQQSPSVPLNHLPGMPD
THLGIHGLNVAAPKEMAALGGGRLAFETGPRLSHLPVASGTSTVLGSSSGGALNFTVGGSTSLNGQCE
WLSRLQSGMVPNQYNPLRGSVAPGPLSTQAPSLQHGMVGPLHSSLAASALSQMMSYQGLPSTRLATQPHL
VQTQQVQPQNLQMQQNLQPANIQQQSLQPPPPPPQPHLGVSSAASGHLGRSFLSGEPSQADVQLPGPS
SLAVHTILPQESPALPTSLPSSLVPPVTAAQFLTPPSQHSYSSPVDNTPSHQLQVPEHPFLTPSPESPDQ
WSSSSPHSNVSDWSEGVSSPPTSMQSQIARIPEAFK

```

10

20

【0501】

上記配列の5'末端に位置するメチオニン及びアラニン残基は内因性残基ではなく、メチオニンは開始配列を形成するため、またアラニンはクローニングを容易にするために取り込まれたものである。

【0502】

30

Jurkatトランスフェクション

10%ウシ胎児血清とグルタミンとペニシリン/ストレプトマイシンを添加したRPMI培地でJurkat E6.1をルーティンに従って培養した。

【0503】

構築物(上述の実施例8のpLOR91と上記のNIC1構築物)を、0.5 ml量の冷温培地において950 µF及び300 Vでのエレクトロポレーションにより細胞にトランスフェクトした。トランスフェクション後、直ちに細胞を温培地に移し、遠心分離(1000 rpm、30秒)にかけて静かにペレット化した。これらの細胞をペレットとしてインキュベーターにて20分間インキュベートし、その後6ウェルディッシュ中の6 mlの新鮮培地に移入した。かかる細胞を一晩インキュベーションし、洗浄し、計数して、平底96ウェルプレートに、約150000細胞/ウェルで、50 ng/ml PMA、500 ng/ml イオノマイシン、5 µg/ml 抗ヒトCD3抗体、1 µg/ml 抗ヒトCD28抗体の各刺激の存在下又は不在下で播いた。次にこれらの細胞を再度一晩インキュベーションしてから上述のとおり(Promega社製のSteadyGlo)通常にルシフェラーゼ活性を測定し、Hewlett-Packard社製のTopCountルミノメーターで読み取った。図30に結果を示す。

40

【0504】

上述の明細書で言及した文献は全て参考文献として本明細書に添付している。当技術分野の専門家にとっては、本発明の範囲や精神から逸脱することなく本発明で記載した方法やシステムに種々の修正や変更を加えることは自明である。本発明は具体的に好適な実施態様との関連で記載しているが、ここにクレームする本発明は、かかる具体的実施態様に不

50

当に限定されるべきではない。実際、本発明を実施するためにここに記載した方法に加える、生化学及びバイオテクノロジー又はそれらの関連分野における専門家にとっては自明の種々の修正は以下に記載する特許請求の範囲に含まれることを意図する。

【図面の簡単な説明】

【0505】

【図1】ノッチシグナル伝達経路の代表的な概略図である。

【図2】ノッチシグナル伝達経路の代表的な概略図である。

【図3】ノッチ、及びノッチシグナル伝達における免疫細胞モジュレーターのスクリーニングに用いる免疫細胞シグナル伝達経路の例を示す概略図である。

【図4】実施例1～9のアッセイの概略を示す図である。

10

【図5】実施例1～9のアッセイの概略を示す図である。

【図6】実施例1～9のアッセイの概略を示す図である。

【図7】実施例3の結果を示す図である。

【図8】実施例4の結果を示す図である。

【図9】実施例5の結果を示す図である。

【図10】実施例6の結果を示す図である。

【図11】実施例7の結果を示す図である。

【図12】実施例8の結果を示す図である。

【図13】実施例10の結果を示す図である。

20

【図14】実施例11の結果を示す図である。

【図15】実施例11の結果を示す図である。

【図16】実施例11の結果を示す図である。

【図17】実施例11の結果を示す図である。

【図18】実施例11の結果を示す図である。

【図19】実施例12の結果を示す図である。

【図20】実施例13の結果を示す図である。

【図21】実施例14の結果を示す図である。

【図22】実施例15の結果を図式化して示す図である。

【図23】実施例15の結果を図式化して示す図である。

【図24】実施例15の結果を図式化して示す図である。

30

【図25】実施例15の結果を図式化して示す図である。

【図26】実施例15の結果を図式化して示す図である。

【図27】実施例16の結果を示す図である。

【図28】実施例16の結果を示す図である。

【図29】実施例17の結果を示す図である。

【図30】実施例18の結果を示す図である。

【図31】ノッチリガンドであるジャグド及びデルタの概略を示す図である。

【図32】種々のショウジョウバエ及び哺乳類のノッチリガンドにおけるDSLドメインの整列アミノ酸配列である。

【図33】ヒトデルタ1、デルタ3及びデルタ4のアミノ酸配列である。

40

【図34】ヒトジャグド1及びジャグド2のアミノ酸配列である。

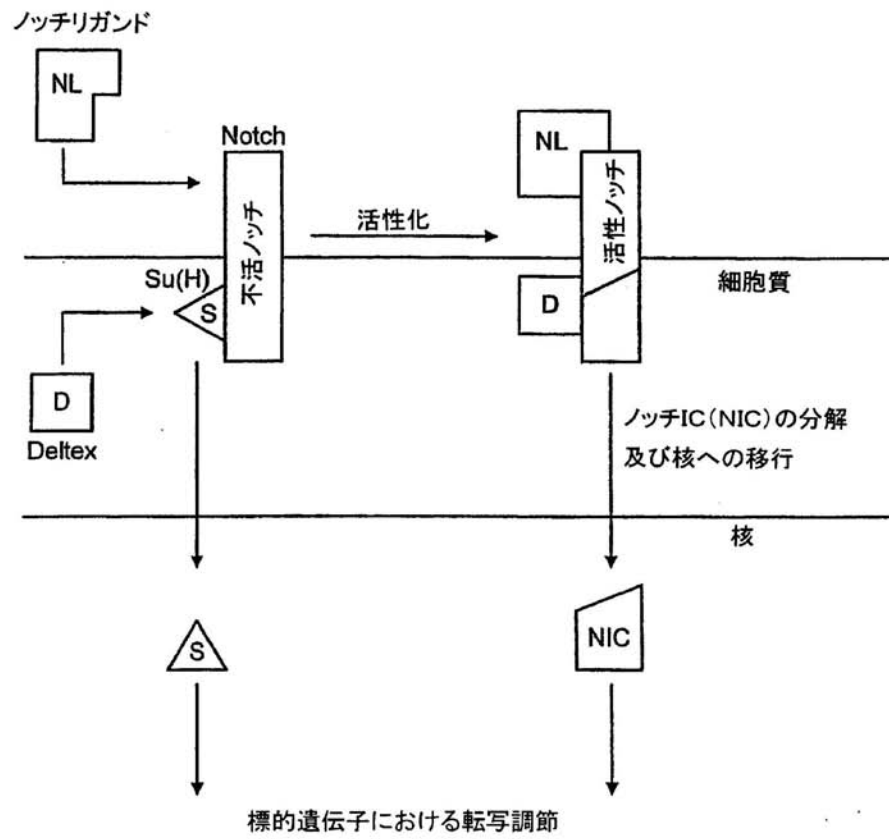
【図35】ヒトノッチ1のアミノ酸配列である。

【図36】ヒトノッチ2のアミノ酸配列である。

【図37】ノッチ1-4の概略を表す図である。

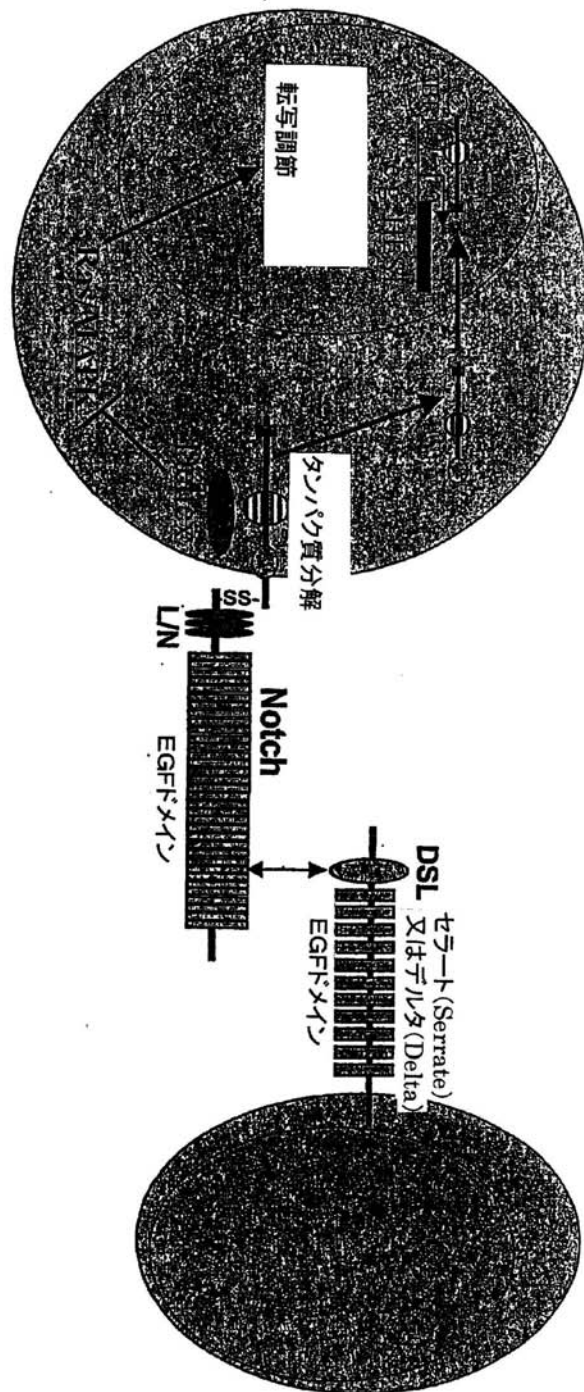
【図38】Notch1Cの概略を表す図である。

【 図 1 】

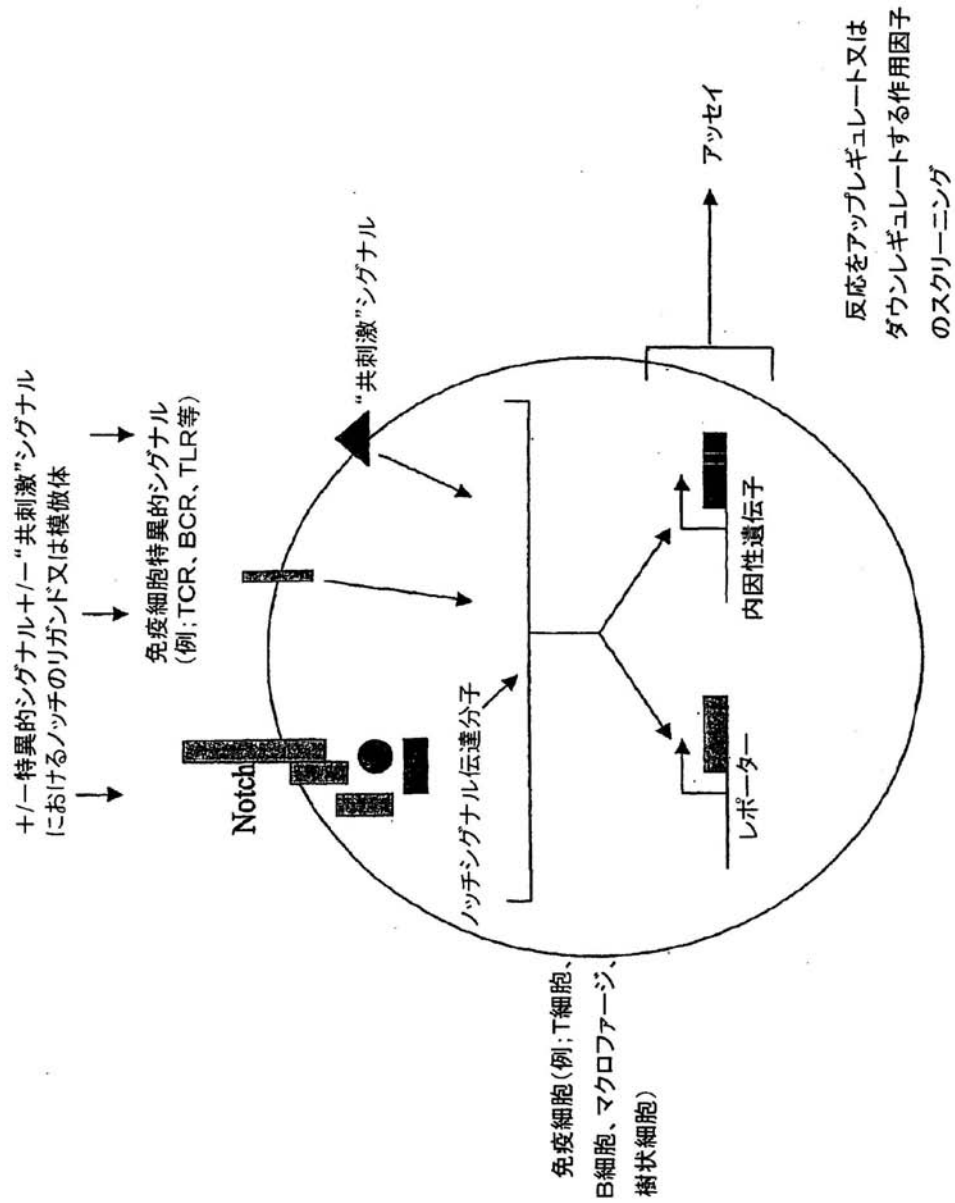


【図 2】

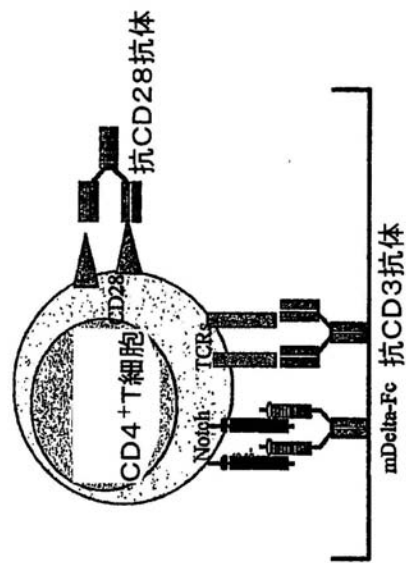
Figure 2



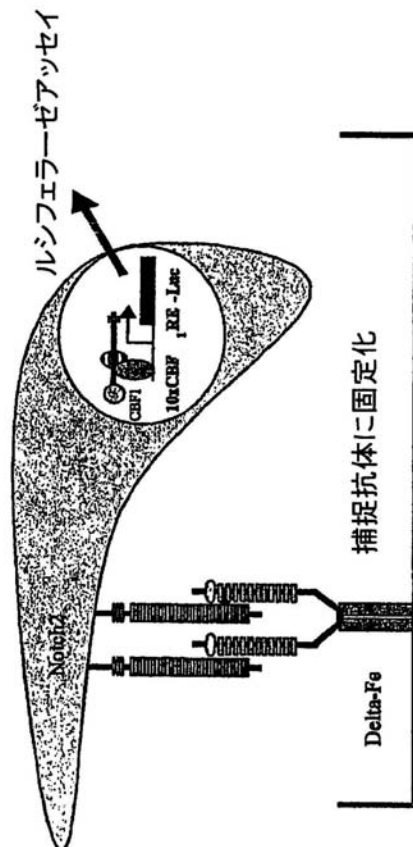
【 図 3 】



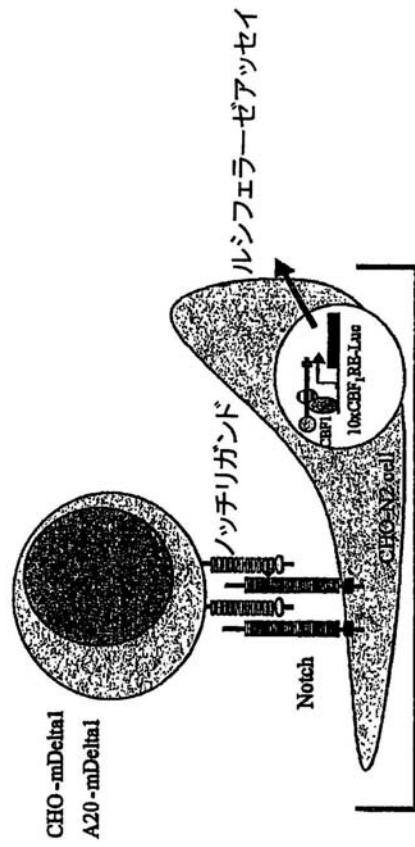
【 図 4 】



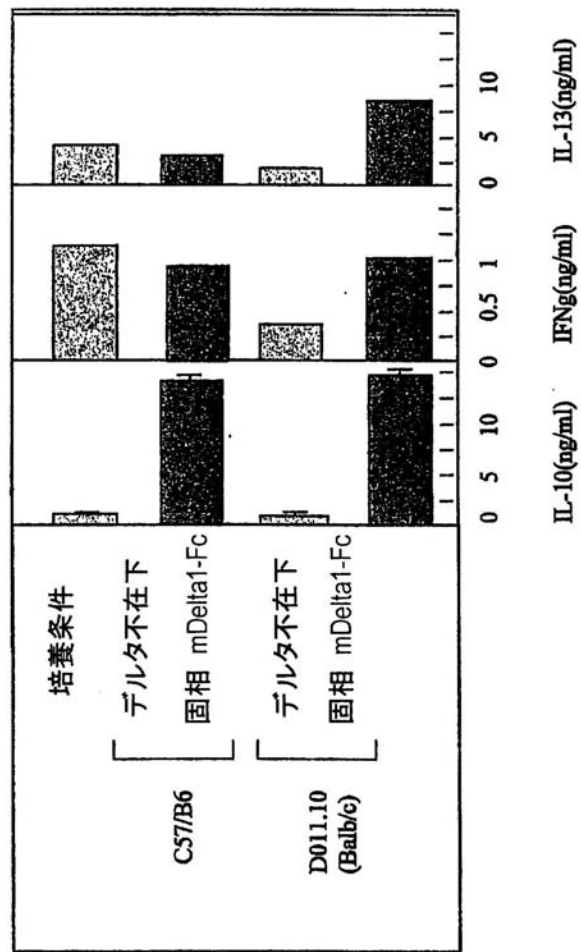
【 図 5 】



【 図 6 】



【図 7】

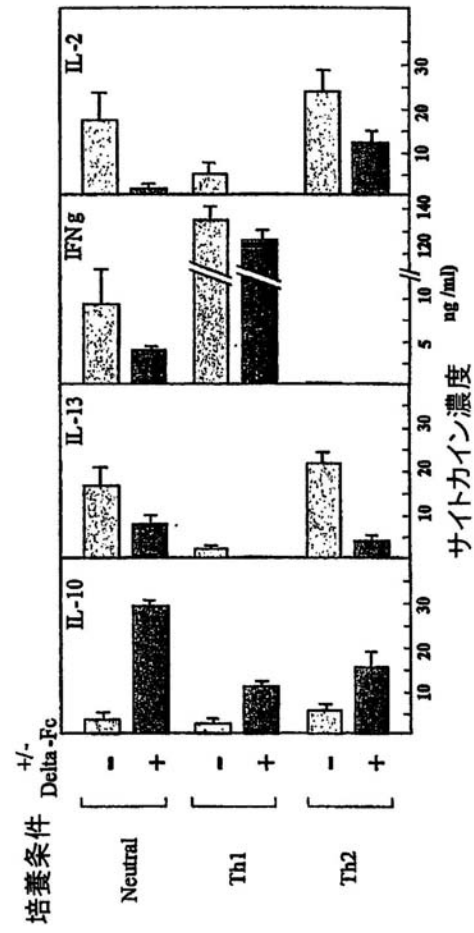


【 図 8 】

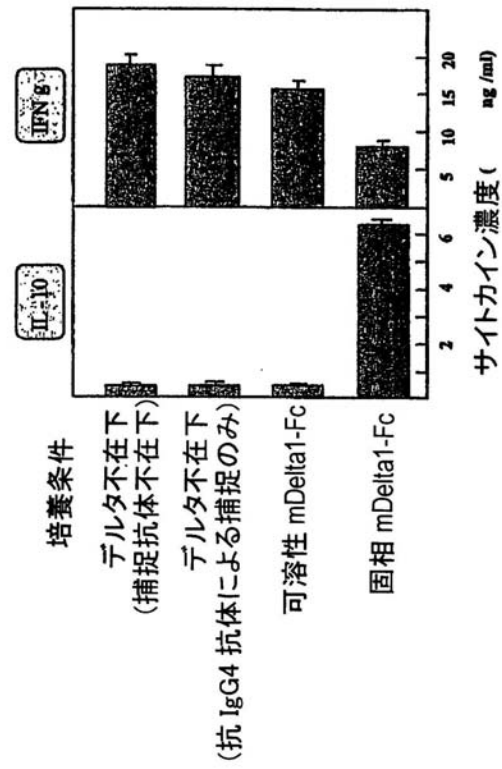
CD4⁺T細胞におけるmHes1の相対発現量

【 図 9 】

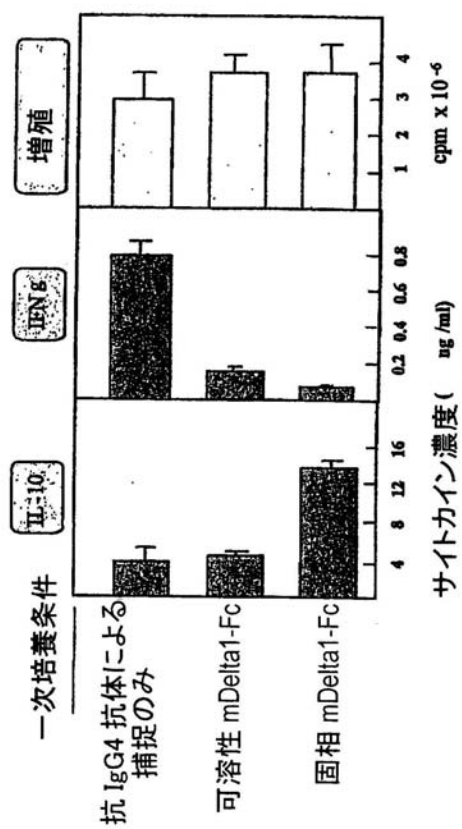
分極条件下でのサイトカイン産生



【図 10】

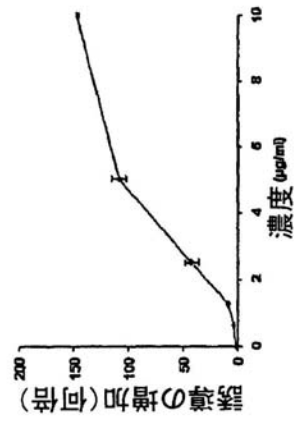


【図 11】

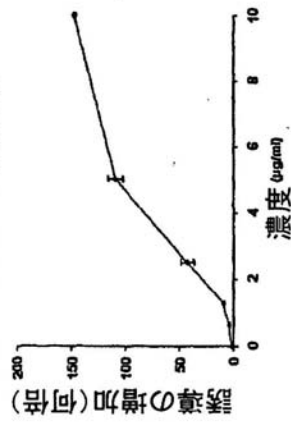


【図 12】

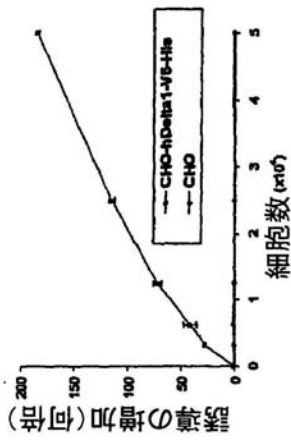
A) 精製 hDelta1-Fc(固定化)



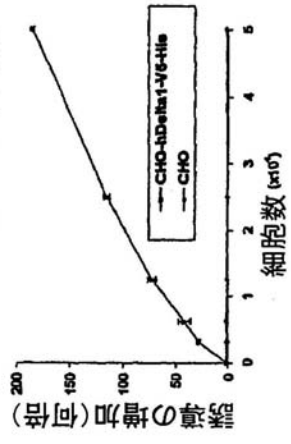
B) 精製 mDelta1-Fc(固定化)



C) CHO/CHO-hDelta1-共培養

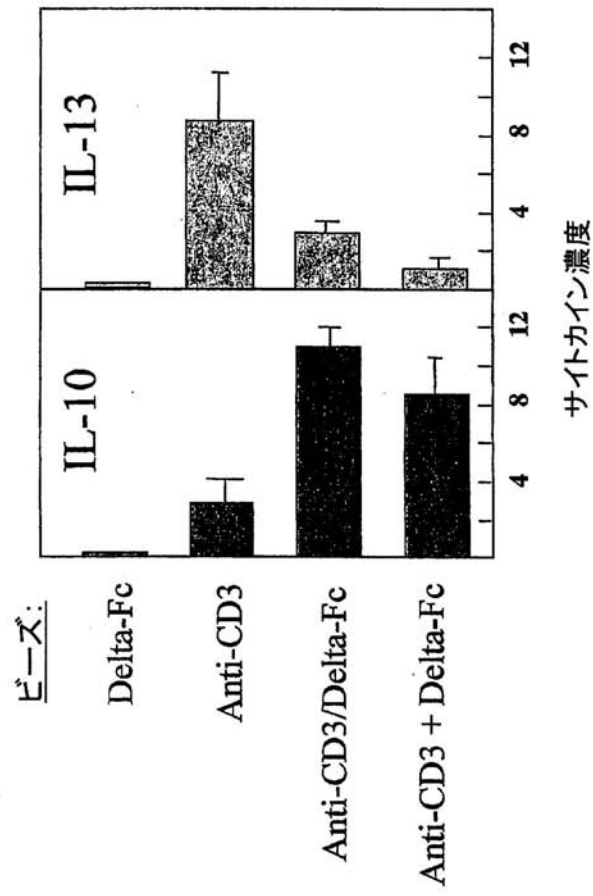


D) A20/A20-mDelta1-共培養



【図 13】

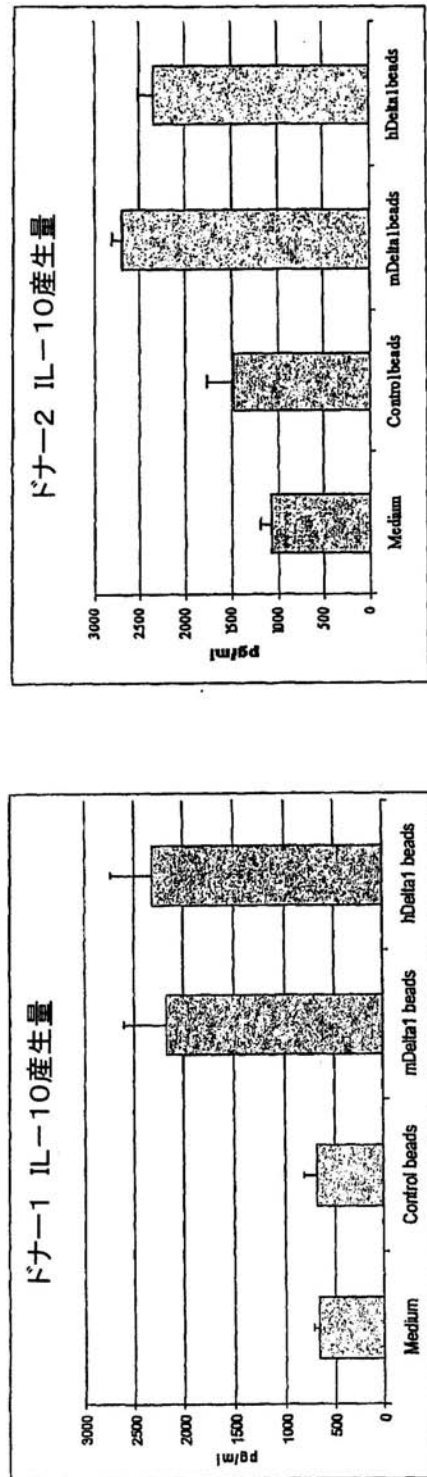
デルタFcコーティングビーズがインビトロでT細胞の反応を調節する



表に示すようにコーティングしたビーズ及び可溶性抗CD28抗体で
3日間活性化したCD4⁺T細胞

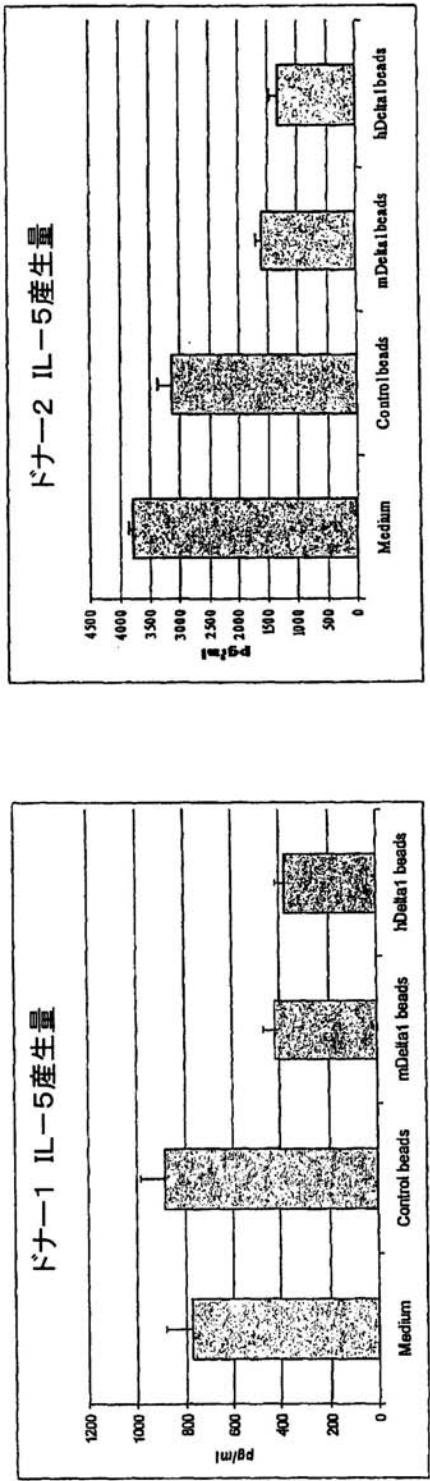
【図 14】

マウス又はヒトデルタ1ビーズ存在下におけるIL-10産生量の増加



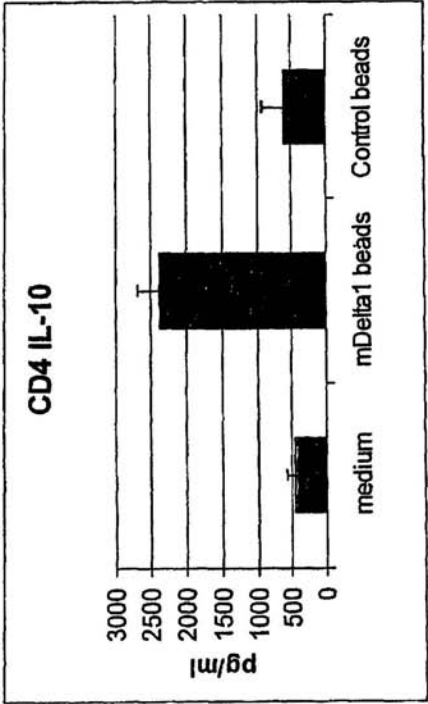
【図 15】

マウス又はヒトデルタ1ビーズ存在下におけるIL-5産生量の減少



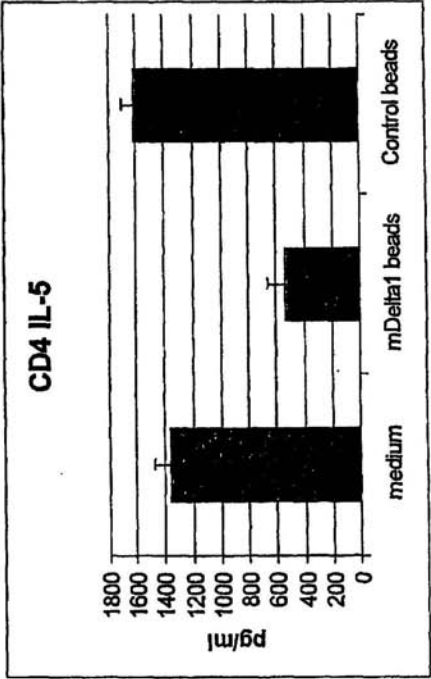
【図 16】

マウスデルタ1ビーズ存在下におけるIL-10産生量の増加



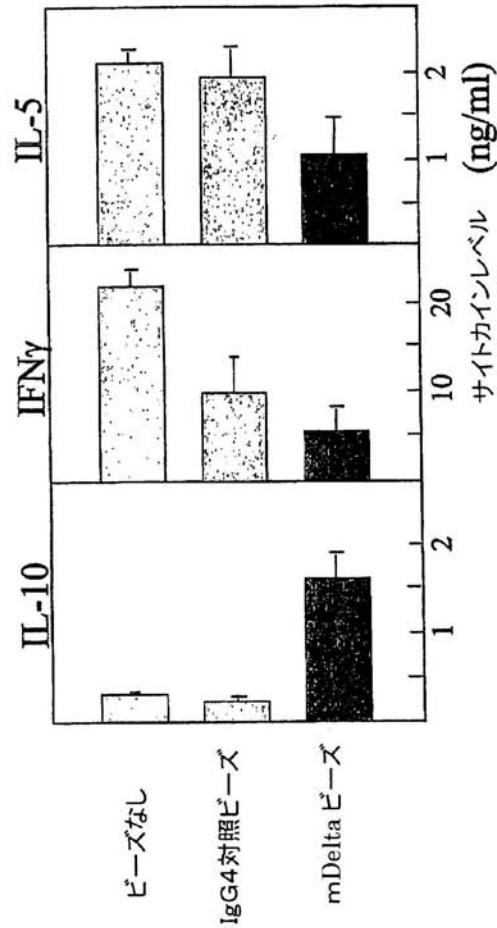
【図 17】

マウスデルタ1ビーズ存在下におけるIL-5産生量の減少



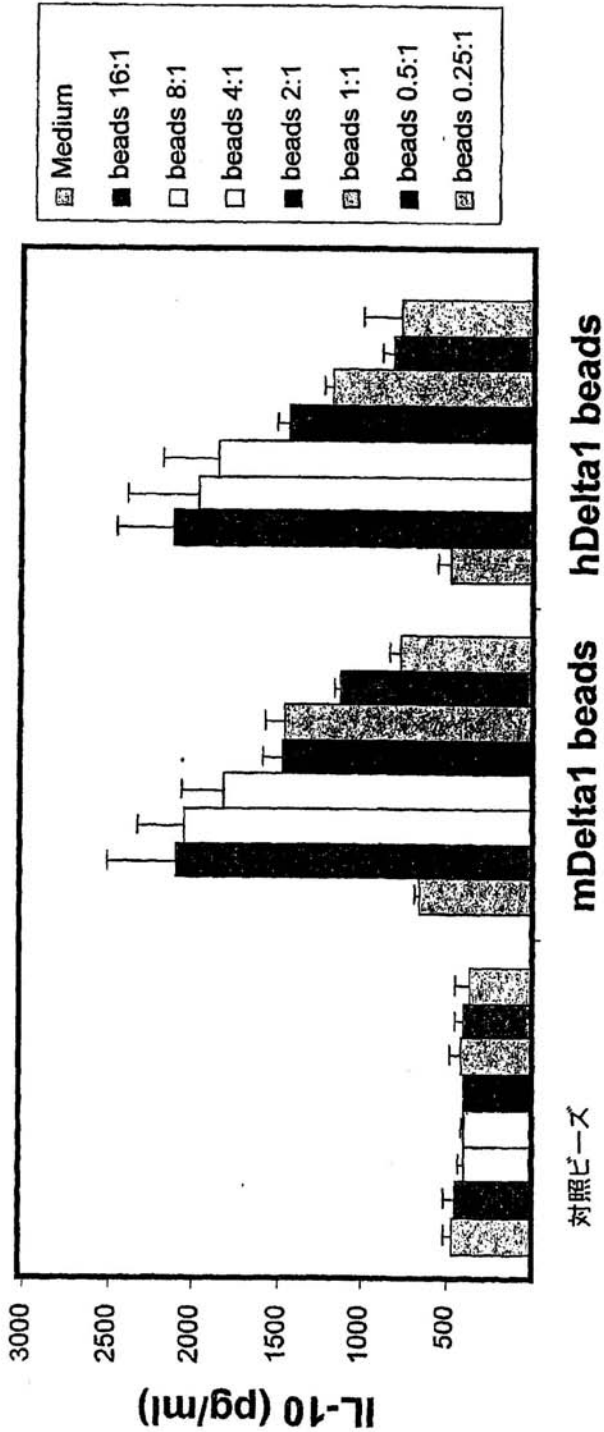
【 図 1 8 】

mDelta1-Fcが、ヒトCD4⁺T細胞によるIL-10の産生を増強し、IFN γ 及びIL-5の産生を減少させる



マウスデルタ1-hlgG4コーティングビーズの存在下又は不在下において
抗CD3抗体と抗CD28抗体で刺激したヒトCD4⁺T細胞

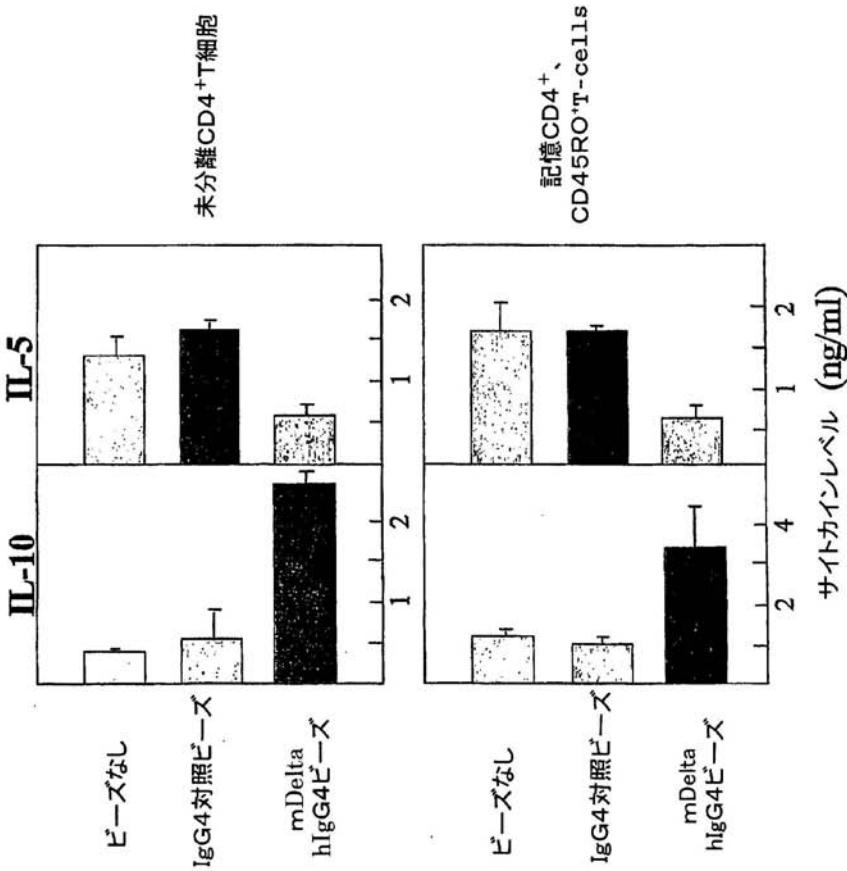
ヒトCD4⁺T細胞によるIL-10の産生をデルタ1が増強する



表に示すデルタコーティングビーズの存在下又は不在下において抗CD3/CD28抗体で刺激した細胞（各グループの左から右にむかって、培地単独、ビーズ：細胞の割合が、16：1、8：1、4：1、2：1、1：1、0.5：1及び0.25：1）

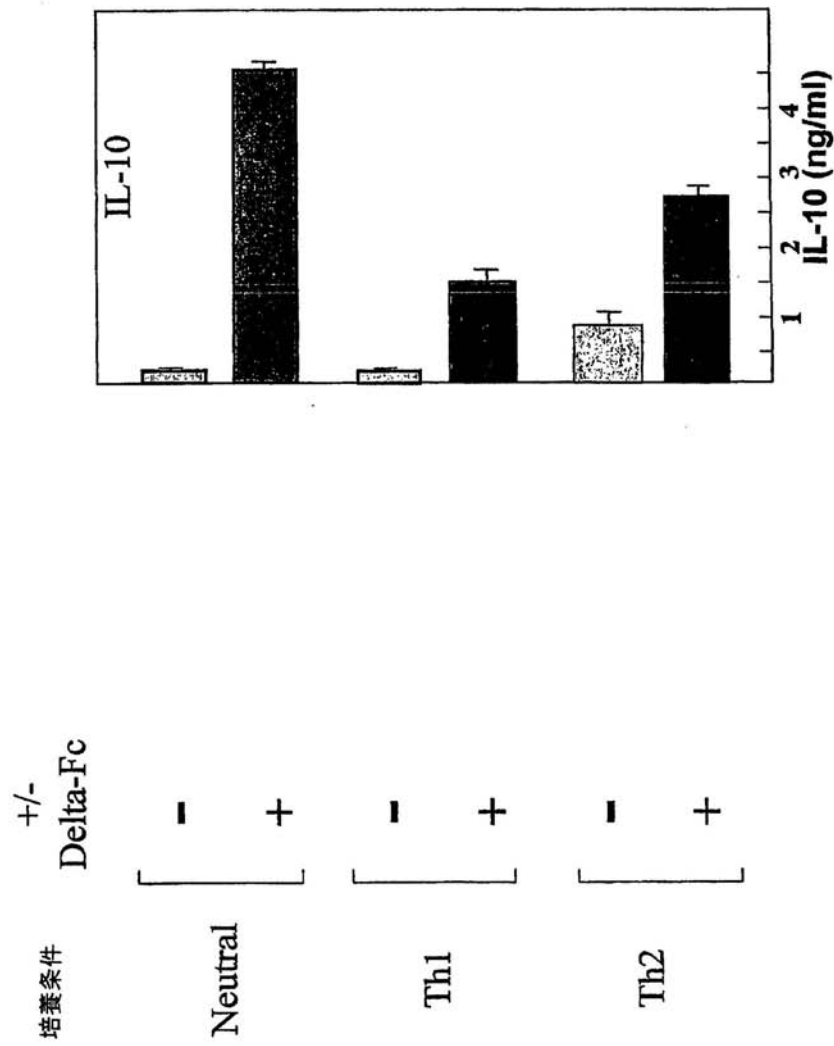
【 図 2 0 】

マウスデルタ1-Fcが、抗CD3/CD28抗体で活性化されたヒトCD4⁺T細胞によるIL-10の産生を増強し、IL-5の産生を減少させる



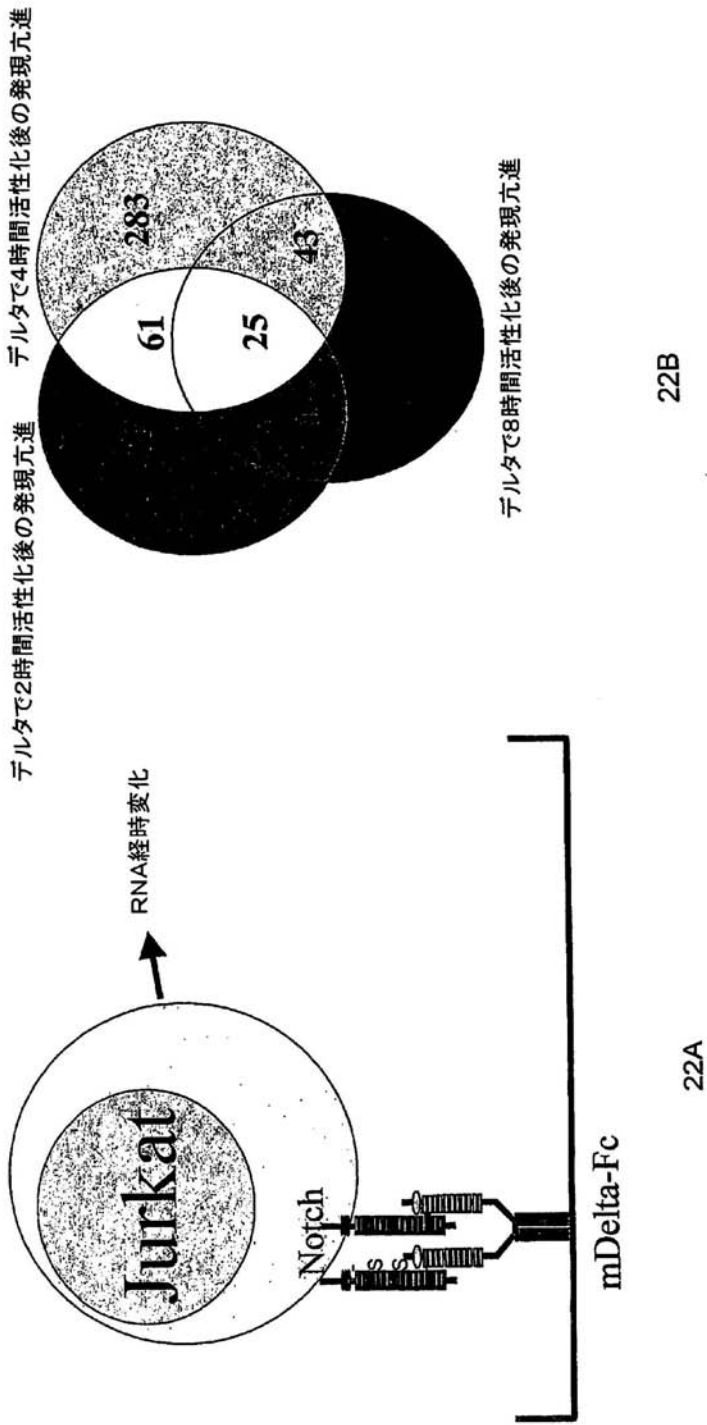
【 図 2 1 】

Th1又はTh2サイトカインの存在下であっても、デルターFcがマウスCD4⁺T細胞によるIL-10産生を増強する



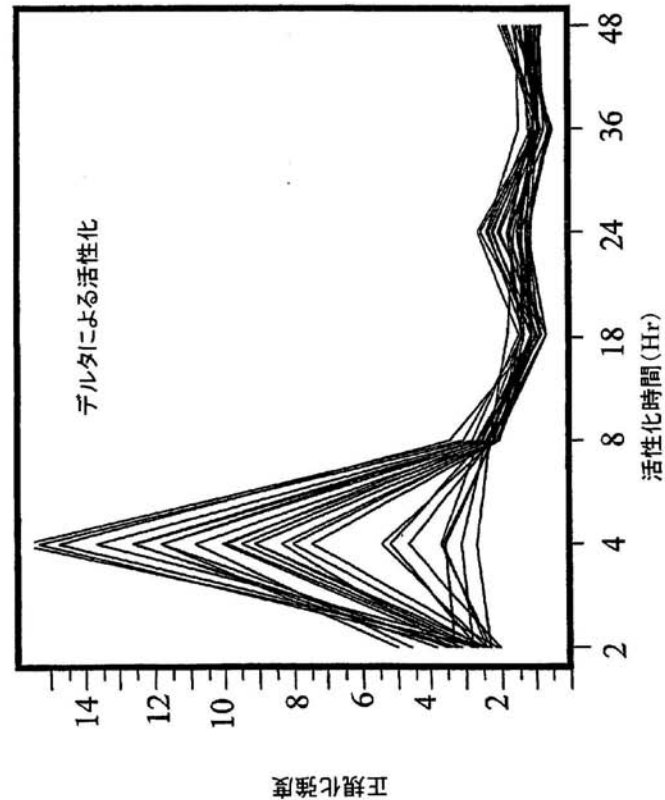
【 図 2 2 】

JurkatT細胞においてデルタにより活性化された遺伝子のマイクロアレイプロファイリング



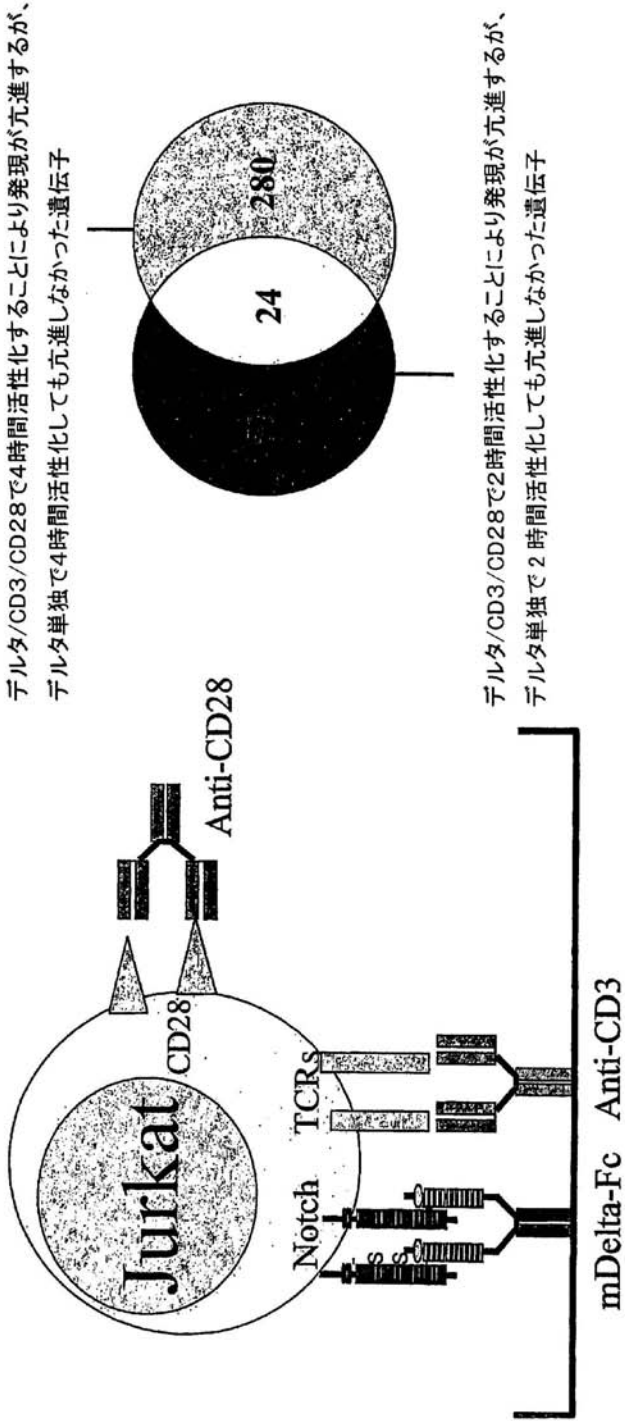
【 図 2 3 】

JurkatT細胞においてデルタに仲介される遺伝子発現活性化



【 図 2 4 】

JurkatT細胞においてデルタに活性化される遺伝子のマイクロアレイプロファイリング

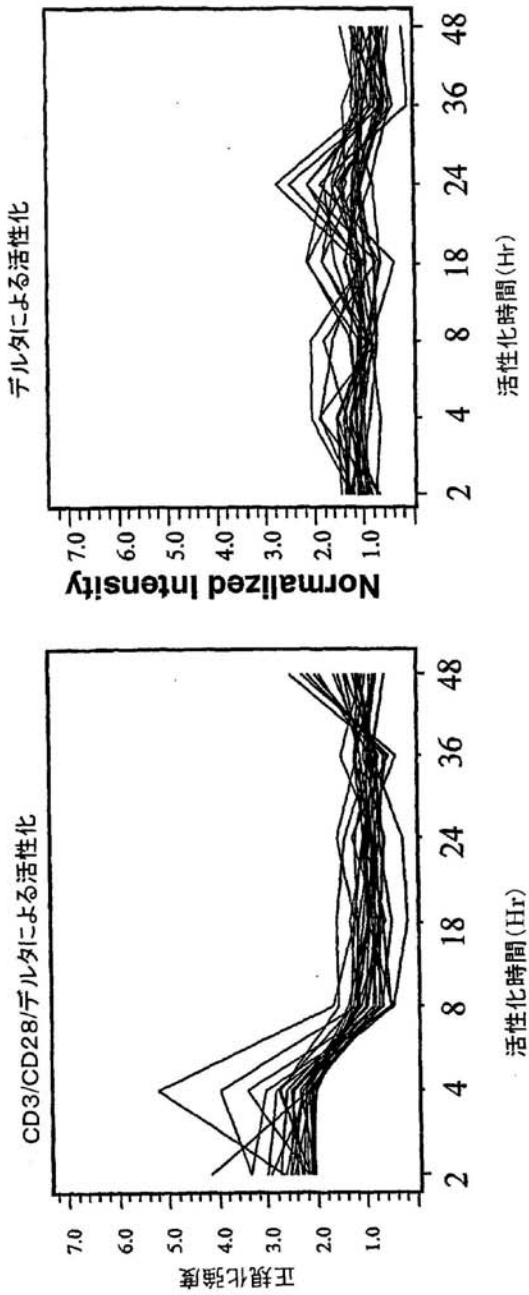


24B

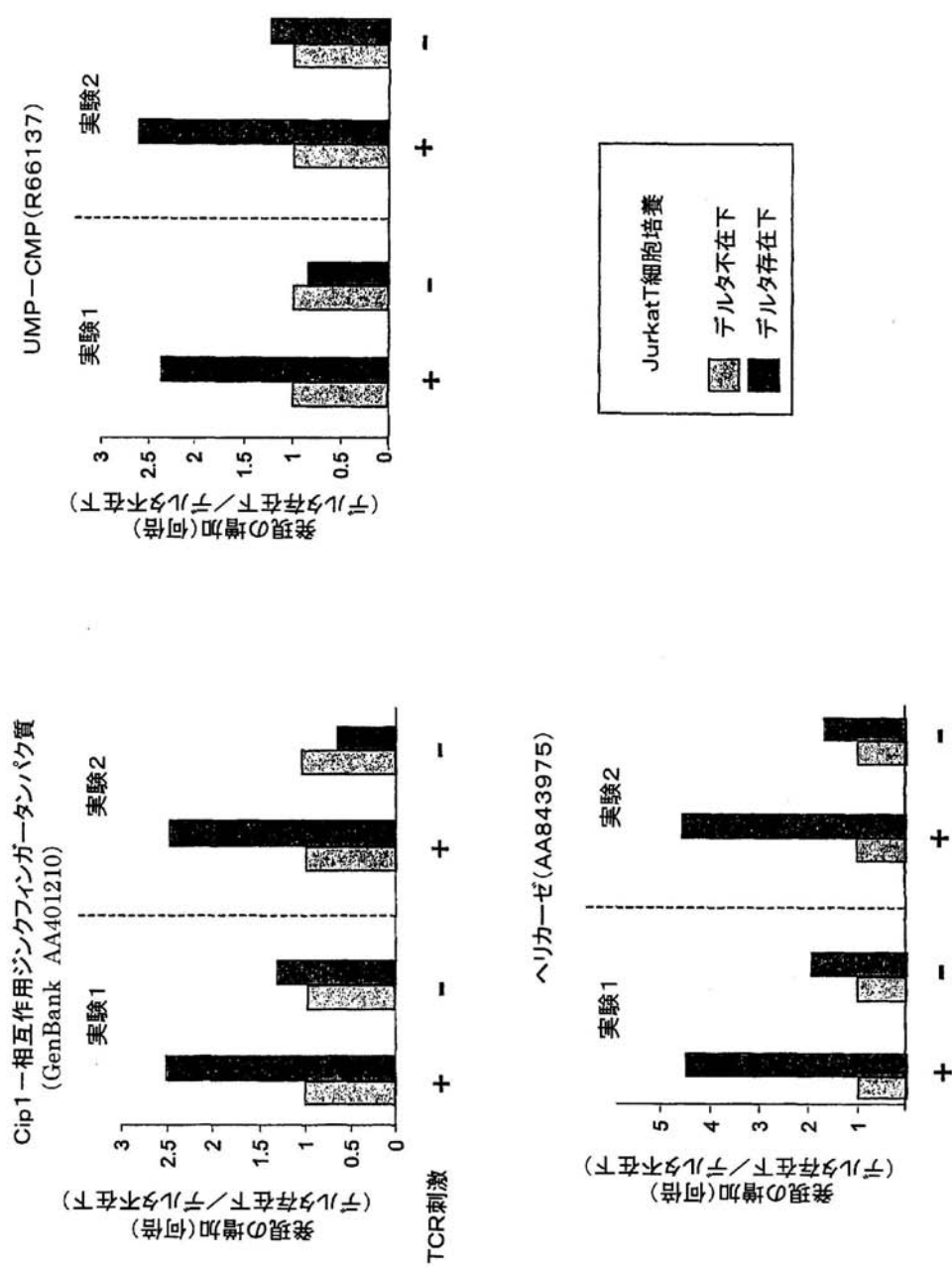
24A

【 図 2 5 】

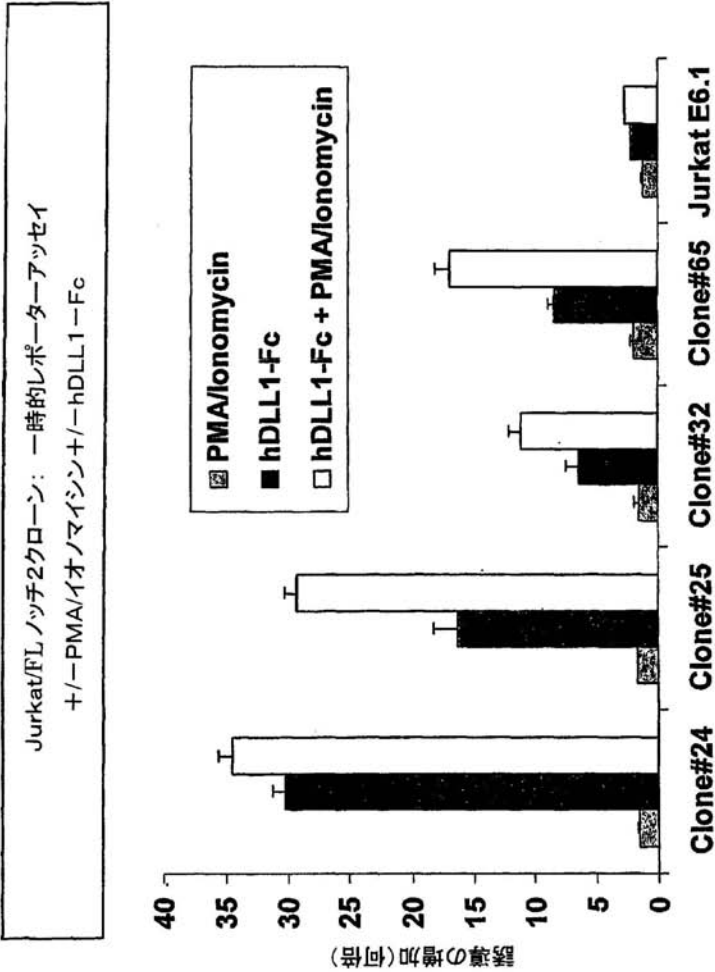
JurkatT細胞における抗 CD3/CD28抗体による遺伝子発現活性化のデルタによる調節



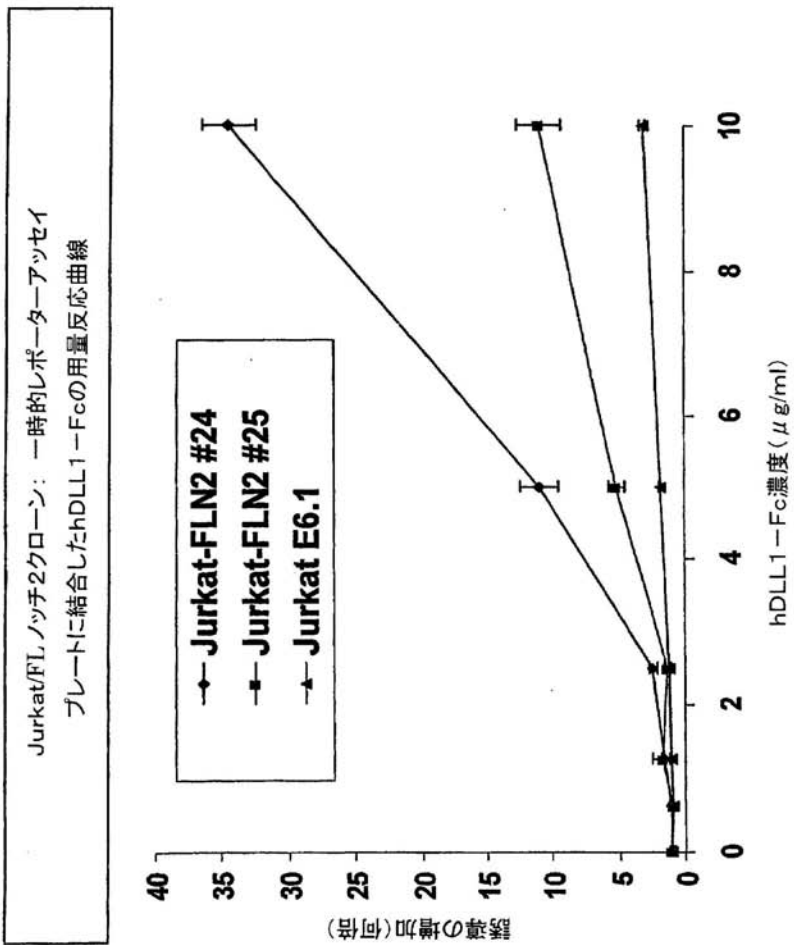
【 図 2 6 】



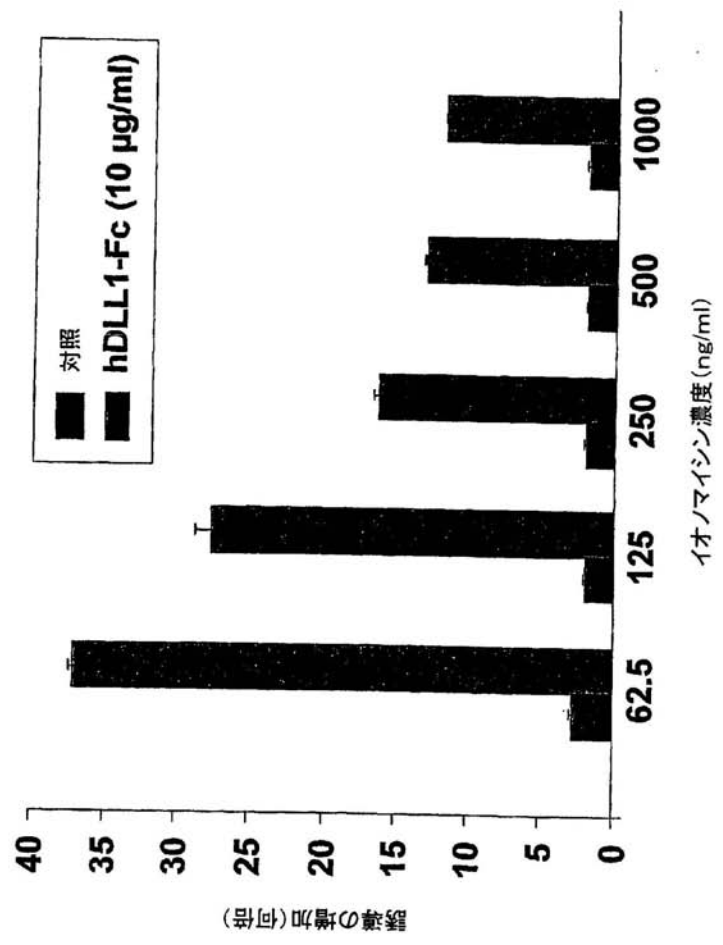
【 図 2 7 】



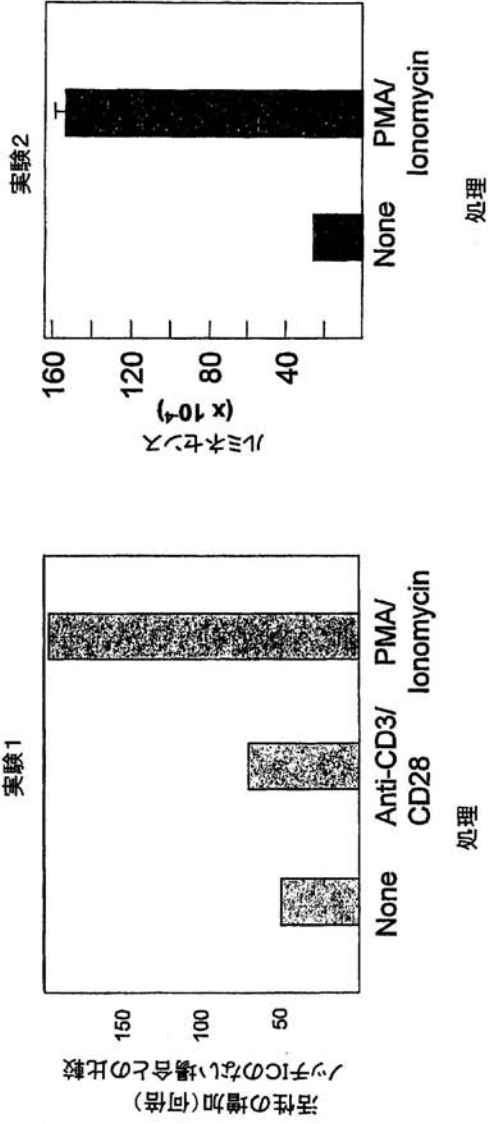
【図 28】



【 図 2 9 】

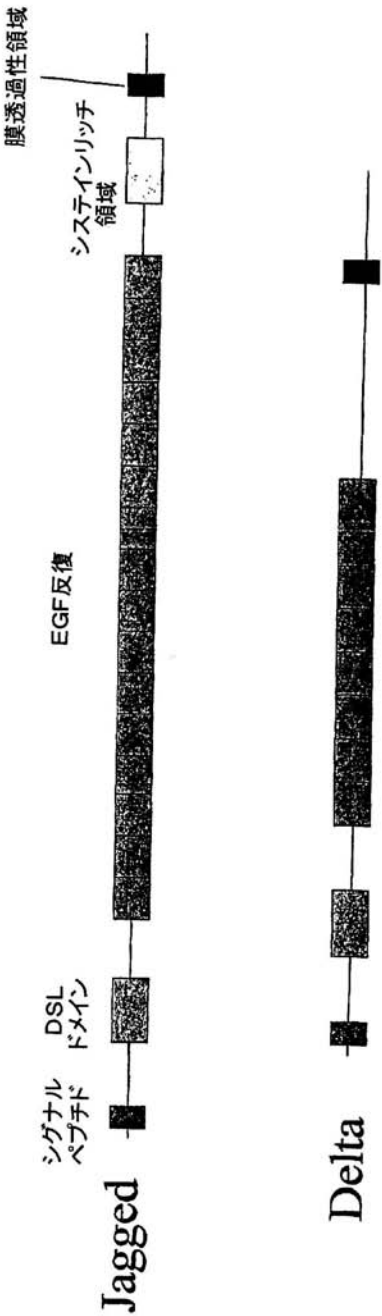


【 図 3 0 】



CBF-1 リンフェローゼレポーターとノックICをトランスフェクトした全細胞

【図 3 1】



【 3 2 】

DL_DROME/164-226 WKTKSESO.....YT-----SLEVDYFRVTCIDNYYTSGCAKFCRPRDSDFSCHSTCSETEIICLTGWQEDYC
 DLL1_HUMAN/159-221 WSQDLHSSG.....RT-----DLKYSYRFVCDHYHTEGGSVFCRPRDDAFGHFTCCGERGEKVCNPNQWKGPGYC
 DLL1_MOUSE/158-220 WSQDLHSSG.....RT-----DLRYSYRFVCDHYHTEGGSVFCRPRDDAFGHFTCCGERGEKMCDDPCWKQGYC
 DLL1_RAT/158-220 WSQDLHSSG.....RT-----DLRYSYRFVCDHYHTEGGSVFCRPRDDAFGHFTCCGERGEKMCDDPCWKQGYC
 DLL4_MOUSE/156-218 WRTDEQNDT.....LT-----RLSYSYRVICSDNYHTEGGSVFCRPRDDAFGHFTCCGERGEKMCDDPCWKQGYC
 DLL4_HUMAN/155-217 WILDEQST.....LT-----RLSYSYRVICSDNYHTEGGSVFCRPRDDAFGHFTCCGERGEKMCDDPCWKQGYC
 Rat J1 (Q63722) WQTLKQNTG.....IA-----HFEYQIRVTCDDHYHTEGGSVFCRPRDDAFGHFTCCGERGEKMCDDPCWKQGYC
 Mouse J1 (Q9QXX0) WQTLKQNTG.....IA-----HFEYQIRVTCDDHYHTEGGSVFCRPRDDAFGHFTCCGERGEKMCDDPCWKQGYC
 Human J1 (O15122) WQTLKQNTG.....VA-----HFEYQIRVTCDDHYHTEGGSVFCRPRDDAFGHFTCCGERGEKMCDDPCWKQGYC
 Chick J1 (Q90819) WQTLKHNTG.....AA-----HFEYQIRVTCDDHYHTEGGSVFCRPRDDAFGHFTCCGERGEKMCDDPCWKQGYC
 Chick J2 (O42347) WKTLQENGP.....VA-----NFEYQIRVTCDDHYHTEGGSVFCRPRDDAFGHFTCCGERGEKMCDDPCWKQGYC
 Mouse J2 (Q9QYE5) WKSLLHFSGH.....VA-----HLEIQIRVRCDENYYSATCNKFCRPRDDAFGHFTCCGERGEKMCDDPCWKQGYC
 Human J2 (Q9UNR8) WKSLLHFSGH.....VA-----HLEIQIRVRCDENYYSATCNKFCRPRDDAFGHFTCCGERGEKMCDDPCWKQGYC
 Rat J2 (P97607) WKSLLHFSGH.....VA-----HLEIQIRVRCDENYYSATCNKFCRPRDDAFGHFTCCGERGEKMCDDPCWKQGYC
 Human J2 (Q9Y219) WKSLLHFSGH.....VA-----HLEIQIRVRCDENYYSATCNKFCRPRDDAFGHFTCCGERGEKMCDDPCWKQGYC
 SERR_DROME/221-283 WKTLDHIGR.....NA-----RITYRVVQCAVYTYNTTCTTFCRPRDDAFGHFTCCGERGEKMCDDPCWKQGYC

(human Delta 1; GenBank Accession No. AF003522)

MGSRCAALAVLSALLCQVWSSGVFEKLQEFVNKGLGNRNCRCGAGPPCACRTFFKVLKHVQASVSPPCITYGSATVPVLGYDSFSLPDGGGA
DSAPNPIRFPFGTWPCTFSLIIEALHTDSPDLATENPERLSRLATVCEWSDLHSGRTDLKSYTRFVDEHYIGECCSVFCRPRDDAFG
HFTCGERGEKVCNPNQWKGFEYCTEPICLPGCDEQHGFCCKPCEKRVWQRYCDEIRYPCGLHGTQQFQWQCNQEGWGLFCNQLINYCTHHKPCIK
GATCTNNGQGSYTCSCRPGYTGCATGELGIDECDFSPCKNGGCTDLENSYCTCPGFTYKICELSAMTCADGCFNCGRCSDSPDGGYSCRCPTGYSGF
NCKKIDYCSSSPCSNAGKCYDLGDAYLCRCQAGFSGRCDNDVDDCASSPCANGCTCRDGVNDFSTCPTTCGNCSPAVERCEHAPCHNCATCCHERG
HGYVCECARGYGGPNCQFLLPELPPGPAVVDLTKELGQGGFFWVACAGVILVLMILICAAVVCVRLRQKRRPADPCRCGETEMNNLANCQREK
DISVSIIGATQIKNTNKKADFFHGDHSHADKNGFKARYPAVDINLVQDKDDTAVRDAHKKEDTKCQPGSSGEEKGTPPTLRGGEASERKRPDSCCSTSK
DTKYQSVYVISEKDECVIATEV

(human Delta 3; GenBank Accession No. NM_016941)

MVSPRMSGLLSQTVILALIFLPQTRPAGVFELOIHSFGPGPGAPSPCSARLPCKLFRVCLKPGLEAAHSPCALGAALSARGPVVTEQPGAPADL
PLPDGLIQVFFRDAMPFTFSFITEWREELGDIIGGPANSLIARVARRRLAAGGWARDIORAGAWELRFSYRARCHPPAVGTACTRLCRPSAPSRGCP
GLRPCAPLEDECEAFIVCRAGCSFEHGFCEQPGCECRCLGWTGPLCTVPVSTSSCLSPGFSATTCCLVPGPGCDNCPANGGSCSETPRSFECTPRG
FYGLRCEVSGVTCAQPCFENGGLCVGGADPD SAYICHCPGFGQSNCKEKKVDRCSLOPCRNGGLCLDIGHALRCRAGFAGRCHEHDLDDCAGACANGG
TCVEGGCAHRCSCALGFGGEDCERADPCAAAPCAHGCCRCYAHFSLVACACAPGYMGCARCEFFVHPDGSALPAAPPGLRPGDPQRYLLFPALGLLVAAGV
AGAALLVHVRRRGHSDAGSRLLAGTTFPSVHALEDAIANNLRTQEGSGDGPSSVDNNRPEDVDPGITYVISAPSIYAREVATFLFPFLHTGACGQHQHL
LFFYPSSILSVK

(human Delta 4; GenBank Accession No. AF_253468)

MAAASRSAGWALLILVALMQRAAGSGVFOLOQEFINERGVLASRCPCRCRTRFVCLKHQAVVSPGCTFTGTVSTPVLCTNSAVRDDSSGGGRN
PLQIPFNFTWPTFSILIIEANWAPGDDLRPEALPDALISKIAYQGLAVQGNLDEQSTLTRIYSYEVICSDNYGNCRLKCKKRNDFHGHVYVQF
DGNLSCLFGWTGEYQOPTICLSQCHEQNGYCSKPAECICLPGWQRLCNECIPNHCGRHCTCSTFWQCTDEGWGLFCDDQLINYCTHHSPCKNGATCSNS
GQSYTTCRCRPGYTGVDCLELSECDNPNCRNGSGCKQEDGYHCLCPPTCYGLHCEHSTLSCADSPCNNGGSCREERQANVACPCFPNFTCSNCKKVD
RCTSNPCANGQCLNRGPSCRCRCPGFTCTYCEILHVSDCANPCAHGCTCHDLENGIMCTCPAGFGRRCEVTSIDACASSPCFNRACTYDLSITFTFV
CNCYPYGVSRCEFFVGLPSPFWVAVSLGVGLAVLLVGLAVAVRQLRLRRPDGSRAMNLSDFQKONLIPAAQLKNTNQKKELEVDCCGLDKSNCG
KQONHTLDYNLAPGLCRGCTMPGKTFPHSDKSLCEKAPLRLHSEKPECRI SAICSPRDSMTQSVCLISEERNECVIATEV

MRAGRGRLPRKLLILLANWQARBMGYTELQISARUNNVNCELLSGACCDGRTTRAGCGGHDCEDTIVRVCLKEYOAKVITFGPCSYGHGATVP
LGNSSFLYPAGAGARARARAGCDQDPLGVLPQFAWERSFTLLVEAWMDNDTPNEELLITERSHAGCINPEDRWKSLHFSGHVAHLELQI
QMCEDENYSATCNKFCRAPRNDFTGHYCTDQYGNACDGMWKECKEAGKQGNCLHAGCTVPECRCSTGYWQGRFCDCVTPFGCVHGSCEVEFW
QRCENETWNGILLCDKOLYNVCGSHHPCTNGATCINAEIPQDRCITCFDGYSGRNCKEAHGCTSNPCANGSGSHEVSPSECHCPBSWSEPTCALDIDE
CASNPAAAGCTCYVDQDFECICEQWAGCTQIDANECEKFLPCTCEKRLNIGTCTCIPKMGKINCHINVDRCGQCHGCTKDLVNGYQCV
CPRFGRGHERLELDKCASSPSHSGLCELDLADGFHCHCQGSGLCEVDVLCPEPFCNGARCYNLEGYCYCACDDFGGKNCVSPREPCCGGA
CRVDHCGSDAGCPMPGAASQVPGHGRSGPGRNFSCITDSGFTYCHENTIDCCLCPKNGCTCDEYDAFCFCPSGMEGLCDTNPNDCL
EDIPGSGRGCTVLVNDFYACDDGMKGKCTSHREFOCATYCSNGCTCYDSDFSCACPPCKGKSCAVARNSSCLLNPFCVNGGTCVYSGSASFSCI
CHDGMGRCTHTNDNPLFCYNGINGICVDYGVNWFECCEAPCFAGPQCRINIDECQSFCAKCATCVDEINGYCRSCPGRAGRCQVITGFRSCW
SRGTPTPFHGSSWVEDCNSCRDLGRDCSKVWCGKPKCLLAGQPEALSAQCPLQORCEKAPQCLRPPECAWCECGAEHPPSPFCLPRSGHLDNNC
AKVITATFNRDHPQCTTVGATCSGTRSLPATVARDRLVALLCDRASASANEVAVSFSPARDLDFSLTQGAHAIVAAITQRGNSLLIALLVTE
NARVETVTVTSGSSSTGLVPLVLCGAFSVIMLILACTVYLWNWTRKRKRERERSRLPREESSANNOWAPINPITRNPTRPEGGHKOVLYQXCNFTPPPPPRADEA
LPGAGAHAEDEDEDEDLGRCEDESLEAKETSHKFTQDPSRSPCEPAHWAISGPKVDNRVAERSINEARYASKE

【 3 5 】

HumanNotch1(AF308602)

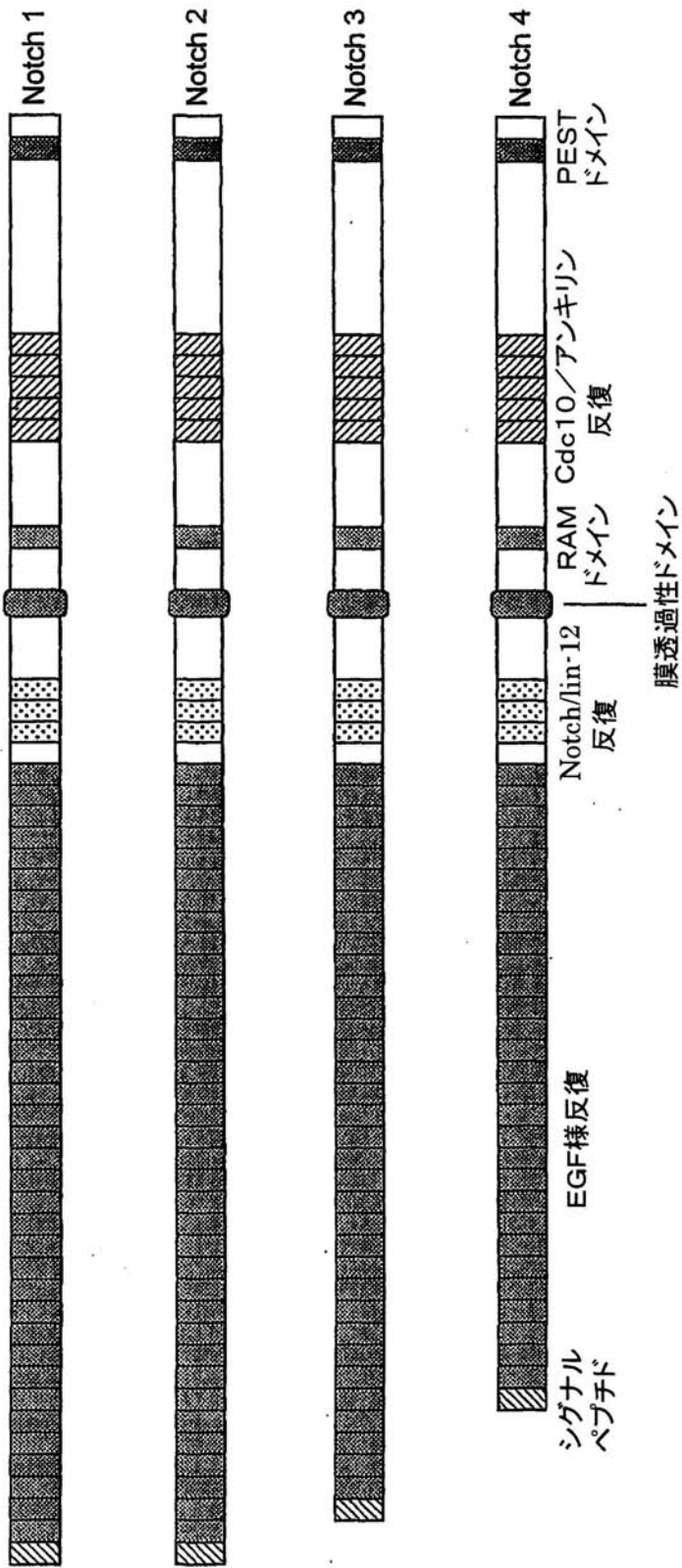
MPPLIAPLLCIAILLPALAARGPRCSQPGETCIANGKCEAANGTEACVCGGAFVGPFCODNPCLSTPKNAGTCHVVDRRGVADYACSCALGFSGPLC
 LTPLDNACLINPCRNCGTCDILLITLTKRCRCPWPWSGKSCQADPCASNPANGGQCLPFEASYICHPPSFHGTQRQDVNECGQKPRLCRHGGTCH
 NEVGSYRCVCRAHTHTGPNCEPYPVPCSPSPCQNGGTCTCRPTGVTHECACLPFTGQNCENIDDCFNKCKNGACACVGVNTYNCPCPPEWTQYCTE
 DVDECOQIMENACQNGGTCHNTHGGYNCVGVNGTGEDCSENIDDCASAACTHATCDHRVASFYCEPHGTGILCHLNDACISNPNCEGNCNDTNPV
 NGKAICTCPSGYTGPACSDQDVDECSLGNAPCEHAKCINTLGSFECCQLQCYTGPCEIDVNECVSNPCQNDATCLDQIGEFQCMCMPEGYEGVHCEVN
 TDECASSPCLHNGRCILDKINEFQCEPTGFTGHLQYDVDECASTPCRNKAKCLDGNPTTVCYTGTYGTHCEVDIDECDPFCYHSGCKDGVATFT
 CLCRPGYTGHHCEITNINESSQPCRLRGTCODPDNAYLCFLKGTGPNCEINLDDCASPPCDSTGCLDKIDGYECACEPGYTGSMCNSENIDECAGNP
 CHNGGTCEGDLNGFTCRCEGYHDPCLSEVNECNSNPCHGACRDSIANGYKCDPCWSGTNCIDINNNECESNFCVNGGTCKMTSGIVTCTREGFS
 GPNCOITNINECASNPCLNKGTCTIDDVAGYKCNCLLPTGTATCEVVLAPCAPSPCRNGGECRQSEYSEFSCVCTAGAKGQTCFVDINECVLSPCRHG
 ASCQNTGXYRCHQAGYSGRNCETDIDDCRPNPCHNGGSCTDGINTAFCDCLPGFRTGTCEDINECASDPCRNGANCTDCVDSTCTCPAGFSGIH
 CENNTPDCTESSCFNGGTCVDGINSFTCLCPPGFTGYSYQHVVNECDSPCLLGGTQDGRGLHRTCPQGYTGPNCQNLVHWCDSPPCKNGKCKWQT
 HTQYRCCEPSCWTGLYCDVPSVCEVAAQROQGVDAVARLCOHGLCVDAAGNTHHCRQAGYTGSYCEDLVDECSFSPCQNGATCTDYLGGYSCKCVAGY
 HGVNCSSEEIDECLSHPCQNGGTCLDLPTNYKCSCEPRTQGVHCEINVDNCPFPVDFYRSBPKCFNNGTCTVDQVGGYSCCTCPGFVGERCEGVDYNECLS
 NPCDARGTQNCVQVRVNDHFCECRAGHTGRRCESVINGCKGKPKCKNGGTCAVANTARGFTICKCPAGFEGATCENDARTCGSLRCLNGGTCTISGPRSP
 CLCLGPTGTGPECQFPASSPCLGGNPCYNQGTCEPTSESPFYRCLCPAKENGLLCHILDYSGGGAGRDIPPLIEEACELPECEQEDAGNKVCSLQCNN
 HACGWDGDCSLNFDNFWKNCTQSLQCKYFSDGCHDSQCNSAGCLFDGDCQRAEGQCNPLYDQYCKOHFSDGCHDQGCNSAECEWDGLDCAEHVPE
 RLAAAGTLVVVVIMPPPEQLRNSSFHFLRELSRVLHTNVVFKRDAHQQOMIFPYYGREELRKHPIKRAAEGMAAPDALLGQVKASILLPGGSEGGRRRRE
 IDPMDVRGSIVYLEIDNRQCVQASSQCFOQATDVAAFLGALSLSLNIPYKIEAVQSETVPPPPAQLHEMTVAAAFAVLLFFVCGCVLLSRKRRRQ
 HGQIWFEGFKVSEASKKRRREPLGEDSVGLKPLKNASDGLMDDNQNEWDEDELETKKRFEEFVVLFDLDDQTDHRTQOQHILDAADLRMSAWPT
 PQGEVDADCMDVNVVRGPDGFTPLMTASCGGGLGTGNSEEDAPAVISDFIYQCASLHNQTDRTGETALHLAARYSRSDAAKRLLEASADANIQDN
 MGRTPLHAAVSADAQGVFQILIRNRATDLDARMHGTTPLLAARLAVEGMELEDLNSHADVNVDLKGKSLHWAATAVNVNDAVAVLLKNGANKDMQ
 NNRETPFLAAREGSYETAKVLLDHFANRDITDHMDRLPRDLAQERMHDIIVRLDLYNLVRSPLHGAFLGCTPPLSPNGYLSLKPQVQG
 KKVRFSSKGLACGSKEAKDLKARRKKSQDGGCLLIDSSGMLSPVDSLESPLHGYLSDVASPPLLPSPFQOQSPSVPLNHLPGMPDTHLGIHLNVAKP
 EMAALGGGGLAFETGPPRLSHLPVAGSTVTLGSSSGGALNFTVGGSTSLNGQCEWLRLQSGMVPNOYNPLRGSVAPGLSTQAPSLQHGAVGPLH
 SSLAASALSQMSYQGLPSTRLATQPHLVQTOQVQONLQMOQONLQPANIQOQOQSLQPPPPPPPPHGLGVSSAASGHLGRSFLSGEPSPQADVQPLGPS
 SLAVHTILPQESPALPTSLPSSLVPPVTAQFLTPPSQHSYSFPVDNTPSHQLQVPEHPFLTPSPFSPDQWSSSSSPHSNVSDWSEGVSSPPTSMQSQI
 ARIPEAFK

【 3 6 】

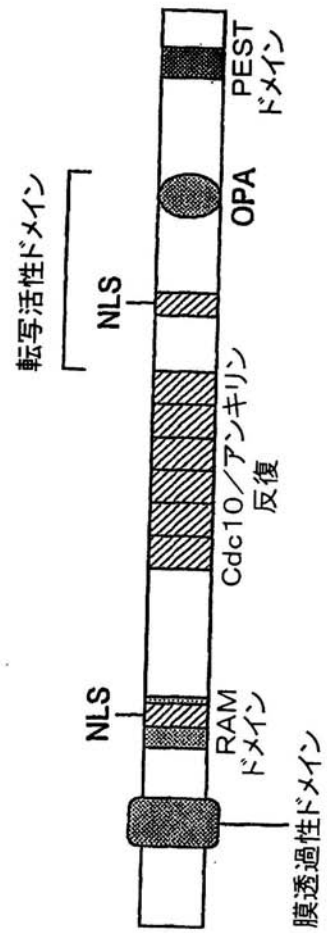
HumanNotch2(AA36377)

MPALRPALLWALLALWLCAPAHALQCRDGYEPCVNEGMVYHNGTCYCKPEGLGEYCQHRDPCEKNCQNGGTCVAQAMLGKATCRCASGF
