

(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2004-527211

(P2004-527211A)

(43) 公表日 平成16年9月9日(2004.9.9)

(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 O 1 K 67/027	A O 1 K 67/027	4 B O 2 4
A 6 1 K 35/12	A 6 1 K 35/12	4 B O 6 3
A 6 1 K 39/00	A 6 1 K 39/00	H 4 B O 6 5
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395	E 4 C O 8 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 242 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-517738 (P2002-517738)	(71) 出願人	503046404
(86) (22) 出願日	平成13年8月2日 (2001.8.2)		リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ
(85) 翻訳文提出日	平成15年2月3日 (2003.2.3)		オブ ミシガン
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/024243		アメリカ合衆国 4 8 1 0 9 - 1 2 8 0
(87) 国際公開番号	W02002/012447		ミシガン、アン アーバー、サウス ステ
(87) 国際公開日	平成14年2月14日 (2002.2.14)		イト ストリート 3 0 0 3、ウルブリン
(31) 優先権主張番号	60/222, 794		タワー、ルーム 2 0 7 1
(32) 優先日	平成12年8月3日 (2000.8.3)	(74) 代理人	100067817
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 倉内 基弘
(31) 優先権主張番号	60/240, 317	(74) 代理人	100085774
(32) 優先日	平成12年10月13日 (2000.10.13)		弁理士 風間 弘志
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	マイケル エフ. クラーク
(31) 優先権主張番号	09/920, 517		アメリカ合衆国 4 8 1 0 3 ミシガン、
(32) 優先日	平成13年8月1日 (2001.8.1)		アン アーバー、クレイグ ロード 3 3
(33) 優先権主張国	米国 (US)		7 7
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 充実腫瘍幹細胞の単離及び用途

(57) 【要約】

確立された充実腫瘍内の少ない百分率の細胞は、幹細胞の特性を有する。これらの充実腫瘍幹細胞は、より多くの腫瘍幹細胞と、大規模な増殖の余地、及び新たな腫瘍を生じる能力を失った、腫瘍内の大多数の細胞との双方を生じる。したがって、充実腫瘍の不均一性は、充実腫瘍幹細胞から生じた腫瘍細胞の子孫の存在を反映する。本発明者らは、異種移植片モデルを開発して、重篤な免疫不全マウスの乳腺への腫瘍の注入を通じて、原発性腫瘍からの腫瘍を確立することができた。これらの異種移植片アッセイは、クローン形成性充実腫瘍幹細胞を特性記述するための、生物学的及び分子のアッセイを実施するのを許した。本発明者らは、N o t c h 経路、特にN o t c h 4 が、発癌における中心的経路を演じると強力に意味する証拠も開発した。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- (a) 充実腫瘍に由来し；
- (b) 細胞表面マーカーである C D 4 4 を発現し；
- (c) 該充実腫瘍に由来する非腫瘍形成性癌細胞による C D 2 4 の平均的発現より低レベルのマーカー C D 2 4 を発現し；
- (d) 腫瘍形成性である、

単離された充実腫瘍幹細胞。

【請求項 2】

さらに

- (e) 細胞表面マーカーである B 3 8 . 1 を発現する

請求項 1 記載の単離された充実腫瘍幹細胞。

【請求項 3】

C D 2、C D 3、C D 1 4、C D 1 6 及び C D 6 4 からなる群から選ばれる、一つ又はそれ以上の検出できるレベルの L I N E A G E マーカーを発現しない、請求項 1 記載の単離された充実腫瘍幹細胞。

【請求項 4】

C D 2、C D 3、C D 1 4、C D 1 6 及び C D 6 4 を含む、検出できるレベルの L I N E A G E マーカーを発現しない、請求項 3 記載の単離された充実腫瘍幹細胞。

【請求項 5】

さらに

- (e) 細胞表面マーカーの上皮特異性抗原 (E S A) を発現する

請求項 1 記載の単離された充実腫瘍幹細胞。

【請求項 6】

L I N E A G E マーカーが、C D 1 0、C D 3 1 及び C D 1 4 0 b をさらに含む、請求項 4 記載の単離された充実腫瘍幹細胞。

【請求項 7】

肉腫細胞又は上皮癌である、請求項 1 記載の単離された充実腫瘍幹細胞。

【請求項 8】

上皮癌が、乳癌又は卵巣癌である、請求項 1 記載の単離された充実腫瘍幹細胞。

【請求項 9】

ポリヌクレオチドベクターを有する、請求項 1 記載の単離された充実腫瘍幹細胞。

【請求項 10】

ポリヌクレオチドベクターが、ウイルスベクター又はプラスミドである、請求項 9 記載の単離された充実腫瘍幹細胞。

【請求項 11】

ポリヌクレオチドベクターが、リポーターポリヌクレオチドである、請求項 9 記載の単離された充実腫瘍幹細胞。

【請求項 12】

リポーターポリヌクレオチドが、充実腫瘍幹細胞内で活性を有するときに、検出できるシグナルを与える、請求項 11 記載の単離された充実腫瘍幹細胞。

【請求項 13】

組換えポリヌクレオチドをさらに含む、請求項 1 記載の単離された充実腫瘍幹細胞。

【請求項 14】

組換えポリヌクレオチドが、該充実腫瘍幹細胞の染色体に組み込まれている、請求項 13 記載の単離された充実腫瘍幹細胞。

【請求項 15】

宿主哺乳動物に導入される、請求項 1 記載の単離された充実腫瘍幹細胞。

【請求項 16】

宿主の動物に移植されると新たな腫瘍を形成する、請求項 15 記載の単離された充実腫瘍

10

20

30

40

50

幹細胞。

【請求項 17】

宿主の動物が免疫障害性マウスである、請求項 15 記載の単離された充実腫瘍幹細胞。

【請求項 18】

培地を含み、その中に該充実腫瘍幹細胞が存在する、請求項 1 記載の単離された充実腫瘍幹細胞。

【請求項 19】

培地が N o t c h リガンドを含む、請求項 18 記載の単離された充実腫瘍幹細胞。

【請求項 20】

基質に付着させた、請求項 1 記載の単離された充実腫瘍幹細胞。

10

【請求項 21】

増殖を低下させるよう処理された、請求項 1 記載の単離された充実腫瘍幹細胞。

【請求項 22】

増殖を増大させるよう処理された、請求項 1 記載の単離された充実腫瘍幹細胞。

【請求項 23】

- (a) 充実腫瘍に由来し；
 - (b) 細胞表面マーカーである C D 4 4 を発現し；
 - (c) 該充実腫瘍に由来する非腫瘍形成性癌細胞による C D 2 4 の平均的発現より低レベルのマーカー C D 2 4 を発現し；
 - (d) 腫瘍形成性であり；
 - (e) その集団が、未分画腫瘍細胞に比して少なくとも 2 倍富化されている
- 充実腫瘍幹細胞の富化された集団。

20

【請求項 24】

充実腫瘍が肉腫又は上皮癌である、請求項 23 記載の富化された集団。

【請求項 25】

充実腫瘍幹細胞が、細胞表面マーカーである B 3 8 . 1 を発現する、請求項 23 記載の富化された集団。

【請求項 26】

充実腫瘍幹細胞が、C D 2、C D 3、C D 1 4、C D 1 6、C D 4 5 及び C D 6 4 からなる群から選ばれる、少なくとも一つの系譜マーカーを発現できない、請求項 23 記載の富化集団。

30

【請求項 27】

富化が、未分画腫瘍細胞に比しての新たな腫瘍を形成できる能力においてなされている、請求項 23 記載の富化集団。

【請求項 28】

集団が、少なくとも 5 倍富化された、請求項 23 記載の富化集団。

【請求項 29】

集団が、少なくとも 10 倍富化された、請求項 23 記載の富化集団。

【請求項 30】

集団が、少なくとも 50 倍富化された、請求項 23 記載の富化集団。

40

【請求項 31】

非腫瘍形成性充実腫瘍細胞が富化された細胞集団であって、

- (a) 充実腫瘍に由来し；
- (b) 未分画充実腫瘍細胞に比しての腫瘍を形成できる能力が奪われており；
- (c) 未分画充実腫瘍細胞に比して、細胞表面マーカーである C D 4 4 を発現する細胞が奪われている；

集団。

【請求項 32】

細胞の集団を充実腫瘍幹細胞について富化する方法であって、

- (a) 充実腫瘍を解離させて、細胞懸濁液を形成する工程と；

50

(b) 解離した細胞を、充実腫瘍幹細胞の陽性マーカー又は陰性マーカーのいずれかに選択的に結合する、少なくとも1種類の試薬に接触させる工程と；

(c) 陽性マーカーに選択的に結合する試薬に結合するか、かつ／又は陰性マーカーに選択的に結合する試薬に結合しない細胞を選別し、該選別された細胞が、充実腫瘍細胞の未分画集団と比較して、腫瘍幹細胞が富化されている工程とを含む方法。

【請求項33】

充実腫瘍が肉腫又は上皮癌である、請求項32記載の方法。

【請求項34】

試薬が抗体又はレクチンである、請求項32記載の方法。

10

【請求項35】

試薬を、蛍光色素又は磁性粒子と結合させる、請求項32記載の方法。

【請求項36】

充実腫瘍細胞の陽性マーカーが、CD44、B38.1及びESAからなる群から選ばれるマーカーである、請求項32記載の方法。

【請求項37】

充実腫瘍細胞の陰性マーカーが、CD2、CD3、CD14、CD16及びCD64からなる群から選ばれるマーカーである、請求項32記載の方法。

【請求項38】

細胞選別を、フローサイトメトリー、蛍光活性化細胞選別法、パンニング法、アフィニティカラム分離法及び／又は磁気選別法によって実施する、請求項32記載の方法。

20

【請求項39】

接触及び選別の工程が、

(a) 充実腫瘍細胞を含む細胞集団を、試薬の組合せに接触させ、組合せ中の試薬が、それぞれ、充実腫瘍細胞の陽性マーカー又は陰性マーカーのいずれかに選択的に結合する工程と、

(b) 陽性マーカーに選択的に結合する試薬に結合するか、もしくは陰性マーカーに選択的に結合する試薬に結合しない細胞を選別する工程、又はその組合せであって、選別された細胞が、未分画細胞の集団と比較した限りで、腫瘍幹細胞が富化されている工程とを含む、請求項32記載の方法。

30

【請求項40】

(e) 増殖した充実腫瘍幹細胞を単離する工程

をさらに含む、請求項32記載の方法。

【請求項41】

(d) 少なくとも一つの選別された細胞を、腫瘍幹細胞の増殖を支援する培地に導入する工程と；

(e) 該培地中の選ばれた細胞を増殖させる工程と

をさらに含む、請求項32記載の方法。

【請求項42】

(f) 増殖した細胞を宿主哺乳動物に導入する工程

をさらに含む、請求項41記載の方法。

40

【請求項43】

(f) 増殖した細胞を試験化合物に接触させる工程と；

(g) 増殖した細胞に対する試験化合物の効果を決定する工程と

をさらに含む、請求項41記載の方法。

【請求項44】

(f) (i) 充実腫瘍に由来し；

(i i) 未分画充実腫瘍細胞に比しての腫瘍を形成できる能力が奪われており；

(i i i) 未分画充実腫瘍細胞に比して、細胞表面マーカーであるCD44を発現する細胞が奪われている；

50

非腫瘍形成性腫瘍細胞の集団を、培地中の充実腫瘍幹細胞と混合する工程をさらに含む、請求項 4 1 記載の方法。

【請求項 4 5】

(g) 該混合物を宿主動物に移植する工程をさらに含む、請求項 4 4 記載の方法。

【請求項 4 6】

(g) 該混合物を、充実腫瘍幹細胞の生存又は増殖できる能力の低下もしくは増大について分析する工程をさらに含む、請求項 4 4 記載の方法。

【請求項 4 7】

充実腫瘍幹細胞に対する免疫応答を刺激する方法であって、

(a) (i) 充実腫瘍に由来し、

(i i) 細胞表面マーカーである C D 4 4 を発現し、

(i i i) 該充実腫瘍に由来する非腫瘍形成性癌細胞による C D 2 4 の平均的発現より低レベルのマーカー C D 2 4 を発現し、

(i v) 腫瘍形成性であり、

(v) その集団が、未分画腫瘍細胞に比して少なくとも 2 倍富化されている、

充実腫瘍幹細胞の富化された集団を得る工程と；

(b) 該集団を、細胞複製を阻害するよう処理する工程と；

(c) 該処理された細胞を、ヒト又は動物の被験体に、充実腫瘍幹細胞に対する免疫応答を誘導するのに十分な量で投与する工程とを含む方法。

【請求項 4 8】

充実腫瘍幹細胞の富化された集団が、単離された充実腫瘍幹細胞である、請求項 4 7 記載の方法。

【請求項 4 9】

該処理が充実腫瘍幹細胞を死滅させる、請求項 4 7 記載の方法。

【請求項 5 0】

該投与を、注射又は経口投与によって実施する、請求項 4 7 記載の方法。

【請求項 5 1】

充実腫瘍幹細胞が、細胞表面マーカーである B 3 8 . 1 を発現する、請求項 4 7 記載の方法。

【請求項 5 2】

充実腫瘍幹細胞が、C D 2、C D 3、C D 1 4、C D 1 6、C D 4 5 及び C D 6 4 からなる群から選ばれる、少なくとも一つの系譜マーカーを発現できない、請求項 4 7 記載の方法。

【請求項 5 3】

(d) 抗体、又は抗体分泌性ハイブリドーマを、該ヒト又は動物の被験体から得る工程をさらに含む請求項 4 7 記載の方法。

【請求項 5 4】

(e) 得られた抗体を、充実腫瘍幹細胞に特異的に結合できる能力について試験する工程をさらに含む、請求項 5 3 記載の方法。

【請求項 5 5】

得られた抗体を、充実腫瘍幹細胞上に存在するポリペプチドに結合できる能力について試験する工程

をさらに含む、請求項 5 3 記載の方法。

【請求項 5 6】

(e) 充実腫瘍幹細胞上に存在するポリペプチドを免疫学的に特定する工程をさらに含む、請求項 5 3 記載の方法。

【請求項 5 7】

10

20

30

40

50

(e) 充実腫瘍幹細胞上に存在するポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドを免疫学的に特定する工程

をさらに含む、請求項 53 記載の方法。

【請求項 58】

(e) 得られた抗体を、腫瘍の成長を低下させ得る能力について試験する工程

をさらに含む、請求項 53 記載の方法。

【請求項 59】

充実腫瘍幹細胞に対する免疫応答を刺激する方法であって、

(a) (i) 充実腫瘍に由来し、

(i i) 細胞表面マーカーである CD 44 を発現し、

(i i i) 該充実腫瘍に由来する非腫瘍形成性癌細胞による CD 24 の平均的発現より低レベルのマーカー CD 24 を発現し、

(i v) 腫瘍形成性であり、

(v) その集団が、未分画腫瘍細胞に比して少なくとも 2 倍富化されている、

充実腫瘍幹細胞の富化された集団を得る工程と；

(b) 該腫瘍幹細胞を、免疫エフェクター細胞と *in vitro* 培養体内で混合する工程と；

(c) 免疫エフェクター細胞を培養体から取り出す工程と；

(d) 免疫エフェクター細胞を、宿主動物に、該動物における免疫応答を刺激するのに有効である用量で移植する工程と

を含む方法。

【請求項 60】

充実腫瘍が、細胞表面マーカーである B 38.1 を発現する、請求項 59 記載の方法。

【請求項 61】

充実腫瘍が、CD 2、CD 3、CD 14、CD 16、CD 45 及び CD 64 からなる群から選ばれる、少なくとも一つの系譜マーカーを発現できない、請求項 59 記載の方法。

【請求項 62】

充実腫瘍幹細胞の富化された集団から精製された、ポリヌクレオチドの精製された集団であって、

(a) 腫瘍細胞が、充実腫瘍に由来し、

(b) 充実腫瘍幹細胞が、細胞表面マーカーである CD 44 を発現し、

(c) 充実腫瘍幹細胞が、該充実腫瘍に由来する非腫瘍形成性癌細胞による CD 24 の平均的発現より低レベルのマーカー CD 24 を発現し、

(d) 充実腫瘍幹細胞が、腫瘍形成性であり、

(e) 充実腫瘍幹細胞の集団が、未分画腫瘍細胞に比して少なくとも 2 倍富化されているポリヌクレオチドの集団。

【請求項 63】

充実腫瘍が肉腫又は上皮癌である、請求項 63 記載のポリヌクレオチド集団。

【請求項 64】

充実腫瘍幹細胞の富化された集団が、単離された充実腫瘍幹細胞である、請求項 63 記載のポリヌクレオチド集団。

【請求項 65】

充実腫瘍幹細胞が、細胞表面マーカーである B 38.1 を発現する、請求項 63 記載のポリヌクレオチド集団。

【請求項 66】

充実腫瘍が、CD 2、CD 3、CD 14、CD 16、CD 45 及び CD 64 からなる群から選ばれる、少なくとも一つの系譜マーカーを発現できない、請求項 63 記載のポリヌクレオチド集団。

【請求項 67】

ポリヌクレオチドを固体表面に付着させた、請求項 63 記載のポリヌクレオチド集団。

10

20

30

40

50

【請求項 68】

ポリヌクレオチドを固体表面に、規則的なアレーとして付着させた、請求項 67 記載のポリヌクレオチド集団。

【請求項 69】

規則的なアレーがマイクロアレーである、請求項 68 記載のポリヌクレオチド集団。

【請求項 70】

ポリヌクレオチドが cDNA ライブラリー内に存在する、請求項 63 記載のポリヌクレオチド集団。

【請求項 71】

ポリヌクレオチドが増幅されている、請求項 63 記載のポリヌクレオチド集団。

10

【請求項 72】

ポリヌクレオチドが標識化されている、請求項 63 記載のポリヌクレオチド集団。

【請求項 73】

ポリヌクレオチドがハイブリダイゼーションプローブとして用いられる、請求項 63 記載のポリヌクレオチド集団。

【請求項 74】

ポリヌクレオチド配列のマイクロアレーをさらに含む、請求項 73 記載のポリヌクレオチド集団。

【請求項 75】

充実腫瘍幹細胞の富化された集団から精製された、ポリペプチドの精製された集団であって、

20

(a) 腫瘍細胞が、充実腫瘍に由来し、

(b) 充実腫瘍幹細胞が、細胞表面マーカーである CD44 を発現し、

(c) 充実腫瘍幹細胞が、該充実腫瘍に由来する非腫瘍形成性癌細胞による CD24 の平均的発現より低レベルのマーカー CD24 を発現し、

(d) 充実腫瘍幹細胞が、腫瘍形成性であり、

(e) 充実腫瘍幹細胞の集団が、未分画腫瘍細胞に比して少なくとも 2 倍富化されているポリペプチドの集団。

【請求項 76】

充実腫瘍が肉腫又は上皮癌である、請求項 75 記載のポリペプチド集団。

30

【請求項 77】

充実腫瘍幹細胞が、細胞表面マーカーである B38.1 を発現する、請求項 75 記載のポリペプチド集団。

【請求項 78】

充実腫瘍が、CD2、CD3、CD14、CD16、CD45 及び CD64 からなる群から選ばれる、少なくとも一つの系譜マーカーを発現できない、請求項 75 記載のポリペプチド集団。

【請求項 79】

充実腫瘍幹細胞の富化された集団が、単離された充実腫瘍幹細胞である、請求項 75 記載のポリペプチド集団。

40

【請求項 80】

ポリペプチドを固体表面に付着させた、請求項 75 記載のポリペプチド集団。

【請求項 81】

ポリペプチドを固体表面に、規則的なアレーとして付着させた、請求項 75 記載のポリペプチド集団。

【請求項 82】

規則的なアレーがマイクロアレーである、請求項 81 記載のポリペプチド集団。

【請求項 83】

ポリペプチドが標識化されている、請求項 75 記載のポリペプチド集団。

【請求項 84】

50

ポリペプチドがプローブとして用いられる、請求項 7 5 記載のポリペプチド集団。

【請求項 8 5】

細胞、ポリヌクレオチド、ポリペプチド及び試験化合物からなる群から選ばれる構成要素のマイクロアレーをさらに含む、請求項 8 4 記載のポリペプチド集団。

【請求項 8 6】

充実腫瘍幹細胞が富化された細胞の集団を、遺伝子発現パターンについて分析する方法であって、

(a) (i) 充実腫瘍に由来し、

(i i) 細胞表面マーカーである C D 4 4 を発現し、

(i i i) 該充実腫瘍に由来する非腫瘍形成性癌細胞による C D 2 4 の平均的発現より低いレベルのマーカー C D 2 4 を発現し、 10

(i v) 腫瘍形成性であり、

(v) その集団が、未分画腫瘍細胞に比して少なくとも 2 倍富化されている、

充実腫瘍幹細胞が富化された細胞集団を得る工程と；

(b) 該細胞集団を遺伝子発現パターンについて分析する工程とを含む方法。

【請求項 8 7】

分析を、再配列決定、高処理量スクリーニング、マイクロアレーの使用、データ採集及び貯蔵のための分析ソフトウェアの使用、データ出力の柔軟なフォーマットのための分析ソフトウェアの使用、グループ化を与える個別的スポット強度の統計的分析及びクラスター分析のための分析ソフトウェアの使用、ならびに外部データベースとの連関のための分析ソフトウェアの使用からなる群から選ばれる方法によって実施する、請求項 8 6 記載の方法。 20

【請求項 8 8】

充実腫瘍が肉腫又は上皮癌である、請求項 8 6 記載の方法。

【請求項 8 9】

充実腫瘍幹細胞が、細胞表面マーカーである B 3 8 . 1 を発現する、請求項 8 6 記載の方法。

【請求項 9 0】

充実腫瘍幹細胞が、C D 2、C D 3、C D 1 4、C D 1 6、C D 4 5 及び C D 6 4 からなる群から選ばれる、少なくとも一つの系譜マーカーを発現できない、請求項 8 6 記載の方法。 30

【請求項 9 1】

充実腫瘍幹細胞の富化された集団が、単離された充実腫瘍幹細胞である、請求項 8 6 記載の方法。

【請求項 9 2】

充実腫瘍幹細胞が富化された細胞集団を、タンパク質発現パターンについて分析する方法であって、

(a) (i) 充実腫瘍に由来し、

(i i) 細胞表面マーカーである C D 4 4 を発現し、 40

(i i i) 該充実腫瘍に由来する非腫瘍形成性癌細胞による C D 2 4 の平均的発現より低いレベルのマーカー C D 2 4 を発現し、

(i v) 腫瘍形成性であり、

(v) その集団が、未分画腫瘍細胞に比して少なくとも 2 倍富化されている、

充実腫瘍幹細胞が富化された細胞集団を得る工程と；

(b) 該細胞集団をタンパク質発現パターンについて分析する工程とを含む方法。

【請求項 9 3】

分析を、質量分析法、高処理量スクリーニング、マイクロアレーの使用、データ採集及び貯蔵のための分析ソフトウェアの使用、データ出力の柔軟なフォーマットのための 50

分析ソフトウェアの使用、グループ化を与える個別的スポット強度の統計的分析及びクラスター分析のための分析ソフトウェアの使用、ならびに外部データベースとの連関のための分析ソフトウェアの使用からなる群から選ばれる方法によって実施する、請求項 9 2 記載の方法。

【請求項 9 4】

充実腫瘍が肉腫又は上皮癌である、請求項 9 2 記載の方法。

【請求項 9 5】

充実腫瘍幹細胞が、細胞表面マーカーである B 3 8 . 1 を発現する、請求項 9 2 記載の方法。

【請求項 9 6】

充実腫瘍幹細胞が、C D 2、C D 3、C D 1 4、C D 1 6、C D 4 5 及び C D 6 4 からなる群から選ばれる、少なくとも一つの系譜マーカーを発現できない、請求項 9 2 記載の方法。

【請求項 9 7】

充実腫瘍幹細胞の富化された集団が、単離された充実腫瘍幹細胞である、請求項 9 2 記載の方法。

【請求項 9 8】

充実腫瘍幹細胞に対する試験化合物の効果を決定する方法であって、

(a) (i) 充実腫瘍に由来し、

(i i) 細胞表面マーカーである C D 4 4 を発現し、

(i i i) 該充実腫瘍に由来する非腫瘍形成性癌細胞による C D 2 4 の平均的発現より低レベルのマーカー C D 2 4 を発現し、

(i v) 腫瘍形成性であり、

(v) その集団が、未分画腫瘍細胞に比して少なくとも 2 倍富化されている、

充実腫瘍幹細胞の富化された集団を得る工程と；

(b) 得られた細胞を試験化合物と接触させる工程と；

(c) 接触された細胞の試験化合物に対する応答を決定する工程とを含む方法。

【請求項 9 9】

充実腫瘍が肉腫又は上皮癌である、請求項 9 8 記載の方法。

【請求項 1 0 0】

充実腫瘍幹細胞が、細胞表面マーカーである B 3 8 . 1 を発現する、請求項 9 8 記載の方法。

【請求項 1 0 1】

充実腫瘍幹細胞が、C D 2、C D 3、C D 1 4、C D 1 6、C D 4 5 及び C D 6 4 からなる群から選ばれる、少なくとも一つの系譜マーカーを発現できない、請求項 9 8 記載の方法。

【請求項 1 0 2】

充実腫瘍幹細胞の富化された集団が、単離された充実腫瘍幹細胞である、請求項 9 8 記載の方法。

【請求項 1 0 3】

充実腫瘍幹細胞を、「培養体中の単層に」、「培養体中の懸濁液中に」、及び「固体表面に付着させて」からなる群から選ばれる方式で局在させる、請求項 9 8 記載の方法。

【請求項 1 0 4】

接触を、試験しようとする試験化合物の二つ以上の濃度で実施する、請求項 9 8 記載の方法。

【請求項 1 0 5】

接触を、微細流動法を用いて実施する、請求項 9 8 記載の方法。

【請求項 1 0 6】

接触させた細胞の試験化合物に対する応答の決定が、腫瘍形成、腫瘍成長、腫瘍幹細胞の

10

20

30

40

50

増殖、腫瘍細胞の生存、腫瘍細胞の周期状態、及び腫瘍幹細胞の生存からなる群から選ばれる効果についてのアッセーを含む、請求項 98 記載の方法。

【請求項 107】

試験化合物を固体表面に付着させる、請求項 98 記載の方法。

【請求項 108】

試験化合物を固体表面にマイクロアレーとして付着させる、請求項 107 記載の方法。

【請求項 109】

試験化合物がその他の分子のセット内に存在する、請求項 98 記載の方法。

【請求項 110】

試験化合物がその他の分子のアレー内に存在する、請求項 98 記載の方法。

10

【請求項 111】

(d) 試験化合物が作用し合う、接触させた細胞内の標的を特定する工程をさらに含む、請求項 98 記載の方法。

【請求項 112】

充実腫瘍幹細胞に対する試験化合物の効果を決定する方法であって、

(a) (i) 充実腫瘍に由来し、

(i i) 細胞表面マーカーである CD 44 を発現し、

(i i i) 該充実腫瘍に由来する非腫瘍形成性癌細胞による CD 24 の平均的発現より低レベルのマーカー CD 24 を発現し、

(i v) 腫瘍形成性であり、

20

(v) その集団が、未分画腫瘍細胞に比して少なくとも 2 倍富化されている

充実腫瘍幹細胞の富化された集団を得る工程と；

(b) 得られた細胞を、免疫障害性マウスに移植する工程と；

(c) 試験化合物を該免疫障害性マウスに投与する工程と；

(d) 試験化合物に対する移植された充実腫瘍幹細胞の応答を決定する工程とを含む方法。

【請求項 113】

充実腫瘍が肉腫又は上皮癌である、請求項 112 記載の方法。

【請求項 114】

充実腫瘍が、細胞表面マーカーである B 38.1 を発現する、請求項 112 記載の方法。

30

【請求項 115】

充実腫瘍が、CD 2、CD 3、CD 14、CD 16、CD 45 及び CD 64 からなる群から選ばれる、少なくとも一つの系譜マーカーを発現できない、請求項 112 記載の方法。

【請求項 116】

充実腫瘍幹細胞の富化された集団が、単離された充実腫瘍幹細胞である、請求項 112 記載の方法。

【請求項 117】

充実腫瘍幹細胞に特異的に結合する試験化合物をふるい分ける方法であって、

(a) (i) 腫瘍細胞が、充実腫瘍に由来し、

(i i) 充実腫瘍幹細胞が、細胞表面マーカーである CD 44 を発現し、

40

(i i i) 充実腫瘍幹細胞が、該充実腫瘍に由来する非腫瘍形成性癌細胞による CD 24 の平均的発現より低レベルのマーカー CD 24 を発現し、

(i v) 充実腫瘍幹細胞が、腫瘍形成性であり、

(v) 充実腫瘍幹細胞の集団が、未分画腫瘍細胞に比して少なくとも 2 倍富化されている

充実腫瘍幹細胞の富化された集団を得る工程と；

(b) 充実腫瘍幹細胞の富化された集団を、複合体形成に適した条件下で、試験化合物に接触させる工程と；

(c) 試験化合物と充実腫瘍幹細胞との複合体形成を検出し、ここで、複合体の存在が、腫瘍幹細胞を、腫瘍幹細胞に特異的に結合するとして特定する工程と

50

を含む方法。

【請求項 1 1 8】

充実腫瘍が肉腫又は上皮癌である、請求項 1 1 7 記載の方法。

【請求項 1 1 9】

充実腫瘍幹細胞の富化された集団が、単離された充実腫瘍幹細胞である、請求項 1 1 7 記載の方法。

【請求項 1 2 0】

充実腫瘍幹細胞が、細胞表面マーカーである B 3 8 . 1 を発現する、請求項 1 1 7 記載の方法。

【請求項 1 2 1】

充実腫瘍幹細胞が、C D 2、C D 3、C D 1 4、C D 1 6、C D 4 5 及び C D 6 4 からなる群から選ばれる、少なくとも一つの系譜マーカーを発現できない、請求項 1 1 7 記載の方法。

【請求項 1 2 2】

充実腫瘍幹細胞の存在を診断する方法であって、

(a) 充実腫瘍からの細胞を、充実腫瘍幹細胞に対する陽性マーカーに結合する試薬に接触させる工程と；

(b) 試薬と充実腫瘍からの細胞との接触を検出し、ここで、接触した細胞の数の検出の、良性腫瘍内の接触した細胞の数と比較しての増加が、腫瘍を、充実腫瘍幹細胞を含むとして特定する工程と

を含む方法。

【請求項 1 2 3】

検出を、フローサイトメトリー又は免疫組織化学によって実施する、請求項 1 2 2 記載の方法。

【請求項 1 2 4】

充実腫瘍が肉腫又は上皮癌である、請求項 1 2 2 記載の方法。

【請求項 1 2 5】

陽性マーカーが、C D 4 4、B 3 8 . 1 及び E S A からなる群から選ばれるマーカーである、請求項 1 2 2 記載の方法。

【請求項 1 2 6】

腫瘍幹細胞を *in vitro* で増殖させる方法であって、

(a) (i) 充実腫瘍に由来し、

(i i) 細胞表面マーカーである C D 4 4 を発現し、

(i i i) 該充実腫瘍に由来する非腫瘍形成性癌細胞による C D 2 4 の平均的発現より低レベルのマーカー C D 2 4 を発現し、

(i v) 腫瘍形成性であり、

(v) その集団が、未分画腫瘍細胞に比して少なくとも 2 倍富化されている、充実腫瘍幹細胞の富化された集団を得る工程と；

(b) 得られた細胞を培地中で増殖させる工程と

を含む方法。

【請求項 1 2 7】

充実腫瘍が肉腫又は上皮癌である、請求項 1 2 6 記載の方法。

【請求項 1 2 8】

充実腫瘍幹細胞が、細胞表面マーカーである B 3 8 . 1 を発現する、請求項 1 2 6 記載の方法。

【請求項 1 2 9】

充実腫瘍幹細胞が、C D 2、C D 3、C D 1 4、C D 1 6、C D 4 5 及び C D 6 4 からなる群から選ばれる、マーカーを発現できない、請求項 1 2 6 記載の方法。

【請求項 1 3 0】

充実腫瘍幹細胞の富化された集団が、単離された充実腫瘍幹細胞である、請求項 1 2 6 記

10

20

30

40

50

載の方法。

【請求項 1 3 1】

腫瘍幹細胞を *in vivo* で増殖させる方法であって、

- (a) (i) 充実腫瘍に由来し、
 - (i i) 細胞表面マーカーである C D 4 4 を発現し、
 - (i i i) 該充実腫瘍に由来する非腫瘍形成性癌細胞による C D 2 4 の平均的発現より低レベルのマーカー C D 2 4 を発現し、
 - (i v) 腫瘍形成性であり、
 - (v) その集団が、未分画腫瘍細胞に比して少なくとも 2 倍富化されている、
- 充実腫瘍幹細胞の富化された集団を得る工程と；
- (b) 単離された細胞を、宿主哺乳動物内での充実腫瘍幹細胞の増殖を許す条件下で、宿主哺乳動物に移植する工程と
- を含む方法。

10

【請求項 1 3 2】

充実腫瘍が肉腫又は上皮癌である、請求項 1 3 1 記載の方法。

【請求項 1 3 3】

充実腫瘍幹細胞が、細胞表面マーカーである B 3 8 . 1 を発現する、請求項 1 3 1 記載の方法。

【請求項 1 3 4】

充実腫瘍幹細胞が、C D 2、C D 3、C D 1 4、C D 1 6、C D 4 5 及び C D 6 4 からなる群から選ばれる、マーカーを発現できない、請求項 1 3 1 記載の方法。

20

【請求項 1 3 5】

充実腫瘍幹細胞の富化された集団が、単離された充実腫瘍幹細胞である、請求項 1 3 1 記載の方法。

【請求項 1 3 6】

(c) 増殖した腫瘍細胞を宿主哺乳動物から単離する工程をさらに含む、請求項 1 3 1 記載の方法。

【請求項 1 3 7】

遺伝学的に改変された腫瘍幹細胞を生成する方法であって、

- (a) (i) 充実腫瘍に由来し、
 - (i i) 細胞表面マーカーである C D 4 4 を発現し、
 - (i i i) 該充実腫瘍に由来する非腫瘍形成性癌細胞による C D 2 4 の平均的発現より低レベルのマーカー C D 2 4 を発現し、
 - (i v) 腫瘍形成性であり、
 - (v) その集団が、未分画腫瘍細胞に比して少なくとも 2 倍富化されている、
- 充実腫瘍幹細胞の富化された集団を得る工程と；
- (b) 得られた細胞を遺伝学的に改変する工程と
- を含む方法。

30

【請求項 1 3 8】

充実腫瘍が肉腫又は上皮癌である、請求項 1 3 7 記載の方法。

40

【請求項 1 3 9】

充実腫瘍幹細胞が、細胞表面マーカーである B 3 8 . 1 を発現する、請求項 1 3 7 記載の方法。

【請求項 1 4 0】

充実腫瘍幹細胞が、C D 2、C D 3、C D 1 4、C D 1 6、C D 4 5 及び C D 6 4 からなる群から選ばれる、マーカーを発現できない、請求項 1 3 7 記載の方法。

【請求項 1 4 1】

充実腫瘍幹細胞の富化された集団が、単離された充実腫瘍幹細胞である、請求項 1 3 7 記載の方法。

【請求項 1 4 2】

50

遺伝学的改変を、*in vitro*で実施する、請求項137記載の方法。

【請求項143】

遺伝学的改変を、*in vivo*で実施する、請求項142記載の方法。

【請求項144】

遺伝学的改変が、充実腫瘍幹細胞へのプラスミドの導入である、請求項137記載の方法。

【請求項145】

遺伝学的改変が、充実腫瘍幹細胞へのウイルスベクターの導入である、請求項137記載の方法。

【請求項146】

ウイルスを、充実腫瘍幹細胞上の抗原を認識するタンパク質を発現し、こうして、充実腫瘍幹細胞を該ウイルスの標的にさせるよう改変する、請求項137記載の方法。

【請求項147】

(c) 腫瘍形成、腫瘍成長、腫瘍細胞の増殖、腫瘍細胞の生存、腫瘍幹細胞の生存、腫瘍幹細胞の増殖、腫瘍幹細胞の周期状態、及び腫瘍幹細胞の頻度に対する遺伝学的改変の効果を検査する工程
をさらに含む、請求項137記載の方法。

【請求項148】

癌細胞の集団を*in vitro*で増殖させる方法であって、

(a) (i) 充実腫瘍に由来し、

(ii) 細胞表面マーカーであるCD44を発現し、

(iii) 該充実腫瘍に由来する非腫瘍形成性癌細胞によるCD24の平均的発現より低レベルのマーカーCD24を発現し、

(iv) 腫瘍形成性であり、

(v) その集団が、未分画腫瘍細胞に比して少なくとも2倍富化されている、
充実腫瘍幹細胞の富化された集団を、免疫障害性マウスに導入する工程と；

(b) 充実腫瘍幹細胞を該マウス内で増殖させる工程と；

(c) 増殖した充実腫瘍幹細胞を、マウスから精製する工程と
を含む方法。

【請求項149】

充実腫瘍が肉腫又は上皮癌である、請求項148記載の方法。

【請求項150】

充実腫瘍幹細胞が、細胞表面マーカーであるB38.1を発現する、請求項148記載の方法。

【請求項151】

充実腫瘍が、CD2、CD3、CD14、CD16、CD45及びCD64からなる群から選ばれる、マーカーを発現できない、請求項148記載の方法。

【請求項152】

充実腫瘍幹細胞の富化された集団が、単離された充実腫瘍幹細胞である、請求項148記載の方法。

【請求項153】

マウスが、NOD/SCID系マウス又はSCID/Beige系マウスである、請求項148記載の方法。

【請求項154】

細胞を、皮下にか、又は乳房脂肪パッド内に導入する、請求項148記載の方法。

【請求項155】

腫瘍が、該哺乳動物内で、導入時の75%より大きく成長する、請求項148記載の方法。

【請求項156】

腫瘍が、該哺乳動物内で、導入時の90%より大きく成長する、請求項148記載の方法

10

20

30

40

50

。

【請求項 1 5 7】

細胞の集団を、少なくとも 2 倍に富化しておく、請求項 1 4 8 記載の方法。

【請求項 1 5 8】

細胞の集団を、少なくとも 5 倍に富化しておく、請求項 1 4 8 記載の方法。

【請求項 1 5 9】

細胞の集団を、少なくとも 1 0 倍に富化しておく、請求項 1 4 8 記載の方法。

【請求項 1 6 0】

マウスを、V P 1 6 の投与、放射線療法、及び化学療法からなる群から選ばれる方法によって、さらに免疫障害性にさせておく、請求項 1 4 8 記載の方法。

10

【請求項 1 6 1】

(d) 充実腫瘍幹細胞の富化された集団を、増殖した細胞から単離する工程をさらに含む、請求項 1 4 8 記載の方法。

【請求項 1 6 2】

単離が、フローサイトメトリーの使用を含む、請求項 1 6 1 記載の方法。

【請求項 1 6 3】

充実腫瘍からの充実腫瘍幹細胞を増殖させる方法であって、

(a) 充実腫瘍の細胞を分離する工程と；

(b) 分離した腫瘍細胞を懸濁液中に懸濁させる工程と；

(c) 懸濁させた細胞を、宿主哺乳動物に、導入された懸濁液中の癌の幹細胞が宿主哺乳動物内に腫瘍を形成するよう導入する工程とを含む方法。

20

【請求項 1 6 4】

充実腫瘍が肉腫又は上皮癌である、請求項 1 6 3 記載の方法。

【請求項 1 6 5】

充実腫瘍幹細胞が、細胞表面マーカーである B 3 8 . 1 を発現する、請求項 1 6 3 記載の方法。

【請求項 1 6 6】

充実腫瘍幹細胞が、C D 2、C D 3、C D 1 4、C D 1 6、C D 4 5 及び C D 6 4 からなる群から選ばれる、マーカーを発現できない、請求項 1 6 3 記載の方法。

30

【請求項 1 6 7】

単一の腫瘍に由来する細胞を含む腫瘍バンクであって、(a) (i) 充実腫瘍に由来し、(i i) 細胞表面マーカーである C D 4 4 を発現し、

(i i i) 該充実腫瘍に由来する非腫瘍形成性癌細胞による C D 2 4 の平均的発現より低レベルのマーカー C D 2 4 を発現し、

(i v) 腫瘍形成性であり、

(v) その集団が、未分画腫瘍細胞に比して少なくとも 2 倍富化されている

充実腫瘍幹細胞の富化された集団を宿主哺乳動物に導入する工程と；

(b) 導入された細胞を、宿主哺乳動物内で増殖させる工程と；

(c) 増殖した細胞を宿主哺乳動物から単離する工程と

40

によって、該腫瘍を形成する腫瘍バンク。

【請求項 1 6 8】

充実腫瘍が肉腫又は上皮癌である、請求項 1 6 7 記載の方法。

【請求項 1 6 9】

充実腫瘍幹細胞が、細胞表面マーカーである B 3 8 . 1 を発現する、請求項 1 6 7 記載の方法。

【請求項 1 7 0】

充実腫瘍幹細胞が、C D 2、C D 3、C D 1 4、C D 1 6、C D 4 5 及び C D 6 4 からなる群から選ばれる、マーカーを発現できない、請求項 1 6 7 記載の方法。

【請求項 1 7 1】

50

充実腫瘍幹細胞の富化された集団が、単離された充実腫瘍幹細胞である、請求項 1 6 7 記載の方法。

【請求項 1 7 2】

(a) 哺乳動物と；
(b) (i) 充実腫瘍に由来し、
(ii) 細胞表面マーカーである C D 4 4 を発現し、
(iii) 該充実腫瘍に由来する非腫瘍形成性癌細胞による C D 2 4 の平均的発現より低レベルのマーカー C D 2 4 を発現し、
(iv) 腫瘍形成性であり、
(v) その集団が、未分画腫瘍細胞に比して少なくとも 2 倍富化されており、
(vi) 富化されたその集団の細胞を哺乳動物に注射した、
充実腫瘍幹細胞の富化された細胞集団と；
を含む、キメラ哺乳動物。

【請求項 1 7 3】

(b) (iv) の充実腫瘍が肉腫又は上皮癌である、請求項 1 7 2 記載のキメラ哺乳動物。

【請求項 1 7 4】

充実腫瘍幹細胞が、細胞表面マーカーである B 3 8 . 1 を発現する、請求項 1 7 2 記載のキメラ哺乳動物。

【請求項 1 7 5】

充実腫瘍幹細胞が、C D 2、C D 3、C D 1 4、C D 1 6、C D 4 5 及び C D 6 4 からなる群から選ばれる、少なくとも一つの系譜マーカーを発現できない、請求項 1 7 2 記載のキメラ哺乳動物。

【請求項 1 7 6】

充実腫瘍幹細胞の富化された集団が、単離された充実腫瘍幹細胞である、請求項 1 7 2 記載のキメラ哺乳動物。

【請求項 1 7 7】

哺乳動物が免疫障害性マウスである、請求項 1 7 2 記載のキメラ哺乳動物。

【請求項 1 7 8】

腫瘍の治療方式の *in vitro* モデルを形成する方法であって、

(a) (i) 充実腫瘍に由来し、
(ii) 細胞表面マーカーである C D 4 4 を発現し、
(iii) 該充実腫瘍に由来する非腫瘍形成性癌細胞による C D 2 4 の平均的発現より低レベルのマーカー C D 2 4 を発現し、
(iv) 腫瘍形成性であり、
(v) その集団が、未分画腫瘍細胞に比して少なくとも 2 倍富化されている
充実腫瘍幹細胞の富化された細胞集団を、該充実腫瘍幹細胞が増殖して、腫瘍を形成するのを許す条件下で、該免疫障害性マウスに導入する工程と；
(b) 該免疫障害性マウス内の充実腫瘍幹細胞に対する該治療方式の効果を、治療方式の効果を追跡することによって試験する工程と
を含む方法。

【請求項 1 7 9】

充実腫瘍が肉腫細胞又は上皮癌である、請求項 1 7 8 の方法。

【請求項 1 8 0】

充実腫瘍幹細胞が、細胞表面マーカーである B 3 8 . 1 を発現する、請求項 1 7 8 記載の方法。

【請求項 1 8 1】

充実腫瘍幹細胞が、C D 2、C D 3、C D 1 4、C D 1 6、C D 4 5 及び C D 6 4 からなる群から選ばれる、マーカーを発現できない、請求項 1 7 8 記載の方法。

【請求項 1 8 2】

10

20

30

40

50

充実腫瘍幹細胞の富化された集団が、単離された充実腫瘍幹細胞である、請求項 1 7 8 記載の方法。

【請求項 1 8 3】

充実腫瘍の細胞を、N o t c h タンパク質に対して誘導された、治療有効量の抗体に接触させる工程を含む、充実腫瘍の大きさを減少させる方法。

【請求項 1 8 4】

抗体を、N o t c h 4 ポリペプチドに対して誘導する、請求項 1 8 3 記載の方法。

【請求項 1 8 5】

抗体を、N o t c h 4 の細胞外ドメインに対して誘導する、請求項 1 8 4 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

10

【0 0 0 1】

(技術分野)

本発明は、癌の診断及び治療に関する。

【0 0 0 2】

(背景となる技術)

癌は、米国における第 2 位の死因であり続けていて、毎年 5 0 0 , 0 0 0 を越える死亡を招いている。検出及び治療における進歩にもかかわらず、癌の死亡率は高い。癌の分子の基盤の理解における顕著な前進にもかかわらず、この知見は、いまだに効果的な治療方針へと翻訳されていない。

【0 0 0 3】

20

特に、乳癌は、米国人の女性には最も一般的な癌であって、ほぼ 9 人に 1 人が、その人生のうちに乳癌を発症する。不幸にも、転移性乳癌は、依然として不治の病である。転移性乳癌のほとんどの女性は、死に屈服する。

【0 0 0 4】

慣用の治療法の様式（放射線療法、化学療法及びホルモン療法）は、役立つ一方で、治療耐性の癌細胞の出現によって限定されている。明らかに、転移性乳癌、及び一般的に癌を治療するための標的を特定する、新たなアプローチが必要とされている。

【0 0 0 5】

(発明の開示)

本発明は、確立された充実腫瘍内の少ない百分率の細胞が、「幹細胞」の特性を有するという発見に基づく。これらの充実腫瘍「幹」細胞は、より多くの充実腫瘍幹細胞と、腫瘍内の細胞の大多数、すなわち、広範囲の増殖の余地、及び新たな腫瘍を生じる能力を失った癌細胞との双方を生じる。したがって、充実腫瘍幹細胞細胞の不均一性は、1 個の充実腫瘍幹細胞から生じる様々な腫瘍細胞型の存在を反映している。

30

【0 0 0 6】

癌療法が結果を有意に改善することの従来のは失敗は、部分的には、これらの療法が、充実腫瘍内の、広範囲の増殖の余地と、他のすべての充実腫瘍細胞型を生じる能力とを有する充実腫瘍幹細胞を標的とするものの失敗に起因している。本発明は、抗癌療法を、充実腫瘍幹細胞に対して、一般的に、かついまや特異的に、仕向けることができる方法を提供する。したがって、仕向けられる本発明の抗癌療法は、はるかに効果的かつ持続的な治療応答を招来する。

40

【0 0 0 7】

本発明の方法により、充実腫瘍内の細胞の表現型が不均一である集団を特性記述することができる。充実腫瘍から得られる細胞の集団は、蛍光標示式細胞分取法（F A C S）を用いて単離し、構造的に特性記述される。特に、腫瘍内の、広範囲の増殖という幹細胞特性、及び他のすべての腫瘍細胞型を生じる能力を有する、表現型が明確である細胞集団を特定し、単離し、かつ特性記述することができる。充実腫瘍幹細胞は、真に腫瘍形成性の細胞であって、治療後も腫瘍を再確立することができる。

【0 0 0 8】

本発明は、充実腫瘍幹細胞の機能と、充実腫瘍から単離された細胞の様々な集団による細

50

胞の機能との *in vivo* 及び *in vitro* のアッセイを提供する。本発明は、充実腫瘍から単離された細胞の様々な集団（例えば充実腫瘍幹細胞が富化された細胞集団）を用いて、充実腫瘍幹細胞の増殖に影響する因子を特定し、充実腫瘍から単離された細胞の集団を遺伝子発現パターン又はタンパク質発現パターンについて分析し、新奇な抗癌薬の標的を特定し、既存の抗癌治療方式に対する個々の患者からの腫瘍の感受性を予測し、抗癌治療をモデル化し、新奇な治療化合物を試験し、新奇な診断マーカーを特定かつ試験し、腫瘍を治療し、遺伝学的に変更された充実腫瘍幹細胞を生成し、そして充実腫瘍幹細胞からポリヌクレオチドやポリペプチドの cDNA ライブラリー及びマイクロアレーを調製する方法を提供する。

【0009】

本発明は、充実腫瘍細胞を *in vivo* で一貫して増殖させる方法を提供する。本発明は、単細胞懸濁液としてか、又は小凝集体として存在する充実腫瘍細胞を増殖させる方法も提供する。その上、本発明は、充実腫瘍一次細胞から受容を確立することができ、これらの充実腫瘍細胞に由来する腫瘍を試験することができる、キメラ動物（異種移植片モデル）を提供する。さらに、本発明は、単一の充実腫瘍幹細胞に由来する腫瘍バンク（実質的数のバイオアッセイを実施するのに充分大きい）を提供する。

【0010】

そのいくつかの態様で、本発明は、抗癌剤のスクリーニングに；抗癌療法の試験に；新たな経路を標的とする薬物の開発に；新奇抗癌療法の標的の特定に；病理学的標本における悪性細胞の特定及び診断に；充実腫瘍幹細胞の薬物感受性の試験及び検定に；薬物感受性を予測する特異的因子の測定に；患者のスクリーニングに（例えば乳房撮影用佐剤として）役立つ方法を提供する。本発明は、公知治療法に対する患者の腫瘍の感受性を試験するためのモデルとして；癌治療の新奇な治療標的の特定のためのモデルとして；癌治療用の新奇治療剤を試験するための腫瘍バンクを確立する体系として；腫瘍形成性の癌細胞を特定するための体系として用いることができる。

【0011】

（本発明を実施する様式）

幹細胞及び充実腫瘍不均一性モデル

充実腫瘍は、不均一な細胞集団で構成される。例えば、乳癌は、癌細胞と、間葉（間質）細胞、炎症細胞及び内皮細胞を包含する正常細胞との混合物である。古典的なモデルは、表現型の明確な癌細胞集団には、すべて、増殖し、新たな腫瘍を生じる余地があると考え（図1A）。古典的モデルでは、腫瘍細胞の不均一性は、環境的因子はもとより、腫瘍形成細胞の多様な集団を招来する、癌細胞内で進行中の突然変異の結果として生じ、細胞の集団は、すべて、類似の腫瘍形成能を有すると思われる [Pandis et al., Genes, Chromosomes & Cancer, 12: 122-129 (1998); Kuukasjarvi et al., Cancer Res., 57: 1597-1604 (1997); Bonsing et al., Cancer, 71: 382-391 (1993); Bonsing et al., Genes Chromosomes & Cancer, 82: 173-183 (2000); Beerman, H. et al., Cytometry, 12(2): 147-54 (1991); Aubelle, M., & Werner, M., Analyt. Cell. Path., 19: 53 (1999); Shen, L. et al., Cancer Res., 60: 3884 (2000)]。

【0012】

本発明は、充実腫瘍細胞不均一性の代替モデルに基づいており、充実腫瘍は、「充実腫瘍幹細胞」（又は充実腫瘍からの「癌幹細胞」）と、充実腫瘍幹細胞のその後の無秩序な発達との結果生じる。この幹細胞モデル（図1B）では、充実腫瘍は、大規模又は無限に増殖し、追加の充実腫瘍幹細胞を効率的に生じるという点で、正常な「幹細胞」の特性を共有する、細胞の明確で限定された（又はおそらく希な）サブセットを含む。確立された充実腫瘍内では、ほとんどの細胞が、大規模に増殖し、新たな腫瘍を形成できる能力を失っ

10

20

30

40

50

ているが、充実腫瘍幹細胞は、大規模に増殖し、追加の充実腫瘍はもとより、腫瘍形成性を欠くその他の腫瘍細胞も生じる。増殖し、最終的には致死的と判明するのは、この充実腫瘍幹細胞の集団である。

【0013】

これらのモデルを区別するには、従来のクローン形成アッセイ（下記参照）を克服しなければならない。あらゆる細胞型に一定している低確率の腫瘍形成性ではなく、一貫した幹細胞集団の存在を証明するには、幹細胞を純化し、それらは、腫瘍形成性に極めて富むが、新生物細胞の残余は、そのような活性を奪われているのを示すことができなければならない。本発明は、その可能性を与える。

【0014】

充実腫瘍内の細胞集団を、充実腫瘍幹細胞の、本明細書に記載の構造的特徴に基づいて単離かつ分析できる可能性は、腫瘍学又は幹細胞生物学の当業者が、図1に示された二つのモデルを区別するのを許す。本発明によって、充実腫瘍幹細胞、及び充実腫瘍からの細胞集団が単離かつ分析された。その上、これらの充実腫瘍幹細胞は、非常に高いか、又は無限定的な増殖能を有し、そのために、真に腫瘍形成性である集団を代表する。充実腫瘍幹細胞モデル、及び下記に与えられた結果（実施例を参照）によれば、これらの腫瘍形成細胞は、充実腫瘍のクローン形成細胞である。

【0015】

正常な動物発生の際は、ほとんどか、又はすべての組織の細胞は、幹細胞と呼ばれる正常な前駆体に由来する [Morrison et al., Cell 88 (3): 287-98 (1997); Morrison et al., Curr. Opin. Immunol. 9 (2): 216-21 (1997); Morrison et al., Annu. Rev. Cell. Dev. Biol., 11: 35-71 (1995)]。用語「幹細胞」は、(1)細胞が、低下した増殖又はは発生能を有する1種類もしくはそれ以上の子孫を生成できる細胞であること；(2)細胞が、大規模な増殖能を有すること；及び(3)細胞が、自己更新又は自己維持できることを意味することが当技術に公知である [Potten et al., Development, 110: 1001 (1990)；米国特許第5,750,376号、第5,851,832号、第5,753,506号、第5,589,376号、第5,824,489号、第5,654,183号、第5,693,482号、第5,672,499号及び第5,849,553号明細書を参照、すべて引用によって組み込まれる]。成体の動物では、いくつかの細胞（血液、腸、胸腺管系及び皮膚を包含する）は、各組織内の幹細胞の小集団から、絶えず補充される。したがって、（正常な生活であれ、損傷及び疾病に応答してであれ）組織の維持は、特定の発生上のシグナルに応答しての、前駆細胞からの組織の補充に依存する。

【0016】

幹細胞の分化による成体細胞の更新の最も良く知られた例は、造血組織である [米国特許第5,061,620号、第5,087,570号、第5,643,741号、第5,821,108号、第5,914,108号明細書を参照、それぞれ引用によって組み込まれる]。発生的に未熟な前駆体（造血幹及び始原細胞）は、分子的シグナルに応答して、多様化された血液及びリンパ系の細胞型を次第に形成する。幹細胞は、上皮組織 [Slack, Science, 287: 1431 (2000)]を参照]及び間葉組織 [米国特許第5,942,225号明細書を参照、引用によって組み込まれる]を包含する、その他の組織でも見出される。正常な乳房の発生では、正常な幹細胞が、分化した子孫を生じて、正常な管系を形成する [Kordon & Smith, Development, 125: 1921-1930 (1998)；米国特許第5,814,511号及び第5,650,317号明細書も参照]。