 TGEDCOYSTSHPCFVSRPCLNGGTCMLSRDIFYECTQVGTKECQWTDACLSHPCANGSTCTTVANQFSCKCLTGTQKCETDVNECDIPGHC
 OHGGTCLNLPGSYQCCPQFTGYCDLSYPCAPSPCVNGGTCRQTCDFTEECNCLPGEGSTCERNIDDCPNHRCQNGGVCVDGVNTYNCRCPP
 QWTGQCTEDVDECLLPNACQNGGTCANRNGYGCVCVNGWSGDDCSENIDDCAFASCTPGSTCIDRVASFSCMCEPKGAGLLCHLDACISNPC
 HKGALCDTNPLNGQYICTPQGYKGADCTEDVDECAMANSNPCEHAGKCVNTDGAFFCECLKGAGPRCEMDINECHSDPCQNDATCLDKIGGFTC
 LCPGFGVHCELEINECQSNPCVNNNGQCVDKVNRFCCLPPFTGVQIDIDDCSTPTCLNGAKCIDHPNGYECQCATGFTGVLCEENIDNCDP
 DPCHGQCCQDIDSYTCINPQYMGALCSDQIDECYSPLNDGRCIDLVNGYQCQPGTSGYNCEINFDDCASNPCIHGICMDGINRYSVCVSP
 GFTGQRCNIDIDECASNPCRKGAATCINGVNGFRCICPEGPHPCSYQVNECLSNPCIHGNCITGLSGYKCLDAGWVGINCEVDKNECLSNPCQN
 GGTCDNLVNGYRCTCKGFKGYNQVNIDECASNPCLNQGTCTDDISGYTCHCVLPTGKNCQTVLAPCSNPNCEAAVCKESPNFESYTCICLAPG
 WOGQCTIDIDECSKPCMHGLCHNTQGSYMCCEPPGFGSGMCEEDIDDLANPCQNGSGMDGVNTFSCILCPGFTGDKQCTDMNECLSEPCKN
 GGTCSDYVNSYTCCKQAGFDGVHCENINECTESSCENGCTCVDGINFSCLCPVGTGSCFLHEINECSSHPCINECTCVDGLGTYRCSCLGYT
 GKNCQTLVNLCSRSPCKNKGTCVQKRAESQCLPSGWAGAYCDVFNVSQDIAASRRGVIVHLCQHSQVGINAGNTHYCCQPLGYTGSYCEEQIDE
 CASNPCQHGATCSDFIGGYRCECVPGYQGVNCEYEVDECONPCQNGGTCIDLVNHFKSCPPGTRGLLCEENIDDCARGPHCLNGGQCMRIGGY
 SCRCPLPGAGERCEGIDINECLSNPCSESGSLDCIQLTNDYLCVCRSAFTGRHCETFVDVCPQPCINGGTCVAVASNMFDGFTCRCPGPGFGARCOQ
 SCGVKCRKEQCVHTASGPRCFPCSPRDCESGCASSPCQHGSGCHPQRPYYSQCAPFSGSRCELYTAPSTPPATCLLSQYCADKARDGVCD
 EACNSHACQWDGDCSLTMENFWANCSPPLCWDYINNQCDELNTVECLDNFECCQNSKTKDKYCADHFKDNHCNQCNCSEECGWDGLDCAA
 DQPENLAECTIVIVLMPEQLLODARSFTLRALGTLHLNLRKRSQGLMVPYFYGEKSAAMKQRMTRRSILPGEQEQEVAGSKVFEIDNRQC
 VQSDHCFKNTDAAALASHAIQGTLSYPLVSVVSESLTPERTQLLYLLAVAVIILFILLGVIMAKRRKHGSLWLPFGFTLRDDASNHKRRR
 PVGDVGLKNLSVQVSEANLIGTGTSEHWVDDEGPQPKVKADEALLSEEDDPIDRRPWTQOHLAADIRRTPSLALTPPOAEQEVVDVLDVNR
 GPDGCTPMLASLRGSSDLSEDEDAEDSSANITDLVYQASLOAQTDRTGEMALHAARYSRADAARLLDAGADANAQDNMGRCPHLHAAYAA
 DAQGVFQILLIRNKVTDIDARMNDGTTPLTLAARLAVEGWAEINCOADVNAVDDHGKSALHWAAYVNNVEATLILLKNGANRMDQNKETPLFL
 AAREGSYEAAILLDHFANRDITDMDRLPRDVARDRMHDIIVRLIDEYNTVPSPPGTVLTSALSVICGPNRSFSLKHTPMGKKSRRPSAKSTM
 PTLNLAKEAKGSRKKSLSKVKQVLSSESVTLSPVDSLESPHTYVSDTSSPMITSPGILQASPNEMLATAAPPAPVHAQHALSFSNLHEMQ
 PLAHGASTVLPVSVQILLSHHHIVSPGSGSAGLSRLHPVPVPADWMNRMEVNETQYNEMFGWLAPAGETHPGIAPQSRPPEGKHITTPREPPIPI
 VTFQILPKGSIAQAPAGAPQOSTCPRPAGVPLPTMYQIPEMARLPVAFPTAMMPQDQVQVQATILPAYHPFASVGKYPPTPPSQHSYASSNAER
 TPSHSGHLQCEHPYLTPSPESPQWSSSPHSAWSVDVTTSTPGAGGQGPCTHSEPPHNMQVYA

【図 37】



【図 38】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
13 February 2003 (13.02.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/012441 A1

- (51) International Patent Classification: G01N 33/50, A61K 38/17, A61P 37/00
- (21) International Application Number: PCT/GB02/03397
- (22) International Filing Date: 25 July 2002 (25.07.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
0118153.6 25 July 2001 (25.07.2001) GB
0307930.9 5 April 2002 (05.04.2002) GB
0212282.8 28 May 2002 (28.05.2002) GB
0212283.6 28 May 2002 (28.05.2002) GB
- (71) Applicant (for all designated States except US): LORANTIS LIMITED [GB/GB]; 307 Cambridge Science Park, Milton Road, Cambridge CB4 0WG (GB).
- (72) Inventors: and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): BODMER, Mark, William [GB/GB]; Loralis Limited, 307 Cambridge Science Park, Milton Road, Cambridge CB4 0WG (GB). BRIEND, Emmanuel, Cyrille, Pascale [FR/GB]; Loralis Limited, 307 Cambridge Science Park, Milton Road, Cambridge CB4 0WG (GB). CHAMPION, Brian, Robert [GB/GB]; Loralis Limited, 307 Cambridge Science Park, Milton Road, Cambridge CB4 0WG (GB). MCKENZIE, Grahame, James [GB/GB]; Loralis Limited, 307 Cambridge Science Park, Milton Road, Cambridge CB4 0WG (GB). TUGAL, Tamara [SK/GB]; Loralis Limited, 307 Cambridge Science Park, Milton Road, Cambridge CB4 0WG (GB). WARD, George, Albert [GB/GB]; Loralis Limited, 307 Cambridge Science Park, Milton Road, Cambridge CB4 0WG (GB). YOUNG, Lesley, Lynn [GB/GB]; Loralis Limited, 307 Cambridge Science Park, Milton Road, Cambridge CB4 0WG (GB).
- (74) Agents: MALLALIEU, Catherine, Louise et al.; D. Young & Co., 21 New Fetter Lane, London EC4A 3DA (GB).
- (81) Designated States (national): AI, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, GR, GU, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Declaration under Rule 4.17:
— of inventorship (Rule 4.17(vi)) for US only
- Published:
with international search report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 03/012441 A1

(54) Title: METHOD FOR DETECTING MODULATORS OF NOTCH SIGNALLING

(57) Abstract: A method for detecting modulators of Notch signalling is described. The method comprises the step of monitoring Notch signalling in a cell of the immune system in the presence of a candidate modulator.

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

METHOD FOR DETECTING MODULATORS OF NOTCH SIGNALLING

Field of the invention

The present invention relates to a method of detecting modulators of Notch signalling.

- 5 The present invention also relates to novel modulators identifiable by such a method and uses thereof in therapy. The present invention also relates to a pharmaceutical composition comprising at least one such modulator.

Background of the Invention

10

Notch signal transduction plays a critical role in cell fate determination in vertebrate and invertebrate tissues. Notch is expressed at many stages of *Drosophila* embryonic and larval development and in many different cells implying a wide range of functions including an important role in neurogenesis and in the differentiation of mesodermal and endodermal cells. There are at least four mammalian Notch genes (Notch-1, Notch-2, Notch-3 and Notch-4). Notch-1, which most closely resembles the proteins of invertebrates and lower vertebrates, is widely expressed and is essential for early development. Recent evidence suggests that Notch signalling contributes to lineage commitment of immature T-cells in the thymus.

20

During maturation in the thymus, T-cells acquire the ability to distinguish self-antigens from those that are non-self, a process termed "self tolerance". Tolerance to a non-self antigen, however, may be induced by immunisation under specific conditions with a peptide fragment comprising that antigen. In autoimmune diseases such as multiple sclerosis, rheumatoid arthritis or diabetes, there is a failure of the proper regulation of tolerance. Improved treatment methods for re-establishing tolerance are desirable for autoimmune diseases. Similarly in allergic conditions and for transplantation of an organ or tissue from a donor individual, induction of tolerance to particular foreign antigens or profiles of foreign antigens is desirable.

30

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

2

The expression on the cell surface of normal adult cells of the peripheral immune system of Notch and its ligands, Delta and Serrate, suggests a role for these proteins in T-cell acquired immunocompetence. T-cells express Notch-1 mRNA constitutively. Delta expression is limited to only a subset of T-cells in the peripheral lymphoid tissues. Serrate expression is restricted to a subset of antigen presenting cells (APCs). These observations reinforce the view that the Notch receptor ligand family continues to regulate cell fate decisions in the immune system beyond embryonic development with Notch signalling playing a central role in the induction of peripheral unresponsiveness (tolerance or anergy), linked suppression and infectious tolerance (Hoyne et al.).

10

Thus, as described in WO 98/20142, manipulation of the Notch signalling pathway can be used in immunotherapy and in the prevention and/or treatment of T-cell mediated diseases. In particular, allergy, autoimmunity, graft rejection, tumour induced aberrations to the T-cell system and infectious diseases caused, for example, by Plasmodium species, Microfilariae, Helminths, Mycobacteria, HIV, Cytomegalovirus, Pseudomonas, Toxoplasma, Echinococcus, Haemophilus influenza type B, measles, Hepatitis C or Toxicara, may be targeted.

It has also recently been shown that it is possible to generate a class of regulatory T cells which are able to transmit antigen-specific tolerance to other T cells, a process termed infectious tolerance (WO98/20142). The functional activity of these cells can be mimicked by over-expression of a Notch ligand protein on their cell surfaces or on the surface of antigen presenting cells. In particular, regulatory T cells can be generated by over-expression of a member of the Delta or Serrate family of Notch ligand proteins. Delta or Serrate induced T cells specific to one antigenic epitope are also able to transfer tolerance to T cells recognising other epitopes on the same or related antigens, a phenomenon termed "epitope spreading".

Notch ligand expression also plays a role in cancer. Indeed, upregulated Notch ligand expression has been observed in some tumour cells. These tumour cells are capable of rendering T cells unresponsive to restimulation with a specific antigen, thus providing a possible explanation of how tumour cells prevent normal T cell responses. By

30

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

3

downregulating Notch signalling *in vivo* in T cells, it may be possible to prevent tumour cells from inducing immunotolerance in those T cells that recognise tumour-specific antigens. In turn, this would allow the T cells to mount an immune response against the tumour cells (WO00/135990).

- 5 A description of the Notch signalling pathway and conditions affected by it may be found in our published PCT Applications WO 98/20142, WO 00/36089 and WO 0135990. The text of each of PCT/GB97/03058 (WO 98/20142), PCT/GB99/04233 (WO 00/36089) and PCT/GB00/04391 (WO 0135990) is hereby incorporated herein by reference.

There remains a need in the art for the provision of further diagnostic or therapeutic compositions useful in the detection, prevention and treatment of diseases or conditions of, or relating to, the immune system, and in particular, but not exclusively, T cell mediated diseases or disorders. The present invention addresses this problem by delivering an effective method of identifying novel modulators of the Notch signalling pathway. While many assay methods are known in the art, the present invention is based in our knowledge of the Notch signalling pathway and realisation that an effective assay method for detection of novel modulators needs to be carried out using a cell of the immune system.

10

Statements of the Invention

- According to one aspect of the present invention there is provided a method for detecting modulators of Notch signalling comprising the step of monitoring Notch signalling in a cell of the immune system in the presence and absence of a candidate modulator and determining whether the candidate modulator modulates Notch signalling.

- According to a further aspect of the present invention there is provided a method for detecting modulators of Notch signalling comprising the steps of:

20

- (a) contacting a cell of the immune system with a candidate modulator;

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

4

- (b) monitoring Notch signalling; and
- (c) determining whether the candidate modulator modulates Notch signalling.

"Contacting" means bringing together in such a way so as the cell may interact with the candidate modulator. Preferably this will be in an aqueous solvent or buffering solution.

5

According to a further aspect of the invention there is provided a method for detecting modulators of Notch or immune signalling comprising the steps of (in any order):

- (a) activating Notch signalling in a cell of the immune system;
- (b) contacting the cell with a candidate modulator of Notch or immune signalling;
- 10 (c) monitoring Notch or immune signalling; and
- (d) determining whether the candidate modulator modulates Notch or immune signalling.

According to a further aspect of the invention there is provided a method for detecting modulators of Notch or immune signalling comprising the steps of (in any order):

- 15 (a) activating a cell of the immune system;
- (b) contacting the cell with a candidate modulator of Notch or immune signalling;
- (c) monitoring Notch or immune signalling; and
- (d) determining whether the candidate modulator modulates Notch or immune
- 20 signalling.

According to a further aspect of the invention there is provided a method for detecting modulators of Notch or immune signalling comprising the steps of (in any order):

- (a) activating a cell of the immune system;
- 25 (b) activating Notch signalling in the cell;
- (c) contacting the cell with a candidate modulator of Notch or immune signalling;
- (d) monitoring Notch or immune signalling; and
- (e) determining whether the candidate modulator modulates Notch or immune
- 30 signalling.

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

5

According to a further aspect of the invention there is provided a method for detecting modulators of Notch signalling comprising the steps of (in any order):

- (a) activating Notch signalling in a cell of the immune system;
- (b) contacting the cell with a candidate modulator of Notch signalling;
- 5 (c) monitoring Notch or immune signalling; and
- (d) determining whether the candidate modulator modulates Notch or immune signalling.

According to a further aspect of the invention there is provided a method for detecting modulators of Notch signalling comprising the steps of (in any order):

- 10 (a) activating a cell of the immune system;
- (b) contacting the cell with a candidate modulator of Notch signalling;
- (c) monitoring Notch or immune signalling; and
- (d) determining whether the candidate modulator modulates Notch or immune
- 15 signalling.

According to a further aspect of the invention there is provided a method for detecting modulators of Notch signalling comprising the steps of (in any order):

- (a) activating a cell of the immune system;
- 20 (b) activating Notch signalling in the cell;
- (c) contacting the cell with a candidate modulator of Notch signalling;
- (d) monitoring Notch or immune signalling; and
- (e) determining whether the candidate modulator modulates Notch or immune

25

Suitably immune cell activation is at least 20%, preferably at least 70% optimal with respect to Notch or immune signalling.

The candidate modulator may be any organic or inorganic compound. Preferably the candidate modulator is selected from a group consisting of: small natural or synthetic

30

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

6

molecule compounds, a polypeptide, a polynucleotide, an antibody or a fragment of an antibody and a cytokine or a fragment of a cytokine.

5 In a preferred embodiment, the step of monitoring Notch signalling comprises the steps of monitoring levels of expression of at least one target gene. The target gene may be an endogenous target gene of the Notch signalling pathway or a reporter gene.

Known endogenous target genes of the Notch signalling pathway include Deltex, Hes-1, Hes-5, E(spl), Il-10, CD-23, Dlx-1, CTLA4, CD-4, Numb, Mastermind and Dsh.

10 Many reporter genes are standard in the art and include genes encoding an enzymatic activity, genes comprising a radiolabel or a fluorescent label and genes encoding a predetermined polypeptide epitope.

15 Preferably at least one target gene is under the transcriptional control of a promoter region sensitive to Notch signalling. Even more preferably, at least one target gene is under the transcriptional control of a promoter region sensitive to Notch signalling and a second signal, and/or a third signal wherein the second and third signals are different.

20 An example of a signal of use in the present invention is a signal that results from activation of a signalling pathway specific to cells of the immune system, such as a T cell receptor (TCR) signalling pathway, a B cell receptor (BCR) signalling pathway or a Toll-like receptor (TLR) signalling pathway, with or without an accessory signal (known in the art as costimulatory signals for T and B cell receptor signalling).

25 Another example of a signal of use in the present invention is a costimulus specific to cells of the immune system such as B7 proteins including B7.1-CD80, B7.2-CD86, B7H1, B7H2, B7H3, B7RP1, B7RP2, CTLA4, ICOS, CD2, CD24, CD27, CD28, CD30, CD34, CD38, CD40, CD44, CD45, CD49, CD69, CD70, CD95 (Fas), CD134, 30 CD134L, CD153, CD154, 4-1BB, 4-1BB-L, LFA-1, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, OX40, OX40L, TRANCE/RANK ligands, Fas ligand, MHC class II, DEC205-CD205,

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

7

CD204-Scavenger receptor, CD14, CD206 (mannose receptor), Toll-like receptors (TLR) such as TLR 1-9, CD207 (Langerin), CD209 (DC-SIGN), FC γ receptor 2 (CD32), CD64 (FC γ receptor 1), CD68, CD83, CD33, CD54, BDCA-2, BDCA-3, BDCA-4, chemokine receptors, cytokines, growth factors or growth factor receptor agonists, and variants, derivatives, analogues and fragments thereof.

In a preferred embodiment, the method of the present invention is carried out in a T cell or T cell progenitor or an antigen presenting cell (APC). APCs are cells which are capable of expressing MHC class II molecules and able to present antigens to CD4 $^{+}$ T cells. Preferably, the APC will be a myeloid lineage cell such as a dendritic cell, for example a Langerhans cell, a monocyte or macrophage or a primary cell or a B lineage cell.

Levels of expression of at least one target gene can be monitored with a protein or a nucleic acid assay.

In accordance with another aspect of the present invention there is provided a method for detecting modulators of Notch signalling comprising the steps of:

- (a) activating a cell of the immune system;
 - (b) contacting the cell with a candidate modulator;
 - (c) monitoring Notch signalling;
- (wherein steps (a), (b) and (c) can be carried out in any order); and
- (d) determining whether the candidate modulator modulates Notch signalling.

Suitably the expression of the at least one target gene is monitored with a protein or nucleic acid assay

Suitably the candidate modulator has a molecular weight of less than about 1000, suitably less than about 500.

Preferably the cell of the immune system is a T-cell or T-cell progenitor.

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

8

Preferably the T-cell is activated by activation of the T-cell receptor.

Preferably the T-cell receptor is activated with an antigen or antigenic determinant.

5

Preferably the T-cell receptor is activated by an anti-CD3 or anti-TCR antibody which are preferably bound to a support. Preferably the anti-CD3 or anti-TCR antibody is bound to a particulate support.

10 Preferably the T-cell is co-activated, suitably by activation of CD28.

Preferably the T-cell receptor is co-activated by an anti-CD28 antibody or CD28 ligand, such as an active domain of B7.

15 Preferably the T-cell is activated by an anti-CD3 antibody and co-activated by anti-CD28 antibody.

Alternatively the T-cell may be activated with a calcium ionophore or an activator of protein kinase C or MAP Kinase.

20

Suitably the immune cell may be transfected with an expression vector coding for Notch, a constitutively active truncated form of Notch or a Notch IC domain, an if desired a Notch reporter construct.

25 In an preferred embodiment the method comprises the steps of:

- i) activating Notch signalling in the immune cell with a further agent; and
- ii) determining whether the candidate modulator modulates such Notch signalling activation and/or immune cell activation.

30 In one embodiment Notch signalling may be activated with a Notch ligand or an active portion of a Notch ligand, for example a Notch ligand EC domain. Suitably the Notch ligand may be bound to a membrane or support.

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

9

According to a further aspect of the present invention there is provided a particle comprising an active portion of a Delta ligand bound to a particulate support matrix.

- 5 Preferably the particulate support matrix is a bead. The bead may be, for example, a magnetic bead (eg as available under the trade name "Dynal") or a polymeric bead such as a Sepharose bead. Suitably a plurality of active portions of a Delta ligand are bound to the particulate support matrix.
- 10 According to a yet further aspect of the present invention there is provided a modulator identifiable or identified by the method of the invention.

- According to yet another aspect of the present invention there is provided the use of a modulator according to the present invention in the preparation of a medicament for the
- 15 treatment of a disease or condition of, or related to the immune system. Preferably, the disease is a T-cell mediated disease.

- According to yet another aspect of the present invention there is provided a pharmaceutical composition comprising a therapeutically effective amount of at least
- 20 one modulator according to the invention and a pharmaceutically acceptable carrier, diluent and/or excipient.

- Preferably Notch signalling pathway is activated with an agent capable of activating a Notch receptor. Suitably the modulator is a Notch ligand or a biologically active
- 25 fragment or derivative of a Notch ligand. The Notch ligand may be soluble or presented on a cell or cell membrane, or bound to a support.

- Suitably the modulator of the Notch signalling pathway may comprise or code for a fusion protein. For example, the modulator may comprise or code for a fusion protein
- 30 comprising a segment of a Notch ligand extracellular domain and an immunoglobulin F_c segment.

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

10

Suitably the modulator of the Notch signalling pathway comprises or codes for a protein or polypeptide comprising a Notch ligand DSL domain and at least one EGF domain or a fragment, derivative, homologue, analogue or allelic variant thereof.

- 5 Preferably the modulator of the Notch signalling pathway comprises or codes for a Notch ligand DSL domain and at least 1 to 20, suitably at least 3 to 15, for example at least 3 to 8 EGF repeat motifs. Suitably the DSL and EGF sequences are or correspond to mammalian sequences. Preferred sequences include human sequences.
- 10 According to a further aspect of the invention there is provided a particle comprising protein comprising a Delta DSL domain and at least one Delta EGF domain bound to a particulate support matrix. Suitably the protein comprises a Delta extracellular domain or an active portion thereof bound to a particulate support matrix. In one embodiment the particulate support matrix is a bead. Preferably a plurality of such proteins are bound
- 15 to the particulate support matrix.

Alternatively or in addition the modulator of the Notch signalling pathway may comprise a Notch intracellular domain (Notch IC) or a fragment, derivative, homologue, analogue or allelic variant thereof, or a polynucleotide sequence which

20 codes for Notch intracellular domain or a fragment, derivative, homologue, analogue or allelic variant thereof.

Suitably the modulator of the Notch signalling pathway comprises Delta or a fragment, derivative, homologue, analogue or allelic variant thereof or a polynucleotide encoding

25 Delta or a fragment, derivative, homologue, analogue or allelic variant thereof.

Alternatively or in addition the modulator of the Notch signalling pathway may comprise Serrate/Jagged or a fragment, derivative, homologue, analogue or allelic variant thereof or a polynucleotide encoding Serrate/Jagged or a fragment, derivative,

30 homologue, analogue or allelic variant thereof.

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

11

Alternatively or in addition the modulator of the Notch signalling pathway may comprise Notch or a fragment, derivative, homologue, analogue or allelic variant thereof or a polynucleotide encoding Notch or a fragment, derivative, homologue, analogue or allelic variant thereof.

5

Alternatively or in addition the modulator of the Notch signalling pathway may comprise a dominant negative version of a Notch signalling repressor, or a polynucleotide which codes for a dominant negative version of a Notch signalling repressor.

10

Alternatively or in addition the modulator of the Notch signalling pathway may comprise a polypeptide capable of upregulating the expression or activity of a Notch ligand or a downstream component of the Notch signalling pathway, or a polynucleotide which codes for such a polypeptide.

15

Suitably the modulator of the Notch signalling pathway may comprise an antibody, antibody fragment or antibody derivative or a polynucleotide which codes for an antibody, antibody fragment or antibody derivative.

20

According to a further aspect of the invention there is provided a method for detecting genes which are upregulated in an immune cell in response to a combination of Notch signalling and immune cell activation comprising the steps of (in any order):

- (a) activating an immune cell;
- (b) activating Notch signalling in the cell;
- (c) monitoring gene expression; and
- (d) determining which genes are upregulated or downregulated.

25

According to a further aspect of the invention there is provided a method for detecting genes which are more significantly upregulated or downregulated in an immune cell in response to a combination of Notch signalling and immune cell activation than in

30

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

12

response to Notch signalling or immune cell activation alone comprising the steps of (in any order):

- (a) activating an immune cell;
- (b) activating Notch signalling in the cell;
- 5 (c) monitoring gene expression;
- (d) determining whether gene expression is upregulated or downregulated in the cell; and
- (e) comparing gene expression from step (d) with controls in which the cell is not activated or Notch signalling is not activated.

10

In one embodiment gene expression may be monitored using a microarray and preferably the immune cell is a T-cell.

According to a further aspect of the invention there is provided a gene detected by a
15 method as defined above.

According to a further aspect of the invention there is provided the use of a modulator of a gene as detected by a method described above for the treatment of an immune disorder.

20

According to a further aspect of the invention there is provided an assay comprising the steps of (in any order):

- (a) providing a culture of immune cells;
- (b) transfecting said cells with a Notch signalling reporter construct;
- 25 (c) optionally transfecting said cells with a nucleic acid coding for Notch, a constitutively active truncated form of Notch or a Notch IC domain;
- (d) optionally providing a Notch ligand;
- (e) exposing the cells to one or more compound(s) to be tested; and
- (f) determining the difference in Notch signalling between cells exposed to the
30 compound(s) to be tested and cells not so exposed.

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

13

According to a further aspect of the invention there is provided an assay comprising the steps of (in any order):

- 5 (a) providing a culture of immune cells;
(b) optionally transfecting said cells with a Notch signalling reporter construct;
(c) transfecting said cells with a nucleic acid coding for Notch, a constitutively active truncated form of Notch or a Notch IC domain;
(d) optionally providing a Notch ligand;
10 (e) exposing the cells to one or more compound(s) to be tested; and
(f) determining the difference in Notch signalling between cells exposed to the compound(s) to be tested and cells not so exposed.

Preferably the assay comprises the further step of activating the immune cell.

- 15 Suitablyly Notch signalling may be monitored by monitoring cytokine production, for example by monitoring IL-10, TNF, IFN, IL-5, or IL-13 production.

According to a further aspect of the invention there is provided an immune cell
20 transfected with:

- (i) a Notch signalling reporter construct; and
(ii) an expression vector coding for Notch, a constitutively active truncated form of Notch or a Notch IC domain.

25 According to a further aspect of the invention there is provided an immune cell transfected with:

- (i) a Notch signalling reporter construct; and
(ii) an expression vector coding for a constitutively active truncated form of Notch.

30 According to a further aspect of the invention there is provided an immune cell transfected with:

- (i) a Notch signalling reporter construct; and

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

14

(ii) an expression vector coding for a Notch IC domain.

Preferably the immune cell is stably transfected.

- 5 According to a further aspect of the invention there is provided a method for detecting modulators of Notch signalling comprising the steps of monitoring Notch signalling in a cell of the immune system in the presence and absence of a candidate modulator having a molecular weight of less than about 1000, and determining whether the candidate modulator modulates Notch signalling.

10

According to a further aspect of the invention there is provided a method for detecting modulators of Notch signalling comprising the steps of:

- (a) contacting a cell of the immune system with a candidate modulator having a molecular weight of less than about 1000;
- 15 (b) monitoring Notch signalling; and
- (c) determining whether the candidate modulator modulates Notch signalling.

Preferably the candidate modulator has a molecular weight of less than about 500.

20 **Detailed Description**

Various preferred features and embodiments of the present invention will now be described by way of non-limiting examples and with reference to the accompanying drawings in which:

25

Figure 1 and Figure 2 show schematic representations of the Notch signalling pathway;

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

15

Figure 3 shows a schematic representation of Notch and examples of immune cell signalling pathways which may be used in screening for immune cell modulators of Notch signalling;

Figures 4 to 6 show schematic representations of the assays of Examples 1 to 9;

5 Figure 7 shows the results of Example 3;

Figure 8 shows the results of Example 4;

Figure 9 shows the results of Example 5;

Figure 10 shows the results of Example 6;

Figure 11 shows the results of Example 7;

10 Figure 12 shows the results of Example 8;

Figure 13 shows the results of Example 10;

Figures 14-18 show the results of Example 11;

Figure 19 shows the results of Example 12;

Figure 20 shows the results of Example 13;

15 Figure 21 shows the results of Example 14;

Figures 22A & B, 23, 24A & B, 25 and 26 illustrate, and show, the results of Example 15;

Figures 27 and 28 show the results of Example 16;

Figure 29 shows the results of Example 17;

20 Figure 30 shows the results of Example 18;

Figure 31 shows schematic representations of the Notch ligands Jagged and Delta;

Figure 32 shows aligned amino acid sequences of DSL domains from various *Drosophila* and mammalian Notch ligands;

Figure 33 shows amino acid sequences of human Delta-1, Delta-3 and Delta-4;

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

16

Figure 34 shows amino acid sequences of human Jagged-1 and Jagged-2;

Figure 35 shows the amino acid sequence of human Notch1;

Figure 36 shows the amino acid sequence of human Notch2;

Figure 37 shows schematic representations of Notch 1-4; and

5 Figure 38 shows a schematic representation of Notch1C.

The practice of the present invention will employ, unless otherwise indicated, conventional techniques of chemistry, molecular biology, microbiology, recombinant DNA and immunology, which are within the capabilities of a person of ordinary skill in the art. Such techniques are explained in the literature. See, for example, J. Sambrook, E. F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Books 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F. M. et al. (1995 and periodic supplements; *Current Protocols in Molecular Biology*, ch. 9, 13, and 16, John Wiley & Sons, New York, N.Y.); B. Roe, J. Crabtree, and A. Kahn, 1996, *DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques*, John Wiley & Sons; J. M. Polak and James O'D. McGee, 1990, *In Situ Hybridization: Principles and Practice*, Oxford University Press; M. J. Gait (Editor), 1984, *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, Irl Press; and, D. M. J. Lilley and J. E. Dahlberg, 1992, *Methods of Enzymology: DNA Structure Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA* Methods in Enzymology, Academic Press. Each of these general
 10
 15
 20 texts is herein incorporated by reference.

The present invention relates to an assay method for detecting modulators of Notch signalling.

Notch Signalling

25 As used herein, the expression "Notch signalling" is synonymous with the expression "the Notch signalling pathway" and refers to any one or more of the upstream or downstream events that result in, or from, (and including) activation of the Notch

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

17

receptor.

Notch signalling directs binary cell fate decisions in the embryo. Notch was first described in *Drosophila* as a transmembrane protein that functions as a receptor for two different ligands, Delta and Serrate. Vertebrates express multiple Notch receptors and ligands. At least four Notch receptors (Notch-1, Notch-2, Notch-3 and Notch-4) have been identified to date in human cells.

Notch proteins are synthesized as single polypeptide precursors that undergo cleavage via a Furin-like convertase that yields two polypeptide chains that are further processed to form the mature receptor. The Notch receptor present in the plasma membrane comprises a heterodimer of two Notch proteolytic cleavage products, one comprising an N-terminal fragment consisting of a portion of the extracellular domain, the transmembrane domain and the intracellular domain, and the other comprising the majority of the extracellular domain. The proteolytic cleavage step of Notch to activate the receptor occurs and is mediated by a furin-like convertase.

Notch receptors are inserted into the membrane as disulphide-linked heterodimeric molecules consisting of an extracellular domain containing up to 36 epidermal growth factor (EGF)-like repeats and a transmembrane subunit that contains the cytoplasmic domain. The cytoplasmic domain of Notch contains six ankyrin-like repeats, a polyglutamine stretch (OPA) and a PEST sequence. A further domain termed RAM23 lies proximal to the ankyrin repeats and, like the ankyrin-like repeats, is involved in binding to a transcription factor, known as Suppressor of Hairless [Su(H)] in *Drosophila* and CBF1 in vertebrates (Tamura). The Notch ligands also display multiple EGF-like repeats in their extracellular domains together with a cysteine-rich DSL (Delta-Serrate Lag2) domain that is characteristic of all Notch ligands (Artavanis-Tsakonas).

The Notch receptor is activated by binding of extracellular ligands, such as Delta, Serrate and Scabrous, to the EGF-like repeats of Notch's extracellular domain. Delta requires cleavage for activation. It is cleaved by the ADAM disintegrin

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

18

metalloprotease Kuzbanian at the cell surface, the cleavage event releasing a soluble and active form of Delta. An oncogenic variant of the human Notch-1 protein, also known as TAN-1, which has a truncated extracellular domain, is constitutively active and has been found to be involved in T-cell lymphoblastic leukemias.

5

The cdc10/ankyrin intracellular-domain repeats mediate physical interaction with intracellular signal transduction proteins. Most notably, the cdc10/ankyrin repeats interact with Suppressor of Hairless [Su(H)]. Su(H) is the *Drosophila* homologue of C-promoter binding factor-1 [CBF-1], a mammalian DNA binding protein involved in the Epstein-
10 Barr virus-induced immortalization of B-cells. It has been demonstrated that, at least in cultured cells, Su(H) associates with the cdc10/ankyrin repeats in the cytoplasm and translocates into the nucleus upon the interaction of the Notch receptor with its ligand Delta on adjacent cells. Su(H) includes responsive elements found in the promoters of several genes and has been found to be a critical downstream protein in the Notch
15 signalling pathway. The involvement of Su(H) in transcription is thought to be modulated by Hairless.

The intracellular domain of Notch (NotchIC) also has a direct nuclear function (Lieber). Recent studies have indeed shown that Notch activation requires that the six
20 cdc10/ankyrin repeats of the Notch intracellular domain reach the nucleus and participate in transcriptional activation. The site of proteolytic cleavage on the intracellular tail of Notch has been identified between gly1743 and val1744 (termed site 3, or S3) (Schroeter). It is thought that the proteolytic cleavage step that releases the NotchIC for nuclear entry is dependent on Presenilin activity.

25

The intracellular domain has been shown to accumulate in the nucleus where it forms a transcriptional activator complex with the CSL family protein CBF1 (suppressor of hairless, Su(H) in *Drosophila*, Lag-2 in *C. elegans*) (Schroeter; Struhl). The NotchIC-CBF1 complexes then activate target genes, such as the bHLH proteins HES (hairy-
30 enhancer of split like) 1 and 5 (Weinmaster). This nuclear function of Notch has also been shown for the mammalian Notch homologue (Lu).

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

19

NotchIC processing occurs only in response to binding of Notch ligands Delta or Serrate/Jagged. The post-translational modification of the nascent Notch receptor in the Golgi (Munro; Ju) appears, at least in part, to control which of the two types of
5 ligand it interacts with on a cell surface. The Notch receptor is modified on its extracellular domain by Fringe, a glycosyl transferase enzyme that binds to the Notch/Lin motif. Fringe modifies Notch by adding O-linked fucose groups to the EGF-like repeats (Moloney; Bruckner). This modification by Fringe does not prevent ligand binding, but may influence ligand induced conformational changes in Notch.
10 Furthermore, recent studies suggest that the action of Fringe modifies Notch to prevent it from interacting functionally with Serrate/Jagged ligands but allow it to preferentially interact with Delta (Panin; Hicks). Although *Drosophila* has a single Fringe gene, vertebrates are known to express multiple genes (Radical, Manic and Lunatic Fringes) (Irvine).

15 Thus, signal transduction from the Notch receptor can occur via different pathways. The better defined pathway involves proteolytic cleavage of the intracellular domain of Notch (NotchIC) that translocates to the nucleus and forms a transcriptional activator complex with the CSL family protein CBF1 (suppressor of hairless, Su(H) in
20 *Drosophila*, Lag-2 in *C. elegans*). NotchIC-CBF1 complexes then activate target genes, such as the bHLH proteins HES (hairy-enhancer of split like) 1 and 5. Notch can also signal in a CBF1-independent manner that involves the cytoplasmic zinc finger containing protein Deltex (Figure 3). Unlike CBF1, Deltex does not move to the nucleus following Notch activation but instead can interact with Grb2 and modulate
25 the Ras-Jnk signalling pathway.

As described above, several endogenous modulators of Notch are already known. These include, for example, the Notch ligands Delta and Serrate. An aim of the present invention is the detection of novel Notch signalling modulators.

30

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

20

Candidate Modulators

The term "modulate" as used herein refers to a change or alteration in the biological activity of the Notch signalling pathway or a target signalling pathway thereof. The term "modulator" may refer to antagonists or inhibitors of Notch signalling, i.e. compounds which block, at least to some extent, the normal biological activity of the Notch signalling pathway. Conveniently such compounds may be referred to herein as inhibitors or antagonists. Alternatively, the term "modulator" may refer to agonists of Notch signalling, i.e. compounds which stimulate or upregulate, at least to some extent, the normal biological activity of the Notch signalling pathway. Conveniently such compounds may be referred to as upregulators or agonists.

The term "candidate modulator" is used to describe any one or more molecule(s) which may be, or is suspected of being, capable of functioning as a modulator of Notch signalling. Said molecules may for example be organic "small molecules" or polypeptides. Suitably, candidate molecules comprise a plurality of, or a library of such molecules or polypeptides. These molecules may be derived from known modulators. "Derived from" means that the candidate modulator molecules preferably comprise polypeptides which have been fully or partially randomised from a starting sequence which is a known modulator of Notch signalling. Most preferably, candidate molecules comprise polypeptides which are at least 40% homologous, more preferably at least 60% homologous, even more preferably at least 75% homologous or even more, for example 85 %, or 90 %, or even more than 95% homologous to one or more known Notch modulator molecules, using the BLAST algorithm with the parameters as defined herein.

The candidate modulator of the present invention may be an organic compound or other chemical. In this embodiment, the candidate modulator will be an organic compound comprising two or more hydrocarbyl groups. Here, the term "hydrocarbyl group" means a group comprising at least C and H and may optionally comprise one or more other suitable substituents. Examples of such substituents may include halo-, alkoxy-, nitro-, an alkyl group, a cyclic group etc. In addition to the possibility of the

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

21

substituents being a cyclic group, a combination of substituents may form a cyclic group. If the hydrocarbyl group comprises more than one C then those carbons need not necessarily be linked to each other. For example, at least two of the carbons may be linked *via* a suitable element or group. Thus, the hydrocarbyl group may contain

5 hetero atoms. Suitable hetero atoms will be apparent to those skilled in the art and include, for instance, sulphur, nitrogen and oxygen. The candidate modulator may comprise at least one cyclic group. The cyclic group may be a polycyclic group, such as a non-fused polycyclic group. For some applications, the agent comprises at least the one of said cyclic groups linked to another hydrocarbyl group.

10

In one preferred embodiment, the candidate compound will be an amino acid sequence or a chemical derivative thereof, or a combination thereof. In another preferred embodiment, the candidate compound will be a nucleotide sequence, which may be a sense sequence or an anti-sense sequence. The candidate modulator may also be an

15 antibody.

The term "antibody" includes intact molecules as well as fragments thereof, such as Fab, F(ab')₂, Fv and scFv which are capable of binding the epitopic determinant. These antibody fragments retain some ability to selectively bind with its antigen or

20 receptor and include, for example:

(i) Fab, the fragment which contains a monovalent antigen-binding fragment of an antibody molecule can be produced by digestion of whole antibody with the enzyme papain to yield an intact light chain and a portion of one heavy chain;

25

(ii) Fab', the fragment of an antibody molecule can be obtained by treating whole antibody with pepsin, followed by reduction, to yield an intact light chain and a portion of the heavy chain; two Fab' fragments are obtained per antibody molecule;

(iii) F(ab')₂, the fragment of the antibody that can be obtained by treating whole antibody with the enzyme pepsin without subsequent reduction; F(ab')₂ is a dimer of two Fab' fragments held together by two disulfide bonds;

30

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

22

(iv) scFv, including a genetically engineered fragment containing the variable region of a heavy and a light chain as a fused single chain molecule..

- 5 General methods of making these fragments are known in the art. (See for example, Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1988), which is incorporated herein by reference).

Modulators may be synthetic compounds or natural isolated compounds.

10

By a protein which is for Notch signalling transduction is meant a molecule which participates in signalling through Notch receptors including activation of Notch, the downstream events of the Notch signalling pathway, transcriptional regulation of downstream target genes and other non-transcriptional downstream events (e.g. post-translational modification of existing proteins). More particularly, the protein is a

15 domain that allows activation of target genes of the Notch signalling pathway, or a polynucleotide sequence which codes therefor.

- A very important component of the Notch signalling pathway is Notch receptor/Notch
- 20 ligand interaction. Thus Notch signalling may involve changes in expression, nature, amount or activity of Notch ligands or receptors or their resulting cleavage products. In addition, Notch signalling may involve changes in expression, nature, amount or activity of Notch signalling pathway membrane proteins or G-proteins or Notch signalling pathway enzymes such as proteases, kinases (e.g. serine/threonine kinases),
- 25 phosphatases, ligases (e.g. ubiquitin ligases) or glycosyltransferases. Alternatively the signalling may involve changes in expression, nature, amount or activity of DNA binding elements such as transcription factors.

- In the present invention Notch signalling means specific signalling, meaning that the
- 30 signal detected results substantially or at least predominantly from the Notch signalling pathway, and preferably from Notch/Notch ligand interaction, rather than any other significant interfering or competing cause, such as cytokine signalling. In one

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

23

embodiment the term "Notch signalling" excludes cytokine signalling. The Notch signalling pathway is described in more detail below.

5 Proteins or polypeptides may be in the form of the "mature" protein or may be a part of a larger protein such as a fusion protein or precursor. For example, it is often advantageous to include an additional amino acid sequence which contains secretory or leader sequences or pro-sequences (such as a HIS oligomer, immunoglobulin Fc, glutathione S-transferase, FLAG etc) to aid in purification. Likewise such an additional sequence may sometimes be desirable to provide added stability during
10 recombinant production. In such cases the additional sequence may be cleaved (eg chemically or enzymatically) to yield the final product. In some cases, however, the additional sequence may also confer a desirable pharmacological profile (as in the case of IgFc fusion proteins) in which case it may be preferred that the additional sequence is not removed so that it is present in the final product as administered.

15 In one embodiment the Notch ligand which activates Notch may be expressed on a cell or cell membrane, suitably derived from a cell.

Candidate modulators may be synthetic compounds or natural isolated compounds.
20 Various examples of such synthetic or natural modulators are listed below.

Candidate modulators: antagonists

25 Antagonists of Notch signalling will include any molecule which is capable of inhibiting Notch, the Notch signalling pathway or any one or more of the components of the Notch signalling pathway.

Candidate modulators for Notch signalling inhibition may be dominant negative versions of a compound capable of activating or transducing Notch signalling.
30 Alternatively, the candidate modulator of Notch signalling will be capable of repressing a compound capable of activating or transducing Notch signalling. In a further alternative embodiment, the modulator will be an inhibitor of Notch signalling.

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

24

In a particular embodiment, the modulator will be capable of reducing or preventing Notch or Notch ligand expression. Such a modulator may be a nucleic acid sequence capable of reducing or preventing Notch or Notch ligand expression. Endogenous such modulators include nucleic acid sequences encoding a polypeptide selected from Toll-like receptor protein family, a cytokine such as IL-12, IFN- γ , TNF- α , or a growth factor such as a bone morphogenetic protein (BMP), a BMP receptor and activins. Candidate modulators will include derivatives, fragments, variants, mimetics, analogues and homologues of any of the above.

10 In a preferred embodiment, the modulator will be a polypeptide, or a polynucleotide encoding such a polypeptide, that decreases or interferes with the production of compounds that are capable of producing an increase in the expression of Notch ligand. Endogenous compounds of this type include Noggin, Chordin, Follistatin, Xnr3, 15 fibroblast growth factors. Candidate modulators will include derivatives, fragments, variants, mimetics, analogues and homologues of any of the above.

Alternatively, the candidate modulator will be an antisense construct derived from a sense nucleotide sequence encoding a polypeptide selected from a Notch ligand and a 20 polypeptide capable of up-regulating Notch ligand expression, such as Noggin, Chordin, Follistatin, Xnr3, fibroblast growth factors and derivatives, fragments, variants, mimetics, analogues and homologues thereof.

In another preferred embodiment the candidate modulator for Notch signalling inhibition 25 will be a molecule which is capable of modulating Notch-Notch ligand interactions. A molecule may be considered to modulate Notch-Notch ligand interactions if it is capable of inhibiting the interaction of Notch with its ligands, preferably to an extent sufficient to provide therapeutic efficacy. In this embodiment the modulator may be a polypeptide, or a polynucleotide encoding such a polypeptide, selected from a Toll-like receptor, a 30 cytokine such as IL-12, IFN- γ , TNF- α , or a growth factor such as a BMP, a BMP receptor and activins, derivatives, fragments, variants, mimetics, homologues and analogues thereof. Preferably the modulator will decrease or interfere with the

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

25

production of an agent that is capable of producing an increase in the expression of Notch ligand, such as Noggin, Chordin, Follistatin, Xnr3, fibroblast growth factors and derivatives, fragments, variants, mimetics homologues and analogues thereof.

- 5 Preferably when the modulator is a receptor or a nucleic acid sequence encoding a receptor, the receptor is activated. Thus, for example, when the modulator is a nucleic acid sequence, the receptor is constitutively active when expressed.

- Modulators for Notch signalling inhibition also include downstream modulators of the Notch signalling pathway (such as Dsh, Numb and derivatives, fragments, variants, mimetics, homologues and analogues thereof), compounds that prevent expression of Notch target genes or induce expression of genes repressed by the Notch signalling pathway and dominant negative versions of Notch signalling transducer molecules (such as of Notch1C, Deltex and derivatives, fragments, variants, mimetics, homologues and analogues thereof). Proteins for Notch signalling inhibition will also include variants of the wild-type components of the Notch signalling pathway which have been modified in such a way that their presence blocks rather than transduces the signalling pathway. An example of such a modulator would be a Notch receptor which has been modified such that proteolytic cleavage of its intracellular domain is no longer possible.
- 10
15
20

Candidate modulators: agonists

- Agonists of Notch signalling will include any molecule which is capable of up-regulating Notch, the Notch signalling pathway or any one or more of the components of the Notch signalling pathway. Candidate modulators for up-regulating the Notch signalling pathway include compounds capable of transducing or activating the Notch signalling pathway.
- 25
- 30 Modulators for Notch signalling transduction will include molecules which participate in signalling through Notch receptors including activation of Notch, the downstream events of the Notch signalling pathway, transcriptional regulation of downstream

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

26

target genes and other non-transcriptional downstream events (e.g. post-translational modification of existing proteins). More particularly, such modulators will allow activation of target genes of the Notch signalling pathway.

5 According to one aspect of the present invention the modulator may be the Notch polypeptide or polynucleotide or a fragment, variant, derivative, mimetic or homologue thereof which retains the signalling transduction ability of Notch or an analogue of Notch which has the signalling transduction ability of Notch. By Notch, we mean Notch-1, Notch-2, Notch-3, Notch-4 and any other Notch homologues or
10 analogues. Analogues of Notch include proteins from the Epstein Barr virus (EBV), such as EBNA2, BARF0 or LMP2A. In a particularly preferred embodiment the modulator may be the Notch intracellular domain (Notch IC) or a sub-fragment, variant, derivative, mimetic, analogue or homologue thereof.

15 Modulators for Notch signalling activation include molecules which are capable of activating Notch, the Notch signalling pathway or any one or more of the components of the Notch signalling pathway.

Such a modulator may be a dominant negative version of a Notch signalling repressor.

20 In an alternative embodiment, the modulator will be capable of inhibiting a Notch signalling repressor. In a further alternative embodiment, the modulator for Notch signalling activation will be a positive activator of Notch signalling.

In a particular embodiment, the modulator will be capable of inducing or increasing

25 Notch or Notch ligand expression. Such a molecule may be a nucleic acid sequence capable of inducing or increasing Notch or Notch ligand expression.

In one embodiment, the modulator will be capable of up-regulating expression of the endogenous genes encoding Notch or Notch ligands in target cells. In particular, the

30 modulator may be an immunosuppressive cytokine capable of up-regulating the expression of endogenous Notch or Notch ligands in target cells, or a polynucleotide which encodes such a cytokine. Immunosuppressive cytokines include IL-4, IL-10, IL-

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

27

13, TGF- β and FLT3 ligand. Candidate modulators will therefore further include fragments, derivatives, variants, mimetics, analogues and homologues of any of the above.

- 5 Endogenous agonists include Noggin, Chordin, Follistatin, Xnr3, fibroblast growth factors. Candidate modulators may therefore include derivatives, fragments, variants, mimetics, analogues and homologues thereof, or a polynucleotide encoding any one or more of the above.
- 10 In another embodiment, the modulator may be a Notch ligand, or a polynucleotide encoding a Notch ligand. Notch ligands will typically be capable of binding to a Notch receptor polypeptide present in the membrane of a variety of mammalian cells, for example hemapoietic stem cells. Particular examples of mammalian Notch ligands identified to date include the Delta family, for example Delta or Delta-like 1 (Genbank
- 15 Accession No. AF003522 - *Homo sapiens*), Delta-3 (Genbank Accession No. AF084576 - *Rattus norvegicus*) and Delta-like 3 (*Mus musculus*) (Genbank Accession No. NM_016941 - *Homo sapiens*) and US 6121045 (Millennium), Delta-4 (Genbank Accession Nos. AB043894 and AF 253468 - *Homo sapiens*) and the Serrate family, for example Serrate-1 and Serrate-2 (WO97/01571, WO96/27610 and WO92/19734),
- 20 Jagged-1 (Genbank Accession No. U73936 - *Homo sapiens*) and Jagged-2 (Genbank Accession No. AF029778 - *Homo sapiens*), and LAG-2. Homology between family members is extensive.

- In a preferred embodiment, the modulator will be a constitutively active Notch
- 25 receptor or Notch intracellular domain, or a polynucleotide encoding such a receptor or intracellular domain.

- In an alternative embodiment, the modulator of Notch signalling will act downstream of the Notch receptor. Thus, for example, the activator of Notch signalling may be a
- 30 constitutively active Deltex polypeptide or a polynucleotide encoding such a polypeptide. Other endogenous downstream components of the Notch signalling pathway include Deltex-1, Deltex-2, Deltex-3, Suppressor of Deltex (SuDx), Numb

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

28

and isoforms thereof, Numb associated Kinase (NAK), Notchless, Dishevelled (Dsh), emb5, Fringe genes (such as Radical, Lunatic and Manic), PON, LNX, Disabled, Numbllike, Nur77, NFkB2, Mirror, Warthog, Engrailed-1 and Engrailed-2, Lip-1 and homologues thereof, the polypeptides involved in the Ras/MAPK cascade modulated
 5 by Deltex, polypeptides involved in the proteolytic cleavage of Notch such as Presenilin and polypeptides involved in the transcriptional regulation of Notch target genes. Candidate modulators of use in the present invention will therefore include constitutively active forms of any of the above, analogues, homologues, derivatives, variants, mimetics and fragments thereof.

10 Modulators for Notch signalling activation may also include any polypeptides expressed as a result of Notch activation and any polypeptides involved in the expression of such polypeptides, or polynucleotides encoding for such polypeptides.

15 Activation of Notch signalling may also be achieved by repressing inhibitors of the Notch signalling pathway. As such, candidate modulators will include molecules capable of repressing any Notch signalling inhibitors. Preferably the molecule will be a polypeptide, or a polynucleotide encoding such a polypeptide, that decreases or interferes with the production or activity of compounds that are capable of producing
 20 an decrease in the expression or activity of Notch, Notch ligands, or any downstream components of the Notch signalling pathway. In a preferred embodiment, the modulators will be capable of repressing polypeptides of the Toll-like receptor protein family, cytokines such as IL-12, IFN- γ , TNF- α , and growth factors such as the bone morphogenetic protein (BMP), BMP receptors and activins.

25

Polypeptides and Polynucleotides for Notch Signalling Transduction

The Notch signalling pathway directs binary cell fate decisions in the embryo. Notch was first described in *Drosophila* as a transmembrane protein that functions as a
 30 receptor for two different ligands, Delta and Serrate. Vertebrates express multiple Notch receptors and ligands (discussed below). At least four Notch receptors (Notch-1, Notch-2, Notch-3 and Notch-4) have been identified to date in human cells (see for

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

29

example GenBank Accession Nos. AF308602, AF308601 and U95299 - *Homo sapiens*).

5 Notch proteins are synthesized as single polypeptide precursors that undergo cleavage via a Furin-like convertase that yields two polypeptide chains that are further processed to form the mature receptor. The Notch receptor present in the plasma membrane comprises a heterodimer of two Notch proteolytic cleavage products, one comprising an N-terminal fragment consisting of a portion of the extracellular domain, the transmembrane domain and the intracellular domain, and the other comprising the majority of the extracellular domain. The proteolytic cleavage step of Notch to activate the receptor occurs in the Golgi apparatus and is mediated by a furin-like convertase.

15 Notch receptors are inserted into the membrane as disulphide-linked heterodimeric molecules consisting of an extracellular domain containing up to 36 epidermal growth factor (EGF)-like repeats [Notch 1/2 = 36, Notch 3 = 34 and Notch 4 = 29], 3 Cysteine Rich Repeats (Lin-Notch (L/N) repeats) and a transmembrane subunit that contains the cytoplasmic domain. The cytoplasmic domain of Notch contains six ankyrin-like repeats, a polyglutamine stretch (OPA) and a PEST sequence. A further domain termed RAM23 lies proximal to the ankyrin repeats and is involved in binding to a transcription factor, known as Suppressor of Hairless [Su(H)] in *Drosophila* and CBF1 in vertebrates (Tamura). The Notch ligands also display multiple EGF-like repeats in their extracellular domains together with a cysteine-rich DSL (Delta-Serrate Lag2) domain that is characteristic of all Notch ligands (Artavanis-Tsakonas).

25 The Notch receptor is activated by binding of extracellular ligands, such as Delta, Serrate and Scabrous, to the EGF-like repeats of Notch's extracellular domain. Delta requires cleavage for activation. It is cleaved by the ADAM disintegrin metalloprotease Kuzbanian at the cell surface, the cleavage event releasing a soluble and active form of Delta. An oncogenic variant of the human Notch-1 protein, also known as TAN-1, which has a truncated extracellular domain, is constitutively active and has been found to be involved in T-cell lymphoblastic leukemias.

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

30

The cdc10/ankyrin intracellular-domain repeats mediate physical interaction with intracellular signal transduction proteins. Most notably, the cdc10/ankyrin repeats interact with Suppressor of Hairless [Su(H)]. Su(H) is the *Drosophila* homologue of C-promoter binding factor-1 [CBF-1], a mammalian DNA binding protein involved in the Epstein-Barr virus-induced immortalization of B-cells. It has been demonstrated that, at least in cultured cells, Su(H) associates with the cdc10/ankyrin repeats in the cytoplasm and translocates into the nucleus upon the interaction of the Notch receptor with its ligand Delta on adjacent cells. Su(H) includes responsive elements found in the promoters of several genes and has been found to be a critical downstream protein in the Notch signalling pathway. The involvement of Su(H) in transcription is thought to be modulated by Hairless.

The intracellular domain of Notch (NotchIC) also has a direct nuclear function (Lieber). Recent studies have indeed shown that Notch activation requires that the six cdc10/ankyrin repeats of the Notch intracellular domain reach the nucleus and participate in transcriptional activation. The site of proteolytic cleavage on the intracellular tail of Notch has been identified between gly1743 and val1744 (termed site 3, or S3) (Schroeter). It is thought that the proteolytic cleavage step that releases the cdc10/ankyrin repeats for nuclear entry is dependent on Presenilin activity.

The intracellular domain has been shown to accumulate in the nucleus where it forms a transcriptional activator complex with the CSL family protein CBF1 (suppressor of hairless, Su(H) in *Drosophila*, Lag-2 in *C. elegans*) (Schroeter; Struhl). The NotchIC-CBF1 complexes then activate target genes, such as the bHLH proteins HES (hairly-enhancer of split like) 1 and 5 (Weinmaster). This nuclear function of Notch has also been shown for the mammalian Notch homologue (Lu).

S3 processing occurs only in response to binding of Notch ligands Delta or Serrate/Jagged. The post-translational modification of the nascent Notch receptor in the Golgi (Munro; Ju) appears, at least in part, to control which of the two types of ligand is expressed on a cell surface. The Notch receptor is modified on its

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

31

extracellular domain by Fringe, a glycosyl transferase enzyme that binds to the Lin/Notch motif. Fringe modifies Notch by adding *O*-linked fucose groups to the EGF-like repeats (Moloney; Bruckner). This modification by Fringe does not prevent ligand binding, but may influence ligand induced conformational changes in Notch.

5 Furthermore, recent studies suggest that the action of Fringe modifies Notch to prevent it from interacting functionally with Serrate/Jagged ligands but allow it to preferentially bind Delta (Panin; Hicks). Although *Drosophila* has a single Fringe gene, vertebrates are known to express multiple genes (Radical, Manic and Lunatic Fringes) (Irvine).

10

Signal transduction from the Notch receptor can occur via two different pathways (Figure 1). The better defined pathway involves proteolytic cleavage of the intracellular domain of Notch (Notch IC) that translocates to the nucleus and forms a transcriptional activator complex with the CSL family protein CBF1 (suppressor of

15 Hairless, Su(H) in *Drosophila*, Lag-2 in *C. elegans*). NotchIC-CBF1 complexes then activate target genes, such as the bHLH proteins HES (hairly-enhancer of split like) 1 and 5. Notch can also signal in a CBF1-independent manner that involves the cytoplasmic zinc finger containing protein Deltx. Unlike CBF1, Deltx does not move to the nucleus following Notch activation but instead can interact with Grb2 and

20 modulate the Ras-JNK signalling pathway.

Thus, signal transduction from the Notch receptor can occur via two different pathways both of which are illustrated in Figure 1. Target genes of the Notch signalling pathway include Deltx, genes of the Hes family (Hes-1 in particular),

25 Enhancer of Split [E(spl)] complex genes, IL-10, CD-23, CD-4 and Dll-1.

Deltx, an intracellular docking protein, replaces Su(H) as it leaves its site of interaction with the intracellular tail of Notch. Deltx is a cytoplasmic protein containing a zinc-finger (Artavanis-Tsakonas; Osborne). It interacts with the ankyrin repeats of the

30 Notch intracellular domain. Studies indicate that Deltx promotes Notch pathway activation by interacting with Grb2 and modulating the Ras-JNK signalling pathway (Matsuno). Deltx also acts as a docking protein which prevents Su(H) from binding

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

32

to the intracellular tail of Notch (Matsuno). Thus, Su(H) is released into the nucleus where it acts as a transcriptional modulator. Recent evidence also suggests that, in a vertebrate B-cell system, Deltex, rather than the Su(H) homologue CBF1, is responsible for inhibiting E47 function (Ordentlich). Expression of Deltex is upregulated as a result of Notch activation in a positive feedback loop. The sequence of Homo sapiens Deltex (DTX1) mRNA may be found in GenBank Accession No. AF053700.

Hes-1 (Hairy-enhancer of Split-1) (Takebayashi) is a transcriptional factor with a basic helix-loop-helix structure. It binds to an important functional site in the CD4 silencer leading to repression of CD4 gene expression. Thus, Hes-1 is strongly involved in the determination of T-cell fate. Other genes from the Hes family include Hes-5 (mammalian Enhancer of Split homologue), the expression of which is also upregulated by Notch activation, and Hes-3. Expression of Hes-1 is upregulated as a result of Notch activation. The sequence of Mus musculus Hes-1 can be found in GenBank Accession No. D16464.

The E(spl) gene complex [E(spl)-C] (Leimeister) comprises seven genes of which only E(spl) and Groucho show visible phenotypes when mutant. E(spl) was named after its ability to enhance Split mutations, Split being another name for Notch. Indeed, E(spl)-C genes repress Delta through regulation of achaete-scute complex gene expression. Expression of E(spl) is upregulated as a result of Notch activation.

Interleukin-10 (IL-10) was first characterised in the mouse as a factor produced by Th2 cells which was able to suppress cytokine production by Th1 cells. It was then shown that IL-10 was produced by many other cell types including macrophages, keratinocytes, B cells, Th0 and Th1 cells. It shows extensive homology with the Epstein-Barr bcrf1 gene which is now designated viral IL-10. Although a few immunostimulatory effects have been reported, it is mainly considered as an immunosuppressive cytokine. Inhibition of T cell responses by IL-10 is mainly mediated through a reduction of accessory functions of antigen presenting cells. IL-10 has notably been reported to suppress the production of numerous pro-inflammatory

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

33

cytokines by macrophages and to inhibit co-stimulatory molecules and MHC class II expression. IL-10 also exerts anti-inflammatory effects on other myeloid cells such as neutrophils and eosinophils. On B cells, IL-10 influences isotype switching and proliferation. More recently, IL-10 was reported to play a role in the induction of
 5 regulatory T cells and as a possible mediator of their suppressive effect. Although it is not clear whether it is a direct downstream target of the Notch signalling pathway, its expression has been found to be strongly up-regulated coincident with Notch activation. The mRNA sequence of IL-10 may be found in GenBank ref. No. GI1041812.

10 CD-23 is the human leukocyte differentiation antigen CD23 (FCE2) which is a key molecule for B-cell activation and growth. It is the low-affinity receptor for IgE. Furthermore, the truncated molecule can be secreted, then functioning as a potent mitogenic growth factor. The sequence for CD-23 may be found in GenBank ref. No. GI1783344.

15 Dlx-1 (distalless-1) (McGuiness) expression is downregulated as a result of Notch activation. Sequences for Dlx genes may be found in GenBank Accession Nos. U51000-3.

20 CD-4 expression is downregulated as a result of Notch activation. A sequence for the CD-4 antigen may be found in GenBank Accession No. XM006966.

Other genes involved in the Notch signaling pathway, such as Numb, Mastermind and Dsh, and all genes the expression of which is modulated by Notch activation, are
 25 included in the scope of this invention.

Polypeptides and Polynucleotides for Notch Signalling Activation

Examples of mammalian Notch ligands identified to date include the Delta family, for

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

34

example Delta-1 (Genbank Accession No. AF003522 - *Homo sapiens*), Delta-3 (Genbank Accession No. AF084576 - *Rattus norvegicus*) and Delta-like 3 (*Mus musculus*), the Serrate family, for example Serrate-1 and Serrate-2 (WO97/01571, WO96/27610 and WO92/19734), Jagged-1 and Jagged-2 (Genbank Accession No. AF029778 - *Homo sapiens*), and LAG-2. Homology between family members is extensive. For example, human Jagged-2 has 40.6% identity and 58.7% similarity to Serrate.

Further homologues of known mammalian Notch ligands may be identified using standard techniques. By a "homologue" it is meant a gene product that exhibits sequence homology, either amino acid or nucleic acid sequence homology, to any one of the known Notch ligands, for example as mentioned above. Typically, a homologue of a known Notch ligand will be at least 20%, preferably at least 30%, identical at the amino acid level to the corresponding known Notch ligand over a sequence of at least 10, preferably at least 20, preferably at least 50, suitably at least 100 amino acids, or over the entire length of the Notch ligand. Techniques and software for calculating sequence homology between two or more amino acid or nucleic acid sequences are well known in the art (see for example <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> and Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology (1995), John Wiley & Sons, Inc.)

Notch ligands identified to date have a diagnostic DSL domain (D, Delta, S, Serrate, L, Lag2) comprising 20 to 22 amino acids at the amino terminus of the protein and up to 14 or more EGF-like repeats on the extracellular surface. It is therefore preferred that homologues of Notch ligands also comprise a DSL domain at the N-terminus and up to 14 or more EGF-like repeats on the extracellular surface.

In addition, suitable homologues will be capable of binding to a Notch receptor. Binding may be assessed by a variety of techniques known in the art including *in vitro* binding assays.

Homologues of Notch ligands can be identified in a number of ways, for example by probing genomic or cDNA libraries with probes comprising all or part of a nucleic acid

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

35

encoding a Notch ligand under conditions of medium to high stringency (for example 0.03M sodium chloride and 0.03M sodium citrate at from about 50°C to about 60°C). Alternatively, homologues may also be obtained using degenerate PCR which will generally use primers designed to target sequences within the variants and homologues
5 encoding conserved amino acid sequences. The primers will contain one or more degenerate positions and will be used at stringency conditions lower than those used for cloning sequences with single sequence primers against known sequences.