【0017】

本発明により、正常な幹細胞生物学の原理が、充実腫瘍幹細胞を単離し、特性記述するのに適用された。充実腫瘍幹細胞を単離するか、又は本発明によれば富化することができる

10

20

30

40

50

、充実腫瘍の例は、肉腫及び癌腫、例えば、これに限定されないが、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨原性肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫、滑膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌、膵臓癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、扁平上皮細胞癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳頭癌、乳頭腺癌、嚢腺癌、骨髄癌、気管支原性癌、腎細胞癌、肝癌、胆管癌、絨毛癌、精上皮腫、胎生期癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸癌、精巣癌、半眼、小細胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神経膠腫、星状細胞腫、骨髄芽腫、頭蓋咽頭腫、脳室上衣細胞腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聴神経腫瘍、乏突起神経膠腫、髄膜腫、黒色腫、神経芽細胞腫及び網膜芽細胞腫を包含する。本発明は、肉腫（図 2 2 参照）及び上皮癌、例えば卵巣癌（図 2 1 参照）及び乳癌（実施例参照）に適用できる。

10

【0018】

充実腫瘍幹細胞は、下記に記載されたのと類似の方法及びアッセイを用いて、本明細書に記載のとおり構造的及び機能的に定義することができる。腫瘍細胞は、追加の遺伝的突然変異が発生するにつれて、経時的に、表現型上及び機能的に発達することが知られているため、充実腫瘍幹細胞は、個々の患者においても、経時的に、表現型上及び機能的に変化し得る。にもかかわらず、本明細書に開示された、患者の大多数における充実腫瘍幹細胞の単離及び特定に一貫して役立つのマーカーを用いて、本発明の方法を用いることができる。

【0019】

また、充実腫瘍幹細胞は、無秩序な発達の際に「自己更新」及び「分化」を遂げて、腫瘍を形成し、異常な細胞型を生じ、追加の遺伝的突然変異が発生するにつれて、経時的に変化し得る。充実腫瘍幹細胞の機能的特徴は、それらが腫瘍形成性であり、追加の腫瘍形成細胞を生じ（「自己更新」）、非腫瘍形成性腫瘍細胞を生じ得る（「分化」）ことである。

20

【0020】

充実腫瘍幹細胞の発生上の起源は、充実腫瘍癌の異なる種類の間で変動し得る。充実腫瘍幹細胞は、正常な幹細胞の増殖及び分化を失調させる、遺伝的損傷の結果として [Lapidot et al., Nature 367 (6464): 645-8 (1994)] か、又は正常な制約された始原細胞、もしくは正常な分化した細胞型の異常調節された増殖によって発生し得る。代表的には、充実腫瘍は、それらの発生上の起源ではなく、それらの位置に従って、視認され、最初に特定される。

30

【0021】

対照的に、充実腫瘍からの非腫瘍形成細胞は、免疫障害性マウスへの移植に際して、触診できる腫瘍を形成できない、集団からの細胞であって、分画されない、解離させた同数の腫瘍細胞を、同じ条件下で移植したならば、充実腫瘍幹細胞は、同じ期間で触診できる腫瘍を形成したであろう。したがって、非腫瘍形成細胞葉、動物モデルでは、腫瘍形成活性を奪われている。

【0022】

「触診できる腫瘍」は、手で扱われるか、手に触れるか、又は感じられることができる腫瘍として当技術に公知である。

40

【0023】

腫瘍形成性の変化は、腫瘍内の正常な環境から取り出された後でさえ、充実腫瘍幹細胞に固有であるため、本発明は、いくつかの新奇な用途を提供する：

（１）充実腫瘍幹細胞が発現する遺伝子及びタンパク質を特定することによって、その機能が腫瘍形成に必要であり、新奇な薬物の標的を代表する、タンパク質を特定することができる；

（２）充実腫瘍幹細胞を表現型マーカーに基づいて充実腫瘍幹細胞を純化することによって、それらの遺伝子発現パターン及び機能を、はるかに直接的かつ効率的に調べることができる；

（３）充実腫瘍幹細胞の機能の *in vitro* 及び *in vivo* アッセイを開発するこ

50

とによって、潜在的治療化合物の効果をより効果的に試験することができる。

(4) 充実腫瘍幹細胞のマーカーを特定することによって、悪性細胞（腫瘍を作り出せる能力にとっては希である、環境的特徴性に依存しないものでさえ）の存在をより効果的に診断することができる；

(5) 充実腫瘍幹細胞を、個々の患者から単離し、*in vitro*及び*in vivo*アッセイに移植することによって、それらに対する異なる薬物治療様式の効果を試験することができる。そのため、薬物感受性及び薬物耐性を予測することができる。

【0024】

本発明のモデルの充実腫瘍幹細胞は、米国特許第6,004,528号明細書が提供する「癌幹細胞系」とは異なる。該特許では、「癌幹細胞系」は、それ自体は、僅かな突然変異を有するにすぎないが、その細胞の環境で発生する腫瘍形成性の変化の結果として、非対称的な細胞分裂ではなく、対称的なそれを行なう、緩慢に増殖する始原細胞型として定義される。したがって、この「癌幹細胞系」仮説は、甚だしく突然変異した、急速に増殖する腫瘍細胞は、おおむね、異常な環境の結果として生じるのであって、その環境が、比較的正常な幹細胞を集積させ、そうして、それらを腫瘍細胞にさせる突然変異を生じると提唱する。米国特許第6,004,528号明細書は、そのようなモデルは、癌の診断を強化するのに用いることができると提唱する。充実腫瘍幹細胞モデルは、「癌幹細胞系」モデルとは根本的に異なり、その結果、「癌幹細胞系」モデルが提供しない効用を示す。第一に、充実腫瘍幹細胞は、「突然変異が省かれて」いない。米国特許第6,004,528号明細書が記載する「突然変異が省かれた癌幹細胞系」は、前癌性病変であると考え 10
てよいが、本発明記載の充実腫瘍幹細胞は、腫瘍形成の原因となる突然変異をそれ自体有する。すなわち、本発明の充実腫瘍幹細胞（「癌幹細胞」）は、米国特許第6,004,528号明細書の「癌幹細胞系」と区別される、甚だしく突然変異した細胞のうちに含まれることになる。第二に、癌へと導く遺伝的突然変異は、おおむね、環境的ではなく、むしろ充実腫瘍幹細胞そのものに固有である。充実腫瘍幹細胞モデルは、単離された充実腫瘍幹細胞が、移植した際に追加の腫瘍を生じることができるとを予測する（こうして転移を説明する）が、「癌幹細胞系」モデルは、腫瘍形成性であるのは、異常な環境であることから、移植された「癌幹細胞系」の細胞は、新たな腫瘍を発生できないと予測することになる。実際、解離され、表現型上単離されたヒト充実腫瘍幹細胞をマウスに（正常な腫瘍環境とは非常に異なる環境へと）移植できて、依然として新たな腫瘍を形成すること 30
が、本発明を「癌幹細胞系」モデルから区別させる。第三に、充実腫瘍幹細胞は、対称的にも、非対称的にも同様に分裂するため、対称的細胞分裂は、無条件の特性ではない。第四に、充実腫瘍幹細胞は、多くの変動要因に応じて、急速又は緩慢に分裂するため、低い増殖率は、定義となる特徴性ではない。

【0025】

上記のとおり、充実腫瘍幹細胞は、細胞表面マーカーによって機能的に特徴付けることができる。これらの細胞表面マーカーは、それに特異的に結合する試薬によって認識することができる。例えば、充実腫瘍幹細胞の表面のタンパク質、炭水化物又は脂質は、その特定のタンパク質又は炭水化物に特異的な抗体によって、免疫学的に認識することができる [マーカーに対する抗体の構成及び使用については、Harlow, Using Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, 1999)を参照；実施例も参照されたい]。充実腫瘍幹細胞（本発明の「癌幹細胞」）の細胞表面に存在する、一連のマーカーは、充実腫瘍幹細胞に特徴的である。そのため、充実腫瘍幹細胞は、細胞表面マーカーの肯定的及び否定的選別によって選別することができる。充実腫瘍幹細胞に結合する試薬は、「陽性マーカー」（すなわち、充実腫瘍幹細胞の細胞表面に存在するマーカー）であって、充実腫瘍幹細胞の肯定的選別に用いることができる。充実腫瘍幹細胞「陰性マーカー」（すなわち、充実腫瘍幹細胞の細胞表面には存在しないが、充実腫瘍から得られたその他の細胞の表面に存在するマーカー）に結合する試薬は、充実腫瘍幹細胞ではない集団内のこれらの充実腫瘍細胞の排除に（すなわち、充 40
50

実腫瘍幹細胞ではない細胞の排除に)用いることができる。

【0026】

一実施態様では、細胞表面マーカーの検出された発現に基づく、細胞間の識別は、対照細胞集団による平均的発現と比較した限りでの、細胞表面マーカーの検出された発現を比較することによってなされる。例えば、充実腫瘍幹細胞上のマーカーの発現は、同じ腫瘍から充実腫瘍幹細胞として派生したその他の細胞による、マーカーの平均的発現と比較することができる。マーカーの発現によって細胞同士を識別するその他の方法は、マーカー発現に基づくフローサイトメトリーによって、細胞を排除する方法を包含する [Givan A., Flow Cytometry: First Principles, (Wiley-Liss, New York, 1992); Owens, M. A. & Loken, M. R., Flow Cytometry: Principles for Clinical Laboratory Practice, (Wiley-Liss, New York, 1995) を参照]。 10

【0027】

充実腫瘍幹細胞陽性マーカーは、充実腫瘍幹細胞以外の細胞にも存在し得る。充実腫瘍幹細胞陰性マーカーは、充実腫瘍幹細胞以外の細胞にも不在であり得る。幹細胞を特定する単一のマーカーを特定することは希であるが、別の前後関係から、幹細胞を独自に特定し、その実質的な富化を許す、陽性及び陰性マーカーの組合せを特定できることは多かった [Morrison et al., Cell, 96 (5): 737-49 (1999); Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 92 (22): 10302-6 (1995); Morrison & Weissman, Immunity, 1 (8): 661-73 (1994)]。 20

【0028】

「試薬の組合せ」は、充実腫瘍幹細胞の表面に存在する(陽性マーカー)か、もしくは存在しない(陰性マーカー)かのいずれかの細胞表面マーカー、又は陽性及び陰性マーカーの組合せに結合する、少なくとも2種類の試薬である(実施例7及び8、表6を参照されたい)。充実腫瘍幹細胞表面マーカーに特異的な抗体の組合せを用いることは、肉腫、卵巣癌及び胸部腫瘍を包含する、様々な充実腫瘍からの充実腫瘍幹細胞の単離又は富化に役立つ、本発明の方法を招く。試薬の組合せの使用に対する指針は、PCT特許願第WO 01/052143号公報(Morrison & Anderson、引用により組み込まれる)に見出すことができる。 30

【0029】

充実腫瘍から得られた細胞間の表現型の特徴性を選ぶことによって、いかなる動物の充実腫瘍、特にいかなる哺乳動物の充実腫瘍からも、充実腫瘍幹細胞を単離することができる。結合親和性のような因子を考慮すると、マーカーの種特異的な多様性を認識する抗体は、充実腫瘍幹細胞に富ませ、かつそれを選別するのに用いられることが認識されるであろう。CD44、B38.1、CD24その他のマーカーの種特異的な多様性を認識する抗体は、充実腫瘍幹細胞を富化し、その種から単離するのに用いられるであろう(例えばマウスの充実腫瘍幹細胞についてはマウスCD44に対する抗体、サルの充実腫瘍幹細胞についてはサルB38.1に対する抗体等々)。 40

【0030】

ヒト乳癌の効率的異種移植片

本発明は、宿主動物への充実腫瘍幹細胞の注入によって腫瘍を確立する、異種移植片モデルを提供する。宿主動物は、線虫、ミバエ、ゼブラダニオのようなモデル生物、好ましくはマウス(ヌードマウス、SCID系マウス、NOD/SCID系マウス、Beige/SCID系マウス)、ラット、ウサギ又は霊長類のような研究用哺乳動物であることができる。重篤な免疫不全のNOD/SCID系マウスを受容者として選んで、注入された細胞の参加を最大化した。免疫不全マウスは、ヒトの組織を拒絶せず、SCID及びNOD/SCID系マウスは、ヒトの造血及び組織生着のin vivo研究用宿主として用いられている [McCune et al., Science, 241: 1632-9 (50

1988) ; Kamel-Reid & Dick, Science, 242: 1706-9 (1988) ; Larochelle et al., Nat. Med., 2: 1329-37 (1996)]。加えて、Beige/SCID系マウスも用いられている。

【0031】

異種移植片の腫瘍は、今日まで試験された患者すべての乳房切除標本から確立されている（実施例7参照）。マウスの腫瘍は、悪性の胸水からも確立されている。加えて、腫瘍は、2種類の肉腫から得られた細胞の皮下注射によって確立されている。さらに、本発明者らが試みたすべての腫瘍について、単細胞懸濁液（又は少数の細胞凝集体のみ、例えば100未満、好ましくは10未満を有する懸濁液）を作成し、次いで、腫瘍に移転することができている。この異種移植片アッセイは、腫瘍形成性で、クローン形成性の充実腫瘍幹細胞を特性記述するための生物学的及び分子のアッセイに役立つ。

10

【0032】

NOD/SCID又はBeige/SCID系マウスは、VP-16（実施例1及び3参照）、放射線療法、化学療法、又はその他の免疫抑制性の生物学的作用因を用いて、さらに免疫抑制することができる。

【0033】

このin vivoアッセイは、乳癌、及びこの疾病の新たな治療の発展をより良く理解するのに特に好都合である。現在まで、原発性乳癌を必要とする生物学的及び分子的研究を実施するのは不可能であった。そのような研究は、細胞系に限定されていた。不幸にも、乳癌細胞の根本的特性の多くは、組織培養中に変化することが周知である [Fenhall et al., Brit. J. Cancer, 81: 1142-1149 (1999)]。この後者の問題は、細胞の継続的培養によって悪化するのみである。

20

【0034】

対照的に、本発明の方法を用いると、乳癌細胞（好ましくは乳癌幹細胞に富ませた）は、免疫障害性マウスに注入されて、腫瘍を成長させる。一実施態様では、細胞は、マウスの乳房脂肪パッドに注入されるか、又はマウスに皮下注射される。さらに、腫瘍は、単細胞懸濁液（又は少数の細胞凝集体、例えば100未満、好ましくは10未満を有する懸濁液）から確立し、次いで、腫瘍を他のマウスに移転することができる。

【0035】

充実腫瘍幹細胞の富化、及び充実腫瘍幹細胞の単離は、本発明を、米国特許第4,411,990号明細書で参照された「ヒト腫瘍幹細胞の一次アッセイ」から際立たせる [Hamburger et al., Blood, 47: 995 (1976) ; Salmon et al., AACR Abstracts, 19: 231, Abstr. No. 922 (1978) も参照されたい]。従来の組織培養アッセイでは、小比率の腫瘍細胞のみが、in vitroクローン形成アッセイでコロニーを形成できたにすぎず、非常に多くの細胞（例えば骨髄腫及び造血細胞）は、代表的には、腫瘍をin vivoで形成するのに移植することを要した [Ogawa, M. et al., Cancer Res., 31(12): 2116-2119 (1971) ; Ogawa, M. et al., Cancer Res., 33(12): 3172-3175 (1973) ; Schlag, P. & Flentje, D., Cancer Treatment Reviews, 11, Suppl. A: 131-7 (1984)]。このことは、少数の腫瘍細胞のみが、実際に腫瘍形成性であるにすぎないとの仮説へと導いた。しかし、技術的限界のために、細胞のこの腫瘍形成性分画は、非腫瘍形成細胞から単離することができず、そのため、腫瘍細胞の本質的に異なるサブセット、すなわち、実質的な増殖の潜在的能力を有するいくつか、及び限定された潜在的能力を有するその他が存在することが、証明できなかった。すなわち、腫瘍形成細胞を純化し、非腫瘍形成細胞から区別できない限り、すべての腫瘍細胞が、いかなるアッセイにおいても、クローン形成活性を示す類似の低い確率を有することが可能であり続ける。その上、細胞の腫瘍形成性分画（腫瘍幹細胞）を特定かつ単離できることなしには、米国特許第4,411,990号明細

30

40

50

書は、この発明に記載された効用を欠く。例えば、腫瘍形成細胞を単離するためのマーカーなしには、その遺伝子発現パターン、又は診断マーカーのその発現、又は治療剤に対するその応答を研究することは、不可能である。いくつかの技術的問題は、従来の発明が腫瘍形成細胞又は腫瘍幹細胞を単離するのを妨げた。第一に、*in vitro*アッセイは、いくつかの初期コロニー形成を生じたが、通常、細胞は、培養において増殖を停止し、連続的に成長できなかった [Salmon, S. E. & Hamburger, A. W., *Science*, 197: 461-463 (1977); Schlag, P. et al., *Cancer Treatment Reviews*, 11, Suppl. A: 131-7 (1984); Salmon, S. E., *Recent Results in Cancer Research*, 94: 8 (1984)]。また、多くの腫瘍は、*in vitro*ではコロニーを全く形成できなかった [Carney, D. N. et al., *Stem Cells*, 1: 149-164 (1981)]。同様に、ほとんどの充実腫瘍から単離された、解離した細胞は、免疫不全マウスモデルで、腫瘍を形成することが希でしかなかった [Sakakibara, T. et al., *Cancer J. Si. Am.* 2: 291-300 (1996); Mueller, B. & Reisfeld, R. A., *Cancer Metastasis Rev.*, 10: 193-200 (1991)]。不死化された組織培養の癌細胞系の特定のクローンのみが、*in vivo*モデルで腫瘍を形成できたとの所見は、この問題をさらに具体的に示す [Hamilton, T. C. et al., *Cancer Res.*, 44 (11): 5286-90 (1984)]。こうして、アッセイにおける制約は、コロニーが、*in vitro*で増殖できるその余地を失った幹細胞から生じるのか、又は限定された増殖能を有する非腫瘍形成細胞から生じるのか、あるいは*in vitro*でコロニーを形成できる少数の細胞は、その腫瘍内の「幹細胞」集団によるのか、又は*in vitro*で増殖できる希な細胞によるのかを決定することを不可能にしている。さらに、表現型上異なる細胞集団を区別することができなかった：本発明以前には、非常に限定された使用が、充実腫瘍細胞の表現型上明確な集団をフローサイトメトリーによって分離かつ分析するのに、フローサイトメトリーのような手法になされなかったためである。実際、従来の技術に用いられたクローン形成アッセイは、個々の患者の腫瘍の挙動を予測せず、認められなかった [von Hoff, D. D. et al., *Cancer*, 67 (1): 20-7 (1991); Federico, M. et al., *Gynecologic Oncology*, 55 (3 Pt. 2): S156-63 (1994)]。こうして、細胞分離手法、及び従来の技術に用いられたアッセイにおける限界は、それらが腫瘍形成細胞を純化するのを不可能にした。そのため、仮説的な腫瘍幹細胞の存在を証明することは、不可能であった。

【0036】

乳癌におけるNotchの役割

受容体のNotchファミリーは、幹細胞の発生及び分化に関与している [Morrison et al., *Cell*, 101 (5): 499-510 (2000); Artavanis-Tsakonas et al., *Science*, 284: 770 (1999); 及び Artavanis-Tsakonas et al., *Science*, 268: 225-232 (1995); 米国特許第6,090,922号明細書 (引用により組み込まれる) を参照されたい]。Notchは、本来は、ショウジョウバエ属で、他の細胞型を費やして多過ぎるニューロンを形成する、機能喪失突然変異から特定された [Poulson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 23: 133 (1937)]。試験されたすべての動物モデルで、Notch受容体における突然変異は、発生上の異常を招く。カエノラーブディティス・エレガンス *Caenorhabditis elegans* (C. エレガンス) では、Notchは、生殖細胞系幹細胞の自己更新に必要とされる [Berry et al., *Development*, 124 (4): 925-36 (1997)]。ラットでは、Notchは、神経冠幹細胞の分化を調節する [Morrison et al., *Cell*, 101 (5)

： 499-510 (2000)]。一過性のNotch活性化は、神経冠幹細胞による神経組織発生から神経膠発生への不可逆的切り換えを始動する。

【0037】

隣接する細胞が、Notch受容体及びリガンドを発現できるため、一つの細胞は、隣接する細胞のNotchシグナリングを活性化することによって、隣接細胞の運命に影響を及ぼすことができる。

【0038】

Jagged [Shimizu et al., Journal of Biological Chemistry, 274 (46): 32961-9 (1999); Jarriault et al., Molecular and Cellular Biology, 18: 7423-7431 (1998)]、Serrate及びDelta (及びそれぞれの変異型、例えばDelta1、Delta2、Delta3、Delta4及びJagged2、C. エレガンスのLAG-2ならびにAPX-1) のようなナイフエッジ名を有するタンパク質は、Notch受容体に結合し、隣接細胞が神経冠始原細胞になるのを阻害する、下流シグナリング経路を活性化する。最近特定されたりガンドは、Dll4であって、動脈内皮で発現される、DeltaファミリーのNotchリガンドである [Shutter et al., Genes Dev., 14 (11): 1313-8 (2000)]。

【0039】

Notchリガンドは、Notchファミリー受容体は無差別に結合かつ活性化し得る。Fringeファミリーの成員 [Panin et al., Nature, 387 (6366): 908-912 (1997)] のような、その他の遺伝子の発現は、NotchリガンドとのNotch受容体の相互作用を変更し得る。Numbファミリーの成員も、Notchシグナリングを細胞内で変更し得る。

【0040】

Notchへのリガンドの結合は、Notchを切断する、プレセニン1依存性γ-セクレターゼ様タンパク質の活性化を招く [De Strooper et al., Nature, 398: 518-522 (1999); Mumm et al., Molecular Cell, 5: 197-206 (2000)]。細胞外領域での切断は、フリン様転換酵素を必要とし得る [Logeat et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 95: 8108-8112 (1998)]。細胞内ドメインは、放出され、DNA結合タンパク質のRBP-Jと会合することによって、遺伝子をトランス活性化する [Kato et al., Development, 124: 4133-4141 (1997)]。Notch1、Notch2及びNotch4は、スプリットエンハンサー (HES) ファミリーの成員のような遺伝子をトランス活性化するが、Notch3のシグナリングは、阻害的であり得ると考えられている [Beatus et al., Development, 126: 3925-3935 (1999)]。最後に、Fringeファミリーの分泌されるタンパク質は、Notch受容体に結合し、それらの機能を変更する [Zhang & Gridley, Nature, 394 (1998)]。

【0041】

哺乳動物では、公知のNotchファミリーの成員が4種類存在する。Notch4は、マウスの乳癌に役割を演じる、マウスint-3というの癌遺伝子のヒトオースログである [Gallahan et al., Cancer Res., 56 (8): 1775-85 (1996); Uyttendaele et al., Development, 2122: 251 (1996); Imatani & Callahan, Oncogene, 19 (2): 223-31 (2000)]。

【0042】

本発明は、Notch4が、正常なヒト乳腺の発生と腫瘍形成との双方に役割を演じるこ

との発見に基づく。個々の腫瘍内では、腫瘍形成細胞の小さい下位集団のみが、高レベルのN o t c h 4を発現するにすぎない。N o t c h 4を認識する抗体は、乳癌腫瘍細胞の増殖をi n v i t r o及びi n v i v oで遮断する（実施例2、5、12及び15を参照されたい）。一実施態様では、抗体は、N o t c h 4の細胞外ドメインに結合する。特定の実施態様では、抗体は、ペプチド領域：

【0043】

L L C V S V V R P R G L L C G S F P E

(L e u L e u C y s V a l S e r V a l V a l A r g P r o A r g G l y L e u L e u C y s G l y S e r P h e P r o G l u) (S E Q I D N o.)

に結合する。

10

【0044】

しかし、N o t c h活性化を阻害する、いかなる抗N o t c h 4抗体も、腫瘍の生存を損なうのに用いることはできない。

【0045】

N o t c hのシグナリングの阻害剤（例えばN u m b及びN u m b様；又はN o t c h活性化を遮断する抗体もしくは小分子）を本発明の方法に用いて、充実腫瘍幹細胞を阻害することができる。このようにして、N o t c h経路を変更して、充実腫瘍幹細胞を死滅させるか、又はその増殖を阻害する。

【0046】

対照的に、N o t c hリガンドである、可溶性D e l t a [H a n e t a l., B l o o d, 95(5): 161625 (2000)]を用いたN o t c hの刺激が、腫瘍細胞の増殖及び生存をi n v i t r oで促進することが、従来見出されていた。こうして、N o t c h経路の刺激は、癌細胞の増殖及び生存を促進することが、従来見出されていた。

20

【0047】

本発明は、米国特許第5,780,300号明細書で提供された、N o t c h経路を用いた、非末端分化細胞の操作とは異なる。米国特許第5,780,300号明細書は、癌細胞ではなく、正常細胞の変更を指向している。該特許は、N o t c h機能の作用薬を用いて非末端分化させた細胞（正常な前駆細胞）を、細胞の分化を、増殖（有糸分裂活性）を阻害せずに阻害することによって拡大する方法を対象としているため、非末端分化した細胞の拡大された集団が得られた。これらの拡大された細胞は、細胞置換療法に用いることができるが、それは、本発明におけるN o t c hのシグナリングを変更することによって、充実腫瘍幹細胞を死滅させるか、又はその増殖を阻害するという、目標とは両立し得ない用途である。

30

【0048】

本発明の治療的態様

本発明の充実腫瘍幹細胞モデルの当然の結果は、癌を効果的に治療し、より高い治癒率を達成するには、抗癌療法は、充実腫瘍幹細胞を対象としなければならないということである。現在の治療法は、大集団を対象とすることから、それらは、充実腫瘍幹細胞を根絶するには効果的ではない可能性がある。現在の癌療法の限界は、充実腫瘍幹細胞を効果的に死滅させることができないことから派生する。充実腫瘍幹細胞の特定は、この細胞集団に対する治療剤の特異的な標的化を許して、より効果的な癌治療が、結果的に得られる。この概念は、癌治療に対する我々のアプローチを根本的に変えるであろう。

40

【0049】

現代のバイオテクノロジーにおける進歩は、癌治療のための新たな治療標的の特定を促進した。ゲノム学における進歩は、個々の細胞型で発現される10,000〜30,000の遺伝子の配列決定及び特定を可能にした。ヒトゲノムが配列決定されている。これは、増殖、細胞死及び不死化のような無数の生物学的過程に関与する、新奇なタンパク質の特定を招いて、薬物干渉のための標的を提供している。ゲノム学は、癌細胞内の薬物の標的を特定するための強力な手段を提供するが、これらの標的は、標的が腫瘍形成細胞集団内

50

に存在する場合にのみ、有効であるにすぎない。効果的であるには、ゲノム学は、腫瘍を構成する不均一な細胞内の、腫瘍形成性成長の原因となる個別的集団に絞り込まれなければならない。充実腫瘍では、これらは、充実腫瘍幹細胞である。加えて、ゲノム学は、癌性組織に由来する純化された細胞集団で発現される遺伝子を特定するためには、未だに用いられていない。

【0050】

新奇な癌治療剤を特定する際の主要な問題の一つは、大規模な配列決定プロジェクトで特定された、無数の遺伝子のどれが、臨床的に最も重要な薬物標的であるかということである。このことは、充実腫瘍が多く種類の正常細胞と、腫瘍細胞の不均一な集団との混合物からなるため、とくに困難にされる。この複雑さを軽減する一つの方途は、充実腫瘍を精細解剖して、腫瘍細胞を富化した後に、cDNAを作成することである（下記を参照）。この手法は、腫瘍細胞を解剖する病理学者は、どの細胞が腫瘍形成性であるかを外見に基づいて予測できるという仮定に基づく。しかし、細胞は、形態学的には類似していても、機能的には不均一なままであり得る。その上、精細解剖によって得られた細胞は、生存できず、そのため、そのような細胞の機能的特性は、試験又は確認することができない。

10

【0051】

これに代えて、本発明の方法によって、フローサイトメトリー（FACSのような）、及び本発明の異種移植片の動物モデルを用いて、特定の細胞集団を富化することができる。この手法は、生存できる正常及び腫瘍細胞の表現型上純粋な集団を、分子的分析のために同時に単離することができるという利点を有する。したがって、フローサイトメトリーは、細胞集団の機能を試験し、それらを生物学的アッセイに用い、加えて、その遺伝子発現の様相を研究するのを許す。さらに、そのような細胞は、生物学的アッセイで特性記述することもできる。例えば、間葉（間質）細胞を、成長因子、礎質タンパク質及びプロテアーゼの産生について分析し、内皮細胞を、充実腫瘍の成長支援（例えば血管新生）に関与する特異的因子の産生について分析し、かつ充実腫瘍からの腫瘍細胞の異なるサブセットを単離し、腫瘍形成性、薬物耐性及び転移可能性について分析することができる。

20

【0052】

細胞の富化された集団におけるような、「富化された」は、細胞の分画されたセットにおける、特定のマーカーを有する細胞の数の、細胞の未分画セットにおける該マーカーを有する細胞の数に比しての増加に基づいて定義することができる。しかし、用語「富化された」は、好ましくは、試験マウスにおいて限界希釈頻度で腫瘍を形成する、細胞の最小数としての腫瘍形成機能によって定義することができる。したがって、500の腫瘍幹細胞が、試験動物の63%に腫瘍を形成するが、5,000の未分画腫瘍細胞が、試験動物の63%に腫瘍を形成するのに必要とされるならば、この充実腫瘍幹細胞集団は、腫瘍形成活性について10倍富化されている（実施例を参照）。充実腫瘍幹細胞モデル（図1A）は、（表現型及び機能上の）富化のこれら二つの定義の間の関連を与える。

30

【0053】

CD44のみを用いたFACS方は、充実腫瘍幹細胞を少なくとも2倍富化することができる（実施例1及び3を参照）。追加のマーカーを用いた富化は、10倍又はそれ以上富化することができ、充実腫瘍幹細胞を単離するのに用いることができる。

40

【0054】

「単離された」は、その天然の環境（例えば充実腫瘍内）から取り出され、隔離又は分離された細胞であって、少なくとも約75%、最も好ましくは約90%が、天然にはともに存在するが、該細胞がそれに基づいて単離されるマーカーを欠く、その他の細胞から遊離している、細胞を意味する。

【0055】

充実腫瘍からの癌細胞サブセットの純化（富化又は単離）は、腫瘍学の当業者が、癌の古典的モデルと充実腫瘍幹細胞モデルとを区別するのを許す（図1）。少数の充実腫瘍細胞が、実際に、幹細胞の特性を有するならば、腫瘍増殖及び薬物耐性に必要な遺伝子を効率的に特定するには、ゲノム学を、幹細胞集団に集束させなければならない。しかし、ゲノ

50

ム学を、充実腫瘍細胞ではなく、大集団に標的化するならば、最も有望な薬物標的が、腫瘍内の大規模増殖の余地を保有しない、その他の細胞が発現するその他の遺伝子の大海の中で、曖昧になるか、又は失われてしまう。

【0056】

実施例のいくつかで、本発明者らは、乳癌からの腫瘍形成細胞に的を絞った。充実腫瘍内の細胞の個々の集団に的を絞ることは、新奇な癌治療に的を絞り、薬物発見のための新奇なひょてきを特定する方法の、より明瞭な理解を与える。加えて、充実腫瘍幹細胞（例えば乳癌腫瘍形成細胞）の純化は、薬物感受性についてふり分け、腫瘍形成又は転移の能力を予測するマーカーを特定するための材料を提供する。

【0057】

充実腫瘍幹細胞の *in vivo* 増殖

充実腫瘍幹細胞の *in vivo* 増殖は、充実腫瘍幹細胞を、動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはマウスのような齧歯類（実験用齧歯類に注入するのに当技術に開発された予測可能な方法のため）、最も好ましくは免疫弱体化されたマウス、例えば SCID 系マウス、Beige/SCID 系マウス又は NOD/SCID 系マウス（実施例を参照）への注入によって達成することができる。NOD/SCID 系マウスは、様々な数の細胞を注入し、腫瘍形成について観察する。注入は、当技術に公知のいかなる方法によって実施することもでき、注入された細胞集団の充実腫瘍幹細胞についての富化を追跡する。

【0058】

特定の実施態様では、NOD/SCID 系マウスモデルにヒト乳癌腫瘍を確立するために、8週齢の雌の NOD/SCID 系マウスを、ケタミン/キシラジン（4 ml の体積中キシラジン 20 mg と併せたケタミン 300 mg）0.2 ml の腹腔内注射によって麻酔した。次いで、この溶液 0.02 ml を、HBSS に希釈し、マウス 20 g あたりで用いた。次いで、マウスに VP-16（エトポシド）を、腹腔内注射（1 kg あたりエトポシド 30 mg、無血清 HBSS に希釈して最終注人体積を 0.2 ml とした）によって投与した。同時に、エストロゲンペレットを、マウスの頸部背側の皮下に、トロカールを用いて入れた。次いで、マウスを、暖め、覚醒した後にケージに戻した。腫瘍注入/移植は、すべて、この操作の 3～3 日後に実施した。

【0059】

新鮮な標本を移植するため、ヒト乳癌腫瘍のサンプルは、術後 1 時間以内に受領した。これらの腫瘍を、鋏で小片に裁断し、次いで、小片を、剃刀で寸断して、2 x 2 mm の大きさの片を得た。寸断は、氷上の無菌条件下で、20% ウシ胎児血清を補った無菌の RPMI 1640 培地中で実施した。次いで、腫瘍片を、無血清 HBSS で洗浄し、直ちに移植した。次いで、中腹部に 2 mm の切開を施し、トロカールを用いて、1～2 個の小腫瘍片を、上右側及び上左側の乳腺脂肪パッド（両側の 2 番目の乳首の直下）に移植した。6-0 縫合糸を、MFP-乳首に 2 回り施して、移植片を定位置に保持させた。縫合糸は、5 日後に除去した。Nexaban を用いて、切開を密封し、腫瘍成長についてマウスを毎週追跡した。

【0060】

胸水、又は解離した充実腫瘍細胞を注入するため、細胞を、手術直後に受領し、無血清 HBSS で洗浄した。次いで、細胞を、無血清 RPMI/Matrigel 混合物（1:1 体積）に懸濁し、次いで、左右の乳腺パッドに 18 G の針を用いて注入した。これを実施するには、望みの数の細胞を、0.2 ml 中に懸濁し、注入した。針注入の部位は、Nexaban で密封して、いかなる細胞の漏れも防いだ。

【0061】

消化された腫瘍細胞を注入するには、患者からの腫瘍（充実腫瘍）、又はマウスで（本発明の方法によって）成長させた腫瘍を、小片に裁断し、次いで、無菌の剃刀を用いて完全に寸断した。次いで、得られた片を、HBSS 溶液中の超純粋コラゲナーゼ II と混合し（コラゲナーゼ 200～250 U/ml）、37℃で 3～4 時間温置を許し、15～20 分毎に、10 ml 入りピペットで採取した。温置の終点で、細胞を、45 ミクロンのナイ

10

20

30

40

50

ロンメッシュ越しに濾過し、RPMI-20% FBSで洗浄し、次いで、HBSSで2回洗浄した。次いで、注入しようとする細胞を、HBSS/Matrigel混合物(1:1体積)に懸濁し、上記のとおり、哺乳動物の脂肪パッド又は皮下に注入した。Nexabanは、注入部位を密封するのに用いることができる。

【0062】

異種移植片腫瘍を分析するため、充実腫瘍を、マウスから取り出し、単細胞懸濁液とした。当技術に公知の方法を用いて、細胞を、染色し、フローサイトメトリー(FACS)によって分析した[Morrison & Weissman, Immunity, 1(8): 661-73 (1994)]。腫瘍形成細胞の表現型は、すべての腫瘍でCD44⁺CD24⁻/1⁰であり、ほとんどの腫瘍で、B38.1CD44⁺CD24⁻/1⁰である。次いで、これらのマーカーの発現に基づくFACSによって、単離された細胞の限界希釈分析を実施した。次に、乳癌幹細胞をさらに純化した。細胞を、7AAD(死細胞を染色)、抗H2K-PE(マウス細胞を染色)、及び癌細胞による不均一発現パターンを有する、抗B38.1、抗アネキシンV、抗Notch4、抗CD9、抗CD24、抗MUC1、抗CD49F、抗CD62P、抗P-糖タンパク質、抗Notch1、抗520C9、抗260F9及び抗317G5を包含する、抗体の組合せで染色した。FACSを用いて、示差的に発現された抗原の一つを発現するか、又はしないヒト生存細胞を単離した。マーカーの組合せは、腫瘍形成細胞の最大の富化を許す。限界希釈アッセイのために、各集団の100、1,000、10,000及び100,000の細胞をin vivoで分析した。

10

20

【0063】

SCID系マウス、NOD/SCID系マウス又はBeige/SCID系マウスに、様々な数の細胞を注入し、腫瘍について観察した。形成されるいかなる腫瘍も、病理学的検査及びFACS分析のために取り出した。試験を繰り返して(例えば約10回)、結果を確認した。

【0064】

細胞の処方及び注入のその他の一般的手法は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 20th ed. (Mack Publishing Co., Easton, PA)に見出し得る。適切な経路は、筋内、皮下(上記参照)、脊髄内注射はもとより、鞘内、直接脳室内、静脈内、腹腔内、鼻内又は眼内注射を包含する、非経口送達を包含し得るが、これらは僅かを指名したにすぎない。注入には、本発明の薬剤を、水溶液中、好ましくは、ハンク液、リンゲル液、又は生理食塩水緩衝液のような、生理学的に適格である緩衝液中に処方する。そのような経粘膜投与には、浸透させようとする障壁に適切な浸透剤を処方物中に用いる。そのような浸透剤は、当技術に一般的に公知である。

30

【0065】

充実腫瘍幹細胞が富化された細胞集団を用いることによって、本発明は、Mueller及びReisfeld[Cancer Metastasis Rev., 10: 183-200 (1991)](多数のヒト腫瘍、特に血液学的疾患及び悪性黒色腫に対する散剤性成長を許す、SCID系マウスを用いた)、及びSakakibaraら[Cancer J. Sci. Am., 2: 291-300 (1996)](重篤な合併免疫不全(SCID)のマウスの大腹部(生殖腺)脂肪パッドに内植された乳癌の外科標本の成長及び転移能を研究)の方法にまさる改良である。Sakakibaraらは、生殖腺脂肪パッド内へのヒト乳腫瘍の定置が、急速又は緩慢いずれかに成長するか、又は全く成長しない腫瘍を生じ得ることを観察した。調べた48例の腫瘍のうち、3個のリンパ節由来腫瘍の一つを包含する12例(25%)が、移植されたマウスのいくつか又はすべての中で充分急速に成長して(すなわち、腫瘍は、2~6ヶ月以内に2~3cmの直径に達した)、反復的な継代を許した。

40

【0066】

対照的に、充実腫瘍幹細胞の注入は、回数の75%を越える、好ましくは回数の80%、

50

より好ましくは85%、90%、又は95%を越える、腫瘍の成功裡の確立を一貫して生じることができる。本発明者らは、試験した5例の腫瘍はもとより、3例の胸水からも、腫瘍の100%の成功裡の確立を達成した（実施例を参照）。その上、本発明は、Sakakibaraら[Cancer J. Sci. Am., 2: 291-300 (1996)]の方法を用いては、確立に到達できない領域である、乳腺脂肪パッドで充実腫瘍（特に乳癌幹細胞からの腫瘍）の好都合な確立を与える。

【0067】

充実腫瘍幹細胞の*in vitro*増殖

細胞は、個々の細胞の解離によって、充実腫瘍組織から得ることができる。特定の腫瘍からの組織を、無菌手順を用いて取り出し、トリプシン、コラゲナーゼなどのような酵素による処理を包含する、当技術に公知のいかなる方法[Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989); Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., eds, (Wiley Interscience, New York, 1989); 及びMolecular Biology Lab Fax, Brown, ed. (Academic Press, 1991)]を参照]を用いても、又は直截的な機器によるような、解離の物理的方法によっても、細胞を解離させる。解離の方法は、異なる濃度の酵素を、異なる時間試験して、細胞生存率、細胞表面マーカーの保持、及び培養中の生存能力を最大化することによって最適化する[Worthington Enzyme Manual, von Worthington, ed. (Worthington Biochemical Corporation, 2000)]。解離させた細胞は、200~2,000 rpm、通常、約1,000 rpm (210 x G) の低速度で遠心分離し、継いで、培地に再懸濁する。細胞培養の方法への指針については、Spector et al., Cells: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, 1998)を参照されたい。

【0068】

解離した細胞は、細胞代謝に要する補強物、例えばグルタミンその他のアミノ酸、ビタミン、無機質、及びトラスフェリンなどの有用なタンパク質を含有する、HEM、DMEM、RPMI、F-12などを包含する、細胞増殖を支援できる公知のいかなる培地にも入れることができる。培地は、酵母、細菌及び真菌による汚染を防ぐために、ペニシリン、ストレプトマイシン、ゲンタマイシンなどのような抗生物質を含有してもよい。ある場合には、培地は、ウシ、ウマ、ニワトリなどに由来する血清を含有してもよい。しかし、充実腫瘍幹細胞の増殖に好適な実施態様は、規定された低血清培地を用いることである。充実腫瘍幹細胞に好適な培地は、ハムのF12、2%ウシ胎児血清、及び定義されたホルモン及び塩類混合物、インスリン、トラスフェリン、ならびにセレン又はB27補強物の混合物を含む、規定培地である[Brewer et al., J. Neurosci Res., 35: 567 (1993)]。

【0069】

培地は、培養中の腫瘍幹細胞の増殖を許すための分裂促進因子及び生存因子としての、ウシ胎児血清又はニワトリ胚エクス(CEE)で補強された、化学的に規定された培地であることができる。幹細胞の増殖に効果的な、1種類又はそれ以上の所定の成長因子、例えば、当業者には公知のN2補強物又はB27補強物を含有する、その他の無血清培地を用いて、充実腫瘍幹細胞を他の鳥類及び哺乳動物の種、例えばヒトから単離かつ繁殖させることができる[米国特許第5,750,376号、第5,851,832号及び第5,753,506号明細書; Atlas et al., Handbook of Microbiological Media (CRC Press, Boca Raton, Louisiana, 1993); Freshney, Culture on Animal

Cells, A Manual of Basic Technique, 3rd Edition (Wiley-Liss, New York, 1994)を参照、すべて、引用により本明細書に組み込まれる]。

【0070】

充実腫瘍幹細胞の増殖用培地は、こうして、充実腫瘍幹細胞、及び増殖した後代の増殖を支援する。「増殖した後代」は、充実腫瘍幹細胞を包含する未分化の腫瘍細胞であるが、それは、充実腫瘍幹細胞は、培養中に大規模に増殖する能力を有するからである。

【0071】

培養の条件は、生理学的条件に近くなければならない。培地のpHは、生理学的pH、好ましくはpH6～8、より好ましくは約pH7～7.8に近くなければならず、pH7.4が最も好ましい。生理学的温度は、約30～40℃にわたる。細胞は、好ましくは約32～約38℃、より好ましくは約35～約37℃の温度で培養する。同様に、細胞は、空気中のO₂濃度に比して比較的低下させたレベルのO₂中で培養する結果、O₂濃度が、空気中の20%のO₂ではなく、生理学的レベル(1～6%)に匹敵してよい。 10

【0072】

特定の患者の充実腫瘍幹細胞は、*in vitro*で増殖させさえすれば、分析し、ふり分けることができる。*in vitro*で増殖させた充実腫瘍幹細胞は、当技術に公知の手法を用いて、遺伝的に改変することもできる[下記を参照；またSambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989)；Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., eds, (Wiley Interscience, New York, 1989)も参照された]。*in vitro*遺伝的改変は、一定の状況では、遺伝学的材料による感染に優る、より以上の制御が必要とされるときに、*in vivo*遺伝的改変より望ましいことがある。 20

【0073】

充実腫瘍幹細胞及び幹細胞後代は、当技術に公知の何らかの方法によって必要とされるまでは、凍結保存することができる。細胞は、等張溶液、好ましくは、特定の凍結保存剤を含有する、細胞培養液中に懸濁させることができる。そのような凍結保存剤は、ジメチルスルホキシド(DMSO)、グリセリンなどを包含する。これらの凍結保存剤は、5～15%、好ましくは8～10%の濃度で用いる。細胞は、-15～-150℃、好ましくは-20～-100℃、より好ましくは-150℃の温度まで徐々に凍結させる。 30

【0074】

充実腫瘍幹細胞の*in vitro*培養についてのそれ以上の指針は、実施例9及び図9に与えられる。

【0075】

充実腫瘍幹細胞及び充実腫瘍幹細胞後代の遺伝的改変

未分化の状態では、充実腫瘍幹細胞は、急速に分裂し、そのため、遺伝的改変の絶好の標的となる。本明細書に用いられる限りでの用語「遺伝的改変」は、外来DNAの意図的な導入による、前駆細胞の遺伝子型の安定的又は一過的变化を意味する。DNAは、合成によるか、又は天然に派生してもよく、遺伝子、遺伝子の一部、その他の役立つDNA配列を含んでよい。本明細書に用いられる限りでの用語「遺伝的改変」は、天然に生じる変更、例えば天然のウイルス活動、天然の遺伝子組換えなどを通じて発生するものを包含することは意味しない。真核細胞の遺伝的改変の一般的方法は、当技術に公知である[Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989)；Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., eds, (Wiley Interscience, New York, 1989)を 40 50

参照]。

【0076】

ベクターを細胞又は組織内に導入するための多くの方法が利用でき、*in vivo*、*in vitro*及び*ex vivo*での充実腫瘍幹細胞による使用に等しく適する。ベクターは、患者から採取した造血幹細胞に導入し、クローン的に繁殖させてよい。本発明の方法によって、そのような方法は、充実腫瘍幹細胞に拡張される。

【0077】

本明細書に用いられる限りでの「形質転換」又は「遺伝的改変された」は、外来DNAを、受容細胞に進入し、それを変化させる方法を記載する。形質転換は、天然のか、又は当技術に周知の様々な方法による人為的な条件下で発生してよく、外来核酸配列を原核又は真核宿主細胞に挿入するための、公知のいかなる方法にも依拠してよい。形質転換の方法は、形質転換しようとする宿主細胞の種類に基づいて選び、ウイルス感染、電気穿孔、熱ショック、リポフェクション及び粒子衝撃を包含するが、これらに限定されない。用語「形質転換された」細胞は、安定的に形質転換された細胞であって、挿入されたDNAが、自発的に複製するプラスミド、又は宿主染色体の一部のいずれかとして複製できる細胞はもとより、挿入DNA又はRNAを限定された時間だけ発現する、一過的に形質転換された細胞も包含する。

【0078】

原発性腫瘍細胞の遺伝子操作は、Patelら[Human Gene Therapy 5: 577-584 (1994)]によって以前に記載されている。細胞の遺伝的改変は、遺伝子療法の分野に周知の一つ又はそれ以上の手法を用いて達成され得る[Mulligan, R. C., Human Gene Therapy 5: 543-563 (1993)]。ウイルス形質導入法は、感染した標的細胞に対するタンパク質の発現を推進又は阻害する、核酸配列を含む組換えDNA又はRNAウイルスの使用を含み得る。本発明に用いるのに適するDNAウイルスは、アデノウイルス(Ad)、アデノ関連ウイルス(AAV)、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス又はポリオウイルスを包含するが、これらに限定されない。本発明に用いるのに適するRNAウイルスは、レトロウイルス又はシンドビスウイルスを包含するが、これらに限定されない。本発明に用いるのに適すると思われる、いくつかのそのようなDNA及びRNAウイルスが存在する。

【0079】

アデノウイルスベクターは、ワクチン開発のための真核細胞への遺伝子導入に特に役立つことが判明している[Graham, F. L. & Prevec, L., in Vaccines: New Approaches to Immunological Problems, Ellis, R. V., ed., 363-390 (Butterworth-Heinemann, Boston, 1992)]。

【0080】

充実腫瘍幹細胞の遺伝的改変に特定した指針は、実施例13及び図15～18に与えられる。

【0081】

遺伝子療法に使用又は提唱されている、「非ウイルス性」送達手法は、DNAリガンド複合体、アデノウイルス-リガンド-DNA複合体、DNAの直接注入、CaPO₄沈降、遺伝子銃の手法、電気穿孔、及びリポフェクションを包含する[Mulligan, R. C., Science 260: 926-932 (1993)]。これらの方法のいずれも、当業者には広く利用可能であり、本発明に用いるのに適すると思われる。その他の適切な方法は、当業者に利用可能であり、本発明は、トランスフェクションの利用できる方法のいずれを用いて達成してもよい。リポフェクションは、単離DNA分子をリポソーム粒子内に封入し、リポソーム粒子を標的細胞の細胞膜に接触させることによって達成してよい。リポソームは、自己集合性のコロイド粒子であって、その中に、ホスファチジルセリン又はホスファチジルコリンのような、両親媒性分子で構成される脂質二重層が、周囲の培地の一部を、脂質二重層が親水性の内部を囲むように封入している。単層又は多

層のリボソームは、内部が、望みの化学物質、薬物、又は本発明におけるように、単離 DNA 分子を収容するように構成することができる。トランスフェクション、リボソーム注入、又はポリカチオン性アミノ重合体による送達は、当技術に周知の方法を用いて達成してよい [例えば、Goldman, C. K. et al., Nature Biotechnology 15: 462-466 (1997)]。

【0082】

特に問題とされる、2種類の改変された充実腫瘍幹細胞は、欠失突然変異体、及び過剰発現突然変異体である。欠失突然変異体は、単一の遺伝子、通常はタンパク質コーディング遺伝子が実質的に欠失するよう遺伝的に改変された、野生型細胞である。欠失突然変異体は、遺伝子が、通常、検出できる mRNA 又は生物活性タンパク質が該遺伝子から全く発現されないよう、破壊されているが、それでも遺伝材料の多少の部分が存在し得る、突然変異体も包含する。加えて、いくつかの実施態様では、欠失、又は二つ又はそれ以上の活性を有するタンパク質の（しばしば、あるタンパク質ドメインに相当する）一つの活性を除去又は不活性化する突然変異を有する突然変異体が用いられ、用語「欠失突然変異体」に包含される。過剰発現突然変異体は、改変された充実腫瘍幹細胞内の少なくとも一つの、唯一であることが最も多い遺伝子が、遺伝子が改変されていない細胞に比して、より高いレベルで発現されるように遺伝的に改変された、野生型細胞である。

10

【0083】

遺伝的に改変された充実腫瘍幹細胞は、当技術に公知の組織培養プロトコルに付すことができる [米国特許第 5, 750, 376 号及び第 5, 851, 832 号明細書; Specter et al., Cells: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, 1998) を参照]。腫瘍幹細胞は、培養の際に、分化、細胞死又は免疫原性を促進するよう、遺伝的に改変することができる。例えば、腫瘍幹細胞は、患者の充実腫瘍に対する免疫応答を誘導する産物の発現を促進するよう改変することができる。これに代えて、充実腫瘍幹細胞は、遺伝的改変の前に、様々な増殖プロトコルに *in vitro* で付すことができる。用いられるプロトコルは、遺伝的に改変される充実腫瘍幹細胞、又は望みの充実腫瘍幹細胞後代の種類に依存する。細胞を分化のプロトコルに付したならば、それらを、望みのタンパク質の発現について再び検定することができる。望みの表現型を有する細胞は、単離し、遺伝的に改変された細胞が発現するタンパク質又は生物学的活性分子の必要に応じて、受容者に移植することができる。そのような分子は、腫瘍の退縮を促進するか、又は腫瘍の拡大を阻害することができる。

20

30

【0084】

充実腫瘍発生の *in vitro* モデル、*in vivo* モデル、及び充実腫瘍幹細胞に対する薬物の効果をスクリーニングする方法

in vitro (実施例 9 参照) 又は *in vivo* (本発明の異種移植片モデル) での充実腫瘍幹細胞、及び培養された充実腫瘍幹細胞後代は、可能性のある治療組成物のスクリーニングに用いることができる。充実腫瘍の治療のためのこれらの組成物は、培養内のこれらの細胞に様々な用量で適用することができ、これらの細胞の応答を、様々な時間にわたって追跡することができる。これらの細胞の物理的特徴性は、細胞を顕微鏡で観察することによって分析することができる。酵素、受容体その他の細胞表面分子のようなタンパク質の、新たな、又は上昇したレベルでの発現の誘導は、そのような分子のレベルの変化を特定できる、当技術に公知のいかなる手法によっても分析することができる [Clarke et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 11024-11028 (1995) を参照]。これらの手法は、そのような分子に対する抗体を用いた免疫組織化学 (実施例を参照)、又は生化学的分析を包含する。そのような生化学的分析は、タンパク質アッセイ、受容体結合アッセイ、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA)、電気泳動分析、高性能液体クロマトグラフィー (HPLC) による分析、ウエスタンブロット分析、及び放射線免疫アッセイ (RIA) を包含する。ノーザンブロット分析のような核酸分析は、これらの分子をコードしている mRNA のレベル、

40

50

又はPCRを調べるのに用いることができる〔実施例14を参照されたい〕。

【0085】

これに代えて、これらの製剤組成物で処理された細胞を、動物に移植し（例えば本発明の異種移植片モデル）、それらの生存、腫瘍を形成する能力、及び生化学的かつ免疫学的特徴性を調べることができる。

【0086】

本発明の充実幹細胞及び充実腫瘍幹細胞後代は、充実腫瘍細胞に対する生物学的作用因の効果を決定する方法に用いることができる。用語「生物学的作用因」又は「試験化合物」は、腫瘍細胞に対する効果を（そのような効果が有害、有益又は別途であろうと否と）有し得るいかなる作用因（ウイルス、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、脂質、炭水化物、核酸、ヌクレオチド、薬物、抗体、プロドラッグその他の物質）を意味する。

10

【0087】

可能性のある試験化合物の充実腫瘍幹細胞に対する効果を決定するには、腫瘍幹細胞に由来する前駆細胞の培養体を、被験者、例えば、腫瘍その他の癌性疾患、例えば上皮癌又は乳癌を有する患者の組織から得ることができる。充実腫瘍幹細胞、又は他の望みの細胞集団を被験者から得たならば、細胞を*in vitro*で培養する。培養の選択は、試験しようとする特定の試験化合物、及び研究室の人員が達成したいと欲する診断効果に依存する。

【0088】

様々な生物学的作用因が、充実腫瘍幹細胞及び充実腫瘍幹細胞後代の数及び性質を増加、減少、又は他の何らかの方法で改変できる能力を、ふるい分けることができる。例えば、充実腫瘍幹細胞の増殖能力を低下させる試験化合物についてふるい分けることが可能であって、抗癌治療剤の特定に役立つと思われる。これらのアッセイでは、適切な細胞を、問題の試験化合物の存在下で培養し、発生する増殖又は細胞死の度合いについて検定する。

20

【0089】

充実腫瘍幹細胞及びその後代の大規模な増殖に対する試験化合物、又は試験化合物の組合せの効果を決定することができる。大規模に増殖できる能力を失うよう、スクリーニングの前に既に誘導された、非腫瘍形成性充実腫瘍細胞をふるい分けることが可能である。増殖過程に対する試験化合物の効果を、それらを充実腫瘍幹細胞に適用することによって決定することもできる。一般的には、試験化合物を可溶化し、培地に加えるか、又は*in vivo*アッセイではマウスに様々な濃度で与えて、各用量での試験化合物又は作用因の効果を決定する。培地は、2日毎に、試験化合物又は生物学的作用因を、該作用因の濃度を多少とも一定に保つような量で補充してよい。同様に、試験化合物は、異なる時間的間隔でマウスに再投与して、化合物の効果を経時的に査定することができる。

30

【0090】

増殖の変化は、形成される細胞の数の増加もしくは減少、あるいは*in vitro*での病巣の大きさ、又は*in vivo*での腫瘍の大きさの増加もしくは減少によって観察する（それが、増殖の速度、及び細胞死の速度の反映であって、病巣あたりの細胞数、又はマウスにおける腫瘍の大きさによって決定される）。腫瘍幹細胞に対する試験化合物の効果は、試験化合物の投与後の、培養体、又は*in vivo*でのマウス中に存続する腫瘍幹細胞の数を決定することによって測定する。腫瘍幹細胞の数の決定に加えて、腫瘍幹細胞の細胞周期、及びマーカー発現に対する試験化合物の効果も、フローサイトメトリーによって決定する。