Polypeptide substances may be purified from mammalian cells, obtained by recombinant expression in suitable host cells or obtained commercially. Alternatively,
10 nucleic acid constructs encoding the polypeptides may be used. As a further example, overexpression of Notch or Notch ligand, such as Delta or Serrate, may be brought about by introduction of a nucleic acid construct capable of activating the endogenous gene, such as the Serrate or Delta gene. In particular, gene activation can be achieved
15 by the use of homologous recombination to insert a heterologous promoter in place of the natural promoter, such as the Serrate or Delta promoter, in the genome of the target cell.

The activating molecule of the present invention may, in an alternative embodiment,
20 be capable of modifying Notch-protein expression or presentation on the cell membrane or signalling pathways. Agents that enhance the presentation of a fully functional Notch-protein on the target cell surface include matrix metalloproteinases such as the product of the Kuzbanian gene of *Drosophila* (Dkuz) and other ADAMALYSIN gene family members.

25

Polypeptides and Polynucleotides for Notch Signalling Inhibition

Suitable nucleic acid sequences may include anti-sense constructs, for example nucleic acid sequences encoding antisense Notch ligand constructs as well as antisense
30 constructs designed to reduce or inhibit the expression of upregulators of Notch ligand expression (see above). The antisense nucleic acid may be an oligonucleotide such as a

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

36

synthetic single-stranded DNA. However, more preferably, the antisense is an antisense RNA produced in the patient's own cells as a result of introduction of a genetic vector. The vector is responsible for production of antisense RNA of the desired specificity on introduction of the vector into a host cell.

5

Preferably, the nucleic acid sequence for use in the present invention is capable of inhibiting Serrate and Delta, preferably Serrate 1 and Serrate 2 as well as Delta 1, Delta 3 and Delta 4 expression in APCs such as dendritic cells. In particular, the nucleic acid sequence may be capable of inhibiting Serrate expression but not Delta expression, or Delta but not Serrate expression in APCs or T cells. Alternatively, the nucleic acid sequence for use in the present invention is capable of inhibiting Delta expression in T cells such as CD4⁺ helper T cells or other cells of the immune system that express Delta (for example in response to stimulation of cell surface receptors). In particular, the nucleic acid sequence may be capable of inhibiting Delta expression but not Serrate expression in T cells. In a particularly preferred embodiment, the nucleic acid sequence is capable of inhibiting Notch ligand expression in both T cells and APC, for example Serrate expression in APCs and Delta expression in T cells.

10

15

Molecules for inhibition of Notch signalling will also include polypeptides, or polynucleotides which encode therefore, capable of modifying Notch-protein expression or presentation on the cell membrane or signalling pathways. Molecules that reduce or interfere with its presentation as a fully functional cell membrane protein may include MMP inhibitors such as hydroxymate-based inhibitors.

20

Other substances which may be used to reduce interaction between Notch and Notch ligands are exogenous Notch or Notch ligands or functional derivatives thereof. Such Notch ligand derivatives would preferably have the DSL domain at the N-terminus and up to about 14 or more, for example between about 3 to 8 EGF-like repeats on the extracellular surface. A peptide corresponding to the Delta/Serrate/LAG-2 domain of hJagged1 and supernatants from COS cells expressing a soluble form of the extracellular portion of hJagged1 was found to mimic the effect of Jagged1 in inhibiting Notch1 (Li).

25

30

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

37

Other Notch signalling pathway antagonists include antibodies which inhibit interactions between components of the Notch signalling pathway, e.g. antibodies to Notch ligands.

5

Whether a substance can be used for modulating Notch-Notch ligand expression may be determined using suitable screening assays.

- 10 Notch signalling can be monitored either through protein assays or through nucleic acid assays. Activation of the Notch receptor leads to the proteolytic cleavage of its cytoplasmic domain and the translocation thereof into the cell nucleus. The "detectable signal" referred to herein may be any detectable manifestation attributable to the presence of the cleaved intracellular domain of Notch. Thus, increased Notch signalling
- 15 can be assessed at the protein level by measuring intracellular concentrations of the cleaved Notch domain. Activation of the Notch receptor also catalyses a series of downstream reactions leading to changes in the levels of expression of certain well defined genes. Thus, increased Notch signalling can be assessed at the nucleic acid level by say measuring intracellular concentrations of specific mRNAs. In one preferred
- 20 embodiment of the present invention, the assay is a protein assay. In another preferred embodiment of the present invention, the assay is a nucleic acid assay.

The advantage of using a nucleic acid assay is that they are sensitive and that small samples can be analysed.

25

The intracellular concentration of a particular mRNA, measured at any given time, reflects the level of expression of the corresponding gene at that time. Thus, levels of mRNA of downstream target genes of the Notch signalling pathway can be measured in an indirect assay of the T-cells of the immune system. For example, an increase in

30 levels of Deltex, Hes-1 and/or IL-10 mRNA may, for instance, indicate induced anergy while an increase in levels of IFN- γ mRNA, or in the levels of mRNA encoding cytokines such as IL-2, IL-5 and IL-13, may indicate improved responsiveness.

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

38

Many compounds identified according to the present invention may be lead compounds useful for drug development. Useful lead compounds include antibodies and peptides, and including intracellular antibodies expressed within the cell in a gene therapy context, which may be used as models for the development of peptide or low molecular weight therapeutics. In a preferred aspect of the invention, lead compounds and the Notch receptor or Notch ligand or other target peptides may be co-crystallised in order to facilitate the design of suitable low molecular weight compounds which mimic the interaction observed with the lead compound.

Any one or more of appropriate targets - such as an amino acid sequence and/or nucleotide sequence - may be used for identifying a compound capable of modulating the Notch signalling pathway and/or a targeting molecule in any of a variety of drug screening techniques. The target employed in such a test may be free in solution, affixed to a solid support, borne on a cell surface, or located intracellularly.

This invention also contemplates the use of competitive drug screening assays in which neutralising antibodies capable of binding a target specifically compete with a test compound for binding to a target.

Techniques are well known in the art for the screening and development of agents such as antibodies, peptidomimetics and small organic molecules which are capable of binding to and/or modulating components of the Notch signalling pathway. These include the use of phage display systems for expressing signalling proteins, and using a culture of transfected *E. coli* or other microorganism to produce the proteins for studies of potential binding and/or modulating compounds (see, for example, G. Cesarini, FEBS Letters, 307(1):66-70 (July 1992); H. Gram et al., J. Immunol. Meth., 161:169-176 (1993); and C. Summer et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89:3756-3760 (May 1992)). Further library and screening techniques are described, for example, in US 6281344 (Phyllos).

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

39

Notch ligands

As discussed above, Notch ligands comprise a number of distinctive domains. Some predicted/potential domain locations for various naturally occurring human Notch

5 ligands (based on amino acid numbering in the precursor proteins) are shown below:

Human Delta 1

10	Component	Amino acids	Proposed function/domain
	SIGNAL	1-17	SIGNAL
	CHAIN	18-723	DELTA-LIKE PROTEIN 1
	DOMAIN	18-545	EXTRACELLULAR
15	TRANSMEM	546- 568	TRANSMEMBRANE
	DOMAIN	569-723	CYTOPLASMIC
	DOMAIN	159-221	DSL
	DOMAIN	226-254	EGF-LIKE 1
	DOMAIN	257-285	EGF-LIKE 2
20	DOMAIN	292-325	EGF-LIKE 3
	DOMAIN	332-363	EGF-LIKE 4
	DOMAIN	370-402	EGF-LIKE 5
	DOMAIN	409-440	EGF-LIKE 6
	DOMAIN	447-478	EGF-LIKE 7
25	DOMAIN	485-516	EGF-LIKE 8

Human Delta 3

30	Component	Amino acids	Proposed function/domain
	DOMAIN	158-248	DSL
	DOMAIN	278-309	EGF-LIKE 1
	DOMAIN	316-350	EGF-LIKE 2
35	DOMAIN	357-388	EGF-LIKE 3
	DOMAIN	395-426	EGF-LIKE 4
	DOMAIN	433-464	EGF-LIKE 5

Human Delta 4

40	Component	Amino acids	Proposed function/domain
	SIGNAL	1-26	SIGNAL
45	CHAIN	27-685	DELTA-LIKE PROTEIN 4
	DOMAIN	27-529	EXTRACELLULAR
	TRANSMEM	530-550	TRANSMEMBRANE
	DOMAIN	551-685	CYTOPLASMIC
	DOMAIN	155-217	DSL
50	DOMAIN	218-251	EGF-LIKE 1
	DOMAIN	252-282	EGF-LIKE 2
	DOMAIN	284-322	EGF-LIKE 3
	DOMAIN	324-360	EGF-LIKE 4
	DOMAIN	362-400	EGF-LIKE 5

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

40

DOMAIN	402-438	EGF-LIKE 6
DOMAIN	440-476	EGF-LIKE 7
DOMAIN	480-518	EGF-LIKE 8

5 Human Jagged 1

	Component	Amino acids	Proposed function/domain
	SIGNAL	1-33	SIGNAL
10	CHAIN	34-1218	JAGGED 1
	DOMAIN	34-1067	EXTRACELLULAR
	TRANSMEM	1068-1093	TRANSMEMBRANE
	DOMAIN	1094-1218	CYTOPLASMIC
	DOMAIN	167-229	DSL
15	DOMAIN	234-262	EGF-LIKE 1
	DOMAIN	265-293	EGF-LIKE 2
	DOMAIN	300-333	EGF-LIKE 3
	DOMAIN	340-371	EGF-LIKE 4
	DOMAIN	378-409	EGF-LIKE 5
20	DOMAIN	416-447	EGF-LIKE 6
	DOMAIN	454-484	EGF-LIKE 7
	DOMAIN	491-522	EGF-LIKE 8
	DOMAIN	529-560	EGF-LIKE 9
	DOMAIN	595-626	EGF-LIKE 10
25	DOMAIN	633-664	EGF-LIKE 11
	DOMAIN	671-702	EGF-LIKE 12
	DOMAIN	709-740	EGF-LIKE 13
	DOMAIN	748-779	EGF-LIKE 14
	DOMAIN	786-817	EGF-LIKE 15
30	DOMAIN	824-855	EGF-LIKE 16
	DOMAIN	863-917	VON WILLEBRAND FACTOR C

Human Jagged 2

	Component	Amino acids	Proposed function/domain
	SIGNAL	1-26	SIGNAL
	CHAIN	27-1238	JAGGED 2
	DOMAIN	27-1080	EXTRACELLULAR
40	TRANSMEM	1081-1105	TRANSMEMBRANE
	DOMAIN	1106-1238	CYTOPLASMIC
	DOMAIN	178-240	DSL
	DOMAIN	249-273	EGF-LIKE 1
	DOMAIN	276-304	EGF-LIKE 2
45	DOMAIN	311-344	EGF-LIKE 3
	DOMAIN	351-382	EGF-LIKE 4
	DOMAIN	389-420	EGF-LIKE 5
	DOMAIN	427-458	EGF-LIKE 6
	DOMAIN	465-495	EGF-LIKE 7
50	DOMAIN	502-533	EGF-LIKE 8
	DOMAIN	540-571	EGF-LIKE 9
	DOMAIN	602-633	EGF-LIKE 10
	DOMAIN	640-671	EGF-LIKE 11
	DOMAIN	678-709	EGF-LIKE 12
55	DOMAIN	716-747	EGF-LIKE 13
	DOMAIN	755-786	EGF-LIKE 14
	DOMAIN	793-824	EGF-LIKE 15

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

41

DOMAIN	831-862	EGF-LIKE 16
DOMAIN	872-949	VON WILLEBRAND FACTOR C

5 **DSL domain**

A typical DSL domain may include most or all of the following consensus amino acid sequence:

10 Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys

Preferably the DSL domain may include most or all of the following consensus amino acid sequence:

Cys Xaa Xaa Xaa ARO ARO Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Cys BAS NOP
 BAS ACM ACM Xaa ARO NOP ARO Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa NOP Xaa Xaa
 Xaa Cys Xaa Xaa NOP ARO Xaa NOP Xaa Xaa Cys

20 wherein:

ARO is an aromatic amino acid residue, such as tyrosine, phenylalanine, tryptophan or histidine;

25 NOP is a non-polar amino acid residue such as glycine, alanine, proline, leucine, isoleucine or valine;

BAS is a basic amino acid residue such as arginine or lysine; and

30 ACM is an acid or amide amino acid residue such as aspartic acid, glutamic acid, asparagine or glutamine.

Preferably the DSL domain may include most or all of the following consensus amino acid sequence:

Cys Xaa Xaa Xaa Tyr Tyr Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Cys Arg Pro
 Arg Asx Asp Xaa Phe Gly His Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Xaa
 Xaa Cys Xaa Xaa Gly Trp Xaa Gly Xaa Xaa Cys

40 (wherein Xaa may be any amino acid and Asx is either aspartic acid or asparagine).

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

42

An alignment of DSL domains from Notch ligands from various sources is shown in Figure 32.

- 5 The DSL domain used may be derived from any suitable species, including for example *Drosophila*, *Xenopus*, rat, mouse or human. Preferably the DSL domain is derived from a vertebrate, preferably a mammalian, preferably a human Notch ligand sequence.
- 10 Suitably, for example, a DSL domain for use in the present invention may have at least 30%, preferably at least 50%, preferably at least 60%, preferably at least 70%, preferably at least 80%, preferably at least 90%, preferably at least 95% amino acid sequence identity to the DSL domain of human Jagged 1.
- 15 Alternatively a DSL domain for use in the present invention may, for example, have at least 30%, preferably at least 50%, preferably at least 60%, preferably at least 70%, preferably at least 80%, preferably at least 90%, preferably at least 95% amino acid sequence identity to the DSL domain of human Jagged 2.
- 20 Alternatively a DSL domain for use in the present invention may, for example, have at least 30%, preferably at least 50%, preferably at least 60%, preferably at least 70%, preferably at least 80%, preferably at least 90%, preferably at least 95% amino acid sequence identity to the DSL domain of human Delta 1.
- 25 Alternatively a DSL domain for use in the present invention may, for example, have at least 30%, preferably at least 50%, preferably at least 60%, preferably at least 70%, preferably at least 80%, preferably at least 90%, preferably at least 95% amino acid sequence identity to the DSL domain of human Delta 3.
- 30 Alternatively a DSL domain for use in the present invention may, for example, have at least 30%, preferably at least 50%, preferably at least 60%, preferably at least 70%,

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

43

preferably at least 80%, preferably at least 90%, preferably at least 95% amino acid sequence identity to the DSL domain of human Delta 4.

EGF-like domain

5

The EGF-like motif has been found in a variety of proteins, as well as EGF and Notch and Notch ligands, including those involved in the blood clotting cascade (Furie and Furie, 1988, Cell 53: 505-518). For example, this motif has been found in extracellular proteins such as the blood clotting factors IX and X (Rees et al., 1988, EMBO J. 7:2053-2061; Furie and Furie, 1988, Cell 53: 505-518), in other *Drosophila* genes (Knust et al., 1987 EMBO J. 761-766; Rothberg et al., 1988, Cell 55:1047-1059), and in some cell-surface receptor proteins, such as thrombomodulin (Suzuki et al., 1987, EMBO J. 6:1891-1897) and LDL receptor (Sudhof et al., 1985, Science 228:815-822). A protein binding site has been mapped to the EGF repeat domain in thrombomodulin and urokinase (Kurosawa et al., 1988, J. Biol. Chem 263:5993-5996; Appella et al., 1987, J. Biol. Chem. 262:4437-4440).

As reported by PROSITE the EGF domain typically includes six cysteine residues which have been shown (in EGF) to be involved in disulfide bonds. The main structure is proposed, but not necessarily required, to be a two-stranded beta-sheet followed by a loop to a C-terminal short two-stranded sheet. Subdomains between the conserved cysteines strongly vary in length as shown in the following schematic representation of the EGF-like domain:

25

```

+-----+          +-----+
|         |          |         |
x(4)-C-x(0,48)-C-x(3,12)-C-x(1,70)-C-x(1,6)-C-x(2)-G-a-x(0,21)-G-x(2)-C-x
|         |          |         |
+-----+          +-----+

```

30

wherein:

'C': conserved cysteine involved in a disulfide bond.

'G': often conserved glycine

'a': often conserved aromatic amino acid

'*': position of both patterns.

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

44

'x': any residue

The region between the 5th and 6th cysteine contains two conserved glycines of which at least one is normally present in most EGF-like domains.

5

The EGF-like domain used may be derived from any suitable species, including for example *Drosophila*, *Xenopus*, rat, mouse or human. Preferably the EGF-like domain is derived from a vertebrate, preferably a mammalian, preferably a human Notch ligand sequence.

10

Suitably, for example, an EGF-like domain for use in the present invention may have at least 30%, preferably at least 50%, preferably at least 60%, preferably at least 70%, preferably at least 80%, preferably at least 90%, preferably at least 95% amino acid sequence identity to an EGF-like domain of human Jagged 1.

15

Alternatively an EGF-like domain for use in the present invention may, for example, have at least 30%, preferably at least 50%, preferably at least 60%, preferably at least 70%, preferably at least 80%, preferably at least 90%, preferably at least 95% amino acid sequence identity to an EGF-like domain of human Jagged 2.

20

Alternatively an EGF-like domain for use in the present invention may, for example, have at least 30%, preferably at least 50%, preferably at least 60%, preferably at least 70%, preferably at least 80%, preferably at least 90%, preferably at least 95% amino acid sequence identity to an EGF-like domain of human Delta 1.

25

Alternatively an EGF-like domain for use in the present invention may, for example, have at least 30%, preferably at least 50%, preferably at least 60%, preferably at least 70%, preferably at least 80%, preferably at least 90%, preferably at least 95% amino acid sequence identity to an EGF-like domain of human Delta 3.

30

Alternatively an EGF-like domain for use in the present invention may, for example, have at least 30%, preferably at least 50%, preferably at least 60%, preferably at least

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

45

70%, preferably at least 80%, preferably at least 90%, preferably at least 95% amino acid sequence identity to an EGF-like domain of human Delta 4.

As a practical matter, whether any particular amino acid sequence is at least X% identical to another sequence can be determined conventionally using known computer programs. For example, the best overall match between a query sequence and a subject sequence, also referred to as a global sequence alignment, can be determined using a program such as the FASTDB computer program based on the algorithm of Brutlag et al. (Comp. App. Biosci. (1990) 6:237-245). In a sequence alignment the query and subject sequences are either both nucleotide sequences or both amino acid sequences. The result of the global sequence alignment is given as percent identity. Suitable parameters used in a FASTDB amino acid alignment are: Matrix=PAM 0, k-tuple=2, Mismatch Penalty=1, Joining Penalty=20, Randomization Group Length=0, Cutoff Score=1, Window Size=sequence length, Gap Penalty=5, Gap Size Penalty=0.05, Window Size=500 or the length of the subject amino acid sequence, whichever is shorter.

Polypeptide Sequences

As used herein, the term "polypeptide" is synonymous with the term "amino acid sequence" and/or the term "protein". In some instances, the term "polypeptide" is synonymous with the term "peptide".

"Peptide" usually refers to a short amino acid sequence that is 10 to 40 amino acids long, preferably 10 to 35 amino acids.

The polypeptide sequence may be prepared and isolated from a suitable source, or it may be made synthetically or it may be prepared by use of recombinant DNA techniques.

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

46

Polynucleotide Sequences

As used herein, the term "polynucleotide sequence" is synonymous with the term
5 "polynucleotide" and/or the term "nucleotide sequence".

The polynucleotide sequence may be DNA or RNA of genomic or synthetic or of
recombinant origin. They may also be cloned by standard techniques. The
polynucleotide sequence may be double-stranded or single-stranded whether
10 representing the sense or antisense strand or combinations thereof.

"Polynucleotide" refers to a polymeric form of nucleotides of at least 10 bases in
length and up to 1,000 bases or even more. Longer polynucleotide sequences will
generally be produced using recombinant means, for example using a PCR (polymerase
15 chain reaction) cloning techniques. This will involve making a pair of primers (e.g. of
about 15 to 30 nucleotides) flanking a region of the targeting sequence which it is desired
to clone, bringing the primers into contact with mRNA or cDNA obtained from an animal
or human cell, performing a polymerase chain reaction (PCR) under conditions which
bring about amplification of the desired region, isolating the amplified fragment (e.g. by
20 purifying the reaction mixture on an agarose gel) and recovering the amplified DNA.
The primers may be designed to contain suitable restriction enzyme recognition sites so
that the amplified DNA can be cloned into a suitable cloning vector.

The nucleic acid may be RNA or DNA and is preferably DNA. Where it is RNA,
25 manipulations may be performed via cDNA intermediates. Generally, a nucleic acid
sequence encoding the first region will be prepared and suitable restriction sites
provided at the 5' and/or 3' ends. Conveniently the sequence is manipulated in a
standard laboratory vector, such as a plasmid vector based on pBR322 or pUC19 (see
below). Reference may be made to Molecular Cloning by Sambrook *et al.* (Cold
30 Spring Harbor, 1989) or similar standard reference books for exact details of the
appropriate techniques.

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

47

Sources of nucleic acid may be ascertained by reference to published literature or databanks such as GenBank. Nucleic acid encoding the desired first or second sequences may be obtained from academic or commercial sources where such sources
5 are willing to provide the material or by synthesising or cloning the appropriate sequence where only the sequence data are available. Generally this may be done by reference to literature sources which describe the cloning of the gene in question.

Alternatively, where limited sequence data is available or where it is desired to express
10 a nucleic acid homologous or otherwise related to a known nucleic acid, exemplary nucleic acids can be characterised as those nucleotide sequences which hybridise to the nucleic acid sequences known in the art.

The polynucleotide sequence may comprise, for example, a protein-encoding domain,
15 an antisense sequence or a functional motif such as a protein-binding domain and includes variants, derivatives, analogues and fragments thereof. The term also refers to polypeptides encoded by the nucleotide sequence.

The nucleotide sequences such as a DNA polynucleotides useful in the invention may be
20 produced recombinantly, synthetically, or by any means available to those of skill in the art. They may also be cloned by standard techniques.

In general, primers will be produced by synthetic means, involving a step wise
25 manufacture of the desired nucleic acid sequence one nucleotide at a time. Techniques for accomplishing this using automated techniques are readily available in the art.

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

48

Longer nucleotide sequences will generally be produced using recombinant means, for example using a PCR (polymerase chain reaction) cloning techniques. This will involve making a pair of primers (e.g. of about 15 to 30 nucleotides) flanking a region of the targeting sequence which it is desired to clone, bringing the primers into contact with mRNA or cDNA obtained from an animal or human cell, performing a polymerase chain reaction (PCR) under conditions which bring about amplification of the desired region, isolating the amplified fragment (e.g. by purifying the reaction mixture on an agarose gel) and recovering the amplified DNA. The primers may be designed to contain suitable restriction enzyme recognition sites so that the amplified DNA can be cloned into a suitable cloning vector

For recombinant production, host cells can be genetically engineered to incorporate expression systems or polynucleotides of the invention. Introduction of a polynucleotide into the host cell can be effected by methods described in many standard laboratory manuals, such as Davis *et al* and Sambrook *et al*, such as calcium phosphate transfection, DEAE-dextran mediated transfection, transfection, microinjection, cationic lipid-mediated transfection, electroporation, transduction, scrape loading, ballistic introduction and infection. It will be appreciated that such methods can be employed *in vitro* or *in vivo* as drug delivery systems.

Representative examples of appropriate hosts include bacterial cells, such as streptococci, staphylococci, *E. coli*, streptomyces and *Bacillus subtilis* cells; fungal cells, such as yeast cells and *Aspergillus* cells; insect cells such as *Drosophila* S2 and *Spodoptera* Sf9 cells; animal cells such as CHO, COS, NSO, HeLa, C127, 3T3, BHK, 293 and Bowes melanoma cells; and plant cells.

A great variety of expression systems can be used to produce a polypeptide useful in the present invention. Such vectors include, among others, chromosomal, episomal and virus-derived vectors, e.g., vectors derived from bacterial plasmids, from bacteriophage, from transposons, from yeast episomes, from insertion elements, from yeast chromosomal elements, from viruses such as baculoviruses, papova viruses, such as SV40, vaccinia viruses, adenoviruses, fowl pox viruses, pseudorabies viruses and

retroviruses, and vectors derived from combinations thereof, such as those derived from plasmid and bacteriophage genetic elements, such as cosmids and phagemids. The expression system constructs may contain control regions that regulate as well as engender expression. Generally, any system or vector suitable to maintain, propagate
5 or express polynucleotides and/or to express a polypeptide in a host may be used for expression in this regard. The appropriate DNA sequence may be inserted into the expression system by any of a variety of well-known and routine techniques, such as, for example, those set forth in Sambrook *et al.*

For secretion of the translated protein into the lumen of the endoplasmic reticulum,
10 into the periplasmic space or into the extracellular environment, appropriate secretion signals may be incorporated into the expressed polypeptide. These signals may be endogenous to the polypeptide or they may be heterologous signals.

Active agents for use in the invention can be recovered and purified from recombinant cell cultures by well-known methods including ammonium sulfate or ethanol
15 precipitation, acid extraction, anion or cation exchange chromatography, phosphocellulose chromatography, hydrophobic interaction chromatography, affinity chromatography, hydroxylapatite chromatography and lectin chromatography. Most preferably, high performance liquid chromatography is employed for purification. Well known techniques for refolding protein may be employed to regenerate active
20 conformation when the polypeptide is denatured during isolation and/or purification.

Variants, Derivatives, Analogues, Homologues and Fragments

In addition to the specific polypeptide and polynucleotide sequences mentioned herein,
25 the present invention also encompasses the use of variants, derivatives, analogues, homologues, mimetics and fragments thereof.

In the context of the present invention, a variant of any given sequence is a sequence in which the specific sequence of residues (whether amino acid or nucleic acid residues)
30 has been modified in such a manner that the polypeptide or polynucleotide in question retains at least one of its endogenous functions. A variant sequence can be modified by

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

50

addition, deletion, substitution modification replacement and/or variation of at least one residue present in the naturally-occurring protein.

5 The term "derivative" as used herein, in relation to proteins or polypeptides of the present invention includes any substitution of, variation of, modification of, replacement of, deletion of and/or addition of one (or more) amino acid residues from or to the sequence providing that the resultant protein or polypeptide retains at least one of its endogenous functions.

10 The term "analogue" as used herein, in relation to polypeptides or polynucleotides, includes any polypeptide or polynucleotide which retains at least one of the functions of the endogenous polypeptide or polynucleotide but generally has a different evolutionary origin thereto.

15 The term "mimetic" as used herein, in relation to polypeptides or polynucleotides, refers to a chemical compound that possesses at least one of the endogenous functions of the polypeptide or polynucleotide which it mimics.

Typically, amino acid substitutions may be made, for example from 1, 2 or 3 to 10 or
20 20 substitutions provided that the modified sequence retains the required transport activity or ability to modulate Notch signalling. Amino acid substitutions may include the use of non-naturally occurring analogues.

Proteins of use in the present invention may also have deletions, insertions or
25 substitutions of amino acid residues which produce a silent change and result in a functionally equivalent protein. Deliberate amino acid substitutions may be made on the basis of similarity in polarity, charge, solubility, hydrophobicity, hydrophilicity, and/or the amphipathic nature of the residues as long as the transport or modulation function is retained. For example, negatively charged amino acids include aspartic
30 acid and glutamic acid; positively charged amino acids include lysine and arginine; and amino acids with uncharged polar head groups having similar hydrophilicity

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

51

values include leucine, isoleucine, valine, glycine, alanine, asparagine, glutamine, serine, threonine, phenylalanine, and tyrosine.

For ease of reference, the one and three letter codes for the main naturally occurring amino acids (and their associated codons) are set out below:

Symbol	3-letter	Meaning	Codons
-----	-----	-----	-----
10	A	Ala	Alanine
	B	Asp, Asn	Aspartic, Asparagine
	C	Cys	Cysteine
	D	Asp	Aspartic
15	E	Glu	Glutamic
	F	Phe	Phenylalanine
	G	Gly	Glycine
	H	His	Histidine
	I	Ile	Isoleucine
20	K	Lys	Lysine
	L	Leu	Leucine
	M	Met	Methionine
	N	Asn	Asparagine
	P	Pro	Proline
25	Q	Gln	Glutamine
	R	Arg	Arginine
	S	Ser	Serine
	T	Thr	Threonine
	V	Val	Valine
30	W	Trp	Tryptophan
	X	Xxx	Unknown
	Y	Tyr	Tyrosine
	Z	Glu, Gln	Glutamic, Glutamine
35	*	End	Terminator

Conservative substitutions may be made, for example according to the Table below.

Amino acids in the same block in the second column and preferably in the same line in the third column may be substituted for each other:

40

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

52

ALIPHATIC	Non-polar	G A P
		I L V
	Polar – uncharged	C S T M
		N Q
	Polar – charged	D E
		K R
AROMATIC		H F W Y

As used herein, the term "protein" includes single-chain polypeptide molecules as well as multiple-polypeptide complexes where individual constituent polypeptides are linked by covalent or non-covalent means. As used herein, the terms "polypeptide" and "peptide" refer to a polymer in which the monomers are amino acids and are joined together through peptide or disulfide bonds. The terms subunit and domain may also refer to polypeptides and peptides having biological function.

10

"Fragments" are also variants and the term typically refers to a selected region of the polypeptide or polynucleotide that is of interest either functionally or, for example, in an assay. "Fragment" thus refers to an amino acid or nucleic acid sequence that is a portion of a full-length polypeptide or polynucleotide.

15

Such variants may be prepared using standard recombinant DNA techniques such as site-directed mutagenesis. Where insertions are to be made, synthetic DNA encoding the insertion together with 5' and 3' flanking regions corresponding to the naturally-occurring sequence either side of the insertion site. The flanking regions will contain convenient restriction sites corresponding to sites in the naturally-occurring sequence so that the sequence may be cut with the appropriate enzyme(s) and the synthetic DNA ligated into the cut. The DNA is then expressed in accordance with the invention to make the encoded protein. These methods are only illustrative of the numerous

20

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

53

standard techniques known in the art for manipulation of DNA sequences and other known techniques may also be used.

Polynucleotide variants will preferably comprise codon optimised sequences. Codon optimisation is known in the art as a method of enhancing RNA stability and therefore gene expression. The redundancy of the genetic code means that several different codons may encode the same amino-acid. For example, Leucine, Arginine and Serine are each encoded by six different codons. Different organisms show preferences in their use of the different codons. Viruses such as HIV, for instance, use a large number of rare codons. By changing a nucleotide sequence such that rare codons are replaced by the corresponding commonly used mammalian codons, increased expression of the sequences in mammalian target cells can be achieved. Codon usage tables are known in the art for mammalian cells, as well as for a variety of other organisms. Preferably, at least part of the sequence is codon optimised. Even more preferably, the sequence is codon optimised in its entirety.

As used herein, the term "homology" can be equated with "identity". An homologous sequence will be taken to include an amino acid sequence which may be at least 75, 85 or 90% identical, preferably at least 95 or 98% identical. In particular, homology should typically be considered with respect to those regions of the sequence (such as amino acids at positions 51, 56 and 57) known to be essential for an activity. Although homology can also be considered in terms of similarity (i.e. amino acid residues having similar chemical properties/functions), in the context of the present invention it is preferred to express homology in terms of sequence identity.

Homology comparisons can be conducted by eye, or more usually, with the aid of readily available sequence comparison programs. These commercially available computer programs can calculate % homology between two or more sequences.

Percent homology may be calculated over contiguous sequences, i.e. one sequence is aligned with the other sequence and each amino acid in one sequence is directly compared with the corresponding amino acid in the other sequence, one residue at a

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

54

time. This is called an "ungapped" alignment. Typically, such ungapped alignments are performed only over a relatively short number of residues.

Although this is a very simple and consistent method, it fails to take into consideration that, for example, in an otherwise identical pair of sequences, one insertion or deletion will cause the following amino acid residues to be put out of alignment, thus potentially resulting in a large reduction in % homology when a global alignment is performed. Consequently, most sequence comparison methods are designed to produce optimal alignments that take into consideration possible insertions and deletions without penalising unduly the overall homology score. This is achieved by inserting "gaps" in the sequence alignment to try to maximise local homology.

However, these more complex methods assign "gap penalties" to each gap that occurs in the alignment so that, for the same number of identical amino acids, a sequence alignment with as few gaps as possible - reflecting higher relatedness between the two compared sequences - will achieve a higher score than one with many gaps. "Affine gap costs" are typically used that charge a relatively high cost for the existence of a gap and a smaller penalty for each subsequent residue in the gap. This is the most commonly used gap scoring system. High gap penalties will of course produce optimised alignments with fewer gaps. Most alignment programs allow the gap penalties to be modified. However, it is preferred to use the default values when using such software for sequence comparisons. For example when using the GCG Wisconsin Bestfit package (see below) the default gap penalty for amino acid sequences is -12 for a gap and -4 for each extension.

Calculation of maximum % homology therefore firstly requires the production of an optimal alignment, taking into consideration gap penalties. A suitable computer program for carrying out such an alignment is the GCG Wisconsin Bestfit package (Devereux). Examples of other software that can perform sequence comparisons include, but are not limited to, the BLAST package, FASTA (Atschul) and the GENEWORKS suite of comparison tools. Both BLAST and FASTA are available for offline and online searching. However it is preferred to use the GCG Bestfit program.

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

55

Although the final % homology can be measured in terms of identity, the alignment process itself is typically not based on an all-or-nothing pair comparison. Instead, a scaled similarity score matrix is generally used that assigns scores to each pairwise comparison based on chemical similarity or evolutionary distance. An example of such a matrix commonly used is the BLOSUM62 matrix - the default matrix for the BLAST suite of programs. GCG Wisconsin programs generally use either the public default values or a custom symbol comparison table if supplied (see user manual for further details). It is preferred to use the public default values for the GCG package, or in the case of other software, the default matrix, such as BLOSUM62.

Once the software has produced an optimal alignment, it is possible to calculate % homology, preferably % sequence identity. The software typically does this as part of the sequence comparison and generates a numerical result.

Nucleotide sequences which are homologous to or variants of sequences of use in the present invention can be obtained in a number of ways, for example by probing DNA libraries made from a range of sources. In addition, other viral/bacterial, or cellular homologues particularly cellular homologues found in mammalian cells (e.g. rat, mouse, bovine and primate cells), may be obtained and such homologues and fragments thereof in general will be capable of selectively hybridising to the sequences shown in the sequence listing herein. Such sequences may be obtained by probing cDNA libraries made from or genomic DNA libraries from other animal species, and probing such libraries with probes comprising all or part of the reference nucleotide sequence under conditions of medium to high stringency. Similar considerations apply to obtaining species homologues and allelic variants of the amino acid and/or nucleotide sequences useful in the present invention.

Variants and strain/species homologues may also be obtained using degenerate PCR which will use primers designed to target sequences within the variants and homologues encoding conserved amino acid sequences within the sequences of use in the present invention. Conserved sequences can be predicted, for example, by aligning the amino

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

56

acid sequences from several variants/homologues. Sequence alignments can be performed using computer software known in the art. For example the GCG Wisconsin PileUp program is widely used. The primers used in degenerate PCR will contain one or more degenerate positions and will be used at stringency conditions lower than those used
5 for cloning sequences with single sequence primers against known sequences.

Alternatively, such nucleotide sequences may be obtained by site directed mutagenesis of characterised sequences. This may be useful where for example silent codon changes are required to sequences to optimise codon preferences for a particular host cell in which the
10 nucleotide sequences are being expressed. Other sequence changes may be desired in order to introduce restriction enzyme recognition sites, or to alter the activity of the polynucleotide or encoded polypeptide.

In a first step of the method of the present invention, any one or more of the above
15 candidate modulators is brought into contact with a cell of the immune system. Cells of the immune system of use in the present invention are described below.

By Notch, we mean Notch-1, Notch-2, Notch-3 or Notch-4 and any other Notch homologues or analogues. The term "Notch IC" includes the full intracellular domain
20 of Notch or an active portion of this domain. For example, the sequence may be a sequence comprising or coding for at least amino acids 1848 to 2202 of human Notch1 or a sequence having at least 70%, preferably at least 75%, preferably at least 80%, preferably at least 85%, preferably at least 90%, preferably at least 95% amino acid sequence similarity or identity with this sequence. The sequence may also suitably be
25 derived from human Notch2, Notch3 or Notch4. Suitably the Notch sequence comprises at least a Notch Ankyrin repeat domain and optionally a Notch LNR domain, Notch RAM domain, Notch OPA domain and/or Notch PEST sequence.

Cells of the Immune System

30 Cells of use in the present invention are cells of the immune system capable of transducing the Notch signalling pathway.

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

57

Most preferably the cells of use in the present invention are T-cells. These include, but are not limited to, CD4⁺ and CD8⁺ mature T cells, immature T cells of peripheral or thymic origin and NK-T cells.

5

Alternatively, the cells will be antigen-presenting cells (APCs). APCs include dendritic cells (DCs) such as interdigitating DCs or follicular DCs, Langerhans cells, PBMCs, macrophages, B-lymphocytes, T-lymphocytes, or other cell types such as epithelial cells, fibroblasts or endothelial cells, constitutively expressing or activated to

10 express a MHC Class II molecules on their surfaces. Precursors of APCs include CD34⁺ cells, monocytes, fibroblasts and endothelial cells. The APCs or precursors may be modified by the culture conditions or may be genetically modified, for instance by transfection of one or more genes.

15 The T cells or APCs may be isolated from a patient, or from a donor individual or another individual. The cells are preferably mammalian cells such as human or mouse cells. Preferably the cells are of human origin. The APC or precursor APC may be provided by a cell proliferating in culture such as an established cell line or a primary cell culture. Examples include hybridoma cell lines, L-cells and human fibroblasts

20 such as MRC-5. Preferred cell lines for use in the present invention include Jurkat, H9, CEM and EL4 T-cells; long-term T-cell clones such as human HA1.7 or mouse D10 cells; T-cell hybridomas such as DO11.10 cells; macrophage-like cells such as U937 or THP1 cells; B-cell lines such as EBV-transformed cells such as Raji, A20 and M1 cells.

25

Dendritic cells (DCs) can be isolated/prepared by a number of means, for example they can either be purified directly from peripheral blood, or generated from CD34⁺ precursor cells for example after mobilisation into peripheral blood by treatment with GM-CSF, or directly from bone marrow. From peripheral blood, adherent precursors

30 can be treated with a GM-CSF/IL-4 mixture (Inaba *et al*), or from bone marrow, non-adherent CD34⁺ cells can be treated with GM-CSF and TNF- α (Caux *et al*). DCs can also be routinely prepared from the peripheral blood of human volunteers, similarly to

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

58

the method of Sallusto and Lanzavecchia J Exp Med (1994) 179(4) 1109-18 using purified peripheral blood mononucleocytes (PBMCs) and treating 2 hour adherent cells with GM-CSF and IL-4. If required, these may be depleted of CD19⁺ B cells and CD3⁺, CD2⁺ T cells using magnetic beads (Coffin *et al*). Culture conditions may include other cytokines such as GM-CSF or IL-4 for the maintenance and, or activity of the dendritic cells or other antigen presenting cells.

T cells and B cells for use in the invention are preferably obtained from cell lines such as lymphoma or leukemia cell lines, T cell hybridomas or B cell hybridomas but may also be isolated from an individual suffering from a disease of the immune system or a recipient for a transplant operation or from a related or unrelated donor individual. T cells and B cells may be obtained from blood or another source (such as lymph nodes, spleen, or bone marrow) and may be enriched or purified by standard procedures. Alternatively whole blood may be used or leukocyte enriched blood or purified white blood cells as a source of T cells and other cell types. It is particularly preferred to use helper T cells (CD4⁺). Alternatively other T cells such as CD8⁺ cells may be used.

Candidate modulators of use in the present invention are brought into contact with a cell of the immune system as described above. In a further step, modulation of Notch signalling by a candidate modulator is detected. Assays for detecting modulation of Notch signalling will be described below. Many of these assays will involve monitoring the expression of a "target gene".

Target Genes

The target genes of use in the present invention may be endogenous target genes (i.e. endogenous target genes of the Notch signalling pathway) or synthetic reporter genes.

Endogenous target genes

Endogenous target genes of the Notch signalling pathway include Deltex, genes of the Hes family (Hes-1 in particular), Enhancer of Split [E(spl)] complex genes, Il-10, CD-

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

59

23, Dlx-1, CTLA4, CD-4, Dll-1, Numb, Mastermind and Dsh. Although all genes the expression of which is modulated by Notch activation may be used for the purpose of the present invention, preferred endogenous target genes are described below.

5 Deltex, an intracellular docking protein, replaces Su(H) as it leaves its site of interaction with the intracellular tail of Notch, as shown in Figure 1. Deltex is a cytoplasmic protein containing a zinc-finger (Artavanis-Tsakonas; Osborne). It interacts with the ankyrin repeats of the Notch intracellular domain. Studies indicate that Deltex promotes Notch pathway activation by interacting with Grb2 and modulating the Ras-JNK signalling
10 pathway (Matsuno). Deltex also acts as a docking protein which prevents Su(H) from binding to the intracellular tail of Notch (Matsuno). Thus, Su(H) is released into the nucleus where it acts as a transcriptional modulator. Recent evidence also suggests that, in a vertebrate B-cell system, Deltex, rather than the Su(H) homologue CBF1, is responsible for inhibiting E47 function (Ordentlich). Expression of Deltex is
15 upregulated as a result of Notch activation in a positive feedback loop. The sequence of Homo sapiens Deltex (DTX1) mRNA may be found in GenBank Accession No. AF053700.

Hes-1 (Hairy-enhancer of Split-1) (Takebayashi) is a transcriptional factor with a basic
20 helix-loop-helix structure. It binds to an important functional site in the CD4 silencer leading to repression of CD4 gene expression. Thus, Hes-1 is strongly involved in the determination of T-cell fate. Other genes from the Hes family include Hes-5 (mammalian Enhancer of Split homologue), the expression of which is also upregulated by Notch activation, and Hes-3. Expression of Hes-1 is upregulated as a result of Notch
25 activation. The sequence of human Hes-1 can be found in GenBank Accession Nos. AK000415 and AF264785.

The E(spl) gene complex [E(spl)-C] (Leimeister) comprises seven genes of which only
30 E(spl) and Groucho show visible phenotypes when mutant. E(spl) was named after its ability to enhance Split mutations, Split being another name for Notch. Indeed, E(spl)-C

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

60

genes repress Delta through regulation of achaete-scute complex gene expression. Expression of E(spl) is upregulated as a result of Notch activation.

IL-10 (interleukin-10) is a factor produced by Th2 helper T-cells. It is a co-regulator of mast cell growth and shows extensive homology with the Epstein-Barr bcrfl gene. Although it is not known to be a direct downstream target of the Notch signalling pathway, its expression has been found to be strongly upregulated coincident with Notch activation. The mRNA sequence of IL-10 may be found in GenBank ref. No. GI1041812.

CD-23 is the human leukocyte differentiation antigen CD23 (FCE2) which is a key molecule for B-cell activation and growth. It is the low-affinity receptor for IgE. Furthermore, the truncated molecule can be secreted, then functioning as a potent mitogenic growth factor. Although it is not thought to be a direct downstream target of the Notch signalling pathway, its expression has been found to be strongly upregulated coincident with Notch activation. The sequence for CD-23 may be found in GenBank ref. No. GI1783344.

Dlx-1 (distalless-1) expression is downregulated as a result of Notch activation. Sequences for Dlx genes may be found in GenBank Accession Nos. U51000-3.

CTLA4 (cytotoxic T-lymphocyte activated protein 4) is an accessory molecule found on the surface of T-cells which is thought to play a role in the regulation of airway inflammatory cell recruitment and T-helper cell differentiation after allergen inhalation. The promoter region of the gene encoding CTLA4 has CBF1 response elements and its expression is upregulated as a result of Notch activation. The sequence of CTLA4 can be found in GenBank Accession No. L15006.

CD-4 expression is downregulated as a result of Notch activation. A sequence for the CD-4 antigen may be found in GenBank Accession No. XM006966.

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

61

Other useful target genes include genes associated with anergy, such as (with associated GenBank Accession Nos):

- GRG4 (groucho-related protein U61363), Ikaros (L03547), Jumonji (D31967), Caspase 3 (U54803), SOCS2 (U88327), Traf5 (D78141), RPTP σ Sigma - D28530),
- 5 RPTP κ Kappa - L10106), PTP-1B (U24700), AGK α - AA066032), LDHA α Y00309 , Pgaml (phosphoglycerate mutase - AA161799), GBP-3 (guanylate binding protein 3 - U44731), RGS-2 (G-protein signaling regulator 2 - U67187), Rab10 (AA119194), CD98 (U25708), 4-1BB-L (L15435), FasL (U06948), Hif-1 (Hypoxia inducible factor 1 AF003695), SATB1 (nuclear matrix attachment
- 10 DNA-binding protein - U05252), Elf-1(U19617), NFIL3 (U83148), RNF19 (also called GEG-154 X71642), Mlp (Markks-like protein - AA245242), Lad/TsAd (p56lck-associated adapter protein - E162419), ZAP-70 (U04379), Serpin 1b (AA125310), Cytostatin C (M59470), glutamate dehydrogenase (X57024), CD3 epsilon (J02990), cation-dependent mannose-6-phosphate receptor (X64068), gamma-
- 15 aminobutyric acid receptor-associated protein-like protein-1 (Z31137), tetracycline transporter-like protein (D88315), MCSF (M21952), Calcyelin (M37761), Heme oxygenase 2a (Z31202) and Osp94 (osmotic stress protein 94 - U23921).

Preferably the target/reporter gene is not IL-2 or NF-AT.

20 **Synthetic Reporter Genes**

In an alternative embodiment of the present invention, the target gene is a reporter gene. In a preferred embodiment, the reporter gene is under the transcriptional control of a promoter region or responder element(s) sensitive to Notch signalling.

- 25 A wide variety of reporters may be used in the assay methods (as well as screens) of the present invention with preferred reporters providing conveniently detectable signals (eg. by spectroscopy). By way of example, a reporter gene may encode an enzyme which catalyses a reaction which alters light absorption properties.

- 30 Other protocols include enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA),

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

62

radioimmunoassay (RIA) and fluorescent activated cell sorting (FACS). A two-site, monoclonal-based immunoassay utilising monoclonal antibodies reactive to two non-interfering epitopes may even be used. These and other assays are described, among other places, in Hampton R et al (1990, Serological Methods, A Laboratory Manual, APS Press, St Paul MN) and Maddox DE et al.

One skilled in the art will recognize that the identity of the specific reporter gene can, of course, vary. Examples of reporter genes that have been used in the art include, but are not limited to, genes encoding an enzymatic activity such as chloramphenicol acetyltransferase (CAT) gene, Green Fluorescent Protein (GFP), luciferase (luc), β -galactosidase, invertase, horseradish peroxidase, glucuronidase, exo-glucanase, glucoamylase or alkaline phosphatase. Alternatively, the reporter gene may comprise a radiolabel or a fluorescent label such as FITC, rhodamine, lanthanide phosphors, or a green fluorescent fusion protein (See for example Stauber et al). Alternatively, the reporter may comprise a predetermined polypeptide epitope which can be recognized by a secondary reporter such as leucine zipper pair sequences, binding sites for secondary antibodies, metal binding domains, or epitope tags. One skilled in the art will appreciate that the specific reporter gene or genes utilized in the methods disclosed herein may vary and may also depend on the specific model system utilized, and the methods disclosed herein are not limited to any specific reporter gene or genes.

By way of further examples, a number of companies such as Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ), Promega (Madison, WI), and US Biochemical Corp (Cleveland, OH) supply commercial kits and protocols for assay procedures. Suitable reporter molecules or labels include those radionuclides, enzymes, fluorescent, chemiluminescent, or chromogenic agents as well as substrates, cofactors, inhibitors, magnetic particles and the like. Patents teaching the use of such labels include US-A-3817837; US-A-3850752; US-A-3939350; US-A-3996345; US-A-4277437; US-A-4275149 and US-A-4366241.

The reporter gene used in the method of the present invention is under the transcriptional control of at least one Notch signalling sensitive promoter region and/or

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

63

responder element. Promoter regions and/or responder elements sensitive to Notch signalling include the regulatory elements of endogenous Notch target genes such as the HES promoters, Deltex promoter, Notch and Notch ligand promoters, IL-10 promoters. Regulatory elements of use in the present invention also include single or multimerized CBF1 sites, CTLA4 promoters and AIRE promoters. The regulatory elements are positioned such that activation of the Notch signalling pathway results in increased expression of the reporter gene.

One or more copies of the reporter gene can be inserted into the host cell by methods known in the art. The term "host cell" - in relation to the present invention includes any cell that could comprise the target for the agent of the present invention. Polynucleotides may be introduced into prokaryotic cells or eukaryotic cells, for example yeast, insect or mammalian cells. Preferably, the host cell will be a cell of the immune system as described above.

Polynucleotides of the invention may be introduced into suitable host cells using a variety of techniques known in the art, such as transfection, transformation and electroporation. Where polynucleotides of the invention are to be administered to animals, several techniques are known in the art, for example infection with recombinant viral vectors such as retroviruses, herpes simplex viruses and adenoviruses, direct injection of nucleic acids and biolistic transformation.

In the present invention, the host cells will preferably be mammalian cells and the polypeptides will be expressed either intracellularly, on the cell membranes or secreted in a culture media if preceded by an appropriate leader sequence.

Expression of the target genes (whether endogenous or synthetic reporter genes) may be dependent on Notch signalling alone or on Notch signalling and one or more further stimulatory signals.

30

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

64

Stimulatory Signals

Expression or repression of the target genes (endogenous or reporter genes) of use in the present invention is dependent on Notch signalling. In a preferred embodiment,
 5 expression or repression of the target genes will additionally be depend on a second immune cell specific stimulus, with or without an accessory signal (or "costimulus").

In one embodiment, the second stimulus will result from activation of an immune cell receptor. Examples of immune cell receptors include T cell receptors (TCR), B cell
 10 receptors (BCR) and Toll-like receptors (TLR). Examples of molecules capable of triggering a TCR or BCR signal include specific antigens for the receptors, superantigens such as TSS1, SEA, SEB, SEC, SED and SEE, antibodies to the TCR $\alpha\beta$ chains including Fab, F(ab)2 fragments, phage displayed peptides and ScFV or
 15 antibodies to CD3 proteins including ξ and ϵ chains, anti-CD28 antibodies, anti-BCR antibodies, LPS and other bacterial products, cell receptors involved in phagocytosis such as Fc receptors, complement receptors, mannose receptors and other scavenger
 20 receptors, receptors involved in clearance of apoptotic cells such as CD36 and $\alpha\text{v}\beta 5$, dendritic cell receptors such as DEC205 and DC-light, and activators of TCR and/or BCR signalling pathways such as PMA, ionomycin or kinase inhibitors. These
 20 molecules may be used alone or in combination and may be presented on an antigen presenting cell.

In accordance with one embodiment of the present invention there is provided a method for detecting modulators of Notch signalling comprising the steps of:

- 25 (a) activating a cell of the immune system;
- (b) contacting the cell with a candidate modulator;
- (c) monitoring Notch signalling;
- (wherein steps (a), (b) and (c) can be carried out in any order); and
- (d) determining whether the candidate modulator modulates Notch signalling.

30

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

65

Preferably the activator is an anti-CD3 antibody or an anti-CD28 antibody. In more detail, T cell activation involves multiple intracellular signaling events originating from the cell surface TCR/CD3 complex. Cross-linking of the TCR/CD3 complex by anti-CD3 antibodies induces T cell activation, leading to the production of cytokines such as IL-2. IL-2 binds to its high affinity receptor to promote cell proliferation. Additionally co-stimulatory surface molecules such as CD28 have been shown to provide accessory signals in T cell activation, enhancing IL-2 production, e.g. when combined with an anti-CD3 antibody. CD28 is an antigen expressed on the surface of T cells, and is also responsible for activation of T cells.

Accessory or costimulatory signals of immune cell receptor signalling include B7 proteins such as B7.1-CD80, B7.2-CD86, B7H1, B7H2, B7H3, B7RP1, B7RP2, CTLA4, ICOS, CD2, CD24, CD27, CD28, CD30, CD34, CD38, CD40, CD44, CD45, CD49, CD69, CD70, CD95 (Fas), CD134, CD134L, CD153, CD154, 4-1BB, 4-1BB-L, LFA-I, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, OX40, OX40L, TRANCE/RANK ligands, Fas ligand, MHC class II, DEC205-CD205, CD204-Scavenger receptor, CD14, CD206 (mannose receptor), Toll-like receptors (TLRs), such as TLR 1-9, CD207 (Langerin), CD209 (DC-SIGN), FC γ receptor 2 (CD32), CD64 (FC γ receptor 1), CD68, CD83, CD33, CD54, BDCA-2, BDCA-3, BDCA-4, chemokine receptors, cytokines, growth factors and growth factor receptor agonists, and variants, derivatives, analogues and fragments thereof.

In one embodiment, the second stimulus will be a costimulus. In an alternative embodiment, expression of the target genes will depend on three separate stimuli: Notch signalling, immune cell signalling and a costimulus, all of which are described above. The signals may be delivered all at once or may be phased over a defined period (possibly separated by hours or even days). Preferably, the signals will be delivered substantially simultaneously.

30

Immune Cell Activation

Immune cell activation may be monitored by any suitable method known to those skilled in the art. For example, cytotoxic activity may be monitored. Natural killer
5 (NK) cells will demonstrate enhanced cytotoxic activity within 4 hours after activation. This cytotoxic activity is maximal after 18 hours.

Once activated, leukocytes express a variety of new cell surface antigens. NK cells, for example, will express transferrin receptor, HLA-DR and the CD25 IL-2 receptor
10 after activation. Activation may therefore be assayed by monitoring expression of these antigens.

Hara *et al.* Human T Cell Activation: III, Rapid Induction of a Phosphorylated 28 kD/32kD Disulfidelinked Early Activation Antigen (EA-1) by 12-0-tetradecanoyl
15 Phorbol-13-Acetate, Mitogens and Antigens, J. Exp. Med., 164:1988 (1986), and Cosulich *et al.* Functional Characterization of an Antigen (MLR3) Involved in an Early Step of T-Cell Activation, PNAS, 84:4205 (1987), have described cell surface antigens that are expressed on T cells shortly after activation. These antigens, EA-1 and MLR3 respectively, are glycoproteins having major components of 28kD and
20 32kD. EA-1 and MLR3 are not HLA class II antigens and an MLR3 Mab will block IL-1 binding. These antigens appear on activated T cells within 18 hours and continue to appear as late as 48 hours after activation.

These antigens may be useful in detecting leukocyte activation. Additionally,
25 leukocyte activation may be monitored as described in EP O 325 489 which is incorporated herein by reference. Briefly this is accomplished using a monoclonal antibody ("Anti-Leu23") which interacts with a cellular antigen recognised by the monoclonal antibody produced by the hybridoma designated as ATCC No. HB-9627.

30 Anti-Leu 23 recognizes a cell surface antigen on activated and antigen stimulated leukocytes. On activated NK cells, the antigen, Leu 23, is expressed within 4 hours after activation and continues to be expressed as late as 72 hours after activation. Leu

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

67

23 is a disulfide-linked homodimer composed of 24 kD subunits with at least two N-linked carbohydrates.

5 Because the appearance of Leu 23 on NK cells correlates with the development of cytotoxicity and because the appearance of Leu 23 on certain T cells correlates with stimulation of the T cell antigen receptor complex, Anti-Leu 23 is useful in monitoring the activation or stimulation of leukocytes.

10 Further details of techniques for the monitoring of immune cell activation may be found in: 'The Natural Killer Cell' Lewis C.E. and J. O'D. McGee 1992. Oxford University Press; Trinchieri G. 'Biology of Natural Killer Cells' Adv. Immunol. 1989 vol 47 pp187-376; 'Cytokines of the Immune Response' Chapter 7 in "Handbook of Immune Response Genes". Mak T.W. and J.J.L. Simard 1998, which are incorporated herein by reference.

15 Suitably the immune cell is activated with a calcium signalling agent (such as a calcium ionophore, such as ionomycin) and/or an activator of a protein kinase (eg Protein Kinase C or MAP Kinase), such as phorbol myristate acetate (PMA). Alternatively, for example, a lectin such as phytohemagglutinin (PHA) may also be used to activate T cells (Nowell, P. C. (1990) Cancer Res. 20:462-466). Alternatively, 20 for example, an antibody such as an anti-CD3, anti-T-cell Receptor antibody (anti-TCR antibody) and/or an anti-CD28 antibody may be used. A CD28 ligand, such as a protein comprising the co-activating domain of the B-cell antigen B7, may also be used.

25 Where a calcium ionophore such as ionomycin is used as activator, this may be used in concentrations of less than about 5µg/ml, preferably less than about 1000 ng/ml, preferably less than about 250 ng/ml, preferably less than about 200 ng/ml, preferably 30 less than about 100 ng/ml. Thus, for example, the concentration may range from about 0.01 ng/ml to about 5µg/ml, preferably from about 0.1 ng/ml to about 1000 ng/ml,

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

68

suitably from about 0.1 ng/ml to about 250 ng/ml, preferably from about 1 ng/ml to about 200 ng/ml.

5 Where a calcium ionophore such as ionomycin is used as activator, this may be used in concentrations of less than about 10 μ M, preferably less than about 5 μ M, preferably less than about 2 μ M, preferably less than about 0.5 μ M, preferably less than about 0.1 μ M. Suitably, for example, the ionophore is used in a range of from about 0.001 to 10 μ M, for example about 0.01 to 0.5 μ M.

10 A protein kinase activator may be used to activate the cells either in addition to or instead of a calcium ionophore. Suitably the kinase activator may be a MAP kinase activator (such as a member of one or more of the MAPKKK, MAPKK, MAPK families and their associated phosphatases, for example activators of the p38, Erk and Jnk pathways) or a protein kinase C activator (such as a phorbol ester, such as for
15 example PMA or TPA).

Where a protein kinase activator is used, this may be used in concentrations of less than about 50 nM, preferably less than about 20 nM, preferably less than about 10 nM, preferably less than about 1 nM, preferably less than about 0.1 nM. Suitably, for
20 example, the ionophore is used in a range of from about 0.001 to 10 nM, for example about 0.01 to 0.5 nM.

Preferably the immune cell is activated such as to permit at least 30% optimal, preferably at least 50% optimal, preferably at least 70% optimal, preferably at least
25 80% optimal, preferably at least 90% optimal, preferably at least 95% optimal levels of Notch or immune signalling. By "optimal" is meant the level of activation which maximises the response (as measured, for example, by reporter output) in the system used. By x% optimal is meant a level of activation which gives at least x% of the optimal response in the system used.

30

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

69

In some cases it may be desirable to operate a screen with optimal immune cell activation (for example to more readily identify inhibitors of Notch signalling) whilst in other cases it may be desirable to operate the screen with sub-optimal immune cell activation (for example to more readily identify activators of Notch signalling).

5

Likewise with Notch signalling activation, in some cases it may be desirable to operate a screen with optimal Notch activation (for example to more readily identify inhibitors of Notch signalling) whilst in other cases it may be desirable to operate the screen with sub-optimal Notch activation (for example to more readily identify activators of Notch

10 signalling).

Preferably the Notch signalling activation is such as to permit at least 30% optimal, preferably at least 50% optimal, preferably at least 70% optimal, preferably at least 80% optimal, preferably at least 90% optimal, preferably at least 95% optimal levels of Notch or immune signalling. By "optimal" is meant the level of activation which maximises the response (as measured, for example, by reporter output) in the system used. By x% optimal is meant a level of activation which gives at least x% of the optimal response in the system used.

15

20 Notch Activation

Notch signalling may be activated in the immune cell in various ways. For example, the cell may already express Notch, in which case Notch signalling may be activated by activating Notch with, for example, a Notch ligand or an active portion thereof.

25

If the cell does not naturally express Notch, or it is desired to increase the expression (and therefore the signal), the cell may be transfected with Notch and Notch signalling may be activated with, for example, a Notch ligand or an active portion thereof.

30

Alternatively, the cell may be transfected with a constitutively active truncated form of Notch, in which case activation with Notch ligand etc is not necessary to establish Notch signalling. Such truncated forms of Notch are known, for example, from Lu et

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

70

al, PNAS Vol 93, pp5663-5667 (May 1996) which is herein incorporated by reference. This document describes a truncated form of Notch wherein the extracellular domain is deleted (N1(ΔEC)).

- 5 Alternatively, the cell may be transfected with an expression vector expressing Notch intracellular domain (Notch IC) or an active part thereof, so that, once again, activation with Notch ligand etc is not necessary to establish Notch signalling.

Immune signalling

10

The term "immune signalling" as used herein includes any signalling pathway for activation of cells of the immune system, preferably leukocytes, more preferably lymphocytes, and more preferably T-cells. Preferably immune signalling relates to a signalling pathway activated by activation of the T-cell receptor, B-cell receptor or a

15 Toll-like receptor. Preferably immune signalling relates to any intracellular signalling pathway activated by activation of the T-cell receptor complex, where the term complex encompasses both protein chains of the T-cell receptor and CD3 molecules as well as membrane proteins providing costimulatory signals. These immune signalling pathways may be activated by physiological or engineered ligands for components of

20 the membrane receptor complex, or other activators of proteins of the signalling pathway acting intracellularly in the cytoplasm and/or nucleus.

- Lymphocyte activation is stimulated by clustering of their antigen receptors, by antigen/MHC complexes or antibodies to receptor components (for a general
- 25 discussion see, for example, Immunobiology (4th Edition, 1999), by Janeway, Travers, Walport and Capra, published by Elsevier Science).

- Signalling is initiated by the activation of protein tyrosine kinases, which associate with the receptor complex. Receptor clustering brings the enzymes into close
- 30 proximity with each other and components of the receptor, leading to phosphorylation of tyrosine residues in both the kinases and cytoplasmic tails of the receptor protein chains. These phosphorylation events serve to provide interaction sites for other

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

71

proteins involved in signalling and for activation of enzyme activities. Tyrosine phosphatases removing the phospho-groups from tyrosine residues are also involved in both activation events and in regulating the degree of activation.

5 Tyrosine kinases of the src family represent the first kinases involved in this receptor-mediated activation. For T-cells, *lck* and *fyn* play key initiating roles and serve to activate other tyrosine kinases such as ZAP-70. Similarly, for B-cells *fyn*, *blk* and *lyn* play similar roles, activating the kinase Syk. The receptor signalling chains of the T-cell receptor complex (CD3) or the B-cell receptor complex (*Igα/Igβ*) are tyrosine
10 phosphorylated at tyrosine containing sequences called ITAMs (immunoreceptor tyrosine-based activation motifs), which have a canonical sequence of YXX[L/V]X₇₋₁₁ YXX[L/V], where Y is tyrosine, L is leucine, V is valine and X represents any amino acid. These ITAMS serve as "docking sites" for other signalling proteins which bind via their SH2 phospho-tyrosine binding domains.

15 Several different classes of protein are recruited to these activated receptors. Phospholipase *γ* (PLC γ) is recruited and activated to produce two key signalling mediators inositol trisphosphate (IP₃) and diacyl glycerol (DAG). IP₃ causes the release of calcium ions (Ca⁺⁺) into the cytoplasm from intracellular stores which in turn
20 leads to the opening of calcium channels in the membrane that let more Ca⁺⁺ into the cell. This calcium influx serves to activate a number of calcium-binding proteins, including calmodulin and calcineurin, which together play a key role in transmitting signals to the nucleus to regulate gene transcription events, particularly activating members of the NFAT family of transcription factors. DAG participates in the
25 activation of different members of the protein kinase c (PKC) family of serine threonine kinases, some of which are also activated by Ca⁺⁺. PKC phosphorylates a number of other proteins in different signalling cascades, again mediating delivery of signals to the nucleus, especially through the activation of members of the NF κ B family of transcription factors.

30 Small GTP-binding proteins ("small G-proteins") are also involved in propagating signals from tyrosine kinase activated receptors. The best known of these is Ras.

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

72

These small G-proteins exist in two different states depending on whether they are bound to GTP or GDP. The GTP bound form of Ras is the active form of the protein, whereas GDP-bound form is inactive. Ras itself has GTPase activity so can remove a phosphate and convert Ras back to the inactive form. Small G-proteins are normally found in their inactive state and activation requires a guanine nucleotide exchange factor (GEF) which helps exchange the GDP for GTP. In lymphocytes, Ras and other small G-proteins such as Rac are recruited to activated receptors by adapter proteins recruited to ITAMs; GEFs also bound to these adapters serve to activate these G-proteins.

There are many examples of adapter proteins involved in lymphocyte signal transduction. Two major ones for T-cells are LAT and SIp-76. LAT, activated by tyrosine phosphorylation, localizes to lipid rafts in membranes and binds directly or indirectly to a number of different adapter and signal propagation molecules, such as Grb2, SOS and Ras. For B-cells, BLNK may play a similar adapter role. Another adapter protein called Vav, which also has G-protein activity, plays an important role in B-cell signalling.

Activated G-proteins such as Ras are involved in activating several protein kinase cascades known as the mitogen activated protein kinase cascades (MAP kinase pathways). These cascades lead to phosphorylation and activation of different transcription factors and hence delivers signals to guide gene expression events in the nucleus. For example, the AP-1 family of transcription factors which are heterodimers of members of the fos and jun are important targets of these MAP kinase signalling pathways.

MAP kinase signalling cascades can be generically described as being activated by an activated small G-protein through action on the first kinase of the cascade which is called a MAP kinase kinase kinase (MAPKKK). This in turn phosphorylates and activates a MAP kinase kinase (MAPKK), which then phosphorylates and activates a MAP kinase (MAPK) protein, acting on two sites, a tyrosine and a threonine separated by a single amino acid. The double phosphorylated MAPK is then both enzymically

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

73

active and able to migrate to the nucleus where it can phosphorylate transcription factors. Three major MAP kinase cascades have been defined, all of which are active in lymphocytes, which lead to the activation of the MAP kinases Erk (Erk1 and Erk2 particularly in lymphocytes), p38 and Jnk (JNK1 and JNK2 particularly in lymphocytes). Activators of Erk1 and Erk2 are called Mek1 and Mek2

Different co-receptors serve to enhance or modulate the antigen-receptor-mediated activation of lymphocytes. Examples being CD2, CD4, CD8 and CD45 in T-cells and CD19, CD21 and CD81 in B-cells. In addition co-stimulatory molecules also serve to enhance and modify the immune signalling. For example, CD28, CD40, OX40 and others can provide key signals that help determine both the quality and quantity of the cell's response. These molecules also activate signalling pathways which become integrated with signals emanating from the lymphocyte antigen receptor/co-receptor complexes, and include both tyrosine and serine/threonine kinases as well as small G-protein mediated cascades.

Different cytokines (e.g. IL-2, IL-4, IL-10, IFN γ , IL-15 etc) also play important roles in regulating the responses of lymphocytes. Receptors for these cytokines use, among other pathways, a signal transduction pathway involving receptor activated kinases called Janus kinases (JAKS), which include JAK1,2 &3 and Tyk2. These phosphorylate a family of proteins called signal transducers and activators of transcription (STATS). This phosphorylation leads to homo- and heterodimerization of STATS mediated by their SH2 domains binding to STAT phosphotyrosine motifs. These dimers then translocate to the nucleus where they activate a variety of cytokine responsive genes. This activation pathway is regulated by a set of inhibitory proteins called SOCS proteins (e.g. SOCS1,2 & 3). Different cytokines activate different STATS. For example, the IL-4 receptor activates STAT6, which in turn plays a role in activating IL-4 responsive genes such as CD23. IL-12 activates STAT4 which plays a role in regulating IFN γ gene expression.

The integration of the different signals and their relative strengths determines the nature of the transcriptional response and the gene/protein expression profile and

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

74

kinetics which in turn determines the overall nature of the response of the cell. For T-cells, for example, this will impact on the generation of effector and memory T-cell responses, different cytokine profiles and other effector functions or induce the cell to develop an unresponsive or anergic state. T-cells of different types will also have different quantitative and qualitative requirements for their different potential response states.

In APCs, different receptors can also transduce signals that regulate the activation and function of these cells. For example, Fc receptors, scavenger receptors and Toll-like receptors (TLRs) binding pathogenic material can provide signals that trigger responses in the APC that help those cells provide the right signals to the lymphocytes in order that they make the most effective response to clear the pathogen. TLRs are particularly important in this regard. TLRs (e.g. TLR1, TLR2, TLR3 etc) are activated on binding different sets of molecules, often derived from pathogens (e.g. LPS, viral RNA, CpG motifs). This leads to the binding of an adapter protein called MyD88 to the cytoplasmic tail of the TLR, which leads to the activation of a kinase cascade culminating in activation of transcription factors, particularly of the NF κ B family. These then serve to regulate the expression of genes encoding molecules that help activate and differentiate lymphocytes, particularly T-cells (e.g. surface proteins of the B7 family, cytokines such as IL-12 etc).

Assays

Assays for monitoring expression of the one or more target genes and other methods of detecting modulation of Notch signalling are described below.

The present invention preferably provides a cell-based assay for screening compounds for their ability to modulate Notch signalling. In one embodiment, the present invention provides an assay comprising the steps of:

- (a) providing a culture of immune cells;
- (b) optionally transfecting said cells with a reporter construct;
- (c) optionally transfecting said cells with a Notch gene;

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

75

- (d) exposing the cells to one or more compound(s) to be tested; and
- (e) determining the difference in Notch signalling between cells exposed to the compound(s) to be tested and cells not so exposed.

5 The assay of the present invention is set up to detect either inhibition or enhancement of Notch signalling in cells of the immune system by candidate modulators. The method comprises mixing cells of the immune system, where necessary transformed or transfected, etc. with a synthetic reporter gene, in an appropriate buffer, with a sufficient amount of candidate modulator and monitoring Notch signalling. The modulators may be
10 small molecules, proteins, antibodies or other ligands as described above. Amounts or activity of the target gene (also described above) will be measured for each compound tested using standard assay techniques and appropriate controls. Preferably the detected signal is compared with a reference signal and any modulation with respect to the reference signal measured.

15

The assay may also be run in the presence of a known antagonist of the Notch signalling pathway in order to identify compounds capable of rescuing the Notch signal.

Any one or more of appropriate targets - such as an amino acid sequence and/or
20 nucleotide sequence - may be used for identifying a compound capable of modulating the Notch signalling pathway in cells of the immune system in any of a variety of drug screening techniques. The target employed in such a test may be free in solution, affixed to a solid support, borne on a cell surface, or located intracellularly. The assay of the present invention is a cell based assay.

25

The assay of the present invention may be a screen, whereby a number of agents are tested. In one aspect, the assay method of the present invention is a high through put screen.

30 Techniques for drug screening may be based on the method described in Geysen, European Patent No. 0138855, published on September 13, 1984. In summary, large

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

76

numbers of different small peptide candidate modulators are synthesized on a solid substrate, such as plastic pins or some other surface. The peptide test compounds are reacted with a suitable target or fragment thereof and washed. Bound entities are then detected - such as by appropriately adapting methods well known in the art. A purified target can also be coated directly onto plates for use in drug screening techniques. Plates of use for high throughput screening (HTS) will be multi-well plates, preferably having 96, 384 or over 384 wells/plate. Cells can also be spread as "lawns". Alternatively, non-neutralising antibodies can be used to capture the peptide and immobilise it on a solid support. High throughput screening, as described above for synthetic compounds, can also be used for identifying organic candidate modulators.

This invention also contemplates the use of competitive drug screening assays in which neutralising antibodies capable of binding a target specifically compete with a test compound for binding to a target.

It is expected that the assay methods of the present invention will be suitable for both small and large-scale screening of test compounds as well as in quantitative assays.

Various nucleic acid assays are also known. Any conventional technique which is known or which is subsequently disclosed may be employed. Examples of suitable nucleic acid assay are mentioned below and include amplification, PCR, RT-PCR, RNase protection, blotting, spectrometry, reporter gene assays, gene chip arrays and other hybridization methods.

Target gene presence, amplification and/or expression may be measured in a sample directly, for example, by conventional Southern blotting, Northern blotting to quantitate the transcription of target mRNA, dot blotting (DNA or RNA analysis), or in situ hybridisation, using an appropriately labelled probe. Those skilled in the art will readily envisage how these methods may be modified, if desired.

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

77

Generation of nucleic acids for analysis from samples generally requires nucleic acid amplification. Many amplification methods rely on an enzymatic chain reaction (such as a polymerase chain reaction, a ligase chain reaction, or a self-sustained sequence replication) or from the replication of all or part of the vector into which it has been cloned. Preferably, the amplification according to the invention is an exponential amplification, as exhibited by for example the polymerase chain reaction.

Many target and signal amplification methods have been described in the literature, for example, general reviews of these methods in Landegren, U., et al., *Science* 242:229-237 (1988) and Lewis, R., *Genetic Engineering News* 10:1, 54-55 (1990). These amplification methods may be used in the methods of our invention, and include polymerase chain reaction (PCR), PCR in situ, ligase amplification reaction (LAR), ligase hybridisation, Qbeta bacteriophage replicase, transcription-based amplification system (TAS), genomic amplification with transcript sequencing (GAWTS), nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) and *in situ* hybridisation. Primers suitable for use in various amplification techniques can be prepared according to methods known in the art.

PCR is a nucleic acid amplification method described *inter alia* in U.S. Pat. Nos. 4,683,195 and 4,683,202. PCR consists of repeated cycles of DNA polymerase generated primer extension reactions. PCR was originally developed as a means of amplifying DNA from an impure sample. The technique is based on a temperature cycle which repeatedly heats and cools the reaction solution allowing primers to anneal to target sequences and extension of those primers for the formation of duplicate daughter strands. RT-PCR uses an RNA template for generation of a first strand cDNA with a reverse transcriptase. The cDNA is then amplified according to standard PCR protocol. Repeated cycles of synthesis and denaturation result in an exponential increase in the number of copies of the target DNA produced. However, as reaction components become limiting, the rate of amplification decreases until a plateau is reached and there is little or no net increase in PCR product. The higher the starting copy number of the nucleic acid target, the sooner this "end-point" is reached. PCR can be used to amplify

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

78

any known nucleic acid in a diagnostic context (Mok et al., (1994), Gynaecologic Oncology, 52: 247-252).

5 Self-sustained sequence replication (3SR) is a variation of TAS, which involves the isothermal amplification of a nucleic acid template via sequential rounds of reverse transcriptase (RT), polymerase and nuclease activities that are mediated by an enzyme cocktail and appropriate oligonucleotide primers (Guatelli et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874). Enzymatic degradation of the RNA of the RNA/DNA heteroduplex is used instead of heat denaturation. RNase H and all other enzymes are
10 added to the reaction and all steps occur at the same temperature and without further reagent additions. Following this process, amplifications of 10^6 to 10^9 have been achieved in one hour at 42 °C.

Ligation amplification reaction or ligation amplification system uses DNA ligase and
15 four oligonucleotides, two per target strand. This technique is described by Wu, D. Y. and Wallace, R. B. (1989) Genomics 4:560. The oligonucleotides hybridise to adjacent sequences on the target DNA and are joined by the ligase. The reaction is heat denatured and the cycle repeated.

20 Alternative amplification technology can be exploited in the present invention. For example, rolling circle amplification (Lizardi *et al.*, (1998) Nat Genet 19:225) is an amplification technology available commercially (RCATTM) which is driven by DNA polymerase and can replicate circular oligonucleotide probes with either linear or geometric kinetics under isothermal conditions.

25 In the presence of two suitably designed primers, a geometric amplification occurs via DNA strand displacement and hyperbranching to generate 10^{12} or more copies of each circle in 1 hour.

30 If a single primer is used, RCAT generates in a few minutes a linear chain of thousands of tandemly linked DNA copies of a target covalently linked to that target.

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

79

A further technique, strand displacement amplification (SDA; Walker *et al.*, (1992) PNAS (USA) 80:392) begins with a specifically defined sequence unique to a specific target. But unlike other techniques which rely on thermal cycling, SDA is an
5 isothermal process that utilises a series of primers, DNA polymerase and a restriction enzyme to exponentially amplify the unique nucleic acid sequence.

SDA comprises both a target generation phase and an exponential amplification phase.

10 In target generation, double-stranded DNA is heat denatured creating two single-stranded copies. A series of specially manufactured primers combine with DNA polymerase (amplification primers for copying the base sequence and bumper primers for displacing the newly created strands) to form altered targets capable of exponential amplification.

15 The exponential amplification process begins with altered targets (single-stranded partial DNA strands with restricted enzyme recognition sites) from the target generation phase.

20 An amplification primer is bound to each strand at its complementary DNA sequence. DNA polymerase then uses the primer to identify a location to extend the primer from its 3' end, using the altered target as a template for adding individual nucleotides. The extended primer thus forms a double-stranded DNA segment containing a complete restriction enzyme recognition site at each end.

25 A restriction enzyme is then bound to the double stranded DNA segment at its recognition site. The restriction enzyme dissociates from the recognition site after having cleaved only one strand of the double-sided segment, forming a nick. DNA polymerase recognises the nick and extends the strand from the site, displacing the
30 previously created strand. The recognition site is thus repeatedly nicked and restored by the restriction enzyme and DNA polymerase with continuous displacement of DNA strands containing the target segment.

Each displaced strand is then available to anneal with amplification primers as above. The process continues with repeated nicking, extension and displacement of new DNA strands, resulting in exponential amplification of the original DNA target.

5

In an alternative embodiment, the present invention provides for the detection of gene expression at the RNA level. Typical assay formats utilising ribonucleic acid hybridisation include nuclear run-on assays, RT-PCR and RNase protection assays (Melton *et al.*, Nuc. Acids Res. 12:7035. Methods for detection which can be employed include radioactive labels, enzyme labels, chemiluminescent labels, fluorescent labels and other suitable labels.

10

Real-time PCR uses probes labeled with a fluorescent tag or fluorescent dyes and differs from end-point PCR for quantitative assays in that it is used to detect PCR products as they accumulate rather than for the measurement of product accumulation after a fixed number of cycles. The reactions are characterized by the point in time during cycling when amplification of a target sequence is first detected through a significant increase in fluorescence.

15

The ribonuclease protection (RNase protection) assay is an extremely sensitive technique for the quantitation of specific RNAs in solution. The ribonuclease protection assay can be performed on total cellular RNA or poly(A)-selected mRNA as a target. The sensitivity of the ribonuclease protection assay derives from the use of a complementary *in vitro* transcript probe which is radiolabeled to high specific activity.

20

The probe and target RNA are hybridized in solution, after which the mixture is diluted and treated with ribonuclease (RNase) to degrade all remaining single-stranded RNA. The hybridized portion of the probe will be protected from digestion and can be visualized via electrophoresis of the mixture on a denaturing polyacrylamide gel followed by autoradiography. Since the protected fragments are analyzed by high resolution polyacrylamide gel electrophoresis, the ribonuclease protection assay can be employed to accurately map mRNA features. If the probe is hybridized at a molar

25

30

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

81

excess with respect to the target RNA, then the resulting signal will be directly proportional to the amount of complementary RNA in the sample.

5 PCR technology as described e.g. in section 14 of Sambrook et al., 1989, requires the use of oligonucleotide probes that will hybridise to target nucleic acid sequences. Strategies for selection of oligonucleotides are described below.

10 As used herein, a probe is e.g. a single-stranded DNA or RNA that has a sequence of nucleotides that includes between 10 and 50, preferably between 15 and 30 and most preferably at least about 20 contiguous bases that are the same as (or the complement of) an equivalent or greater number of contiguous bases. The nucleic acid sequences selected as probes should be of sufficient length and sufficiently unambiguous so that false positive results are minimised. The nucleotide sequences are usually based on conserved or highly homologous nucleotide sequences or regions of polypeptides. The
15 nucleic acids used as probes may be degenerate at one or more positions.

Preferred regions from which to construct probes include 5' and/or 3' coding sequences, sequences predicted to encode ligand binding sites, and the like. For example, either the full-length cDNA clone disclosed herein or fragments thereof can
20 be used as probes. Preferably, nucleic acid probes of the invention are labelled with suitable label means for ready detection upon hybridisation. For example, a suitable label means is a radiolabel. The preferred method of labelling a DNA fragment is by incorporating ³²P dATP with the Klenow fragment of DNA polymerase in a random priming reaction, as is well known in the art. Oligonucleotides are usually end-labelled
25 with ³²P-labelled ATP and polynucleotide kinase. However, other methods (e.g. non-radioactive) may also be used to label the fragment or oligonucleotide, including e.g. enzyme labelling, fluorescent labelling with suitable fluorophores and biotinylation.

Preferred are such sequences, probes which hybridise under high-stringency
30 conditions.

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

82

Stringency of hybridisation refers to conditions under which polynucleic acids hybrids are stable. Such conditions are evident to those of ordinary skill in the field. As known to those of skill in the art, the stability of hybrids is reflected in the melting temperature (T_m) of the hybrid which decreases approximately 1 to 1.5°C with every 1% decrease in sequence homology. In general, the stability of a hybrid is a function of sodium ion concentration and temperature. Typically, the hybridisation reaction is performed under conditions of higher stringency, followed by washes of varying stringency.

10 As used herein, high stringency refers to conditions that permit hybridisation of only those nucleic acid sequences that form stable hybrids in 1 M Na⁺ at 65-68 °C. High stringency conditions can be provided, for example, by hybridisation in an aqueous solution containing 6x SSC, 5x Denhardt's, 1 % SDS (sodium dodecyl sulphate), 0.1 Na⁺ pyrophosphate and 0.1 mg/ml denatured salmon sperm DNA as non specific competitor. Following hybridisation, high stringency washing may be done in several steps, with a final wash (about 30 min) at the hybridisation temperature in 0.2 - 0.1x SSC, 0.1 % SDS.

20 It is understood that these conditions may be adapted and duplicated using a variety of buffers, e.g. formamide-based buffers, and temperatures. Denhardt's solution and SSC are well known to those of skill in the art as are other suitable hybridisation buffers (see, e.g. Sambrook, et al., eds. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York or Ausubel, et al., eds. (1990) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc.). Optimal hybridisation conditions have to be determined empirically, as the length and the GC content of the hybridising pair also play a role.

Gene expression may also be detected using a reporter system. Such a reporter system may comprise a readily identifiable marker under the control of an expression system, e.g. of the gene being monitored. Fluorescent markers, which can be detected and sorted by FACS, are preferred. Especially preferred are GFP and luciferase. Another type of preferred reporter is cell surface markers, i.e. proteins expressed on the cell

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

83

surface and therefor easily identifiable. Thus, cell-based screening assays can be designed by constructing cell lines in which the expression of a reporter protein, i.e. an easily assayable protein, such as β -galactosidase, chloramphenicol acetyltransferase (CAT) or luciferase, is dependent on the activation of a Notch. For example, a reporter gene encoding one of the above polypeptides may be placed under the control of a response element which is specifically activated by Notch signalling. Alternative assay formats include assays which directly assess responses in a biological system. If a cell-based assay system is employed, the test compound(s) indentified may then be subjected to *in vivo* testing to determine their effect on Notch signalling pathway.

10

In general, reporter constructs useful for detecting Notch signalling by expression of a reporter gene may be constructed according to the general teaching of Sambrook et al (1989). Typically, constructs according to the invention comprise a promoter of the gene of interest (i.e. of an endogenous target gene), and a coding sequence encoding the desired reporter constructs, for example of GFP or luciferase. Vectors encoding GFP and luciferase are known in the art and available commercially.

Sorting of cells, based upon detection of expression of target genes, may be performed by any technique known in the art, as exemplified above. For example, cells may be sorted by flow cytometry or FACS. For a general reference, see Flow Cytometry and Cell Sorting: A Laboratory Manual (1992) A. Radbruch (Ed.), Springer Laboratory, New York.

Flow cytometry is a powerful method for studying and purifying cells. It has found wide application, particularly in immunology and cell biology: however, the capabilities of the FACS can be applied in many other fields of biology. The acronym F.A.C.S. stands for Fluorescence Activated Cell Sorting, and is used interchangeably with "flow cytometry". The principle of FACS is that individual cells, held in a thin stream of fluid, are passed through one or more laser beams, causing light to be scattered and fluorescent dyes to emit light at various frequencies. Photomultiplier tubes (PMT) convert light to electrical signals, which are interpreted by software to generate data about the cells. Sub-populations of cells with defined characteristics can

30

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

84

be identified and automatically sorted from the suspension at very high purity (~100%).

5 FACS can be used to measure target gene expression in cells transfected with recombinant DNA encoding polypeptides. This can be achieved directly, by labelling of the protein product, or indirectly by using a reporter gene in the construct. Examples of reporter genes are β -galactosidase and Green Fluorescent Protein (GFP). β -galactosidase activity can be detected by FACS using fluorogenic substrates such as fluorescein digalactoside (FDG). FDG is introduced into cells by hypotonic shock, and
10 is cleaved by the enzyme to generate a fluorescent product, which is trapped within the cell. One enzyme can therefore generate a large amount of fluorescent product. Cells expressing GFP constructs will fluoresce without the addition of a substrate. Mutants of GFP are available which have different excitation frequencies, but which emit fluorescence in the same channel. In a two-laser FACS machine, it is possible to
15 distinguish cells which are excited by the different lasers and therefore assay two transfections at the same time.

Alternative means of cell sorting may also be employed. For example, the invention comprises the use of nucleic acid probes complementary to mRNA. Such probes can
20 be used to identify cells expressing polypeptides individually, such that they may subsequently be sorted either manually, or using FACS sorting. Nucleic acid probes complementary to mRNA may be prepared according to the teaching set forth above, using the general procedures as described by Sambrook et al (1989).

25 In a preferred embodiment, the invention comprises the use of an antisense nucleic acid molecule, complementary to a target mRNA, conjugated to a fluorophore which may be used in FACS cell sorting.

30 Methods have also been described for obtaining information about gene expression and identity using so-called gene chip arrays or high density DNA arrays (Chee). These high density arrays are particularly useful for diagnostic and prognostic purposes. Use may also be made of In Vivo Expression Technology (IVET) (Camilli). IVET identifies

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

85

target genes up-regulated during say treatment or disease when compared to laboratory culture.

5 The present invention also provides a method of detection of polypeptides. The advantage of using a protein assay is that Notch activation can be directly measured. Assay techniques that can be used to determine levels of a polypeptide are well known to those skilled in the art. Such assay methods include radioimmunoassays, competitive-binding assays, protein gel assay, Western Blot analysis, antibody sandwich assays, antibody detection, FACS and ELISA assays. For example, 10 polypeptides can be detected by differential mobility on protein gels, or by other size analysis techniques, such as mass spectrometry. The detection means may be sequence-specific. For example, polypeptide or RNA molecules can be developed which specifically recognise polypeptides *in vivo* or *in vitro*.

15 For example, RNA aptamers can be produced by SELEX. SELEX is a method for the *in vitro* evolution of nucleic acid molecules with highly specific binding to target molecules. It is described, for example, in U.S. patents 5654151, 5503978, 5567588 and 5270163, as well as PCT publication WO 96/38579

20 The invention, in certain embodiments, includes antibodies specifically recognising and binding to polypeptides.

Antibodies may be recovered from the serum of immunised animals. Monoclonal antibodies may be prepared from cells from immunised animals in the conventional 25 manner.

The antibodies of the invention are useful for identifying cells expressing the genes being monitored.

30 Antibodies according to the invention may be whole antibodies of natural classes, such as IgE and IgM antibodies, but are preferably IgG antibodies. Moreover, the invention

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

86

includes antibody fragments, such as Fab, F(ab')₂, Fv and ScFv. Small fragments, such as Fv and ScFv, possess advantageous properties for diagnostic and therapeutic applications on account of their small size and consequent superior tissue distribution.

- 5 The antibodies may comprise a label. Especially preferred are labels which allow the imaging of the antibody in neural cells *in vivo*. Such labels may be radioactive labels or radioopaque labels, such as metal particles, which are readily visualisable within tissues. Moreover, they may be fluorescent labels or other labels which are visualisable in tissues and which may be used for cell sorting.

10

In more detail, antibodies as used herein can be altered antibodies comprising an effector protein such as a label. Especially preferred are labels which allow the imaging of the distribution of the antibody *in vivo*. Such labels can be radioactive labels or radioopaque labels, such as metal particles, which are readily visualisable within the body of a patient. Moreover, they can be fluorescent labels or other labels which are visualisable on tissue

15

Antibodies as described herein can be produced in cell culture. Recombinant DNA technology can be used to produce the antibodies according to established procedure, in bacterial or preferably mammalian cell culture. The selected cell culture system optionally secretes the antibody product, although antibody products can be isolated from non-secreting cells.

20

Multiplication of hybridoma cells or mammalian host cells *in vitro* is carried out in suitable culture media, which are the customary standard culture media, for example Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) or RPMI 1640 medium, optionally replenished by a mammalian serum, e.g. foetal calf serum, or trace elements and growth sustaining supplements, e.g. feeder cells such as normal mouse peritoneal exudate cells, spleen cells, bone marrow macrophages, 2-aminoethanol, insulin, transferrin, low density lipoprotein, oleic acid, or the like. Multiplication of host cells which are bacterial cells or yeast cells is likewise carried out in suitable culture media known in the art, for example for bacteria in medium LB, NZCYM, NZYM, NZM,

25

30

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

87

Terific Broth, SOB, SOC, 2 x YT, or M9 Minimal Medium, and for yeast in medium YPD, YEPD, Minimal Medium, or Complete Minimal Dropout Medium.

5 In vitro production provides relatively pure antibody preparations and allows scale-up to give large amounts of the desired antibodies. Techniques for bacterial cell, yeast or mammalian cell cultivation are known in the art and include homogeneous suspension culture, e.g. in an airlift reactor or in a continuous stirrer reactor, or immobilised or entrapped cell culture, e.g. in hollow fibres, microcapsules, on agarose microbeads or ceramic cartridges.

10 Large quantities of the desired antibodies can also be obtained by multiplying mammalian cells in vivo. For this purpose, hybridoma cells producing the desired antibodies are injected into histocompatible mammals to cause growth of antibody-producing tumours. Optionally, the animals are primed with a hydrocarbon, especially
15 mineral oils such as pristane (tetramethyl-pentadecane), prior to the injection. After one to three weeks, the antibodies are isolated from the body fluids of those mammals. For example, hybridoma cells obtained by fusion of suitable myeloma cells with antibody-producing spleen cells from Balb/c mice, or transfected cells derived from hybridoma cell line Sp2/0 that produce the desired antibodies are injected
20 intraperitoneally into Balb/c mice optionally pre-treated with pristane, and, after one to two weeks, ascitic fluid is taken from the animals.

The foregoing, and other, techniques are discussed in, for example, Kohler and Milstein, (1975) Nature 256:495-497; US 4,376,110; Harlow and Lane, Antibodies: a
25 Laboratory Manual, (1988) Cold Spring Harbor, incorporated herein by reference. Techniques for the preparation of recombinant antibody molecules is described in the above references and also in, for example, EP 0623679; EP 0368684 and EP 0436597, which are incorporated herein by reference.

30 The cell culture supernatants are screened for the desired antibodies, preferentially by an enzyme immunoassay, e.g. a sandwich assay or a dot-assay, or a radioimmunoassay.

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

88

For isolation of the antibodies, the immunoglobulins in the culture supernatants or in the ascitic fluid can be concentrated, e.g. by precipitation with ammonium sulphate, dialysis against hygroscopic material such as polyethylene glycol, filtration through
5 selective membranes, or the like. If necessary and/or desired, the antibodies are purified by the customary chromatography methods, for example gel filtration, ion-exchange chromatography, chromatography over DEAE-cellulose and/or (immuno-) affinity chromatography, e.g. affinity chromatography with the target antigen, or with Protein-A.

10

The antibody is preferably provided together with means for detecting the antibody, which can be enzymatic, fluorescent, radioisotopic or other means. The antibody and the detection means can be provided for simultaneous, simultaneous separate or sequential use, in a kit.

15

The antibodies of the invention are assayed for immunospecific binding by any method known in the art. The immunoassays which can be used include but are not limited to competitive and non-competitive assay systems using techniques such as western blots, radioimmunoassays, ELISA, sandwich immunoassays,
20 immunoprecipitation assays, precipitin reactions, gel diffusion precipitin reactions, immunodiffusion assays, agglutination assays, complement-fixation assays, immunoradiometric assays, fluorescent immunoassays and protein A immunoassays. Such assays are routine in the art (see, for example, Ausubel et al, eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York, which is
25 incorporated by reference herein in its entirety). Exemplary immunoassays are described briefly below.

Immunoprecipitation protocols generally comprise lysing a population of cells in a lysis buffer such as RIPA buffer (1% NP-40 or Triton X-100, 1% sodium
30 deoxycholate, 0.1% SDS, 0.15 M NaCl, 0.01 M sodium phosphate at pH 7.2, 1% Trasylol) supplemented with protein phosphatase and/or protease inhibitors (e. g.,

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

89

EDTA, PMSF, aprotinin, sodium vanadate), adding the antibody of interest to the cell lysate, incubating for a period of time (e. g., 1-4 hours) at 4 °C, adding protein A and/or protein G sepharose beads to the cell lysate, incubating for about an hour or more at 4 °C, washing the beads in lysis buffer and resuspending the beads in SDS/sample buffer. The ability of the antibody of interest to immunoprecipitate a particular antigen can be assessed by, e. g., western blot analysis.

Western blot analysis generally comprises preparing protein samples, electrophoresis of the protein samples in a polyacrylamide gel (e. g., 8%-20% SDS-PAGE depending on the molecular weight of the antigen), transferring the protein sample from the polyacrylamide gel to a membrane such as nitrocellulose, PVDF or nylon, blocking the membrane in blocking solution (e. g., PBS with 3% BSA or non-fat milk), washing the membrane in washing buffer (e. g., PBS-Tween 20), exposing the membrane to a primary antibody (the antibody of interest) diluted in blocking buffer, washing the membrane in washing buffer, exposing the membrane to a secondary antibody (which recognises the primary antibody, e. g., an antihuman antibody) conjugated to an enzymatic substrate (e. g., horseradish peroxidase or alkaline phosphatase) or radioactive molecule (e. g., ³²P or ¹²⁵I) diluted in blocking buffer, washing the membrane in wash buffer, and detecting the presence of the antigen.

ELISAs generally comprise preparing antigen, coating the well of a 96 well microtitre plate with the antigen, adding the antibody of interest conjugated to a detectable compound such as an enzymatic substrate (e. g., horseradish peroxidase or alkaline phosphatase) to the well and incubating for a period of time, and detecting the presence of the antigen. In ELISAs the antibody of interest does not have to be conjugated to a detectable compound; instead, a second antibody (which recognises the antibody of interest) conjugated to a detectable compound can be added to the well. Further, instead of coating the well with the antigen, the antibody can be coated to the well. In this case, a second antibody conjugated to a detectable compound can be added following the addition of the antigen of interest to the coated well.

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

90

It is convenient when running assays to immobilise one of more of the reactants, particularly when the reactant is soluble. In the present case it may be convenient to immobilise any one of more of the candidate modulator, Notch ligand, immune cell activator or immune cell costimulus. Immobilisation approaches include covalent
5 immobilisation, such as using amine coupling, surface thiol coupling, ligand thiol coupling and aldehyde coupling, and high affinity capture which relies on high affinity binding of a ligand to an immobilised capturing molecule. Example of capturing molecules include: streptavidin, anti-mouse Ig antibodies, ligand-specific antibodies, protian A, protein G and Tag-specific capture. In one embodiment, immobilisation is
10 achieved through binding to a support, particularly a particulate support which is preferably in the form of a bead.

For assays involving monitoring or detection of tolerised T-cells for use in clinical applications, the assay will generally involve removal of a sample from a patient prior to
15 the step of detecting a signal resulting from cleavage of the intracellular domain.

The invention additionally provides a method of screening for a candidate modulator of Notch signalling, the method comprising mixing in a buffer an appropriate amount of Notch, wherein Notch is suitably labelled with detection means for monitoring cleavage
20 of Notch; and a sample of a candidate ligand; and monitoring any cleavage of Notch.

As used herein, the term "sample" refers to a collection of inorganic, organic or biochemical molecules which is either found in nature (e.g., in a biological- or other specimen) or in an artificially-constructed grouping, such as agents which may be
25 found and/or mixed in a laboratory. The biological sample may refer to a whole organism, but more usually to a subset of its tissues, cells or component parts (e.g. body fluids, including but not limited to blood, mucus, saliva and urine).

The present invention provides a method of detecting novel modulators of Notch

signalling. The modulators identified may be used as therapeutic agents -- i.e. in therapy applications.

TH2 modulation

5

The humoral/TH2 branch of the immune system is generally directed at protecting against extracellular immunogens such as bacteria and parasites through the production of antibodies by B cells; whereas the cellular/TH1 branch is generally directed at intracellular immunogens such as viruses and cancers through the activity of natural killer cells, cytotoxic T lymphocytes and activated macrophages (US 6039969). TH2 cells are believed to produce cytokines which stimulate production of IgE antibodies, as well as to be involved with recruitment, proliferation, differentiation, maintenance and survival of eosinophils, which can result in eosinophilia. Eosinophilia is a hallmark of many TH2 mediated diseases, such as asthma, allergy, and atopic dermatitis.

Some diseases that are thought to be caused/mediated in substantial part by TH2 immune response, IL-4/IL-5 cytokine induction, and/or eosinophilia include asthma, allergic rhinitis, systemic lupus erythematosus, Ommen's syndrome (hypereosinophilia syndrome), certain parasitic infections, for example, cutaneous and systemic leishmaniasis, toxoplasma infection and trypanosome infection, and certain fungal infections, for example candidiasis and histoplasmosis, and certain intracellular bacterial infections, such as leprosy and tuberculosis. Additionally, it should also be noted that diseases having a viral or cancer related basis, but with a significant TH2 mediated pathology can also be beneficially treated according to the present invention.

Recent evidence indicates that the immune system can be broken down into two major arms, the humoral and cellular arms. The humoral arm is important in eliminating extracellular pathogens such as bacteria and parasites through production of antibodies by B cells. On the other hand, the cellular arm is important in the elimination of intracellular pathogens such as viruses through the activity of natural killer cells, cytotoxic T lymphocytes and activated macrophages. In recent years it has become

apparent that these two arms are activated through distinct T helper cell (TH) populations and their distinct cytokine production profiles. T helper type 1 (TH1) cells are believed to enhance the cellular arm of the immune response and produce predominately the cytokines IL-2 and IFN- γ ; whereas, T helper 2 (TH2) cells
5 are believed to enhance the humoral arm of the immune response and produce cytokines, such as interleukin-3 (IL-3), interleukin-4 (IL-4), interleukin-5 (IL-5) and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). In the TH2 case, IL-3, IL-5 and GM-CSF are thought to stimulate eosinophilopoiesis. In addition, IL-5 facilitates terminal differentiation and cell proliferation of eosinophils and promotes
10 survival, viability and migration of eosinophils, while IL-4 stimulates production of antibodies of the IgE class. IgE is an important component in allergies and asthma. IL-5 may also prime eosinophils for the subsequent actions of other mediators.

In contrast, the TH1 cytokines, IL-2 and IFN γ , are important in activating
15 macrophages, NK cells and CTL (cytotoxic T lymphocytes). IFN γ also stimulates B cells to secrete specifically cytophilic antibody for the elimination of virally-infected cells. Interestingly, IFN α a macrophage-derived cytokine has been shown to antagonize TH2-type responses. IFN α also appears to inhibit the proliferation and cytokine production of TH2 cells and enhances IFN γ
20 production by TH1 cells. In addition, IFN α also appears to inhibit IgE production and antigen-induced increases in IL4 mRNA levels.

One common feature of many TH2 mediated diseases is an accumulation of eosinophils, referred to as eosinophilia. For example, chronic pulmonary inflammation
25 involving eosinophil infiltration is a characteristic hallmark feature of bronchial asthma. Increased numbers of eosinophils have been observed in blood, bronchoalveolar lavage fluid and pulmonary tissue in patients with asthma, but the mechanism(s) responsible for their recruitment into and regulation within pulmonary tissues undergoing allergic or pro-inflammatory reactions has not been fully
30 understood. Mediators and cytokines from T-lymphocytes and effector cells such as basophils, mast cells, macrophages and eosinophils have been implicated in enhancing cell maturation, chemotaxis and activation of eosinophils. Evidence suggests that an

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

93

association exists between the immune system, especially CD4+ T cells, and eosinophils and eosinophil recruitment. Studies in asthmatics and in animal models of allergic pulmonary responses support this notion with the evidence of close correlations between the relative numbers of T cells and activated eosinophils in the
5 airways.

Examples of diseases which may be treated by reducing a TH2 response according to the present invention include include asthma, allergy, atopic dermatitis, early HIV disease, infectious mononucleosis, systemic lupus erythematosus, parasitic infections,
10 for example, cutaneous and systemic leishmaniasis, Toxoplasma infection and Trypanosome infection, certain fungal infections, for example Candidiasis and Histoplasmosis, and intracellular bacterial infections, such as leprosy and tuberculosis.

15 TNF modulation

At least two TNFs have been previously described, specifically TNF alpha (TNF alpha) and TNF beta (TNF beta or lymphotoxin), and each is active as a trimeric molecule and is believed to initiate cellular signaling by crosslinking receptors
20 (Engelmann et al. (1990), J. Biol. Chem., 265:14497-14504).

Several lines of evidence implicate TNF alpha and TNF beta as major inflammatory cytokines. These known TNFs have important physiological effects on a number of different target cells which are involved in inflammatory responses to a variety of
25 stimuli such as infection and injury. The proteins cause both fibroblasts and synovial cells to secrete latent collagenase and prostaglandin E2 and cause osteocyte cells to stimulate bone resorption. These proteins increase the surface adhesive properties of endothelial cells for neutrophils. They also cause endothelial cells to secrete coagulant activity and reduce their ability to lyse clots. In addition they redirect the activity of
30 adipocytes away from the storage of lipids by inhibiting expression of the enzyme lipoprotein lipase. TNFs also cause hepatocytes to synthesize a class of proteins known as "acute phase reactants," which act on the hypothalamus as pyrogens (Selby et al.