40

【0091】

培地に添加されたか、又はマウスに注入された試験化合物又は生物学的作用因は、約10 pg/ml～1 µg/ml、好ましくは約1 ng/ml（又は1 ng/血液1 cc）～100 ng/ml（又は100 ng/血液1 cc）の範囲内の最終濃度であることができる。

【0092】

試験化合物又は生物学的作用因の効果は、発現された表現型、細胞生存率、増殖率、腫瘍

50

幹細胞の数、*in vivo*での移植に対する腫瘍幹細胞活性、培養における移植に対する腫瘍幹細胞の活性、腫瘍細胞の細胞周期の分布、及び遺伝子発現における変化のような基準に関して、対照培養体に対する有意差に基づいて特定する。

【0093】

治療組成物及び方法

N o t c hリガンド、抗N o t c h抗体、又は他の、N o t c hシグナル導入／応答経路におけるタンパク質の作用薬もしくは拮抗薬として作用する治療剤を含有する製剤組成物を、いかなる効果的な方法によっても投与することができる。例えば、有効濃度の抗N o t c h治療剤を含有する、生理学的に適切な溶液を、局所的に、眼内、非経口、経口、鼻内、静脈内、筋内、皮下投与でか、又は他のいかなる効果的な手段によっても投与することができる。特に、抗N o t c h治療剤は、標的癌又は腫瘍組織に、針によって、該標的組織の腫瘍細胞を治療するのに効果的な量で直接注入してよい。これに代えて、目、消化管、生殖泌尿管（例えば膀胱）、肺及び気管支系などのような体腔内に存在する癌又は腫瘍は、有効濃度の抗N o t c h治療剤を含有する生理学的に適切な組成物（例えば、無菌である、生理食塩水もしくはリン酸緩衝液、懸濁液、又は乳濁液）を、針による直接注入を通じてか、又は癌もしくは腫瘍に冒された中空の器官に入れた、カテーテルその他の送達管を通じて、与えることができる。X線、ソノグラム又は光ファイバー視覚化装置系のような、効果のないいかなる造影装置も用いて、標的組織を定位し、針又はカテーテル管を案内してよい。もう一つの代替方法では、有効濃度の抗N o t c h治療剤を含有する生理学的に適切な溶液を、血液循環内に全身的に投与して、直接到達するか、又は解剖学的に単離することができない、癌もしくは腫瘍を治療することができる。

10

20

【0094】

そのような操作は、すべて、抗N o t c h治療剤が腫瘍細胞に接触し、形質導入し、又はトランスフェクションするのに十分なだけ（作用因の性質に依存する）、抗N o t c h治療剤を標的腫瘍に接触させるという目標を共通して有する。一実施態様では、中空器官の上皮裏打ちに存在する充実腫瘍を、ベクター懸濁液を液体に満たされた中空器官内に注入することによってか、又は空気に満たされた中空器官内に吹き付けるか、もしくは噴霧することによって治療してよい。すなわち、腫瘍細胞（例えば充実腫瘍幹細胞）は、肺気管支樹の裏打ち、消化管の裏打ち、女子生殖管、生殖泌尿管、膀胱、胆嚢、その他の抗N o t c h治療剤との接触に到達できるいかなる器官組織の裏打ちの中もしくは間に存在し得る。もう一つの実施態様では、充実腫瘍は、例えば脊椎、脊髄根又は脳のような、中枢神経系の中にか、又は裏打ちに位置するため、脳脊髄液に注入された抗N o t c h治療剤が、その空間内の充実腫瘍の細胞に接触し、形質導入する（したがって、抗N o t c h治療剤は、当技術に公知の方法を用いて、脳血液障壁を横断するよう改質することができる）。腫瘍学の当業者は、抗N o t c h治療剤は、腫瘍へのベクター懸濁液の直接注入によって、充実腫瘍に投与されるため、抗N o t c h治療剤は、腫瘍内部の腫瘍細胞に接触かつ影響できることを理解することができる。

30

【0095】

腫瘍学の当業者は、ベクターは、選ばれたベクターの形質導入又はトランスフェクション効率を維持し、安全な注入を促進するのに適した担体又は賦形剤とともにベクターを含む組成物として投与されることを理解することができる。そのような担体は、pH均衡させた生理学的緩衝液、例えばリン酸、クエン酸又は重炭酸緩衝液、生理食塩水溶液、徐放性組成物、その他、治療しようとする充実腫瘍幹細胞に抗N o t c h治療剤を安全かつ効果的に接触させるのに役立ついかなる物質であってもよい。

40

【0096】

充実腫瘍を有する患者を治療する際は、治療有効量の抗N o t c h治療剤を投与する。治療有効量は、症状の改善、又は生存の延長を患者に招くのに十分な、化合物の量を意味する。そのような化合物の毒性及び治療効率は、細胞培養又は実験動物における、例えばLD₅₀（集団の50％に致死的な用量）及びED₅₀（集団の50％に治療上有効な用量）を決定するための、標準的な製剤手順によって決定することができる。毒性効果と治療

50

効果との用量比は、治療指数であり、比 LD_{50} / ED_{50} として表すことができる。大きい治療指数を示す化合物が、好ましい。これらの細胞培養アッセイ及び動物研究から得られたデータは、ヒトに用いるための投与量の範囲を処方するのに用いることができる。そのような化合物の投与量は、好ましくは、僅かにすぎないか、又は全くない毒性を伴う ED_{50} を包含する循環濃度の範囲内にある。投与量は、採用される投与形態、及び利用される投与経路に応じて、この範囲内で変動し得る。本発明の方法に用いられるいかなる化合物についても、治療有効用量を、当初は、細胞培養アッセイから推算することができる。用量は、細胞培養で決定されたとおりの IC_{50} を包含する循環血漿濃度範囲を達成するよう、動物モデルで処方し得る。そのような情報は、ヒトに役立つ用量をより正確に決定するのに用いることができる。血漿中のレベルは、例えば、高性能液体クロマトグラフィー (HPLC) によって測定し得る。 10

【0097】

的確な処方、投与経路及び投与量は、患者の状態に鑑みて、個々の内科医によって選ぶことができる [例えば、Finglet al., in The Pharmacological Basis of Therapeutics, Chap. 1, pg. 1 (1975) を参照]。担当内科医は、毒性のために投与を終結、中断又は調整する方法及び時期を知っていると思われる。逆に、担当内科医は、臨床的応答が適切でないならば (毒性は別として)、より高いレベルに投与を調整することの知っているであろう。問題の臨床的疾患の管理における、投与される用量の大きさは、治療しようとする状態の重篤度、及び投与経路とともに変動する可能性がある [Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals, 12th ed. (CRC Press 1996); Physicians' Desk Reference, 55th ed. (2000) を参照]。状態の重篤度は、例えば、適切な予後評価法によって、部分的には評価し得る。さらに、用量、及びおそらく用量頻度も、個々の患者の年齢、体重及び応答に応じて変動する。上記に考察されたそれに匹敵するプログラムを、獣医学においても用い得る。 20

【0098】

治療しようとする特定の状態に応じて、薬剤を全身的又は局所的に処方かつ投与し得る。処方及び投与の手法は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 20th ed. (Mack Publishing Co., Easton, PA) に見出し得る。適切な経路は、経口、経直腸、経皮、経膈、経粘膜又は経小腸投与；筋内、皮下、脊髄内注射はもとより、鞘内、直接脳室内、静脈内、腹腔内、鼻内又は眼内注射を包含する、非経口送達を包含し得るが、これらは僅かを指名したにすぎない。 30

【0099】

注入には、本発明の薬剤を、水溶液中、好ましくは、ハंक液、リンゲル液、又は生理食塩水緩衝液のような、生理学的に適格である緩衝液中に処方する。そのような経粘膜投与には、浸透させようとする障壁に適切な浸透剤を処方物中に用いる。そのような浸透剤は、当技術に一般的に公知である。

【0100】

活性成分に加えて、これらの製剤組成物は、薬学的に使用できる製剤へと活性化合物を加工するのを助ける、賦形剤及び佐剤を含む、薬学的に許容され得る適切な担体を含み得る。経口投与用に処方された製剤は、錠剤、カプセル剤又は溶液の形態であり得る。本発明の製剤組成物は、それ自体は公知である方式で、例えば、慣用の混合、溶解、造粒、研和、乳化、カプセル化、内包又は凍結乾燥の方法によって製造し得る。非経口投与向けの薬学的処方物は、水溶性形態の活性化合物の水溶液を包含する。加えて、活性成分の懸濁液を、適切な油状注射懸濁液として調製し得る。適切な親油性溶媒又は担体は、ゴマ油のような油脂、又は合成脂肪酸エステル、例えばオレイン酸エチルもしくはトリグリセリド、又はリポソームを包含する。水性の注射懸濁液は、懸濁液の粘度を上昇させる物質、例えばカルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール又はデキストランを含み得 40 50

る。場合により、懸濁液は、適切な安定剤、又は化合物の溶解度を上昇させて、著しく濃縮された溶液の調製を許す薬剤を含有してもよい。

【0101】

充実腫瘍幹細胞から得られるポリヌクレオチド及びポリペプチド

「ポリヌクレオチド」は、ヌクレオチドの連鎖であって、核酸、核酸配列、オリゴヌクレオチド、ヌクレオチド、又はそれらのいかなる断片であることもできる、連鎖を意味する。それは、ゲノムDNA、mRNA、cDNA、又は合成起源の、二本鎖もしくは一本鎖の、かつ炭水化物、脂質、タンパク質その他の、特定の活性を遂行するか、又は役立つ組成物を形成するための材料と組み合わせられた、DNAもしくはRNAであってもよい。「オリゴヌクレオチド」は、アンプリマー、プライマー、オリゴマー、要素及びプローブという用語と実質的に同等である。用語「プローブ」は、標的配列とハイブリダイズして、ポリヌクレオチドプローブ／標的複合体を形成できる、ポリヌクレオチド配列を意味する。「標的ポリヌクレオチド」は、ポリヌクレオチドプローブが、それとの塩基対合によってハイブリダイズすることができる、ヌクレオチドの連鎖を意味する。ある場合には、配列は、整列させたときに相補的である（誤対合がない）。別の場合には、10%以内の誤対合が存在し得る。

10

【0102】

DNA又はRNAは、当業者には周知である数多くの方法のいずれによってもサンプルから単離することができる。例えば、核酸の精製法は、Tijssen, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology: Hybridization With Nucleic Acid Probes, pt. I. Theory and Nucleic Acid Preparation (Elsevier, New York, N. Y., 1993)に記載されている。「サンプル」は、その最も広い意味で用いられる。ポリヌクレオチド又はポリペプチドを含有するサンプルは、体液；細胞、染色体、細胞小器官、細胞から単離された膜からの抽出物；溶液中のか、又は基質に結合したゲノムDNA、RNAもしくはcDNA；細胞；組織；組織プリントなどであることができる。

20

【0103】

総RNAは、TRIZOL試薬 (Life Technologies, Gaithersburg, MD、米国) を用いて単離することができ、mRNAは、オリゴd (T) カラムクロマトグラフィー又はガラスビーズを用いて単離することができる。これに代えて、標的ポリヌクレオチドがmRNAに由来するときは、mRNAから逆転写されたcDNA、該cDNAから転写されたRNA、該cDNAから増幅されたDNA、増幅されたDNAから転写されたRNAなどであることができる。標的ポリヌクレオチドがmRNAがDNAに由来するときは、標的ポリヌクレオチドは、DNAから増幅されたDNA、又はDNAから逆転写されたRNAであることができる。

30

【0104】

いくつかの技術が、電気泳動分析、例えば二重制限酵素消化をプライマーの同調と組み合わせる方法 [例えば、ヨーロッパ特許第0 534 858 A1号公報参照]、又は規定されたmRNA末端に最近の部位を有する制限フラグメントを選ぶ方法 [例えば、Prashar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 659-663 (1996) 参照] 向けの、限定された複雑性を有する制限フラグメントのプールを形成する。その他の方法は、cDNAを、例えば十分な塩基を（各cDNAを特定するために多数のcDNAのそれぞれでか、又は規定されたmRNA末端に関して公知の位置で生成された短いタグを配列決定することによって）配列決定することによって、統計的にサンプリングする [例えば、Velculescu, Science 270: 484-487 (1995) を参照されたい]。

40

【0105】

RNAの存在量及び活性を改変する方法は、現在、三つの分類群、すなわちリボザイム、アンチセンス種 [PCT特許第WO 88/09810号公報]、及びRNAアプタマー

50

[Good et al., Gene Therapy, 4: 45-54 (1997)] に属する。リボザイムは、RNA切断反応を触媒できるRNAである[PCT特許第WO 90/11364号公報]。リボザイム法は、例えば、そのような小さいRNAリボザイム分子に、細胞を接触させ、細胞での発現を誘導することなどを必要とする[Grassi & Marini, Annals of Medicine, 28: 499-510 (1996); Gibson, Cancer and Metastasis Reviews, 15: 287-299 (1996)]。

【0106】

用語「アンチセンス」は、本明細書に用いられる限りで、特定の核酸配列の「センス」鎖に相補的である核酸配列を含むいかなる組成物も意味する。アンチセンス分子は、合成又は転写を包含する、いかなる方法によって生成してもよい。細胞内に導入されたならば、相補的ヌクレオチドが、細胞によって産生された天然の配列と組み合わせて、デュプレックスを形成し、転写又は翻訳のいずれかを遮断する。呼称「陰性の」は、アンチセンス鎖を意味することがあり、呼称「陽性の」は、センス鎖を意味することがある。

10

【0107】

オリゴヌクレオチドは、当技術に公知の標準的な方法によって、例えば、自動化されたDNA合成装置(例えばBiosearch, Applied Biosystems等々から商業的に入手できるもの)の使用によって合成してよい。

【0108】

「増幅」は、本明細書に用いられる限りで、核酸配列の追加的コピーの精製に関連する。増幅は、一般的には、当技術に周知のポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を用いて実施する。例えば、Dieffenbach, C. W. & Dveksler, G. S., PCR Primer, a Laboratory Manual, 1-5 (Cold Spring Harbor Press, Plainview, N. Y., 1995)を参照されたい。増幅は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、リガーゼ連鎖反応(LCR)、核酸配列依拠増幅(NASBA)又はT7依拠RNA増幅であることができる。

20

【0109】

「ポリペプチド」は、天然に産すると、合成によるとを問わず、アミノ酸、アミノ酸配列、オリゴペプチド、ペプチド、又はタンパク質もしくはその部分を意味する。

【0110】

タンパク質活性を直接測定する方法は、当業者に周知である。そのような方法は、例えば、該タンパク質に対する抗体リガンドを有することに依存する方法、例えばウエスタンブロット分析を包含する[例えば、Burnette, A. Anal. Biochem., 112: 195-203 (1981)参照]。そのような方法は、最も良く研究されているタンパク質薬物標的のために利用できる。タンパク質の検出は、抗体によって達成することができる(実施例参照)。

30

【0111】

用語「抗原決定基」は、本明細書に用いられる限りで、特定の抗体と接触させる、分子のフラグメント(すなわちエピトープ)を意味する。タンパク質、又はタンパク質のフラグメントを用いて、宿主動物を感作するとき、タンパク質の非常に多くの領域が、抗体の生成を誘導し、それらが抗原決定基(タンパク質の与えられた領域又は三次元構造)に特異的に結合することがある。抗原決定基は、抗体との結合について、未処理抗原(すなわち、免疫応答を誘導するのに用いられる免疫原)と競合し得る。

40

【0112】

充実腫瘍幹細胞の富化された集団から単離されたか、又は充実腫瘍幹細胞から単離されたタンパク質は、二次元ゲル電気泳動系によって分離することができる。二次元ゲル電気泳動は、当技術に周知であり、代表的には、一次元による等電点電気泳動、次いで二次元によるSDS-PAGE電気泳動を含む。例えば、Hames et al., Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach (IRL Press, New York 1990); Lander, Sc

50

ience, 274: 536-539 (1996) を参照されたい。得られた電気泳動図は、質量分析法の手法、ポリクローナル及びモノクローナル抗体を用いる、ウエスタンブロット分析及び免疫ブロット分析、ならびに内部及びN末端微細配列決定を包含する、数多くの手法によって分析することができる。これらの手法を用いて、薬物に接触させた細胞（例えば充実腫瘍幹細胞）、又は例えば特定の遺伝子の欠失もしくは過剰発現によって改変された細胞を包含する、与えられた生理学的条件下で生成されたすべてのタンパク質の、実質的な画分を特定することができる。

【0113】

cDNAライブラリー

純化された充実腫瘍幹細胞、充実腫瘍幹細胞後代、非腫瘍形成細胞、及び未分画腫瘍細胞は、潜在的な新奇薬物の標的を特定するために、当技術に公知の方法を用いて、アレー又はcDNAライブラリーを作成することができる [Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989); Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., eds, (Wiley Interscience, New York, 1989) を参照されたい]。 10

【0114】

分子生物学は、核酸及びタンパク質の分析のための非常に様々な手法を含み、その多くは、臨床的診断アッセイの基盤を形成する。これらの手法は、核酸ハイブリダイゼーション分析、制限酵素分析、遺伝学的配列分析、ならびに核酸及びタンパク質の分離及び精製を包含する [Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989)]。多くの分子生物学的手法は、非常に多くのサンプルに対する数多くの操作を実施することを含む。本発明に役立つゲノム学その他の分子生物学的方法に対する指針については、Birren et al., Genome Analysis: A Laboratory Manual Series, Vol. 1, Analyzing DNA (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, 1998); Birren et al., Genome Analysis: A Laboratory Manual Series, Vol. 4, Mapping Genomes (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, 1999) を参照されたい。 20 30

【0115】

核酸ハイブリダイゼーション分析は、一般的には、大量の非標的核酸の間の非常に少数の特定の標的核酸（DNA又はRNA）の、プローブによる検出を必要とする。複数サンプルの核酸ハイブリダイゼーション分析が、様々なフィルター及び固相支持体の体裁で実施されている。「ドットブロット」ハイブリダイゼーションは、標的DNAを、フィルターに非共有結合で付着させ、次いで標識化されたプローブとハイブリダイズすることを含む。「ドットブロット」ハイブリダイゼーションは、多重分析のため [ヨーロッパ特許第0 228 075号公報]、ならびに重複クローンの検出、及びゲノム地図の作成 [米国特許第5, 219, 726号明細書] のためにさらに開発されている。もう一つの体裁、いわゆる「サンドイッチ」ハイブリダイゼーションは、オリゴヌクレオチドプローブを固相支持体に共有結合で付着させ、それを用いて、複数の核酸標的を捕捉かつ検出することを含む [米国特許第4, 751, 177号明細書; 国際公開特許第90/01564号公報]。これらの体裁の多重項翻案は、「逆ドットブロット」と呼ばれる。 40

【0116】

感受性リポーター基（酵素、発蛍光団、放射性同位元素等々）、及び関連する検出系（フルオロメーター、ルミノメーター、光量子計、シンチレーション計数管等々）を用いた、シグナルを増幅する方法が、当技術に公知である。これらの方法を、増幅方法、例えばポ 50

リメラーゼ連鎖反応（PCR）と併用して、標的核酸配列を増幅することができる。例えば、PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, (Academic Press, 1990)を参照されたい。

【0117】

マイクロアレー

ある面では *in situ* ハイブリダイゼーションを模倣して、マイクロ体裁とした多重又はマトリックス装置（例えばDNAチップ）で複数サンプル核酸ハイブリダイゼーション分析を実施するための、新たな手法が開発されている [Barinaga, Science, 253: 1489 (1991); Bains, Bio/Technology, 10: 757-758 (1992) 参照]。マイクロアレーの使用についての指針は、Wang, E. et al., Nature Biotechnology, 18: 457-459 (2000); Diehn, M. et al., Nature Genetics, 25: 58-62 (2000) によって与えられる。 10

【0118】

マイクロアレーは、当技術に公知であり、遺伝子産物（例えば、cDNA、オリゴヌクレオチド、mRNA、cRNA、ポリペプチド、及びそれらの断片）に配列が対応するプローブを特異的にハイブリダイズするか、又は既知の位置で結合する表面からなる。一実施態様では、マイクロアレーは、各位置が、遺伝子（例えば、タンパク質又はRNA）によってコードされる産物に対する不連続な結合部位を表し、結合部位が、生物のゲノム内の遺伝子の大半又はほとんどすべての産物に対して存在する、アレー（すなわちマトリックス）である。 20

【0119】

ポリヌクレオチド、ポリペプチド又は類似体を、ガラス、プラスチック（例えばポリプロピレン、ナイロン）、ポリアクリルアミド、ニトロセルロース、その他の材料から製造され得る、固相支持体又は基板に付着させる。「基板」は、ポリヌクレオチド又はポリペプチドを結合する、適切ないかなる剛体又は半剛体の支持体をも意味し、膜、フィルター、チップ、スライド、ウェーファ、繊維、磁性もしくは非磁性ビーズ、ゲル、毛細管その他の管材、プレート、重合体、及び微粒子を包含して、ウェル、溝、ピン、チャンネル及び細孔を包含する様々な表面形態を有する。ポリヌクレオチドは、当技術に公知のいかなる方法によっても、基板上に固定化することができる。好ましくは、基板は、光学的に透明である。 30

【0120】

生物学的高分子のアレー、例えば核酸分子又はタンパク質のアレーを製造するための、様々な方法が利用可能である。DNAの規則正しいアレーを多孔膜に作成する一つの方法は、「ドットプロット」又は「スロットプロット」法である。フラグメントの規則正しいアレーを作成するために用いられる、より効率的な手法は、ウェル、例えば微量滴定プレートの96のウェルに浸漬した一連のピンを用いて、一連のサンプルを基板、例えば多孔膜に移転することである。核酸配列の規則正しいアレーを形成する、これに代わる方法は、米国特許第5,143,854号明細書（Pirrungに）、及びFodorら [Science, 251: 767-773 (1991)] が記載している。この方法は、異なる核酸配列を支持体の別個の異なる領域で合成する工程を含む。Khrapkoら [DNA Sequence, 1: 375-388 (1991)] は、DNAをポリアクリルアミドの薄層に、マイクロピペットを用いて手動で、オリゴヌクレオチドマトリックスを作成する方法を記載している。米国特許第5,807,522号明細書（Brownらに、参照により組み込まれる）は、既知量の試薬をアレーの選ばれた位置のそれぞれに、規定量の液体を支持体に引き出すのに効果的な条件下で、毛細管の分与装置から支持体に取り出すことによって分与することによって、生物学のサンプルのマイクロアレーを製作する方法を記載している。 40

【0121】

スポッターは、ピン、インクジェットその他の技術を用いて、サンプルを支持体材料上に 50

置くことができる。より一般的な方法のいくつかは、固体又はスプリットのいずれかであることができる、金属ピンを用いる。問題の化合物を含むウェルにピンを浸したとき、それぞれが、少量の材料を引き上げる。次いで、ピンを固相支持体に接触させ、ナノリットルの量を望みの位置に分与する。スプリットピン（別にキル：羽（ペン）として知られる）では、ピンの頭に切り込まれたスロットが、点滴しようとする化合物に対する貯留槽として機能する。キルピンは、ガラススライドとともに用いられることが最も多いが、固体ピンは、代表的には、膜を点滴するのに用いられる。Amersham、Pharmacia、Biotech、GeneMachinesその他の企業が、点滴用ロボットを提供している。

【0122】

インクジェットの技術は、マイクロアレーを点滴するもう一つの方法を提供する。印刷機業界から適応され、バイオテクノロジーの用途に用いよう再設計されて、これは、圧電結晶発信器及び電極案内装置系を用いて、化合物をスライド又は膜上の精密な位置に置く。Cartesian Technologies及びProtoGene Laboratoriesのような企業がこの技術を用いている。

【0123】

核酸を表面に付着させる方法は、PCT刊行物の国際公開特許第95/35505号公報；DeRisi et al., Nature Genetics, 14: 457-460 (1996)；Shalon et al., Genome Res., 6: 639-645 (1996)；及びSchena et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 10614-10619 (1995)によって一般的に記載されているとおり、ガラスプレートに印刷することによる。マイクロアレーを製作するもう一つの方法は、高密度オリゴヌクレオチドアレーを作成することによる。規定された配列に相補的な数千のオリゴヌクレオチドを含むアレーを、in situ合成向けの写真平版法の手法を用いて、ある表面の規定された位置に形成する手法が、公知である[Fodor et al., Science, 251: 767-773 (1991)；Pease et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 5022-5026 (1994)；Lockhart et al., Nature Biotech, 14: 1675 (1996)；米国特許第5, 578, 832号及び第5, 510, 270号明細書（それぞれ、参照により組み込まれる）を参照されたい]。

【0124】

米国特許第6, 110, 426号明細書（Shalonらへの）は、大規模スクリーニングアッセイ向けの生物学的サンプルのマイクロアレー、例えば、遺伝学的研究及び診断的用途のためのDNAハイブリダイゼーションアッセイに用いようとする、DNAサンプルのアレーを製作する方法及び装置を開示している。米国特許第6, 221, 674号明細書（Slukaらへの）は、空間的に規定された試薬部域を固相に適用するための、記載された方法を開示していて、それは、吸着性の結合試薬を含有する液体を、連続的な金属又は金属酸化物表面を基本的に含む、固相の空間的に規定された部域に、試薬と固相との吸着性結合の形成を可能にするのに適切な時間、接触させることを特徴とする。PCT特許第WO 92/10092号公報には、光反応性化合物とマスクを用いた照射とによって、ガラス支持体上に異なる複数の構造を形成するのに用いることができる方法が記載されている。米国特許第4, 877, 745号明細書には、異なって官能化された斑点を、インクジェット法によってプラスチック支持体に与える方法が記載されている。

【0125】

マイクロアレー及びマイクロアレー技術の使用の販売者のうちには、Affymetrix, Inc.（米国）、NimbleGen Systems, Inc.（Madison, Wisconsin、米国）、及びIncyte Genomics（米国）：大型の産業及び学術的部門の中核施設向けのマイクロアレーを製造；Agilent Technologies（米国）及びGraffinity Pharmaceutica

10

20

30

40

50

l Design, GmbH (ドイツ国) : 個人研究者が設計かつ使用する、印刷及び指紋採取用アレーのような特定の役務を提供) ; ならびに CLONTECH Laboratories (Becton Dickinson Bioscience) 及び BioRobotics, Ltd. (英国) : 個人研究者が、印刷を包含する、マイクロアレー製造の全工程を実施するのに必要な基礎的手段を提供) がある。Gwynne, P. & Heebner, G. "DNA Chips and Microarrays", Science (2001) を参照されたい。

【0126】

プラスチック表面とは対照的に、金属及び金属酸化物表面は、自己集合の手法によって、厳密に規定されたマトリックス層で塗装することができるという利点を有する。自己集合した単層 (SAM) は、例えば、有機アルキルチオールが金表面に吸着されたときに形成され、そのような稠密に充填された単層の自発的組織化は、支持材料と吸着剤との強い特異的相互作用に基づく [Nuzzo et al., J. Am. Chem. Soc., 105: 4481 (1983)]。このようにして、結合マトリックスの厳密に規定された単層を、例えば金又は銀のような金属の表面に貼付することができる。さらに、自己集合した固相の特異的結合容量は、EP-A-0 515 615 に記載されたような特異的固相反応物の希釈によって、さらに最適化することができる。

10

【0127】

自己集合した単層に基づく微細構造による金属表面の塗装も公知であり、充実腫瘍幹細胞から単離された構成要素を付着させるのに用いることができる。Whitesidesら [Langmuir, 10 (1994) 1498-1511] は、微細構造化した特別シリコンスタンプを用いて、試薬を貴金属表面に押捺する方法を記載している。これは、微細構造化された単層が、互いに空間的に分離された帯域を有して生成されるのを可能にする。貴金属表面の自己集合した単層の微細構造は、その全域をチオールで塗装した基板をマスク越しに照射し、次いで洗浄することによって形成することができる [Hemminger et al., Langmuir, 10: 626-628 (1994)]。すべて同一に官能化された、空間的に分離された帯域も、この過程で形成される。試薬の斑点を形成できる追加的な可能性は、初めに、既に互いに空間的に分離された支持体に金の斑点を与え、次いで、試薬で塗装することである。

20

【0128】

本発明による官能化された固相マトリックスとの分析対象物の結合は、例えば共焦点スキャナー蛍光顕微鏡又はプラズモン共鳴分光学によって、検出することができる [Ruthenhausler, B. et al., Nature, 332: 615-617 (1988)]。

30

【0129】

米国特許第6, 228, 659号明細書は、開示された、試薬領域の複数のアレーを形成する装置を記載している。装置中の分与集成材は、基板の異なるアレー領域の選ばれた位置に、試薬を蓄えるために隔てられた複数のヘッドを有する。

【0130】

転写体アレーは、細胞内の転写状態を分析し、特に等級付きレベルの問題の治療法、例えば、等級付きレベルの問題の薬物、又は等級付きレベルの問題の疾患状態に接触させた細胞の転写状態を測定するのに用いることができる。一実施態様では、細胞内に存在する mRNA 転写体を表す、検出できるように標識化されたポリヌクレオチド (例えば、総細胞 mRNA から合成された、蛍光標識化された DNA) を、マイクロアレーとハイブリダイズすることによって、転写体アレーを生成する。これに代わる実施態様では、cDNA 又は RNA プロブは、検出できる標識の不在下で合成することができ、次いで、例えば、ビオチニル化 dNTP もしくは rNTP を組み込むことによってか、又は何らかの類似の手段 (RNA とのビオチンのスポラレン誘導体の光架橋結合) によって、標識化し、次いで、標識化されたストレプトアビジン (例えばフィコエリトリンを結合したストレプトアビジン) もしくは等価物を加えてよい。プロブに対する標識は、ビオチン、蛍光体、放

40

50

放射性物質及び酵素の標識からなる群から選ばれる。蛍光標識化したプローブを用いるときは、フルオレセイン、リサミン、フィコエリトリン、ローダミン (Perkin Elmer Cetus)、Cy2、Cy3、Cy3.5、Cy5、Cy5.5、Cy7、Fluor X (Amersham) その他を包含する、適切な多くの発蛍光団が公知である [例えば、Kricka, Nonisotopic DNA Probe Techniques (Academic Press, San Diego, Calif., 1992) を参照]。発蛍光団の対は、明確な放射スペクトルを有するために、容易に識別されるよう選ぶことが、理解されると思われる。もう一つの実施態様では、蛍光標識以外の標識を用いる。例えば、明確な放射スペクトルを有する放射性標識、又は一対の放射性標識を用いることができる [Zhao et al., Gene, 156: 207 (1995); Pietu et al., Genome Res., 6: 492 (1996) を参照; 実施例 21 も参照されたい]。例えば、 ^{32}P を用いることができる。 10

【0131】

転写体を付着させるこれらの方法は、通常、特定のポリヌクレオチド配列を、固相支持体の非常に小さい特定の部域、例えば DNA チップのマイクロウェルに付着させる。これらのハイブリダイゼーションの体裁は、慣用の「逆ドットプロット」及び「サンドイッチ」ハイブリダイゼーション系のマイクロ規模の翻案である。マイクロ体裁のハイブリダイゼーションは、「ハイブリダイゼーションによる配列決定」を実施するのに用いることができる [Barinaga, Science, 253: 1489 (1991); Bains, Bio/Technology, 10: 757-758 (1992) を参照]。ハイブリダイゼーションによる配列決定は、可能なすべての n-ヌクレオチドオリゴマー (n 量体) を利用して、未知の DNA サンプル中の n 量体を特定し、次いで、アルゴリズム解析によって整列させて、DNA 配列を生成する [米国特許第 5, 202, 231 号明細書を参照; 英国特許第 88 10400 号公報 (1988); Southern et al., Genomics, 13: 1008 (1992); Fodor et al., Nature, 364: 555-556 (1993); Fodor et al., Science, 251: 767-773 (1991); 米国特許第 5, 143, 854 号明細書も参照されたい]。 20

【0132】

プローブは、化学的なカップリングの手順、及び圧電式印刷装置、例えば PCT 刊行物の WO 95/251116 (Baldeschweiler et al.) に記載されたそれを用いて、全体としてか、又は部分として、基板の表面に合成することができる。これに代えて、プローブを、試薬をいつ加えるかを制御する自己指向性電子装置を用いて、基板表面に合成することもできる [米国特許第 5, 605, 662 号明細書]。 30

【0133】

さらに、プローブは、基板に直接結合する必要はなくて、リンカー基を介して基板に結合することができる。リンカー基は、代表的には、約 6~50 原子長出会って、付着したポリヌクレオチドプローブとの接触を与える。好適なリンカー基は、エチレングリコールオリゴマー、ジアミン、二価酸などを包含する。基質表面の反応基は、リンカーの末端部分の一方と反応して、リンカーを基板に結合する。次いで、リンカーの他方の末端部分を、ポリヌクレオチドプローブを結合するよう官能化する。 40

【0134】

材料のアレーをチップ又は基板上に形成し、それを用いるための装置及びコンピュータシステムは、公知である。例えば、PCT 国際特許出願の WO 92/10588 及び WO 95/11995 (ともに、引用により本明細書に組み込まれる) は、核酸その他の材料の配列決定又は配列チェックの手法を記載している。これらの操作を実施するためのアレーは、例えば、米国特許第 5, 445, 934 号、第 5, 384, 261 号及び第 5, 571, 639 号明細書 (それぞれ、引用により本明細書に組み込まれる) に開示された、先駆的な手法の方法によるアレーとして形成することができる。ペプチド、ポリヌクレオチドその他の重合体配列の高密度アレーを短時間のうちに形成する、改良された方法が、 50

組合せ固相合成を用いて案出されている。超大規模固定化重合体合成 (VLSIPS) 技術は、組合せ固相重合体合成を大幅に進歩させ、GENECHIP (登録商標) の名称で販売されているもの [Kozal et al., Nature Medicine, 2 : 753-759 (1996)] のような、デオキシリボ核酸 (DNA) アレーチップの臨床的応用への道を整備した。VLSIPS 技術は、米国特許第 5, 143, 854 号明細書、PCT 国際特許出願の WO 90/15070、WO 92/10092 及び WO 95, 11995 ; ならびに Fodor et al., Science, 251 : 767-777 (1991) に開示されている。

【0135】

核酸ハイブリダイゼーション及び洗浄の条件は、プローブが特定のアレー部位に「特異的に結合する」か、又は「特異的にハイブリダイズする」ように、すなわち、プローブが、相補的核酸配列を有する配列アレー部位にハイブリダイズ、二本鎖化又は結合するが、相補的でない核酸配列を有する部位とはハイブリダイズしないように選ぶ。本明細書に用いられる限りで、一つのポリヌクレオチド配列は、ポリヌクレオチドの不足が 25 塩基以下ならば、標準的な塩基対合規則を用いて、誤対合が皆無であるか、ポリヌクレオチドの不足が、25 塩基より長いならば、5% を越える誤対合が皆無であるときに、もう一つに相補的であると考えられる。好ましくは、ポリヌクレオチドは、完全に相補的である (誤対合が皆無である)。特定のハイブリダイゼーション条件が、負の対照を含むハイブリダイゼーションアッセイを実施することによって特異的なハイブリダイゼーションを招くことは、容易に立証することができる。最適のハイブリダイゼーション条件は、標識化された 20 プローブ、及び固定化されたポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドの長さ (例えば 200 塩基より長いポリヌクレオチドに対してのオリゴマー) 及び種類 (例えば RNA、DNA、PNA) に依存するであろう。核酸に対する特定の (すなわち緊縮) ハイブリダイゼーション条件のための一般的パラメータは、Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York 1987) に記載されている。役立つハイブリダイゼーション条件は、例えば、Tijssen, Hybridization With Nucleic Acid Probes, (Elsevier Science Publishers, B. V., 1993) 及び Kricka, Nonisotopic DNA Probe Techniques, (Academic Press, San Diego, Calif., 1992) でも与えられる。

【0136】

細胞の RNA に相補的な cDNA を作成し、適切なハイブリダイゼーション条件下でマイクロアレーとハイブリダイズしたときは、特定のいかなる遺伝子にも相当する、アレー内の部位とのハイブリダイゼーションのレベルは、該遺伝子から転写された RNA の細胞内での普及率を反映することになる。例えば、(例えば発蛍光団により) 検出できるよう標識化された、総細胞 mRNA に相補的な cDNA を、マイクロアレーとハイブリダイズしたとき、細胞内で転写されない遺伝子 (すなわち、該遺伝子の産物に特異的に結合できる) に相当する、アレー上の部位は、シグナル (例えば蛍光シグナル) を僅かしか、又は全く保有せず、それにコードされた mRNA が普及している遺伝子は、比較的強いシグナルを有することになる。

【0137】

米国特許第 6, 183, 968 号明細書 (Bandman らへの) は、マイクロアレーのハイブリダイズできるアレー要素として用いることができるポリヌクレオチドプローブを開示していて、ヌクレオチドプローブは、それぞれ、細胞増殖に関連するタンパク質、又は受容体をコードしている遺伝子の少なくとも一部を有する。

【0138】

蛍光標識化されたプローブを用いるときは、転写体アレーの各部位での蛍光放射を、好ましくは、走査共焦点レーザー顕微鏡によって検出することができる。一実施態様では、適

切な励起ラインを用いて、用いられた2種類の発蛍光団のそれぞれについて、別個の走査を実施する。これに代えて、2種類の発蛍光団に特異的な波長での同時標本照明を許す、レーザーを用いることができ、2種類の発蛍光団からの放射を、同時に分析することができる [Shalon et al., Genome Research, 6: 639-645 (1996)] を参照]。シグナルは、コンピュータによって、商業的に入手できる方法を用いて記録し、好ましくは分析する。米国特許第5,840,484号明細書に記載された発明の存在量選別プログラムは、特定された遺伝子のそれぞれに対応するmRNA転写体を、作表し、頻度によって分類するのに用いることができる。ポリヌクレオチド配列のいくつかは、発現レベルのみに基づいて特定されることから、充実腫瘍幹細胞における特定の遺伝子の機能を先験的に知ることは、不可欠ではない。

10

【0139】

転写体の画像の比較は、当業者には周知の方法によって得ることができる。転写体のレベル及び画像は、例えば、アレー化されたDNAクローンの定量的ハイブリダイゼーション [Nguyen et al., Genomics, 29: 207-216 (1995)]、遺伝子発現の系統的分析 (SAGE) の技術 [Velculescu et al., Science 270: 484-487 (1995)]、ポリメラーゼ連鎖反応 [Peng et al., Science, 257: 967-971 (1992)]、示差増幅プロトコル [米国特許第5,545,522号明細書]、又は電子的分析、例えば比較遺伝子転写体分析 [米国特許第5,840,484号明細書] 又はGEMTOOL S遺伝子発現解析プログラム (Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, Calif., 米国) に基づく、示差遺伝子発現アッセイによって、入手かつ比較することができる。好ましくは、二つ又はそれ以上の転写体像の比較は、電子的に実施する。

20

【0140】

米国特許第6,215,894号明細書は、バイオチップアレーを走査するためのシステムであって、各アレーについて記録される独自の画像アレー特定機構と、各特定機構に対応し、該特定機構によって特定されるアレー内の実験のパラメータを内容する、コンピュータ記憶された記録とを含むシステムを開示している。このシステムは、さらに、プロトコルライブラリーにアクセスして、特定されたアレーに関連する走査プロトコルを検索し、次いで、それぞれのプロトコルに従ってアレーを走査するための手段を含む。得られた、スキャナーが生成した画像マップは、関連付けられた特定機構に対応する位置に記憶される。

30

【0141】

翻訳状態の測定は、いくつかの方法に従って実施し得る。例えば、タンパク質の全ゲノム追跡 (すなわち「プロテオーム」) は、細胞ゲノムがコードしている複数のタンパク質種に特異的な、固定化された、好ましくはモノクローナルの抗体を結合部位が含む、マイクロアレーの構築によって実施することができる。

【0142】

マイクロアレーの使用

上記のマイクロアレーは、充実腫瘍癌の診断、予後及び治療の様式、薬物の発見及び開発、毒物学的及び発癌性研究、法医学、薬理ゲノム学などを包含する、いくつかの用途に用いることができる。

40

【0143】

一実施態様では、マイクロアレーは、疾患の進行を追跡するのに用いられる。内科医は、健康組織と癌性組織との遺伝子発現の相違を、患者からの充実腫瘍幹細胞と比較した遺伝子発現のパターンの変化を分析することによって、査定し、分類することができる。したがって、癌は、患者が発症する前の初期段階で診断することができる。本発明は、治療の効能を追跡するのに用いることもできる。公知の副作用を有するいくつかの治療に対して、マイクロアレーは、治療様式を「微調整する」のに用いられる。遺伝子発現パターンの、成功裡の治療を示す変化を生起する投与量が、確定される。望ましくない副作用に付随

50

する発現パターンは、回避される。このアプローチは、患者が不適切な改善を示すか、副作用を表すのを待ってから、治療の経路を変更するよりも、敏感かつ迅速であり得る。

【0144】

これに代えて、疾患を模倣する、患者のではなく動物のモデルを用いて、特定の疾患又は状態に付随する発現プロファイルを特性記述することもできる。この遺伝子発現データは、患者における疾患の経路を診断かつ追跡すること、干渉のための遺伝子標的を決定すること、及び新奇な治療様式を試験することに役立つ可能性がある。

【0145】

また、研究者は、大量の候補薬物分子を迅速にふるい分け、既知の治療薬のそれに類似する発現プロファイルを形成するものを、同じ発現プロファイルを有する分子は、同様に、類似の治療効果を有するとの期待とともに待つために、マイクロアレーを用いることができる。すなわち、本発明は、薬物の分子的作用様式を決定するための手段を与える。

【0146】

米国特許第6, 218, 122号、第6, 165, 709号及び第6, 146, 830号明細書（すべてFriendらへの）は、(i) 野生型細胞に対する薬物の効果、(ii) 野生型細胞に対する、推定される薬物の標的に対する改変の効果、及び(iii) 推定される薬物の標的が改変された野生型細胞に対する、薬物の効果を比較することによって、細胞内の薬物の標的を特定する方法を開示している。様々な実施態様で、細胞に対する効果は、遺伝子発現、タンパク質存在量、タンパク質活性の測定、又はそのような測定の組合せによって決定することができる。様々な実施態様で、細胞内の推定される標的に対する改変は、該標的をコードしている遺伝子に対する改変、該標的をコードしているRNAの存在量に対する改変、標的タンパク質の存在量に対する改変、又は標的タンパク質の活性に対する改変によって実施することができる。本発明は、より精密な薬物発見プログラムのための、薬物発見のこれらの方法の改良を、腫瘍形成性の充実腫瘍幹細胞を提供することによって提供する。

【0147】

「発現プロファイル」は、細胞の生物学的状態の態様を示す、複数の細胞成分の測定を含む。そのような測定は、例えば、RNA又はタンパク質の存在量もしくは活性レベルを包含し得る。対象とされる細胞の生物学的状態の態様、例えば、転写状態、翻訳状態、又は活性状態を測定する。これらの、場合によりグラフで表された測定の収集は、「診断プロファイル」と呼ばれる。細胞の、診断プロファイルで測定されたのと類似する生物学的状態の態様、例えば転写状態は、類似被験者、又は既知の相関する疾患状態に応答するか、又は治療効果を追跡しようとするならば、既知の相関する治療効果に応答する被験者で測定される。これらの、場合によりグラフで表された測定の収集は、本明細書では、「応答プロファイル」と呼ぶ。応答プロファイルを補間して、測定されたタンパク質活性の範囲内のすべてのタンパク質活性のレベルについて、応答プロファイルを予測する。治療効果を追跡しようとする場合、応答プロファイルは、有益な効果、不都合な効果、例えば毒性効果、又は有益と不都合との双方の効果と相関させ得る。

【0148】

一般的に認識されているとおり、タンパク質活性は、タンパク質存在量から得られ；タンパク質存在量は、mRNAの翻訳から得られ（タンパク質分解と均衡させる）；mRNA存在量は、DNAの転写から得られる（mRNA分解と均衡させる）。そのため、細胞DNA成分に対する遺伝子レベルの改変は、転写mRNAの存在量、翻訳されたタンパク質の存在量、及び最終的にはタンパク質活性を変更する。RNAレベルの改変は、同様に、RNA存在量、ならびにタンパク質の存在量及び活性を変更する。タンパク質レベルの改変は、タンパク質の存在量及び活性を変更する。最後に、タンパク質活性の改変は、最も標的とされる改変の方法である。一般的に認識されているとおり、細胞の形質転換及び効果を生じるのは、最終的には、タンパク質活性（及び触媒として活性を有するRNAの活性）である。また、ほとんどの薬物は、タンパク質活性を変更することによって作用する。

10

20

30

40

50

【0149】

一実施態様では、異なる二つの型の細胞（一方は、本発明の充実腫瘍幹細胞）からの cDNA を、マイクロアレーの結合部位とハイブリダイズさせる。（例えば薬物に応答しての）治療効果の場合、一方の細胞を治療法に接触させ、同じ型の別の細胞は、治療法に接触させない。疾患状態の場合は、一方の細胞が、特定のレベルの疾患状態を示し、同じ型の別の細胞は、疾患状態（又はそのレベル）を示さない。二つの細胞型のそれぞれに由来する cDNA を、区別できるよう、異なって標識化する。例えば、一実施態様では、薬物を投与した（又は経路の混乱に接触させた）細胞からの cDNA を、フルオレセイン標識化 dNTP を用いて合成し、第二の、薬物接触させない細胞からの cDNA を、ローダミン標識化 dNTP を用いて合成する。2 種類の cDNA を混合し、マイクロアレーとハイブリダイズさせ、cDNA セットのそれぞれからのシグナルの相対強度を、アレーの各部位について決定し、特定の mRNA の存在量の相対的ないかなる差も検出する。二色の蛍光標識化、及び検出要綱を用いて、遺伝子発現における変更を定義することが、例えば、Shena et al., Science 27; 467-470 (1995) に記載されている。異なる 2 種類の発蛍光団で標識化した cDNA の利点は、二つの細胞状態にあるアレーに配列した遺伝子のそれぞれに応答する mRNA レベルの、制御された比較を直接、内部的に実施することができ、実験条件（例えばハイブリダイゼーション条件）の僅かな差による変動が、その後の分析に影響しないことである。追加の指針は、実施例 21 に与えられる。

10

【0150】

癌細胞内の一定の配列の発現レベルを測定して、発現がアップ又はダウンレギュレーションされているか否かを決定するための、特定の配列の DNA チップによる癌についての診断アッセイに向けての、米国特許第 6, 194, 158 号明細書 (Kroes らの) がある。DNA 配列のパネルの一つ又はそれ以上の成員とハイブリダイズできるヌクレオチド配列を含む DNA チップは、一般的に利用できる手法を用いて合成し得る。mRNA を、正常な、癌でない細胞と癌細胞とから単離し、パネルからの配列の一つ又はそれ以上の配列を含む DNA チップとハイブリダイズさせる。次いで、利用できる方法のいずれかによって、ハイブリダイゼーションを検出する。そのようにして、癌細胞内で、正常細胞に比して過剰発現又は過少発現される配列が特定される。同様にして、ある化合物に接触させた癌細胞からの mRNA を、DNA チップ上の配列とハイブリダイゼーションさせて、該化合物が特定の配列の発現に影響するか否かを決定し得る。本発明は、mRNA を単離することができる「癌細胞」が、本発明の腫瘍形成性充実腫瘍幹細胞であるという点で、この方法に対する改良を提供する。

20

30

【0151】

純化された幹細胞の遺伝子発現プロファイルは、幹細胞の挙動の分子的機構についての手がかりを与えることができると思われる。Terskikh, A. V. ら [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98 (14): 7934-7939 (2001)] は、造血幹細胞 (HSC) 富化細胞を、正常組織及びマウス神経球 (神経始原細胞を大幅に富化した集団) との、cDNA マイクロアレーの手法、及び in situ ハイブリダイゼーションを用いた、末端分化した神経細胞との比較による比較によって分析して、潜在的な調節遺伝子候補を特定した。本発明は、本発明の充実腫瘍幹細胞の使用が、患者の正常組織（例えば、充実腫瘍の部域からのそれ）と比較したときか、又は充実腫瘍から得られたその他の細胞集団と比較したときに、薬物標的の明確なセットを与えることができるという点で、Terskikh の方法に優る、薬物発見の改良された方法を提供する。

40

【0152】

DNA チップを活用する、米国特許第 5, 744, 305 号；第 5, 733, 729 号；第 5, 710, 000 号；第 5, 631, 734 号；第 5, 599, 695 号；第 5, 593, 839 号；第 5, 578, 832 号；第 5, 556, 752 号；第 5, 770, 456 号；第 5, 753, 788 号；第 5, 688, 648 号；5, 753, 439 号；第

50

5, 744, 306号明細書（すべて、参照によって、その全体が組み込まれる）に記載された方法を包含する、その他いくつかの方法が公知である。米国特許第5, 807, 522号明細書（Brownらへの）は、細胞における、疾患状又は治療法のレベルと相関し、実際のタンパク質の機能又は活性の検出できる変化に先行する、初期変化を追跡する方法を開示している。

【0153】

その上、充実腫瘍幹細胞からのゲノムDNAのマイクロアレーは、単一ヌクレオチド多型（SNP）についてプローブで調べて、細胞を前癌性又は腫瘍形成性にさせる遺伝的突然変異の部位を定位することができる。そのような方法についての指針は、上記の商業的販売者から入手可能であり、一般的には、遺伝学方法の書籍、例えば本明細書に掲載された

10

【0154】

ワクチン

本発明の充実腫瘍幹細胞は、抗癌細胞抗体を誘導するのに用いることができる。一実施態様では、この方法は、充実腫瘍幹細胞、又は単離された充実腫瘍幹細胞の富化された集団を得る工程と；画集団を細胞の複製を阻害するよう処理する（例えば照射によって）工程と；処理された細胞をヒト又は動物の被験者に、充実腫瘍幹細胞に対する免疫応答を誘導するのに有効な量で投与する工程とを含む。注入又は経口投与しようとする細胞の有効量に関する指針については、米国特許第6, 218, 166号、第6, 207, 147号、及び第6, 156, 305号明細書（引用により、本明細書に組み込まれる）を参照されたい。もう一つの実施態様では、この方法は、充実腫瘍幹細胞、又は単離された充実腫瘍幹細胞の富化された集団を得る工程と；腫瘍幹細胞を、*in vitro*培養で、抗体を誘導しようとするヒトの被験者又は宿主動物からの、免疫エフェクター細胞（当技術に公知の免疫学的方法に従って）と混合する工程と、免疫エフェクター細胞を培養体から取り出す工程と、免疫エフェクター細胞を、動物における免疫応答を刺激するのに効果的な用量で、宿主動物に移植する工程とを含む。

20

【0155】

充実腫瘍幹細胞に対するモノクローナル抗体は、培養内の連続細胞系による、抗体分子の産生を与えるいかなる手法も用いて製造し得る。これらは、ハイブリドーマの手法、ヒトB細胞ハイブリドーマの手法、及びEBV-ハイブリドーマの手法を包含するが、これらに限定されない〔例えば、Kozbor, D. et al., J. Immunol. Methods, 81: 31-42 (1985); Cote, R. J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 2026-2030 (1983); 及びCole, S. P. et al., Mol. Cell. Biol., 62: 109-120 (1984)を参照されたい〕。

30

【0156】

加えて、「キメラ抗体」の製造向けに開発された手法、例えばヒト抗体遺伝子に対するマウス抗体遺伝子をスプライスして、適切な抗原特異性及び生物学的活性を有する分子を得ることを用いることができる〔例えば、Morrison, S. L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984); Neuberger, M. S. et al., Nature, 312: 604-608 (1984); 及びTakeda, S. et al., Nature, 314: 452-454 (1985)を参照されたい〕。

40

【0157】

望みの特異性を有する抗体を特定するスクリーニングには、様々な免疫アッセイを用いてよい。確定された特異性を有するポリクローナル又はモノクローナル抗体のいずれかを用いた、競合結合又はイムノラジオメトリックアッセイのための数多くのプロトコルが、当技術に周知である。

【0158】

抗体は、ヒト化抗体であることもできる。用語「ヒト化抗体」は、本明細書に用いられる

50

限りで、非抗原結合領域のアミノ酸配列が、ヒトの抗体に、より密接に近似するよう変更されているが、その本来の結合能力をなおも保持する、抗体分子を意味する。抗体を、免疫原性がより弱くなり、そのため、患者に治療のために投与されたときに、より長く存続するよう、ヒト化する。

【0159】

ヒト抗体は、Abgenix (Fremont, Calif., 米国)からのXeno Mouse (登録商標)の技術を用いて生成することができて、抗体療法に適切である基本的にすべての疾患標的に対する、高親和性の、完全にヒト的な抗体産物候補の生成及び選別を可能にする [米国特許第6, 235, 883号、第6, 207, 418号、第6, 162, 963号、第6, 150, 584号、第6, 130, 364号、第6, 114, 598号、第6, 091, 001号、第6, 075, 181号、第5, 998, 209号、第5, 985, 615号、第5, 939, 598号及び第5, 916, 771号明細書 (それぞれ参照によって組み込まれる); Yang, X-D. et al., Crit. Rev. Oncol. Hematol., 38 (1): 17-23 (2001); Chadd, H. E. & Chamow, S. M., Curr. Opin. Biotechnol., 12 (2): 188-94 (2001); Green, L. L., J. Immunological Methods, 231: 11-23 (1999); Yang, X-D. et al., Cancer Res., 59 (6): 1236-1243 (1999); 及び Jakobovits, A., Advanced Drug Delivery Rev., 31: 33-42 (1998)を参照] 10
。マウス抗体の遺伝子発現が抑制され、ヒト抗体の遺伝子発現と機能的に置き換えられているが、残余のマウス免疫系は、健全なままである、マウスの遺伝子操作された系統を用いて、完全にヒトタンパク質配列を有する抗体を生成する。 20

【0160】

その上、本発明の充実腫瘍幹細胞内又は上に存在するマーカーに対抗する抗体の生成は、薬物開発の標的を特定する方法として用いることができる。充実腫瘍幹細胞に免疫応答して誘導される抗体は、当技術に公知の方法を用いて、充実腫瘍幹細胞上の抗原性タンパク質を特定するのに用いることができ [Harlow, Using Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, 1999)]、 30
さらに、そのようなタンパク質をコーディングするポリヌクレオチドを特定するのに用いることができる [Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989); Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., eds, (Wiley Interscience, New York, 1989)]。特定されさえすれば、タンパク質及びポリヌクレオチドは、癌に関与することが以前に特定された、別のタンパク質及びポリヌクレオチドと比較することができる。一実施態様では、完全にヒト的な抗体を生成するためのXeno Mouseの技術を用いて、薬物開発標的に対抗させた抗体を生成することができる [Jeffrey Krasner, Boston Globe (July 25, 2001) at F4を参照] 40
。本発明は、より精密な薬物開発プログラムに向けて、免疫応答をそれに対して誘導する、腫瘍形成性の充実腫瘍幹細胞を与えることによって、薬物発見のこれらの抗体に基づく方法に対する改良を提供する。

【0161】

マイクロアレーネットワーク

遺伝子発現パターンを体系的に研究するための、上記のcDNAライブラリー及びDNAアレーの手法に加えて、分子生物学の当業者は、マイクロアレー技術の使用についての指針をミシガン大学マイクロアレーネットワークから得ることができる (実施例9も参照) 50
。さらに、ミシガン大学は、マイクロアレーデータの管理及び解析に特定して資金を提供

し、それとともに大学のための新たな生物情報科学センターに資金を提供することによって、生物情報科学に大きく傾倒している。

【0162】

これに代えて、免疫応答を誘導する方法は、本発明の充実腫瘍幹細胞の「幹細胞」の質を利用することができる。動物に免疫応答を誘導するための、充実腫瘍幹細胞、充実腫瘍幹細胞タンパク質抽出物、充実腫瘍幹細胞から精製されたタンパク質、又は充実腫瘍幹細胞からのcDNAの発現に由来するタンパク質（充実腫瘍幹細胞の遺伝的改変については上記を参照されたい）。免疫応答は、標準的な免疫学的方法が示すとおり、癌細胞に対抗させることができる。例えば、充実腫瘍幹細胞（単離細胞の富化された集団）又はタンパク質を、培養内の樹状細胞、培養内の抗原提示細胞、又は培養内の抗原提示細胞及びT細胞に接触させる。次いで、抗原刺激された細胞を、患者に注入して戻す。 10

【0163】

これに代えて、本発明の充実腫瘍幹細胞は、腫瘍幹細胞に対する免疫応答を促進するよう遺伝的に加工することができる。例えば、造血幹細胞を、腫瘍幹細胞抗原を標的とするT細胞受容体を有するよう遺伝的に加工することができる（米国特許第5,914,108号明細書を参照、参照によって組み込まれる）。こうして、腫瘍幹細胞が発現する抗原を認識するT細胞受容体を、特定し、次いで、造血幹細胞にクローニングすることができる。そうして、加工された造血幹細胞を、患者に移植し、生着させて、腫瘍幹細胞を認識する受容体を発現する多数のT細胞を生じさせることができる。腫瘍幹細胞特異的T細胞の数を増加させることによって、抗腫瘍免疫応答を強化することができる。 20

【0164】

腫瘍幹細胞をワクチンの基盤として用いること、腫瘍幹細胞を抗原提示樹状細胞を刺激するために用いること、腫瘍幹細胞を抗腫瘍抗原を生成するための接種材料として用いることを包含する、その他の手段も、抗腫瘍免疫応答を増大させるために利用可能である。腫瘍幹細胞は、腫瘍幹細胞に対する免疫応答を生成することを目的として、患者の腫瘍幹細胞を、例えば照射によって死滅させ、死滅した幹細胞を、生理学的及び免疫学的に許容され得る担体中で患者に投与して戻すことによって、ワクチンとして用いることができる。抗体を乳癌細胞の膜小胞調製品に対して誘導する、米国特許第4,960,716号明細書；抗ヒト乳腺上皮抗体を、脱脂ヒト乳脂肪球の膜画分から製造する、米国特許第4,584,268号明細書を参照されたい、両特許とも、参照によって組み込まれる。 30

【0165】

患者からの樹状細胞は、*in vitro*で培養することができ、同じ患者からの死滅腫瘍幹細胞を、培養に加えて、樹状細胞を刺激することができる。活性化された樹状細胞は、腫瘍幹細胞抗原を提示するが、そうして、患者に再投与して、患者の抗腫瘍応答を刺激することができる。最後に、腫瘍幹細胞は、マウス、ラット、ハムスター、ヤギ、ヒツジ、ウサギ又はロバのような動物に投与して、腫瘍幹細胞に対する抗体を生成することができる。好ましくは、モノクローナル抗腫瘍幹細胞抗体は、マウス、ラット又はハムスターで作成する。次いで、このようにして作成されたモノクローナル抗体は、患者に投与するか、又は初めに（上記のとおり）ヒト化し、次いで患者に投与して、該患者における腫瘍幹細胞に対する免疫応答を促進する。 40

【0166】

さらに、アデノウイルスベクターは、ワクチン開発のための真核細胞への遺伝子移入に特に役立つことが判明している[Graham, F. L. & Prevec, L., in Vaccines: New Approaches to Immunological Problems, Ellis, R. V. ed., 363-390 (Butterworth-Heinemann, Boston, 1992)]。

【0167】

マイクロアレーを走査するためのプローブ

ヒトゲノムの完全な配列決定は、細胞の特定の集団が発現する遺伝子の特定を可能にした。腫瘍幹細胞の富化された集団からのプローブを、当技術に公知の方法を用いて作成する 50

ことができる [Wang et al., Nature Biotechnology 18: 457 (2000) を参照]。腫瘍幹細胞ならびに腫瘍幹細胞後代の集団についての遺伝子発現パターン及びタンパク質発現パターンの分析は、結果を、公知の Gene Pattern Databases、又は公知の Protein Pattern Databases (例えば、PROSITE、PRINTS: Protein Motif Fingerprint Database、BLOCKS、PFAM、DOMO、PRODOMその他のデータベース)と比較することによって実施することができる。検索は、例えば、BCM Search Launcher: General Protein Sequence/Pattern Searches (ベイラー医科大学ヒトゲノム配列決定センター、(One Baylor Plaza, Houston))を用いて、実施することができる。遺伝子及びタンパク質の分析のための商業的に入手できるプログラム (例えばCGC (Genetics Computer Group, Inc. より) 及びDNA STRIDA) も利用できる。

【0168】

腫瘍幹細胞及び腫瘍幹細胞後代の増殖、分化もしくは生存、又は生物学的作用因に対するそれらの応答に關与する因子を、当技術に公知の手法を用いて、腫瘍幹細胞、又は腫瘍幹細胞、非腫瘍形成癌細胞、もしくは正常な腫瘍細胞から、cDNAライブラリーを構成するか、又はマイクロアレーをプローブで調べるかのいずれかによって単離することができる。cDNAを生物学的作用因又は薬物との接触後の異なる集団のいずれからも作成して、そのような操作に対する応答を決定することができる。一つの集団の細胞からのライブラリーを、異なる集団の細胞からのそれと比較して、発生の際の遺伝子発現の順序を決定し、様々な生物学的作用因の効果を明らかにするか、又は癌細胞における遺伝子発現を変更する新たな生物学的作用因を明らかにすることができる。ライブラリーを新生物組織から調製したときは、例えば、癌性組織からのライブラリーを正常組織からのそれと比較することによって、癌細胞増殖の原因に役割を果たす遺伝的要因を特定し得る。この情報は、抗癌療法の設計に用いることができる。加えて、様々な癌の診断に用いるためか、腫瘍発達の特定の段階にある細胞を特定するのに用いるための、プローブを特定することができる。

【0169】

腫瘍の診断及び予後の評価

腫瘍及び転移の診断及び予後の評価、ならびにそのような状態の素質を有する対象者の特定のために、様々な方法を用いることができる。当技術に周知の方法のうちには、骨走査、X線造影、MRI試験、CAT走査、及び腫瘍付随抗原についての血液試験がある [American Cancer Society, Cancer Facts and Figures 1999: Selected Cancers (1999); American Cancer Society, Breast Cancer Guidelines and Statistics (1999); Kopans, Breast Imaging, 2nd ed. (J. B. Lippincott, Philadelphia, PA, 1998); Potter & Partin, NCCN Practice Guidelines for Early Detection of Prostate Cancer 13 (11A) Oncology (November 1999) を参照]。追加の検出方法については、Franklin et al., Breast Cancer Research & Treatment, 41 (1): 1-13 (1996); Kufe et al., Cancer Research, 43 (2): 851-7 (1983) を参照されたい。骨走査には、核医学造影を用いることができる。核医学は、一定の以上を特定するのを支援するために、乳房撮影法に追加して用い得る。核医学は、リンパ系、その他の器官及び骨格系への癌の転移を評価するための優れた手段でもある。腫瘍付随抗原は、例えば、BCA 225 [米国特許第5,681,860号明細書]; 膀胱腫瘍付随抗原 [BTA統計的検定、ARUP Laboratories, Salt Lake City, UT]; 腫瘍付随抗原CA125 [Wagner e

t al., Hybridoma, 16 (1): 33-40 (1997)] ; 22-1-1 Ag, YH 206, GA 733, CA 125、癌胚性抗原及びシアリルLe³ [Sonoda et al., Cancer, 77 (8): 1501-1509 (1996)] を包含する。乳癌の予後のためには、癌性細胞を、患者の骨髄中に探すことができる。例えばBruan et al., New Engl. J. Med., (Feb. 24, 2000) を参照されたい。

【0170】

そのような方法は、例えば、VEGFヌクレオチド配列及びVEGF抗体のような試薬を利用し得る。具体的には、そのような試薬は、例えば、(1) 非発癌性状態に対比してのVEGFmRNAの過発現の検出；(2) 非発癌性状態に対比してのVEGFタンパク質の過存在量の検出；(3) 腫瘍塊における低酸素状態の検出；(4) 隣接する内皮組織におけるVEGFチロシンキナーゼ受容体その他の血管形成性受容体の発現の検出；及び(5) 癌遺伝子の発現の検出に用い得る。これらの方法は、例えば、本明細書に記載の、少なくとも一つの特定のVEGFヌクレオチド配列又はVEGF抗体試薬を含み、例えば臨床的設定において、腫瘍の血管形成及び転移の危険がある患者を診断するのに好都合に用い得る、予めパッケージ化された診断キットを利用することによって実施し得る。

【0171】

さらに、異なる癌遺伝子の対立遺伝子の発現を、これらの方法を用いて査定し得る。その他のマーカーの発現に関して得られた追加的情報は、特定の患者における癌の分子的段階に合わせて作成される、血管形成又は腫瘍増殖を阻害するのに適切な設計のための指針を与える。

【0172】

薬物の発見

本発明は、充実腫瘍を削減するための試験化合物を特定する方法を提供する。該方法の実施は、さらに、下記の実施例に与えられる指針を用いて決定することができる。該方法の工程は、生物学的作用因に対する腫瘍細胞の応答を検定し、腫瘍幹細胞に対する該生物学的作用因の効果を決定することを包含する。言い換えれば、本発明は、本発明の充実腫瘍幹細胞の使用による薬物発見の改良された方法を提供する。

【0173】

薬物発見に本発明の方法を用いる原理の証明は、実施例11及び図11における薬物発見で与えられるて、そこでは、表皮成長因子(EGF)受容体(EGF-R)及びHER2/neuというマーカー(癌に関与することが公知である)を、充実腫瘍幹細胞上に特定した。それにより、EGF-R [例えば, Yang, X. et al., Crit. Rev. Oncol. Hematol., 38 (1): 17-23 (2001)]、及びHER2/neuマーカー [Breast Disease, Vol. 11, HER2: Basic Research, Prognosis and Therapy, Y. Yarden, ed. (IOS Press, Amsterdam, 2000) を参照] に対抗させた治療法を、充実腫瘍幹細胞に効果的に標的化することができる。

【0174】

生物学的経路の特定は、近代的薬物発見法の重要な部分である。充実腫瘍から得られた充実腫瘍幹細胞その他の細胞集団における生物学的経路、特に薬物作用に関与する経路、すなわち、薬物標的(例えばタンパク質)を起源とする経路は、米国特許第5,965,352号明細書(参照によって本明細書に組み込まれる)が示すような使用に向けて特定することができる。

【0175】

一セットの方法では、薬物をふるい分けて、細胞の生物学的経路を活性化して、リポーターポリペプチドを発現させる、受容体との試験化合物の結合を決定する。しばしば、このリポーターポリペプチドは、組換えポリペプチド上でコードされていて、コーディングポリヌクレオチドは、プロモーターに機能的に結合されている。

【0176】

用語「機能的に付随する」又は「機能的に結合された」は、本明細書に用いられる限りで、機能的に関連付けられるポリヌクレオチドを意味する。プロモーターは、それが、コードされるポリペプチドの翻訳を制御するならば、コーディング配列に機能的に付随するか、又は機能的に結合されている。機能的に付随するか、又は機能的に結合された核酸配列は、隣接し、同じ読み枠内にあることができる一方で、一定の遺伝的要素、例えばリプレッサー遺伝子は、ポリペプチドをコードしている配列に隣接して結合されていないが、ポリペプチドの発現を制御するオペレーター配列には結合する。

【0177】

検出できるシグナルは、リポーターポリペプチドに応じて蛍光、吸光又は発光であることができて、リポーターポリペプチドは、例えば、ルシフェラーゼ（ホタルルシフェラーゼ、ビブリオ・フィスケリ *Vibrio fischeri* ルシフェラーゼ、又はゼノラブダス・ルミニスケンス *Xenorhabdus luminescens* ルシフェラーゼ）、緑色蛍光タンパク質、緑色蛍光タンパク質変種、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、 β -グルクロニダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ、グアニンキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ、チミジンキナーゼ、 β -ラクタマーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、インベルターゼ、アミラーゼ（酵母に基づくアッセイに）、ヒト成長ホルモン（活性に基づくアッセイに）であることができる。蛍光性検出可能シグナルは、蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）、生物発光共鳴エネルギー移動（BRET）、時間分解蛍光（TRF）又は蛍光分極（FP）であることができる。適切な場合、検出可能シグナルは、蛍光計、光度計、蛍光マイクロプレートリーダー、二重単色光分光器、マイクロプレート分光蛍光計、分光光度計、共焦点顕微鏡（レーザースキャナー）又は電荷結合素子（CCD）のような機械によって検出する。検出可能シグナルは、リポーターポリペプチドが、腫瘍幹細胞内で発現されたときに生成されるシグナルの量を、リポーターポリペプチドが腫瘍幹細胞内で発現されないときに生成されるシグナルの量と比較することによって決定される。

【0178】

薬物スクリーニングのもう一つの方法は、化合物の高処理量スクリーニングである〔例えば、PCT刊行物のWO 84/03564を参照〕。この方法では、異なる大量の試験小化合物を、固体基板、例えばプラスチックピンその他の何らかの表面に合成する。試験化合物を、充実腫瘍幹細胞又はその部分と反応させ、洗浄する。次いで、結合した充実腫瘍幹細胞を、当技術に周知の方法によって、商業的に入手できる機械類及び方法、例えば液体ハンドラーとのインターフェースを有して、アッセイを最適化する直接統計的解析を可能にする、自動化アッセイ最適化（AAO）ソフトウェアプラットフォーム（Beckman、米国）；CRS Robotics Corp. からのモジュラーシステム（Burlington, Ontario）、液体取扱システム、及びPOLARA（登録商標：CRS）を用いる様々なインキュベーター、超高処理量スクリーニングシステム向けの開放構造研究室自動化ソフトウェア；ユーザーが新たな機器を接続することによって自動化プラットフォームを再構成できるように設計された、3P（Plug & Play Peripherals）技術（ROBOCON, Vienna、オーストリア国）；HTS、超HTS及び高速プレート調製を包含する広範囲の発見応用を可能にする、Allegro（登録商標）システム又はStaccato（登録商標）ワークステーション（Zymark）；研究室自動化プログラミング及び統合のためのMICROLABベクターソフトウェア（Hamilton Co., Reno, Nev., 米国）を用いて検出する。

【0179】

これらの機械及び方法のいずれについても、アッセイは、試験化合物が有効であり得るとの検出できる証拠を与える、標的細胞（充実腫瘍幹細胞、又は遺伝的改変された充実腫瘍幹細胞）の応答を測定する。検出可能シグナルは、対照細胞、及び減算分析によって特定された検出可能シグナルと比較する。「標的化」及び「非標的化」アリコートの中の差の

相対的存在量は、示差表示、表示的示差分析（RDA）、GEM（遺伝子発現マイクロアレー）[米国特許第5,545,531号明細書]、抑制減算ハイブリダイゼーション（SSH）及び直接配列決定[PCIT刊行物WO 96/17957]のような「減算」分析（示差分析）手法を用いて、同時に比較する。減算分析は、示差表示、表示的示差分析（RDA）、抑制減算ハイブリダイゼーション（SSH）、遺伝子発現の系統的分析（SAGE）、遺伝子発現マイクロアレー（GEM）、核酸チップ技術又は直接配列決定の方法を包含する。

【0180】

本発明の充実腫瘍幹細胞は、充実腫瘍幹細胞が、薬物開発の標的の限定され、富化されたセットを与えることから、薬物開発法に特に役立つ。合理的な薬物設計における最も重要な一工程は、標的、すなわち薬物自体が作用し合う分子の特定である。しばしば、標的は、腫瘍形成する充実腫瘍幹細胞の上又は中の受容体であることになる。

10

【0181】

同様に、本発明の遺伝的に改変された充実腫瘍幹細胞は、薬物開発に特に役立つ。例えば、遺伝的に改変された幹細胞は、プロモーターが、リポーターポリペプチドをコードしているに機能的に結合されたポリヌクレオチドを有することがある。リポーターポリペプチドは、腫瘍幹細胞の受容体が試験化合物との結合によって活性化されるか、又は試験化合物との結合によって不活性化された後で、腫瘍幹細胞内で発現される。そのような検出可能シグナルは、遺伝的に改変された充実腫瘍幹細胞を高処理量スクリーニング（HTS）に用いるのに適切にする。

20

【0182】

検出可能シグナルは、正の選別又は負の選別の結果であることがある。正の選別は、特定の培養条件下で細胞が生存できる能力、特定の因子を発現できる能力、細胞培養における変化、又は差別的遺伝子発現を試験する操作を包含する。この選別は、充実腫瘍幹細胞、又は遺伝的に改変された充実腫瘍幹細胞が、下記のことができる能力に基づく：

（a）特定の培養条件、例えば *in vitro* 細胞培養の下で増殖又は生存する；

（b）測定することができる特定の因子を発現して、この測定が、選別に適合できる。この因子は、測定に接し得るいかなる因子であることもできて、分泌される分子、細胞表面分子、可溶性及び不溶正分子、結合活性、他の細胞の活性を誘導するか、又は他の有機もしくは無機化学反応を誘導する活性を包含するが、これらに限定されない；

30

（c）示差沈降、示差光散乱、示差浮遊密度、ふるい分けによって選別される示差細胞体積のような物理的方法によって測定される、形態学的変化を包含する、細胞構造の変化；

（d）直接測定することができる、細胞表面マーカーの変化、生化学的活性の変化、蛍光活性化セルソーター（FACS）と結合して用い得る、蛍光標識化プローブの結合の変化の際に再選別できるであろういかなる変化、又は選別の根拠として用いるいかなる特性も包含する、遺伝子発現における差。リポーターポリペプチドを発現するポリヌクレオチドを有する、遺伝的に改変された充実腫瘍幹細胞は、ここで特に役立つ。

（e）間接的に測定することができる、選別的マーカー（例えば薬物耐性マーカー、又はFACS選別に用い得る細胞表面マーカー）をコードしている合成遺伝子構成体によって測定される、転写因子活性の変化を包含する、遺伝子発現における差。この範疇は、mRNA安定性、mRNA局在性、mRNA翻訳制における変化も包含することになるであろう。これらの変化は、すべて、これらの調節性事象の一つによって制御され、容易に選別される遺伝子産物の発現を作動させる合成構成体を、構成できると思われるため、選別の根拠になり得る。

40

【0183】

薬理ゲノム学

本発明は、悪性に向かう傾向を確認し、化学療法その他の抗癌療法の進行を追跡し、癌の再発をスクリーニングするか、又は他の類似の、存在するか、もしくは潜在的な癌の検出の方法であって、そのような方法が、潜在的な癌細胞内で、患者から単離された充実腫瘍幹細胞、又は充実腫瘍幹細胞のコレクションから単離されたそのいずれかと比較して、

50

過剰又は過少発現される、少なくとも一つの遺伝子の発現について検出する、改良された方法を提供する。一実施態様では、この方法は、（充実腫瘍幹細胞との比較によって）有意である、ポリヌクレオチド転写体の転写を示すシグナルについて試験しようとする、生物学的サンプル（例えば患者からのそれ）を検定することである。加えて、生物学的サンプルのスクリーニングアッセイも企図されて、そのようなアッセイは、化学療法のための途上でか、又は癌を治療する外科的干渉の後に、癌性細胞の持続する存在又は撤退について追跡する。

【0184】

本発明のその他の実施態様

本発明は、パッケージ化する材料と、該パッケージ材料内に収容される一次試薬とを含む、製造物（システム又はキット）を提供する。一次試薬は、上記の充実腫瘍幹細胞調製品である。パッケージ材料は、一次試薬を、充実腫瘍を削減する作用因を特定するのに用いることができることを示す、標識を包含する。 10

【0185】

また、本発明は、細胞内の特定のポリヌクレオチド又はタンパク質の活性レベルを決定するためのキットを提供する。そのようなキットは、（それが富化された集団、又は単離された）充実腫瘍幹細胞、そのような充実腫瘍幹細胞から抽出されたポリヌクレオチド、又はそのような充実腫瘍幹細胞から抽出されたタンパク質を固相、例えば表面を含む、アレーもしくはマイクロアレーを有する。該キットは、固相の既知の位置で充実腫瘍幹細胞の成分とハイブリダイズか、又は結合するプローブも含んでよい。これらのプローブは、既知の異なる配列の、それぞれ、RNA種、又はそれに由来するcDNA種とハイブリダイズできる、核酸からなる。特に、本発明のキットに収容されるプローブは、キットが追跡しようとする特定の疾患又は治療法に相関させた混乱に応答して増加もしくは減少する、mRNA種に由来する核酸配列と特異的にハイブリダイズできる、核酸である。本発明のキットに収容されるプローブは、好ましくは、キットが決定しようとする疾患状態又は治療効果の特定のレベルに相関させた混乱に応答して増加もしくは減少する、RNA種とハイブリダイズする核酸を実質的に排除する。 20

【0186】

本発明の一つ又はそれ以上の実施態様の詳細を、上記に付随する記載中に説明してきた。本明細書に記載されたのと類似又は等価のいかなる方法及び材料も、本発明の実施もしくは試験に用いることができるが、好適な方法及び材料を、ここに記載する。本発明のその他の特徴、目的及び利点は、記載及びクレームから明白であると思われる。 30

【0187】

本明細書、及び付記されたクレームでは、単数形は、複数の被参照物を包含する。本明細書に別途定義されない限り、ここに用いられた技術用語及び学術用語は、すべて、本発明が属する当技術の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に引用されたすべての特許及び刊行物は、参照によって組み込まれる。

【0188】

下記の実施例は、本発明の好適実施態様をより十分に例示するために提示される。これらの実施例は、付記されたクレームによって定義されたとおりに、決して、本発明の対象範囲を限定するとして解釈してはならない。 40

【0189】

実施例 1

乳癌幹細胞の単離

本実施例の目的は、乳癌幹細胞の構造及び細胞機能の特性記述を示すことである。

【0190】

本発明者らは、胸部腫瘍のクローン形成細胞を特定するための、組織培養及びマウスモデルの双方を開発した。マウスモデルでは、NOD／SCID系マウス [Lapidot et al., Nature, 367 (6464) : 645-8 (1994)] に、VP-16（エトポシド）（商業的入手源、例えばMoravsek, Biochemi 50

cells, Brea, CA、米国から入手できる)を投与し、ヒト原発性乳癌組織(乳房切除又は局所部分切除標本から得た)を移植した。この系で、原発性腫瘍5例中3例が腫瘍を形成した。

【0191】

患者2名から得た悪性胸水から単離した腫瘍細胞[Zhang et al., Invasion & Metastasis, 11(4): 204-15 (1991)を参照]を、Matrigel(登録商標:Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ、米国から入手可能)に懸濁させ、次いでマウスに注入した。注入されたマウスに、腫瘍が形成された。

【0192】

この方法によって、本発明者らは、FACSによる分析に十分な腫瘍細胞を形成することができた。細胞を特性記述するための生物学的アッセイを実施するのに十分な腫瘍細胞も得ることができた[造血サンプル中の希腫瘍細胞を検出するためのクローン形成アッセイに付いては、米国特許第5,674,694号明細書(参照によって組み込まれる)を参照されたい]。

【0193】

腫瘍細胞の表現型が明確なサブセットは、FACSを包含する、当技術に公知の適切ないかなる手段によっても、発蛍光団結合マーカー結合用試薬を用いて単離することができる。固相への付着、及びそれからの脱着を包含する、適切なその他の方法も、本発明の対象範囲内にある。分離の手順は、抗体被覆した磁気ビーズを用いる磁気分離、アフィニティークロマトグラフィー、及び抗体を固相マトリックス、例えばプレートに付着させた「パニング」による分離を包含し得る。正確な分離を与える手法は、蛍光活性化セルソーターを包含し、これは、様々な程度の複雑化、例えば多色チャンネル、ローアングル鈍角光散乱検出チャンネル、インピーダンスチャンネル等々を有することができる。死細胞は、死細胞に結合する染料(例えばヨウ化プロピジウム(PI)又は7-AAD)による選別によって排除してよい。選ばれた細胞の生存率に不当に有害でない、いかなる手法を用いてもよい。

【0194】

マーカー結合試薬は、磁気試薬、例えば超常磁性微粒子(微粒子)に直接又は間接的に結合することができる。磁気粒子との直接結合は、当技術に公知のとおり、様々な化学的結合基の使用によって達成される。抗体は、側鎖アミノ又はスルフヒドリル基、及び異機能性架橋結合試薬によって、微粒子とカップリングすることができる。非常に多くの異機能性化合物が、実体との結合に利用できる。好適な結合基は、3-(2-ピリジルジチオ)プロピオン酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(SPDP)又は4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボン酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(SMCC)であって、反応性に富むスルフヒドリル基を抗体上に、及び反応性に富むアミノ基を磁気粒子上に有する。これに代えて、マーカー結合試薬を、磁気粒子に直接カップリングする。マーカー結合試薬は、ハプテンに直接結合し、ハプテン特異的な、第二期抗体を粒子に結合した。適切なハプテンは、ジゴキシン、ジゴキシゲニン、FITC、ジニトロフェニル、アビジン、ビオチン等々を包含する。ハプテンをタンパク質に結合する方法は、当技術に公知であり、そのような結合のためのキットが、商業的に入手できる。蛍光色素標識した抗体は、FACS分離、免疫磁気選別、特に高勾配磁気選別(HGMS)のための磁気粒子等々に役立つ。例示的な磁気分離装置は、PCT刊行物WO 90/07380及びWO 96/09550、及びヨーロッパ特許第0438520号公報に記載されている。

【0195】

本発明者らは、原発性腫瘍の一つ、及び悪性胸水細胞の一つによって形成された腫瘍を大規模に研究した。本発明者らは、原発性乳癌細胞、及びマウス異種移植片から単離した細胞が、組織培養中で少なくとも1~3週間増殖する、低血清組織培養条件を特定した。in vitro組織培養モデルを用いて、特異的受容体の刺激が、乳癌細胞の増殖及び生

10

20

30

40

50

存に影響を及ぼし得ることを見出した。

【0196】

本発明者らは、ヒト乳癌の *in vitro* (組織培養) 及び *in vivo* (マウス異種移植片) モデルを用いた。マウスモデルで成長するヒト腫瘍を、FACSによって採集し、単細胞懸濁液にさせ、分析した。本発明者らは、腫瘍細胞の表面マーカーの発現の不均一性を見出した。初めに、悪性胸水から単離した乳癌細胞を、CD44の発現に基づいて群に分離した。細胞を、マーカーである520C9及びCD44の発現について分析した(図2を参照)。520C9は、c-erbB-2 (HER-2/neu) を認識することが公知である [Ring et al., Molecular Immunology, 28: 915 (1991)]。ヒト乳癌細胞に選択的に結合するマウスモノクローナル抗体を開示する、米国特許第4,753,894号明細書も参照されたい。細胞の4集団が、特定可能であった。マーカーの520C9及びCD44の双方を発現する細胞の小集団、いずれかのマーカーのみを発現する集団はもとより、いずれのマーカーも発現しない集団も存在した。CD44発現に関して、細胞を単離した(図2)。CD44⁺又はCD44⁻細胞を、それらが増殖できる能力について試験した。マーカーCD44⁻の腫瘍細胞ではなく、マーカーCD44⁺の腫瘍細胞が、*in vitro*でコロニーを、かつ *in vivo*で腫瘍を形成することができた(表1)。CD44⁺細胞の単離は、腫瘍形成細胞の少なくとも2.5倍の純化を招くことに注目されたい。

10

【0197】

【表1】

20

表 1 乳癌幹細胞の単離集団		
	CD44 ⁺	CD44 ⁻
<i>in vitro</i> コロニー	+	-
マウスにおける腫瘍形成性	+	-
ヒト乳癌細胞を、FACSを用いて採集した。 <i>in vitro</i> でのコロニーの分析を、それぞれの表現型の5,000の細胞を用いて、別個の2ウェル内で実施した。選別された細胞の <i>in vivo</i> 増殖を、 2×10^6 のマーカーCD44 ⁺ 又はCD44 ⁻ 細胞をマウスに注入することによって実施した。マウスを、実験1では毎週、実験2では4週目に分析した。マーカーCD44 ⁻ 細胞でなく、マーカーCD44 ⁺ 細胞の注入は、 <i>in vitro</i> での腫瘍の形成及び増殖を招いた。 <i>in vitro</i> 実験は、患者から単離した凍結細胞でも複製し、 <i>in vitro</i> 実験を裏付けた。 <i>in vivo</i> 実験は、2回複製した。		

30

【0198】

これらの結果は、充実癌の幹細胞モデルの原理の証明として役立ち、下記のことを立証する：

40

- (a) 充実腫瘍細胞は、表面型上及び機能的に不均一である；いくつかの腫瘍細胞は、腫瘍形成性であるが、その他は、限定された増殖能を有し、移植しても腫瘍を形成しない；
- (b) FACSによって細胞を分離することによって、腫瘍形成細胞を富化することができる；
- (c) 腫瘍形成性画分を研究することによって、腫瘍幹細胞を単離し、大方針を治療標的の特定に、より注意深く絞り込むことができる。

【0199】

本実施例は、二つの腫瘍からのクローン形成乳癌腫瘍細胞が、CD44を発現することを示す。その他のマーカーも、乳癌幹細胞のそれ以上の純化を許す。本発明者らは、いくつかの抗原の発現について腫瘍細胞を分析した。不均一な発現パターンを有するいくつかの

50

細胞は、MUC1、Notch4、アネキシンV、317G5、CD9、CD24、260F9、P-糖タンパク質、及びCD49Fを包含する。260F9は、55キロダルトンの糖タンパク質（ムチン）B細胞表面抗原に結合する〔Weiner, L. M. et al., Cancer Res., 49: 4062-4067 (1989); Gregg, E. O. et al., J. Immunol., 138: 4502-4508 (1987)〕。ヒト乳癌細胞に選択的に結合するマウスモノクローナル抗体を開示する、米国特許第4,753,894号明細書も参照されたい。これらのマーカーのCD44との併用は、CD44のみで達成されたのを越える、腫瘍幹細胞の富化の増大を許す。

【0200】

顕著なことに、CD44⁺（腫瘍形成）細胞は、すべて、B38.1⁺でもある。B38.1抗体の記載については、Kufe et al., Cancer Research, 43(2): 851-7 (1983)を参照されたい。アネキシン、Notch4及びCD24の発現は、B38.1⁺細胞によって不均一である。そのため、本発明者らは、2腫瘍からの乳癌幹細胞を、B38.1⁺又はCD44⁺細胞の様々な下位集団を分析することによってさらに純化することができる。実際に、本発明者らは、一次生検から得たB38.1⁺CD24⁺及びB38.1⁺CD24⁻細胞を単離し、組織培養に入れた。B38.1⁺CD24⁻細胞のみが、コロニーを形成したにすぎなかった。もう一つの腫瘍で、細胞の260F9⁺CD24⁻、260F9⁺CD24^{hi}、及び260F9⁺CD24^{lo}集団を単離した。細胞のCD24⁻/^{lo}集団のみが、腫瘍を形成したにすぎない（表2）。B38.1又は260F9及びCD24を用いると、腫瘍形成細胞の5〜6倍の富化があることに注目されたい。

【0201】

【表2】

表 2 CD24 ⁺ 及びCD24 ^{-/lo} 細胞腫瘍形成性の分析		
腫瘍形成	CD24 ⁺	CD24 ^{-/lo}
腫瘍T1	—	+
腫瘍T2	—	+
NOD/SCID系マウスに 50,000〜200,000 のCD24 ⁺ 又はCD24 ^{-/lo} 細胞のいずれかを注入し、2週間後に腫瘍形成について分析した。		

【0202】

実施例2

乳腺細胞増殖におけるNotchについての役割

本実施例の目的は、少なくとも2種類の異なる腫瘍で、Notch4が少数の腫瘍形成細胞によって発現されることの予備的証拠を与えることであった。実施例1からの腫瘍T1及び腫瘍T2を、Notch4の発現について分析した。細胞を、抗Notch4ポリクローナル抗体で染色し、FACSによって分析した。細胞の5〜15%が、検出可能レベルのNotch4を発現した。さらに、非腫瘍形成細胞の異なる集団が、異なるNotchリガンド、及びFringeファミリーの成員を発現した。正常な乳腺組織及び乳腫瘍組織によって、いずれのNotchRNAが発現されるのかを決定するために、それぞれのNotchmRNAに特異的なプライマーを用いて、RT-PCRを実施した。興味深いことに、Notch2ではなく、Notch1、Notch3及びNotch4が、正常乳腺細胞及び乳腫瘍細胞の双方によって発現された。100,000の細胞からRNAを調製した。正常乳腺細胞又は乳腫瘍細胞からのRNAのRT-PCRを、Notch1、Notch2、Notch3及びNotch4に特異的なプライマーを用いて実施した

。予測された大きさのPCR産物が、Notch1、3及び4について存在し、これらの細胞内のこれらのマーカーの存在を示した。RNAをRNAアーゼで前処理した場合、シグナルは失われた。

【0203】

増殖におけるNotchの役割を決定するために、Notch組換えリガンド、又は該リガンドの作用薬ペプチドを、正常な乳腺上皮細胞の培養の培地に加えた。いずれのNotch作用薬も、単一細胞の生存／増殖を刺激し：Notch作用薬の存在下では、2～3倍も多くのコロニーが形成され、それらは、より高い百分率の大きく、混合したコロニーを形成した（40%対20%）。単一細胞をクローン密度で播種したときは、2種類のコロニーが得られた。おそらくは充実腫瘍幹細胞から生じた、筋上皮細胞と管上皮細胞との混合物からなる、数百ないし数千の細胞で構成された巨大コロニーが存在した。単一の系譜のみを含むと思われ、おそらく、限定された始原細胞の後代を表わす、より小さい細胞コロニーも存在した。

10

【0204】

in vitroで増殖した正常な乳腺上皮細胞から、（筋上皮細胞と管上皮細胞との双方を含む）二系譜コロニーを、単一の細胞によって生成した。筋上皮細胞は、抗CALLA抗体で染色することによって特定した。管上皮細胞は、抗ESA抗体で染色することによって特定した。Notch作用薬ペプチドの存在又は不在下で、Matrigel（登録商標）中で成長した類器官は、Notch作用薬ペプチドの存在下より多く側鎖形成かつ増殖した。この作用薬ペプチドは、カゼイン産生の阻害が示すとおり、分化も阻害した。これらの結果は、これらのアッセイが、正常な乳腺上皮からの多能始原細胞を検出する手段も提供することを立証する。このアッセイは、正常な乳腺幹細胞の純化に用いてもよい。これらの結果は、Notchが正常な乳腺の発達に機能を有することも立証する。

20

【0205】

次いで、乳癌腫瘍細胞におけるNotch4発現を調べた。高レベルのNotch4が、少数の腫瘍細胞で発現された。腫瘍形成集団を特定するB38.1集団を、Notch4発現について分析したとき、B38.1^{low}、Notch4⁺である細胞の、別個の小集団が明白になった。

【0206】

Notch4⁺及びNotch4⁻細胞を選別し、in vitroで分析した。意外にも、いずれの集団も、組織培養では増殖しなかった。二つの可能な説明が存在する。第一に、細胞増殖には細胞の2集団間の相互作用が必要とされることがあり得た。次に、抗体は、Notch4の作用薬又は拮抗薬のいずれでもあり得て、腫瘍細胞の増殖を阻害し得る。これらの可能性を区別するため、腫瘍細胞を、抗Notch4抗体とともに温置し、次いでin vitroで検定した。乳癌細胞を、抗Notch4抗体に接触させた後、組織培養に入れた。細胞を、抗Notch4抗体を含有するか、含有しないか、又は抗体を生成するのに用いたペプチドとともに予備温置した抗Notch4抗体を含有するHBSS中、氷上で1時間温置した。可溶性Deltaの存在下、及び対照として可溶性Deltaなしでも、細胞を増殖させた。

30

【0207】

対照細胞は、組織培養中で増殖し、コロニーを形成したが、Notch4とともに温置した細胞は、形成しなかった。抗Notch4抗体を、細胞を加える前に、抗体を生成するのに用いたペプチドとともに温置したとき、増殖は回復した。in vitroでの増殖に対するNotchの役割を確認するため、細胞を、可溶性Delta、Notchリガンド、又はDeltaなしの対照培養を含有する培地中で、無血清の条件下で温置した。Deltaを有する培養は、多くのコロニーを形成したが、可溶性Deltaなしか、又は抗Notch4抗体に接触させた細胞を用いた培養では、少数の小コロニーのみ形成されたにすぎなかった。抗体を、このペプチドとともに予備温置したときは、抗体は、もはや増殖を遮断しなかった。したがって、Notch4経路は、in vitroでの乳癌細胞増殖に決定的に重要である。

40

50

【0208】

腫瘍細胞を、抗N o t c h 4抗体に接触させ、次いで、細胞をマウスに注入して、抗体が腫瘍形成を阻害するか否かを決定した。35, 000の腫瘍細胞を、抗体なし、抗N o t c h 4抗体あり、又は抗体を生成するのに用いたペプチドとともに予備温置した抗N o t c h 4抗体ありで温置した。2週間後、抗N o t c h 4抗体に接触させた細胞が形成した腫瘍の直径は、対照腫瘍より40%小さかった。したがって、抗N o t c h 4抗体に接触させた細胞は、抗体を生成するのに用いたペプチドとともに温置した抗N o t c h 4抗体に接触させた細胞より小さい腫瘍を形成した。

【0209】

乳癌腫瘍細胞の下位集団におけるN o t c h、N o t c hリガンド、及びF r i n g eファミリーの成員の発現 10

乳腫瘍細胞の集団での、N o t c h受容体ファミリーの成員、N o t c hリガンド及びN o t c hシグナル修飾タンパク質の発現を調べた。初めに、N o t c h 4⁺及びN o t c h 4⁻集団内のマーカーに的を絞った。100個のN o t c h 4⁺又はN o t c h 4⁻細胞を、FACSによって単離した(図4参照)。40週のPCRを実施して、指示されたmRNAを検出した。N o t c h 4⁺集団は、N o t c h 1、N o t c h 4及びJ a g g e d(一N o t c hリガンド)を発現した。N o t c h 4⁻集団は、N o t c h 1及びN o t c h 3とともにJ a g g e dも発現した。N o t c h 3(他のN o t c h受容体を通じてシグナリングを阻害し得る)は、N o t c h 4⁺集団によって発現されなかった。

【0210】

要約 20

本発明者らは、正常なヒト乳腺細胞及びヒト乳腺幹細胞向けのi n v i t r o及びi n v i v oアッセイを開発した。NOD/SCID系マウスモデルに生じる、異なる2種類の腫瘍では、腫瘍細胞は、いくつかの細胞表面マーカーの発現に関して不均一であった。いずれの腫瘍でも、クローン形成腫瘍幹細胞の表現型は、B38.1⁺CD44⁺CD24⁻/1⁰であった。同じ集団は、i n v i v oアッセイでもクローン形成性であった。このB38.1⁺集団は、追加のいくつかのマーカーの発現を用いて、さらに下位区分することができる。i n v i t r o及びi n v i v oでの証拠は、N o t c h経路、特にN o t c h 4経路が、腫瘍形成における中心的経路を演じるとして強く含意する。

【0211】

実施例3 30

マウス異種移植片モデル

本発明者らは、原発性乳腫瘍からの腫瘍を確立することができる異種移植片モデルを、重篤な免疫不全であるマウスの乳腺に腫瘍を注入することによって開発した。異種移植片の腫瘍は、現在まで試験された、全部で5名の患者からの乳房切除術標本から確立した。3例の悪性胸水からも、腫瘍を確立することができた。NOD/SCID系マウスに、VP-16を投与し、原発性ヒト乳癌組織を移植した。M a t r i g e l(登録商標)に懸濁させた悪性胸水3例から単離した腫瘍細胞を、マウスに注入し、やはり腫瘍を形成した。これは、フローサイトメトリーによる分析、及び異なるサブセットが腫瘍を形成できる能力についてのアッセイを容易にするのに十分な悪性腫瘍細胞を生成することを可能にした 40

。本発明者らは、原発性腫瘍の一つ、及び悪性胸水細胞の一つが形成した腫瘍を大規模に研究した。さらに、実施しようとした腫瘍3例で、単細胞懸濁液を作成し、腫瘍に移転することができた。異種移植片アッセイにおけるこれらの改良は、クローン形成乳癌細胞を特性記述するための生物学的及び分子的試験を実施するのを許した。加えて、本発明者らは、原発性乳癌細胞、及びマウス異種移植片腫瘍から単離した細胞が、組織培養内で短期間(1~3週間)増殖する組織培養条件を見出した。

【0212】

マウスモデルで成長するヒト腫瘍を、採集し、単細胞懸濁液にさせ、FACSによって分析した。腫瘍細胞による細胞表面マーカーの発現の不均一性があった。初めに、悪性胸水から単離した乳癌細胞を、CD44発現に基づいて群に分けた。細胞を、マーカー520 50

C 9 及び C D 4 4 の発現について分析した。細胞の 3 集団が、特定可能であった。マーカー 5 2 0 C 9 及び C D 4 4 をともに発現した細胞の小集団、いずれかのマーカーのみを発現した集団、及びいずれのマーカーも発現しなかった集団があった。細胞を、C D 4 4 の発現に関して単離した。C D 4 4⁺ 又は C D 4 4⁻ 細胞を、それらが増殖できる能力について試験した。マーカー C D 4 4⁻ の腫瘍細胞ではなく、マーカー C D 4 4⁺ の腫瘍細胞が、in vitro でコロニーを、かつ in vivo で腫瘍を形成することができた（表 3）。C D 4 4⁺ 細胞の単離は、腫瘍形成細胞の 2 倍の富化を招くことに注目されたい。

【0 2 1 3】

【表 3】

10

表 3 FACS を用いて採集されたヒト乳癌細胞		
	CD 4 4 ⁺	CD 4 4 ^{-/lo}
in vitro コロニー	+	-
マウスにおける腫瘍形成性	+	-
in vitro でのコロニーの分析を、それぞれの表現型の 5, 0 0 0 の細胞を用いて、別個の 2 ウェル内で実施した。選別された細胞の in vivo 増殖を、2 x 1 0 ⁶ のマーカー CD 4 4 ⁺ 又は CD 4 4 ⁻ 細胞をマウスに注入することによって実施した。マウスを、試験 1 では 3 週目に、実験 2 では 4 週目に分析した。マーカー CD 4 4 ⁻ 細胞でなく、マーカー CD 4 4 ⁺ 細胞の注入は、in vitro での腫瘍の形成及び増殖を招いた。in vitro 実験は、患者から単離した凍結細胞でも複製し、in vitro 実験を裏付けた。in vivo 実験は、2 回複製した。		

20

【0 2 1 4】

これらの結果は、クローン形成乳癌腫瘍細胞が、C D 4 4 を発現することを示す。本発明者らは、乳癌幹細胞をさらに純化するのを許す可能性がある、その他のマーカーについての検索を開始した。これを実施するために、いくつかの抗原の発現について、腫瘍細胞を分析した。

30

【0 2 1 5】

意外にも、C D 4 4⁺（腫瘍形成）細胞は、すべて、B 3 8 . 1⁺ でもあった。実際に、本発明者らは、一次生検から得た B 3 8 . 1⁺ C D 2 4⁺ 及び B 3 8 . 1⁺ C D 2 4⁻ 細胞を単離し、組織培養に入れた。B 3 8 . 1⁺ C D 2 4⁻ 細胞のみが、コロニーを形成したにすぎなかった。

【0 2 1 6】

次に、マーカー C D 2 4 の発現に基づいて、腫瘍 2 例から細胞を単離した。腫瘍 T 2 では、C D 2 4⁻、C D 2 4^{lo} 及び C D 2 4^{hi} 集団を単離した。双方の例で、C D 2 4⁻ / ^{lo} 集団のみが、腫瘍を形成したにすぎない（表 4）。B 3 8 . 1 又は 2 6 0 F 9 及び C D 2 4 を用いると、腫瘍形成細胞の 5 ~ 6 倍の富化があることに注目されたい。

40

【0 2 1 7】

【表 4】

表 4 フローサイトメトリーによって単離されたヒト乳癌細胞の分画		
マウスの腫瘍形成	CD 2 4 ⁺	CD 2 4 ^{-/lo}
腫瘍 T 1	—	+
腫瘍 T 2	—	+
マウスに 50,000 の CD 2 4 ⁺ 又は CD 2 4 ^{-/lo} 細胞を注入した。注入 4 週間後に腫瘍の形成を決定した。		

10

【0218】

CD 2 4⁻細胞集団から生じる腫瘍の分析

充実腫瘍幹細胞のモデルによれば、CD 2 4⁻細胞は、CD 2 4⁺及び CD 2 4⁻細胞とともに有する腫瘍を生じる。この仮説を試験するために、B 3 8 . 1⁺ CD 2 4⁻細胞を用いて、二次移植片を実施した。

【0219】

得られた腫瘍を、取り出し、細胞を、B 3 8 . 1 及び CD 2 4 の発現に関して再分析した。幹細胞モデルから予測されたとおり、移植された B 3 8 . 1⁺ CD 2 4⁻細胞から生じた腫瘍から得た細胞は、B 3 8 . 1 及び CD 2 4 双方の発現に関して不均一であった。B 3 8 . 1⁺ CD 2 4⁻細胞によって開始された腫瘍から単離された細胞のマーカー発現パターンは、本来の腫瘍のそれに類似した。

20

【0220】

これらの結果は、充実癌の充実腫瘍幹細胞モデルの原理の証明として役立ち、下記のことを立証する：

- (1) 腫瘍細胞は、表面型上及び機能的に不均一である；
- (2) F A C S によって細胞を分離することによって、腫瘍形成細胞を富化することができる；
- (3) 腫瘍形成性画分を試験することによって、腫瘍幹細胞を単離し、大方針を治療標的の特定に、より注意深く絞り込むことができる。

30

【0221】

実施例 4

マウスモデルにおける原発性乳腫瘍細胞の分析

本発明者らのマウスモデルにおいて、患者 8 名からの腫瘍を確立した。また、原発性腫瘍 3 例、及び胸水 2 例から確立した腫瘍を特性記述した。2 例は、高速成長性腫瘍であり、3 例は低速成長性腫瘍であった。

【0222】

異なる腫瘍のそれぞれについて、腫瘍形成細胞の表現型を決定した。分析のために、腫瘍を、マウスから取り出し、単細胞懸濁液にさせた。初めに、本発明の充実腫瘍幹細胞モデルを、また腫瘍形成細胞の表現型が実際に B 3 8 . 1⁺ CD 4 4⁺ CD 2 4^{-/lo}であることを確認した。すべての腫瘍で、これらのマーカーの発現に基づく、F A C S によって単離した細胞の限定希釈分析を実施した。

40

【0223】

本発明者らの予備的データに基づき、推定される腫瘍形成細胞の最高の純化へと導く抗体カクテルは、下記のとおりであった：抗 3 8 . 1 - A P C、抗 CD 4 4 - F I T C 及び抗 CD 2 4 - P E、抗 CD 3 - C y t o c h r o m e、抗 CD 1 0 - C y t o c h r o m e、抗 CD 1 4 - C y t o c h r o m e、抗 CD 1 6 - C y t o c h r o m e、抗 CD 3 1 - C y t o c h r o m e、CD 4 5 - C y t o c h r o m e、CD 1 4 0 b - C y t o c h r o m e、抗 CD 6 4 - C y t o c h r o m e、抗 E S A - P h a r - r e d 及び 7 A A D (生存性マーカー)。シトクロームで標識化された抗体は、すべて、系譜カクテル (

50

LINEAGE⁻の一部であると見なした。FACSを用いて、推定される乳癌幹細胞を単離したが、それらは、異種移植片腫瘍T1では、細胞のCD44⁺CD24⁻/1^o。LINEAGE⁻集団であり、細胞のCD44⁺B38.1⁺CD24⁻/1^o。LINEAGE⁻集団は、乳癌幹細胞が、より富化され、ESA⁺CD44⁺B38.1⁺CD24⁻/1^o。LINEAGE⁻集団が、最も富化されていた。悪性細胞の異なる集団を、*in vivo*及び*in vitro*モデルで試験して、原発性腫瘍形成細胞の表現型が、マウス異種移植片モデルで成長する間に変化しないことを確かめた。本発明者らが、腫瘍形成細胞を次第に富化するにつれ、腫瘍を形成するのに要する細胞数及び時間は、減少した。

【0224】

10

実施例5

乳腺細胞の増殖におけるNotchの役割

Notchタンパク質は、成長／生存因子Delta及びJaggedに対する受容体である[Panin et al., Nature, 387(6636): 908-912 (1997); Perron et al., Cellular & Molecular Life Sciences, 57(2): 215-23 (2000); Shimizu et al., J. Biol. Chem., 274(46): 32961-9 (1999)]。いくつかの正常幹細胞では、Notchは、増殖、生存及び分化に役割を果たすことが公知である[Apelqvist et al., Nature, 400(6747): 877-81 (1999); Berry et al., Development, 124(4): 925-36 (1997); Yasutomo et al., Nature, 404(6777): 506-10 (2000); Morrison, Cell, 101: 499-510 (2000)]。一定の状況では、Notchの刺激は、幹細胞の自己更新を促進できるが、他の状況では、分化を促進することができる。Deltaは、4種類のNotch受容体すべてを活性化する。

20

【0225】

本発明者らは、乳癌腫瘍細胞におけるNotch4の発現を調べた。Notch4を、少数の腫瘍細胞上で発現させた。腫瘍形成集団を特定するB38.1集団を、Notch4発現について分析したとき、B38.1^{1o}及びNotch4⁺である、細胞の明確な小集団が明らかになった。

30

【0226】

本発明者らは、Notch4⁺及びNotch4⁻細胞を選別し、それらが*in vitro*でコロニーを形成できる能力を分析した。意外にも、いずれの集団も、組織培養では増殖しなかった。二つの可能な説明が存在する。第一に、細胞増殖には細胞の2集団間の相互作用が必要とされることがあり得た。これに代えて、抗体は、Notch4の作用薬又は拮抗薬のいずれでもあり得て、受容体の阻害又は活性化が、腫瘍細胞の増殖を阻害し得る。

【0227】

これらの可能性を区別するため、分離していない腫瘍細胞を、抗Notch4抗体とともに温置し、次いで、*in vitro*でコロニーを形成できる能力について検定した。対照細胞は、組織培養内で増殖し、コロニーを形成したが(図5A)、Notch4抗体とともに温置した細胞は、増殖しなかった(図5B)。抗Notch4抗体を、抗体を生成するのに用いたペプチドとともに予備温置したとき(このペプチドは、理論的には、細胞との抗体の結合を遮断するはずである)、腫瘍細胞がコロニーを形成できる能力は、回復した(図8C)。Notchが腫瘍細胞によってコロニー形成を調節することを確認するため、細胞を、可溶性Deltaありか、又はそれなしの培地で温置した(それぞれ、図5A及び5D)。Deltaを有する培養は、多くのコロニーを形成したが(図5A)、可溶性Deltaを欠く培地では、又は抗Notch4抗体に接触させた細胞を用いた培養では、少数の小コロニーのみ形成されたにすぎなかった(図5B、5D及び5E)。まとめると、これらの結果は、Notch4経路が、細胞内の乳癌細胞の増殖／生存を調節

40

50

し、抗N o t c h 4抗体が、i n v i t r oでの活性化を遮断することを示す。

【0228】

次に、腫瘍細胞を、抗N o t c h 4抗体とともに温置し、次いで、細胞をマウスに注入して、抗体が腫瘍形成を阻害するか否かを決定した。抗N o t c h 4抗体に接触させた細胞は、細胞を加える前に、抗体を生成するのに用いたペプチドとともに温置した抗N o t c h 4抗体に接触させた細胞より小さい腫瘍を形成した。約35,000の腫瘍細胞を、抗体なし、抗N o t c h 4抗体あり、又は抗体を生成するのに用いたペプチドとともに予備温置した抗N o t c h 4抗体ありで温置した。2週間後、抗N o t c h 4抗体に接触させた細胞が形成した腫瘍の直径は、いずれの対照腫瘍より40%小さかった。i n v i t r o及びi n v i v oアッセイの最も単純な説明は、N o t c h活性化は、幹細胞の増殖／生存を促進し、抗N o t c h 4抗体は、受容体活性化を遮断することである。 10

【0229】

実施例6

乳癌幹細胞のそれ以上の特性記述

5例の腫瘍からのヒト乳癌腫瘍（原発性乳腫瘍3例の乳房切除術標本、及び転移性乳癌からの悪性胸水2例）を、N O D／S C I D系マウスに確立した。5例の腫瘍は、初め、新生物細胞マーカーの不均一性を理解するのに用いた。これらの結果に基づき、患者から切除直後の原発性腫瘍から単離された、細胞を用いた実験を実施して、マウス異種移植片モデルが、ヒト乳癌を正確に反映することを確認した。

【0230】

C D 4 4発現及び腫瘍形成性

転移性乳癌から得た細胞（T 1と名付ける）、及び原発性乳腫瘍1例（T 2と名付ける）を、分析に十分な細胞を得るために、マウスで拡大するために選んだ。これを達成するため、T 1からの $10^6 \sim 10^7$ 個の胸水細胞（凍結サンプル）、又はT 2の $1 \sim 2 \text{ mm}^3$ の小片（新鮮な生検サンプル）を、マウスの乳腺脂肪パッド内で1～3ヶ月間増殖させた。次いで、得られたヒト腫瘍を採集し、単細胞懸濁液にさせ、異なるいくつかの抗原の発現についてフローサイトメトリーによって分析した。混入しているマウス細胞は、マウスH-2K（主要組織適合性複合体クラスI）を発現する細胞を除去することによって、分析から排除し、死細胞は、生存性染料を用いて除去した。 20

【0231】

充実腫瘍幹細胞モデルから予測されたとおり、細胞は、C D 4 4及びB 3 8. 1を包含する、様々な細胞表面マーカーの不均一発現を示した。これらのマーカーが、腫瘍形成細胞を非腫瘍形成細胞から区別できるか否かを決定するため、これらのi n v i v o継代させたT 1又はT 2細胞から、C D 4 4⁺又はC D 4 4⁻細胞を単離し（図6）、N O D／S C I D系マウスにC D 4 4⁺又はC D 4 4⁻細胞を注入した。 30

【0232】

その他の報知的マーカーの特定

注射後6～12週間に、観察及び触診によって、マウスを腫瘍について調べ、次いで、すべてのマウスを検死して、触診するには過小であり得た注入部位での成長を探した。C D 4 4⁺の注入は、すべて、可視的な腫瘍を生じたがC D 4 4⁻の注入は、検出可能な腫瘍を全く形成しなかった（表5）。次に、第一継代T 1及びT 2からの細胞を、B 3 8. 1の発現に基づいて選別し、マウスに注入した。腫瘍は、B 3 8. 1⁺細胞のすべての注入から出現したが、B 3 8. 1⁻からは腫瘍形成が全く検出されなかった（表5）。したがって、継代した双方の腫瘍からの腫瘍形成細胞は、B 3 8. 1⁺ C D 4 4⁺であった。 40

【0233】

【表5】

表 5
腫瘍T1及び腫瘍T2細胞の異なる集団の腫瘍形成性

	細胞数／注入数		
腫瘍数／注入	8×10^5	5×10^5	2×10^5
T1細胞			
CD44 ⁻	0/2	0/2	-
CD44 ⁺	2/2	2/2	-
B38.1 ⁻	0/2	0/2	-
B38.1 ⁺	2/2	2/2	-
CD24 ⁺	-	-	1/6
CD24 ⁻	-	-	6/6
T2細胞			
CD44 ⁻	0/2	0/2	-
CD44 ⁺	2/2	2/2	-
B38.1 ⁻	0/2	0/2	-
B38.1 ⁺	2/2	2/2	-
CD24 ⁺	-	-	1/6
CD24 ⁻	-	-	6/6

指示されたマーカーの発現に基づき、図2に記載のとおりフローサイトメトリーによって、細胞を単離し、 $2 \sim 8 \times 10^5$ 個の細胞をNOD／SCID系マウスの乳腺脂肪パッドに注入した後に腫瘍を形成できる能力について検定した。形成された腫瘍の数／実施された注入の数を、細胞集団のそれぞれについて示す。