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

94

(1988), *Lancet*, 1 (8583):483; Starnes, Jr. et al. (1988), *J. Clin. Invest.*, 82:1321; Oliff et al. (1987), *Cell*, 50:555; and Waage et al. (1987), *Lancet*, 1 (8529):355).

Particular examples of diseases which may be treated according to the present invention include, for example:

- (A) acute and chronic immune and autoimmune pathologies, such as systemic lupus erythematosus (SLE) rheumatoid arthritis, rheumatoid spondylitis, osteoarthritis, gouty arthritis and other arthritic conditions, thyroidosis, graft versus host disease, scleroderma, diabetes mellitus, Graves' disease, Bescher's disease, and the like;
- (B) infections, including, but not limited to, sepsis syndrome, general sepsis, gram-negative sepsis, septic shock, endotoxic shock, toxic shock syndrome, cachexia, circulatory collapse and shock resulting from acute or chronic bacterial infection, acute and chronic parasitic and/or infectious diseases, bacterial, viral or fungal, such as a HIV, AIDS (including symptoms of cachexia, autoimmune disorders, AIDS dementia complex and infections), fever and myalgias due to bacterial or viral infections;
- (C) inflammatory diseases, such as chronic inflammatory pathologies and vascular inflammatory pathologies, including chronic inflammatory pathologies such as sarcoidosis, chronic inflammatory bowel disease, ulcerative colitis, and Crohn's pathology and vascular inflammatory pathologies, such as, but not limited to, disseminated intravascular coagulation, atherosclerosis, and Kawasaki's pathology;
- (D) neurodegenerative diseases, including, but are not limited to, demyelinating diseases, such as multiple sclerosis and acute transverse myelitis; extrapyramidal and cerebellar disorders such as lesions of the corticospinal system; disorders of the basal ganglia or cerebellar disorders; hyperkinetic movement disorders such as Huntington's Chorea and senile chorea; drug-induced movement disorders, such as those induced by drugs which block CNS dopamine receptors; hypokinetic movement disorders, such as Parkinson's disease; Progressive supranucleo palsy;

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

95

- Cerebellar and Spinocerebellar Disorders, such as structural lesions of the cerebellum; spinocerebellar degenerations (spinal ataxia, Friedreich's ataxia, cerebellar cortical degenerations, multiple systems degenerations (Mencel, Dejerine-Thomas, Shi-Drager, and Machado-Joseph)); and systemic disorders
- 5 (Refsum's disease, abetalipoproteinemia, ataxia, telangiectasia, and mitochondrial multi system disorder); demyelinating core disorders, such as multiple sclerosis, acute transverse myelitis; disorders of the motor unit, such as neurogenic muscular atrophies (anterior horn cell degeneration, such as amyotrophic lateral sclerosis, infantile spinal muscular atrophy and juvenile spinal muscular atrophy);
- 10 Alzheimer's disease; Down's Syndrome in middle age; Diffuse Lewy body disease; Senile Dementia of Lewy body type; Wernicke-Korsakoff syndrome; chronic alcoholism; Creutzfeldt-Jakob disease; Subacute sclerosing panencephalitis, Hallerorden-Spatz disease; and Dementia pugilistica, or any subset thereof;
- 15 (E) malignant pathologies involving TNF-secreting tumors or other malignancies involving TNF, such as, but not limited to leukemias (acute, chronic myelocytic, chronic lymphocytic and/or myelodysplastic syndrome); lymphomas (Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphomas, such as malignant lymphomas (Burkitt's lymphoma or Mycosis fungoides)); carcinomas (such as colon carcinoma) and
- 20 metastases thereof; cancer-related angiogenesis; infantile haemangiomas;
- (F) alcohol-induced hepatitis; and
- (G) other diseases related to angiogenesis or VEGF/VPF, such as ocular
- 25 neovascularization, psoriasis, duodenal ulcers, angiogenesis of the female reproductive tract.
- (H) cardiovascular conditions such as atherosclerosis, congestive heart failure, stroke and vasculitis
- 30

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

96

(I) pulmonary diseases such as adult respiratory distress syndrome (ARDS), chronic pulmonary inflammatory disease, silicosis, asbestosis and pulmonary sarcoidosis.

5 In one embodiment the present invention may be used to treat a "TNF-mediated disease" A disease or medical condition may be considered to be a " TNF -mediated disease" if the spontaneous or experimental disease is associated with elevated levels of TNF in bodily fluids or in tissues adjacent to the focus of the disease or indication within the body.

10

Diseases such as rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis are chronic joint diseases that afflict and disable, to varying degrees, millions of people worldwide. Rheumatoid arthritis is a disease of articular joints in which the cartilage and bone are slowly eroded away by a proliferative, invasive connective tissue called pannus, which is derived from the synovial membrane. The disease may involve peri-articular structures such as bursae, tendon sheaths and tendons as well as extra-articular tissues such as the subcutis, cardiovascular system, lungs, spleen, lymph nodes, skeletal muscles, nervous system (central and peripheral) and eyes (Silberberg (1985), Anderson's Pathology, Kissane (ed.), II:1828).

20

There is a wide spectrum of disease severity, but many patients run a course of intermittent relapses and remissions with an overall pattern of slowly progressive joint destruction and deformity. The clinical manifestations may include symmetrical polyarthritis of peripheral joints with pain, tenderness, swelling and loss of function of affected joints; morning stiffness; and loss of cartilage, erosion of bone matter and subluxation of joints after persistent inflammation. Extra-articular manifestations include rheumatoid nodules, rheumatoid vasculitis, pleuropulmonary inflammations, scleritis, sicca syndrome, Felty's syndrome (splenomegaly and neutropenia), osteoporosis and weight loss (Katz (1985), Am. J. Med., 79:24 and Krane and Simon (1986), Advances in Rheumatology, Synderman (ed.), 70(2):263-284). The clinical manifestations result in a high degree of morbidity resulting in disturbed daily life of the patient.

30

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

97

Therapy

5 The term "therapy" includes curative effects, alleviation effects, and prophylactic effects. The therapy may be on humans or animals.

Modulators identified by the assay method of the present invention may be used to treat disorders and/or conditions of the immune system. In particular, the compounds can be used in the treatment of T cell mediated diseases or disorders. A detailed description of the conditions affected by the Notch signalling pathway may be found in our WO98/20142, WO00/36089 and WO/00135990.

Diseased or infectious states that may be described as being mediated by T cells include, but are not limited to, any one or more of asthma, allergy, tumour induced aberrations to the T cell system and infectious diseases such as those caused by Plasmodium species, 10 Microfilariae, Helminths, Mycobacteria, HIV, Cytomegalovirus, Pseudomonas, Toxoplasma, Echinococcus, Haemophilus influenza type B, measles, Hepatitis C or Toxocara. Thus particular conditions that may be treated or prevented which are mediated by T cells include multiple sclerosis, rheumatoid arthritis and diabetes. The present invention may also be used in organ transplantation or bone marrow 15 transplantation. The present invention is also useful in treating immune disorders such as autoimmune disorders or graft rejection such as allograft rejection.

Examples of autoimmune disorders range from organ specific diseases (such as thyroiditis, insulinitis, multiple sclerosis, iridocyclitis, uveitis, orchitis, hepatitis, 20 Addison's disease, myasthenia gravis) to systemic illnesses such as rheumatoid arthritis or lupus erythematosus. Other disorders include immune hyperreactivity, such as allergic reactions.

In more detail, organ-specific autoimmune diseases include multiple sclerosis, insulin 25 dependent diabetes mellitus, several forms of anemia (aplastic, hemolytic), autoimmune hepatitis, thyroiditis, insulinitis, iridocyclitis, skleritis, uveitis, orchitis,

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

98

myasthenia gravis, idiopathic thrombocytopenic purpura, inflammatory bowel diseases (Crohn's disease, ulcerative colitis).

Systemic autoimmune diseases include: rheumatoid arthritis, juvenile arthritis,
 5 scleroderma and systemic sclerosis, sjogren's syndrom, undifferentiated connective
 tissue syndrome, antiphospholipid syndrome, different forms of vasculitis
 (polyarteritis nodosa, allergic granulomatosis and angiitis, Wegner's granulomatosis,
 Kawasaki disease, hypersensitivity vasculitis, Henoch-Schoenlein purpura, Behcet's
 Syndrome, Takayasu arteritis, Giant cell arteritis, Thrombangiitis obliterans), lupus
 10 erythematosus, polymyalgia rheumatica, essentiell (mixed) cryoglobulinemia,
 Psoriasis vulgaris and psoriatic arthritis, diffus fasciitis with or without eosinophilia,
 polymyositis and other idiopathic inflammatory myopathies, relapsing panniculitis,
 relapsing polychondritis, lymphomatoid granulomatosis, erythema nodosum,
 ankylosing spondylitis, Reiter's syndrome, different forms of inflammatory dermatitis.

15 A more extensive list of disorders includes: unwanted immune reactions and
 inflammation including arthritis, including rheumatoid arthritis, inflammation
 associated with hypersensitivity, allergic reactions, asthma, systemic lupus
 erythematosus, collagen diseases and other autoimmune diseases, inflammation
 20 associated with atherosclerosis, arteriosclerosis, atherosclerotic heart disease,
 reperfusion injury, cardiac arrest, myocardial infarction, vascular inflammatory
 disorders, respiratory distress syndrome or other cardiopulmonary diseases,
 inflammation associated with peptic ulcer, ulcerative colitis and other diseases of the
 gastrointestinal tract, hepatic fibrosis, liver cirrhosis or other hepatic diseases,
 25 thyroiditis or other glandular diseases, glomerulonephritis or other renal and urologic
 diseases, otitis or other oto-rhino-laryngological diseases, dermatitis or other dermal
 diseases, periodontal diseases or other dental diseases, orchitis or epididimo-orchitis,
 infertility, orchidal trauma or other immune-related testicular diseases, placental
 dysfunction, placental insufficiency, habitual abortion, eclampsia, pre-eclampsia and
 30 other immune and/or inflammatory-related gynaecological diseases, posterior uveitis,
 intermediate uveitis, anterior uveitis, conjunctivitis, chorioretinitis, uveoretinitis, optic
 neuritis, intraocular inflammation, e.g. retinitis or cystoid macular oedema,

- sympathetic ophthalmia, scleritis, retinitis pigmentosa, immune and inflammatory components of degenerative fundus disease, inflammatory components of ocular trauma, ocular inflammation caused by infection, proliferative vitreo-retinopathies, acute ischaemic optic neuropathy, excessive scarring, e.g. following glaucoma
- 5 filtration operation, immune and/or inflammation reaction against ocular implants and other immune and inflammatory-related ophthalmic diseases, inflammation associated with autoimmune diseases or conditions or disorders where, both in the central nervous system (CNS) or in any other organ, immune and/or inflammation suppression would be beneficial, Parkinson's disease, complication and/or side effects from treatment of
- 10 Parkinson's disease, AIDS-related dementia complex HIV-related encephalopathy, Devic's disease, Sydenham chorea, Alzheimer's disease and other degenerative diseases, conditions or disorders of the CNS, inflammatory components of stokes, post-polio syndrome, immune and inflammatory components of psychiatric disorders, myelitis, encephalitis, subacute sclerosing pan-encephalitis, encephalomyelitis, acute
- 15 neuropathy, subacute neuropathy, chronic neuropathy, Guillain-Barre syndrome, Sydenham chora, myasthenia gravis, pseudo-tumour cerebri, Down's Syndrome, Huntington's disease, amyotrophic lateral sclerosis, inflammatory components of CNS compression or CNS trauma or infections of the CNS, inflammatory components of muscular atrophies and dystrophies, and immune and inflammatory related diseases,
- 20 conditions or disorders of the central and peripheral nervous systems, post-traumatic inflammation, septic shock, infectious diseases, inflammatory complications or side effects of surgery or organ, inflammatory and/or immune complications and side effects of gene therapy, e.g. due to infection with a viral carrier, or inflammation associated with AIDS, to suppress or inhibit a humoral and/or cellular immune
- 25 response, to treat or ameliorate monocyte or leukocyte proliferative diseases, e.g. leukaemia, by reducing the amount of monocytes or lymphocytes, for the prevention and/or treatment of graft rejection in cases of transplantation of natural or artificial cells, tissue and organs such as cornea, bone marrow, organs, lenses, pacemakers, natural or artificial skin tissue.
- 30
- The present invention is also useful in cancer therapy, particularly in diseases involving the conversion of epithelial cells to cancer. In particular, the invention may

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

100

- be useful in increasing immune response to cancer by modulating production of key cytokines, for example by use of an inhibitor of Notch signalling. The present invention is especially useful in relation to adenocarcinomas such as: small cell lung cancer, and cancer of the kidney, uterus, prostate, bladder, ovary, colon and breast.
- 5 Thus, the present application has application in the treatment of malignant and pre-neoplastic disorders. The present invention is especially useful in relation to adenocarcinomas such as: small cell lung cancer, and cancer of the kidney, uterus, prostate, bladder, ovary, colon and breast. For example, malignancies which may be treatable according to the present invention include acute and chronic leukemias,
- 10 lymphomas, myelomas, sarcomas such as Fibrosarcoma, myxosarcoma, liposarcoma, lymphangi endotheliosarcoma, angiosarcoma, endotheliosarcoma, chondrosarcoma, osteogenic sarcoma, chordoma, lymphangiosarcoma, synovioma, mesothelioma, leiomyosarcoma, rhabdomyosarcoma, colon carcinoma, ovarian cancer, prostate cancer, pancreatic cancer, breast cancer, squamous cell carcinoma, basal cell carcinoma,
- 15 adenocarcinoma, sweat gland carcinoma, sebaceous gland carcinoma, papillary carcinoma, papillary adenocarcinomas, cystadenocarcinoma, medullary carcinoma, bronchogenic carcinoma, choriocarcinoma, renal cell carcinoma, hepatoma, bile duct carcinoma seminoma, embryonal carcinoma, cervical cancer, testicular tumour, lung carcinoma, small cell lung carcinoma, bladder carcinoma, epithelial carcinoma,
- 20 glioma, astrocytoma, ependymoma, pinealoma, hemangioblastoma, acoustic neuroma, medulloblastoma, craniopharyngioma, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma and retinoblastoma.

Pharmaceutical Compositions

- 25 The present invention provides a pharmaceutical composition comprising administering a therapeutically effective amount of at least one compound identified by the method of the present invention and a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipients (including combinations thereof).
- 30 The pharmaceutical compositions may be for human or animal usage in human and veterinary medicine and will typically comprise any one or more of a pharmaceutically

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

101

- acceptable diluent, carrier, or excipient. Acceptable carriers or diluents for therapeutic use are well known in the pharmaceutical art, and are described, for example, in Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985). The choice of pharmaceutical carrier, excipient or diluent can be selected with regard to the intended route of administration and standard pharmaceutical practice. The pharmaceutical compositions may comprise as - or in addition to - the carrier, excipient or diluent any suitable binder(s), lubricant(s), suspending agent(s), coating agent(s), solubilising agent(s).
- 10 Preservatives, stabilizers, dyes and even flavoring agents may be provided in the pharmaceutical composition. Examples of preservatives include sodium benzoate, sorbic acid and esters of p-hydroxybenzoic acid. Antioxidants and suspending agents may be also used.
- 15 There may be different composition/formulation requirements dependent on the different delivery systems. By way of example, the pharmaceutical composition of the present invention may be formulated to be delivered using a mini-pump or by a mucosal route, for example, as a nasal spray or aerosol for inhalation or ingestible solution, or parenterally in which the composition is formulated by an injectable form,
- 20 for delivery, by, for example, an intravenous, intramuscular or subcutaneous route. Alternatively, the formulation may be designed to be delivered by both routes.

- Where the compound is to be delivered mucosally through the gastrointestinal mucosa, it should be able to remain stable during transit through the gastrointestinal tract; for example, it should be resistant to proteolytic degradation, stable at acid pH and resistant to the detergent effects of bile.

- Where appropriate, the pharmaceutical compositions can be administered by inhalation, in the form of a suppository or pessary, topically in the form of a lotion, solution, cream, ointment or dusting powder, by use of a skin patch, orally in the form of tablets containing excipients such as starch or lactose, or in capsules or ovules either alone or in admixture with excipients, or in the form of elixirs, solutions or

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

102

suspensions containing flavouring or colouring agents, or they can be injected parenterally, for example intravenously, intramuscularly or subcutaneously. For parenteral administration, the compositions may be best used in the form of a sterile aqueous solution which may contain other substances, for example enough salts or monosaccharides to make the solution isotonic with blood. For buccal or sublingual administration the compositions may be administered in the form of tablets or lozenges which can be formulated in a conventional manner.

Administration

10

Typically, a physician will determine the actual dosage which will be most suitable for an individual subject and it will vary with the age, weight and response of the particular patient. The dosages below are exemplary of the average case. There can, of course, be individual instances where higher or lower dosage ranges are merited.

15

The compositions of the present invention may be administered by direct injection. The composition may be formulated for parenteral, mucosal, intramuscular, intravenous, subcutaneous, intraocular or transdermal administration.

20

The term "administered" includes delivery by viral or non-viral techniques. Viral delivery mechanisms include but are not limited to adenoviral vectors, adeno-associated viral (AAV) vectors, herpes viral vectors, retroviral vectors, lentiviral vectors, and baculoviral vectors. Non-viral delivery mechanisms include lipid mediated transfection, liposomes, immunoliposomes, lipofectin, cationic facial amphiphiles (CFAs) and combinations thereof. The routes for such delivery mechanisms include but are not limited to mucosal, nasal, oral, parenteral, gastrointestinal, topical, or sublingual routes.

25

30

The term "administered" includes but is not limited to delivery by a mucosal route, for example, as a nasal spray or aerosol for inhalation or as an ingestible solution; a parenteral route where delivery is by an injectable form, such as, for example, an intravenous, intramuscular, intradermal, intra-articular, intrathecal, intra-peritoneal or

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

103

subcutaneous route, or via the alimentary tract (for example, via the Peyers patches).

The routes of administration and dosages described are intended only as a guide since a skilled practitioner will be able to determine readily the optimum route of administration and dosage for any particular patient depending on, for example, the age, weight and condition of the patient. Preferably the pharmaceutical compositions are in unit dosage form. The present invention includes both human and veterinary applications.

10 Preparation of Primed APCs and Lymphocytes

According to one aspect of the invention immune cells may be used to present antigens or allergens and/or may be treated to modulate expression or interaction of Notch, a Notch ligand or the Notch signalling pathway. Thus, for example, Antigen Presenting Cells (APCs) may be cultured in a suitable culture medium such as DMEM or other defined media, optionally in the presence of a serum such as fetal calf serum. Optimum cytokine concentrations may be determined by titration. One or more substances capable of up-regulating or down-regulating the Notch signalling pathway are then typically added to the culture medium together with the antigen of interest. The antigen may be added before, after or at substantially the same time as the substance(s). Cells are typically incubated with the substance(s) and antigen for at least one hour, preferably at least 3 hours, if necessary for at least 12 hours or more at 37°C. If required, a small aliquot of cells may be tested for modulated target gene expression as described above. Alternatively, cell activity may be measured by the inhibition of T cell activation by monitoring surface markers, cytokine secretion or proliferation as described in WO98/20142. APCs transfected with a nucleic acid construct directing the expression of, for example Serrate, may be used as a control.

As discussed above, polypeptide substances may be administered to APCs by introducing nucleic acid constructs/viral vectors encoding the polypeptide into cells under conditions that allow for expression of the polypeptide in the APC. Similarly, nucleic acid constructs encoding antigens may be introduced into the APCs by transfection, viral

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

104

infection or viral transduction. The resulting APCs that show increased levels of a Notch signalling are now ready for use.

The techniques described below are described in relation to T cells, but are equally applicable to B cells. The techniques employed are essentially identical to that described for APCs alone except that T cells are generally co-cultured with the APCs. However, it may be preferred to prepare primed APCs first and then incubate them with T cells. For example, once the primed APCs have been prepared, they may be pelleted and washed with PBS before being resuspended in fresh culture medium. This has the advantage that if, for example, it is desired to treat the T cells with a different substance(s) capable of modulating Notch to that used with the APC, then the T cell will not be brought into contact with the different substance(s) used in the APC. Alternatively, the T cell may be incubated with a first substance (or set of substances) to modulate Notch signalling, washed, resuspended and then incubated with the primed APC in the absence of both the substance(s) used to modulate the APC and the substance(s) used to modulate the T cell. Alternatively, T cells may be cultured and primed in the absence of APCs by use of APC substitutes such as anti-TCR antibodies (e.g. anti-CD3) with or without antibodies to costimulatory molecules (e.g. anti-CD28) or alternatively T cells may be activated with MHC-peptide complexes (e.g. tetramers).

Incubations will typically be for at least 1 hour, preferably at least 3 or 6 hours, in suitable culture medium at 37°C. Induction of immunotolerance may be determined by subsequently challenging T cells with antigen and measuring IL-2 production compared with control cells not exposed to APCs.

T cells or B cells which have been primed in this way may be used according to the invention to induce immunotolerance in other T cells or B cells.

The present invention will now further be described with reference to the following non-limiting Examples:

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

105

Example 1**CD4+ cell purification**

5 Splenic were removed from mice (variously Balb/c females, 8-10 weeks, C57B/6 females, 8-10 weeks, CARD1 females, 8-10 weeks (D011.10 transgenic, CAR transgenic)) and passed through a 0.2µm cell strainer into 20ml R10F medium (R10F-RPMI 1640 media (Gibco Cat No 22409) plus 2mM L-glutamine, 50µg/ml Penicillin, 50µg/ml Streptomycin, 5×10^{-5} M β -mercapto-ethanol in 10% fetal calf serum). The cell suspension was spun (1150rpm 5min) and the media removed.

10 The cells were incubated for 4 minutes with 5ml ACK lysis buffer (0.15M NH₄Cl, 1.0M KHC0₃, 0.1mM Na₂EDTA in double distilled water) per spleen (to lyse red blood cells). The cells were then washed once with R10F medium and counted. CD4+ cells were purified from the suspensions by positive selection on a Magnetic Associated Cell Sorter (MACS) column (Miltenyi Biotec, Bisley, UK: Cat No 130-042-401) using CD4 (L3T4) beads (Miltenyi Biotec Cat No 130-049-201), according to the manufacturer's directions.

Example 2**Antibody Coating**

The following protocols were used for coating 96 well flat-bottomed plates with antibodies.

25 A) The plates were coated with Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) plus 1µg/ml anti-CD3 antibody (Pharmingen, San Diego, US: Cat No 553058, Clone No 145-2C11) plus 1µg/ml anti-IgG4 antibody (Pharmingen Cat No 555878). 100µl of coating mixture was used per well. Plates were incubated overnight at 4°C then washed with DPBS. Each well then received either 100µl DPBS or 100µl DPBS plus

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

106

10µg/ml Notch ligand (mouse Delta 1 extracellular domain/Ig4Fc fusion protein; Fc-delta).

5 The plates were incubated for 2-3 hours at 37°C then washed again with DPBS before cells (prepared as in Example 1) were added.

B) Alternatively, the plates were coated with DPBS plus 1µg/ml anti-hamsterIgG antibody (Pharmingen Cat No 554007) plus 1µg/ml anti-IgG4 antibody. 100µl of coating mixture was added per well. Plates were incubated overnight at 4°C then
10 washed with DPBS. Each well then received either 100µl DPBS plus anti-CD3 antibody (1µg/ml) or, 100µl DPBS plus anti-CD3 antibody (1µg/ml) plus Fc-delta (10µg/ml). The plates were incubated for 2-3 hours at 37°C then washed again with DPBS before cells (prepared as in Example 1) were added.

15 **Example 3**

Primary Polyclonal Stimulation

CD4⁺ cells were cultured in 96 well, flat-bottomed plates pre-coated according to Example 2 (A) or 2 (B). Cells were re-suspended, following counting, at 2×10^6 /ml in
20 R10F medium plus 4µg/ml anti-CD28 antibody (Pharmingen, Cat No 553294, Clone No 37.51). 100µl cell suspension was added per well. 100µl of R10F medium was then added to each well to give a final volume of 200µl (2×10^5 cells/well, anti-CD28 final concentration 2µg/ml) The plates were then incubated at 37°C for 72 hours.

25 125µl supernatant was then removed from each well and stored at -20°C until tested by ELISA for IL-10, IFN γ and IL-13 using antibody pairs from R & D Systems (Abingdon, UK). The cells were then split 1 in 3 into new wells (not coated) and fed with R10F medium plus recombinant human IL-2 (2.5ng/ml, PeproTech Inc, London, UK: Cat No 200-02).

30

Results are shown in Figure 7.

Example 4**Real Time PCR analysis of primary stimulated CD4+ cells**

5 Murine (Balb/c) stimulated CD4⁺ T-cells from Example 3 were harvested at 4, 16 and 24 hours. Total cellular RNA was isolated using the RNeasyTM RNA isolation kit (Qiagen, Crawley, UK) according to the manufacturer's guidelines.

10 In each case 1µg of total RNA was reverse transcribed using SuperScriptTM II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Paisley, UK) using Oligo dT₍₁₂₋₁₈₎ or a random decamer mix according to the manufacturer's guidelines. After synthesis, Oligo dT₍₁₂₋₁₈₎- and random decamer-primed cDNAs were mixed in equal proportions to provide the working cDNA sample for real-time quantitative PCR analysis.

15 Real-time quantitative PCR was performed using the Roche LightcyclerTM system (Roche, UK) and SYBR green detection chemistry according to the manufacturer's guidelines. The following HPLC-purified primer pairs were used for cDNA-specific amplification (5' to 3'):

20 *mouse 18s rRNA:* **Forward** GTAACCCGTTGAACCCATT
 Reverse CCATCCAATCGGTAGTAGCG

25 *mouse Hes-1:* **Forward** GGTGCTGATAACAGCGGAAT
 Reverse ATTTTGGAAATCCTTCACGC

The endpoint used in real-time PCR quantification, the Crossing Point (C_p), is defined as the PCR cycle number that crosses an algorithm-defined signal threshold. Quantitative analysis of gene-specific cDNA was achieved firstly by generating a set of standards using the C_ps from a set of serially-diluted gene-specific amplicons which had been previously cloned into a plasmid vector (pCR2.1, Invitrogen). These serial dilutions fall into a standard curve against which the C_ps from the cDNA samples were

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

108

compared. Using this system, expression levels of the 18S rRNA house-keeping gene were generated for each cDNA sample. Hes-1 was then analysed by the same method using serially-diluted Hes-1-specific standards, and the Hes-1 value divided by the 18S rRNA value to generate a value, which represents the relative expression of Hes-1 in each cDNA sample. All Cp analysis was performed using the Second Derivative Maximum algorithm within the Lightcycler system software.

Results (HES-1 expression relative to 18S rRNA expression with and without Fe-delta) are shown in Figure 8.

10

Example 5

Screening under polarising conditions

- 15 Plates were coated and CD4+ cells added as in Example 2 (A).
The procedure of Example 3 was then followed, except that instead of adding 100µl R10F medium per well as in Example 3, 100µl of polarising cocktail was added per well as follows:
- 20 Un-polarised cells: R10F medium.
Th1 polarised cells: R10F medium plus anti-IL-4 antibody (10µg/ml, Pharmingen Cat No 554432) plus IL-12 (10ng/ml, Peprotech 210-12).
Th2 polarised cells: R10Fmedium plus anti-IL-12 antibody (10µg/ml, Pharmingen Cat No 554475) plus anti-IFNγ antibody (1µg/ml, Pharmingen Cat No 554408) plus IL-4
25 (10ng/ml, Peprotech Cat No 214-14).

Cells were then stimulated and cytokines (IL-10, IFNγ and IL-13) measured by ELISA as described in Example 3. Results are shown in Figure 9.

30

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

109

Example 6**Soluble Ligand**

- 5 The procedure of Example 2(A) (with the modification that ligand was not added to the plate) and Example 3 (with the modification that soluble Fc-delta was added with the R10F medium) was used to compare soluble Fc-delta with plate-bound Fc-delta against controls. Results are shown in Figure 10.

10 **Example 7**

Secondary stimulation

7 days after primary stimulation all cells were harvested and counted then stimulated in one of three ways as follows:

15

Re-stimulation

Cells were re-stimulated exactly as for primary stimulation (Example 3).

20 **Re-challenge on anti-CD3/CD28**

96-well flat-bottomed plates were coated with PBS plus 1µg/ml anti-CD3 antibody. The plates were incubated overnight at 4°C then washed with DPBS.

- 25 The cells were re-suspended at 2×10^5 /ml in R10F medium plus anti-CD28 antibody (4µg/ml). 100µl cell suspension was added per well. 100µl of R10F medium was then added per well to give a final volume of 200µl. (2×10^5 cells/well, anti-CD28 final concentration 2µg/ml). The plates were then incubated at 37°C for 72 hours. After 72 hours supernatants were removed for ELISA as described in Example 3 (primary stimulation).
- 30

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

110

Re-stimulation with APC plus anti-CD3

Primary stimulated cells from Example 3 were harvested after 7 days and restimulated with APCs of the same strain (2×10^4 per well) plus anti-CD3 antibody.

5

Mouse spleen cells were isolated as described in Example 1 up to the counting step. Thy-1.2 antibody-binding cells were then removed on a MACS column and the flowthrough was recovered and treated with mitomycin-C for 45 minutes then added to a 96 well plate in 100 μ l R10F medium with equal numbers of cells from Example 3 and 0.5 μ g/ml anti-CD3 antibody.

10

Cell proliferation was measured using a kit from Roche Molecular Biochemicals, Cell Proliferation ELISA, BrdU (chemiluminescent) 1 669 915, according to the manufacturer's instructions. Plates were pulsed at 72 hours and read on a luminometer.

15

Cytokines (IL-10 and IFN- γ) were measured as described in Example 3. Results are shown in Figure 11.

Example 8

20

CHO-N2 (N27) Luciferase Reporter Assay**A) Construction of Luciferase Reporter Plasmid 10xCBF1-Luc (pLOR91)**

25

An adenovirus major late promoter TATA-box motif with BglII and HindIII cohesive ends was generated as follows:

BglII**HindIII**

GATCTGGGGGGCTATAAAGGGGTA

30

ACCCCCGATATTTCCCATTCGA

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

111

This was cloned into plasmid pGL3-Basic (Promega) between the BglII and HindIII sites to generate plasmid pGL3-AdTATA.

- 15 A TP1 promoter sequence (TP1; equivalent to 2 CBF1 repeats) with BamHI and BglII cohesive ends was generated as follows:

```

BamHI                                     BglII
5' GATCCCGACTCGTGGGAAATGGGCGGAAGGCACCGTGGGAAATAGTA 3'
3'   GGCTGAGCACCCCTTTTACCGCCTTCCCGTGGCACCCCTTTTATCATCTAG 5'

```

10

This sequence was pentamerised by repeated insertion into a BglII site and the resulting TP1 pentamer (equivalent to 10 CBF1 repeats) was inserted into pGL3-AdTATA at the BglII site to generate plasmid pLOR91.

- 15 **B) Generation of a stable CHO cell reporter cell line expressing full length Notch2 and the 10xCBF1-Luc reporter cassette**

- A cDNA clone spanning the complete coding sequence of the human Notch2 gene (see, eg GenBank Accession No AF315356) was constructed as follows. A 3' cDNA fragment encoding the entire intracellular domain and a portion of the extracellular domain was isolated from a human placental cDNA library (OriGene Technologies Ltd., USA) using a PCR-based screening strategy. The remaining 5' coding sequence was isolated using a RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) strategy and ligated onto the existing 3' fragment using a unique restriction site common to both fragments (Cla I). The resulting full-length cDNA was then cloned into the mammalian expression vector pcDNA3.1-V5-HisA (Invitrogen) without a stop codon to generate plasmid pLOR92. When expressed in mammalian cells, pLOR92 thus expresses the full-length human Notch2 protein with V5 and His tags at the 3' end of the intracellular domain.

30

Wild-type CHO-K1 cells (eg see ATCC No CCL 61) were transfected with pLOR92 (pcDNA3.1-FLNNotch2-V5-His) using Lipfectamine 2000TM (Invitrogen) to generate a

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

112

stable CHO cell clone expressing full length human Notch2 (N2). Transfectant clones were selected in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) plus 10% heat inactivated fetal calf serum (HI)FCS plus glutamine plus Penicillin-Streptomycin (P/S) plus 1 mg/ml G418 (GeneticinTM - Invitrogen) in 96-well plates using limiting
5 dilution. Individual colonies were expanded in DMEM plus 10%(HI)FCS plus glutamine plus P/S plus 0.5 mg/ml G418. Clones were tested for expression of N2 by Western blots of cell lysates using an anti-V5 monoclonal antibody (Invitrogen). Positive clones were then tested by transient transfection with the reporter vector pLOR91 (10xCBF1-Luc) and co-culture with a stable CHO cell clone (CHO-Delta)
10 expressing full length human delta-like ligand 1 (DLL1; eg see GenBank Accession No AF196571). (CHO-Delta was prepared in the same way as the CHO Notch 2 clone, but with human DLL1 used in place of Notch 2. A strongly positive clone was selected by Western blots of cell lysates with anti-V5 mAb.)

15 One CHO-N2 stable clone, N27, was found to give high levels of induction when transiently transfected with pLOR91 (10xCBF1-Luc) and co-cultured with the stable CHO cell clone expressing full length human DLL1 (CHO-Delta1). A hygromycin gene cassette (obtainable from pcDNA3.1/hygro, Invitrogen) was inserted into pLOR91 (10xCBF1-Luc) using BamHI and SalI and this vector (10xCBF1-Luc-
20 hygro) was transfected into the CHO-N2 stable clone (N27) using Lipfectamine 2000 (Invitrogen). Transfectant clones were selected in DMEM plus 10%(HI)FCS plus glutamine plus P/S plus 0.4 mg/ml hygromycin B (Invitrogen) plus 0.5 mg/ml G418 (Invitrogen) in 96-well plates using limiting dilution. Individual colonies were expanded in DMEM plus 10%(HI)FCS plus glutamine plus P/S + 0.2 mg/ml
25 hygromycin B plus 0.5 mg/ml G418 (Invitrogen).

Clones were tested by co-culture with a stable CHO cell clone expressing FL human DLL1. Three stable reporter cell lines were produced N27#11, N27#17 and N27#36. N27#11 was selected for further use because of its low background signal in the
30 absence of Notch signalling, and hence high fold induction when signalling is initiated. Assays were set up in 96-well plates with 2×10^4 N27#11 cells per well in 100 μ l per well of DMEM plus 10%(HI)FCS plus glutamine plus P/S.

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

113

C) Transient Transfection of CHO-N2 Cells with 10xCBF1-Luc

Alternatively, for transient transfection, CHO-N2 (Clone N27) cells were maintained in DMEM plus 10%(HI)FCS plus glutamine plus P/S plus 0.5 mg/ml G418 and a T₈₀ flask of the CHO-N2 cells was transfected as follows. The medium on the cells was replaced with 8 ml of fresh in DMEM plus 10%(HI)FCS plus glutamine plus P/S. In a sterile bijou 10 µg of pLOR91 (10xCBF1-Luc) was added to OptiMem (Invitrogen) to give a final volume of 1 ml and mixed. In a second sterile bijou 20 µl of Lipofectamine 2000 reagent was added to 980 µl of OptiMem and mixed.

The contents of each bijou were mixed and left at room temperature for 20 minutes.

The 2 ml of transfection mixture was added to the flask of cells containing 8 ml of medium and the resulting mixture was left in a CO₂ incubator overnight before removing the transfected cells and adding to the 96-well plate containing the immobilised Notch ligand protein.

The following day the transfected CHO-N2 cells were removed using 0.02% EDTA solution (Sigma), spun down and resuspended in 10 ml DMEM plus 10%(HI)FCS plus glutamine plus P/S. 10 µl of cells were counted and the cell density was adjusted to 2.0×10^5 cells/ml with fresh DMEM plus 10%(HI)FCS plus glutamine plus P/S. 100 µl per well was added to a 96-well tissue culture plate (flat bottom), i.e. 2.0×10^4 transfected cells per well, using a multi-channel pipette and the plate was then incubated overnight.

D) Immobilisation of Notch Ligand protein directly onto a 96-well Tissue Culture Plate

10 µg of purified Notch ligand protein was added to sterile PBS in a sterile Eppendorf tube to give a final volume of 1 ml. Serial 1:2 dilutions were made by adding 500 µl into sterile Eppendorf tubes containing 500 µl of sterile PBS to generate dilutions of 10 µg/ml, 5 µg/ml, 2.5 µg/ml, 1.25 µg/ml, 0.625 µg/ml and 0 µg/ml.

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

114

The lid of the plate was sealed with parafilm and the plate was left at 4 °C overnight or at 37 °C for 2 hours. The protein was then removed and the plate was washed with 200 µl of PBS.

5

E) A20-Delta cells

The IVS, IRES, Neo and pA elements were removed from plasmid pIRESneo2 (Clontech, USA) and inserted into a pUC cloning vector downstream of a chicken beta-actin promoter (eg see GenBank Accession No E02199). Mouse Delta-1 (eg see GenBank Accession No NM_007865) was inserted between the actin promoter and IVS elements and a sequence with multiple stop codons in all three reading frames was inserted between the Delta and IVS elements.

15 The resulting construct was transfected into A20 cells using electroporation and G418 to provide A20 cells expressing mouse Delta1 on their surfaces (A20-Delta).

F) CHO and CHO-hDelta1-V5-His Assay Control

20 CHO cells were maintained in DMEM plus 10%(HI)FCS plus glutamine plus P/S and CHO-hDelta1-V5-His (clone#10) cells were maintained in DMEM plus 10%(HI)FCS plus glutamine plus P/S plus 0.5mg/ml G418.

Cells were removed using 0.02% EDTA solution (Sigma), spun down and resuspended in 10 ml DMEM plus 10%(HI)FCS plus glutamine plus P/S. 10 µl of cells were counted and the cell density was adjusted to 5.0×10^5 cells/ml with fresh DMEM plus 10%(HI)FCS plus glutamine plus P/S. 300 µl of each cell line at 5.0×10^5 cells/ml was added into duplicate wells of a 96-well tissue culture plate. 150 µl of DMEM plus 10%(HI)FCS plus glutamine plus P/S was added in to the next 5 wells below each well. 150 µl of cells were serially diluted into the next 4 wells giving cell density

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

115

dilution of 5.0×10^5 cells/ml, 2.5×10^5 cells/ml, 1.25×10^5 cells/ml, 0.625×10^5 cells/ml, 0.3125×10^5 cells/ml and 0 cells/ml.

- 100 μ l from each well was added into the 96-well plate containing 100 μ l of CHO-N2 cells transfected with 10xCBF1-Luc (2.0×10^4 transfected CHO-N2 cells/well) and the plate was left in an incubator overnight.

G) Cell Co-Culture

- 10 5×10^4 CHO-N2 cells were plated on a 96 well plate. CHO-Delta or A20-Delta cells were titrated in as required (max ratio CHO-N2: CHO-Delta was 1:1, max ratio CHO-N2: A20-Delta was 1:2). The mixture was incubated overnight before conducting a luciferase assay.

15 **H) Luciferase Assay**

- Supernatant was removed from all wells. 100 μ l of PBS and 100 μ l of SteadyGlo™ luciferase assay reagent (Promega) was added and the cells were left at room temperature for 5 minutes. The mixture was pipetted up and down 2 times to ensure cell lysis and contents from each well were transferred into a white 96-well OptiPlate™ (Packard). Luminescence was measured in a TopCount™ counter (Packard).

- Results of sample assays (using the stable CHO-Notch2-10xCBF1-Luc reporter cell line described above with (A) plate-immobilised human Delta-1/Ig4Fc fusion protein, (B) plate-immobilised mouse Delta-1/Ig4Fc fusion protein, (C) CHO / CHO-human Delta1 co-cultured cells and (D) A20/ A20-mouse Delta1 co-cultured cells as actives against corresponding controls) are shown in Figures 12 A to D.

30

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

116

Example 9Dynabeads Luciferase Assay Method For Detecting Notch Ligand Activity

- 5 Fc-tagged Notch ligands were immobilised on Streptavidin-Dynabeads (CELLection Biotin Binder Dynabeads [Cat. No. 115.21] at 4.0×10^8 beads/ml from Dynal (UK) Ltd; beads) in combination with biotinylated α -IgG-4 (clone JDC14 at 0.5 mg/ml from Pharmingen [Cat. No. 555879]) as follows:
- 10 2.5×10^7 beads ($62.5 \mu\text{l}$ of beads at 4.0×10^8 beads/ml) and $5 \mu\text{g}$ biotinylated α -IgG-4 was used for each sample assayed. PBS was added to the beads to 1 ml and the mixture was spun down at 13,000 rpm for 1 minute. Following washing with a further 1 ml of PBS the mixture was spun down again. The beads were then resuspended in a final volume of $100 \mu\text{l}$ of PBS containing the biotinylated α -IgG-4 in a sterile
- 15 Eppendorf tube and placed on shaker at room temperature for 30 minutes. PBS was added to 1 ml and the mixture was spun down at 13,000 rpm for 1 minute and then washed twice more with 1 ml of PBS.
- The mixture was then spun down at 13,000 rpm for 1 minute and the beads were
- 20 resuspended in a $50 \mu\text{l}$ PBS per sample. $50 \mu\text{l}$ of biotinylated α -IgG-4-coated beads were added to each sample and the mixture was incubated on a rotary shaker at 4°C overnight. The tube was then spun at 1000 rpm for 5 minutes at room temperature.
- The beads then were washed with 10 ml of PBS, spun down, resuspended in 1 ml of
- 25 PBS, transferred to a sterile Eppendorf tube, washed with a further $2 \times 1 \text{ ml}$ of PBS, spun down and resuspended beads in a final volume of $250 \mu\text{l}$ of DMEM plus 10%(HI)FCS plus glutamine plus P/S, i.e. at 1.0×10^5 beads/ μl .
- Stable N27#11 cells from Example 8 (T_{80} flask) were removed using 0.02% EDTA
- 30 solution (Sigma), spun down and resuspended in 10 ml DMEM plus 10%(HI)FCS plus glutamine plus P/S. $10 \mu\text{l}$ of cells were counted and the cell density was adjusted to 1.0×10^5 cells/ml with fresh DMEM plus 10%(HI)FCS plus glutamine plus P/S. 1.0×10^5

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

117

of the cells were plated out per well of a 24-well plate in a 1 ml volume of DMEM plus 10%(HI)FCS plus glutamine plus P/S and cells were placed in an incubator to settle down for at least 30 minutes.

- 5 100 μ l of beads were then added in duplicate to the first pair of wells to give 1.0×10^7 beads / well (100 beads / cell); 20 μ l of beads added in duplicate to the second pair of wells to give 2.0×10^6 beads / well (20 beads / cell); 4 μ l of beads added in duplicate to the third pair of wells to give 4.0×10^5 beads / well (4 beads / cell) and 0 μ l of beads added to the fourth pair of wells. The plate was left in a CO₂ incubator overnight.

10

Luciferase assay

- Supernatant was then removed from all the wells, 150 μ l of PBS and 150 μ l of SteadyGlo luciferase assay reagent (Promega) were added and the resulting mixture
15 left at room temperature for 5 minutes.

- The mixture was then pipetted up and down 2 times to ensure cell lysis and the contents from each well were transferred into an Eppendorf tube, spun at 13,000 rpm for 1 minute and the cleared supernatant was transferred to a white 96-well
20 OptiPlate™ (Packard), leaving the bead pellet behind. Luminescence was then read in a TopCount™ (Packard) counter.

Example 10

- 25 Dynabeads ELISA Assay Method For Detecting Notch Ligand Activity

- M450 Streptavidin Dynabeads were coated with anti-hamster-IgG1 biotinylated monoclonal antibody, anti-human-IgG4 biotinylated monoclonal antibody or both antibodies and rotated for 2 hours at room temperature.

30

- Beads were washed three times with PBS (1ml). The anti-hamster-IgG1 beads were then further incubated with anti-CD3 ϵ chain monoclonal antibody, the anti-human-

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

118

IgG4 beads were further incubated with Fc-Delta, and the double coated beads incubated with both anti-CD3 ϵ chain monoclonal antibody and Fc-Delta. Beads were rotated overnight at 4°C, washed three times with PBS (1ml) and resuspended.

- 5 T-cell assays were carried out with CD4⁺ T-cells and the beads. Supernatants were removed after 72 hours and cytokines measured by ELISA as described in Example 3. Results are shown in Figure 13.

Example 11

10

Modulation of cytokine production by human CD4⁺ T cells in the presence of Delta1-hIgG4 immobilised on Dynal microbeads.

- Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were purified from blood using
15 Ficoll-Paque separation medium (Pharmacia). Briefly, 28 ml of blood were overlaid on 21 ml of Ficoll-Paque separation medium and centrifuged at 18-20°C for 40 minutes at 400g. PBMC were recovered from the interface and washed 3 times before use for CD4⁺ T cell purification.

- 20 Human CD4⁺ T cells were isolated by positive selection using anti-CD4 microbeads from Miltenyi Biotec according to the manufacturer's instructions.
The CD4⁺ T cells were incubated in triplicates in a 96-well-plate (flat bottom) at 10⁵ CD4/well/200 μ l in RPMI medium containing 10% FCS, glutamine, penicillin, streptomycin and β_2 -mercaptoethanol.

25

Cytokine production was induced by stimulating the cells with anti-CD3/CD28 T cell expander beads from Dynal at a 1:1 ratio (bead/cell) or plate bound anti-CD3 (clone UCHT1, BD Biosciences, 5 μ g/ml) and soluble anti-CD28 (clone CD28.2, BD Biosciences, 2 μ g/ml). Beads coated with mouse Delta1EC domain-hIgG4 fusion
30 protein (prepared as described above with the modifications that incubation with human IgG4 was for 30-40 minutes at room temperature and incubation with Delta-Fc

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

119

was for two hours at room temperature) or control beads were added in some of the wells at a 10:1 ratio (beads/cell). The supernatants were removed after 3 or 4 days of incubation at 37°C/ 5%CO₂/humidified atmosphere and cytokine production was evaluated by ELISA using Pharmingen kits OptEIA Set human IL10 (catalog No. 555157), OptEIA Set human IL-5 (catalog No. 555202) and OptEIA Set human IFN γ (catalog No 555142) for IL-10, IL-5 and IFN γ respectively and a human TNF α DuoSet from R&D Systems (catalog. No. DY210) for TNF α according to the manufacturer's instructions.

10 Results are shown in Figures 14 to 18.

Example 12

Variation of bead:cell ratios

15 The procedure of Example 11 was repeated except that the ratio of control beads to cells and mouse Delta1-hIgG4 fusion protein coated beads to cells was varied between 16:1 and 0.25:1 (variously 16:1, 8:1, 4:1, 2:1, 1:1, 0.5:1, 0.25:1) and human Delta1-hIgG4 fusion protein coated beads were also used at the same ratios for comparison.

20 Results are shown in Figure 19.

Example 13

Comparison of CD45RO+ (memory cells) and CD45RO- (naive cells)

The procedure of Example 11 was repeated except that prior to the stimulation the human CD4+ were separated into CD45RO+ (memory cells) and CD45RO- (naive cells, data not shown on the slide). The magnetic separation was done using anti-CD4
30 Multisort microbeads (cat.No. 551-01) and then anti-CD45RO microbeads (cat.No.460-01) supplied by Miltenyi Biotech and following Miltenyi's protocol.

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

120

Results are shown in Figure 20.

Example 14

5 Measurement of cytokine production in stimulated mouse CD4+ cells under polarising conditions

(i) CD4+ cell purification

- 10 Spleens were removed from mice (variously Balb/c females, 8-10 weeks, C57B/6 females, 8-10 weeks, CARD1 females, 8-10 weeks (D011.10 transgenic, CAR transgenic)) and passed through a 0.2µM cell strainer into 20ml R10F medium (R10F-RPMI 1640 media (Gibco Cat No 22409) plus 2mM L-glutamine, 50µg/ml Penicillin, 50µg/ml Streptomycin, 5×10^{-5} M β -mercapto-ethanol in 10% fetal calf serum). The
15 cell suspension was spun (1150rpm 5min) and the media removed.

The cells were incubated for 4 minutes with 5ml ACK lysis buffer (0.15M NH_4Cl , 1.0M KHCO_3 , 0.1mM Na_2EDTA in double distilled water) per spleen (to lyse red blood cells). The cells were then washed once with R10F medium and counted. CD4+
20 cells were purified from the suspensions by positive selection on a Magnetic Associated Cell Sorter (MACS) column (Miltenyi Biotec, Bisley, UK: Cat No 130-042-401) using CD4 (L3T4) beads (Miltenyi Biotec Cat No 130-049-201), according to the manufacturer's directions.

25 (ii) Antibody Coating

- 96 well flat-bottomed plates were coated with Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) plus 1µg/ml anti-CD3 antibody (Pharmingen, San Diego, US: Cat No 553058, Clone No 145-2C11) plus 1µg/ml anti-IgG4 antibody (Pharmingen Cat No
30 555878). 100µl of coating mixture was used per well. Plates were incubated overnight

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

121

at 4°C then washed with DPBS. Each well then received either 100µl DPBS or 100µl DPBS plus 10µg/ml Notch ligand (mouse Delta 1 extracellular domain/Ig4Fc fusion protein; Fc-delta). The plates were incubated for 2-3 hours at 37°C then washed again with DPBS before cells (prepared as in (i)) were added.

5

(iii) Primary Polyclonal Stimulation

CD4⁺ cells were cultured in 96 well, flat-bottomed plates pre-coated as in (ii) above. Cells were re-suspended, following counting, at 2×10^6 /ml in R10F medium plus 4µg/ml anti-CD28 antibody (Pharmingen, Cat No 553294, Clone No 37.51). 100µl cell suspension was added per well. 100µl of polarising or control medium was then added to each well to give a final volume of 200µl (2×10^5 cells/well, anti-CD28 final concentration 2µg/ml) as follows:

15 Un-polarised cells: R10F medium.

Th1 polarised cells: R10F medium plus anti-IL-4 antibody (10µg/ml, Pharmingen Cat No 554432) plus IL-12 (10ng/ml, Peprotech 210-12).

Th2 polarised cells: R10Fmedium plus anti-IL-12 antibody (10µg/ml, Pharmingen Cat No 554475) plus anti-IFNγ antibody (1µg/ml, Pharmingen Cat No 554408) plus IL-4

20 (10ng/ml, Peprotech Cat No 214-14).

The plates were then incubated at 37°C for 72 hours.