10

20

30

40

50

【0234】

腫瘍は、CD24発現についても不均一であった。200,000個のCD24⁺又はCD24⁻／¹°細胞をNOD／SCID系マウスに注入したとき、CD24⁻／¹°細胞を注入されたマウスは、すべて、腫瘍を成長させた（表5）。CD24⁺細胞を注入された位置で触診によって検出できた腫瘍は、皆無であったが、CD24⁺細胞を注入されたマウス12匹中2匹は、実際には、注入部位に僅かな成長を有し、それは、検死の際にのみ検出できたにすぎない。対照的に、CD24⁻／¹°細胞を注入された部位は、すべて、直径が1cmより大きい腫瘍を有して、視覚的に、かつ触診によって容易に明白であった。フローサイトメトリーによってCD24⁺画分からCD24⁻細胞を完全に除去するのは、極めて困難であることから、僅かな成長は、代表的には選別されたCD24⁺集団中に存在する、1～3%のCD24⁻細胞による汚染を表わす可能性が高い。これに代えて、この僅かな成長は、増殖能が低下したCD24⁺癌細胞から生じた可能性もある。現時点では、本発明者らは、これらの可能性を区別することができない。にもかかわらず、この異種移植片モデルで触診可能な腫瘍を形成した細胞は、すべて、B38.1⁺CD44⁺CD24⁻／¹°であった。

【0235】

正常な細胞型に付随する、本発明者らが集合的にLINEAGE（CD2、CD3、CD10、CD14、CD16、CD19、CD31、-CD45、-CD64及び-CD140b）と称するいくつかの抗原は、多数回マウスで継代させた腫瘍の分析に基づき、癌細胞によって発現されないことが見出された。LINEAGE⁺細胞を排除することによって、正常なヒト白血球、内皮細胞及び繊維芽細胞が、特に未継代又は第一継代腫瘍から

排除された。

【0236】

NOD／SCID系マウスに確立された腫瘍のうち4例のフローサイトメトリー分析によって、これらの腫瘍は、すべて、B38. 1、CD44及びCD24の発現に関して不均一であることが明らかにされた（例えば、図7A、7Bを参照されたい）。しかし、腫瘍は、それぞれ、B38. 1⁺CD44⁺CD24⁻／¹°細胞の明確な集団を含んだ。NOD／SCID系マウスにおける1継代後に分析した、独立した4例の腫瘍では、B38. 1⁺CD44⁺CD24⁻／¹°細胞の頻度は、生存ヒト腫瘍細胞の9. 5±4. 5%（平均±標準偏差）であった。接種の7週間後に、B38. 1⁺CD44⁺CD24⁻／¹°LINEAGE⁻細胞及びB38. 1⁺CD44⁺CD24⁺LINEAGE⁻細胞の注入部位を、組織学によって調べた。B38. 1⁺CD44⁺CD24⁻／¹°LINEAGE⁻注入部位は、直径が1cmより大きい腫瘍を含んだが、B38. 1⁺CD44⁺CD24⁺LINEAGE⁻注入部位は、検出可能な腫瘍を全く含まなかった。B38. 1⁺CD44⁺CD24⁺LINEAGE⁻注入の部位では、正常マウス乳腺組織のみが、組織学によって認められたにすぎなかったが（図7K）、B38. 1⁺CD44⁺CD24⁻／¹°LINEAGE⁻細胞によって形成された腫瘍は、ヘマトキシリン及びエオジン染色された切片における形態学によって判定された限りで、悪性細胞を含んだ（図7L）。B38. 1⁺CD44⁺CD24⁺LINEAGE⁻注入部位は、11週間後に調べたときでさえ、腫瘍は全く検出されなかった。

10

【0237】

B38. 1、CD44、CD24及びLINEAGEマーカーを用いた腫瘍形成細胞の富化

T1、T2、及びT3、すなわちNOD／SCID系マウスで1回継代された第三の腫瘍を、腫瘍形成細胞は、B38. 1、CD44、CD24及びLINEAGEマーカーの発現に基づいて富化できるか否かを決定するために、試験した。すべての事例で、B38. 1⁺CD44⁺CD24⁻／¹°細胞は、腫瘍形成細胞が顕著に富化された。未選別T1又はT2細胞を注入したときは、5×10⁴個の細胞が、一貫して腫瘍を生じたが、10⁴個の細胞は、少数の事例にのみ腫瘍を生じたにすぎない（表6）。対照的に、B38. 1⁺CD44⁺CD24⁻／¹°LINEAGE⁻細胞をT1又はT2から単離したときは（図7）、この集団からの10³という僅かな細胞が、すべての事例で腫瘍を生じることができた（表6、図7J及び7L）。B38. 1⁺CD44⁺LINEAGE⁻であるが、CD24⁺である細胞は、腫瘍を形成できなかった。これらのデータは、B38. 1⁺CD44⁺CD24⁻／¹°LINEAGE⁻集団は、NOD／SCID系マウスに腫瘍を形成できる能力が未分画腫瘍細胞に比して少なくとも10倍富化されることを示す。この集団は、T1及びT2内の細胞の4～17%を占めた（癌細胞の5～23%）。

20

30

【0238】

実施例7

ヒト原発性腫瘍細胞の分析

実施例7の富化された集団における腫瘍形成活性が、異種移植片モデル内での繁殖の結果として生じた可能性を排除するため、凍結させなかった胸水乳癌細胞を、CD44及びCD24の発現に基づいて単離した。新生物細胞の約11%がCD44⁺CD24⁻／¹°LINEAGE⁻であり、75%がCD44⁺CD24⁺LINEAGE⁻であった。100, 000のCD44⁺CD24⁻／¹°LINEAGE⁻の注入3例は、すべて、腫瘍を形成したが、CD44⁺CD24⁺LINEAGE⁻細胞は、全く形成しなかった（図6）。次に、非継代乳腫瘍標本からのB38. 1⁺CD44⁺CD24⁻／¹°集団（図7I）が腫瘍形成性であるか否かを試験した。マウスに継代した後に分析した、独立した腫瘍4例のうち、フローサイトメトリーを許すのに十分な唯一の凍結されたT1の非継代細胞が、入手できたにすぎなかった。加えて、第五の患者からの凍結非継代細胞（T5）を分析した。非継代T1細胞の5%、及び非継代T5細胞の35%が、B38. 1⁺CD44⁺CD24⁻／¹°LINEAGE⁻であった。

40

50

【0239】

40,000のB38.1⁺CD44⁺CD24⁻/L^oLINEAGE⁻細胞、又は非継代T1からフローサイトメトリーによって単離した40,000のB38.1⁺CD44⁺CD24⁺L^oLINEAGE⁻細胞を、すべて、1匹のマウスに注入した。非継代T5細胞からは、60,000~100,000細胞のB38.1⁺CD44⁺CD24⁻/L^oLINEAGE⁻集団(図7I)、及びB38.1⁺CD44⁺CD24⁺L^oLINEAGE⁻集団(図7F)が単離され、NOD/SCID系マウス3匹のそれぞれに、これを注入した。CD24⁻/L^o集団は、T1細胞から腫瘍を、T5細胞からは3例の注入中2例に腫瘍を形成したが、CD24⁺集団は、決して腫瘍を形成せず、継代された腫瘍で特定された腫瘍形成集団は、非継代T1及びT5サンプル中にも存在することを立証した。非継代T1細胞から生じた腫瘍を分析したときは、B38.1⁺CD44⁺CD24⁻/L^oLINEAGE⁻細胞の頻度は、継代及び非継代T1双方のサンプル中のと同様であった。

【0240】

【表6】

表 6 腫瘍形成性乳癌細胞はCD44 ⁺ B38 ⁺ CD24 ⁻ 集団で著しく富化される									
細胞注入	各細胞投与量についての腫瘍数/注入数								
	5x10 ⁵	1x10 ⁵	5x10 ⁴	2x10 ⁴	1x10 ⁴	5x10 ³	1x10 ³	5x10 ²	2x10 ²
T1細胞(異種移植)									
ソートなし	4/4	4/4	6/6	-	2/6	-	0/6	-	-
B38.1 ⁺ CD44 ⁺ CD24 ⁺	-	-	-	0/5	0/5	0/5	0/5	-	-
B38.1 ⁺ CD44 ⁺ CD24 ⁻	-	-	-	5/5	5/5	5/5	5/5	-	-
ESA ⁺ B38 ⁺ CD24 ⁺	-	-	-	-	-	-	8/8*	2/2	1/2
ESA ⁺ B38 ⁺ CD24 ⁻	-	-	-	-	-	-	0/8*	0/2	0/2
T2細胞(異種移植)									
ソートなし	4/4	4/4	4/4	-	1/6	-	0/6	-	-
B38.1 ⁺ CD44 ⁺ CD24 ⁺	-	-	-	0/5	0/5	0/5	0/5	-	-
B38.1 ⁺ CD44 ⁺ CD24 ⁻	-	-	-	5/5	5/5	5/5	5/5	-	-
T3細胞(異種移植)									
B38.1 ⁺ CD44 ⁺ CD24 ⁺	-	-	-	-	0/2	-	-	-	-
B38.1 ⁺ CD44 ⁺ CD24 ⁻	-	-	-	-	2/2	-	-	-	-
T5細胞(ブライマリ)									
CD44 ⁺ CD24 ⁺		0/3							
CD44 ⁺ CD24 ⁻		3/3							
T1細胞(ブライマリ)									
B38.1 ⁺ CD44 ⁺ CD24 ⁺			0/1						
B38.1 ⁺ CD44 ⁺ CD24 ⁻			1/1						
T6細胞(ブライマリ)									
B38.1 ⁺ CD44 ⁺ CD24 ⁺		0/1	0/2						
B38.1 ⁺ CD44 ⁺ CD24 ⁻		1/1	1/2						

第一継代腫瘍T1、腫瘍T2又は腫瘍T3細胞から細胞を単離した。B38.1⁺CD44⁺CD24⁻/L^oLINEAGE⁻及びB38.1⁺CD44⁺CD24⁺L^oLINEAGE⁻細胞を、図3に記載のフローサイトメトリーによって単離した。各表現型の指示された数の細胞を、NOD/SCID系マウスの乳腺脂肪パッドに注入した。各群の細胞の注入から形成された腫瘍の数を示す。B38.1⁺CD44⁺CD24⁻/L^oLINEAGE⁻細胞の単離は、腫瘍形成細胞の10倍を超える富化を招き、B38.1⁺CD44⁺CD24⁺L^oLINEAGE⁻細胞の注入からは、腫瘍が全く生じないことに注目されたい。細胞をB38.1⁺CD24⁺に加えてESA⁺として選別したときは、200細胞という僅かな注入が、腫瘍を生じて、選別しなかった細胞に比して、腫瘍形成性の約50倍の富化を生じた。
*これらの注入については、1x10³に代えて、2x10³を用いた。

【0241】

実施例8

乳癌腫瘍からの細胞集団のそれ以上の特性記述

一腫瘍で、B38.1⁺CD44⁺CD24⁻/L^o集団のESA⁺サブセットを選別することによって、腫瘍形成細胞をさらに富化した。ESA⁺CD44⁺CD24⁻/L^oLINEAGE⁻細胞をT1から単離したとき(図8A)、この集団からは200という少数の細胞が、腫瘍を生じることができたが、B38.1⁺CD24⁻/L^oLINEAGE⁻であるがESA⁻の細胞2,000個の注入は、いずれの場合も腫瘍を形成できなかった(図6)。少なくとも10,000の未分画細胞が、何らかの腫瘍を形成するのに必要とされた。したがって、ESA⁺B38.1⁺CD24⁻/L^oLINEAGE⁻集

団は、選別されなかった腫瘍細胞に比して、腫瘍を形成できる能力が少なくとも50倍富化されている。E S A⁺ B 3 8 . 1⁺ C D 2 4⁻ /¹ ° L I N E A G E⁻ 集団は、T 1 細胞の2~4% (癌細胞の2.5~5%)を占める。E S A⁺ B 3 8 . 1⁺ C D 2 4⁻ /¹ ° L I N E A G E⁻ 細胞及び非腫瘍形成細胞を、細胞学によって調べ、両集団とも、外見が実質的に区別できない、悪性細胞からなった。

【0242】

実施例9

乳癌細胞の増殖向け組織培養条件を改良するための癌幹細胞の使用

組織培養では、少数の原発性腫瘍細胞のみが、コロニーを形成できるにすぎないことが、長く公知となっている。充実腫瘍幹細胞モデルによれば、細胞の非腫瘍形成集団は、多少の増殖できる能力を保持している可能性があるが、細胞の腫瘍形成集団は、そうするための、より大きい余地を有すると思われる。原発性腫瘍から直接にか、又はマウスで成長中の腫瘍T 1 及び腫瘍T 2 から単離された、等しい数の腫瘍形成表現型、及び非腫瘍形成細胞を、組織培養プレートにクローン密度で播種し、コロニー形成を測定した。原発性の患者の細胞は、乳癌細胞系を容易に形成し、組織培養中で十分に増殖する腫瘍からの凍結原発性細胞のアリコートからの細胞であった。

10

【0243】

細胞学は、集団が、それぞれ、上皮起源の癌細胞を含むことを示した (図9)。

【0244】

初めに、コロニーは、腫瘍形成細胞からばかりでなく、いくつかの腫瘍では、非腫瘍形成細胞からも形成された (図9)。しかし、12日目までに、腫瘍形成細胞が形成したコロニーは、成長したが、非腫瘍形成細胞は、死滅した (図9)。14日目までには、B 3 8 . 1⁺ C D 4 4⁺ C D 2 4⁺ L I N E A G E⁻ 細胞のみが、癌細胞の無数の大コロニーを形成したにすぎない (図9C)。

20

【0245】

これらの細胞を、組織培養内で3代にわたって継代させ、上皮性新生物細胞は、増殖し続けた。対照的に、非腫瘍形成細胞は、2~4個の細胞からなる小コロニーのみを形成できたにすぎず、数日後には、増殖を停止した (図9C)。

【0246】

これらの結果は、二つの重要な点を示している。第一に、幹細胞の表現型は、免疫不全マウスアッセイの人為的産物ではない。表現型上は同一である細胞集団が、増大した増殖能力をマウス異種移植片モデルと *i n v i t r o* アッセイとの双方で有するという事実は、この集団が、乳癌の患者に見出される細胞の腫瘍形成集団であることを示している。

30

【0247】

第二に、非腫瘍形成細胞の少なくともいくつかは、限定された増殖の余地を有する。このことは、非腫瘍形成集団を特定するのに用いられたマーカーが、生存性を欠く細胞についての単なる選別ではないことを示している。

【0248】

これらの結果は、本実施例が、*i n v i t r o* クローン形成アッセイを化学療法薬物の感受性を予測するのに用いることは、しばしば、治療法に対する特定の患者の応答を予測しないという問題に解決を与える。本実施例に用いられた腫瘍の一つでは、細胞の非腫瘍形成集団が、4日目には腫瘍形成細胞 (本発明の充実腫瘍幹細胞) とほとんど同程度に効率的にコロニーを形成した。この腫瘍を薬物スクリーニングアッセイに用いるのに、*i n v i t r o* でクローン形成性である非腫瘍形成及び腫瘍形成細胞が、特定の試験化合物に異なって応答するならば、アッセイは、特に早期に採点したならば、試験化合物が乳癌幹細胞を *i n v i v o* で排除できる能力を反映しなかったであろう。

40

【0249】

実施例10

幹細胞集団は、幹細胞と非腫瘍形成性細胞集団との両方を再生する

決定論的充実腫瘍幹細胞モデル (図1B) によると、B 3 8 . 1⁺ C D 4 4⁺ C D 2 4⁻

50

$\text{CD}44^+ \text{CD}24^- / \text{LINEAGE}^-$ 腫瘍形成性細胞は、さらに別の $\text{B}38.1^+ \text{CD}44^+ \text{CD}24^- / \text{LINEAGE}^-$ 腫瘍形成性細胞と表現型が不均一の非腫瘍形成性細胞集団とを含む腫瘍を形成する。古典的モデルでは、 $\text{B}38.1^+ \text{CD}44^+ \text{CD}24^- / \text{LINEAGE}^-$ 細胞から形成される腫瘍は、単に個数が増加した $\text{B}38.1^+ \text{CD}44^+ \text{CD}24^- / \text{LINEAGE}^-$ 細胞からなると示唆されるところである。

【0250】

1,000個の $\text{B}38.1^+ \text{CD}44^+ \text{CD}24^- / \text{LINEAGE}^-$ 細胞から生じた腫瘍を解離し、 $\text{B}38.1$ 、 $\text{CD}44$ 及び $\text{CD}24$ の発現についてフローサイトメトリーで分析した（図10）。決定論的充実腫瘍幹細胞モデルから予想されるように、移植 $\text{B}38.1^+ \text{CD}44^+ \text{CD}24^- / \text{LINEAGE}^-$ 細胞から生じた腫瘍から得た細胞は、全てのマーカーの発現について不均一であった（図10C及び図10F）。どのケースにおいても、 $\text{B}38.1^+ \text{CD}44^+ \text{CD}24^- / \text{LINEAGE}^-$ 細胞によって誘導された腫瘍から単離された細胞のマーカー発現パターンは、元の腫瘍と似たパターンを示した（図10A及び図10B、図10C及び図10E、図10Fと比較）。

【0251】

$\text{B}38.1^+ \text{CD}44^+ \text{CD}24^- / \text{LINEAGE}^-$ 細胞により形成された腫瘍が、他の非腫瘍形成性細胞に加えて腫瘍形成性 $\text{B}38.1^+ \text{CD}44^+ \text{CD}24^- / \text{LINEAGE}^-$ 細胞を含有するかどうかを試験した。 $\text{B}38.1^+ \text{CD}44^+ \text{CD}24^- / \text{LINEAGE}^-$ 細胞又は $\text{B}38.1^+ \text{CD}44^+ \text{CD}24^+ \text{LINEAGE}^-$ 細胞は1000個の $\text{B}38.1^+ \text{CD}44^+ \text{CD}24^- / \text{LINEAGE}^-$ 細胞を7週間前に注射することにより開始した第2継代T1腫瘍から単離した。1000個の細胞は一回の注射について第3継代の腫瘍を形成するために4個体の動物の各々に投与した。元のT1及びT2腫瘍に対すると同様に全4つの $\text{B}38.1^+ \text{CD}44^+ \text{CD}24^- / \text{LINEAGE}^-$ 集団の注射は、新規な腫瘍を生じたが、 $\text{B}38.1^+ \text{CD}44^+ \text{CD}24^+ \text{LINEAGE}^-$ 集団は新規な腫瘍を生じなかった。

【0252】

本実施例は、 $\text{B}38.1^+ \text{CD}44^+ \text{CD}24^- / \text{LINEAGE}^-$ 集団が、さらに別の腫瘍形成性 $\text{B}38.1^+ \text{CD}44^+ \text{CD}24^- / \text{LINEAGE}^-$ 細胞と、表現型が異なる非腫瘍形成性細胞との両方を形成することを実証している。

【0253】

実施例11

異なる新生細胞集団による、潜在的な治療標的対象の発現

決定論的充実腫瘍幹細胞モデル（図1B）において、腫瘍形成性腫瘍細胞と非腫瘍形成性腫瘍細胞とによる遺伝子発現は異なりうる。現在の癌治療では大幅な結果の改善は困難であるが、これは非腫瘍形成性細胞が治療の標的になりやすく、数の少ない腫瘍形成性充実腫瘍幹細胞が標的になりにくいということに原因がある。ある治療で非腫瘍形成性集団のみを破壊して腫瘍を小さくしても、残っている腫瘍形成性充実腫瘍幹細胞が腫瘍の再生を引き起こす可能性がある。

【0254】

EGF受容体（EGF-R）又はHER2/neuのいずれかの発現について、第一継代T1細胞を調べた。EGF-R及びHER2/neuは、乳癌細胞増殖に関与していると考えられている潜在的な治療標的対象である。非腫瘍形成性細胞に比べて、腫瘍形成性T1細胞は抗EGF-R抗体による染色性が低く、腫瘍形成性細胞におけるEGF-R発現は、1個の細胞レベルでは検出できなかった（図11）。

【0255】

検出可能なレベルでEGF-Rを発現しなかった細胞が腫瘍形成性であることを調べるために、1,000-2,000個の $\text{EGFR}^- \text{B}38.1^+ \text{CD}24^- \text{LINEAGE}^-$ 細胞をNOD/SCIDマウスに注射した。4例中全てにおいて腫瘍が形成され、EGF-R⁻細胞が腫瘍形成性であることが確認された。これに対して、腫瘍形成性T1細胞と非腫瘍形成性T1細胞との間に、HER2/neu発現の実質的な違いを検出することはで

きなかった（図11B及び図11E）。

【0256】

充実腫瘍幹細胞モデルから予想されるように、1,000-2,000個のHER2/neu⁺B38.1⁺CD24⁻LIN E A G E⁻細胞は、4例中全てにおいて腫瘍を形成した。本実施例は、治療標的対象の発現について、腫瘍形成性集団と非腫瘍形成性集団との間に差異があり得ることを示している。

【0257】

これらの実験は、充実腫瘍の幹細胞モデルの原理を証明し、下記を実証している。

(a) 腫瘍細胞は表現型上及び機能上不均一である；

(b) FACSによって細胞を分離することで、腫瘍形成性細胞を富化することができる；及び

(c) 腫瘍形成性画分を研究することで、充実腫瘍幹細胞を単離してより厳密な分子的及び生物学的検定を行える。

【0258】

実施例12

Notchが乳癌細胞増殖に役割を担っていることの更なる証拠

Notchが充実腫瘍幹細胞マーカーであるかどうかを調べるために、Notch4⁺細胞とNotch4⁻細胞を分別し、生体外でのコロニー形成能について分析した。驚くことに、どちらの細胞集団も組織培養中で成長しなかった。

【0259】

この結果については2つの説明が考えられる。第一に、細胞の成長には2細胞集団間の相互作用が必要であると考えられる。第二に、抗体がNotch4のアゴニスト又はアンタゴニストのいずれかとして作用し、受容体が活性化又は阻害された結果、腫瘍細胞成長が阻害されることが考えられる。これらの可能性を区別するために、分離していない腫瘍細胞を抗Notch4抗体と共に培養し、可溶性Delta(Notchリガンド)を含む組織培養中にて、生体外でコロニーを形成できるかどうかを調べた。Deltaは、腫瘍から単離されたこの細胞がコロニーを形成するのに必須なものである。対照細胞が組織培養で成長しコロニーを形成した（図12A）のに対し、Notch4抗体と培養した細胞は成長しなかった（図12B）。抗体を作成するのに用いたペプチド（理論上、このペプチドは抗体と細胞との結合を阻害する）と抗Notch4抗体とを予め保温すると、腫瘍細胞のコロニー形成能が回復する（図12C）。抗Notch2抗体はコロニー形成に影響を与えなかった。

【0260】

腫瘍細胞によるコロニー形成を、Notchが調節していることを確認するために、可溶性Deltaを含む培養基と含まない培養基で細胞を培養した（図12Aと図12D）。Deltaを含む培養基ではコロニーが多数形成されたが（図12A）、可溶性Deltaを含まない培養基又は抗Notch4抗体に接触させた細胞を用いた培養基では、数個の小さなコロニーしか形成されなかった（図12B、図12D及び図12E）。これらのデータは、Notch4経路が細胞中の乳癌細胞の増殖/生存を調節し、抗Notch4抗体が生体外での活性化を阻害することを示唆している。

【0261】

抗Notch4抗体が、生体内での乳癌腫瘍細胞成長を阻害するかどうかについても調べた。まず、20,000、10,000又は5,000個の腫瘍形成性細胞を抗Notch4抗体と、あるいは抗Notch4抗体及び阻止ペプチドと共に培養した。20,000又は10,000個の腫瘍形成性細胞を注射した場合、抗体によって腫瘍の発生を1週間遅らせることができ、5,000個を注射した場合には13日遅らせることができた。これは抗体が生体内での腫瘍形成を阻害していることを示唆している。

【0262】

次いで4種の乳癌細胞系について、Notch4の発現と抗Notch4抗体による成長阻害とを調べた。MCF-7とSKBR-3乳癌細胞系はNotch4を発現し、抗No

10

20

30

40

50

t c h 4 抗体はこれらの細胞の成長を阻害することが分かった。R T - P C R を行ったところ、いずれも N o t c h 4 を発現した。抗 N o t c h 4 抗体が成長を阻害するかどうかを調べるために、5, 0 0 0 個の M C F - 7 細胞を、抗 N o t c h 4 抗体と、或いは抗 N o t c h 4 抗体及び抗体を作成するのに用いたペプチドと、或いは無関係な対照抗体と共に培養した。抗 N o t c h 4 抗体は、両方の細胞系において 1 0 倍以上の強度でコロニー形成を阻害した。

【0263】

本実施例は、N o t c h 4 活性化が充実腫瘍幹細胞の増殖／生存を促進し、抗 N o t c h 4 抗体が受容体活性化を阻害することを示している。

【0264】

実施例 13

遺伝子治療自殺ベクターによる乳癌幹細胞の標的化

乳癌幹細胞は、乳癌の中でわずかしかな存在しない腫瘍細胞である。本発明では、遺伝子治療においてこれらの細胞を標的にすることを目的とする（図 13）。

【0265】

乳癌幹細胞によって発現されたマーカーを用いて、幹細胞をウイルスベクターの標的とした。まず異なる細胞系を 38. 1 抗体で染色し、フローサイトメトリーで分析した。M C F 7、S K B R 3、T 47 D 及び B T 474 乳癌細胞系は強度の陽性を示した。P r o l i n x (P r o l i n x, I n c.、米国ワシントン州ボーセル) 法 [図 14、D o u g l a s J T 他、N a t u r e B i o t e c h n o l o g y 14 (11) : 1574 - 8 (1996) 参照] によって複合した抗繊維 - B 38. 1 抗体を調製した。改変抗 k n o b 抗体と抗 B 38. 1 抗体とを混合したところ、架橋して双特異性複合体を形成した（図 15）。複合体の抗繊維抗体部分はアデノウイルスに結合し、抗 B 38. 1 部分は乳癌幹細胞に結合する。A d L a c Z ウイルスを抗繊維抗体のみと培養したところ、ウイルスの感染性が阻害された（図 16）。ウイルスを双特異性複合体と培養した場合、B 38. 1 抗体を高レベルで発現する細胞においてのみ、感染性が回復した（図 18）。結合していない B 38. 1 抗体によって阻害されるので、再標的化は特異的になる（図 18）。

【0266】

結論として、新規な双特異性複合体はアデノウイルスの感染性を改変し、従来存在する親和性を阻害し、乳癌幹細胞表面マーカーを発現する細胞へ感染を誘導する。

【0267】

実施例 14

乳癌幹細胞における下流標的

本実施例の方法は、癌幹細胞を用いた、N o t c h 関連及び他の抗癌治療を開発する指標を提供する。アレイ法を用いて、特異的な N o t c h リガンドに誘導される N o t c h シグナリングによって調節される分子経路を調べた。R e s e a r c h G e n e t i c s により配列確認済みのヒト c D N A (ミシガン大学 M i c r o a r r a y N e t w o r k より入手) を、C a n c e r a n d M i c r o a r r a y 施設にて配列比較した。自己再生する乳癌幹細胞又は腫瘍から得た様々な細胞集団から、プローブを調製した。プローブを配列にハイブリダイズし、C a n c e r a n d M i c r o a r r a y 施設によってハイブリダイゼーションパターンを読みとった。次いでハイブリダイゼーションパターンを分析し、様々な N o t c h リガンドによって刺激された乳癌幹細胞と、刺激を与えていない細胞とから得たプローブにハイブリダイズする遺伝子を同定した。同定された遺伝子は、乳癌細胞の生存又は自己再生の調節に関与する遺伝子であると考えられる。

【0268】

マイクロアレイの調製。マイクロアレイ法を用いて造血幹細胞の遺伝子発現を分析してきたが、この作業を癌幹細胞に適用した。

【0269】

現在、ミシガン大学 M i c r o a r r a y N e t w o r k は R e s e a r c h G e n e t i c s から入手した 32, 500 個の配列確認済みヒト c D N A 配列を有している。N

10

20

30

40

50

C Iと共同して、「癌」チップを組み立てた。このチップは、増殖及び腫瘍形成に関与する1, 200個の遺伝子配列を包括的に含んでいる。ミシガン大学は「アポトーシスチップ」も開発しているが、このチップにはプログラム細胞死に関与することが知られている遺伝子が全て含まれている。特に、N o t c hの下流標的として知られるH E S遺伝子が配列に含まれている。

【0270】

乳癌幹細胞からのプローブの調製。精製したばかりの乳癌幹細胞から、又は様々なN o t c hリガンドの存在下／非存在下で培養した乳癌幹細胞から、メッセンジャーRNAを単離した。必要であれば、例えばPCR又は線形RNA増幅[Wang他、Nature Biotechnology 18: 457-459 (2000年4月)]によって、RNAを増幅する。オリゴdTプライマーからの逆転写によってプローブを調製し、CY3又はCY5複合ヌクレオチドに結合して標識化する。単離したばかりで培養を行っていない乳癌細胞から調製したプローブと、培養した乳癌細胞[適当なN o t c hリガンド(例えばF r i n g e族を単独で又は組み合わせて用いる。腫瘍細胞の異なる集団によってどのリガンドが発現されるかに基づいて決定する)に接触した細胞など]から調製したプローブを用いて、遺伝子発現の概要を調べた。これらのアッセイを行うために、経膜領域を除去した可溶性のD e l t a又はJ a g g e d族、あるいは分泌性蛋白質のF r i n g e族の一つに細胞を接触させた。バキュロウイルス又は哺乳類発現ベクターによってそれぞれトランスフェクトした昆虫細胞又は哺乳類細胞から、D e l t a、J a g g e d及びF r i n g e族それぞれのN o t c hリガンドの組換え蛋白質を作製した。

【0271】

対照乳癌腫瘍形成性細胞と様々なN o t c hリガンドに接触させた腫瘍形成性細胞との間で、遺伝子発現パターンを比較した。様々なN o t c hリガンドと培養した乳癌幹細胞から作製した、異なる蛍光物質で標識したプローブに、各腫瘍由来の乳癌幹細胞から得たプローブを結合し、ハイブリダイゼーションパターンを比較した。まずF A C Sによって乳癌幹細胞を単離した。細胞間のN o t c h相互作用を避けるために、細胞密度を1個として細胞を培養した。細胞を可溶性D e l t a(実施例6参照)、D e l t a様、J a g g e d 1、J a g g e d 2又は各F r i n g eに接触した。個々の細胞集団が示すN o t c hリガンド発現パターンに基づいて、単独の及び組み合わせた各蛋白質に細胞を接触させた。各実験条件で得たプローブにハイブリダイズしたマイクロアレイを比較分析し、N o t c hリガンド相互作用によって影響される分子経路を仮定した。例えば、ある細胞集団がD e l t aとM a n i c F r i n g eを発現する場合、乳癌幹細胞の第1群をD e l t aのみに、第2群をD e l t aとM a n i c F r i n g eに、第3群をM a n i c F r i n g eのみに接触させた。Cy5又はCy3標識を用いて各群からcDNAを作製し、これを用いてマイクロアレイチップを精査する。更に、対照培養基で培養された細胞と単離したばかりの乳癌細胞とから作製したcDNAと共に、各群から得たcDNAを用いてマイクロアレイチップを精査する。各群の比較を5回行って、各試験群の配列遺伝子の発現パターンにおける差異が、実際に存在するものであるかを確認する。

【0272】

抗N o t c h 4抗体で処理した細胞からのプローブの調製。N o t c h 4に対する抗体は、生体外で成長を、生体内で腫瘍形成を阻害する。抗体がN o t c h 4アゴニスト又はアンタゴニストのいずれかとして作用するとすれば、この効果を説明することができる。可溶性D e l t aは生体外での癌細胞成長を促進するので、抗体はおそらくN o t c h 4アンタゴニストである。抗N o t c h 4抗体が腫瘍の成長を阻害する機構を調べるために、抗N o t c h 4の存在下又は非存在下で又は対照の無関係な抗体及びN o t c hリガンドの様々な組合せとで培養した細胞からプローブを作製し、上記したようにマイクロアレイ発現分析に使用した。別の対照群では、抗体の存在下かつN o t c hリガンドの非存在下で培養した細胞を用いた。独立して調製したプローブ群を用いた独立した6回の実験で、それぞれの比較を行った。各群の遺伝子発現パターンを比較することによって、抗N o t c h 4抗体がN o t c hシグナリングにどのように影響を与えるかを調べることができる

。

【0273】

cDNAプローブの作製。1-2 μg の mRNA を用いて、マイクロアレイ上の遺伝子発現プロファイルスクリーニング用プローブを合成した (Wang 他、Nature Biotechnology 18: 457-459 (2000年4月))。各実験において3枚のスライド1セット (計32, 500のcDNAを含む) をスクリーンしたので、6 μg の mRNA が各アッセイに必要であった (6 μg の mRNA の逆転写で約3 μg の cDNA プローブが産生される。或いはスライド1枚あたり1 μg のプローブが産生される)。癌細胞の RNA 濃度は高いという傾向がある。これまでのアッセイでは、 10^7 個の癌細胞からは約100 μg の全 RNA が産生され、約3 μg のポリA⁺ RNA が産生されている。従って、6 μg の mRNA を産生するためには、約 2×10^7 個の細胞が必要である。予備的なデータが示すように、フローサイトメトリーで精製された乳癌幹細胞を上記個数用意するのに、約5-10個の1cm腫瘍から単離することができる。

10

【0274】

腫瘍内の全細胞数の約5%が乳癌幹細胞である。解離したばかりの (培養を行っていない) 乳癌幹細胞をフローサイトメトリーで1日に 10^6 個以上単離するのは実用的ではない。この方法だと、1日に選別できる細胞から得られる mRNA は0.5 μg 未満である。選別した乳癌幹細胞を数日分蓄積し、単離されたばかりの細胞からプローブを調製するのに十分な量の mRNA を得ることができるが、全てのアッセイをこの方法で行うのは実用的ではない。あるアッセイでは組織培養中で短期間培養する必要がある。選別した細胞の培養効率は約10%である。従ってプローブ合成の前に酵素を用いて鋳型を増幅する必要がある。増幅はPCR又はT7 RNAポリメラーゼを用いた線形増幅によって行うことができる。本実施例では15-18回のPCRを繰り返して少量の幹細胞からcDNAを増幅した。この方法を用いて高品質の造血幹細胞 (HSC) cDNAライブラリーを構築し、造血幹細胞からプローブを作製した。単離されたばかりの乳癌幹細胞からプローブを作製するのに、同様の方法を用いた。あるいは線形RNA増幅を用いてマイクロアレイハイブリダイゼーション用のプローブ作製に成功している例が数多く報告されている。従って両方の方法でプローブを調製し、得られるハイブリダイゼーションパターンを調べることによって、2種の方法を比較した。T7 RNAポリメラーゼ結合部位を有するオリゴdTプライマーを用いてcDNAの開始点とし、Superscript逆転写酵素 (Gibco) とcDNA 5'末端への標識化を可能にするClontech 5'スイッチオリゴマーとを用いて、cDNAを合成した。大腸菌DNAポリメラーゼを用いて第2のcDNA鎖を合成した。次いでT7 RNAポリメラーゼ又はPCRによって増幅RNA (aRNA) を作製した。どちらの増幅方法を採用するかは標準的cDNA合成において作製されたプローブを比較することによって決定した。aRNAを調製した後、ランダム六量体を用いてcDNAを再合成した。このcDNAはそのままプローブに用いることもできるが、必要であれば更にもう一度増幅工程を行ってもよい。両方の方法を用いて、40,000個のMCF-7細胞 (ヒト乳癌幹細胞系) からプローブを調製した。このプローブを、増幅していないMCF-7細胞から得たプローブと共にヒトcDNAマイクロアレイにハイブリダイズした。非増幅プローブのハイブリダイゼーションパターンに最も近いパターンを再生した増幅方法を選択した。次いで非増幅プローブのハイブリダイゼーションパターンにできるだけ近いパターンを増幅プローブが再生するまで、増幅条件を変更した。

20

30

40

【0275】

ハイブリダイゼーションパターンの分析。Cancer and Microarray Core施設においてレーザー自動読み取りシステムを用いてハイブリダイゼーションパターンを分析した。Genomics Solutionsから入手可能な製品を用いて、配列化、ハイブリダイゼーション、スキャニング及びハイブリダイゼーションパターンの分析を一括して行うシステムを用いれば、均一で効率のよいハイブリダイゼーションパターン分析を行うことができる。

【0276】

50

プローブ間で標準化ハイブリダイゼーションレベルに少なくとも3倍の差異が存在すれば、転写は差異的に発現される。各プローブの有効濃度に存在しうる差異を補正するために、1回の試験内でのCy3及びCy5標識化プローブからのハイブリダイゼーションシグナルをそれぞれに対して正規化した。プローブの量又は標識化効率における差異を補正するために、各群について逆色の蛍光標識を用いて各試験を繰り返した。

【0277】

差異的発現の検証。細胞群からのプローブに一貫してハイブリダイズするが、対照細胞群からのプローブにはハイブリダイズしないcDNAについて、さらに特徴を調べた。これらのcDNA配列はMicroarray Networkから入手した。2種の方法を用いて、細胞集団間における候補遺伝子の差異的発現を確認した。第1の方法では、候補遺伝子に対するインシトゥハイブリダイゼーションプローブを調製し、上記した様々なNotchリガンドの存在下又は非存在下に培養した乳癌幹細胞について、インシトゥハイブリダイゼーションを行った。次いで培養細胞にインシトゥハイブリダイゼーションを行った。この方法の利点は、各細胞レベルで発現を比較できることにある。

10

【0278】

第2の方法では、候補遺伝子に対する入れ子PCRプライマーを設計し、精製したばかりの乳癌幹細胞（上記方法で単離）の複数の1-10細胞アリコットについてRT-PCRを行う。少量の細胞についてRT-PCRを行うことによって、「非発現」集団が極少数の発現細胞を含んでいる場合でも、特定の転写を増幅する能力における差異を観察することが可能になる。この方法を用いて、多分化能造血原始細胞の異なる副集団間での、RGS18の差異的発現を実証した。

20

【0279】

ノーザン分析による差異的発現の確認。Notchリガンドの存在下又は非存在下で培養した $1-2 \times 10^7$ 個の乳癌幹細胞から得たポリA⁺RNAを、差異的に発現したcDNAのプローブでハイブリダイズした。これらの試料間でハイブリダイゼーションシグナルを定量的に比較した。

【0280】

次いで、遺伝子が蛋白質レベルで差異的発現されていることを確認した。免疫細胞化学染色を用いることができない場合には、異なる細胞から得た蛋白質についてウェスタンブロット法を行った。

30

【0281】

異種移植モデルで長期に増殖するだけの初代乳癌細胞を用いた場合、ある種の分子分析は実施が難しい。このような分析は細胞系にて行うことができるが、本発明者らがかつて研究した、細胞系の初期継代を含む、多くの乳癌細胞系を用いることができる（Clark他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:11024-28（1995年11月）；Hernandez-Alcoceba他、Human Gene Therapy 11（11）:20（2000年9月）。初代乳癌細胞についてのアッセイで述べたように、様々なNotchリガンド、抗Notch4抗体又は対照抗体の存在下又は非存在下に、これらの細胞系を細胞密度を1個として培養した。クローン原性がNotchシグナリングによって影響を受ける場合には、マイクロアレイ分析のプローブを、様々なNotchリガンド、或いは抗Notch4抗体又は対照抗体の存在下又は非存在下に培養した細胞系から得たcDNAを用いて作製する。実質的に無限数の細胞を分析することができるので、増幅していないプローブを作製することができる。

40

【0282】

最後に、細胞系を用いることで、抗Notch4抗体がアゴニストであるかアンタゴニストであるかを有利に確認した。クローン原性が可溶性Deltaによって強化され抗Notch4抗体によって阻害されるということが、ある細胞系について同定された場合、その細胞系をこれらのアッセイに用いる。Notch誘導性HET-1プロモーターの制御下にて、ルシフェラーゼミニ遺伝子で安定的に細胞をトランスフェクトした〔Jarriault他、Molecular & Cellular Biology 18（12）: 50

50

7423-31(1998年12月)]。細胞-細胞、N o t c h-N o t c hリガンド相互作用を避けるために、細胞濃度1で細胞を培養した。これらの細胞を、N o t c hリガンドの様々な組合せと、抗N o t c h4抗体又は対照抗体のいずれかとで処理した。細胞を回収しルシフェラーゼアッセイを行い、各条件がどのようにN o t c hシグナルトランスダクションに影響を与えるか(H E T 1プロモーターの転写促進として反映される)を調べた。

【0283】

マイクロアレイ分析から明らかになってきた候補遺伝子の、包括的機能分析を行うことができる。全長c D N Aを単離し、レトロウイルス発現ベクター内にクローニングした。5個の異種移植腫瘍から単離した乳癌細胞系及び乳癌幹細胞を生体外で感染し、対照ベクターで感染したクローンに比較して、レトロウイルス導入遺伝子が自己再生性及び腫瘍形成性に与える影響を検定した。導入遺伝子はI R E S-G F Pを含むバイシストロン性メッセージとして発現される。これによってF A C S又は蛍光顕微鏡を用いた、形質導入細胞の同定が可能になる。導入遺伝子がN o t c hシグナリングに与える影響を生体外及び生体内で調べた。これには、組織培養でのコロニー形成及びマウスの腫瘍形成性に影響を与えると判明したN o t c hリガンドの様々な組合せに対して、形質導入細胞に応答性があるかどうかを調べた。

10

【0284】

候補遺伝子の発現パターンを生体内で詳細に調べ、遺伝子が異種移植を超えてどれだけ広く発現されるかを調べた。初代乳癌の切片から得た組織片の大量なインシットゥハイブリダイゼーションに加えて、研究対象として選択された遺伝子産物に対する抗体を作製した。ミシガン大学のH y b r i d o m a C o r e施設では、ペプチドと発現された組換え蛋白質との両方を用いたモノクローナル抗体の調製が盛んに行われている。

20

【0285】

最終的には、遺伝子ターゲティングで作製したノックアウトマウスを用いて、未知の遺伝子の機能を生体内で調べた。ミシガン大学のT r a n s g e n i c C o r eはハツカネズミE S細胞技術を確認しているが、高い率で「生殖細胞系に入る」E S細胞を提供し、相同遺伝子組換えE Sクローンの作製を補助している。

【0286】

マイクロアレイ分析によって多くの遺伝子の発現を同時に比較することができるが、これによって遺伝子発現パターンにおける変化をスクリーニングする非常に強力な手段が提供される。生体外で幹細胞を精製し自己再生性と分化を調節する技術と組み合わせて、特殊な型の調節遺伝子のスクリーニングを非常に正確に行うことができるマイクロアレイ分析を達成できる。

30

【0287】

実施例15

N o t c hシグナリングが乳癌形成に与える影響

正常な乳房の成長と発達におけるN o t c hの重要性を確認するために、N o t c hリガンド又はアゴニストペプチドが乳房腫瘍幹細胞の成長及び腫瘍形成に与える影響を調べた。

40

【0288】

N o t c h活性化が生体内で腫瘍形成に与える影響。N o t c hリガンドの様々な組み合わせが腫瘍形成に与える影響について、実施例14で得たマイクロアレイデータとの関係を調べた。これらのアッセイは、悪性乳癌細胞の富化培養前後の異種移植腫瘍細胞を用いて行った。これによってN o t c hが幹細胞と原始細胞に与える影響をそれぞれ区別することが可能になった。N o t c hリガンドが各癌細胞集団の成長及び分化に与える影響を、生体内アッセイを用いて決定した。

【0289】

N o t c h刺激が生体内で腫瘍の成長に与える影響を調べるために、1,000個、10,000個、100,000個の乳癌腫瘍細胞を、可溶性N o t c hリガンド1種又は2

50

種以上の組合せと共に培養してあるいは対照培養基で培養して、NOD／SCIDマウスに（それぞれ6複製を）注射した。可溶性形状のDelta、Delta様、Jagged1及びJagged2と、Fringe族を用いた。各リガンド又はリガンドの様々な組合せと共に細胞を別々に2時間培養した。Notchリガンドと共に細胞をMatrigel（R）に懸濁し、次いでマウスに注射した。腫瘍を形成するのに必要な細胞の数と、腫瘍を形成するのに必要な時間との両方に、各Notchリガンド刺激が与える影響を調べた。これによってNotchが生体内で腫瘍の成長に影響を与えるかどうかを調べることができる。

【0290】

前出の実施例において、抗Notch4抗体は、細胞と一回の短い培養を行うことによって腫瘍形成を妨げた。次に5個の異種移植腫瘍それぞれから得た1,000、10,000、100,000個の腫瘍形成性細胞を、対照抗体又は抗Notch4抗体のいずれかのみ、又は様々な組合せでDelta、Jagged及びFringe族蛋白質の様々な組合せと共に培養した。各群を、同じ抗体又はNotchリガンドを含む、Matrigel（R）に混合してマウスに注射した。抗Notch4抗体が、腫瘍を形成するのに必要な細胞数及び時間に与える影響を測定した。得られた結果と、実施例14で得たマイクロアレイ発現データとの関連を調べた。

【0291】

Notchによる刺激は、正常な乳幹細胞の増殖を引き起こした。正常な幹細胞の場合と同様に、Fringe族はDelta又はJaggedシグナリングを調節するはずである。Notchも又、乳癌幹細胞の自己再生性に役割を果たしていると考えられる。

【0292】

実施例15

ヒト被験体

下記のヒト由来の試料を、本発明の診断法に用いた。（1）乳癌患者から得た初代腫瘍及び（2）転移性乳癌の患者から得た胸膜液。主治医によって腫瘍又は胸膜液の除去が臨床必要であると判断された患者から、腫瘍又は胸膜液の一部分を通常の治療時に得た。

【0293】

例えばミシガン大学病院では、IRBに認証された試料採取プロトコルがある。患者は指示されたインフォームドコンセントに同意を求められることになるが、患者にはそれ以上の負担はかからない。

【0294】

実施例16

脊椎動物

ミシガン大学は動物福祉法改訂版（7U.S.C. 2131節以下参照）並びに動物に関する他の連邦制定法及び条例に従っている。本発明では実験用マウス系NOD／SCIDマウス及び他の免疫無防備マウス系（Beige／SCIDマウスなど）を使用している。

【0295】

マウスは病状を発達させる前に安楽死させられるので、癌細胞成長によってマウスが不快を感じることはない。腫瘍が原因でマウスに不快感を与えている証拠がある（姿勢、食欲又は行動における変化や体重低下）場合には、直ちに安楽死させられる。万一マウスが中程度以上の不快感（姿勢、食欲又は行動における変化や体重低下が指標となる）を示した場合には、経口モルヒネやコデイン鎮痛剤が投与される。エーテル又は他の同様の一般的な麻酔薬によって麻酔をかけている間に、マウスの眼窩後方静脈内に骨髓細胞を接種する。

【0296】

American Veterinary Medical Associationの安楽死委員会に推奨されているように、CO₂でマウスを犠牲にする。安全性且つ慈悲の観点からこの方法を採用した。

【0297】

実施例17

乳癌幹細胞及び非腫瘍形成性乳癌細胞の細胞周期分析

マウス異種移植腫瘍から得た細胞を調べた。腫瘍中の乳癌幹細胞（図19A）と非腫瘍形成性細胞（図19B）の細胞周期状態を、フローサイトメトリーによって調べた。いずれの細胞集団においても、細胞周期中のG1、S及びG2/M相にある細胞の分布は類似していた。従って腫瘍形成性細胞と非腫瘍形成性細胞は同様の細胞周期分布を呈示していた。

【0298】

本実施例では、充実腫瘍幹細胞マーカーを発現した全ての細胞が、分析される腫瘍において細胞周期の特定の段階にあるという可能性が除外された。低レベルでヘキスト染色した細胞を選択することによって造血幹細胞活性を富化できるのが可能であるのと同様に、ヘキスト染色した腫瘍幹細胞をフローサイトメトリー選別して細胞周期の特定の段階にある細胞を選択することによって、腫瘍形成性活性をさらに富化することが可能である。

【0299】

実施例18

ローダミン123による乳癌幹細胞及び非腫瘍形成性乳癌細胞の染色

本実施例の目的は、乳癌幹細胞及び非腫瘍形成性癌細胞における、複薬剤耐性ポンプの活性を調べることにある。異種移植腫瘍の1つから得たESA⁺CD44⁺CD24⁻/1^oLINEAGE⁻細胞（乳癌幹細胞）と非腫瘍形成性細胞とをローダミン123により染色した。

【0300】

細胞内でのローダミン123染色の明暗度を決定する主な要因の一つとして、細胞から染料を排除するMDRポンプ活性が挙げられる[Yumoto R. 他、Drug Metabolism & Disposition 29(2):145-51(2001); Daoud R. 他、Biochemistry 39(50):15344-52(2000)]。この腫瘍から得た充実腫瘍幹細胞の幾つかは、非腫瘍形成性癌細胞に比べて、ローダミン123染色による明暗度が低いことが判明した（図20）。

【0301】

本実施例は、腫瘍細胞に不均一性があることを示し、MDRポンプ活性が充実腫瘍細胞において、より高くなっているという可能性を示している。

【0302】

実施例19

卵巣癌腫瘍におけるB38.1⁺CD44⁺CD24⁻/1^oLINEAGE⁻細胞集団の存在

卵巣癌の患者から細胞削減手術によって得た、腫瘍及び腹水の両方に由来する癌細胞を分析した。B38.1が卵巣癌細胞によって発現されることはよく知られている。驚くべきことに、フローサイトメトリー分析によって、複数の細胞集団の存在が示され、B38.1⁺CD44⁺CD24⁻/1^oLINEAGE⁻細胞集団が明らかに存在した（図21）。

【0303】

この細胞集団の表現型は乳癌幹細胞に類似しており、卵巣癌幹細胞を代表するものと考えられる。

【0304】

実施例20

肉腫におけるB38.1⁺CD44⁺CD24⁻/1^oLINEAGE⁻細胞集団の存在／乳癌幹細胞データとの比較

B38.1抗原は、乳癌と卵巣癌においてのみ発現されることが報告されている。VP16で処理したNOD/SCIDマウスの両脇腹に肉腫細胞を接種することによって、2つの肉腫を得た。腫瘍の1つを摘出してフローサイトメトリーで調べた。驚くべきことに、

肉腫細胞は B 3 8 . 1 抗原を発現していた。その上更に、C D 4 4 について 3 つの異なる細胞集団（高レベル、低レベル、陰性）が存在した（図 2 2）。

【0305】

従って、腫瘍細胞は表現型が乳癌幹細胞に類似した C D 4 4 + 細胞集団を含んでおり、また腫瘍幹細胞を代表するものと考えられる。

【0306】

【表 7】

表 7			
腫瘍 T 1 及び T 2 細胞における異なる細胞集団における腫瘍形成性			
	腫瘍数／注射回数		
細胞／注射	8×10^5	5×10^5	2×10^5
T 1 細胞			
C D 4 4 ⁻	0 / 2	0 / 2	—
C D 4 4 ⁺	2 / 2	2 / 2	—
B 3 8 . 1 ⁻	0 / 2	0 / 2	—
B 3 8 . 1 ⁺	2 / 2	2 / 2	—
C D 2 4 ⁺	—	—	1 / 6
C D 2 4 ⁻	—	—	6 / 6
T 2 細胞			
C D 4 4 ⁻	0 / 2	0 / 2	—
C D 4 4 ⁺	2 / 2	2 / 2	—
B 3 8 . 1 ⁻	0 / 2	0 / 2	—
B 3 8 . 1 ⁺	2 / 2	2 / 2	—
C D 2 4 ⁺	—	—	1 / 6
C D 2 4 ⁻	—	—	6 / 6
指示マーカーの発現に基づいて図 2 に記載のようにフローサイトメトリーで細胞を単離し、NOD／SCID マウスの乳房脂肪パッドに $2 - 8 \times 10^5$ 細胞を注入したあとに腫瘍を形成する能力について検定した。「形成された腫瘍の数／注射回数」を各細胞集団について示した。			

【0307】

実施例 2 1

ポリヌクレオチドプローブの調製

全 RNA 源からの 1 ラウンド RT 標識化。単離充実腫瘍幹細胞又は充実腫瘍幹細胞富化集団から単離されたポリヌクレオチドとして、細胞から抽出された RNA 又は抽出された RNA から作製された相補的 DNA (cDNA) を用いることができる。

【0308】

本発明の方法の幾つかの態様（例えばハイブリダイゼーションに関与する態様）においては、標識化cDNAが有用である。一つの態様においては、全RNA源からの1ラウンドRT標識化方法を用いる。

【0309】

標識化反応に関与するRNAの質は、ハイブリダイゼーションの質に顕著な影響を与えうる。標準的な分子生物学の基準で良好に見えるRNA調製物でも、良好な結果が得られないこともある。典型的な問題点として、ハイブリダイズ全表面にわたって分散した微粒子ノイズや、スライド上のDNA固定領域への非特異的な蛍光標識の結合が挙げられる。これらの問題は炭水化物による汚染に由来していると考えられる。炭水化物の汚染について考えられるのと同様に、標識化前後のエタノール沈降によって問題が悪化していることが予想される。純粋でない調製物を用いた場合、標識化とエタノール沈降の後に沈降を行うと、実質的に溶解しない目視可能な凝集物がしばしば形成される。核酸を炭水化物と共に乾燥した場合又は両者で共沈降を行った場合、強度の凝集物を形成することがよく知られている。この相互作用が、セルロース等のクロマトグラフィー支持体上に核酸を固定する基礎となっている。この種の問題を最小限に抑えるために、RNA調製時及び標識化時に少量のエタノールを用いた又は好ましくは全くエタノールを用いない沈降を行う調製工程が勧められる。ここでは少なくとも、処理する細胞数に対して必要とされる分量だけの抽出溶媒及び洗浄溶液を用いた。適当な又はわずかに超過した抽出／洗浄量にすることで、ハイブリダイゼーションアッセイのノイズを最小限に抑えることができる。

10

20

【0310】

上記を十分に満足する方法として、トリアゾール抽出（BRL）及びRneasy（Qiagen）が挙げられる。

【0311】

全RNAを組織（充実腫瘍又は異種移植腫瘍）、フローサイトメトリーによって得た充実腫瘍幹細胞の組織培養、又は富化培養から調製した。調製したRNAを、 $>6\text{ mg/ml}$ のRNA濃度になる分量でDEPC水中に懸濁した。最終調製工程で基質から回収したRNAが希薄すぎる場合、MicroCon30（Amicon）を用いてRNAの濃度を決定して、標識化に必要な濃度に濃縮した。50mM NaOH中で少量の試料（A260）の数値を読みとって確認した。

30

【0312】

スクレオチド混合物として、 $10\times$ 低TdNTP（Pharmacia（米国ミズーリ州セントルイス）[27-2035-02]の100mM dNTP）を使用した。

【0313】

【表8】

表 8
ヌクレオチド混合物

ヌクレオチド	μ l	mM最終 (1 / 10) 濃度
d G T P	2 5	0 . 5
d A T P	2 5	0 . 5
d C T P	2 5	0 . 5
d T T P	1 0	0 . 2
水	4 1 5	
全量	5 0 0	

10

【0314】

蛍光ヌクレオチドをAmersham Life Sciences又はPerkin Elmer Applied Biosystems Divisionから入手した。FluoroLink Cy3-dUTP (#401-896)又はFluoroLink Cy5-dUTPを使用した。Cy3及びCy5ヌクレオチドの濃度は1 mMであった。

20

【0315】

R110ヌクレオチドの濃度は0.1 mMであり、最初の体積の0.1倍に乾燥及び再懸濁して1 mMにする必要があった。現在、標識化効率、蛍光量、スペクトル分離及び非特異的結合の傾向といった要素から、Cy3 / Cy5が検出システムに最も適した組み合わせとなっている。

【0316】

標識化反応用のプライマーとして、オリゴ(dT)12-18 (27-7858-01、Pharmacia)を用いることができる。Pharmacia 100 mM母液から非標識化ヌクレオチド混合物を調製した。逆転写酵素としてBRL SuperScript II (18064-014)を用いた。5×緩衝液としてポリメラーゼを加えた緩衝液を用いた。

30

【0317】

マイクロアレイ用として、マイクロアレイに配置されたハウスキーピング遺伝子を参照して2種の蛍光標識を規格化した。

【0318】

質量標準及びRNA品質標準として、pSP64ポリ(A)ベクター内でクローン大腸菌遺伝子にファージRNAポリメラーゼを用いて、合成cDNAのカクテルを作製した。可能であれば、17 μ lのDEPC水中に100 μ gのRNAを含む全RNA溶液を調製する。さもなくば、100 mgの全RNAをエタノール沈降して、標識化反応用に試料を濃縮する。残留エタノールは標識化の効率を妨げるので、全ての残留70%エタノール洗浄液を、乾燥又は真空吸引で除去する。

40

【0319】

DEPC水にベレットを再懸濁し、最終容量を17 mlとした。全ての残留沈殿物を遠心分離で除去した。最後に反応液にRNAを添加した。

【0320】

蛍光ヌクレオチド (NTP) RT標識化：下記を添加した。

【0321】

【表9】

50

表 9
逆転写酵素標識化

成分	μ l
5 × 第 1 の鎖緩衝液	8
オリゴ (d T) 12-18 (500 μ g / ml)	2
10 × 低 d T NTP 混合物	4
蛍光 d U T P (1 mM)	4
0.1 M D T T	4
R N A s i n	1
合成 m R N A 鎖 (0.06 μ g)	0.5
100 mg 全 R N A	17.0
計	40

10

20

40

50

【0322】

R N A s i n を添加した後、試料を旋回攪拌した。攪拌中に生じる気泡を最小限に抑えた。

【0323】

試料を 65℃ に 5 分間保持した後、42℃ にした (プログラム R1)。次いで、2 μ l の S S I I 酵素を添加した。酵素が反応液に十分に混合されていることを確認した。次に 42℃ で 25 分間保温した。2 μ l の S S I I 酵素を添加した。酵素が反応液に十分に混合されていることを確認した。次いで 42℃ で 35 分間保温した。N a O H を添加する前に、5 μ l の 500 m M E D T A を添加して反応を停止した。

【0324】

10 ml の 1 M N a O H を添加した。65℃ で 60 分間保温して残留 R N A を加水分解した。室温まで冷却し、25 μ l の 1 M T r i s - H C l (p H 7.5) を添加した。

【0325】

プローブのクリーンアップと分析用として、M i c r o c o n 30 に移し、約 20 μ l (エッペンドルフ 5415 C 中で 14,000 r p m にて約 3.5 分間) に濃縮した。200 μ l の T E (p H 7.5) を添加して洗浄し、約 20 μ l (14,000 r p m にて 4-4.5 分間) に濃縮した。きれいな収集管の上で容器を逆さにし、3000 r p m で 3 分間回転させて生成物を回収した。

【0326】

C y 5 プローブがゼラチン状の青い沈殿物を生じることがあり、濃縮形状で回収される。この物質の存在は汚染物質の存在を示している。汚染の程度が大きいほど、このゲルにとらえられるプローブの断片は大きくなる。熱で溶解しても、この物質は D N A 標的に一様で非特異的な結合をする特性がある。

【0327】

遠心分離濾過によって濃縮するが、望ましい最終量を得るのに必要な時間は場合によって異なる。過度に長い遠心分離を行うことで、濾過される溶液から殆ど全ての水を除去できる。蛍光標識化核酸をこのようにフィルター上で濃縮すると、非常に除去しにくくなる。従って、従来の近似値法で必要な回転回数を求め、望ましい体積を得る。

【0328】

分析用に2 μ lのアリコートのCy5プローブを取り出し、17-18 μ lをハイブリダイゼーション用に残して、TAE中、2%アガロースゲル（ゲル寸法：幅6cm×長さ8.5cm、歯幅2mm）上にこのプローブを泳動する。ゲル上で泳動している試料を蛍光分析にかけるときに最大の感度を得るために、最小限の染色剤とともにローディング緩衝液を用いて、臭化エチジウムをゲル又は泳動緩衝液に添加した。

【0329】

Molecular Dynamics Storm 蛍光スキャナー（設定値：赤色蛍光、200ミクロン解像度、PMT上で1000ボルト）上で、ゲルをスキャンした。標識化がうまくいった場合、低分子量転写物の蓄積と共に、400bp〜1000bpのプローブの高密度スミアが得られる。標識化が薄く、低分子量物質が著しく多い場合には、標識化がうまくいかなかったことを意味する。

10

【0330】

ハイブリダイゼーション。遮断剤としてポリ(dA) [Pharmacia (27-7988-01)、8mg/mlで再懸濁]；酵母菌tRNA [Sigma (R8759)、4mg/mlで再懸濁]；及びCot1DNA [Life Technologies Inc.、10mg/mlに10倍濃縮]を用いた。

【0331】

ハイブリダイゼーションに必要な量は、用いるアレイの寸法に依存する。少量（20-25 μ l）を必要とするハイブリダイゼーションとしては、Microcon濃縮後のプローブ量が多すぎることがある。その場合には、Cy3プローブに遮断剤を添加し、Cy3プローブを沈降させる。

20

【0332】

10mlハイブリダイゼーションにつき、8mgのポリ(dA)；4mgのtRNA；及び10mgのCot1DNAを添加した。

【0333】

【表10】

表 10 ハイブリダイゼーションプローブ混合物	
Cy3 標識化プローブ	～20 μ l
ポリ dA (8 mg/ml)	1 μ l
酵母菌 tRNA (4 mg/ml)	1 μ l
Cot1 DNA (10 mg/ml)	1 μ l

30

【0334】

2 μ lの3M酢酸ナトリウム(pH5.5)を添加し、次いで60 μ lのエタノールを添加し、遠心分離にかけてから軽く乾燥し、～17 μ lのCy5プローブに再懸濁した。アレイが約40 μ lのプローブを必要とする場合には、Cy3及びCy5の濃縮物を取り置いて遮断剤を直接添加するので、沈降させる必要はない。

【0335】

次いで、20 μ lのハイブリダイゼーション混合物につき3 μ lの20×SSCを添加した。この時点で、20 μ lのハイブリダイゼーション混合物につき1 μ lの50×デンハートブロック液を任意に添加した。純度の高いプローブを用いたところ、デンハート液には目視できる変化はなかった。

40

50

【0336】

次いで、98℃で2分間加熱し、45℃に冷却し、20μlのハイブリダイゼーション混合物につき0.2μlの10%SDSを添加した。アレイに適用し、密閉した加湿チャンバ内で65℃にて(16-24時間)ハイブリダイズした。

【0337】

洗浄。残留した未結合のプロブを室温にて2-5分間、数回洗浄してスライドから除去した。第1の洗浄は0.5×SSC、0.01%SDSで行った。第2回の洗浄は0.06×SSCで行った。この工程の後スライドを空気乾燥したところ、蛍光のもやがスライド表面に残った。低いGで短時間回転させてスライドから緩衝液を除去した。スライドをスライドホルダーに載せ、スライドホルダーを保持できる(水平の)スイング式支持体を有する遠心分離器にかけた。マイクロタイター板を遠心分離にかけるのに使われる、ほとんどの型の遠心分離器を用いることができる。

10

【0338】

上記の説明は、例証のみを目的とするものであって、上記に開示の形態にのみ本発明を限定することを企図するものではなく、本発明は付属の請求項によって定義される。

【図面の簡単な説明】

【図1】

充実腫瘍の不均一性の二つのモデルを示す図である。古典的モデル(図1A)では、突然変異又は環境的差異が、腫瘍細胞に異なる様々な表現型を採らせる。白色、緑色及び赤色の細胞によって表される、環境的に決定される表現型の差異は、可逆的であり得るが、紫色の細胞によって表される、突然変異によって決定される表現型の変化は、不可逆的であり得る。異なる様々な表現型を有する多くの細胞は、広範囲に増殖し、新たな腫瘍を形成する潜在的能力を有すると考えられる。この腫瘍幹細胞モデル(図1B)は、腫瘍形成性である腫瘍細胞(黄色の細胞)の小さい集団のみを有するにすぎないことを特徴とする。これらの腫瘍幹細胞は、無限の増殖可能性、新たな腫瘍を形成できる能力、及び不均一な、代表的には腫瘍塊を形成する、非腫瘍形成癌細胞を生じ得る能力によって特徴付けられる。

20

【図2】

乳癌腫瘍細胞の一連のFACSプロットである。ヒトの患者2名から取り出した原発性乳癌の腫瘍細胞を、マウスに移植した。結果として生じた腫瘍を、マウスから取り出し、単細胞懸濁液を作成した。細胞を、抗CD44-PE、抗520C9-APC、抗マウスH2K-FITC(浸潤性マウス細胞を染色)及びヨウ化プロピジウム(PI、死細胞を染色)で染色した。生存する、ヒトCD44⁺及びヒトCD44⁻細胞を、単離し、*in vitro*及び*in vivo*での研究に用いた。

30

【図3】

悪性胸部細胞によるCD24の発現を示す、一連のFACSプロットである。細胞を単離し、図2に記載したとおりに染色した。マウス細胞及び死細胞は、分析から除外した。3種類の乳癌腫瘍からの細胞のFACSプロットを示す。3種類すべての腫瘍からの細胞が、類似の表現型を有することに注目されたい。

【図4】

ヒト乳癌からのCD24⁻細胞集団から生じた腫瘍の分析を示す、一連のFACSプロットである。充実腫瘍幹細胞モデルによれば、CD24⁻細胞は、CD24⁺及びCD24⁻双方の細胞を含む腫瘍を生じる。したがって、B38.1⁺CD24⁻細胞を用いて、二次移植片を実施した(図4A)。得られた腫瘍を取り出し、細胞を、B38.1及びCD24発現に関して再分析した。幹細胞モデルによって予測されたとおり、移植されたB38.1⁺CD24⁻細胞から生じた腫瘍から得られた細胞は、B38.1とCD24との双方の発現に関して不均一であった(図4B)。B38.1⁺CD24⁻細胞によって開始された腫瘍から単離された、細胞のマーカー発現パターンは、本来の腫瘍のそれに類似した(図4)。

40

【図5】

50

N o t c h 4 発現の分析を示す、F A C S プロットである。細胞を、マウス異種移植腫瘍（下記参照）から単離し、抗体で染色した。悪性細胞を、B 3 8 . 1 及び N o t c h 4 の発現について分析した。マウス細胞及び死細胞は、分析から除外した。

【図 6】

C D 4 4 発現に基づく乳癌細胞の分画を示すプロットである。腫瘍 T 1 の細胞（図 6 A、6 C 及び 6 E）及び腫瘍 T 2 の細胞（図 6 B、6 D 及び 6 F）を、抗 C D 4 4 - P E、抗 H 2 K - F I T C、及び生存率染料の 7 A A D で染色した。フローサイトメトリーを用いて、生存するヒト（H 2 K -）細胞を単離したが、それらは、C D 4 4 ⁺（図 6 C、6 D）又は C D 4 4 ⁻（図 6 E、6 F）のいずれかであった。死細胞（7 A A D ⁺）は、すべての分析から除外した。図 6 A 及び 6 B は、未分画 T 1 及び T 2 細胞のドットプロットであって、表示されたとおりの C D 4 4 及び H 2 K 発現を示す。単離された C D 4 4 ⁺（図 6 C、6 D）及び C D 4 4 ⁻（図 6 E、6 F）の集団を示すプロットは、フローサイトメトリーによって単離された細胞の再分析を表す。これらの細胞を、マウスの乳房脂肪パッドに注入して、その腫瘍形成性を調べた。表 1 及び 3 は、C D 4 4 ⁺ 細胞は腫瘍形成性であるが、C D 4 4 ⁻ はそうではなかったことを示す。

【図 7】

腫瘍形成細胞の単離を示す図である。フローサイトメトリーを用いて、N O D / S C I D 系マウスにおける腫瘍形成性について試験した、腫瘍 T 1（図 7 A、7 D 及び 7 G）、腫瘍 T 2（図 7 B、7 E 及び 7 F）又は腫瘍 T 5（図 7 C、7 F、7 I）の細胞の下位集団を単離した。T 1 及び T 2 細胞は、N O D / S C I D 系マウスで一回継代させたが、腫瘍 T 5 細胞は、患者から取り出した直後に凍結した材料から得た。細胞は、抗 B 3 8 . 1 - A P C、抗 C D 4 4 - P E、抗 C D 2 4 - F I T C、抗 L I N E A G E - C y t o c h r o m e、抗マウス H 2 K - C y t o c h r o m e（T 1 及び T 2 細胞のみ）、及び 7 A A D で染色した。各ドットプロットは、生存ヒト B 3 8 . 1 ⁺ L I N E A G E ⁻ 細胞の C D 2 4 及び C D 4 4 染色パターンを表す。図 7 A、7 B 及び 7 C は、未分画腫瘍細胞を示す。C D 2 4 ⁻ / ⁺（図 7 G、7 H、7 I）又は C D 2 4 ⁺（図 7 D、7 E、7 F）のいずれかである、B 3 8 . 1 ⁺ L I N E A G E ⁻ 細胞を、これらの腫瘍細胞からフローサイトメトリーによって単離した。図 7 D ~ 7 I は、選別されたこれらの集団の再分析を表し、次いで、これらを N O D / S C I D 系マウスの乳房脂肪パッドに注入して、腫瘍形成性を試験した。図 7 J は、マウスの B 3 8 . 1 ⁺ C D 4 4 ⁺ C D 2 4 ⁺ L I N E A G E ⁻ 注入部位ではなく、B 3 8 . 1 ⁺ C D 4 4 ⁺ C D 2 4 ⁻ / ⁺ L I N E A G E ⁻ 注入部位での代表的な腫瘍を示す。C D 2 4 ⁺（図 7 K、対物倍率 2 0 x）及び C D 2 4 ⁻ / ⁺（図 7 L、対物倍率 4 0 x）注入部位からの組織に対して実施した組織学は、それぞれ、正常なマウス組織、及び悪性細胞を示した。

【図 8】

E S A 発現に基づく腫瘍形成細胞の富化を示すプロットである。フローサイトメトリーを用いて、N O D / S C I D 系マウスにおける腫瘍形成性について試験した、腫瘍 T 1 細胞の下位集団を単離した。T 1 細胞は、N O D / S C I D 系マウスで一回継代させた。細胞は、抗 B 3 8 . 1 - A P C、抗 C D 4 4 - P E、抗 E S A - F I T C、抗 L I N E A G E - C y t o c h r o m e、抗マウス H 2 K - C y t o c h r o m e（T 1）、及び 7 A A D で染色した。死細胞（7 A A D ⁺）、マウス細胞（H 2 K ⁺）及び L I N E A G E ⁺ 細胞は、分析から除外した。図 8 A のドットプロットは、生存ヒト B 3 8 . 1 ⁺ L I N E A G E ⁻ 細胞の C D 2 4 及び E S A 染色パターンを示す。腫瘍形成集団を、四角で囲み、矢印で示す。図 8 B では、E S A ⁺ B 3 8 . 1 ⁺ C D 2 4 ⁻ / ⁺ L I N E A G E ⁻ 細胞（左のパネル）、及び残余の L I N E A G E ⁻ H 2 K ⁻ 細胞（右のパネル）を、フローサイトメトリーを用いて採集した。

【図 9】

i n v i t r o クローン形成アッセイの結果を示す図である。フローサイトメトリーを用いて、腫瘍形成細胞、又はその他の非腫瘍形成新生物（非腫瘍形成細胞）を、記載のとおり単離した。細胞は、可溶性 D e l t a を含有する組織培養培地に、表示された日数だ

け入れた。腫瘍形成及び非腫瘍形成異種移植片である腫瘍1 (T1) (図9A)、腫瘍4 (T4) (図9B)、又は原発性の患者 (図9C) 細胞を、組織培養に入れた後の表示された時間に示す。T4細胞を、パパニコラウ染色で染色し、光学顕微鏡 (対物100x) 下で調べた。非腫瘍形成 (図9D) 及び腫瘍形成 (図9E) 集団は、ともに、巨大な核、及び傑出した仁を有する新生物細胞からなることに注目されたい。組織培養プレートに付着した細胞の数は、両集団で類似しているが、腫瘍形成集団は、常にコロニーを生じることにも注目されたい。非腫瘍形成集団は、確立されたコロニーを生じない (又は短い期間、約2~6日間のみ生じる)。

【図10】

B38. 1⁺CD44⁺CD24⁻/L⁺ LINEAGE⁻細胞から生じた腫瘍における表現型の多様性を示す、一連のドットプロットである。このドットプロットは、腫瘍T1 (図10A~10C) 又は腫瘍T2 (図10D~10F) からの生存ヒトLINEAGE⁻細胞のCD24及びCD44染色パターンを示す。図10A及び10Dは、NOD/S⁻SCID系マウスで一回継代させた腫瘍から得た未分画T1及びT2細胞を示す。T1 (図10B) 又はT2 (図10E) からのB38. 1⁺CD44⁺CD24⁻/L⁺ LINEAGE⁻細胞を、上記図2に記載したとおりに単離した。図10B及び10Eで再分析したB38. 1⁺CD44⁺CD24⁻/L⁺ LINEAGE⁻集団を、NOD/S⁻SCID系マウスの乳房脂肪パッドに注入した。図10C及び10Fは、これらのB38. 1⁺CD44⁺CD24⁻/L⁺ LINEAGE⁻細胞から生じた腫瘍の分析を示す。いずれの事例でも、B38. 1⁺CD44⁺CD24⁻/L⁺ LINEAGE⁻細胞は、本来の腫瘍で観察されたのと同様の表現型が多様な集団を含む腫瘍を形成したことに注目されたい。

【図11】

HER2/neu及びEGF-Rの発現を示す図である。フローサイトメトリーを用いて、NOD/S⁻SCID系マウスで一回継代させた、腫瘍T1細胞の下位集団を単離した。図11Aで、細胞を、抗EGF-R-PE、抗B38. 1-APC、抗CD24-FITC、抗LINEAGE-Cytochrome、抗マウスH2K-Cytochrome及び7AADで染色したか、又は図11Bで、抗HER2/neu-FITC、抗B38. 1-APC、抗CD24-PE、抗LINEAGE-Cytochrome、抗マウスH2K-Cytochrome、及び7AADで染色した。死細胞 (7AAD⁺)、マウス細胞 (H2K⁺) 及びLINEAGE⁺細胞は、すべての分析から除外した。図11Aのヒストグラムは、染色されなかった細胞 (点線)、B38. 1⁺CD24⁻LINEAGE⁻腫瘍形成集団 (斜線)、及びB38⁺CD24⁺LINEAGE⁻非腫瘍形成集団 (実線) のEGF-R発現を表す。図11Bのヒストグラムは、染色されなかった細胞 (点線)、B38. 1⁺CD24⁻LINEAGE⁻腫瘍形成集団 (斜線)、及びB38⁺CD24⁺LINEAGE⁻非腫瘍形成集団 (実線) のHER2/neu発現を表す。RT-PCRを、入れ子 (nested) プライマーを用いて実施して、EGF-Rを検出するか (図11C及び11D)、又はHER2/neuを検出した (11E)。サンプルあたり1細胞を図11D及び11Eのパネルでか、又はサンプルあたり10細胞を図11Cで分析した。EGF-Rは、腫瘍形成細胞では、タンパク質 (図11A) 及びmRNA (図11C、11D) レベルの双方で、非腫瘍形成細胞より低レベルで発現される。

【図12】

抗Notch4抗体との接触後に組織培養に入れた乳癌細胞の顕微鏡写真である。細胞を、抗Notch4抗体なしの可溶性Deltaとともにか、もしくはそれなしにか、抗Notch4抗体とともにか、又は抗体を生成するのに用いたペプチドとともに前温置した抗Notch4抗体とともに、HBSS中の氷上で1時間温置した。三重の実験で形成された、コロニーの数を示す。可溶性Deltaを培養体に加えた。可溶性DeltaなしのFc制御培地を培地に加えた。記号: Ab=抗Notch4抗体; Block=抗Notch4抗体を生成するのに用いたペプチド。

【図13】

腫瘍内の B 3 8 . 1 ⁺ 細胞の模式図である。多数の患者からの乳癌幹細胞が B 3 8 . 1 ⁺ である。遺伝子療法のアプローチで成功裡に癌を治療するために、これらの細胞をベクターによる標的とすることができる。

【図 1 4】

双特異性結合体を得る方法、及び抗体に導入された化学的改変を説明する図である。

【図 1 5】

アデノウイルスを再標的化するための大方針を示す図である。L a Z ウイルスは、腫瘍からのほとんどの細胞に感染することができる。L a Z ウイルスを、抗線維抗体のみとともに温置した後、L a Z ウイルスは、すべての細胞に感染できる能力を失う。L a Z ウイルスを、双特異性結合体とともに温置した後は、分子の B 3 8 . 1 部分は、B 3 8 . 1 ⁺ 細胞へのウイルスの付着を許すため、これらの細胞のみが感染するにすぎない。 10

【図 1 6】

双特異性抗体による乳癌幹細胞の標的化を示す棒グラフである。異なる細胞系を、A d L a Z、すなわち β -ガラクトシダーゼ遺伝子を発現する E 1 欠失アデノウイルスに感染させた（灰色の棒、ウイルス感染についての対照）。ある場合には、ウイルスを、感染前に抗線維抗体とともに 3 0 分間温置した（黄色の棒）。他の場合には、ウイルスを、双特異性結合体とともに温置した（緑色の棒）。感染の 2 4 時間後、単層を固定し、X - G a l 含有緩衝液とともに温置した。感染した細胞は、青色であり、グラフは、得られた青色の細胞の対照となる感染に対する百分率（すなわち、異なる抗体との温置後の、ウイルスの感染率の上昇又は低下）を示す。 20

【図 1 7】

双特異性抗体が、乳癌幹細胞をアデノウイルスの標的とさせることができることを示す棒グラフである。棒は、1 視野あたりの感染細胞の絶対数を表す。灰色：指定された細胞は、対照アデノウイルスに感染。黄色：指定された細胞は、抗線維抗体とともに温置されたアデノウイルスに感染。緑色：指定された細胞は、双特異性結合体抗体とともに温置した。赤色：細胞を、双特異性結合体とともに温置したウイルスに感染させたが、過剰な B 3 8 . 1 抗体とともに温置した。

【図 1 8】

X - G a l 染色後の細胞単層のいくつかの写真である。感染した細胞は、この白黒写真では、暗い点のように見える（L a Z ウイルスの β -ガラクトシダーゼ遺伝子は、核局在化シグナルを有する）。染色は、細胞の核でなされる。 30

【図 1 9】

乳癌内の細胞の異なる集団を分析したグラフである。E S A ⁺ C D 4 4 ⁺ C D 2 4 ⁻ / ¹ ^o L I N E A G E ⁻ 細胞の乳癌幹細胞（図 1 9 A）及び E S A ⁺ C D 4 4 ⁺ C D 2 4 ⁺ L I N E A G E ⁻ 非腫瘍形成細胞（図 1 9 B）を、図 8 に記載のとおり得た。細胞は、E a v e s 及び同僚が記載したとおり [G l i m m, H. e t a l., B l o o d 9 6 (13) : 4 1 8 5 - 9 3 (2000)]、ヘキスト 3 3 3 4 2 で染色した。乳癌幹細胞のヒストグラムに斜線を施した。乳癌幹細胞及び非腫瘍形成細胞は、細胞周期のすべての期に分布していることに注目されたい。

【図 2 0】

乳癌内の細胞の異なる集団をさらに分析したグラフである。E S A ⁺ C D 4 4 ⁺ C D 2 4 ⁻ / ¹ ^o L I N E A G E ⁻ 細胞の乳癌幹細胞及び E S A ⁺ C D 4 4 ⁺ C D 2 4 ⁺ L I N E A G E ⁻ 非腫瘍形成細胞を、図 7 に記載のとおり得た。細胞は、S p a n t r u d e ら [B l o o d 8 5 (4) : 1 0 0 6 - 1 6 (1995)] が記載したとおり、ローダミン 1 2 3 で染色した。乳癌幹細胞のヒストグラムに斜線を施した。乳癌幹細胞は、ローダミン 1 2 3 には比較的弱く染まる傾向があることに注目されたい。 40

【図 2 1】

卵巣癌幹細胞について腹水を分析したドットプロットである。細胞を、抗 B 3 8 . 1 - A P C、抗 C D 4 4 - P E、抗 C D 2 4 - F I T C、抗 L I N E A G E - C y t o c h r o m e 及び 7 A A D で染色した。死細胞（7 A A D ⁺）及び L I N E A G E ⁺ 細胞は、分析 50

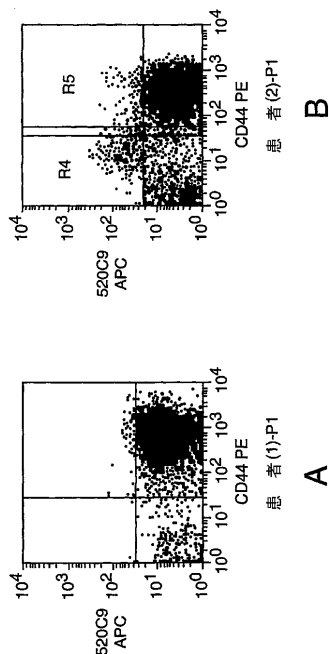
から除外した。乳癌幹細胞に類似する、際立った $CD44^{+}CD24^{-/1^{\circ}}LINEAGE^{-}$ 細胞集団が存在することに注目されたい。

【図 22】

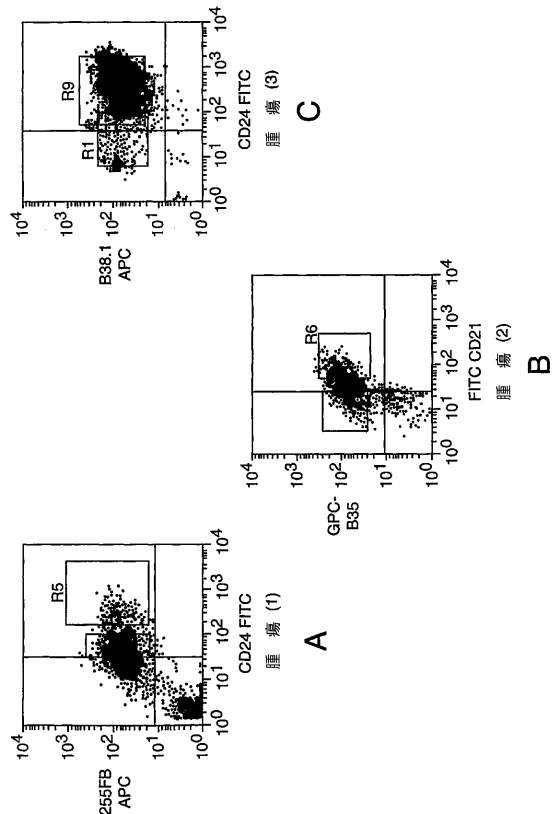
充実腫瘍幹細胞について肉腫細胞を分析したドットプロットである。異種移植片モデルで増殖させた P1 肉腫細胞を、抗 B38.1-APC、抗 CD44-PE、抗 CD24-FITC、抗 LINEAGE-Cytochrome、抗 H2K-Cytochrome 及び 7AAD で染色した。死細胞 ($7AAD^{+}$)、 $LINEAGE^{+}$ 細胞及びマウス細胞は、分析から除外した。この分析における系譜カクテルは、 $CD10$ 、 $CD31$ 又は $CD140b$ を含まないことに注目されたい。際立った $CD44^{+}CD24^{-/1^{\circ}}LINEAGE^{-}$ 細胞集団が存在することにも注目されたい。

10

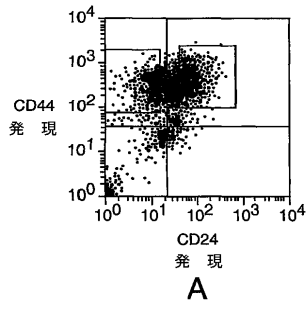
【図 2】



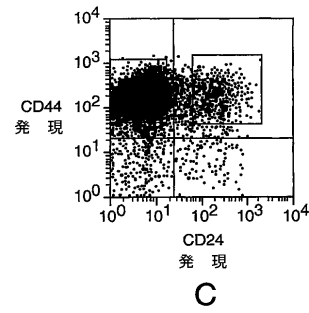
【図 3】



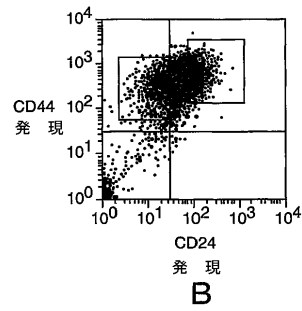
【図 7 A】



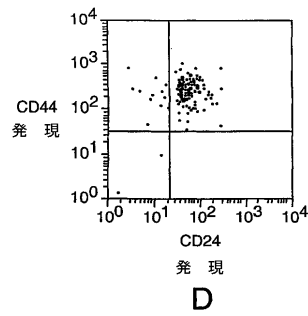
【図 7 C】



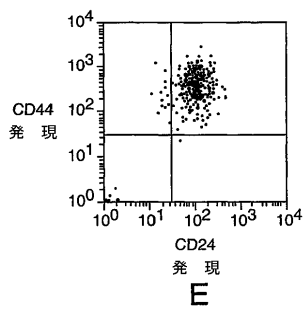
【図 7 B】



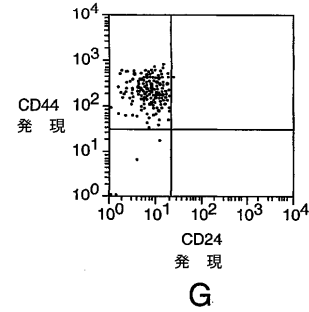
【図 7 D】



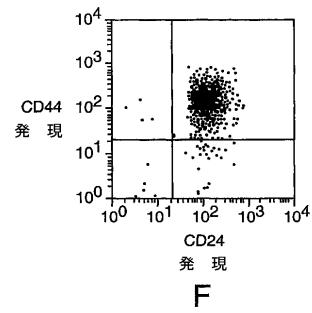
【図 7 E】



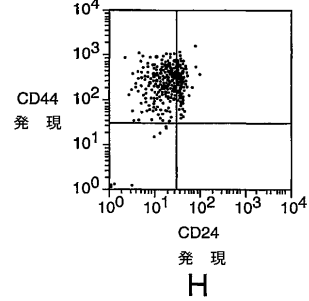
【図 7 G】



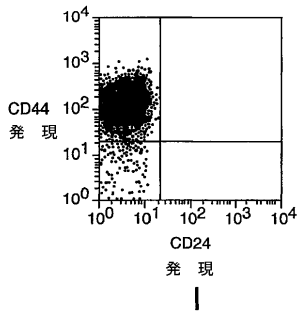
【図 7 F】



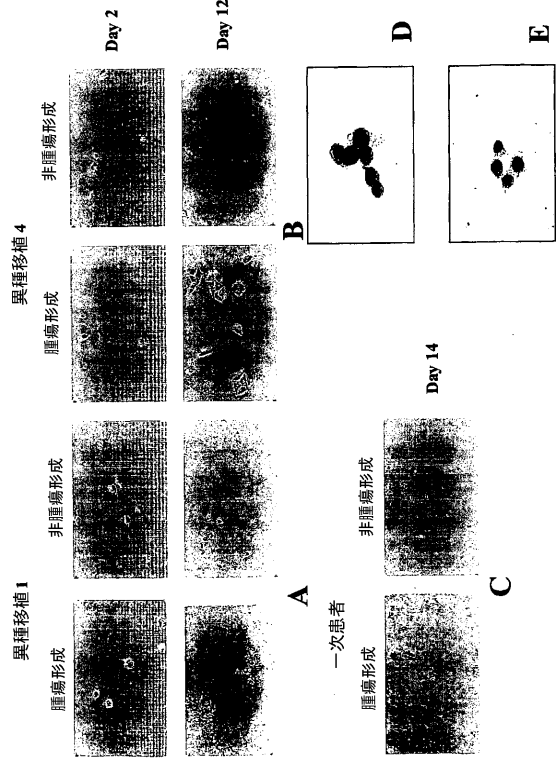
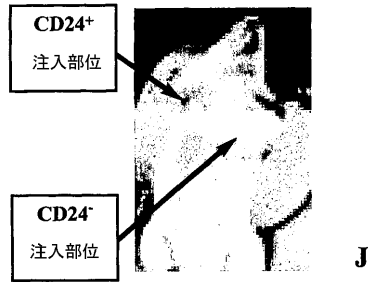
【図 7 H】



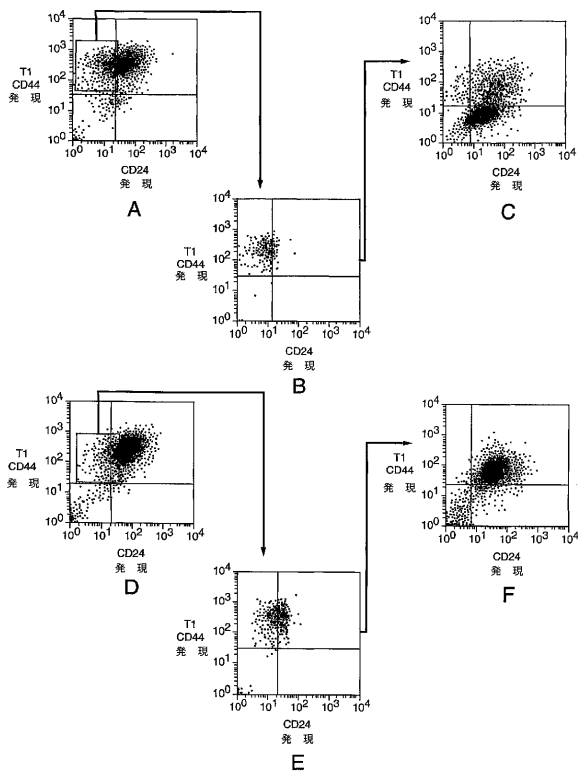
【 図 9 】



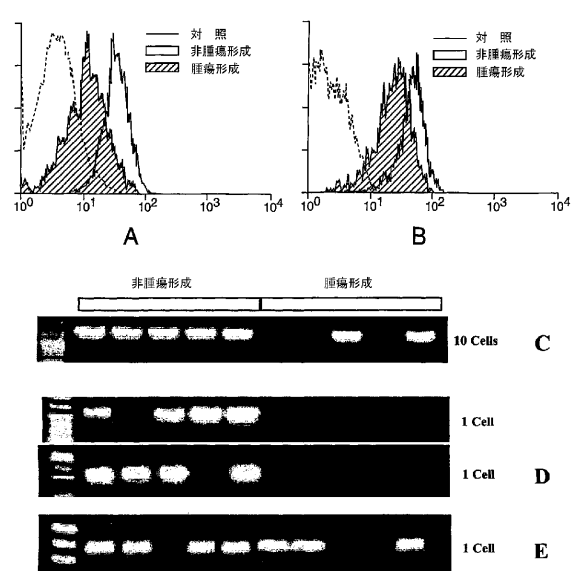
【図 7 J】



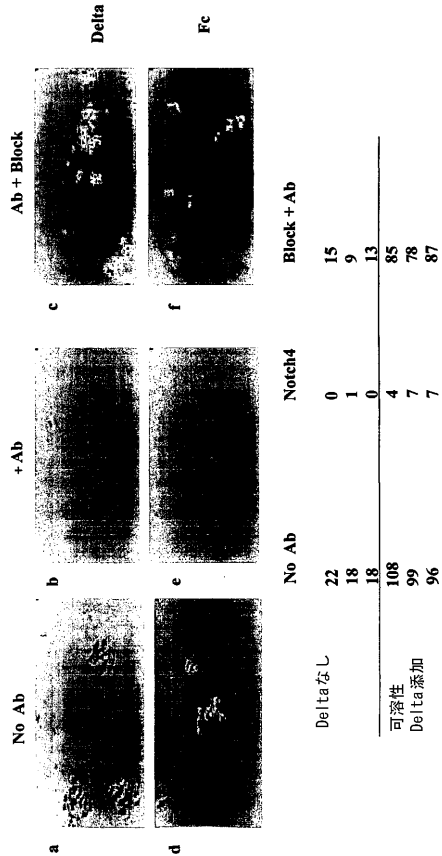
【図 10】



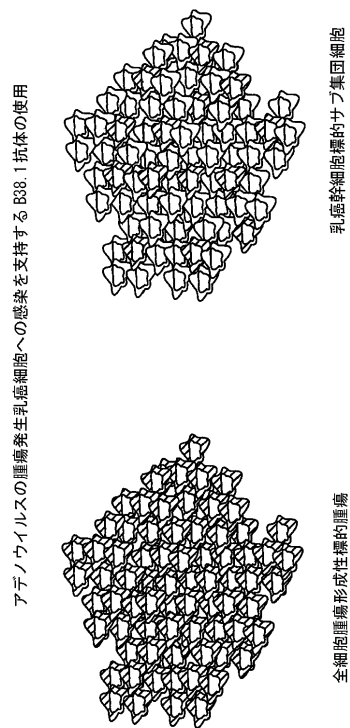
【 図 1 1 】



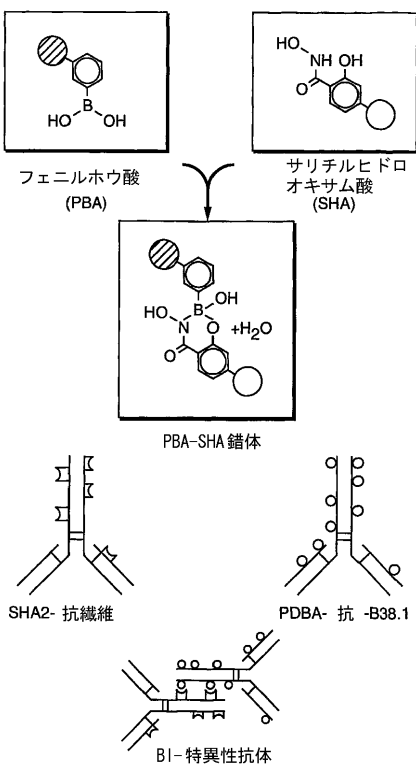
【図 1 2】



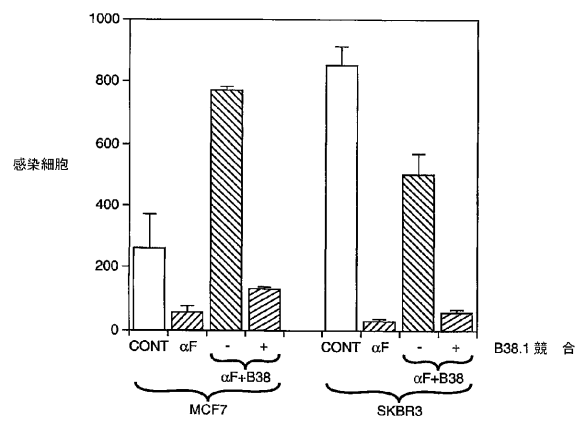
【図 1 3】



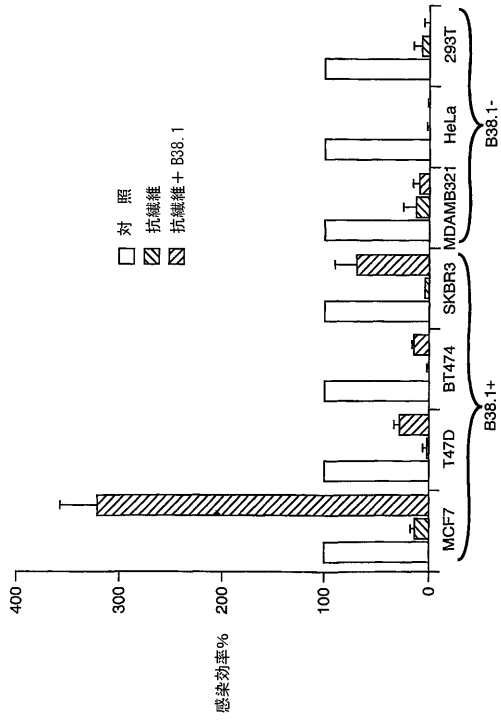
【図 1 4】



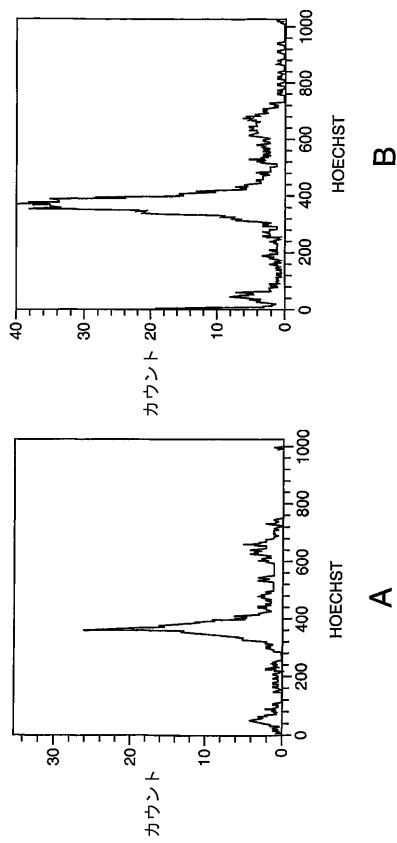
【図 1 6】



【図 17】

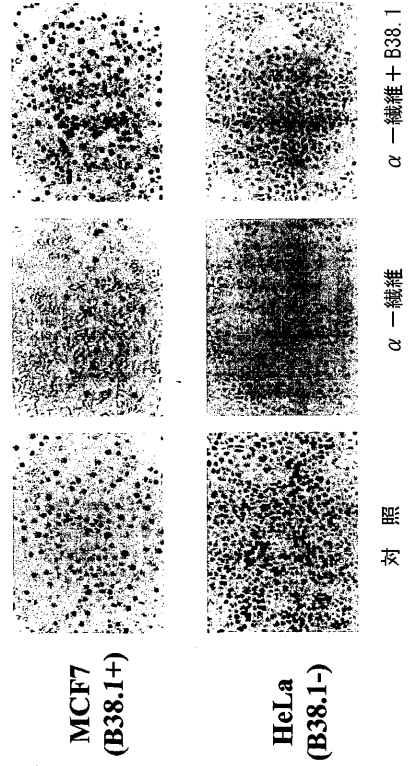


【図 19】

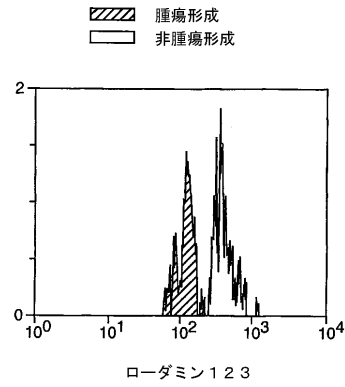


【図 18】

アデノウイルスの B38.1 発現乳癌への特異的



【図 20】



【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
14 February 2002 (14.02.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/12447 A2

(51) International Patent Classification: C12N 5/00

(21) International Application Number: PCT/US01/24243

(22) International Filing Date: 2 August 2001 (02.08.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/222,794 3 August 2000 (03.08.2000) US
60/240,317 13 October 2000 (13.10.2000) US
09/920,517 1 August 2001 (01.08.2001) US

(71) Applicant (for all designated States except US): RE-
GENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN
[US/US]; Wolverine Tower, Room 2071, 3003 S. State
Street, Ann Arbor, MI 48109-1280 (US).

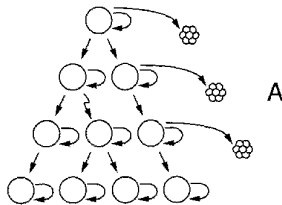
(72) Inventors: and
(75) Inventors/Applicants (for US only): CLARKE, Michael,
F [US/US]; 3377 Craig Road, Ann Arbor, MI 48103 (US).
MORRISON, Sean, J. [US/US]; 3513 Barton Farm, Ann
Arbor, MI 48105 (US). WICHA, Max, S. [US/US]; 2865
Parkridge Street, Ann Arbor, MI 48109 (US). AL-HAJJ,
Muhammad [US/US]; 2035 Commere, Apt #516, Ann Ar-
bor, MI 48103 (US).

(74) Agent: PRINCE, John, T., McDermott, Will & Emery, 28
State Street, Boston, MA 02109 (US).

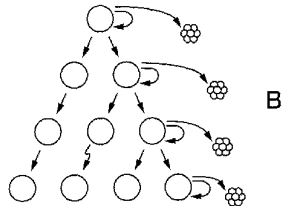
(81) Designated States (national): AE, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP,
KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD,
SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ,
VN, YU, ZA, ZW.

[Continued on next page]

(54) Title: ISOLATION AND USE OF SOLID TUMOR STEM CELLS



(57) Abstract: A small percentage of cells within an established solid tumor have the properties of stem cells. These solid tumor stem cells give rise both to more tumor stem cells and to the majority of cells in the tumor that have lost the capacity for extensive proliferation and the ability to give rise to new tumors. Thus, solid tumor heterogeneity reflects the presence of tumor cell progeny arising from a solid tumor stem cell. We have developed a xenograft model in which we have been able to establish tumors from primary tumors via injection of tumors in the mammary gland of severely immunodeficient mice. These xenograft assay have allowed us to do biological and molecular assays to characterize clonogenic solid tumor stem cells. We have also developed evidence that strongly implicates the Notch pathway, especially Notch 4, as playing a central pathway in carcinogenesis.



WO 02/12447 A2

WO 02/12447 A2



(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that 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 02/12447

PCT/US01/24243

1

ISOLATION AND USE OF SOLID TUMOR STEM CELLS

TECHNICAL FIELD

[01] This invention relates to the diagnosis and treatment of cancer.

BACKGROUND ART

[02] Cancer remains the number two cause of mortality in this country, resulting in over 500,000 deaths per year. Despite advances in detection and treatment, cancer mortality remains high. Despite the remarkable progress in understanding the molecular basis of cancer, this knowledge has not yet been translated into effective therapeutic strategies.

[03] In particular, breast cancer is the most common cancer in American women, with approximately one in nine women developing breast cancer in their lifetime. Unfortunately, metastatic breast cancer is still an incurable disease. Most women with metastatic breast cancer succumb to the disease.

[04] Traditional modes of therapy (radiation therapy, chemotherapy, and hormonal therapy), while useful, have been limited by the emergence of treatment-resistant cancer cells. Clearly, new approaches are needed to identify targets for treating metastatic breast cancer and cancer generally.

DISCLOSURE OF THE INVENTION

[05] The invention is based upon the discovery that a small percentage of cells within an established solid tumor have the properties of "stem cells". These solid tumor "stem" cells give rise both to more solid tumor stem cells and to the majority of cells in the tumor, cancer cells that have lost the capacity for extensive proliferation and the ability to give rise to new tumors. Thus, solid tumor cell heterogeneity reflects the presence of a variety of tumor cell types that arise from a solid tumor stem cell.

[06] The previous failure of cancer therapies to significantly improve outcome has been due in part to the failure of these therapies to target the solid tumor stem cells within a solid tumor that have the capacity for extensive proliferation and the ability to give rise to all other solid tumor cell types. This invention provides a way that anti-cancer therapies can be directed, both generally and now specifically directed, against the solid tumor stem cells. The directed anti-cancer therapies of the invention thus result in much more effective and durable therapeutic responses.

WO 02/12447

PCT/US01/24243

2

[07] By the methods of the invention, one can characterize the phenotypically heterogeneous populations of cells within a solid tumor. Populations of cells obtained from the solid tumor are isolated and structurally characterized using Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS). In particular, one can identify, isolate, and characterize a phenotypically distinct cell population within a tumor having the stem cell properties of extensive proliferation and the ability to give rise to all other tumor cell types. Solid tumor stem cells are the truly tumorigenic cells that are capable of re-establishing a tumor following treatment.

[08] The invention provides *in vivo* and *in vitro* assays of solid tumor stem cell function and cell function by the various populations of cells isolated from a solid tumor. The invention provides methods for using the various populations of cells isolated from a solid tumor (such as a population of cells enriched for solid tumor stem cells) to identify factors influencing solid tumor stem cell proliferation, to analyze populations of cells isolated from solid tumors for gene expression patterns or protein expression patterns, to identify new anti-cancer drug targets, to predict the sensitivity of tumors from individual patients to existing anti-cancer treatment regimens, to model anti-cancer treatment, to test new therapeutic compounds, to identify and test new diagnostic markers, to treat tumors, to produce genetically modified solid tumor stem cells, and to prepare cDNA libraries and microarrays of polynucleotides and polypeptides from solid tumor stem cells.

[09] The invention provides a method for consistently growing solid tumor cells *in vivo*. The invention also provides a method to grow solid tumor cells that are in single cell suspension or in small aggregates. Moreover, the invention provides a chimeric animal (a xenograft model) in which tumors can be established from solid tumor primary cells and in which the tumors derived from these solid tumor cells can be tested. Furthermore, the invention provides tumor banks (large enough to perform substantial numbers of bioassays) derived from single solid tumor stem cells.

[10] In its several aspects, the invention usefully provides methods for screening for anti-cancer agents; for the testing of anti-cancer therapies; for the development of drugs targeting novel pathways; for the identification of new anti-cancer therapeutic targets; the identification and diagnosis of malignant cells in pathology specimens; for the testing and assaying of solid tumor stem cell drug sensitivity; for the measurement of specific factors that predict drug sensitivity; and for the screening of patients (*e.g.*, as an adjunct for mammography). The invention can be used as a model to test patients' tumor sensitivity to known therapies; as a model for identification of new therapeutic targets for cancer treatment; as a system to establish a tumor bank for testing new therapeutic agents for treatment of cancer; and as a system to identify

WO 02/12447

PCT/US01/24243

3

the tumorigenic cancer cells. Also, the invention provides synergy between the methods of the invention and breast cancer genomic databases, for an improved anti-cancer drug discovery.

BRIEF DESCRIPTION OF DRAWINGS

FIG. 1 shows two models of solid tumor heterogeneity. In the classic model (FIG. 1A), mutations or environmental differences cause tumor cells to adopt a variety of different phenotypes. Environmentally determined differences in phenotype, represented by white, green, and red cells, may be reversible while mutationally determined changes in phenotype, represented by purple cells, may not be reversible. Many cells with a variety of different phenotypes are thought to have the potential to proliferate extensively and form new tumors. The tumor stem cell model (FIG. 1B) is distinguished by having only a minor population of tumor cells that are tumorigenic (yellow cells). These tumor stem cells are characterized by indefinite proliferative potential, the ability to form new tumors, and the ability to give rise to heterogeneous non-tumorigenic cancer cells that typically form the bulk of a tumor.

[11] FIG. 2 is a set of FACS plots of breast cancer tumor cells. Mice were implanted with primary breast cancer tumor cells removed from two human patients. Resultant tumors were removed from the mouse and single cell suspensions were made. Cells were stained with anti-CD44-PE, anti-520C9-APC, anti-mouse H2K-FITC (which stains infiltrating mouse cells) and Propidium Iodide (PI, which stains dead cells). Live, human CD44⁺ and human CD44⁻ cells were isolated and used for *in vitro* and *in vivo* studies.

[12] FIG. 3 is a set of FACS plots showing the expression of CD24 by malignant breast cells. Cells were isolated and stained as described in FIG. 2. Mouse cells and dead cells were gated out of the analysis. The FACS plots of cells from three breast cancer tumors are shown. Note that cells from all three tumors have a similar phenotype.

[13] FIG. 4 is a set of FACS plots showing an analysis of tumors arising from the CD24⁻ cell population from human breast cancers. According to the solid tumor stem cell model, the CD24⁻ cells give rise to tumors that contain both CD24⁺ and CD24⁻ cells. Accordingly, secondary transplants were performed using B38.1⁺CD24⁻ cells (FIG. 4A). The resultant tumors were removed and the cells were re-analyzed with respect to B38.1 and CD24 expression. As predicted by the stem cell model, cells obtained from a tumor arising from transplanted B38.1⁺CD24⁻ cells were heterogeneous with respect to expression of both B38.1 and CD24 (FIG. 4B). The marker expression pattern of the cells isolated from the tumor initiated by the B38.1⁺CD24⁻ cells was similar to that of the original tumor (FIG. 4).

[14] FIG. 5 is a FACS plot showing an analysis of Notch 4 expression. Cells were isolated

WO 02/12447

PCT/US01/24243

4

from a mouse xenograft tumor (*see, below*) and stained with antibodies. Malignant cells were analyzed for expression of B38.1 and Notch 4. Mouse cells and dead cells were gated out of the analysis.

- [15] FIG. 6 shows the fractionation of breast cancer cells based upon CD44 expression. Tumor T1 cells (FIG. 6A, FIG. 6C, and FIG. 6E) and Tumor T2 cells (FIG. 6B, FIG. 6D, and FIG. 6F) were stained with anti-CD44-PE, anti-mouse H2K-FITC and the viability dye 7AAD. Flow cytometry was used to isolate live, human (H2K⁻) cells that were either CD44⁺ (FIG. 6C, FIG. 6D) or CD44⁻ (FIG. 6E, FIG. 6F). Dead cells (7AAD⁺) were eliminated from all analyses. FIG. 6A and FIG. 6B are dot plots of the unfractionated T1 and T2 cells showing CD44 and H2K expression as indicated. Plots showing the isolated CD44⁺ (FIG. 6C, FIG. 6D) and CD44⁻ (FIG. 6E, FIG. 6F) populations depict reanalyses of cells that had been isolated by flow-cytometry. These cells were injected into the mammary fat pads of mice to examine their tumorigenicity. TABLES 1 and 3 show that the CD44⁺ cells but not the CD44⁻ cells were tumorigenic.
- [16] FIG. 7 shows the isolation of tumorigenic cells. Flow cytometry was used to isolate subpopulations of Tumor T1 (FIG. 7A, FIG. 7D, and FIG. 7G), Tumor T2 (FIG. 7B, FIG. 7E, and FIG. 7F) or Tumor T5 cells (FIG. 7C, FIG. 7F, and FIG. 7I) that were tested for tumorigenicity in NOD/SCID mice. T1 and T2 cells had been passaged once in NOD/SCID mice while T5 cells were obtained from material that had been frozen immediately after removal from a patient. Cells were stained with anti-B38.1-APC, anti-CD44-PE, anti-CD24-FITC, anti-LINEAGE-Cytochrome, anti-mouse-H2K-Cytochrome (T1 and T2 cells only), and 7AAD. Dead cells (7AAD⁺), mouse cells (H2K⁺) and LINEAGE⁺ cells were eliminated from all analyses. Each dot plot depicts the CD24 and CD44 staining patterns of live human B38.1⁺LINAGE⁻ cells. FIG. 7A, FIG. 7B, and FIG. 7C show unfractionated tumor cells. B38.1⁺CD44⁺LINAGE⁻ cells that were either CD24^{hi} (FIG. 7G, FIG. 7H, FIG. 7I) or CD24⁺ (FIG. 7D, FIG. 7E, FIG. 7F) were isolated from these tumor cells by flow-cytometry. FIGS. 7D-7I depict reanalyses of these sorted populations, which were subsequently injected into the mammary fat pads of NOD/SCID mice to test tumorigenicity. FIG. 7J shows a representative tumor in a mouse at the B38.1⁺CD44⁺CD24^{hi}LINAGE⁻ injection site, but not at the B38.1⁺CD44⁺CD24⁺LINAGE⁻ injection site. Histology performed on tissue from the CD24⁺ (FIG. 7K, 20x objective magnification) and CD24^{hi} (FIG. 7L, 40x objective magnification) injection sites exhibited normal mouse tissue and malignant cells respectively.
- [17] FIG. 8 shows the enrichment of tumorigenic cells based upon ESA expression. Flow cytometry was used to isolate subpopulations of Tumor T1 cells that were tested for tumorigenicity in NOD/SCID mice. T1 cells had been passaged once in NOD/SCID mice. Cells

WO 02/12447

PCT/US01/24243

5

were stained with anti-B38.1-APC, anti-CD24-PE, anti-ESA-FITC, anti-LINEAGE-Cytochrome, anti-mouse-H2K-Cytochrome (T1), and 7AAD. Dead cells (7AAD⁺), mouse cells (H2K⁺) and LINEAGE⁺ cells were eliminated from the analysis. The dot plot in FIG. 8A depicts the CD24 and ESA staining pattern of live human B38.1⁺LINAGE⁻ cells. The tumorigenic population is boxed and marked with an arrow. In FIG. 8B, the ESA⁺B38.1⁺CD24^{low}LINAGE⁻ cells (left panel) and the remaining LINEAGE⁻H2K⁻ cells (right panel) were collected using flow cytometry.