125µl supernatant was then removed from each well and stored at -20°C until tested by ELISA for IL-10 and TNFα using antibody pairs from R & D Systems (Abingdon, UK). The cells were then split 1 in 3 into new wells (not coated) and fed with R10F medium plus recombinant human IL-2 (2.5ng/ml, PeproTech Inc, London, UK: Cat No 200-02).

30 Results are shown in Figure 21.

Example 15Gene expression profiling5 (i) Cell culture, treatments and RNA extraction

Jurkat cells were cultured in RPMI 1640 (GibcoBRL) supplemented with 2mM Glutamine (GibcoBRL), Penicillin-Streptomycin 50 units/ml (GibcoBRL) and with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) (Biochrom KG).

10

Anti-V5 (Invitrogen) and anti-CD3 (human), anti-CD28 (human) antibodies (PharMingen) were plated at 5µg/ml in phosphate buffer saline (Gibco BRL) in 6 well tissue culture dishes (1ml PBS/well) overnight. Anti-V5 antibody was applied to every well, while mouse IgG₁ κ isotype control at 10 µg/ml was applied in wells that no anti-CD3 or anti-CD28 was used. The next day the wells were washed 3 times with PBS, and Delta-V5-His protein was plated at 5µg/ml PBS (1ml/well). The plates were then incubated at 37°C for 2 hours and then washed with PBS three times. Jurkat cells were then plated out at a concentration of 2x10⁶ cells /ml and incubated at 37°C. Ionomycin was added to the appropriate wells at a concentration of 1µg/ml (Sigma). Cells were taken out at 2, 4, 8, 18, 24, 36, 48 hrs, washed once with PBS at 4°C and collected at 300-600 µl RLT lysis solution (Qiagen). In order to ensure the efficacy of the stimulation, cells were tested for the correct expression of T cell activation markers using FACs analysis. The cells used in this experiment were all expressing CD69 (early activation marker) after 48h of anti-CD3, anti-CD28 activation.

25

RNA was extracted using an RNA Easy miniprep kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. The optional DNase step recommended was also performed. A phenol extraction step was performed to ensure the complete lack of proteins in the RNA. RNA was then amplified using the MessageAmp aRNA Kit (Ambion) following the manufacturer's recommendations. Briefly, the procedure consists of reverse transcription with an oligo(dT) primer bearing a T7 promoter and in

30

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

123

vitro transcription of the resulting DNA with T7 RNA polymerase to generate hundreds of thousands of antisense RNA (αRNA) copies of each mRNA in the sample.

- The nomenclature used was as follows: RNA from cells that were plated on wells treated only with V5 was labelled 'V5', while RNA from cells plated on wells treated with anti-V5 and Delta-V5-His was labelled 'Delta'. RNA from cells plated on wells treated with anti-V5, anti-CD3, anti-CD28 were labelled 'CD3CD28' while RNA from cells plated on wells treated with anti-V5, anti-CD3, anti-CD28, Delta-V5-His was labelled 'CD3CD28Delta'. Similarly RNA from cells plated on anti-V5 and further treated with ionomycin was labelled 'ionomycin' while RNA from cells plated on anti-V5, Delta-V5-His and further treated with ionomycin were labelled 'ionomycin-Delta'.

(ii) Gene Expression Profiling

- Microarrays were manufactured by spotting purified PCR products onto glass slides. Microarray probes were prepared by labelling 2μg of αRNA by a reverse transcriptase reaction incorporating dCTP-Cy3 or dCTP-Cy5 labelled nucleotide. Probe labelling and purification were then performed generally as described in Hegde P, Qi R, Abernathy K, Gay C, Dharap S, Gaspard R, Hughes JE, Snesrud E, Lee N, Quackenbush J: A concise guide to cDNA microarray analysis (2000). *Biotechniques* 29:548-50, 552-4, 556 passim.

- Purified probes were then hybridized on the arrays overnight at 42°C in 10 x SSC, 50% formamide, 0.2% SDS solution. Slides were then washed twice in 2 x SSC, 0.2% SDS for 7 min at 42°C, twice in 0.1 SSC/ 0.2% SDS for 5 minutes at room temperature, and finally once in 0.2%SSC at room temperature. For each time point the sample named 'V5' was labelled with dCTP-Cy3 and hybridized on the same slide as the sample named 'Delta' that was labelled with dCTP-Cy5. Similarly the sample named CD3CD28 was labelled with dCTP-Cy3 and hybridized on the same slide as the sample named 'CD3CD28Delta' that was labelled with dCTP-Cy5. Finally the sample named 'ionomycin' was labelled with dCTP-Cy3 and hybridized on the same

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

124

slide as the sample labelled 'ionomycinDelta' that was labelled with dCTP-Cy5 (see Table-1).

Table-1

	Label 1 (Cy3-dCTP)	Label 2 (Cy5-dCTP)
Slide	V5	Delta
Slide	CD3CD28	CD3CD28Delta
Slide	Ionomycin	IonomycinDelta

5

Once dried the slides were scanned on a GSI Lumonics confocal scanner at 100% laser power and 65-75% photo-multiplier tube efficiency (depending on background). Slide images were processed as follows: Array spots representing the signal associated with individual spotted clones were identified and quantified using the Quantarray application (GSI Lumonics). Numeric values for the gene expression intensities were calculated using the histogram method implemented in the same application. Values were calculated as integrals of the pixel signal distribution associated to each spot and local background values subtracted (raw data).

10

15 (iii) Data Processing

For all data analyses the GeneSpring package (Silicon Genetics) was used. Raw data from Quantarray was introduced in GeneSpring, and the ratio between the signal and control intensities was calculated for each gene at each time point. Intensities for genes from samples labelled 'Delta' or 'CD3CD28Delta', or 'ionomycinDelta' were regarded as 'signals' while the intensities from genes from samples labelled either 'V5' or 'CD3CD28' or 'ionomycin' were regarded as 'controls'.

20

Ratio= signal strength of gene in 'Delta'/ control strength of gene in 'V5'

25

Ratio= signal strength of gene in 'CD3CD28Delta'/ control strength of gene in 'CD3CD28'

Ratio= signal strength of gene in 'ionomycinDelta'/ control strength of gene in 'ionomycin'

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

125

When this ratio was >2 the gene was considered to be upregulated, while when the ratio was <0.5 the ratio the gene was considered to be downregulated.

- 5 A schematic representation of the protocol for activating with Delta alone and a Venn diagram showing numbers of genes showing increased expression in response to Delta activation alone are shown in Figures 22A and 22B respectively, and a corresponding time-course expression profile is shown in Figure 23.
- 10 A schematic representation of the protocol for activating with both Delta and anti-CD3/CD28 activation and a Venn diagram showing numbers of genes showing increased expression in response to Delta activation in combination with anti-CD3/CD28 activation but not Delta activation alone are shown in Figures 24A and 24B respectively, and a corresponding time-course expression profile is shown in
- 15 Figure 25.

Some specific genes showing increased expression in response to Delta activation in combination with anti-CD3/CD28 activation in comparison with Delta activation alone are shown in Figure 26.

20

Example 16

Reporter Assay using Jurkat cell line

- 25 As Jurkat cells cannot be cloned by simple limiting dilution a methylcellulose-containing medium (ClonaCell™ TCS) was used with these cells.

Jurkat E6.1 cells (lymphoblast cell line; ATCC No TIB-152) were cloned using ClonaCell™ Transfected Cell Selection (TCS) medium (StemCell Technologies, Vancouver, Canada and Meylan, France) according to the manufacturer's guidelines.

30

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

126

Plasmid pLOR92 (prepared as described above) was electroporated into the Jurkat E6.1 cells with a Biorad Gene Pulser II electroporator as follows:

Actively dividing cells were spun down and resuspended in ice-cold RPMI medium containing 10% heat-inactivated FCS plus glutamine plus penicillin/streptomycin (complete RPMI) at 2.0×10^7 cells per ml. After 10 min on ice, 0.5 ml of cells (ie 1×10^7 cells) was placed into a pre-cooled 4 mm electroporation cuvette containing 20 μ g of plasmid DNA (Endo-free Maxiprep DNA dissolved in sterile water). The cells were electroporated at 300 v and 950 μ F and then quickly removed into 0.5 ml of warmed complete RPMI medium in an Eppendorf tube. The cells were spun for at 3000 rpm for 1 min in a microfuge and placed at 37 °C for 15 min to recover from being electroporated. The supernatant was then removed and the cells were plated out into a well of a 6-well dish in 4 ml of complete RPMI and left at 37 °C for 48 h to allow for expression of the antibiotic resistance marker.

After 48 h the cells were spun down and resuspended in to 10 ml fresh complete RPMI. This was then divided into 10 x 15 ml Falcon tubes and 8 ml of pre-warmed ClonaCell-TCS medium was added followed by 1 ml of a 10 x final concentration of the antibiotic being used for selection. For G418 selection the final concentration of G418 was 1 mg/ml so a 10 mg/ml solution in RPMI was prepared and 1 ml of this was added to each tube. The tubes were mixed well by inversion and allowed to settle for 15 min at room temperature before being plated out into 10 cm tissue culture dishes. These were then placed in a CO2 incubator for 14 days when that were examined for visible colonies.

Macroscopically visible colonies were picked off the plates and these colonies were expanded through 96-well plates to 24-well plates to T25 flasks.

The resulting clones were each transiently transfected with pLOR91 using Lipofectamine 2000 reagent and then plated out onto a 96-well plate containing plate-bound immobilised hDLL1-Fc (prepared as described above). Four well-performing clones were selected and used for further study.

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

127

Luciferase assays were then conducted with each of the four clones with or without plate-bound immobilised hDLL1-Fc and with or without PMA/ionomycin (both from Sigma) at 50 ng/ml PMA plus 1 µg/ml ionomycin final concentration. Results are shown in Figure 27 (with results from native Jurkat E6.1 cells also shown for comparison).

Figure 28 shows a dose response to plate-bound hDLL1-Fc with two selected clones with results from native Jurkat E6.1 cells also shown for comparison.

10 **Example 17**

Reporter assay with variation of ionomycin concentration

The procedure of Example 16 was repeated with ionomycin concentrations of 1000, 500, 250, 125 and 62.5 ng/ml and controls. Results are shown in Figure 29.

Example 18

Reporter assay with Notch signalling by Notch IC

20

Notch IC Construct

Human Notch1 intracellular domain (NIC1) was cloned into the expression vector pcDNA3.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA and Paisley, UK) as a NotI/EcoRI fragment.

Human Notch1-IC was cloned as follows:

A human placental arrayed cDNA library (Origene) was screened by PCR using the following pair of primers specific for the intracellular domain of human Notch1:

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

128

hN1F: CAC CCC ATG GCT ACC TGT CAG

hN1R: GGC TGC ACC TGC TGG GTC TGC

The PCR was carried out on an MJ Tetrad PCR machine using HotStar Taq
5 polymerase (Qiagen) and the following cycle parameters:

95C, 15'

94C, 30s

65C, 30s

10 72C, 45s

30 cycles of these last three steps, followed by

72C, 10'

16C, soak

15 Under these conditions, the primers generate a specific diagnostic product of 500bp
from a human Notch1 cDNA target. Using this PCR screening protocol, a positive
human Notch1 clone (#3) was identified and sequenced to confirm its identity.
Subsequently, the intracellular domain was amplified from #3 using the following
primers:

20

hN1-IC1759: AAA GGA TTC ACC **ATG** GCA CGC AAG CGC CGG CGC AGT
CAT (contains initiation methionine in **bold**)hN1-IC 2556: GCG CTC GAG *TTA* CTT GAA CGC CTC CGG GAT GCG (contains
stop codon in *italics*)

25

The PCR was carried out on an MJ Tetrad PCR machine using Pfu DNA polymerase
(Stratagene) and the following cycle parameters:

94C, 2'

30 94C, 45s

58C, 45s

72C, 3'

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

129

20 cycles of these last three steps, followed by

72C, 10'

16C, soak

- 5 This generated a specific product of approximately 2.6kb corresponding to the intracellular domain of human Notch1. The PCR product was digested with BamHI and XhoI (these sites are present within the amplimers) and cloned into the mammalian expression vector pcDNA3.1 (Invitrogen) using the BamHI and XhoI sites present within the multiple cloning site of this vector. The sequence of the hNotch1-IC
- 10 was confirmed by sequencing, and the protein sequence encoded by this cloned sequence is as follows:

MARKRRRQHGQLWFPEGFKVSEASKKKRREPLGEDSVGLKPLKNASDGALM
DDNQNEWGDEDELETKKFRFEPPVVLPLDDQTDHRQWTQQHLDAAADLRMS
15 AMAPTPPQGEVDADCMDVNVVRGPDGFTPLMIASCSGGGLETGNSEEEEDAPA
VISDFIYQGASLHNQTDRGTETALHLAARYSRSDAAKRLLEASADANIQDN
MGRTPPLHAAVSADAQGVFQILIRNRATDLARMHDGTTPLILAAARLAVEGML
EDLINSHADVNAVDDLKGSALHWAAAVNNVDAVVLLKNGANKDMQNNR
EETPLFLAAREGSYETAKVLLDHFANRDTIDHMDRLPRDIAQERMHHDIVRL
20 DEYNLVRSPQLHGAPLGGTPTLSPPLCSPNGYLGSLKPGVQGGKVRKPSSKGL
ACGSKEAKDLKARRKKSQDGKGCLLDSSGMLSPVDSLESPHGYLSDVASPPL
LPSPFQQSPSPVPLNHLPGMPDTHLGIGHLNVAAKPEMAALGGGGRLAFETGPP
RLSHLPVASGTSTVLGSSSGGALNFTVGGSTSLNGQCEWLSRLQSGMVPNQY
NPLRGSVAPGPLSTQAPSLQHGMVGPLHSSLAASALSQMMSYQGLPSTRLAT
25 QPHLVQTQQVQPQNLMQMQQNLQFANIQQQSLQPPPPPPHILGVSSAASG
HLGRSFLSGEPSQADVQLGPSSLAVHTILPQESPALPTSLPSSLVPPVTAQFL
TPPSQHSYSSPVDNTPSHQLQVPEHPFLTPSPESPQWSSSSPHSNVSDWSEGV
SSPPTSMQSQIARIEAFK

The Met and Ala residues at the 5' end of the sequence are not endogenous residues

- 30 but were incorporated, in the case of the Met, to form an initiation sequence, and for case of cloning in the case of the Ala.

Jurkat Transfection

- 35 Jurkat E6.1 cells were routinely cultured in RPMI media supplemented with 10% foetal calf serum, glutamine and penicillin/streptomycin.

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

130

- The cells were transfected with constructs (pLOR91 from Example 8 above and the NIC1 construct as described above) by electroporation in cold media in a 0.5ml volume at 950 μ F and 300V. After transfection, the cells were rapidly transferred to
- 5 warm media and gently pelleted by centrifugation (1000 rpm, 30 seconds). The cells were then incubated as pellets for 20 minutes in an incubator before being plated out into 6mls of fresh media in a 6-well dish. The cells were then incubated overnight, then washed, counted and plated out at approximately 150,000 cells per well in flat-bottomed 96-well plates +/- stimulation with 50ng/ml PMA; 500ng/ml ionomycin;
- 10 anti-human CD3 at 5 μ g/ml, anti-human CD28 at 1 μ g/ml. The cells were then incubated again overnight before being assayed for luciferase activity generally as described above (SteadyGlo from Promega) and read on a Hewlett-Packard TopCount luminometer. Results are shown in Figure 30.
- 15 All publications mentioned in the above specification are herein incorporated by reference. Various modifications and variations of the described methods and system of the present invention will be apparent to those skilled in the art without departing from the scope and spirit of the present invention. Although the present invention has been described in connection with specific preferred embodiments, it should be
- 20 understood that the invention as claimed should not be unduly limited to such specific embodiments. Indeed, various modifications of the described modes for carrying out the invention which are obvious to those skilled in biochemistry and biotechnology or related fields are intended to be within the scope of the following claims.

25

30

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

131

References (herein incorporated by reference)

- Tamura et al. (1995) *Curr. Biol.* **5**:1416-1423.
- 5 Artavanis-Tsakonas et al. (1995) *Science* **268**:225-232.
Artavanis-Tsakonas et al. (1999) *Science* **284**:770-776.
Lieber et al. (1993) *Genes Dev* **7**(10):1949-65.
Schroeter et al. (1998) *Nature* **393**(6683):382-6.
Struhl et al. (1998) *Cell* **93**(4):649-60.
- 10 Weinmaster(2000) *Curr. Opin. Genet. Dev.* **10**:363-369.
Lu et al. (1996) *Proc Natl Acad Sci* **93**(11):5663-7.
Munro and Freeman (2000) *Curr. Biol.* **10**:813-820.
Ju et al. (2000) *Nature* **405**:191-195.
Moloney et al. (2000) *Nature* **406**:369-375.
- 15 Brucker et al. (2000) *Nature* **406**:411-415.
Panin et al. (1997) *Nature* **387**:908-912.
Hicks et al. (2000) *Nat. Cell. Biol.* **2**:515-520.
Irvine (1999) *Curr. Opin. Genet. Devel.* **9**:434-441.
Devereux et al. (1984) *Nucleic Acid Research* **12**:87.
- 20 Atschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* **403**-410.
Inaba et al. (1992) *J. Exp. Med.* **175**:1157-1167.
Caux et al. (1992) *Nature* **360**:258-261.
Coffin et al. (1998) *Gene Therapy* **5**:718-722.
Kroll et al. (1993) *DNA Cell Biol.* **12**:441-453.
- 25 Osborne and Miele (1999) *Immunity* **11**:653-663.
Matsumo et al. (1995) *Development* **121**(8):2633-44.
Matsumo et al. (1998) *Nat. Genet.* **19**:74-78.
- Ordentlich et al. (1998) *Mol. Cell. Biol.* **18**:2230-2239.
Takebayashi et al. (1994) *J Biol Chem* **269**(7):150-6.
- 30 Leimeister et al. (1999) *Mech Dev* **85**(1-2):173-7.
Maddox (1983) *J. Exp. Med.* **15**(8):121 1

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

132

Sauber et al. (1995) *Virology* **213**:439-449Chee et al. (1996) *Science* **274**:601-614.Camilli et al. (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**:2634-2638.Hoyne et al. (2000) *Immunology* **100**:281-288.5 Hoyne et al. (2001) *Immunol Rev* **182**:215-27.

10

15

20

25

30

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

133

CLAIMS

1. A method for detecting modulators of Notch or immune signalling comprising the steps of (in any order):
- 5 (a) activating Notch signalling in a cell of the immune system;
- (b) contacting the cell with a candidate modulator of Notch or immune signalling;
- (c) monitoring Notch or immune signalling; and
- (d) determining whether the candidate modulator modulates Notch or immune signalling.
- 10 2. A method for detecting modulators of Notch or immune signalling comprising the steps of (in any order):
- (a) activating a cell of the immune system;
- (b) contacting the cell with a candidate modulator of Notch or immune signalling;
- 15 (c) monitoring Notch or immune signalling; and
- (d) determining whether the candidate modulator modulates Notch or immune signalling.
3. A method for detecting modulators of Notch or immune signalling comprising the steps of (in any order):
- 20 (a) activating a cell of the immune system;
- (b) activating Notch signalling in the cell;
- (c) contacting the cell with a candidate modulator of Notch or immune signalling;
- (d) monitoring Notch or immune signalling; and
- 25 (e) determining whether the candidate modulator modulates Notch or immune signalling.
4. A method for detecting modulators of Notch signalling comprising the steps of (in any order):
- 30 (a) activating Notch signalling in a cell of the immune system;
- (b) contacting the cell with a candidate modulator of Notch signalling;

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

134

- (c) monitoring Notch or immune signalling; and
 - (d) determining whether the candidate modulator modulates Notch or immune signalling.
- 5 5. A method for detecting modulators of Notch signalling comprising the steps of
(in any order):
- (a) activating a cell of the immune system;
 - (b) contacting the cell with a candidate modulator of Notch signalling;
 - (c) monitoring Notch or immune signalling; and
- 10 (d) determining whether the candidate modulator modulates Notch or immune
signalling.
6. A method for detecting modulators of Notch signalling comprising the steps of
(in any order):
- 15 (a) activating a cell of the immune system;
- (b) activating Notch signalling in the cell;
 - (c) contacting the cell with a candidate modulator of Notch signalling;
 - (d) monitoring Notch or immune signalling; and
 - (e) determining whether the candidate modulator modulates Notch or immune
- 20 signalling.
7. A method according to any one of claims 1 to 3 comprising the step of contacting
the cell with a candidate modulator of Notch signalling.
- 25 8. A method according to any one of the preceding claims comprising the step of
monitoring Notch signalling.
9. A method according to any one of the preceding claims comprising the step of
determining whether the candidate modulator modulates Notch signalling.
- 30

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

135

10. A method according to any one of the preceding claims comprising providing immune cell activation which is at least 20% optimal with respect to Notch or immune signalling.
- 5 11. A method according to any one of the preceding claims comprising providing immune cell activation which is at least 70% optimal with respect to Notch or immune signalling.
12. A method according to any one of the preceding claims wherein the candidate
10 modulator is selected from the group consisting of: an organic compound, an inorganic compound, a peptide or polypeptide, a polynucleotide, an antibody, a fragment of an antibody, a cytokine and a fragment of a cytokine.
13. A method according to any one of the preceding claims wherein the step of
15 monitoring Notch signalling comprises the step of monitoring levels of expression of at least one target gene.
14. A method according to claim 13 wherein the at least one target gene is an
20 endogenous target gene of Notch signalling.
15. A method according to claim 14 wherein the at least one target gene is selected from the group consisting of: CBF-1, Hes-1, Hes-5, E(spl), Il-10, CD-23, Dlx-1, CTLA4, CD-4, Numb, Mastermind and Dsh.
- 25 16. A method according to any one of claims 13 to 15 wherein the at least one target gene is a reporter gene.
17. A method according to claim 16 wherein the at least one target gene is selected from the group consisting of: a gene encoding a polypeptide having an enzymatic
30 activity, a gene comprising a radiolabel or a fluorescent label and a gene encoding a predetermined polypeptide epitope.

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

136

18. A method according to any one of claims 13 to 17 wherein the at least one target gene is under the transcriptional control of a promoter region sensitive to Notch signalling.
- 5 19. A method according to claim 18 wherein the promoter region sensitive to Notch signalling is a CBF-1, Hes-1, Hes-5, E(spl), Il-10, CD-23, Dlx-1, CTLA4, CD-4, Numb, Mastermind or Dsh promoter.
- 10 20. A method according to any of claims 13 to 19 wherein the at least one target gene is under the transcriptional control of a promoter region sensitive to:
- i) Notch signalling; and
 - ii) a second signal; and/or
 - iii) a third signal
- 15 wherein the second and third signals are different.
21. A method according to claim 20 wherein the second signal results from activation of a signalling pathway specific to cells of the immune system.
- 20 22. A method according to claim 21 wherein the signalling pathway specific to cells of the immune system is a T cell receptor (TCR) signalling pathway.
23. A method according to claim 21 wherein the signalling pathway specific to cells of the immune system is a B cell receptor (BCR) signalling pathway.
- 25 24. A method according to claim 21 wherein the signalling pathway specific to cells of the immune system is a Toll-like receptor (TLR) signalling pathway.
25. A method according to any one of claims 20 to 24 wherein the third signal is a
- 30 costimulus specific to cells of the immune system.

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

137

26. A method according to claim 25 wherein the costimulus is selected from the group consisting of: B7 proteins B7.1-CD80, B7.2-CD86, B7H1, B7H2, B7H3, B7RP1, B7RP2, CTLA4, ICOS, CD2, CD24, CD27, CD30, CD34, CD38, CD40, CD44, CD45, CD49, CD69, CD70, CD95 (Fas), CD134, CD134L, CD153, CD154, 4-1BB, 4-1BB-L, LFA-1, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, OX40, OX40L, TRANCE/RANK ligands, Fas ligand, MHC class II, DEC205-CD205, CD204-Scavenger receptor, CD14, CD206 (mannose receptor), Toll-like receptors (TLRs), such as TLR 1-9, CD207 (Langerin), CD209 (DC-SIGN), FC γ receptor 2 (CD32), CD64 (FC γ receptor 1), CD68, CD83, CD33, CD54, BDCA-2, BDCA-3, BDCA-4, chemokine receptors, cytokines, growth factors and growth factor receptor agonists, and variants, derivatives, analogues and fragments thereof.
27. A method according to any one of claims 13 to 26 wherein expression of the at least one target gene is monitored with a protein assay.
28. A method according to any of claims 13 to 26 wherein expression of the at least one target gene is monitored with a nucleic acid assay.
29. A method according to any one of the preceding claims wherein Notch signalling is activated by activating Notch, providing a constitutively active truncated form of Notch or providing an active Notch IC domain.
30. A method according to any one of the preceding claims wherein the candidate modulator has a molecular weight of less than about 1000.
31. A method according to any one of the preceding claims wherein the candidate modulator has a molecular weight of less than about 500.
32. A method according to any one of the preceding claims wherein the cell of the immune system is a T cell or T cell progenitor.

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

138

33. A method as claimed in claim 32 wherein the T-cell is activated by activation of the T-cell receptor.
34. A method as claimed in claim 33 wherein the T-cell is activated with an antigen
5 or antigenic determinant.
35. A method as claimed in claim 33 wherein the T-cell is activated by an anti-CD3 or anti-TCR antibody
- 10 36. A method as claimed in claim 35 wherein the anti-CD3 antibody or anti-TCR antibody is bound to a support.
37. A method as claimed in claim 36 wherein the anti-CD3 antibody or anti-TCR antibody is bound to a particulate support.
15
38. A method as claimed in claim 33 wherein the T-cell is activated with a calcium ionophore.
39. A method as claimed in claim 33 wherein the T-cell is activated with an activator
20 of protein kinase C or MAP Kinase.
40. A method as claimed in any one of claims 33 to 39 wherein the T-cell is co-activated
- 25 41. A method as claimed in claim 40 wherein the T-cell is co-activated by activation of CD28.
42. A method as claimed in claim 41 wherein the T-cell receptor is co-activated by an anti-CD28 antibody or a CD28 ligand.
30

ENTERING THE RECORD (RULE 26)

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

139

43. A method as claimed in any one of claims 33 to 42 wherein the T-cell is activated by an anti-CD3 or anti-TCR antibody and co-activated by an anti-CD28 antibody or a CD28 ligand.
- 5 44. A method according to any one of claims 1 to 31 wherein the cell of the immune system is an antigen presenting cell (APC).
45. A method according to any one of claims 1 to 31 wherein the cell of the immune system is a B-cell.
- 10 46. A method according to any one of the preceding claims wherein the immune cell is transfected with an expression vector coding for Notch, a constitutively active truncated form of Notch or a Notch IC domain.
- 15 47. A method according to any one of the preceding claims wherein the immune cell is transfected with a Notch reporter construct.
48. A modulator identifiable by a method according to any one of the preceding claims.
- 20 49. A modulator identified by a method according to any one of the preceding claims.
50. Use of a modulator according to claim 48 or claim 49 for the preparation of a medicament for the treatment of a disease or condition of, or related to, the immune system.
- 25 51. Use of a modulator according to claim 50 wherein the disease is a T-cell mediated disease.
- 30 52. Use of a modulator according to claim 50 wherein the disease is a B-cell mediated disease.

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

140

53. Use of a modulator according to claim 50 wherein the disease is an APC mediated disease.
- 5 54. A pharmaceutical composition comprising a therapeutically effective amount of at least one modulator according to claim 48 or claim 49 and a pharmaceutically acceptable carrier, diluent and/or excipient.
- 10 55. A method as claimed in any one of the preceding claims wherein Notch signalling is activated with a Notch ligand.
56. A method as claimed in wherein the Notch ligand is presented on a cell or cell membrane.
- 15 57. A method as claimed in claim 45 wherein the Notch ligand is bound to a support.
58. A particle comprising protein comprising a Delta DSL domain and at least one Delta EGF domain bound to a particulate support matrix.
- 20 59. A particle comprising a protein comprising a Delta extracellular domain or an active portion thereof bound to a particulate support matrix.
60. A particle as claimed in claim 58 or claim 59 wherein the particulate support matrix is a bead.
- 25 61. A particle as claimed in any one of claims 58 to 60 wherein a plurality of such proteins are bound to the particulate support matrix.