[18] FIG. 9 is the results of an *in vitro* clonogenic assay. Flow cytometry was used to isolate tumorigenic cell or the rest of the non-tumorigenic neoplastic (non-tumorigenic cells) as described. The cells were placed in tissue culture medium containing soluble Delta for the indicated number of days. The tumorigenic and non-tumorigenic xenograft Tumor 1 (T1) (FIG. 9A), Tumor 4 (T4) (FIG. 9B) or primary patient (FIG. 9C) cells are shown at the indicated time after being placed in tissue culture. T4 cells were stained with Papanicolaou stain and examined under light microscopy (100x objective). Note that both the non-tumorigenic (FIG. 9D) and tumorigenic (FIG. 9E) populations consist of neoplastic cells with large nuclei and prominent nucleoli. Note that the number of cells that attached to the tissue culture plate is similar in both populations, but that the tumorigenic population always gave rise to colonies. Non-tumorigenic populations do not give rise to established colonies (or only for brief periods, about 2-6 days).

[19] FIG. 10 is a set of dot plots showing the phenotypic diversity in tumors arising from B38.1⁺CD44⁺CD24^{low}LINAGE⁻ cells. The dot plots depict the CD24 and CD44 staining patterns of live human LINEAGE⁻ cells from Tumor T1 (FIG. 10A - FIG. 10C) or Tumor T2 (FIG. 10D - FIG. 10F). FIG. 10A and FIG. 10D show unfractionated T1 or T2 cells obtained from tumors that had been passaged once in NOD/SCID mice.

B38.1⁺CD44⁺CD24^{low}LINAGE⁻ cells from T1 (FIG. 10B) or T2 (FIG. 10E) were isolated as described in FIG. 2, above. The B38.1⁺CD44⁺CD24^{low}LINAGE⁻ populations reanalyzed in FIG. 10B and FIG. 10E) were injected into the mammary fat pads of NOD/SCID mice. FIG. 10C and FIG. 10F depict analyses of the tumors that arose from these

B38.1⁺CD44⁺CD24^{low}LINAGE⁻ cells. Note that in both cases, the

B38.1⁺CD44⁺CD24^{low}LINAGE⁻ cells formed tumors that contained a phenotypically diverse population of cells similar to that observed in the original tumor.

[20] FIG. 11 shows the expression of HER2/neu and EGF-R. Flow cytometry was used to isolate subpopulations of Tumor T1 cells that had been passaged once in NOD/SCID mice. Cells were stained with, in FIG. 11A, anti-EGF-R-PE, anti-B38.1-APC, anti-CD24-FITC,

WO 02/12447

PCT/US01/24243

6

anti-LINEAGE-Cytochrome, anti-mouse-H2K-Cytochrome, and 7AAD or, in FIG. 11B anti-HER2/neu-FITC, anti-B38.1-APC, anti-CD24-PE, anti-LINEAGE-Cytochrome, anti-mouse-H2K-Cytochrome, and 7AAD. Dead cells (7AAD⁺), mouse cells (H2K⁺) and LINEAGE⁺ cells were eliminated from all analyses. The histogram in FIG. 11A depicts the EGF-R expression of the unstained cells (dotted line), B38.1⁺CD24⁺LINAGE⁻ tumorigenic population (shaded) and the B38⁺CD24⁺LINAGE⁻ non-tumorigenic (solid line) population. The histogram in FIG. 11B shows HER2/neu expression of the unstained cells (dotted line), B38.1⁺CD24⁺LINAGE⁻ tumorigenic population (shaded) and the B38⁺CD24⁺LINAGE⁻ non-tumorigenic (solid line) population. RT-PCR was performed using nested primers to detect EGF-R (FIG. 11C and FIG. 11D) or to detect HER2/neu (FIG. 11E). One cell per sample in panels FIG. 11D and FIG. 11E, or ten cells per sample in panel FIG. 11C, were analyzed. EGF-R is expressed at lower levels in tumorigenic cells than in non-tumorigenic cells at both the protein (FIG. 11A) and mRNA levels (FIG. 11C, FIG. 11D).

[21] FIG. 12 is a photomicrograph of breast cancer cells placed in tissue culture after exposure to an anti-Notch 4 antibody. Cells were incubated on ice for one hour in HBSS with or without soluble Delta but no anti-Notch 4 antibody, with anti-Notch 4 antibody, or with anti-Notch 4 antibody that had been preincubated with the peptide used to generate the antibody. The number of colonies that formed in the triplicate experiments is shown. Soluble Delta was added to the culture. Fc-control medium without soluble Delta was added to the culture. Symbols: Ab=the anti-Notch 4 antibody; Block=the peptide used to generate the anti-Notch 4 antibody.

[22] FIG. 13 is a schematic diagram of B38.1⁺ cells within a tumor. The breast cancer stem cells from multiple patients are B38.1⁺. To successfully treat a cancer with a gene therapy approach, these cells can be targeted with a vector.

[23] FIG. 14 is a description of the method for obtaining the bi-specific conjugate and the chemical modifications introduced in the antibodies.

[24] FIG. 15 is a strategy for re-targeting Adenovirus. The LaZ virus can infect most of the cells from a tumor. After the LaZ virus is incubated only with the anti-fiber antibody, the LaZ virus loses ability to infect all of the cells. After the LaZ virus is incubated with the bi-specific conjugate, the B38.1 moiety of the molecule allows the attachment of the virus to the B38.1⁺ cells, so only these cells are infected.

[25] FIG. 16 shows the targeting of breast cancer stem cells with the bi-specific antibody. Different cell lines were infected with AdLaZ, which is an E1-deleted Adenovirus that expresses the β -galactosidase gene (gray columns, control for virus infection). In some cases, the virus was incubated with the anti-fiber antibody for 30 min before infection (yellow columns). In other

WO 02/12447

PCT/US01/24243

7

cases, the virus was incubated with the bi-specific conjugate (green columns). After 24 hr of infection, the monolayers were fixed and incubated with X-Gal-contained buffer. The infected cells are blue, and the graphic shows the percentage of blue cells obtained, relative to the control infection (*i.e.*, the reduction or increase in infectivity of the virus after incubation with the different antibodies).

[26] FIG. 17 shows that the bispecific antibody can target an adenovirus vector to breast cancer stem cells. The columns represent the absolute number of infected cells per field. Gray: The indicated cells infected with the control adenovirus. Yellow: the indicated cells were infected with the adenovirus that had been incubated with the anti-fiber antibody. Green: The indicated cells were incubated with the bi-specific conjugate antibody. Red: Cells were infected with the virus that had been incubated with the bi-specific conjugate antibody, but the cells were pre-treated with an excess of B38.1 antibody.

[27] FIG. 18 is a photograph of some of the cell monolayers after X-Gal staining. The infected cells appear like dark dots in this black and white picture (the β -galactosidase gene of the LaZ virus has a nuclear localization signal. The staining is in the nuclei of the cells).

[28] FIG. 19 is an analysis of different populations of cells in a breast cancer. $ESA^+CD44^+CD24^{lo}$ LINEAGE⁻ cells breast cancer stem cells (FIG. 19A) and $ESA^+CD44^+CD24^+LINEAGE^-$ non-tumorigenic cells (FIG. 19B) were obtained as described in FIG. 8. The cells were stained with Hoechst 33342 as described by Eaves and colleagues (Glimm H *et al.*, *Blood*. 96(13): 4185-93 (2000)). The histogram for the breast cancer stem cells is shaded. Note that the breast cancer stem cells and the non-tumorigenic cells are distributed in all phases of the cells cycle.

[29] FIG. 20 is a further analysis of different populations of cells in a breast cancer. $CD44^+CD24^{lo}$ LINEAGE⁻ cells breast cancer stem cells and non-tumorigenic $CD44^+CD24^+LINEAGE^-$ non-tumorigenic cells were obtained as described in FIG. 7. The cells were stained with Rhodamine 123 as described by Spangrude *et al.*, *Blood* 85(4):1006-16, 1995). The histogram for the breast cancer stem cells is shaded. Note that the breast cancer stem cells tend to stain less intensely with Rhodamine 123.

[30] FIG. 21 is an analysis of ascites fluid for ovarian cancer stem cells. Cells were stained with anti-B38.1-APC, anti-CD44-PE, anti-CD24-FITC, anti-Lineage-Cytochrome and 7AAD. Dead cells (7AAD⁺), and LINEAGE⁺ cells were eliminated from the analyses. Note that there is a distinct $CD44^+CD24^{lo}$ LINEAGE⁻ population of cells that resembles the breast cancer stem cells.

[31] FIG. 22 is an analysis of sarcoma cells for solid tumor stem cells. P1 sarcoma cells

growing in the xenograft model were stained with anti-B38.1-APC, anti-CD44-PE, anti-CD24-FITC, anti-LINEAGE-Cytochrome, anti-H2K-Cytochrome and 7AAD. Dead cells (7AAD⁺), LINEAGE⁺ cells and mouse cells were eliminated from the analyses. Note that the lineage cocktail in this analysis did not include CD10, CD31 or CD140b. Also note that there is a distinct CD44⁺CD24^{-lo} LINEAGE⁺ population of cells.

MODES FOR CARRYING OUT THE INVENTION

[32] *Stem cells and solid tumor heterogeneity models.* Solid tumors are composed of heterogeneous cell populations. For example, breast cancers are a mixture of cancer cells and normal cells, including mesenchymal (stromal) cells, inflammatory cells, and endothelial cells. Classic models hold that phenotypically distinct cancer cell populations all have the capacity to proliferate and give rise to a new tumor (FIG. 1A). In the classical model, tumor cell heterogeneity results from environmental factors as well as ongoing mutation within cancer cells resulting in diverse populations of tumorigenic cells and all populations of cells would have similar tumorigenic potential. Pandis *et al.*, *Genes, Chromosomes & Cancer* 12: 122-129 (1998); Kuukasjärvi *et al.*, *Cancer Res.* 57: 1597-1604 (1997); Bonsing *et al.*, *Cancer* 71: 382-391 (1993); Bonsing *et al.*, *Genes Chromosomes & Cancer* 82: 173-183 (2000); Beerman H *et al.*, *Cytometry*. 12(2): 147-54 (1991); Aubele M & Werner M, *Analyt. Cell. Path.* 19: 53 (1999); Shen L *et al.*, *Cancer Res.* 60: 3884 (2000).

[33] This invention is based upon an alternative model of solid tumor cell heterogeneity, in which a solid tumor results from a "solid tumor stem cell" (or "cancer stem cell" from a solid tumor) and the subsequent chaotic development of the solid tumor stem cell. In this stem cell model (FIG. 1B), solid tumors contain a distinct, limited (or possibly rare) subset of cells that share the properties of normal "stem cells", in that they proliferate extensively or indefinitely and that they efficiently give rise to additional solid tumor stem cells. Within an established solid tumor, most cells have lost the ability to proliferate extensively and form new tumors, but solid tumor stem cells proliferate extensively and give rise to additional solid tumor stem cells as well as to other tumor cells that lack tumorigenic potential. It is this solid tumor stem cell population that proliferates and ultimately proves fatal.

[34] To distinguish between these models, the deficiencies of the previous clonogenic assays (*see, below*) must be overcome. To prove the existence of a consistent stem cell population rather than a constant low probability of tumorigenicity in any cell type, one must be able to purify the stem cells and show that they are highly enriched for tumorigenicity, while the remainder of the neoplastic cells are depleted of such activity. The invention provides this

ability.

[35] The ability to isolate and analyze cell populations within a solid tumor, based upon structural features of the solid tumor stem cells, described herein, allows one skilled in the art of oncology or stem cell biology to distinguish between the two models shown in FIG. 1. By this invention, solid tumor stem cells and cell populations from solid tumors have been isolated and analyzed. Moreover, these solid tumor stem cells have very high or unlimited proliferative potential, and thus represent the truly tumorigenic population. According to the solid tumor stem cell model and the results provided below (*see, EXAMPLES*), these tumorigenic cells are the clonogenic cells of solid tumors.

[36] During normal animal development, cells of most or all tissues are derived from normal precursors, called stem cells (Morrison *et al.*, *Cell* 88(3): 287-98 (1997); Morrison *et al.*, *Curr. Opin. Immunol.* 9(2): 216-21 (1997); Morrison *et al.*, *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 11: 35-71 (1995)). The term "stem cell" is known in the art to mean (1) that the cell is a cell capable of generating one or more kinds of progeny with reduced proliferative or developmental potential; (2) that the cell has extensive proliferative capacity; and (3) that the cell is capable of self-renewal or self-maintenance (*see, Potten et al.*, *Development* 110: 1001 (1990); U.S. Pat. Nos. 5,750,376, 5,851,832, 5,753,506, 5,589,376, 5,824,489, 5,654,183, 5,693,482, 5,672,499, and 5,849,553, all incorporated by reference). In adult animals, some cells (including cells of the blood, gut, breast ductal system, and skin) are constantly replenished from a small population of stem cells in each tissue. Thus, the maintenance of tissues (whether during normal life or in response to injury and disease) depends upon the replenishing of the tissues from precursor cells in response to specific developmental signals.

[37] The best-known example of adult cell renewal by the differentiation of stem cells is the hematopoietic system (*see, U.S. Pat. Nos. 5,061,620, 5,087,570, 5,643,741, 5,821,108, 5,914,108, each incorporated by reference*). Developmentally immature precursors (hematopoietic stem and progenitor cells) respond to molecular signals to gradually form the varied blood and lymphoid cell types. Stem cells are also found in other tissues, including epithelial tissues (*see, Slack, Science* 287: 1431 (2000)) and mesenchymal tissues. (*see, U.S. Pat. No. 5,942,225; incorporated by reference*). In normal breast development, a normal stem cell gives rise to differentiated progeny to form a normal ductal system. Kordon & Smith, *Development* 125: 1921-1930 (1998); *see also, U.S. Pat. Nos. 5,814,511 and 5,650,317*.

[38] By this invention, the principles of normal stem cell biology have been applied to isolate and characterize solid tumor stem cells. Examples of solid tumors from which solid tumor stem cells can be isolated or enriched for according to the invention include sarcomas and carcinomas

such as, but not limited to: fibrosarcoma, myxosarcoma, liposarcoma, chondrosarcoma, osteogenic sarcoma, chordoma, angiosarcoma, endotheliosarcoma, lymphangiosarcoma, lymphangioendotheliosarcoma, synovioma, mesothelioma, Ewing's tumor, leiomyosarcoma, rhabdomyosarcoma, colon carcinoma, pancreatic cancer, breast cancer, ovarian cancer, prostate cancer, squamous cell carcinoma, basal cell carcinoma, adenocarcinoma, sweat gland carcinoma, sebaceous gland carcinoma, papillary carcinoma, papillary adenocarcinomas, cystadenocarcinoma, medullary carcinoma, bronchogenic carcinoma, renal cell carcinoma, hepatoma, bile duct carcinoma, choriocarcinoma, seminoma, embryonal carcinoma, Wilms' tumor, cervical cancer, testicular tumor, lung carcinoma, small cell lung carcinoma, bladder carcinoma, epithelial carcinoma, glioma, astrocytoma, medulloblastoma, craniopharyngioma, ependymoma, pinealoma, hemangioblastoma, acoustic neuroma, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma, and retinoblastoma. The invention is applicable to sarcomas (*see*, FIG. 22) and epithelial cancers, such as ovarian cancers (*see*, FIG. 21) and breast cancers (*see*, EXAMPLES).

[39] Solid tumor stem cells are defined structurally and functionally as described herein; using the methods and assays similar to those described below. Because tumor cells are known to evolve phenotypically and functionally over time as additional genetic mutations occur, the solid tumor stem cells may change phenotypically and functionally over time in an individual patient. Nevertheless, one can use the method of the invention, employing the markers disclosed herein, which are consistently useful in the isolation or identification of solid tumor stem cells in a majority of patients.

[40] Also, solid tumor stem cells undergo "self-renewal" and "differentiation" in a chaotic development to form a tumor, give rise to abnormal cell types, and may change over time as additional mutations occur. The functional features of a solid tumor stem cell are that they are tumorigenic, they give rise to additional tumorigenic cells ("self-renew"), and they can give rise to non-tumorigenic tumor cells ("differentiation").

[41] The developmental origin of solid tumor stem cells can vary between different types of solid tumor cancers. Solid tumor stem cells may arise either as a result of genetic damage that deregulates the proliferation and differentiation of normal stem cells (Lapidot *et al.*, *Nature* 367(6464): 645-8 (1994)) or by the dysregulated proliferation of a normal restricted progenitor or a normal differentiated cell type. Typically, solid tumors are visualized and initially identified according to their locations, not by their developmental origin.

[42] By contrast, a non-tumorigenic cell from a solid tumor is a cell from a population that fails to form a palpable tumor upon transplantation into an immunocompromised mouse, wherein

WO 02/12447

PCT/US01/24243

11

if the same number of unfractionated, dissociated tumor cells were transplanted under the same circumstances, the solid tumor stem cells would form a palpable tumor in the same period of time. Thus non-tumorigenic cells are depleted for tumor forming activity in an animal model.

[43] A "palpable tumor" is known to those in the medical arts as a tumor that is capable of being handled, touched, or felt.

[44] Because the tumorigenic changes are intrinsic to solid tumor stem cells, even after they have been removed from their normal environment within the tumor, the invention provides several novel uses:

(1) by identifying the genes and proteins expressed by solid tumor stem cells it is possible to identify proteins whose function is necessary for tumorigenesis and which represent novel drug targets;

(2) by purifying solid tumor stem cells based on phenotypic markers it is possible to study their gene expression patterns and functions much more directly and efficiently;

(3) by developing *in vitro* and *in vivo* assays of solid tumor stem cell function it is possible to more effectively test the effects of potential therapeutic compounds;

(4) by identifying markers of solid tumor stem cells it is possible to more effectively diagnose the presence of malignant cells (even those that do not depend on rare environmental characteristics for their ability to make tumors); and

(5) by isolating solid tumor stem cells from individual patients and transplanting them into *in vitro* and *in vivo* functional assays it is possible to test the effectiveness of different drug regimens against them. Thus, it is possible to predict drug sensitivity and drug resistance.

[45] The solid tumor stem cells of the model of the invention differs from the "cancer stem line" provided by U.S. Pat. 6,004,528. In that patent, the "cancer stem line" is defined as a slow growing progenitor cell type that itself has few mutations but which undergoes symmetric rather than asymmetric cell divisions as a result of tumorigenic changes that occur in the cell's environment. This "cancer stem line" hypothesis thus proposes that highly mutated, rapidly proliferating tumor cells arise largely as a result of an abnormal environment, which causes relatively normal stem cells to accumulate and then undergo mutations that cause them to become tumor cells. U.S. Pat. 6,004,528 proposes that such a model can be used to enhance the diagnosis of cancer. The solid tumor stem cell model is fundamentally different than the "cancer stem line" model and as a result exhibits utilities not offered by the "cancer stem line" model. First, solid tumor stem cells are not "mutationally spared". The "mutationally spared cancer stem line" described by U.S. Pat. No. 6,004,528 may be considered a pre-cancerous lesion, while the solid tumor stem cells described of this invention are cancer cells that themselves contain the

mutations that are responsible for tumorigenesis. That is, the solid tumor stem cells ("cancer stem cells") of the invention would be included among the highly mutated cells that are distinguished from the "cancer stem line" in U.S. Pat. 6,004,528. Second, the genetic mutations that lead to cancer are largely intrinsic within the solid tumor stem cells rather than being environmental. The solid tumor stem cell model predicts that isolated solid tumor stem cells can give rise to additional tumors upon transplantation (thus explaining metastasis) while the "cancer stem line" model would predict that transplanted "cancer stem line" cells would not be able to give rise to a new tumor, since it was their abnormal environment that was tumorigenic. Indeed, the ability to transplant dissociated, and phenotypically isolated human solid tumor stem cells to mice (into an environment that is very different from the normal tumor environment), where they still form new tumors, distinguishes the present invention from the "cancer stem line" model. Third, solid tumor stem cells likely divide both symmetrically and asymmetrically, such that symmetric cell division is not an obligate property. Fourth, solid tumor stem cells may divide rapidly or slowly, depending on many variables, such that a slow proliferation rate is not a defining characteristic.

[46] As described above, solid tumor stem cells can be operationally characterized by cell surface markers. These cell surface markers can be recognized by reagents that specifically bind to the cell surface markers. For example, proteins, carbohydrates, or lipids on the surfaces of solid tumor stem cells can be immunologically recognized by antibodies specific for the particular protein or carbohydrate (*for construction and use of antibodies to markers, see, Harlow, Using Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, 1999); *see also, EXAMPLES*). The set of markers present on the cell surfaces of solid tumor stem cells (the "cancer stem cells" of the invention) and absent from the cell surfaces of these cells is characteristic for solid tumor stem cells. Therefore, solid tumor stem cells can be selected by positive and negative selection of cell surface markers. A reagent that binds to a solid tumor stem cell is a "positive marker" (*i.e.*, a marker present on the cell surfaces of solid tumor stem cells) that can be used for the positive selection of solid tumor stem cells. A reagent that binds to a solid tumor stem cell "negative marker" (*i.e.*, a marker not present on the cell surfaces of solid tumor stem cells but present on the surfaces of other cells obtained from solid tumors) can be used for the elimination of those solid tumor cells in the population that are not solid tumor stem cells (*i.e.*, for the elimination of cells that are not solid tumor stem cells).

[47] In one embodiment, the discrimination between cells based upon the detected expression of cell surface markers is by comparing the detected expression of the cell surface marker as

compared with the mean expression by a control population of cells. For example, the expression of a marker on a solid tumor stem cell can be compared to the mean expression of the marker by the other cells derived from the same tumor as the solid tumor stem cell. Other methods of discriminating among cells by marker expression include methods of gating cells by flow cytometry based upon marker expression (*see*, Givan A, *Flow Cytometry: First Principles*, (Wiley-Liss, New York, 1992); Owens MA & Loken MR., *Flow Cytometry: Principles for Clinical Laboratory Practice*, (Wiley-Liss, New York, 1995)).

[48] Solid tumor stem cell positive markers may also be present on cells other than solid tumor stem cells. Solid tumor stem cell negative markers may also be absent from cells other than solid tumor stem cells. While it is rare to identify a single marker that identifies a stem cell, it has often been possible to identify combinations of positive and negative markers that uniquely identify stem cells and allow their substantial enrichment in other contexts. Morrison *et al.*, *Cell* 96(5): 737-49 (1999); Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92(22): 10302-6 (1995); Morrison & Weissman, *Immunity* 1(8): 661-73 (1994).

[49] A "combination of reagents" is at least two reagents that bind to cell surface markers either present (positive marker) or not present (negative marker) on the surfaces of solid tumor stem cells, or to a combination of positive and negative markers (*see*, EXAMPLES 7 and 8, TABLE 6). The use of a combination of antibodies specific for solid tumor stem cell surface markers results in the method of the invention being useful for the isolation or enrichment of solid tumor stem cells from a variety of solid tumors, including sarcomas, ovarian cancers, and breast tumors. Guidance to the use of a combination of reagents can be found in PCT patent application WO 01/052143 (Morrison & Anderson), incorporated by reference.

[50] By selecting for phenotypic characteristics among the cells obtained from a solid tumor, solid tumor stem cells can be isolated from any animal solid tumor, particularly any mammalian solid tumor. It will be appreciated that, taking into consideration factors such as a binding affinities, that antibodies that recognize species-specific varieties of markers are used to enrich for and select solid tumor stem cells. Antibodies that recognize the species-specific varieties of CD44, B38.1, CD24 and other markers will be used to enrich for or isolate solid tumor stem cells from that species (for example, antibody to a mouse CD44 for mouse solid tumor stem cells, antibody to a monkey B38.1 for monkey solid tumor stem cells, *etc.*).

[51] *An efficient xenograft model of human breast cancer.* The invention provides a xenograft model in which to establish tumors by the injection of solid tumor cells into a host animal. The host animal can be a model organism such as nematode, fruit fly, zebrafish; preferably a laboratory mammal such as a mouse (nude mouse, SCID mouse, NOD/SCID mouse,

WO 02/12447

PCT/US01/24243

14

Beige/SCID Mouse), rat, rabbit, or primate. The severely immunodeficient NOD-SCID mice were chosen as recipients to maximize the participation of injected cells. Immunodeficient mice do not reject human tissues, and SCID and NOD-SCID mice have been used as hosts for *in vivo* studies of human hematopoiesis and tissue engraftment. McCune *et al.*, *Science* 241: 1632-9 (1988); Kamel-Reid & Dick, *Science* 242: 1706-9 (1988); Larochelle *et al.*, *Nat. Med.* 2: 1329-37 (1996). In addition, Beige/SCID mice also have been used.

[52] Xenograft tumors have been established from mastectomy specimens of all the patients that have been tested to date (*see*, EXAMPLE 7). Tumors in mice have also been established from malignant pleural effusions. In addition, tumors have been established by the subcutaneous injection of cells that have been obtained from two sarcomas. Furthermore, for all the tumors that we have attempted, we have been able to make single-cell suspensions (or suspensions with a few aggregates of cell, such as less than 100; preferably less than 10) and then transfer the tumors. This xenograft assay is useful for biological and molecular assays to characterize the tumorigenic, clonogenic solid tumor stem cells.

[53] The NOD/SCID or Beige/SCID mice can be further immunosuppressed, using VP-16 (*see*, EXAMPLES 1 and 3), radiation therapy, chemotherapy, or other immunosuppressive biological agents.

[54] This *in vivo* assay is particularly advantageous for the better understanding of breast cancer and development of new treatments for this disease. Until now, it has been impossible to do biological and molecular studies involving primary breast cancer. Such studies have been limited to cell lines. Unfortunately, it is well known that the many of the fundamental properties of breast cancer cells change in tissue culture. Fenhall *et al.*, *British J. Cancer* 81: 1142-1149 (1999). This latter problem only worsens with continued culturing of the cells.

[55] By contrast, using the method of the invention, breast cancer cells (preferably enriched for breast cancer stem cells) are injected into immunocompromised mice, to grow the tumor. In one embodiment, the cells are injected either into the mammary fat pads of mice or subcutaneously into the mice. Furthermore, tumors can be established from single-cell suspensions (or suspensions with a few aggregates of cell, such as less than 100; preferably less than 10) and then the tumors transferred to other mice.

[56] The enrichment of solid tumor stem cells and the isolation of solid tumor stem cells distinguishes the present invention from the "primary bioassay of human tumor stem cells" referred to in U.S. Pat. No. 4,411,990 (*see also*, Hamburger *et al.*, *Blood* 47: 995 (1976); Salmon *et al.*, *AACR Abstracts* 19: 231, Abstract No. 922 (1978)). In previous tissue culture assays, only a small proportion of the tumor cells were able to form colonies in an *in vitro* clonogenic assay,

and large numbers of cells (such as myeloma and hematopoietic cells) were typically needed to be transplanted to form tumors *in vivo*. Ogawa M *et al.*, *Cancer Research* 31(12): 2116-2119 (1971); Ogawa M *et al.*, *Cancer Research* 33(12): 3172-3175, 1973. Salmon SE & Hamburger AW, *Science* 197: 461-463 (1977). Schlag P & Flentje D, *Cancer Treatment Reviews* 11 Suppl A:131-7 (1984). This led to the hypothesis that only a small number of tumor cells are actually tumorigenic. However, because of technical limitations, this tumorigenic fraction of cells could not be isolated from non-tumorigenic cells and therefore it could not be proven that there were intrinsically different subsets of tumor cells, some with substantial proliferative potential and others with limited potential. That is, unless the tumorigenic cells can be purified and distinguished from the non-tumorigenic cells it remains possible that all tumor cells have a similar low probability of exhibiting clonogenic activity in any assay. Moreover, without the ability to identify and isolate the tumorigenic fraction of cells (the tumor stem cells) U.S. Pat. No. 4,411,990 lacks the utilities described in this invention. For example, without markers to isolate the tumorigenic cells it is not possible to study their gene expression patterns, or their expression of diagnostic markers, or their response to therapeutic agents. Several technical problems prevented prior inventions from isolating tumorigenic cells or tumor stem cells. First, *in vitro* assays resulted in some initial colony formation, but usually the cells stopped proliferating and could not be grown continuously in culture. Salmon, S.E. & Hamburger AW, *Science* 197: 461-463 (1977); Schlag P *et al.*, *Cancer Treatment Reviews* 11 Suppl A:131-7, (1984); Salmon SE, *Recent Results in Cancer Research* 94: 8 (1984). Also, cells from many tumors failed to form colonies *in vitro* at all. Carney DN *et al.*, *Stem Cells* 1: 149-164 (1981). Similarly, dissociated cells isolated from most solid tumors rarely formed tumors in immunodeficient mouse models. Sakakibara T *et al.*, *Cancer J. Si. Am* 2: 291-300 (1996); Mueller B & Reisfeld RA, *Cancer Metastasis Rev.* 10: 193-200, (1991). The observation that only particular clones of immortalized tissue culture cancer cell lines were capable of forming tumors in the *in vivo* models further illustrates this problem (Hamilton TC *et al.*, *Cancer Research* 44(11): 5286-90 (1984)). Thus, the limitations in the assays made it impossible to determine whether the colonies arose from stem cells that had lost their capacity to proliferate *in vitro* from non-tumorigenic cells that had limited proliferative potential, or whether the small number of cells able to form colonies *in vitro* was due to a "stem cell" population within the tumor or due to a rare cell that could proliferate *in vitro*. Furthermore, it was not possible to distinguish phenotypically different populations of cells: prior to this invention, very limited use was made of techniques like flow-cytometry to separate and analyze phenotypically distinct populations of solid tumor cells by flow-cytometry. Indeed, the clonogenic assays used in the

prior art did not predict the behavior of an individual patient's tumor and fell out of favor. Von Hoff DD et al., *Cancer*. 67(1): 20-7 (1991); Federico M et al., *Gynecologic Oncology*. 55(3 Pt 2): S156-63 (1994). Thus, the limitations in the cell separation techniques, and the assays used in the prior art made it impossible for them to purify tumorigenic cells. Therefore, it was impossible to prove the existence of hypothetical tumor stem cells.

[57] *Role of Notch in breast cancer*. The Notch family of receptors has been implicated in stem cell development and differentiation (see, Morrison et al., *Cell* 101(5): 499-510 (2000); Artavanis-Tsakonas et al., *Science* 284: 770 (1999); and Artavanis-Tsakonas et al., *Science* 268: 225-232 (1995); U.S. Pat. No. 6,090,922, incorporated by reference). Notch was originally identified in *Drosophila* through loss-of-function mutations that produced too many neurons at the expense of other cell types. Poulson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 23: 133 (1937). In all animal models tested, mutations in the Notch receptor result in developmental abnormalities. In *C. elegans*, Notch is required for germ line stem cell self-renewal. Berry et al., *Development* 124(4): 925-36 (1997). In rats, Notch regulates neural crest stem cell differentiation. Morrison et al., *Cell* 101(5): 499-510 (2000). Transient Notch activation initiates an irreversible switch from neurogenesis to gliogenesis by neural crest stem cells.

[58] Because neighboring cells can express Notch receptors and ligands, one cell can affect the fate of a neighboring cell by activating Notch signaling in the neighboring cell.

[59] Proteins with knife-edge names such as Jagged (Shimizu et al., *Journal of Biological Chemistry* 274(46): 32961-9 (1999); Jarriault et al., *Molecular and Cellular Biology* 18: 7423-7431 (1998)), Serrate, and Delta (and variants of each, such as Delta1, Delta2, Delta3, Delta4, and Jagged2, LAG-2 and APX-1 in *C. elegans*), bind to the Notch receptor and activate a downstream signaling pathway that prevents neighboring cells from becoming neural progenitors. A recently identified ligand is Dll4, a Notch ligand of the Delta family expressed in arterial endothelium. Shutter et al., *Genes Dev* 14(11): 1313-8 (2000).

[60] Notch ligands may bind and activate Notch family receptors promiscuously. The expression of other genes, like Fringe family members (Panin et al., *Nature* 387(6636): 908-912 (1997)), may modify the interactions of Notch receptors with Notch ligands. Numb family members may also modify Notch signaling intracellularly.

[61] Ligand binding to Notch results in activation of a presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protein that cleaves Notch. De Strooper et al., *Nature* 398: 518-522 (1999), Mumm et al., *Molecular Cell*. 5: 197-206 (2000). Cleavage in the extracellular region may involve a furin-like convertase. Logeat et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 95: 8108-8112 (1998). The intracellular domain is released and

WO 02/12447

PCT/US01/24243

17

transactivates genes by associating with the DNA binding protein RBP-J. Kato *et al.*, *Development* 124: 4133-4141 (1997)). Notch 1, Notch 2 and Notch 4 are thought to transactivate genes such as members of the Enhancer of Split (HES) family, while Notch 3 signaling may be inhibitory. Beatus *et al.*, *Development* 126: 3925-3935 (1999). Finally, secreted proteins in the Fringe family bind to the Notch receptors and modify their function. Zhang & Gridley, *Nature* 394 (1998).

[62] In mammals, there are four known Notch family members. Notch 4 is the human ortholog of the mouse *int-3* oncogene that plays a role in breast cancer in mice. Gallahan *et al.*, *Cancer Res.* 56(8): 1775-85 (1996); Uyttendaele *et al.*, *Development* 2122: 251 (1996); Imatani & Callahan, *Oncogene* 19(2): 223-31 (2000)).

[63] The invention is based upon the discovery that Notch 4 plays a role both in normal human breast development and in tumorigenesis. Within an individual tumor, only a small subpopulation of tumorigenic cells expresses high levels of Notch 4. An antibody that recognizes Notch 4 blocks the growth of breast cancer tumor cells *in vitro* and *in vivo* (see, EXAMPLES 2, 5, 12 and 15). In one embodiment, the antibody binds to the extracellular domain of Notch 4. In a particular embodiment, the antibody binds to the polypeptide region LLCVSVVRPRGLLCGSFPE (LeuLeuCysValSerValValArgProArgGlyLeuLeuCysGlySerPheProGlu) (SEQ ID NO:1). However, any anti-Notch 4 antibody that inhibits Notch activation can be used to impair tumor survival.

[64] Inhibitors of Notch signaling (such as Numb and Numb-like; or antibodies or small molecules that block Notch activation) can be used in the methods of the invention to inhibit solid tumor stem cells. In this manner, the Notch pathway is modified to kill or inhibit the proliferation of solid tumor stem cells.

[65] By contrast, it had previously been found that stimulation of Notch using soluble Delta (Han *et al.*, *Blood* 95(5): 161625 (2000)), a Notch ligand, promoted growth and survival of tumor cells *in vitro*. Thus, it had previously been found that stimulation of the Notch pathway promotes growth and survival of the cancer cells.

[66] The invention differs from the manipulation of non-terminally differentiated cells using the Notch pathway provided in U.S. Pat. No. 5,780,300. U.S. Pat. No. 5,780,300 addresses the modification of normal cells, not cancer cells. That patent is directed to methods for the expansion of non-terminally differentiated cells (normal precursor cells) using agonists of Notch function, by inhibiting the differentiation of the cells without inhibiting proliferation (mitotic activity) such that an expanded population of non-terminally differentiated cells is obtained.

These expanded cells can be used in cell replacement therapy, a use that is incompatible with the goal of killing or inhibiting the proliferation of solid tumor stem cells by modifying Notch signaling in this invention.

[67] *Therapeutic aspects of the invention.* A corollary to the solid tumor stem cell model of the invention is that, to effectively treat cancer and achieve higher cure rates, anti-cancer therapies must be directed against solid tumor stem cells. Since current therapies are directed against the bulk population, they may be ineffective at eradicating solid tumor stem cells. The limitations of current cancer therapies derive from their inability to effectively kill solid tumor stem cells. The identification of solid tumor stem cells permits the specific targeting of therapeutic agents to this cell population, resulting in more effective cancer treatments. This concept would fundamentally change our approach to cancer treatment.

[68] Advances in modern biotechnology have facilitated the identification of new therapeutic targets for cancer treatment. Advances in genomics have made it possible to sequence and identify the 10,000 to 30,000 genes that are expressed in individual cell types. The human genome has been sequenced. This has resulted in the identification of new proteins involved in a myriad of biological processes such as proliferation, cell death and immortalization, providing targets for drug intervention. Although genomics provides a powerful means for identifying drug targets in cancer cells, these targets are only valid if the targets are present within the tumorigenic cell population. To be effective, genomics must be focused on individual populations within the heterogeneous cells that compose a tumor that are responsible for tumorigenic growth. In solid tumors, these are the solid tumor stem cells. Additionally, genomics has not yet been used to identify genes expressed in purified cell populations derived from cancerous tissues.

[69] One of the major problems in identifying new cancer therapeutic agents is determining which of the myriad of genes identified in large scale sequencing projects are the most clinically important drug targets. This is made especially difficult since solid tumors consist of a mixture of a many types of normal cells and a heterogeneous population of tumor cells. One way to reduce the complexity is to make cDNA after microdissection of solid tumors to enrich for tumor cells (*see, below*). This technique is based on the assumption that the pathologist dissecting out the tumor cells can predict which cells are tumorigenic based upon appearance. However, cells can be morphologically similar and yet remain functionally heterogeneous. Moreover, cells obtained by microdissection are not viable and therefore the functional properties of such cells cannot be tested or verified.

[70] Instead, by the methods of the invention, one can use flow cytometry (such as FACS) and

the xenograft animal model of the invention to enrich for specific cell populations. This technique has the advantage of being able to simultaneously isolate phenotypically pure populations of viable normal and tumor cells for molecular analysis. Thus, flow cytometry allows us to test the functions of the cell populations and use them in biological assays in addition to studying their gene expression profiles. Furthermore, such cells can also be characterized in biological assays. For example, mesenchymal (stromal) cells can be analyzed for production of growth factors, matrix proteins and proteases, endothelial cells can be analyzed for production of specific factors involved in solid tumor growth support (such as neo-vascularization), and different subsets of tumor cells from a solid tumor can be isolated and analyzed for tumorigenicity, drug resistance and metastatic potential.

[71] "Enriched", as in an enriched population of cells, can be defined based upon the increased number of cells having a particular marker in a fractionated set of cells as compared with the number of cells having the marker in the unfractionated set of cells. However, the term "enriched" can be preferably defined by tumorigenic function as the minimum number of cells that form tumors at limit dilution frequency in test mice. Thus, if 500 tumor stem cells form tumors in 63% of test animals, but 5000 unfractionated tumor cells are required to form tumors in 63% of test animals, then the solid tumor stem cell population is 10-fold enriched for tumorigenic activity (*see*, EXAMPLES). The solid tumor stem cell model (FIG. 1A) provides the linkage between these two definitions of (phenotypic and functional) enrichment.

[72] FACS methods using CD44 alone can enrich solid tumor stem cells at least 2-fold (*see*, EXAMPLE 1 and 3). FACS methods using B38.1 and CD24 can enrich for solid tumor stem cells 5-6 fold (*see*, EXAMPLE 3). Enrichment using additional markers can enrich 10-fold or more and can be used to isolate solid tumor stem cells.

[73] "Isolated" refers to a cell that is removed from its natural environment (such as in a solid tumor) and that is isolated or separated, and is at least about 75% free, and most preferably about 90% free, from other cells with which it is naturally present, but which lack the marker based on which the cells were isolated.

[74] Purification (enrichment or isolation) of subsets of cancer cells from a solid tumor allows one of skill in the art of oncology to distinguish between classic models of cancers and the solid tumor stem cell model (FIG. 1). If indeed a minority of solid tumor cells has stem cell properties, then to efficiently identify the genes necessary for tumor proliferation and drug resistance, the genomics must be focused on the stem cell population. If however, the genomics is targeted to the bulk population rather than the solid tumor stem cells, then the most promising drug targets are obscured or lost in a sea of other genes expressed by the other cells within a tumor that do not

have the capacity for extensive proliferation.

[75] In some of the EXAMPLES, we focused on the tumorigenic cells from breast cancer. Focusing on the individual populations of cells within a solid tumor provides a clearer understanding of how to focus new cancer treatments and identify novel targets for drug discovery. In addition, purifying solid tumor stem (such as breast cancer tumorigenic) cells provides a material for screening for drug sensitivity and identifying markers that predict tumorigenicity or metastatic potential.

[76] *In vivo proliferation of solid tumor stem cells.* The *in vivo* proliferation of solid tumor stem cells can be accomplished by injection of solid tumor stem cells into animals, preferably mammals, more preferably in rodents such as mice (due to the predictable methods that have been developed in the art for injection into laboratory rodents), and most preferably into immunocompromised mice, such as SCID mice, Beige/SCID mice or NOD/SCID mice (*see*, EXAMPLES). NOD/SCID mice are injected with the varying number of cells and observed for tumor formation. The injection can be by any method known in the art, following the enrichment of the injected population of cells for solid tumor stem cells.

[77] In one particular embodiment, to establish human breast cancer tumors in the NOD/SCID mouse model, eight week old female NOD-SCID mice were anesthetized by an intraperitoneal injection of 0.2 ml Ketamine/Xylazine (300 mg Ketamine combined with 20 mg Xylazine in a 4 ml volume. Then, 0.02 ml of the solution was diluted in HBSS is used per 20 g mouse. Mice were then treated with VP-16 (etoposide) via an intraperitoneal injection (30 mg etoposide per 1 kg, diluted in serum-free HBSS for a final injection volume of 0.2 ml). At the same time, estrogen pellets were placed subcutaneously on the back of the necks of the mice using a trocar. The mice were then warmed and placed back in to the cages after they awoke. All tumor injections/implantations were done 3-5 days after this procedure.

[78] For the implantation of fresh specimens, samples of human breast tumors were received within an hour after the surgeries. These tumors were cut up with scissors into small pieces, and the pieces were then minced with a blade to yield 2x2 mm-size pieces. Mincing was done in sterile RPMI 1640 medium supplemented with 20% Fetal Bovine Serum under sterile conditions on ice. The tumor pieces were then washed with serum free HBSS right before implantation. A 2-mm incision was then made in the mid abdomen area, and using a trocar, one to two small tumor pieces were implanted onto the upper right and upper left mammary fat pads (right below the second nipple on both sides). A 6-0 suture was wrapped twice around the MFP-Nipple allowing it to hold the implanted pieces in place. Sutures were removed 5 days later. Nexaban was used to seal the incision and mice were weekly monitored from tumor growth.

[79] For the injection of the pleural effusions or dissociated solid tumor cells, cells were received shortly after surgery and washed with HBSS serum-free. Cells were then suspended in serum free-RPMI/Matrigel mixture (1:1 volume) and then injected into the upper right and left mammary pads using an 18G needle. To do this, the desired number of cells were suspended in 0.2 ml and injected. The site of the needle injection was sealed with Nexaban to prevent any cell leakage.

[80] For the injection of digested tumor cells, tumors from a patient (solid tumors) or grown in mice (by the methods of the invention) were cut up into small pieces and then minced completely using sterile blades. The resulting pieces were then mixed with ultra-pure Collagenase III in HBSS solution (200-250 U collagenase/ml) and allowed to incubate at 37C for 3-4 hr, pipetting with a 10 ml pipette is done every 15-20 minutes. At the end of the incubation, cells were filtered through a 45-micron nylon mesh and washed with RPMI-20%FBS, then washed with HBSS twice. Cells to be injected were then suspended in HBSS/Matrigel mix (1:1 volume) and injected into the mammalian fat pad or subcutaneously as described above. Nexaban can be used to seal the injection site.

[81] For analysis of the xenotransplant tumor, a solid tumor is removed from the mice and made into a single cell suspension. Cells are stained and analyzed by flow cytometry (FACS) using methods known to those skilled in the art (Morrison & Weissman, *Immunity* 1(8): 661-73 (1994)). The phenotype of tumorigenic cells is CD44⁺CD24^{low} in all tumors, and B38.1⁺CD44⁺CD24^{low} in most tumors. We then do limiting dilution analysis of cells isolated by FACS based upon expression of these markers. Next, we further purify the breast cancer stem cell. Cells are stained with 7AAD (which stains dead cells), anti H2K-PE (which stains mouse cells), and combinations of antibodies against various markers that have heterogeneous expression patterns by the cancer cells including anti-B38.1, -annexin V, -Notch 4, -CD9, -CD24, -MUC1, -CD49F, -CD62P, -P-glycoprotein, -Notch 1, -520C9, -260F9 and -317G5. FACS is used to isolate viable human cells that either do or do not express one of the differentially expressed antigens. A combination of markers allows the greatest enrichment of tumorigenic cells. For the limiting dilution assays, one hundred, one thousand, ten thousand and one hundred thousand cells of each population are analyzed *in vivo*.

[82] SCID mice, NOD/SCID mice or Beige/SCID mice are injected with the varying number of cells and observed for tumors. Any tumors that form are removed for pathologic examination and FACS analysis. The tests are repeated (for example, about ten times) to confirm the results. The phenotypes of the tumorigenic cells are thus determined.

[83] Other general techniques for formulation and injection of cells may be found in

Remington's Pharmaceutical Sciences, 20th ed. (Mack Publishing Co., Easton, PA). Suitable routes may include parenteral delivery, including intramuscular, subcutaneous (*see, above*), intramedullary injections, as well as intrathecal, direct intraventricular, intravenous, intraperitoneal, intranasal, or intraocular injections, just to name a few. For injection, the agents of the invention may be formulated in aqueous solutions, preferably in physiologically compatible buffers such as Hanks's solution, Ringer's solution, or physiological saline buffer. For such transmucosal administration, penetrants appropriate to the barrier to be permeated are used in the formulation. Such penetrants are generally known in the art.

[84] By the use of populations of cells enriched for solid tumor stem cells, the invention is an improvement over the methods of Mueller & Reisfeld, *Cancer Metastasis Rev.* 10: 193-200 (1991) (who used the SCID mouse, which allows disseminated growths for a number of human tumors, particularly hematologic disorders and malignant melanoma) and Sakakibara *et al.*, *Cancer J. Sci. Am.* 2: 291-300 (1996) (who studied the growth and metastatic potential of surgical specimens of breast carcinomas engrafted into the large abdominal (gonadal) fat pad of severe combined immunodeficient (SCID) mice). Sakakibara *et al.* observed that placement of human breast tumors within the gonadal fat pad could result in tumors that grew either rapidly, slowly, or not at all. Of 48 tumors studied, 12 (25%), including one of the three lymph node-derived tumors, grew rapidly enough within some or all of the implanted mice (*i.e.*, the tumors reached a diameter of 2-3 cm within 2-6 months) to allow repeated passage.

[85] By contrast, the injection of solid tumor stem cells can consistently result in the successful establishment of tumors, more than 75% of the time, preferably more than 80% of the time, more preferably more than 85%, more than 90%, or more than 95% of the time. We have achieved 100% successful establishment of tumors from the five tumors tested, as well as from three pleural effusions (*see, EXAMPLES*). Moreover, the invention provides for the advantageous establishment of solid tumors (particularly tumors from breast tumor stem cells) in mammary fat pads, an area not accessible for establishment using the methods of Sakakibara *et al.*, *Cancer J.* 2: 291-300 (1996).

[86] *In vitro proliferation of solid tumor stem cells.* Cells can be obtained from solid tumor tissue by dissociation of individual cells. Tissue from a particular tumor is removed using a sterile procedure, and the cells are dissociated using any method known in the art (*see, Sambrook et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989); *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel *et al.*, eds., (Wiley Interscience, New York, 1993), and *Molecular Biology LabFax*, Brown, ed. (Academic Press, 1991)), including treatment with enzymes such as trypsin, collagenase and the like, or by using

physical methods of dissociation such as with a blunt instrument. Methods of dissociation are optimized by testing different concentrations of enzymes and for different periods of time, to maximize cell viability, retention of cell surface markers, and the ability to survive in culture (*Worthington Enzyme Manual*, Von Worthington, ed. (Worthington Biochemical Corporation, 2000). Dissociated cells are centrifuged at low speed, between 200 and 2000 rpm, usually about 1000 rpm (210 g), and then resuspended in culture medium. For guidance to methods for cell culture, see Spector *et al.*, *Cells: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, 1998).

[87] The dissociated tumor cells can be placed into any known culture medium capable of supporting cell growth, including HEM, DMEM, RPMI, F-12, and the like, containing supplements which are required for cellular metabolism such as glutamine and other amino acids, vitamins, minerals and useful proteins such as transferrin and the like. Medium may also contain antibiotics to prevent contamination with yeast, bacteria and fungi such as penicillin, streptomycin, gentamicin and the like. In some cases, the medium may contain serum derived from bovine, equine, chicken and the like. However, a preferred embodiment for proliferation of solid tumor stem cells is to use a defined, low-serum culture medium. A preferred culture medium for solid tumor stem cells is a defined culture medium comprising a mixture of Ham's F12, 2% fetal calf serum, and a defined hormone and salt mixture, either insulin, transferrin, and selenium or B27 supplement. Brewer *et al.*, *J. Neuroscience Res.* 35: 567 (1993).

[88] The culture medium can be a chemically defined medium that is supplemented with fetal bovine serum or chick embryo extract (CEE) as a source of mitogens and survival factors to allow the growth of tumor stem cells in culture. Other serum-free culture medium containing one or more predetermined growth factors effective for inducing stem cell proliferation, such as N2 supplement or B27 supplement, known to those of skill in the art can be used to isolate and propagate solid tumor stem cells from other bird and mammalian species, such as human. *See*, U.S. Pat. Nos. 5,750,376, 5,851,832, and 5,753,506; Atlas *et al.*, *Handbook of Microbiological Media* (CRC Press, Boca, Raton, Louisiana, 1993); Freshney, *Cutler on Animal Cells, A Manual of Basic Technique*, 3d Edition (Wiley-Liss, New York, 1994), all incorporated herein by reference.

[89] The culture medium for the proliferation of solid tumor stem cells thus supports the growth of solid tumor stem cells and the proliferated progeny. The "proliferated progeny" are undifferentiated tumor cells, including solid tumor stem cells, since solid tumor stem cells have a capability for extensive proliferation in culture.

[90] Conditions for culturing should be close to physiological conditions. The pH of the culture medium should be close to physiological pH, preferably between pH 6-8, more preferably between about pH 7 to 7.8, with pH 7.4 being most preferred. Physiological temperatures range between about 30°C to 40°C. Cells are preferably cultured at temperatures between about 32°C to about 38°C, and more preferably between about 35°C to about 37°C. Similarly, cells may be cultured in levels of O₂ that are comparatively reduced relative to O₂ concentrations in air, such that the O₂ concentration is comparable to physiological levels (1-6%), rather than 20% O₂ in air.

[91] A particular patient's solid tumor stem cells, once they have been proliferated *in vitro*, can be analyzed and screened. Solid tumor stem cell proliferated *in vitro* can also be genetically modified using techniques known in the art (*see, below; see also, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989); *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel *et al.*, eds., (Wiley Interscience, New York, 1993)). The *in vitro* genetic modification may be more desirable in certain circumstances than *in vivo* genetic modification techniques when more control over the infection with the genetic material is required.

[92] Solid tumor stem cells and stem cell progeny can be cryopreserved until they are needed by any method known in the art. The cells can be suspended in an isotonic solution, preferably a cell culture medium, containing a particular cryopreservant. Such cryopreservants include dimethyl sulfoxide (DMSO), glycerol and the like. These cryopreservants are used at a concentration of 5-15%, preferably 8-10%. Cells are frozen gradually to a temperature of -10°C to -150°C, preferably -20°C to -100°C, and more preferably -150°C.

[93] Additional guidance for the *in vitro* culture of solid tumor stem cells is provided in EXAMPLE 9 and FIG. 9.

[94] *Genetic modification of solid tumor stem cells and solid tumor stem cell progeny.* In the undifferentiated state, the solid tumor stem cells rapidly divide and are therefore excellent targets for genetic modification. The term "genetic modification" as used herein refers to the stable or transient alteration of the genotype of a precursor cell by intentional introduction of exogenous DNA. DNA may be synthetic, or naturally derived, and may contain genes, portions of genes, or other useful DNA sequences. The term "genetic modification" as used herein is not meant to include naturally occurring alterations such as that which occurs through natural viral activity, natural genetic recombination, or the like. General methods for the genetic modification of eukaryotic cells are known in the art. *See, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989); *Current Protocols in*

Molecular Biology, Ausubel *et al.*, eds., (Wiley Interscience, New York, 1993)).

[95] Many methods for introducing vectors into cells or tissues are available and equally suitable for use with solid tumor stem cells *in vivo*, *in vitro*, and *ex vivo*. Vectors may be introduced into hematopoietic stem cells taken from the patient and clonally propagated. By the method of the invention, such methods are extended to solid tumor stem cells.

[96] "Transformation," or "genetically modified" as defined herein, describes a process by which exogenous DNA enters and changes a recipient cell. Transformation may occur under natural or artificial conditions according to various methods well known in the art, and may rely on any known method for the insertion of foreign nucleic acid sequences into a prokaryotic or eukaryotic host cell. The method for transformation is selected based on the type of host cell being transformed and may include, but is not limited to, viral infection, electroporation, heat shock, lipofection, and particle bombardment. The term "transformed" cells includes stably transformed cells in which the inserted DNA is capable of replication either as an autonomously replicating plasmid or as part of the host chromosome, as well as transiently transformed cells which express the inserted DNA or RNA for limited periods of time.

[97] Genetic manipulation of primary tumor cells has been described previously by Patel *et al.*, *Human Gene Therapy* 5: 577-584 (1994). Genetic modification of a cell may be accomplished using one or more techniques well known in the gene therapy field. Mulligan RC, *Human Gene Therapy* 5: 543-563 (1993). Viral transduction methods may comprise the use of a recombinant DNA or an RNA virus comprising a nucleic acid sequence that drives or inhibits expression of a protein to infect a target cell. A suitable DNA virus for use in the present invention includes but is not limited to an adenovirus (Ad), adeno-associated virus (AAV), herpes virus, vaccinia virus or a polio virus. A suitable RNA virus for use in the present invention includes but is not limited to a retrovirus or Sindbis virus. Several such DNA and RNA viruses exist that may be suitable for use in the present invention.

[98] Adenoviral vectors have proven especially useful for gene transfer into eukaryotic cells for vaccine development (Graham FL & Prevec L, In *Vaccines: New Approaches to Immunological Problems*, Ellis RV ed., 363-390 (Butterworth-Heinemann, Boston, 1992).

[99] Specific guidance for the genetic modification of solid tumor stem cells is provided in EXAMPLE 13 and in FIGS. 15-18.

[100] "Non-viral" delivery techniques that have been used or proposed for gene therapy include DNA-ligand complexes, adenovirus-ligand-DNA complexes, direct injection of DNA, CaPO_4 precipitation, gene gun techniques, electroporation, and lipofection. Mulligan RC, *Science* 260: 926-932 (1993). Any of these methods are widely available to one skilled in the art and would be

suitable for use in the present invention. Other suitable methods are available to one skilled in the art, and it is to be understood that the present invention may be accomplished using any of the available methods of transfection. Lipofection may be accomplished by encapsulating an isolated DNA molecule within a liposomal particle and contacting the liposomal particle with the cell membrane of the target cell. Liposomes are self-assembling, colloidal particles in which a lipid bilayer, composed of amphiphilic molecules such as phosphatidyl serine or phosphatidyl choline, encapsulates a portion of the surrounding media such that the lipid bilayer surrounds a hydrophilic interior. Unilamellar or multilamellar liposomes can be constructed such that the interior contains a desired chemical, drug, or, as in the instant invention, an isolated DNA molecule. Delivery by transfection, by liposome injections, or by polycationic amino polymers may be achieved using methods which are well known in the art (*see, e.g.,* Goldman, C. K. et al. *Nature Biotechnology* 15:462-466 (1997)).