62. A method for detecting genes which are upregulated in an immune cell in response to a combination of Notch signalling and immune cell activation comprising the steps of (in any order):
- 30

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

141

- (a) activating an immune cell;
- (b) activating Notch signalling in the cell;
- (c) monitoring gene expression; and
- (d) determining which genes are upregulated or downregulated.

5

63. A method for detecting genes which are more significantly upregulated or downregulated in an immune cell in response to a combination of Notch signalling and immune cell activation than in response to Notch signalling or immune cell activation alone comprising the steps of (in any order):

10

- (a) activating an immune cell;
- (b) activating Notch signalling in the cell;
- (c) monitoring gene expression;
- (d) determining whether gene expression is upregulated or downregulated in the

15 cell; and

- (e) comparing gene expression from step (d) with controls in which the cell is not activated or Notch signalling is not activated.

64. A method as claimed in claims 62 or claim 63 wherein gene expression is monitored using a microarray.

20

65. A method as claimed in any one of claims 62 to 64 wherein the immune cell is a T-cell.

25 66. A gene detected by a method as claimed in any one of claims 62 to 65.

67. An assay comprising the steps of (in any order):

- (a) providing a culture of immune cells;

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

142

- (b) transfecting said cells with a Notch signalling reporter construct;
- (c) optionally transfecting said cells with a nucleic acid coding for Notch, a constitutively active truncated form of Notch or a Notch IC domain;
- (d) optionally providing a Notch ligand;
- 5 (e) exposing the cells to one or more compound(s) to be tested; and
- (f) determining the difference in Notch signalling between cells exposed to the compound(s) to be tested and cells not so exposed.
68. An assay comprising the steps of (in any order):
- 10 (a) providing a culture of immune cells;
- (b) optionally transfecting said cells with a Notch signalling reporter construct;
- (c) transfecting said cells with a nucleic acid coding for Notch, a constitutively active truncated form of Notch or a Notch IC domain;
- 15 (d) optionally providing a Notch ligand;
- (e) exposing the cells to one or more compound(s) to be tested; and
- (f) determining the difference in Notch signalling between cells exposed to the compound(s) to be tested and cells not so exposed.
- 20 69. An assay as claimed in claim 67 or claim 68 comprising the step of activating the immune cell.
70. A method or assay as claimed in any one of the preceding claims wherein Notch signalling is monitored by monitoring cytokine production.
- 25 71. A method or assay as claimed in claim 70 wherein Notch signalling is monitored by monitoring IL-10 production.
- 30 72. A method or assay as claimed in claim 70 wherein Notch signalling is monitored by monitoring TNF production.

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

143

73. A method or assay as claimed in claim 70 wherein Notch signalling is monitored by monitoring IFN gamma production.
74. A method or assay as claimed in claim 70 wherein Notch signalling is monitored by monitoring IL-5 production.
75. A method or assay as claimed in claim 70 wherein Notch signalling is monitored by monitoring IL-13 production.
- 10 76. An immune cell transfected with:
- (i) a Notch signalling reporter construct; and
 - (ii) an expression vector coding for Notch, a constitutively active truncated form of Notch or a Notch IC domain.
- 15 77. An immune cell transfected with:
- (i) a Notch signalling reporter construct; and
 - (ii) an expression vector coding for a constitutively active truncated form of Notch.
- 20 78. An immune cell transfected with:
- (i) a Notch signalling reporter construct; and
 - (ii) an expression vector coding for a Notch IC domain.
- 25 79. An immune cell as claimed in any one of claims 76 to 78 which is stably transfected.
80. A method for detecting modulators of Notch signalling comprising the steps of monitoring Notch signalling in a cell of the immune system in the presence and absence of a candidate modulator having a molecular weight of less than about 1000, and determining whether the candidate modulator modulates Notch signalling.
- 30 81. A method for detecting modulators of Notch signalling comprising the steps of:

WO 03/012441

PCT/GB02/03397

144

- (a) contacting a cell of the immune system with a candidate modulator having a molecular weight of less than about 1000;
- (b) monitoring Notch signalling; and
- (c) determining whether the candidate modulator modulates Notch signalling.

5

82. A method as claimed in claim 80 or claim 81 wherein the candidate modulator has a molecular weight of less than about 500.

10

15

20

25

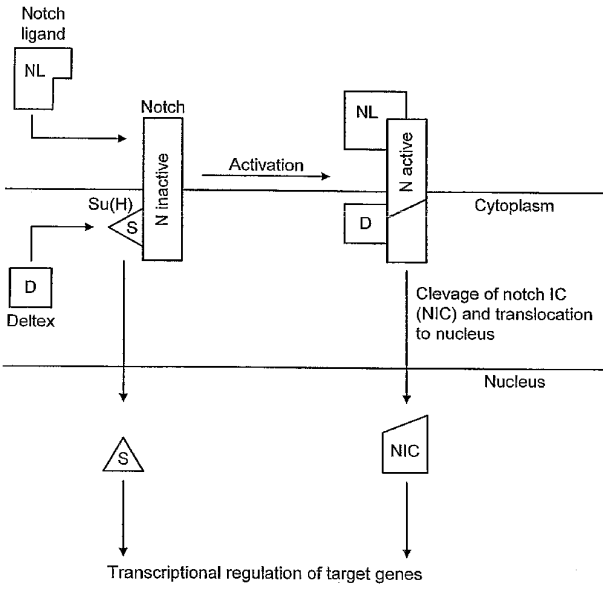


FIG. 1

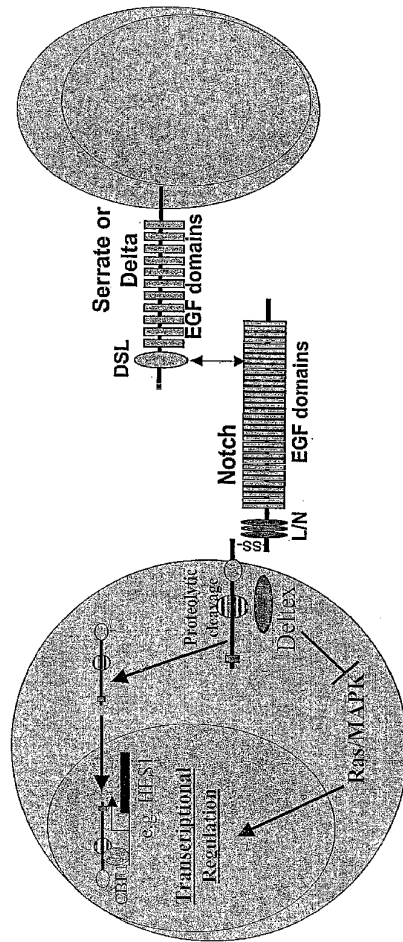
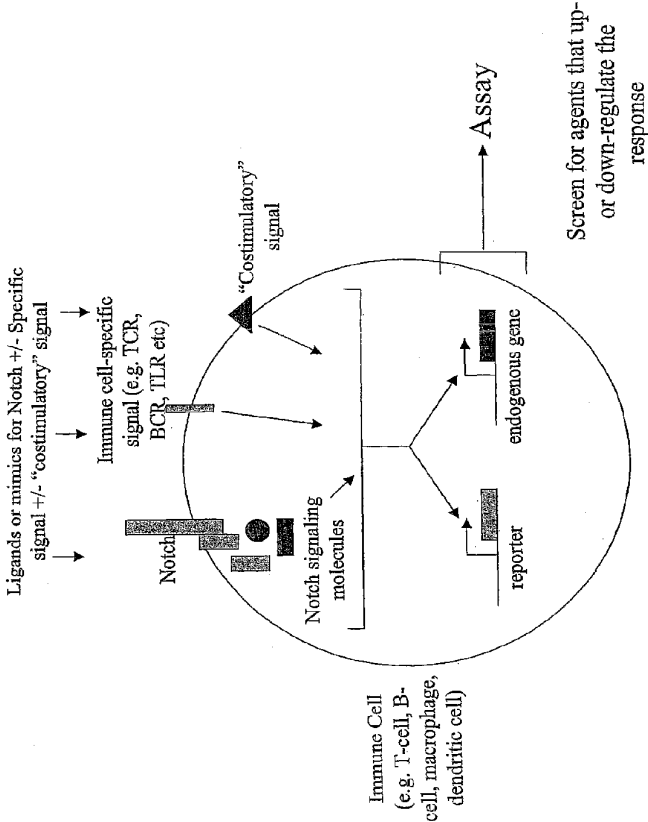


Figure 2

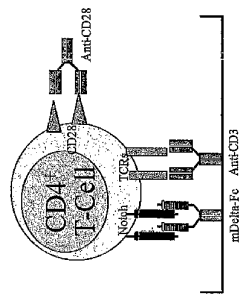
FIGURE 3



WO 03/012441

4/36

PCT/GB02/03397

Figure 4

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

Figure 5

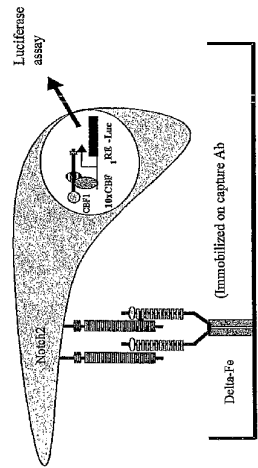


Figure 6

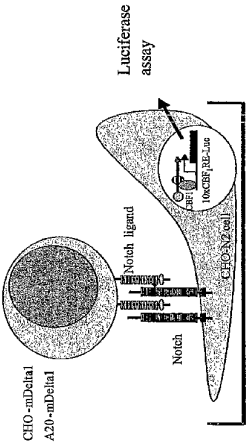


Figure 7

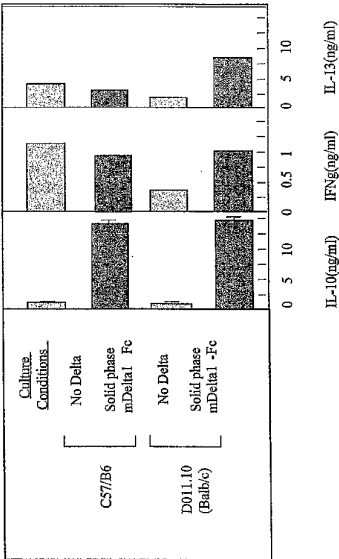


Figure 8

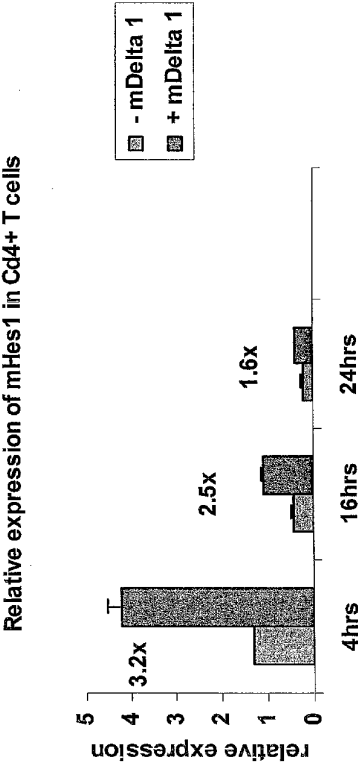
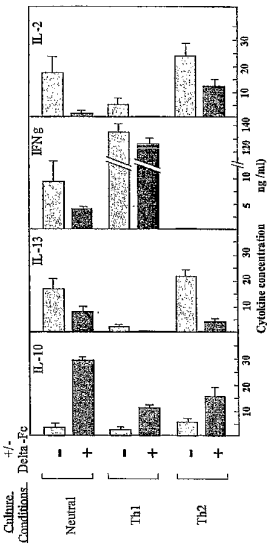


Figure 9
Cytokine production under polarising conditions



WO 03/012441

10/36

PCT/GB02/03397

Figure 10

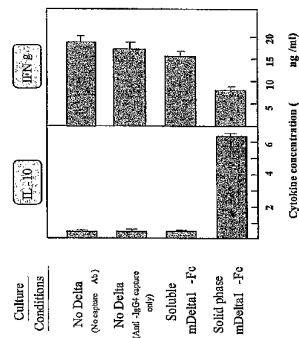
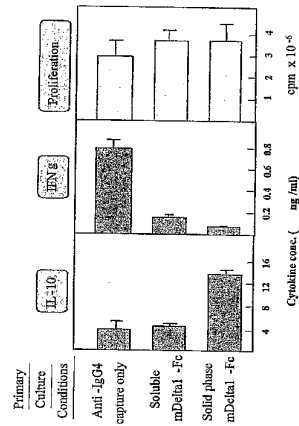


Figure 11



WO 03/012441

12/36

PCT/GB02/03397

Figure 12

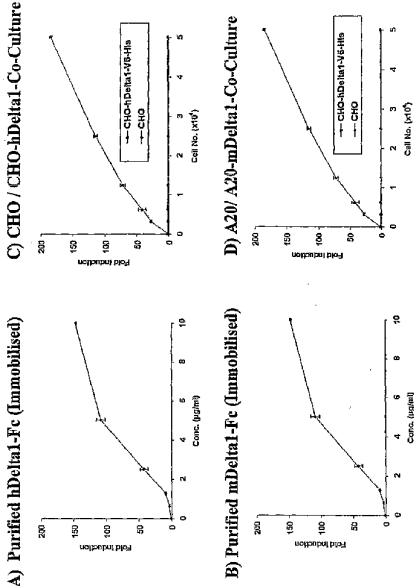


Figure 13: Delta-Fc coated beads modulate *in vitro* T-cell responses

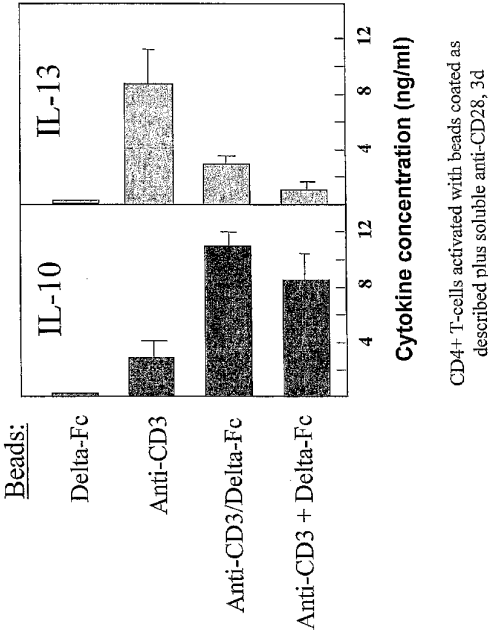


Figure 14: Increase in IL-10 production in the presence of mouse or human Delta1 beads

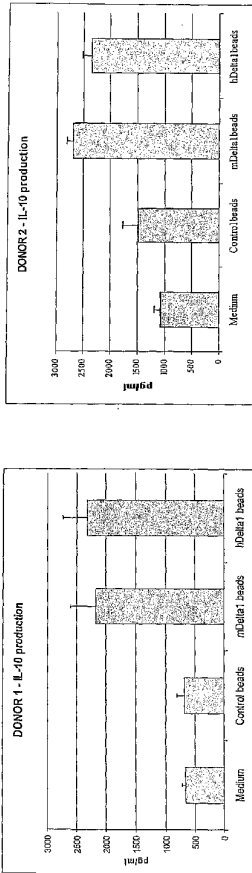


Figure 15: Decrease in IL-5 production in the presence of mouse or human Delta1 beads

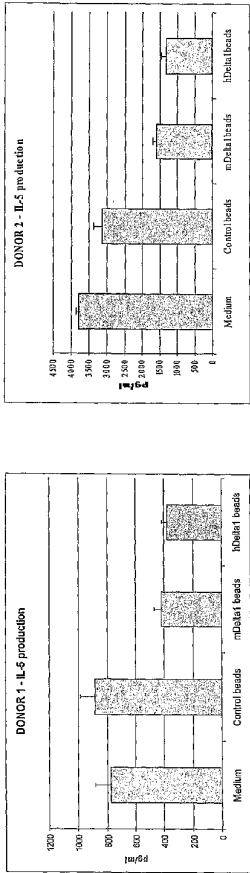


Figure 16: Increase in IL-10 production in the presence of mouse Delta1 beads

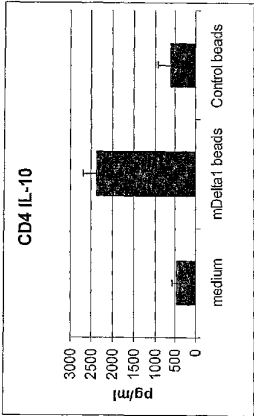
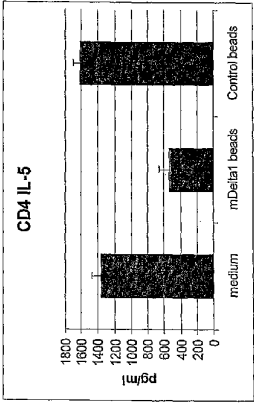


Figure 17: Decrease in IL-5 production in the presence of mouse Delta1 beads



WO 03/012441

16/36

PCT/GB02/03397

Figure 18: mDelta1-Fc Enhances IL-10 Production and decreases IFN γ and IL-5 Production by Human CD4 $^{+}$ T-Cells

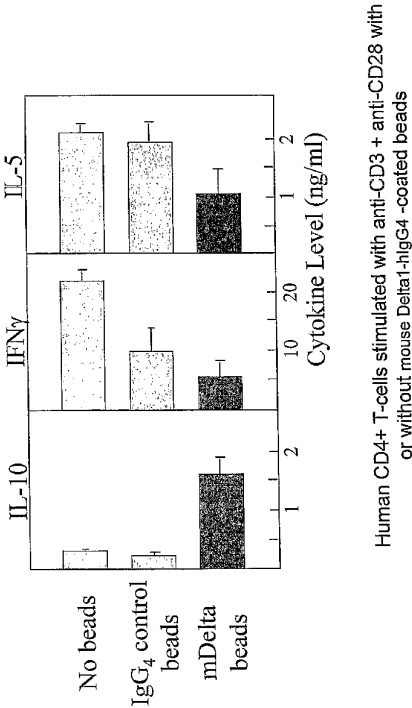
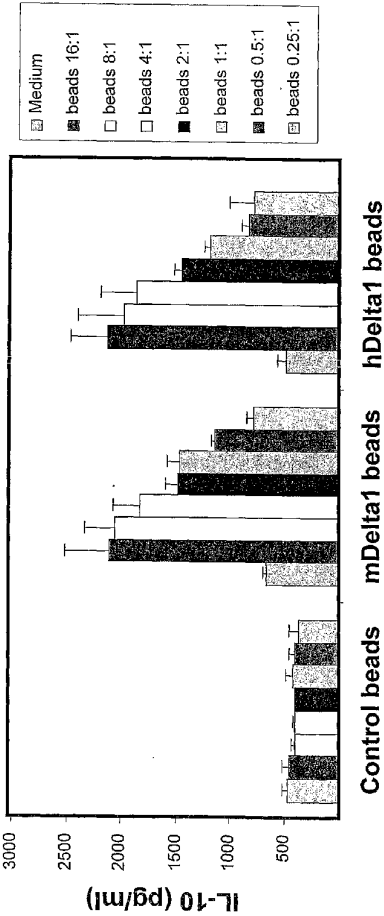
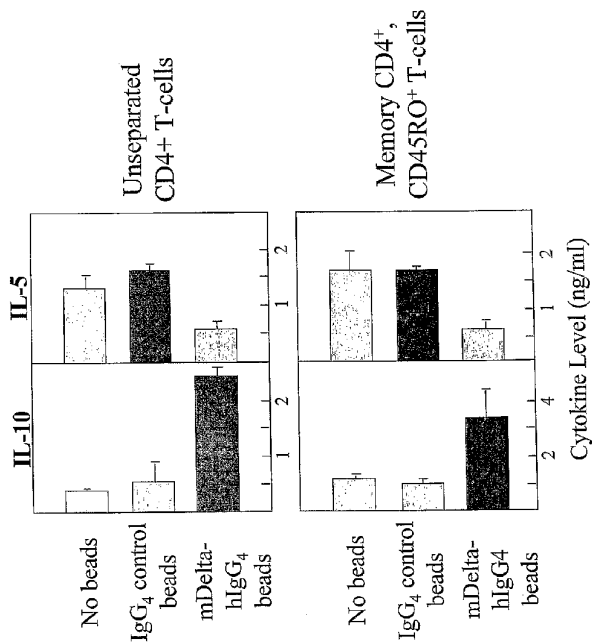


Figure 19: Delta1 enhances IL-10 production by human CD4+ T-cells



Cells stimulated with anti-CD3/CD28 with or without Delta coated beads as shown (medium only and then bead: cell ratios 16:1, 8:1, 4:1, 2:1, 1:1, 0.5:1 and 0.25:1 from left to right in each group)

Figure 20: mDelta1-Fc Enhances IL-10 Production and decreases IL-5 production by Anti-CD3/CD28 Activated Human CD4⁺ T-Cells



WO 03/012441

19/36

PCT/GB02/03397

Figure 21: Delta-Fc enhances IL-10 production by murine CD4+ T-cells, even in presence of Th1 or Th2 cytokines

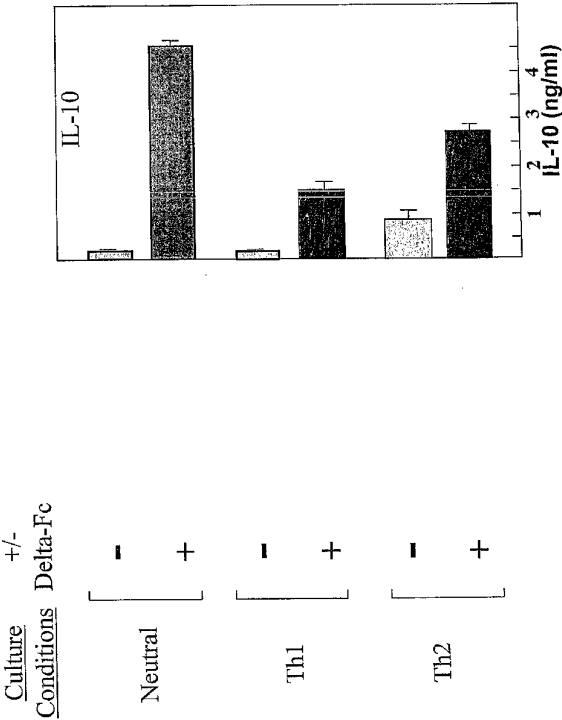


Figure 22: Micro-Array Profiling of Delta-Activated Genes in Jurkat T-Cells

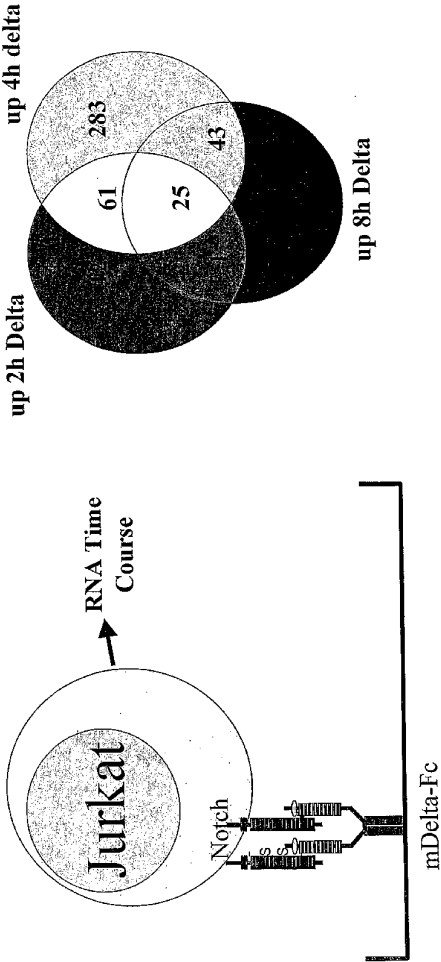


Figure 22B

Figure 22A

Figure 23: Delta-Mediated Activation of Gene Expression in Jurkat T-Cells

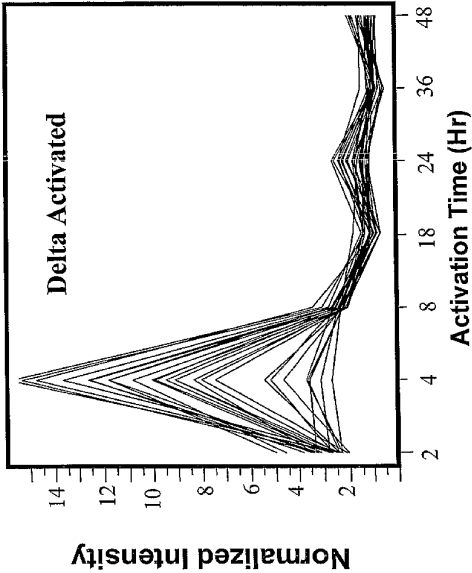


Figure 24: Micro-Array Profiling of Delta-Activated Genes in Jurkat T-Cells

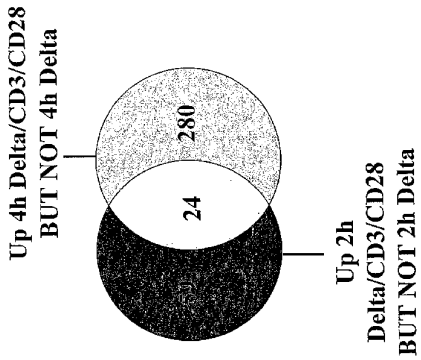


Figure 24B

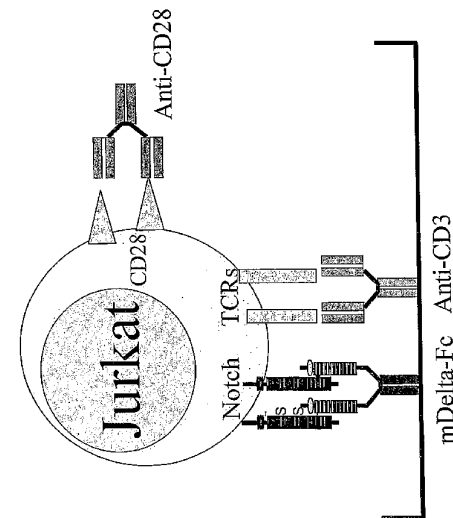
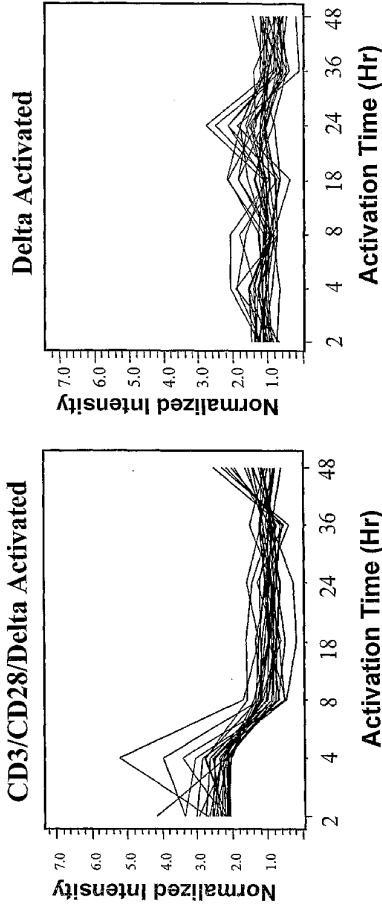
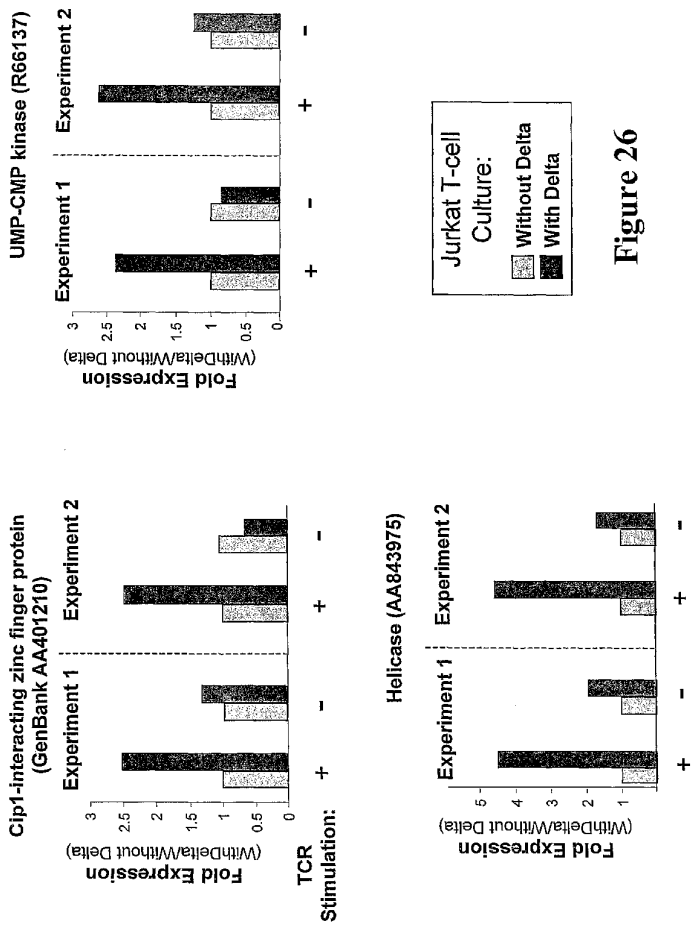


Figure 24A

Figure 25: Delta Modulation of Anti-CD3/CD28 Activation of Gene Expression in Jurkat T-Cells





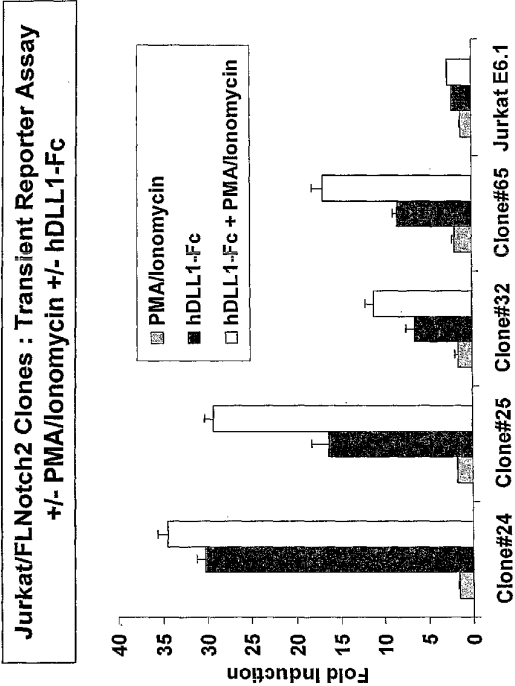


Figure 27

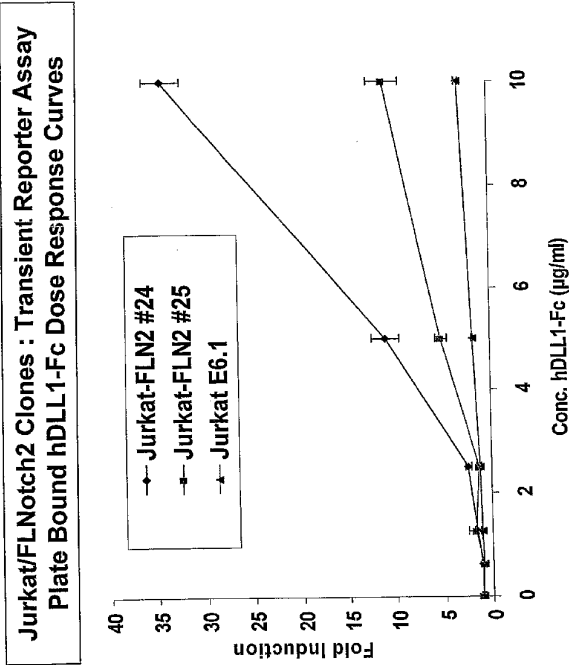


Figure 28

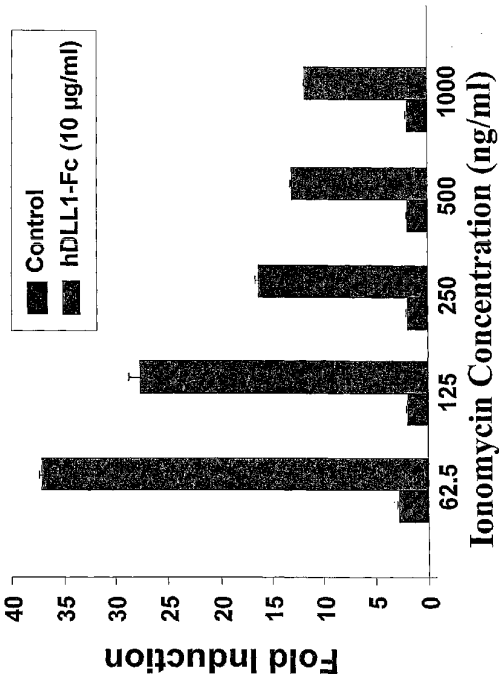
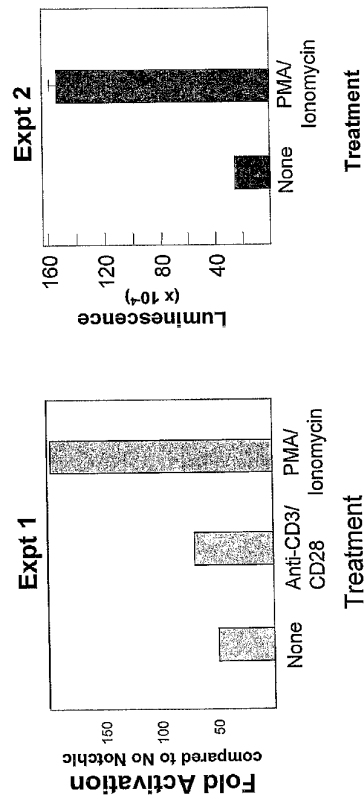


Figure 29



All Cells Transfected with CBF1-luciferase reporter + Nic

Figure 30

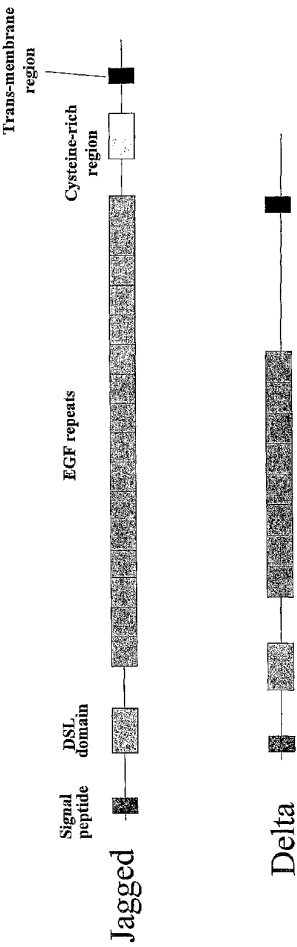


Figure 31

WO 03/012441

30/36

PCT/GB02/03397

DL_DROME/164-226	WTKNKSEQ....YT-----SLIYDFRVTCDIANYGSCAKFCSPDDSPGSHSCSEKTCHEIICLIGWQCDYC
DL11_HUMAN/159-221	WSQDLHSSG....RT-----DLIYSYRVFCDEHYIGGCGSVFCRPDDAFCHFCGKGVKQVCFWKQFPC
DL11_MOUSE/158-220	WSQDLHSSG....RT-----DLIYSYRVFCDEHYIGGCGSVFCRPDDAFCHFCGKGVKQVCFWKQFPC
DL11_RAT/158-220	WSQDLHSSG....RT-----DLIYSYRVFCDEHYIGGCGSVFCRPDDAFCHFCGKGVKQVCFWKQFPC
DL14_MOUSE/156-218	WRTDEQNDT....LF-----ELIYSYRVICSDNYGSCSRCLKKGDHDFHYTCOPDGLSCLFQWTKCYC
DL14_HUMAN/155-217	WLIDEQNST....LT-----ELIYSYRVICSDNYGSCSRCLKKENDHGHVYCPDGLSCLFQWTKCYC
Rat J1 (Q63722)	WQTLKQNTG....IA-----HFEYQIVRTCDHYIGFCNKFCHRPDDFFGHYACDQNGKNTCMGGMGPEFC
Mouse J1 (Q9QXX0)	WQTLKQNTG....IA-----HFEYQIVRTCDHYIGFCNKFCHRPDDFFGHYACDQNGKNTCMGGMGPEFC
Human J1 (Q15122)	WQTLKQNTG....VA-----HFEYQIVRTCDHYIGFCNKFCHRPDDFFGHYACDQNGKNTCMGGMGREG
Chick J1 (Q00819)	WQTLKQNTG....AA-----HFEYQIVRTCAEHYIGFCNKFCHRPDDFFHHCTDQNGKNTCMGGMGREG
Chick J2 (Q42347)	WQTLQNGP....VA-----NFEVQIVKCDENYSALCNKFCQFPDDFVGHYTCQNGKACMGGMGREG
Mouse J2 (Q9QY55)	WKSLEFSGH....VA-----HLELQIVKCDENYSATCNKFCRPNDFFGHYTCQYGNKACMDGMMGREG
Human J2 (Q9UNR8)	WKSLEFSGH....VA-----HLELQIVKCDENYSATCNKFCRPNDFFGHYTCQYGNKACMDGMMGREG
Rat J2 (P97607)	WKSLEFSGH....VA-----HLELQIVKCDENYSATCNKFCRPNDFFGHYTCQYGNKACMDGMMGREG
Human J2 (Q9Y219)	WKSLEFSGH....VA-----HLELQIVKCDENYSATCNKFCRPNDFFGHYTCQYGNKACMDGMMGREG
SEBR_DROME/221-283	WKTLDHGR....NA-----RLIYVAVQCAVTVYNTCTFTFCRPNDDQFGHYACGSGGKCLINGWQVNC

Figure 32

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

(human Delta 1; GenBank Accession No. AF003522)

MGSRCAIAVLSAILCOVWSGVFELKQEFVNRKGLGNRCRCGAGPPQACRTFFVCKHYQASVPEPCTYGSATVTVLGYDSFSFSDGGGA
DSAPNDTRPFGFWGCTWFSLLITAEALHWDSPDILATENPERLSKLANORHLVGRWSDQLHSSGTDLKYSTRVCDHYHTEGCSVTCREDDAAG
HFTCGRGKAVCNQKHGPGVCTEPICLPGCBQEGCDHQBEGCKGVNQGRVCDBCTVPGCLHGTCQQPMQCNQSGWGLFCQDQDIANCYTHHKPCQN
GACINTGQSSITCSKRPFTTGACELGIDEDCFPCRGSGCTDLNANSYSCICPFPFYGKICELNMTCALDPCFCNGRCASDSFGGTSRCRCYVTSBP
NCRKKIDYCSSSFCNRGACVDDGAILCRQDAGFGRRCDNDVDCASFCGANGCRDQGVNDFSCCPFTTGRCNSAPVSRGSHAFRCNATCRHG
HGXYCECARGYGGNCQGLLELPPGPAVVDLZEKLGGGGFFWAVACAGVYVIMLILGCAAVVYVHLQKRRFPADPCRGFTFMMNLANCQK
DISVSLIGATQIKNTNKKADFHGDSADNGGFAKYPAYDINIVQDLKGDPAVRDAHSHKDTKCPQGSSEEEKGTFPTLHGGEASERKHPGSCSTSK
DTKYQSVYVISEEDKCVIATEV

(human Delta 3; GenBank Accession No. NM_016941)

MYSPRSGLLSQVILALIFTQIRPAGVTFELQHSFGGFGGFCAPRSPCSARLPORLFFRVCLKPLSEAAEAPCALGALSARGVYITEQCAPADL
PLPDGLQVPRFNDAMFGTSFTIETWRELGDQIGPANSILARVAGRRLLAAGGFWARDIQRAGWELRFSYSTRACPPFAYGACTTLCRPPSAPBRGCP
GLRCPALDECEAPVACRAGCSPEHCFQCEQCEGCEGLGWTFGLCTVFTVSTSSCLSPRSPSATTGCTVPGFQCDGNFCANGSGSCTFRSFTCTCPRG
FVGLRGVSGVTCADGFCNGGLGVGGADPDSAYICHCPFGQSGNCKRVDSLOPCNNGGICLDLGHALRCRAGFAGRCRHIDLDPCAGACAGG
TCVLEGGAHECSICALGFGGRDRCERADPCARPCAHGGECYAHFSGLVCACAPGYAGARGEPFVHPDGSALPAAFGPLRGDPQRTLLFPALGLIYAAGV
AGRAALLVHYRGGHSGDAGSRLLAGTPEPSVHALPDALNLTQEGSGDGPSSVDWNRBEDVDQGIIVISAPSIYAREVATELFFELHTCRAGORQHL
LEPYPSSLLSYK

(human Delta 4; GenBank Accession No. AF_253468)

MAAASRSASOWALLIVAIMQORAAGSGVFLQLQETINERGVLASGRPCPCRTFRVCLHQTQAVVSPGPCCTGCTVSTVPLGNISAVNRDSSGGRN
PLQLPNNTPGTFSLIIEAHAFGDDLRFEALPDALISKIALQGLAVQGNLLDEQTSLLRLYSYRVISDNYGDNCRLCKRRKRDHFHXYQOP
DGNLSCLFGWTGTCQPTCLSGCHEQNGYCSKPAECLCRPGMQRCLRECIPIHNGCRGCTSPMQCTDGGWGLEFCQDQDIANCYTHHSPCKNATCSNS
GQBSYTCIRPGYTVGDCELELSECDNFCRNGSGCDQEGYHCLCPFTYGLCHSHSLSCASDPCFNNGSCRRNQCANIACPCPNFTGSKNCKKVD
RCTSNFCANGCCLNFGSPSMACRCRPGFTGYICLHVSDCARNPCAHGGCTCHLNGLCMCTCFAGSGRCNCHVTSIDA CASSPCTNRAICYDLSHDFV
CNCPTGYGSRCEFPVGLPSPFWAVSLGVGLAVLVLVLLGAVAVRQLRRPDDGSRKAMNLSDFQCNLIPAAQLKNTNQKRELYDGLDKSNGC
KQCNHTLDYNLAPGLRGCTMGCKFPHSDKSLGEKAPLHLSHSEKPCRISALCSPRDSMTQSVLLISEERNECVIATEV

Figure 33

[illegible]

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 03/012441

33/36

PCT/GB02/03397

HumanNuclei(AF308602)

MPPLAFLCLALLPAAAGPRCSQSFETNGKRCFAANTCAVCGGAFVGRCDNPLCLSTPCNNAGTCHVYDRGVADYACSCALGFSGLC
 LAFPLDNACTNPPCNGCTCCLALLNEXKRCPCPQMSKSGSQADPPCASNPANGSQCLPFASXICHCPSPSTFGTCKRVNVCQKRLCHGGSTCH
 NEVSGXVCRAIHHTCENGCEHPVPCSPFONGGCTEPGTVHWCACLPCTGCONCERNIDGCPGNNKNGACVADVNTVNCPCPEPWGGOYCTE
 DVDECCQMPNACQNGSTCNTHGNCVVCVNGWNGEDSENIDOCASACFHTGATCDHRVASFTCECHGTGGLCHLANDACISNPNNGSNCTNPV
 NDKALCTCPGSGTGPACSDVDESGLANPCEHAGKCLNLSFECQLGQVGRCEITDVNECVSNPCQNDATCLDQIGSPQCMGEGYGVHCVN
 TDECASSPCLHNGRCIDKTNFQCCTPGTGHLLQDVIDECASFTPCNGKAGCIDGENTVTCVTEGCTGHCEDVIDECDFPFCCHYGSCVGAUTP
 CLCRPGTGHCEITNINECSSQPCRLGTCQDDNAYLCTCLKGTGFNCHINDOCASSFCDSCTCLKDCCEACAPGTCGMSNNSNIDECAGNP
 CHNGCTEDGINGFTCKRCEGTHDPTCLSEVNECNSNPVHGACRDSINGTKDCDPPGMSSTNCDINNNECNPVNGGTCAGMSTCICTCRGHS
 GENCOTNINECASNPCLNKGTCIDDVATKNCCLILETTGATCEVTLAFAPSPCRNGGECQSEDIENECASDPCRNAGCTDVIDSTCTCPAGPSGIIH
 ASCQNTHXKXCHCQAGYSGRCEIDIDCRPNCHNGSCTDGTATACDCLCFGRGTCEEDINECASDPCRNAGCTDVIDSTCTCPAGPSGIIH
 CENNTDCHESCFNGCTVDINSFTCLCPPEGTGYORVNECDSECLGCTCQCGRCLHCTCPCQYTCGPNQNLVHWDSPSPCKNGKQWIT
 HTVYRCPCPSGWTGXCVDPSVCEVAAQGVDAVLCQHGELVDAGNTHRCQAGYSGYCEDVDECFSPQNGATCTDYLGGYSCKVAGY
 HGVNCSSEIDCLSHPCONGTCLDLPWYKCGCPGTGVCEINVDNCPVDPVRSKCFNNGTCVGVGYSCTCPGVGERCEGDVNECLIS
 NCDARGTQVQVNDPEHCRAHGTGRCEVYINGCKGKPKNGGTCVASTNATGFTCKCPAGEGATCANDARTCSRLNGCTCISGRSPT
 CLCGPTTGRCCQFPASSFCPCGNCYNGCTCEPSEAPTECLCPAKENGILCHTIDYSGGAGEDIPPTLEACELPEQCEADGNVCSLQCNN
 HACGWGDCSHMFNDPWNCTQSQCWRTSDSGHDSQCNBAGCLPQDQCRASGQCNLDQYCDHFSQDQCGQNSACCEWGLDCAHVPE
 RLAAGTAVVYVMPFEQJNNSSEHFLHLSRVLHNVVFRONHQQMIFPYTGSEELKHUTBAAGCBALPDALLGOVKALPLPGSGSGRERE
 LQDMVRSIVILEIDNRQCVQASSQCTFASNTVAFLGALASLGSINLPIKLAQSBETVEPPAQJHRTVAAALFVLLPVGCGLLSKRERQ
 HGQWTFEGFNVSEASKKREPLGESVGLKFLKASDGLMDDQNGEDDLETKHFEETVEVYLDLDDQTDHQQWTOHLDRAADLNSMAPT
 PQCEVNDACNDVNVGPGCTFPIMASCSGGILETGNSEEDAPVISEDFTYQASLHNDDETFETALHLARARSADAKRLASADANIQDN
 MGRVFLHAAYDAQCVQFILLINRATDIDARMEDGTFPLTLAARLVGEMLEDLINSHADVNVDLCKSLHWAANVNDAAVLLKNGACQDQ
 NNRRETFLEAAREGSYETAUVLDHFANRDITDMDLPRDLAQERMHDIIVLLDEXNIVNSQLHGEFGTFTPLCSFNGTGLSKFPVQG
 KKVKTPSKGLACGSKKAKOLKARKKSQDGRCLIDSGLSPVDSLESPGHYLSDVASFPILSPFPQSPSPVFINHLPAGADPTILIGLNVAAKP
 EMALGGGRUATENGPRPLSHLVASGTSVTLGSSSGCALNFTVGGSTINGCQWLSRLQSGAVPNQINPLRGSVAFGLPTQAPSLQHMVGLH
 SLLAASALSQMSYQGLPSTKLATQPHLVQVQVQFQNLQOQNLQFANIQQQSLQPPPPQPHLVSAASCHLGRSFTLSGTPSQADYQFLQFS
 SLAVHTILLQESLALPTSLPSLLVPPYTAQQLPSPQSHSYSSPVDNTPESHQLOVPEHFFILTSPSEFDQNSSSSPHSNVSNDWSEGVSPFNSMQSQI
 AKLPEAFK

Figure 35

HumanNotch2(AA36377)

MEALRALWALWLCACAPAHALQCRDGYEPCVNGACVTVHNGKCKCFEGLGEYQOHHDFCEKRCQNGCTCVQAAMLGKATCRASGE
TGEDCOYSTHPCFYSPCLNGTCHMLSVYTECTQVGETKEQWTDACLSPCLNGSTCTTVANOFCKLCTFTGCKCFEDVNECDIPGHC
QHGSTCLNLGSGYCCQCFGTGCTGCTSLYVCAFPSCVNGCTCRGTGDFTECNCLPDEFGSTCERNIDDCENHRQNGGVGVGVANTNCRQPP
QNTGQCTEDVDECLLQPLACQNGCTCANNGGVGVGVNGSGCDCKSENIDDCAFAPSTGATCIDRVASFSCMECKGACLLCHLDACISNPC
HKGALCDYNPLNGTTCCTCQCTKGACCTEDVDCAMANSNCFCHAGKCVNDGAFHCECLKGYAGRCENDINCHSDPCQNDATCLDKIGGFTC
LCMPGFGVHCETEINCCSNFCVNGGVGVGVNRRFQCLCPFGTGTTCQIDDDCSNFCPLNGKCTIDHNGYECOCATGPGVLCERNINDCP
DECHGQCGDIDSTICINFTGMAICSDQIDECYSFCLNDGKCIDLVNGIQCNQGTGSGVNGCIINFDCAENFCILGICQAGVINGCFVNEGCI
GFTGRCNIDIDEASNFCRKGATCINGVNGFCICPFHGFSCYSVNGEISNFCINGNCTGSGKICLDCAGVINGCFVNEGCI
GTCNDLVNGYRCTCKGFGZTCQVNDDECAENPCNQGTGDFDYSYTCVCTVYTKRNGCTVFLAPCSNFCENCAVCRSENFSTYCLCARG
WQQRCTIDIDECISKPCNHGLCHNTQSTACTCPCFGSGMDCEDIDCLANPCQNGSCMDGVATFCLPFGTCKQIDNNECLSEPCN
GTCSDYNSYTCQAGADGVHCENINECTESCFNGCTVGINFSCLCPVGTGSGFCIHEINCSHPCLNNGCTVCGLGTPNRCPLGYT
GKNCQTLNLCSPCKNGKCYOKKAE9CCLCFSGMAGTCVENVSCDIAASRSGVINEHLQCHSGVINCAGNTHYCOOBLGTYGSCYEDDE
SBCLPBAGECEGDNECLSNPCSSGSLDICIOTNDYLAVCRBAFTGKHCTFVDCFCQPLMGCTCAVANSMPDGTCLRCPPFGSGARQCS
SCQVCKRKEGCTHETASPPCTCPSPDCE8GCA8SPCQHGSGCHPORQPYYSQCAPFSGSRKCYLTAPESTPATCISQYCADKARDGVCD
EACNSHAQMGDGDGSLINENFWANCSPLFCWYINSCQDELCTVCLPNTFCQGNKCTCKYCADHFKONHCQCNSEECGMDGLDCAA
DQPERNAGCTIVTVVLPFQQLQDARSFIRALGTLTHLLELGBDSGELAVPYTKSKAMKORHRSKSLPGBQSVAGSVLEIDNRQC
VQSDHCFRNTDAAALASHALQGTSLSTVSVSESLTPEKQQLLLAVAVTILLGLVDAKSKSHSLALPEGFTLRDASNHRRE
PYQDQVGLKLSVYZEANLIGTSEHWVDEGGQPKKYRADPALLSEDDPIDRNFQOHLADITESTSLATPPQASQEVOLVAVYA
GPGCTETMLASLUGSSDLSDEDAEDSSANTIIDLVQASLQADQRTGEMALHAKRISADAAKLLIDAGADANQDNMERCPHLAVYA
DAQVFCILINENVTDARNDGTTPLILAAVLAVEGVASLINCQADVADVDDHGSALHAAAVNVEATILLANGANRQMDNRETFEL
AAREGTEAAKILLDHFANRDIIDHMRLEFVVARURGHDIIVRLDEINVTSPFGTFLTSALSPLYGPNRSFLSKRHPHMKRSRFSASIM
PTSLPNIAKEADAKGRKKSLSEKVLSESVTLSEVTSLESPDTPADWNRVNEIYQNEFWATLAPAGCTHGTAPQSPRPECKHTTPEEPLPI
PLAGASVTVLPSQLSHHHIVSPGSGASLSRLHFVTPADWNRVNEIYQNEFWATLAPAGCTHGTAPQSPRPECKHTTPEEPLPI
VTWOLTPKGSTAPQAPQPSCTPPVAGPLPMTQIPEMARLPSVATPTAMFQDQVQAQTLIPAYHFFPFAVGKYPFPFSQHSYASSNAER
TPSHSLQGHETLTPSPSPQWSSSSSHASDWSVDVTSFTPGGAGGQGGGCTGHNSPPHNNQVYA

Figure 36

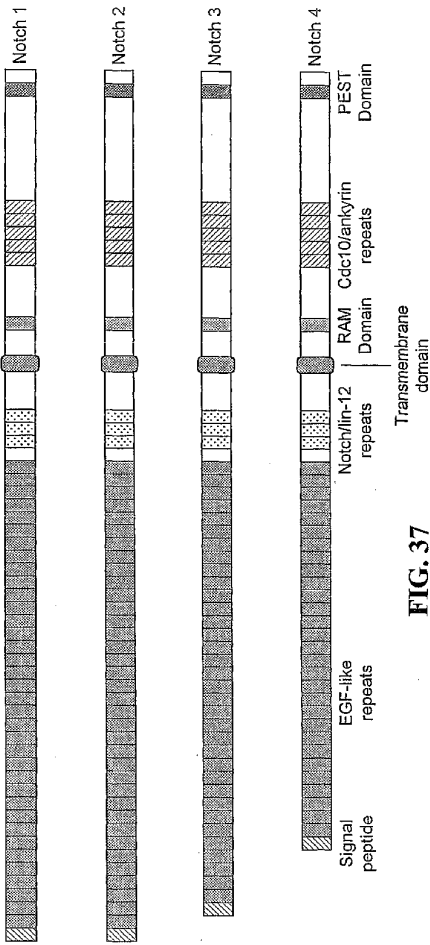


FIG. 37

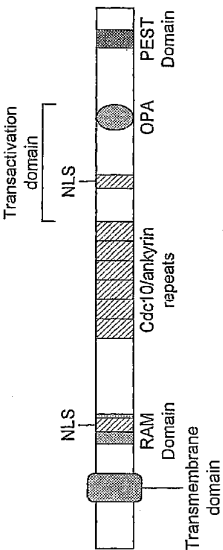


FIG. 38

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Int. # Application No. PCT/GB 02/03397
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/50 A61K38/17 A61P37/00		
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 7 G01N A61K A61P		
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 practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 20142 A (DALLMAN MARGARET JANE ;HOYNE GERALD FRANCIS (GB); IMPERIAL COLLEGE) 14 May 1998 (1998-05-14) page 9, line 9 -page 11, line 12 claims	1-15, 27-34, 44, 45, 48-56, 62-66, 80-82
X	WO 01 35990 A (LORANTIS LTD ;HOYNE GERARD FRANCIS (GB); LAMB JONATHAN ROBERT (GB)) 25 May 2001 (2001-05-25) page 11, line 15 -page 14, line 2 page 21, line 15 -page 23, line 16 -/-	1-15, 27-34, 44, 45, 48-56, 62-66, 80-82
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* 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 document 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* late 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 *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 24 October 2002		Date of mailing of the international search report 05/11/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Didelon, F

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter:	I Application No
PCT/GB 02/03397	

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00 36089 A (DALLMAN MARGARET JANE ; LORANTIS LTD (GB); HOYNE GERARD FRANCIS (GB) 22 June 2000 (2000-06-22) page 2, line 8 - line 21 page 12, line 5 -page 13, line 5 ---	1-15, 27-34, 44, 45, 48-56, 62-66, 80-82
X	WO 96 27610 A (HENRIQUE DOMINGOS M P ;IMP CANCER RES TECH (GB); MYAT ANNA M (GB);) 12 September 1996 (1996-09-12) page 36, paragraph 5.8 -page 62, paragraph 5.12 claims ---	48-54
X	WO 97 01571 A (IMP CANCER RES TECH ;LEWIS JULIAN H (GB); HENRIQUE DOMINGO M P (GB) 16 January 1997 (1997-01-16) page 39, paragraph 5.8 -page 54, paragraph 5.9.2 claims 62-69 ---	48-54
P, X	WO 02 12890 A (CHAMPION BRIAN ROBERT ; DALLMAN MARGARET JANE (GB); LORANTIS LTD (G) 14 February 2002 (2002-02-14) claims 59-73 -----	1-15, 27-34, 44, 45, 48-56, 62-66, 70-75, 80-82

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter	Application No
PCT/GB	02/03397

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9820142	A	14-05-1998	AU 736361 B2
			26-07-2001
			AU 4876597 A
			29-05-1998
			BG 103444 A
			30-06-2000
			CZ 9901639 A3
			13-10-1999
			EP 0942998 A1
			22-09-1999
			GB 2353094 A , B
			14-02-2001
			WO 9820142 A1
			14-05-1998
WO 0135990	A	25-05-2001	GB 2335194 A , B
			15-09-1999
			JP 2001504331 T
			03-04-2001
			NO 992196 A
			05-07-1999
			NZ 335549 A
			27-07-2001
			PL 333302 A1
			22-11-1999
			TR 9901000 T2
			21-07-1999
			HU 0001059 A2
			28-08-2000
WO 0135990	A	25-05-2001	AU 1405601 A
			30-05-2001
			EP 1230346 A2
WO 0036089	A	22-06-2000	14-08-2002
			25-05-2001
			WO 0135990 A2
WO 0036089	A	22-06-2000	AU 1789500 A
			03-07-2000
			EP 1141243 A2
			10-10-2001
			WO 0036089 A2
			22-06-2000
WO 9627610	A	12-09-1996	US 5869282 A
			09-02-1999
			AU 718955 B2
			04-05-2000
			AU 5420296 A
			23-09-1996
			CA 2214830 A1
			12-09-1996
			EP 0813545 A1
			29-12-1997
WO 9627610	A	12-09-1996	JP 11507203 T
			29-06-1999
			WO 9627610 A1
			12-09-1996
			US 6004924 A
			21-12-1999
WO 9701571	A	16-01-1997	AU 723939 B2
			07-09-2000
			AU 6481796 A
			30-01-1997
			CA 2226087 A1
			16-01-1997
			EP 0861261 A1
			02-09-1998
			JP 11508771 T
			03-08-1999
WO 9701571	A	16-01-1997	WO 9701571 A1
			16-01-1997
			US 2002107194 A1
			08-08-2002
			US 6262025 B1
WO 0212890	A	14-02-2002	17-07-2001
			18-02-2002
WO 0212890	A	14-02-2002	AU 7649901 A
			14-02-2002
WO 0212890	A	14-02-2002	WO 0212890 A2
			14-02-2002

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

F I

テーマコード(参考)

A 6 1 P 1/04
 A 6 1 P 1/16
 A 6 1 P 3/10
 A 6 1 P 7/00
 A 6 1 P 9/00
 A 6 1 P 9/10
 A 6 1 P 9/14
 A 6 1 P 11/00
 A 6 1 P 15/00
 A 6 1 P 17/00
 A 6 1 P 17/06
 A 6 1 P 19/02
 A 6 1 P 19/06
 A 6 1 P 21/00
 A 6 1 P 21/04
 A 6 1 P 25/00
 A 6 1 P 25/14
 A 6 1 P 25/16
 A 6 1 P 25/28
 A 6 1 P 25/32
 A 6 1 P 29/00
 A 6 1 P 29/02
 A 6 1 P 31/00
 A 6 1 P 31/04
 A 6 1 P 31/10
 A 6 1 P 31/12
 A 6 1 P 31/18
 A 6 1 P 33/00
 A 6 1 P 35/00
 A 6 1 P 35/02
 A 6 1 P 37/02
 A 6 1 P 37/04
 A 6 1 P 37/06
 A 6 1 P 43/00
 C 0 7 K 14/485
 C 1 2 N 5/10
 C 1 2 Q 1/02
 C 1 2 Q 1/68
 G 0 1 N 33/15
 G 0 1 N 33/50
 G 0 1 N 33/53
 G 0 1 N 33/58
 G 0 1 N 33/68
 G 0 1 N 37/00

A 6 1 P 1/04
 A 6 1 P 1/16
 A 6 1 P 3/10
 A 6 1 P 7/00
 A 6 1 P 9/00
 A 6 1 P 9/10
 A 6 1 P 9/14
 A 6 1 P 11/00
 A 6 1 P 15/00
 A 6 1 P 17/00
 A 6 1 P 17/06
 A 6 1 P 19/02
 A 6 1 P 19/06
 A 6 1 P 21/00
 A 6 1 P 21/04
 A 6 1 P 25/00
 A 6 1 P 25/00 1 0 1
 A 6 1 P 25/14
 A 6 1 P 25/16
 A 6 1 P 25/28
 A 6 1 P 25/32
 A 6 1 P 29/00
 A 6 1 P 29/00 1 0 1
 A 6 1 P 29/02
 A 6 1 P 31/00
 A 6 1 P 31/04
 A 6 1 P 31/10
 A 6 1 P 31/12
 A 6 1 P 31/18
 A 6 1 P 33/00
 A 6 1 P 35/00
 A 6 1 P 35/02
 A 6 1 P 37/02
 A 6 1 P 37/04
 A 6 1 P 37/06
 A 6 1 P 37/04
 A 6 1 P 37/06
 A 6 1 P 43/00
 C 0 7 K 14/485
 C 1 2 Q 1/02
 C 1 2 Q 1/68
 G 0 1 N 33/15
 G 0 1 N 33/50
 G 0 1 N 33/53
 G 0 1 N 33/58
 G 0 1 N 33/68
 G 0 1 N 37/00 1 0 2
 C 1 2 N 5/00
 A 6 1 K 37/02

4 C 0 8 5
 4 C 0 8 6
 4 C 2 0 6

A
 Z
 Z
 M
 A
 B

(31)優先権主張番号 0212283.6

(32)優先日 平成14年5月28日(2002.5.28)

(33)優先権主張国 英国(GB)

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW, ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES, FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,N O,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ブレンド エマニュエル シリル パスカル
イギリス国 シービー4 0ピーイー ケンブリッジ ケンブリッジ サイエンス パーク 4 1
0 ロランティス リミテッド

(72)発明者 チャンピオン ブライアン ロバート
イギリス国 シービー4 0ピーイー ケンブリッジ ケンブリッジ サイエンス パーク 4 1
0 ロランティス リミテッド

(72)発明者 マッケンジー グラハム ジェイムス
イギリス国 シービー4 0ピーイー ケンブリッジ ケンブリッジ サイエンス パーク 4 1
0 ロランティス リミテッド

(72)発明者 トゥガル タマラ
イギリス国 シービー4 0ピーイー ケンブリッジ ケンブリッジ サイエンス パーク 4 1
0 ロランティス リミテッド

(72)発明者 ウォード ジョージ アルバート
イギリス国 シービー4 0ピーイー ケンブリッジ ケンブリッジ サイエンス パーク 4 1
0 ロランティス リミテッド

(72)発明者 ヤング レスリー リン
イギリス国 シービー4 0ピーイー ケンブリッジ ケンブリッジ サイエンス パーク 4 1
0 ロランティス リミテッド

F ターム(参考) 2G045 AA35 AA40 BB10 BB14 BB50 BB51 CB01 DA13 DA14 DA36
FA12 FA16 FB01 FB02 FB03 FB12 GC15 JA01
4B024 AA01 AA11 BA80 CA02 DA02 GA11 HA12 HA15
4B063 QA18 QQ91 QR32 QR48 QR55 QR77 QS24 QS28 QS33 QS34
QS36 QX01
4B065 AA90X AB01 AC20 BA01 BD21 CA44
4C084 AA01 AA02 DA01 NA14 ZA011 ZA012 ZA021 ZA022 ZA031 ZA032
ZA071 ZA072 ZA151 ZA152 ZA161 ZA162 ZA331 ZA332 ZA361 ZA362
ZA441 ZA442 ZA451 ZA452 ZA591 ZA592 ZA681 ZA682 ZA751 ZA752
ZA811 ZA812 ZA891 ZA892 ZA941 ZA942 ZB051 ZB052 ZB081 ZB082
ZB091 ZB092 ZB111 ZB112 ZB151 ZB152 ZB211 ZB212 ZB261 ZB262
ZB271 ZB272 ZB321 ZB322 ZB331 ZB332 ZB351 ZB352 ZB371 ZB372
ZC311 ZC312 ZC351 ZC352 ZC391 ZC392 ZC521 ZC522 ZC541 ZC542
ZC551 ZC552
4C085 AA14 AA33
4C086 AA01 AA02 HA00 MA01 MA04 NA14 ZA01 ZA02 ZA03 ZA07
ZA15 ZA16 ZA33 ZA36 ZA44 ZA45 ZA59 ZA67 ZA68 ZA75
ZA81 ZA89 ZA94 ZB05 ZB08 ZB09 ZB11 ZB15 ZB21 ZB26
ZB27 ZB32 ZB33 ZB35 ZB37 ZC31 ZC35 ZC39 ZC52 ZC54
ZC55
4C206 AA01 AA02 MA01 MA04 NA14 ZA01 ZA02 ZA03 ZA07 ZA15

ZA33	ZA36	ZA44	ZA45	ZA59	ZA67	ZA68	ZA75	ZA81	ZA89
ZA94	ZB05	ZB08	ZB09	ZB11	ZB15	ZB21	ZB26	ZB27	ZB32
ZB33	ZB35								

专利名称(译)	检测Notch信号调节剂的方法		
公开(公告)号	JP2004537314A	公开(公告)日	2004-12-16
申请号	JP2003517584	申请日	2002-07-25
[标]申请(专利权)人(译)	洛伦蒂斯有限公司		
申请(专利权)人(译)	俄罗斯LANTIS有限公司		
[标]发明人	ボドゥーマー マーク ウィリアム ブレンド エマニュエル シリル パスカル チャンピオン ブライアン ロバート マッケンジー グラハム ジェイムス トゥガル タマラ ウォード ジョージ アルバート ヤング レスリー リン		
发明人	ボドゥーマー マーク ウィリアム ブレンド エマニュエル シリル パスカル チャンピオン ブライアン ロバート マッケンジー グラハム ジェイムス トゥガル タマラ ウォード ジョージ アルバート ヤング レスリー リン		
IPC分类号	A61K31/00 A61K33/00 A61K38/00 A61K38/17 A61K39/395 A61K45/00 A61P1/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P3/00 A61P3/10 A61P5/00 A61P7/00 A61P9/00 A61P9/10 A61P9/14 A61P11/00 A61P13/00 A61P15/00 A61P17/00 A61P17/06 A61P19/00 A61P19/02 A61P19/06 A61P21/00 A61P21/04 A61P25 /00 A61P25/12 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/28 A61P25/32 A61P27/02 A61P29/00 A61P29/02 A61P31/00 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P31/18 A61P33/00 A61P35/00 A61P35/02 A61P37 /00 A61P37/02 A61P37/04 A61P37/06 A61P43/00 C07K14/485 C07K19/00 C12N5/06 C12N5/10 C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/58 G01N33/68 G01N37 /00		
CPC分类号	A61K38/17 A61K38/1709 A61P1/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P3/00 A61P11/00 A61P13/00 A61P15/00 A61P17/00 A61P17/06 A61P19/00 A61P19/02 A61P19/06 A61P21/00 A61P21/04 A61P25/00 A61P25 /12 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/28 A61P25/32 A61P27/02 A61P29/00 A61P29/02 A61P31/00 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P31/18 A61P33/00 A61P35/00 A61P35/02 C07K2319/30 G01N33/5047		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K31/00 A61K33/00 A61K39/395.N A61K39/395.V A61P1/04 A61P1/16 A61P3 /10 A61P7/00 A61P9/00 A61P9/10 A61P9/14 A61P11/00 A61P15/00 A61P17/00 A61P17/06 A61P19 /02 A61P19/06 A61P21/00 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/00.101 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/28 A61P25/32 A61P29/00 A61P29/00.101 A61P29/02 A61P31/00 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P31/18 A61P33/00 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/02 A61P37/04 A61P37/06 A61P43/00 C07K14 /485 C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.M G01N33/58.A G01N33/68 G01N37/00.102 C12N5/00.B A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA35 2G045/AA40 2G045/BB10 2G045/BB14 2G045/BB50 2G045/BB51 2G045/CB01 2G045 /DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FA12 2G045/FA16 2G045/FB01 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB12 2G045/GC15 2G045/JA01 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA02 4B024 /DA02 4B024/GA11 4B024/HA12 4B024/HA15 4B063/QA18 4B063/QQ91 4B063/QR32 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR77 4B063/QS24 4B063/QS28 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063 /QX01 4B065/AA90X 4B065/AB01 4B065/AC20 4B065/BA01 4B065/BD21 4B065/CA44 4C084/AA01 4C084/AA02 4C084/DA01 4C084/NA14 4C084/ZA011 4C084/ZA012 4C084/ZA021 4C084/ZA022		

4C084/ZA031 4C084/ZA032 4C084/ZA071 4C084/ZA072 4C084/ZA151 4C084/ZA152 4C084/ZA161
4C084/ZA162 4C084/ZA331 4C084/ZA332 4C084/ZA361 4C084/ZA362 4C084/ZA441 4C084/ZA442
4C084/ZA451 4C084/ZA452 4C084/ZA591 4C084/ZA592 4C084/ZA681 4C084/ZA682 4C084/ZA751
4C084/ZA752 4C084/ZA811 4C084/ZA812 4C084/ZA891 4C084/ZA892 4C084/ZA941 4C084/ZA942
4C084/ZB051 4C084/ZB052 4C084/ZB081 4C084/ZB082 4C084/ZB091 4C084/ZB092 4C084/ZB111
4C084/ZB112 4C084/ZB151 4C084/ZB152 4C084/ZB211 4C084/ZB212 4C084/ZB261 4C084/ZB262
4C084/ZB271 4C084/ZB272 4C084/ZB321 4C084/ZB322 4C084/ZB331 4C084/ZB332 4C084/ZB351
4C084/ZB352 4C084/ZB371 4C084/ZB372 4C084/ZC311 4C084/ZC312 4C084/ZC351 4C084/ZC352
4C084/ZC391 4C084/ZC392 4C084/ZC521 4C084/ZC522 4C084/ZC541 4C084/ZC542 4C084/ZC551
4C084/ZC552 4C085/AA14 4C085/AA33 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/HA00 4C086/MA01 4C086
/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA01 4C086/ZA02 4C086/ZA03 4C086/ZA07 4C086/ZA15 4C086/ZA16
4C086/ZA33 4C086/ZA36 4C086/ZA44 4C086/ZA45 4C086/ZA59 4C086/ZA67 4C086/ZA68 4C086
/ZA75 4C086/ZA81 4C086/ZA89 4C086/ZA94 4C086/ZB05 4C086/ZB08 4C086/ZB09 4C086/ZB11
4C086/ZB15 4C086/ZB21 4C086/ZB26 4C086/ZB27 4C086/ZB32 4C086/ZB33 4C086/ZB35 4C086
/ZB37 4C086/ZC31 4C086/ZC35 4C086/ZC39 4C086/ZC52 4C086/ZC54 4C086/ZC55 4C206/AA01
4C206/AA02 4C206/MA01 4C206/MA04 4C206/NA14 4C206/ZA01 4C206/ZA02 4C206/ZA03 4C206
/ZA07 4C206/ZA15 4C206/ZA33 4C206/ZA36 4C206/ZA44 4C206/ZA45 4C206/ZA59 4C206/ZA67
4C206/ZA68 4C206/ZA75 4C206/ZA81 4C206/ZA89 4C206/ZA94 4C206/ZB05 4C206/ZB08 4C206
/ZB09 4C206/ZB11 4C206/ZB15 4C206/ZB21 4C206/ZB26 4C206/ZB27 4C206/ZB32 4C206/ZB33
4C206/ZB35

優先権
2001018153 2001-07-25 GB
2002007930 2002-04-05 GB
2002012282 2002-05-28 GB
2002012283 2002-05-28 GB

外部リンク [Espacenet](#)

摘要(译)

描述了一种用于检测Notch信号的调制器的方法。该方法包括在候选调节剂存在下监测免疫系统细胞中Notch信号传导的步骤。

特表2004-53/314 (P2004-537314A)				
(43) 公表日 平成16年12月16日 (2004. 12. 16)				
51) Int. Cl. ⁷		F I		テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09		C 1 2 N 15/00	Z N A A	2 G 0 4 5
A 6 1 K 31/00		A 6 1 K 31/00		4 B 0 2 4
A 6 1 K 33/00		A 6 1 K 33/00		4 B 0 6 3
A 6 1 K 38/00		A 6 1 K 39/395	N	4 B 0 6 5
A 6 1 K 39/395		A 6 1 K 39/395	V	4 C 0 8 4
		審査請求	未請求	予備審査請求 有 (全 310 頁) 最終頁に続く
21) 出願番号	特願2003-517584 (P2003-517584)	(71) 出願人	504031180	
36) (22) 出願日	平成14年7月25日 (2002. 7. 25)		ロランティス リミテッド	
35) 翻訳文提出日	平成16年1月26日 (2004. 1. 26)		イギリス国 シービー4 オービーイー ケ	
36) 国際出願番号	PCT/GB2002/003397		ンブリッジ ケンブリッジ サイエンス	
37) 国際公開番号	W02003/012441		パーク 4 I O	
37) 国際公開日	平成15年2月13日 (2003. 2. 13)	(74) 代理人	100107984	
31) 優先権主張番号	0118153.6		弁理士 廣田 聖紀	
32) 優先日	平成13年7月25日 (2001. 7. 25)	(72) 発明者	ボドゥマー マーク ウィリアム	
33) 優先権主張国	英国 (GB)		イギリス国 シービー4 オービーイー ケ	
31) 優先権主張番号	0207930.9		ンブリッジ ケンブリッジ サイエンス	
32) 優先日	平成14年4月5日 (2002. 4. 5)		パーク 4 I O ロランティス リミテッ	
33) 優先権主張国	英国 (GB)		ド	
31) 優先権主張番号	0212282.8			
32) 優先日	平成14年5月28日 (2002. 5. 28)			
33) 優先権主張国	英国 (GB)			
最終頁に続く				