[101] Two types of modified solid tumor stem cells of particular interest are deletion mutants and over-expression mutants. Deletion mutants are wild-type cells that have been modified genetically so that a single gene, usually a protein-coding gene, is substantially deleted. Deletion mutants also include mutants in which a gene has been disrupted so that usually no detectable mRNA or bioactive protein is expressed from the gene, even though some portion of the genetic material may be present. In addition, in some embodiments, mutants with a deletion or mutation that removes or inactivates one activity of a protein (often corresponding to a protein domain) that has two or more activities, are used and are encompassed in the term "deletion mutants." Over-expression mutants are wild-type cells that are modified genetically so that at least one gene, most often only one, in the modified solid tumor stem cell is expressed at a higher level as compared to a cell in which the gene is not modified.

[102] Genetically modified solid tumor stem cells can be subjected to tissue culture protocols known in the art (*see, U.S. Pat. Nos. 5,750,376 and 5,851,832, Spector et al., Cells: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, 1998)). Tumor stem cells can be genetically modified in culture to promote differentiation, cell death, or immunogenicity. For example, tumor stem cells can be modified to enhance expression of products that direct an immune response against the patient's solid tumor. Alternatively, the solid tumor stem cells can be subjected to various proliferation protocols *in vitro* prior to genetic modification. The protocol used depends upon the type of genetically modified solid tumor stem cell or solid tumor stem cell progeny desired. Once the cells have been subjected to the differentiation protocol, they are again assayed for expression of the desired protein. Cells having the desired phenotype can be isolated and implanted into recipients in need of the protein

or biologically active molecule that is expressed by the genetically modified cell. Such molecules can enhance tumor regression or inhibit tumor spread.

[103] *In vitro models of solid tumor development, in vivo models, and methods for screening effects of drugs on solid tumor stem cells.* Solid tumor stem cells and solid tumor stem cell progeny cultured *in vitro* (see, EXAMPLE 9) or *in vivo* (in the xenograft model of the invention) can be used for the screening of potential therapeutic compositions. These compositions for the treatment of solid tumors can be applied to these cells in culture at varying dosages, and the response of these cells monitored for various time periods. Physical characteristics of these cells can be analyzed by observing cells by microscopy. The induction of expression of new or increased levels of proteins such as enzymes, receptors and other cell surface molecules can be analyzed with any technique known in the art see, Clarke *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 11024-11028 (1995)) which can identify the alteration of the level of such molecules. These techniques include immunohistochemistry, using antibodies (see, EXAMPLES) against such molecules, or biochemical analysis. Such biochemical analysis includes protein assays, enzymatic assays, receptor binding assays, enzyme-linked immunosorbant assays (ELISA), electrophoretic analysis, analysis with high performance liquid chromatography (HPLC), Western blots, and radioimmune assays (RIA). Nucleic acid analysis such as Northern blots can be used to examine the levels of mRNA coding for these molecules or PCR (see, EXAMPLE 14).

[104] Alternatively, such cells treated with these pharmaceutical compositions can be transplanted into an animal (such as in the xenograft model of the invention), and their survival, ability to form tumors, and biochemical and immunological characteristics examined.

[105] The solid stem cells and solid stem cell progeny of the invention can be used in methods of determining the effect of a biological agents on solid tumor cells. The term "biological agent" or "test compound" refers to any agent (including a virus, protein, peptide, amino acid, lipid, carbohydrate, nucleic acid, nucleotide, drug, antibody, prodrug or other substance) that may have an effect on tumor cells whether such effect is harmful, beneficial, or otherwise.

[106] To determine the effect of a potential test compound on solid tumor stem cells, a culture of precursor cells derived from tumor stem cells can be obtained from tissue of a subject, such as a patient with a tumor or other cancerous disease, such as an epithelial cancer or breast cancer. Once the solid tumor stem cells or other desired populations of cells are obtained from the subject, the cells are cultured *in vitro*. The choice of culture depends upon the particular test compound being tested and the diagnostic effects that the laboratory personnel want to achieve.

[107] The ability of various biological agents to increase, decrease, or modify in some other

way the number and nature of the solid tumor stem cells and solid tumor stem cell progeny can be screened. For example, it is possible to screen for test compounds that decrease the proliferative ability of the solid tumor stem cells, which would be useful for identifying anti-cancer therapeutic agents. In these assays, the relevant cells are cultured in the presence of the test compounds of interest and assayed for the degree of proliferation or cell death that occurs.

[108] The effects of a test compound or combination of test compounds on the extensive proliferation of solid tumor stem cells and their progeny can be determined. It is possible to screen non-tumorigenic solid tumor cells that have already been induced to lose the ability to extensively proliferate before the screening. It is also possible to determine the effects of the test compounds on the proliferation process by applying them to solid tumor stem cells. Generally, the test compound is solubilized and added to the culture medium or to the mouse in the *in vivo* assay at varying concentrations to determine the effect of the test compounds or agent at each dose. The culture medium may be replenished with the test compound or biological agent every couple of days in amounts so as to keep the concentration of the agent somewhat constant. Similarly, the test compound can be re-administered to the mouse at different intervals to assess the effect of the compound over time.

[109] Changes in proliferation are observed by an increase or decrease in the number of cells that form or an increase or decrease in the size of the foci *in vitro*, or tumor size *in vivo* (which is a reflection of the rate of proliferation and the rate of cell death-- determined by the numbers of cells per foci or tumor size in the mouse). The effect of the test compound on tumor stem cells are measured by determining the number of tumor stem cells that persist in culture or in the tumors *in vivo* after treatment with the test compound. In addition to determining the number of tumor stem cells, the effects of the test compound on tumor stem cell cell-cycle status, and marker expression are also determined by flow-cytometry.

[110] The test compounds or biological agents added to the culture medium or injected into the mouse can be at a final concentration in the range of about 10 pg/ml to 1 µg/ml, preferably about 1 ng/ml (or 1 ng/cc of blood) to 100 ng/ml (or 100 ng/cc of blood).

[111] The effects of the test compounds or biological agents are identified on the basis of significant difference relative to control cultures with respect to criteria such as the ratios of expressed phenotypes, cell viability, proliferation rate, number of tumor stem cells, tumor stem cell activity upon transplantation *in vivo*, tumor stem cell activity upon transplantation in culture, cell cycle distribution of tumor cells, and alterations in gene expression.

[112] *Therapeutic compositions and methods.* A pharmaceutical composition containing a

Notch ligand, an anti-Notch antibody, or other therapeutic agent that acts as an agonist or antagonist of proteins in the Notch signal transduction/response pathway can be administered by any effective method. For example, a physiologically appropriate solution containing an effective concentration of anti-Notch therapeutic agent can be administered topically, intraocularly, parenterally, orally, intranasally, intravenously, intramuscularly, subcutaneously or by any other effective means. In particular, the anti-Notch therapeutic agent may be directly injected into a target cancer or tumor tissue by a needle in amounts effective to treat the tumor cells of the target tissue. Alternatively, a cancer or tumor present in a body cavity such as in the eye, gastrointestinal tract, genitourinary tract (*e.g.*, the urinary bladder), pulmonary and bronchial system and the like can receive a physiologically appropriate composition (*e.g.*, a solution such as a saline or phosphate buffer, a suspension, or an emulsion, which is sterile) containing an effective concentration of anti-Notch therapeutic agent via direct injection with a needle or via a catheter or other delivery tube placed into the cancer or tumor afflicted hollow organ. Any effective imaging device such as X-ray, sonogram, or fiber-optic visualization system may be used to locate the target tissue and guide the needle or catheter tube. In another alternative, a physiologically appropriate solution containing an effective concentration of anti-Notch therapeutic agent can be administered systemically into the blood circulation to treat a cancer or tumor that cannot be directly reached or anatomically isolated.

[113] All such manipulations have in common the goal of placing the anti-Notch therapeutic agent in sufficient contact with the target tumor to permit the anti-Notch therapeutic agent to contact, transduce or transfect the tumor cells (depending on the nature of the agent). In one embodiment, solid tumors present in the epithelial linings of hollow organs may be treated by infusing the vector suspension into a hollow fluid filled organ, or by spraying or misting into a hollow air filled organ. Thus, the tumor cells (such as a solid tumor stem cells) may be present in or among the epithelial tissue in the lining of pulmonary bronchial tree, the lining of the gastrointestinal tract, the lining of the female reproductive tract, genitourinary tract, bladder, the gall bladder and any other organ tissue accessible to contact with the anti-Notch therapeutic agent. In another embodiment, the solid tumor may be located in or on the lining of the central nervous system, such as, for example, the spinal cord, spinal roots or brain, so that anti-Notch therapeutic agent infused in the cerebrospinal fluid contacts and transduces the cells of the solid tumor in that space. (Accordingly, the anti-Notch therapeutic agent can be modified to cross the blood brain barrier using method known in the art). One skilled in the art of oncology can appreciate that the anti-Notch therapeutic agent can be administered to the solid tumor by direct

injection of the vector suspension into the tumor so that anti-Notch therapeutic agent contacts and affects the tumor cells inside the tumor.

[114] One skilled in the art of oncology can understand that the vector is administered in a composition comprising the vector together with a carrier or vehicle suitable for maintaining the transduction or transfection efficiency of the chosen vector and promoting a safe infusion. Such a carrier may be a pH balanced physiological buffer, such as a phosphate, citrate or bicarbonate buffers a saline solution, a slow release composition and any other substance useful for safely and effectively placing the anti-Notch therapeutic agent in contact with solid tumor stem cells to be treated.

[115] In treating a cancer patient who has a solid tumor, a therapeutically effective amount of an anti-Notch therapeutic agent is administered. A therapeutically effective dose refers to that amount of the compound sufficient to result in amelioration of symptoms or a prolongation of survival in a patient. Toxicity and therapeutic efficacy of such compounds can be determined by standard pharmaceutical procedures in cell cultures or experimental animals, *e.g.*, for determining the LD₅₀ (the dose lethal to 50% of the population) and the ED₅₀ (the dose therapeutically effective in 50% of the population). The dose ratio between toxic and therapeutic effects is the therapeutic index and it can be expressed as the ratio LD₅₀/ED₅₀. Compounds that exhibit large therapeutic indices are preferred. The data obtained from these cell culture assays and animal studies can be used in formulating a range of dosage for use in humans. The dosage of such compounds lies preferably within a range of circulating concentrations that include the ED₅₀ with little or no toxicity. The dosage may vary within this range depending upon the dosage form employed and the route of administration utilized. For any compound used in the method of the invention, the therapeutically effective dose can be estimated initially from cell culture assays. A dose may be formulated in animal models to achieve a circulating plasma concentration range that includes the IC₅₀ as determined in cell culture. Such information can be used to more accurately determine useful doses in humans. Levels in plasma may be measured, for example, by high performance liquid chromatography (HPLC).

[116] The exact formulation, route of administration and dosage can be chosen by the individual physician in view of the patient's condition (*see e.g.* Fingl *et al.*, In *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Ch. 1, pg. 1 (1975)). The attending physician would know how to and when to terminate, interrupt, or adjust administration due to toxicity, or to organ dysfunctions. Conversely, the attending physician would also know to adjust treatment to higher levels if the clinical response were not adequate (precluding toxicity). The magnitude of an administered dose in the management of the clinical disorder of interest can vary with the

severity of the condition to be treated and the route of administration. *See, Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals*, 12 Edition (CRC Press 1996); *Physicians' Desk Reference* 55th Edition (2000)). The severity of the condition may, for example, be evaluated, in part, by appropriate prognostic evaluation methods. Further, the dose and perhaps dose frequency, also vary according to the age, body weight, and response of the individual patient. A program comparable to that discussed above may be used in veterinary medicine.

[117] Depending on the specific conditions being treated, agents may be formulated and administered systemically or locally. Techniques for formulation and administration may be found in *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 20th ed. (Mack Publishing Co., Easton, PA). Suitable routes may include oral, rectal, transdermal, vaginal, transmucosal, or intestinal administration; parenteral delivery, including intramuscular, subcutaneous, intramedullary injections, as well as intrathecal, direct intraventricular, intravenous, intraperitoneal, intranasal, or intraocular injections, just to name a few.

[118] For injection, the agents of the invention may be formulated in aqueous solutions, preferably in physiologically compatible buffers such as Hanks's solution, Ringer's solution, or physiological saline buffer. For such transmucosal administration, penetrants appropriate to the barrier to be permeated are used in the formulation. Such penetrants are generally known in the art.

[119] In addition to the active ingredients, these pharmaceutical compositions may contain suitable pharmaceutically acceptable carriers comprising excipients and auxiliaries, which facilitate processing of the active compounds into preparations which can be used pharmaceutically. The preparations formulated for oral administration may be in the form of tablets, capsules, or solutions. The pharmaceutical compositions of the present invention may be manufactured in a manner that is itself known, *e.g.*, by means of conventional mixing, dissolving, granulating, levigating, emulsifying, encapsulating, entrapping or lyophilizing processes. Pharmaceutical formulations for parenteral administration include aqueous solutions of the active compounds in water-soluble form. Additionally, suspensions of the active compounds may be prepared as appropriate oily injection suspensions. Suitable lipophilic solvents or vehicles include fatty oils such as sesame oil, or synthetic fatty acid esters, such as ethyl oleate or triglycerides, or liposomes. Aqueous injection suspensions may contain substances that increase the viscosity of the suspension, such as sodium carboxymethyl cellulose, sorbitol, or dextran. Optionally, the suspension may also contain suitable stabilizers or agents that increase the solubility of the compounds to allow for the preparation of highly concentrated solutions.

[120] *Polynucleotides and polypeptides obtained from solid tumor stem cells.* "Polynucleotide" refers to chain of nucleotides, which can be a nucleic acid, nucleic acid sequence, oligonucleotide, nucleotide, or any fragment thereof. It may be DNA or RNA of genomic DNA, mRNA, cDNA, or synthetic origin, double-stranded or single-stranded, and combined with carbohydrate, lipids, protein or other materials to perform a particular activity or form a useful composition. "Oligonucleotide" is substantially equivalent to the terms *amplimer*, *primer*, *oligomer*, *element*, and *probe*. The term "probe" refers to a polynucleotide sequence capable of hybridizing with a target sequence to form a polynucleotide probe/target complex. A "target polynucleotide" refers to a chain of nucleotides to which a polynucleotide probe can hybridize by base pairing. In some instances, the sequences will be complementary (no mismatches) when aligned. In other instances, there may be up to a 10% mismatch.

[121] DNA or RNA can be isolated from the sample according to any of a number of methods well known to those of skill in the art. For example, methods of purification of nucleic acids are described in Tijssen, *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology: Hybridization With Nucleic Acid Probes, Part I. Theory and Nucleic Acid Preparation* (Elsevier, New York N.Y., 1993). "Sample" is used in its broadest sense. A sample containing polynucleotides or polypeptides can be a bodily fluid; an extract from a cell, chromosome, organelle, or membrane isolated from a cell; genomic DNA, RNA, or cDNA in solution or bound to a substrate; a cell; a tissue; a tissue print; and the like.

[122] Total RNA can be isolated using the TRIZOL reagent (Life Technologies, Gaithersburg MD, USA), and mRNA is isolated using oligo d(T) column chromatography or glass beads. Alternatively, when target polynucleotides are derived from an mRNA, the target polynucleotides can be a cDNA reverse transcribed from an mRNA, an RNA transcribed from that cDNA, a DNA amplified from that cDNA, an RNA transcribed from the amplified DNA, and the like. When the target polynucleotide is derived from DNA, the target polynucleotide can be DNA amplified from DNA or RNA reverse transcribed from DNA.

[123] Several technologies produce pools of restriction fragments of limited complexity for electrophoretic analysis, such as methods combining double restriction enzyme digestion with phasing primers (*see, e.g.,* European patent application EP 0 534 858 A1), or methods selecting restriction fragments with sites closest to a defined mRNA end (*see, e.g.,* Prashar *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 659-663 (1996)). Other methods statistically sample cDNA pools, such as by sequencing sufficient bases (in each of multiple cDNAs to identify each cDNA, or by sequencing short tags which are generated at known positions relative to a defined mRNA end (*see, e.g.,* Velculescu, *Science* 270: 484-487 (1995))).

[124] Methods of modifying RNA abundances and activities currently fall within three classes, ribozymes, antisense species (PCT patent application WO 88/09810), and RNA aptamers (Good *et al.*, *Gene Therapy* 4: 45-54 (1997)). Ribozymes are RNAs which are capable of catalyzing RNA cleavage reactions. (PCT patent application WO 90/11364). Ribozyme methods involve exposing a cell to, inducing expression in a cell, *etc.* of such small RNA ribozyme molecules. (Grassi & Marini, *Annals of Medicine* 28: 499-510 (1996); Gibson, *Cancer and Metastasis Reviews* 15: 287-299 (1996)).

[125] The term "antisense," as used herein, refers to any composition containing a nucleic acid sequence which is complementary to the "sense" strand of a specific nucleic acid sequence. Antisense molecules may be produced by any method including synthesis or transcription. Once introduced into a cell, the complementary nucleotides combine with natural sequences produced by the cell to form duplexes and to block either transcription or translation. The designation "negative" can refer to the antisense strand, and the designation "positive" can refer to the sense strand.

[126] Oligonucleotides may be synthesized by standard methods known in the art, *e.g.* by use of an automated DNA synthesizer (such as are commercially available from Biosearch, Applied Biosystems, *etc.*).

[127] "Amplification," as used herein, relates to the production of additional copies of a nucleic acid sequence. Amplification is generally carried out using polymerase chain reaction (PCR) technologies well known in the art. *See, e.g.*, Dieffenbach CW & Dveksler GS, *PCR Primer, a Laboratory Manual* 1-5 (Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y., 1995). Amplification can be polymerase chain reaction (PCR), ligase chain reaction (LCR), nucleic acid sequence-based amplification (NASBA), or T7 based RNA amplification.

[128] "Polypeptide" refers to an amino acid, amino acid sequence, oligopeptide, peptide, or protein or portions thereof whether naturally occurring or synthetic.

[129] Methods for direct measurement of protein activity are well known to those of skill in the art. Such methods include, *e.g.*, methods which depend on having an antibody ligand for the protein, such as Western blotting, *see, e.g.*, Burnette, *A. Anal. Biochem.* 112: 195-203 (1981). Such methods also include enzymatic activity assays, which are available for most well-studied protein drug targets. Detection of proteins can be accomplished by antibodies (*see, EXAMPLES*).

[130] The term "antigenic determinant," as used herein, refers to that fragment of a molecule (*i.e.*, an epitope) that makes contact with a particular antibody. When a protein or a fragment of a protein is used to immunize a host animal, numerous regions of the protein may induce the

production of antibodies which bind specifically to antigenic determinants (given regions or three-dimensional structures on the protein). An antigenic determinant may compete with the intact antigen (*i.e.*, the immunogen used to elicit the immune response) for binding to an antibody.

[131] Proteins isolated from an enriched population of solid tumor stem cells or isolated solid tumor cells can be separated by two-dimensional gel electrophoresis systems. Two-dimensional gel electrophoresis is well-known in the art and typically involves iso-electric focusing along a first dimension followed by SDS-PAGE electrophoresis along a second dimension. *See, e.g.*, Hames *et al.*, *Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach* (IRL Press, New York 1990); Lander, *Science* 274:536-539 (1996). The resulting electrophoretograms can be analyzed by numerous techniques, including mass spectrometric techniques, western blotting and immunoblot analysis using polyclonal and monoclonal antibodies, and internal and N-terminal micro-sequencing. Using these techniques, it is possible to identify a substantial fraction of all the proteins produced under given physiological conditions, including in cells (*e.g.*, in solid tumor stem cells) exposed to a drug, or in cells modified by, *e.g.*, deletion or over-expression of a specific gene.

[132] *cDNA libraries*. The purified solid tumor stem cells, solid tumor stem cell progeny, non-tumorigenic cells, and unfractionated tumor cells can be used to make arrays or cDNA libraries using methods known in the art (*see*, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989); *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel *et al.*, eds., (Wiley Interscience, New York, 1993)) to identify potential novel drug targets.

[133] Molecular biology comprises a wide variety of techniques for the analysis of nucleic acids and proteins, many of which form the basis of clinical diagnostic assays. These techniques include nucleic acid hybridization analysis, restriction enzyme analysis, genetic sequence analysis, and separation and purification of nucleic acids and proteins (Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Ed.* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989). Many molecular biology techniques involve carrying out numerous operations on a large number of samples. For guidance to genomics and other molecular biological methods useful in the invention, *see* Birren *et al.*, *Genome Analysis: A Laboratory Manual Series, Volume 1, Analyzing DNA* (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, 1997); Birren *et al.*, *Genome Analysis: A Laboratory Manual Series, Volume 2, Detecting Genes* (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, 1998); Birren *et al.*, *Genome Analysis: A Laboratory Manual Series, Volume 4, Mapping Genomes* (Cold Spring

Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, 1999).

[134] Nucleic acid hybridization analysis generally involves the detection of a very small numbers of specific target nucleic acids (DNA or RNA) with probes among a large amount of non-target nucleic acids. Multiple sample nucleic acid hybridization analysis has been conducted on a variety of filter and solid support formats. The "dot blot" hybridization, involves the non-covalent attachment of target DNAs to a filter, which are subsequently hybridized with a labeled probes. The "dot blot" hybridization has been further developed for multiple analysis (European Patent application EP 0 228 075) and for the detection of overlapping clones and the construction of genomic maps (U.S. Pat. 5,219,726). Another format, the so-called "sandwich" hybridization, involves attaching oligonucleotide probes covalently to a solid support and using them to capture and detect multiple nucleic acid targets (U.S. Pat. No. 4,751,177; PCT International patent application WO 90/01564). Multiplex versions of these formats are called "reverse dot blots".

[135] Methods are known in the art for amplifying signal using sensitive reporter groups (enzyme, fluorophores, radioisotopes, *etc.*) and associated detection systems (fluorometers, luminometers, photon counters, scintillation counters, *etc.*). These methods can be combined with amplification methods, such as the polymerase chain reaction (PCR) for the amplification of target nucleic acid sequences. See, Innis *et al.*, *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, (Academic Press, 1990).

[136] *Microarrays*. Mimicking the *in situ* hybridization in some aspects, new techniques are being developed for carrying out multiple sample nucleic acid hybridization analysis on micro-formatted multiplex or matrix devices (*e.g.*, DNA chips) (*see*, Barinaga, *Science* 253: 1489 (1991); Bains, *BioTechnology* 10: 757-758 (1992)). Guidance for the use of microarrays is provided by Wang, E *et al.*, *Nature Biotechnology* 18: 457-459 (2000); Diehn M *et al.*, *Nature Genetics* 25: 58-62 (2000).

[137] Microarrays are known in the art and consist of a surface to which probes that correspond in sequence to gene products (*e.g.*, cDNAs, oligonucleotides, mRNAs, cRNAs, polypeptides, and fragments thereof), can be specifically hybridized or bound at a known position. In one embodiment, the microarray is an array (*i.e.*, a matrix) in which each position represents a discrete binding site for a product encoded by a gene (*e.g.*, a protein or RNA), and in which binding sites are present for products of most or almost all of the genes in the organism's genome.

[138] The polynucleotides, polypeptides, or analogues are attached to a solid support or substrate, which may be made from glass, plastic (*e.g.*, polypropylene, nylon), polyacrylamide,

nitrocellulose, or other materials. "Substrate" refers to any suitable rigid or semi-rigid support to which polynucleotides or polypeptides are bound and includes membranes, filters, chips, slides, wafers, fibers, magnetic or nonmagnetic beads, gels, capillaries or other tubing, plates, polymers, and microparticles with a variety of surface forms including wells, trenches, pins, channels and pores. The polynucleotides can be immobilized on a substrate by any method known in the art. Preferably, the substrates are optically transparent.

[139] A variety of methods are currently available for making arrays of biological macromolecules, such as arrays of nucleic acid molecules or proteins. One method for making ordered arrays of DNA on a porous membrane is a "dot blot" or "slot-blot" method. A more efficient technique employed for making ordered arrays of fragments uses an array of pins dipped into the wells, e.g., the 96 wells of a microtiter plate, for transferring an array of samples to a substrate, such as a porous membrane. An alternate method of creating ordered arrays of nucleic acid sequences is described by U.S. Pat. No. 5,143,854 (to Pirrung), and also by Fodor *et al.*, *Science* 251:767-773 (1991). The method involves synthesizing different nucleic acid sequences at different discrete regions of a support. Khrapko *et al.*, *DNA Sequence* 1:375-388 (1991) describes a method of making an oligonucleotide matrix by spotting DNA onto a thin layer of polyacrylamide, manually with a micropipette. U.S. Pat. No. 5,807,522 (to Brown *et al.*, incorporated by reference) describes methods for fabricating microarrays of biological samples by dispensing a known volume of a reagent at each selected array position, by tapping a capillary dispenser on the support under conditions effective to draw a defined volume of liquid onto the support.

[140] Spotters can use pin, ink-jet, and other technologies to deposit samples onto the support material. Several of the more common methods utilize metal pins, which can be either solid or split. When the pins are dipped into wells that contain the compounds of interest, each picks up a small amount of the material. The pin is then brought into contact with the solid support and a nanoliter volume is dispensed at the desired location. In split pins (otherwise known as quills) a slot cut into the head of the pin functions as a reservoir for the compound being spotted. Quill pins are most often used with glass slides, while solid pins are typically used for spotting membranes. Amersham Pharmacia Biotech, GeneMachines, and other companies offer spotting robots.

[141] Ink-jet technology provides another method of spotting microarrays. Adapted from the printer industry and redesigned for use in biotechnological applications, this uses piezoelectric crystal oscillators and an electrode guidance system to deposit the compound in a precise

location on the slide or membrane. Companies such as Cartesian Technologies and ProtoGene Laboratories use this technology.

[142] A method for attaching the nucleic acids to a surface is by printing on glass plates, as is described generally by PCT publication WO 95/35505; DeRisi *et al.*, *Nature Genetics* 14:457-460 (1996); Shalon *et al.*, *Genome Res.* 6:639-645 (1996); and Schena *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 10614-10619 (1995). Another method for making microarrays is by making high-density oligonucleotide arrays. Techniques are known for producing arrays containing thousands of oligonucleotides complementary to defined sequences, at defined locations on a surface using photolithographic techniques for synthesis *in situ* (see, Fodor *et al.*, *Science* 251:767-773 (1991); Pease *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:5022-5026 (1994); Lockhart *et al.*, *Nature Biotech* 14:1675 (1996); U.S. Pat. Nos. 5,578,832; 5,556,752; and 5,510,270, each of which is incorporated by reference).

[143] U.S. Pat. No. 6,110,426 (to Shalon *et al.*) a method and apparatus for fabricating microarrays of biological samples for large scale screening assays, such as arrays of DNA samples to be used in DNA hybridization assays for genetic research and diagnostic applications. U.S. Pat. No. 6,221,674 (to Sluka *et al.*) discloses a process is described for applying spatially defined reagent areas to a solid phase which is characterized in that a liquid containing an adsorptive binding reagent is contacted with spatially defined areas of a solid phase which comprises an essentially continuous metal or metal oxide surface for an adequate time period to enable the formation of adsorptive bonds between the binding reagent and the solid phase. A process is described in PCT application WO 92/10092 which can be used to generate a plurality of different structures on a glass support by means of photoreactive compounds and irradiation using masks. A process is described in U.S. Pat. No. 4,877,745 in which differently functionalized spots can be applied to plastic supports by means of ink-jet.

[144] Among the vendors of microarrays and microarray technology usage are Affymetrix, Inc. (USA), NimbleGen Systems, Inc. (Madison, Wisconsin, USA), and Incyte Genomics (USA) (producing microarrays for core facilities in large industrial and academic departments); Agilent Technologies (USA) and Graffinity Pharmaceutical Design, GmbH (Germany) (which provide specific services such as printing and fingerprinting arrays designed and used by individual researchers); and CLONTECH Laboratories (Becton Dickinson Bioscience) and BioRobotics, Ltd. (Great Britain) (which provide the basic tools necessary for individual researchers to carry out the entire process of producing microarrays, including printing). See, Gwynne P & Heebner G, "DNA Chips and Microarrays" *Science* (2001).

[145] In contrast to plastic surfaces, metal and metal oxide surfaces have the advantage that

they can be coated with an exactly defined matrix layer by self-assembly techniques. A self-assembled monolayer (SAM) is formed for example when organic alkylthiols are adsorbed onto a gold surface, the spontaneous organisation of such a densely packed monolayer being based on strong specific interactions between the support material and the adsorbent, Nuzzo *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 105: 4481 (1983). In this manner it is possible to apply an exactly defined monolayer of a binding matrix to the surface of metals such as *e.g.* gold or silver. Furthermore the specific binding capability of self-assembled solid phases can be further optimized by dilution of the specific solid phase reactants as described in EP-A-0 515 615.

[146] The coating of metal surfaces with microstructures based on self-assembled monolayers is also known and can be used to attach components isolated from solid tumor stem cells.

Whitesides *et al.*, *Langmuir* 10 (1994) 1498-1511 describe a process in which reagents are stamped onto a noble metal surface by means of a special microstructured silicone stamp. This enables microstructured monolayers to be generated with zones that are spatially separated from one another. Microstructures of self-assembled monolayers on noble metal surfaces can be formed by irradiation through masks of substrates whose whole area is covered with thiols and subsequent washing. Hemminger *et al.*, *Langmuir* 10: 626-628 (1994). Spatially separate zones are also formed in this process which are all identically functionalized. A further possibility of producing reagent spots is firstly to apply gold spots to a support that are already spatially separated from one another which are then subsequently coated with reagents.

[147] The binding of analytes to a functionalized solid phase matrix according to the invention can for example be detected by confocal scanner fluorescence microscopy or by plasmon resonance spectroscopy. Ruthenhausler B *et al.*, *Nature*, 332: 615-617 (1988).

[148] U.S. Pat. No. 6,228,659 describes an apparatus for producing a plurality of arrays of reagent regions is disclosed. A dispensing assembly in the apparatus has a plurality of heads which are spaced for depositing reagents at selected positions in different array areas in a substrate.

[149] Transcript arrays can be employed for analyzing the transcriptional state in a cell, and especially for measuring the transcriptional states of cells exposed to graded levels of a therapy of interest such as graded levels of a drug of interest or to graded levels of a disease state of interest. In one embodiment, transcript arrays are produced by hybridizing detectably labeled polynucleotides representing the mRNA transcripts present in a cell (*e.g.*, fluorescently labeled cDNA synthesized from total cell mRNA) to a microarray. In alternative embodiments, the cDNA or RNA probe can be synthesized in the absence of detectable label and may be labeled subsequently, *e.g.*, by incorporating biotinylated dNTPs or rNTP, or some similar means (*e.g.*,

photo-cross-linking a psoralen derivative of biotin to RNAs), followed by addition of labeled streptavidin (*e.g.*, phycoerythrin-conjugated streptavidin) or the equivalent. The label for the probe may be selected from the group consisting of biotin, fluorescent, radioactive, and enzymatic labels. When fluorescently-labeled probes are used, many suitable fluorophores are known, including fluorescein, lissamine, phycoerythrin, rhodamine (Perkin Elmer Cetus), Cy2, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7, FluorX (Amersham) and others (*see, e.g.*, Kricka, *Nonisotopic DNA Probe Techniques* (Academic Press San Diego, Calif., 1992). It will be appreciated that pairs of fluorophores are chosen that have distinct emission spectra so that they can be easily distinguished. In another embodiment, a label other than a fluorescent label is used. For example, a radioactive label, or a pair of radioactive labels with distinct emission spectra, can be used (*see Zhao et al., Gene* 156:207 (1995); Pietu *et al., Genome Res.* 6:492 (1996); *see also*, EXAMPLE 21). For example, ³²P can be used.

[150] These methods of attaching transcripts usually attach specific polynucleotide sequences to very small specific areas of a solid support, such as micro-wells of a DNA chip. These hybridization formats are micro-scale versions of the conventional "reverse dot blot" and "sandwich" hybridization systems. The micro-formatted hybridization can be used to carry out "sequencing by hybridization" (*see, Barinaga, Science* 253: 1489 (1991); Bains, *Bio/Technology* 10: 757-758 (1992). Sequencing by hybridization makes use of all possible n-nucleotide oligomers (n-mers) to identify n-mers in an unknown DNA sample, which are subsequently aligned by algorithm analysis to produce the DNA sequence (*see, U.S. Pat. No. 5,202,231; see also, United Kingdom patent application GB 8810400* (1988); Southern *et al., Genomics* 13: 1008 (1992); Fodor *et al., Nature* 364: 555-556 (1993); Fodor *et al., Science* 251: 767-773 (1991); U.S. Pat. No. 5,143,854.

[151] Probes can be synthesized, in whole or in part, on the surface of a substrate using a chemical coupling procedure and a piezoelectric printing apparatus, such as that described in PCT publication WO 95/251116 (Baldeschweiler *et al.*). Alternatively, the probe can be synthesized on a substrate surface using a self-addressable electronic device that controls when reagents are added (U.S. Pat. No. 5,605,662).

[152] Furthermore, the probes do not have to be directly bound to the substrate, but rather can be bound to the substrate through a linker group. The linker groups are typically about 6 to 50 atoms long to provide exposure to the attached polynucleotide probe. Preferred linker groups include ethylene glycol oligomers, diamines, diacids and the like. Reactive groups on the substrate surface react with one of the terminal portions of the linker to bind the linker to the substrate. The other terminal portion of the linker is then functionalized for binding the

polynucleotide probe.

[153] Devices and computer systems for forming and using arrays of materials on a chip or substrate are known. For example, PCT International patent applications WO 92/10588 and WO 95/11995, both incorporated herein by reference, describe techniques for sequencing or sequence checking nucleic acids and other materials. Arrays for performing these operations can be formed in arrays according to the methods of, for example, the pioneering techniques disclosed in U.S. Pat. Nos. 5,445,934, 5,384,261 and 5,571,639, each incorporated herein by reference. Improved methods of forming high-density arrays of peptides, polynucleotides, and other polymer sequences in a short period of time have been devised using combinatorial solid phase synthesis. Very Large Scale Immobilized Polymer Synthesis (VLSIPS) technology has greatly advanced combinatorial solid phase polymer synthesis and paved the way to clinical application of deoxyribonucleic acid (DNA) array chips such as those sold under the name GENECHIP™ Kozal *et al.*, *Nature Medicine* 2: 753-759 (1996). VLSIPS technology is disclosed in U.S. Pat. No. 5,143,854, PCT International patent applications WO 90/15070, WO 92/10092, and WO 95/11995; and Fodor *et al.*, *Science* 251: 767-777(1991).

[154] Nucleic acid hybridization and wash conditions are chosen so that the probe "specifically binds" or "specifically hybridizes" to a specific array site, i.e., the probe hybridizes, duplexes or binds to a sequence array site with a complementary nucleic acid sequence but does not hybridize to a site with a non-complementary nucleic acid sequence. As used herein, one polynucleotide sequence is considered complementary to another when, if the shorter of the polynucleotides is less than or equal to 25 bases, there are no mismatches using standard base-pairing rules or, if the shorter of the polynucleotides is longer than 25 bases, there is no more than a 5% mismatch. Preferably, the polynucleotides are perfectly complementary (no mismatches). It can easily be demonstrated that specific hybridization conditions result in specific hybridization by carrying out a hybridization assay including negative controls. Optimal hybridization conditions will depend on the length (e.g., oligomer versus polynucleotide greater than 200 bases) and type (e.g., RNA, DNA, PNA) of labeled probe and immobilized polynucleotide or oligonucleotide. General parameters for specific (i.e., stringent) hybridization conditions for nucleic acids are described in Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology* (Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York 1987). Useful hybridization conditions are also provided in, e.g., Tijessen, *Hybridization With Nucleic Acid Probes*, (Elsevier Science Publishers B.V., 1993) and Kricka, *Nonisotopic DNA Probe Techniques*, (Academic Press, San Diego, Calif., 1992).

[155] When cDNA complementary to the RNA of a cell is made and hybridized to a microarray under suitable hybridization conditions, the level of hybridization to the site in the array corresponding to any particular gene will reflect the prevalence in the cell of RNA transcribed from that gene. For example, when detectably labeled (*e.g.*, with a fluorophore) cDNA complementary to the total cellular mRNA is hybridized to a microarray, the site on the array corresponding to a gene (*i.e.*, capable of specifically binding the product of the gene) that is not transcribed in the cell will have little or no signal (*e.g.*, fluorescent signal), and a gene for which the encoded mRNA is prevalent will have a relatively strong signal.

[156] U.S. Pat. No. 6,183,968 (to Bandman *et al.*) discloses polynucleotide probes that can be used as hybridizable array elements in a microarray, each of the polynucleotide probes having at least a portion of a gene which encodes a protein associated with cell proliferation or a receptor.

[157] When fluorescently labeled probes are used, the fluorescence emissions at each site of a transcript array can be, preferably, detected by scanning confocal laser microscopy. In one embodiment, a separate scan, using the appropriate excitation line, is carried out for each of the two fluorophores used. Alternatively, a laser can be used that allows simultaneous specimen illumination at wavelengths specific to the two fluorophores and emissions from the two fluorophores can be analyzed simultaneously (*see* Shalon *et al.*, *Genome Research* 6:639-645 (1996)). Signals are recorded and, preferably, analyzed by computer, using commercially available methods. The abundance sort program of the invention described in U.S. Pat. No. 5,840,484 can be used to tabulate and sort by frequency the mRNA transcripts corresponding to each gene identified. Since some of the polynucleotide sequences are identified solely based on expression levels, it is not essential to know *a priori* the function of a particular gene in solid tumor stem cells.

[158] Transcript image comparisons can be obtained by methods well known to those skilled in the art. Transcript levels and images can be obtained and compared, for example, by a differential gene expression assay based on a quantitative hybridization of arrayed DNA clones (Nguyen *et al.* *Genomics* 29:207-216 (1995)), based on the serial analysis of gene expression (SAGE) technology (Velculescu *et al.* *Science* 270:484-487 (1995)), based on the polymerase chain reaction (Peng *et al.* *Science* 257:967-971 (1992)), based on a differential amplification protocol (U.S. Pat. No. 5,545,522), or based on electronic analysis, such as comparative gene transcript analysis (U.S. Pat. No. 5,840,484) or the GEMTOOLS gene expression analysis program (Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, Calif., USA). Preferably, comparisons between two or more transcript profiles are performed electronically.

[159] U.S. Pat. No. 6,215,894 discloses a system for scanning biochip arrays includes a unique

image array identifier recorded for each array, and a computer-stored record corresponding to each identifier and containing the parameters of the experiment in the array identified by the identifier. The system further includes means for accessing a protocol library to retrieve the scanning protocols associated with the identified arrays and then scanning the arrays in accordance with the respective protocols. The resulting image maps generated by the scanners are stored in locations corresponding to the associated identifiers.

[160] Measurement of the translational state may be performed according to several methods. For example, whole genome monitoring of protein (*i.e.*, the "proteome,") can be carried out by constructing a microarray in which binding sites comprise immobilized, preferably monoclonal, antibodies specific to a plurality of protein species encoded by the cell genome.

[161] *Use of microarrays.* The microarrays describe above can be employed in several applications including solid tumor cancer diagnostics, prognostics and treatment regimens, drug discovery and development, toxicological and carcinogenicity studies, forensics, pharmacogenomics and the like.

[162] In one embodiment, the microarray is used to monitor the progression of disease. Physicians can assess and catalog the differences in gene expression between healthy and cancerous tissues by analyzing changes in patterns of gene expression compared with solid tumor stem cells from the patient. Thus, cancer can be diagnosed at earlier stages before the patient is symptomatic. The invention can also be used to monitor the efficacy of treatment. For some treatments with known side effects, the microarray is employed to "fine tune" the treatment regimen. A dosage is established that causes a change in genetic expression patterns indicative of successful treatment. Expression patterns associated with undesirable side effects are avoided. This approach may be more sensitive and rapid than waiting for the patient to show inadequate improvement, or to manifest side effects, before altering the course of treatment.

[163] Alternatively, animal models which mimic a disease, rather than patients, can be used to characterize expression profiles associated with a particular disease or condition. This gene expression data may be useful in diagnosing and monitoring the course of disease in a patient, in determining gene targets for intervention, and in testing novel treatment regimens.

[164] Also, researchers can use the microarray to rapidly screen large numbers of candidate drug molecules, looking for ones that produce an expression profile similar to those of known therapeutic drugs, with the expectation that molecules with the same expression profile will likely have similar therapeutic effects. Thus, the invention provides the means to determine the molecular mode of action of a drug.

[165] U.S. Pat Nos. 6,218,122, 6,165,709, and 6,146,830 (all to Friend *et al.*) discloses methods for identifying targets of a drug in a cell by comparing (i) the effects of the drug on a wild-type cell, (ii) the effects on a wild-type cell of modifications to a putative target of the drug, and (iii) the effects of the drug on a wild-type cell which has had the putative target modified of the drug. In various embodiments, the effects on the cell can be determined by measuring gene expression, protein abundances, protein activities, or a combination of such measurements. In various embodiments, modifications to a putative target in the cell can be made by modifications to the genes encoding the target, modification to abundances of RNAs encoding the target, modifications to abundances of target proteins, or modifications to activities of the target proteins. The present invention provides an improvement to these methods of drug discovery by providing the tumorigenic solid tumor stem cells, for a more precise drug discovery program.

[166] An "expression profile" comprises measurement of a plurality of cellular constituents that indicate aspects of the biological state of a cell. Such measurements may include, *e.g.*, RNA or protein abundances or activity levels. Aspects of the biological state of a cell of a subject, for example, the transcriptional state, the translational state, or the activity state, are measured. The collection of these measurements, optionally graphically represented, is called the "diagnostic profile". Aspects of the biological state of a cell which are similar to those measured in the diagnostic profile, *e.g.*, the transcriptional state, are measured in an analogous subject or subjects in response to a known correlated disease state or, if therapeutic efficacy is being monitored, in response to a known, correlated effect of a therapy. The collection of these measurements, optionally graphically represented, is called herein the "response profile". The response profiles are interpolated to predict response profiles for all levels of protein activity within the range of protein activity measured. In cases where therapeutic efficacy is to be monitored, the response profile may be correlated to a beneficial effect, an adverse effect, such as a toxic effect, or to both beneficial and adverse effects.

[167] As is commonly appreciated, protein activities result from protein abundances; protein abundances result from translation of mRNA (balanced against protein degradation); and mRNA abundances result from transcription of DNA (balanced against mRNA degradation). Therefore, genetic level modifications to a cellular DNA constituent alters transcribed mRNA abundances, translated protein abundances, and ultimately protein activities. RNA level modifications similarly alter RNA abundance and protein abundances and activities. Protein level modifications alter protein abundances and activities. Finally, protein activity modifications are the most targeted modification methods. As is commonly appreciated, it is ultimately protein activities (and the activities of catalytically active RNAs) that cause cellular transformations and

effects. Also, most drugs act by altering protein activities.

[168] In one embodiment, cDNAs from two different cells (one being the solid tumor stem cells of the invention) are hybridized to the binding sites of the microarray. In the case of therapeutic efficacy (*e.g.*, in response to drugs) one cell is exposed to a therapy and another cell of the same type is not exposed to the therapy. In the case of disease states one cell exhibits a particular level of disease state and another cell of the same type does not exhibit the disease state (or the level thereof). The cDNA derived from each of the two cell types are differently labeled so that they can be distinguished. In one embodiment, for example, cDNA from a cell treated with a drug (or exposed to a pathway perturbation) is synthesized using a fluorescein-labeled dNTP, and cDNA from a second cell, not drug-exposed, is synthesized using a rhodamine-labeled dNTP. When the two cDNAs are mixed and hybridized to the microarray, the relative intensity of signal from each cDNA set is determined for each site on the array, and any relative difference in abundance of a particular mRNA detected. The use of a two-color fluorescence labeling and detection scheme to define alterations in gene expression has been described, *e.g.*, in Shena *et al.*, *Science* 270:467-470 (1995). An advantage of using cDNA labeled with two different fluorophores is that a direct and internally controlled comparison of the mRNA levels corresponding to each arrayed gene in two cell states can be made, and variations due to minor differences in experimental conditions (*e.g.*, hybridization conditions) will not affect subsequent analyses. Additional guidance is provided in EXAMPLE 21.

[169] U.S. Pat. No. 6,194,158 (to Kroes *et al.*) for a diagnostic assay for cancer with a DNA chip of specific sequences for measuring expression levels of certain sequences within a cancer cell to determine whether expression is up- or down-regulated. The DNA chip comprising nucleotide sequences capable of hybridizing to one or more members of a panel of DNA sequences may be synthesized using commonly available techniques. mRNA is isolated from a normal, non-cancer cell and a cancer cell and hybridized to the DNA chip comprising one of more of the sequences from the panel. Hybridization is then detected by any of the available methods. In such a manner, sequences that are either overexpressed or underexpressed in a cancer cell as compared to a normal cell are. In a similar manner, mRNA from a cancer cell that has been contacted with a compound may be hybridized to sequences on the DNA chip to determine whether that compound affects expression of a particular sequence. The present invention provides an improvement over this method, in that the "cancer cell" from which mRNA can be isolated is the tumorigenic solid tumor stem cell of the invention.

[170] Gene expression profiles of purified stem cells could give clues for the molecular mechanisms of stem cell behavior. Terskikh AV *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 98(14): 7934-

7939 (2001) analyzed hematopoietic stem cells (HSC)-enriched cells by comparison with normal tissue and mouse neurospheres (a population greatly enriched for neural progenitor cells) by comparison with terminally differentiated neural cells, using cDNA microarray techniques and *in situ* hybridization, thus identifying potential regulatory gene candidates. The invention provides an improved method of drug discovery over the methods of Terskikh, in that the use of the solid tumor stem cells of the invention can provide a distinct set of drug targets when compared with a patient's normal tissue (such as from the area of the solid tumor) or compared with the other populations of cells obtained from the solid tumor.

[171] Several other methods for utilizing DNA chips are known, including the methods described in U.S. Pat. Nos. 5,744,305; 5,733,729; 5,710,000; 5,631,734; 5,599,695; 5,593,839; 5,578,832; 5,556,752; 5,770,722; 5,770,456; 5,753,788; 5,688,648; 5,753,439; 5,744,306 (all of which are incorporated by reference in their entirety). U.S. Pat. No. 5,807,522 (to Brown et al.) discloses a method to monitor early changes in a cell that correlate with levels of a disease state or therapy and which precede detectable changes in actual protein function or activity.

[172] Moreover, microarrays of genomic DNA from solid tumor stem cells can be probed for single nucleotide polymorphisms (SNP), to localize the sites of genetic mutations that cause cells to become precancerous or tumorigenic. Guidance for such methods are available from the commercial vendors described above and may be found in general genetic method books, such as those described herein.

[173] *Vaccines*. The solid tumor stem cells of the invention can be used to raise anti-cancer cell antibodies. In one embodiment, the method involves obtaining an enriched population of solid tumor stem cells or isolated solid tumor stem cells; treating the population to prevent cell replication (for example, by irradiation); and administering the treated cell to a human or animal subject in an amount effective for inducing an immune response to solid tumor stem cells. For guidance as to an effective dose of cells to be injected or orally administered; *see*, U.S. Pat. No. 6,218,166, 6,207,147, and 6,156,305, incorporated herein by reference. In another embodiment, the method involves obtaining an enriched population of solid tumor stem cells or isolated solid tumor stem cells; mixing the tumor stem cells in an *in vitro* culture with immune effector cells (according to immunological methods known in the art) from a human subject or host animal in which the antibody is to be raised; removing the immune effector cells from the culture; and transplanting the immune effector cells into a host animal in a dose that is effective to stimulate an immune response in the animal.

[174] Monoclonal antibodies to solid tumor stem cells may be prepared using any technique which provides for the production of antibody molecules by continuous cell lines in culture.

These include, but are not limited to, the hybridoma technique, the human B-cell hybridoma technique, and the EBV-hybridoma technique (see, e.g., Kozbor, D. *et al.*, *J. Immunol. Methods* 81:31-42 (1985); Cote RJ *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80:2026-2030 (1983); and Cole SP *et al.* *Mol. Cell Biol.* 62:109-120 (1984)).

[175] In addition, techniques developed for the production of "chimeric antibodies," such as the splicing of mouse antibody genes to human antibody genes to obtain a molecule with appropriate antigen specificity and biological activity, can be used (see, e.g., Morrison SL *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:6851-6855 (1984); Neuberger MS *et al.* *Nature* 312:604-608 (1984); and Takeda S *et al.* *Nature* 314:452-454 (1985)).

[176] Various immunoassays may be used for screening to identify antibodies having the desired specificity. Numerous protocols for competitive binding or immunoradiometric assays using either polyclonal or monoclonal antibodies with established specificities are well known in the art.

[177] The antibody can also be a humanized antibody. The term "humanized antibody," as used herein, refers to antibody molecules in which the amino acid sequence in the non-antigen binding regions has been altered so that the antibody more closely resembles a human antibody, and still retains its original binding ability. Antibodies are humanized so that they are less immunogenic and therefore persist longer when administered therapeutically to a patient.

[178] Human antibodies can be generated using the XenoMouse™ technology from Abgenix (Fremont, Calif, USA), which enables the generation and selection of high affinity, fully human antibody product candidates to essentially any disease target appropriate for antibody therapy. See, U.S. Pat. No. 6,235,883, 6,207,418, 6,162,963, 6,150,584, 6,130,364, 6,114,598, 6,091,001, 6,075,181, 5,998,209, 5,985,615, 5,939,598, and 5,916,771, each incorporated by reference; Yang X *et al.*, *Crit Rev Oncol Hemato* 38(1): 17-23 (2001); Chadd HE & Chamow SM. *Curr Opin Biotechnol* 12(2):188-94 (2001); Green LL, *Journal of Immunological Methods* 231 11-23 (1999); Yang X-D *et al.*, *Cancer Research* 59(6): 1236-1243 (1999); and Jakobovits A, *Advanced Drug Delivery Reviews* 31: 33-42 (1998). Antibodies with fully human protein sequences are generated using genetically engineered strains of mice in which mouse antibody gene expression is suppressed and functionally replaced with human antibody gene expression, while leaving intact the rest of the mouse immune system.

[179] Moreover, the generation of antibodies directed against markers present in or on the solid tumor stem cells of the invention can be used as a method of identifying targets for drug development. The antibodies that are raised in an immune response to the solid tumor stem cells can be used to identify antigenic proteins on the solid tumor stem cells using methods known in

the art (Harlow, *Using Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, 1999)) and can further be used to identify polynucleotides coding for such proteins (Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989); *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel *et al.*, eds., (Wiley Interscience, New York, 1993)). Once identified, the proteins and polynucleotides can be compared with other proteins and polynucleotides previously identified to be involved in cancer. In one embodiment, the XenoMouse™ technology to produce fully human antibodies can be used to generate antibodies directed against drug development targets (see, Jeffrey Krasner, *Boston Globe* (July 25, 2001) at F4). The present invention provides an improvement to these antibody-based methods of drug discovery by providing the tumorigenic solid tumor stem cells, to which the immune response is raised, for a more precise drug discovery program.

[180] *The Microarray Network*. In addition to the cDNA libraries and DNA array techniques described above for systematically studying gene expression patterns, one of skill in the molecular biological art can obtain guidance for the use of microarray technology from the University of Michigan Microarray Network (see also, EXAMPLE 9). Furthermore, the University of Michigan has made a large commitment to bioinformatics, by providing funding specifically for microarray data management and analysis, as well as by founding a new Bioinformatics Center for the University.

[181] Alternatively, methods for raising an immune response can take advantage of the "stem cell" qualities of the solid tumor stem cell of the invention. Solid tumor stem cells, solid tumor stem cell protein extracts, purified proteins from solid tumor stem cells, or proteins derived from the expression of cDNAs from solid tumor stem cells (see, above for genetic modification of solid tumor stem cells) to induce an immune response in an animal. The immune response can be directed against cancer cells, as shown by standard immunological methods. For example, the solid tumor stem cells (enriched populations of isolated cells) or proteins can be contacted with dendritic cells in culture, antigen presenting cells in culture, or antigen presenting cells and T cells in culture. Then antigen-stimulated cells are infused back into the patient.

[182] Alternatively, the solid tumor stem cells of the invention can be genetically engineered to promote an immune response against the tumor stem cells. For example, hematopoietic stem cells can be engineered to contain a T-cell receptor targeting a tumor stem cell antigen. See, U.S. Pat. Nos. 5,914,108 and 5,928,638 incorporated by reference. Thus T cell receptors that recognize antigens expressed by tumor stem cells can be identified, then cloned into hematopoietic stem cells. The engineered hematopoietic stem cells can then be transplanted into

a patient and allowed to engraft, giving rise to large numbers of T cells that express receptors recognizing the tumor stem cells. By increasing the numbers of tumor stem cell-specific T cells the anti-tumor immune response can be potentiated.

[183] Other means are also available for increasing the anti-tumor immune response, including using the tumor stem cells as the basis of a vaccine, using the tumor stem cells to stimulate antigen presenting dendritic cells, and using the tumor stem cells as an inoculum to generate anti-tumor antibodies. Tumor stem cells can be used as a vaccine by killing a patient's tumor stem cells, such as by irradiation, and readministering the killed stem cells back into the patient in a physiological and immunologically acceptable carrier, for the purpose of generating an immune response against the tumor stem cells. See, U.S. Pat No. 4,960,716, in which antibodies were raised to membrane vesicle preparations of breast carcinoma cell cells; U.S. Pat No. 4,584,268, in which anti-human mammary epithelial antibody was produced a membrane fraction of delipidated human milk fat globules; both incorporated by reference.

[184] Dendritic cells from a patient can be cultured *in vitro* and killed tumor stem cells from the same patient can be added to the cultures to stimulate the dendritic cells. The activated dendritic cells, presenting tumor stem cell antigens, can then be re-administered to the patient to stimulate the patient's anti-tumor response. Finally, tumor stem cells can be administered to an animal such as a mouse, rat, hamster, goat, sheep, rabbit, or donkey to generate antibodies against the tumor stem cells. Preferably, monoclonal anti-tumor stem cell antibodies are made in mouse, rat, or hamster. Monoclonal antibodies that are made in this way can then be administered to patients, or first humanized (as described above) and then administered to patients, to promote an immune response against the tumor stem cells in the patient.

[185] Furthermore, adenoviral vectors have proven especially useful for gene transfer into eukaryotic cells for vaccine development. Graham FL & Prevec L, In *Vaccines: New Approaches to Immunological Problems*, Ellis RV ed., 363-390 (Butterworth-Heinemann, Boston, 1992).

[186] *Probe for scanning microarrays*. The complete sequencing of the human genome makes possible the identification of the genes expressed by a particular population of cells. Probes from enriched populations of tumor stem cells can be made using methods known to the art (see, Wang *et al.*, *Nature Biotechnology* 18: 457 (2000)). Analysis of gene expression patterns and protein expression patterns for tumor stem cells and tumor cell progeny populations can be preformed by comparing results to known Gene Pattern Databases or to known Protein Pattern Databases (for example, PROSITE, PRINTS: Protein Motif Fingerprint Database, BLOCKS, PFAM, DOMO, PRODOM, or other databases). Searches can be preformed, for example, using

the BCM Search Launcher: General Protein Sequence/Pattern Searches (Baylor College of Medicine, Human Genome Sequencing Center, One Baylor Plaza, Houston, TX). Commercially available programs for gene and protein analysis are also available (such as CGC (from Genetics Computer Group, Inc.) and DNA STRIDER).

[187] The factors involved in the proliferation, differentiation, or survival of tumor stem cells and tumor stem cell progeny, or their responses to biological agents can be isolated either by constructing cDNA for libraries or to probe microarrays from tumor stem cells, or tumor stem cell, non-tumorigenic cancer cells, or normal tumor cells using techniques known in the art. cDNA can also be made from any of the different populations after exposure to biological agents or drugs to determine the response to such manipulations. The libraries from cells of one population are compared with those of cells of different populations to determine the sequence of gene expression during development and to reveal the effects of various biological agents or to reveal new biological agents that alter gene expression in cancer cells. When the libraries are prepared from neoplastic tissue, genetic factors may be identified that play a role in the cause of cancer cell growth, for example, by comparing the libraries from the cancerous tissue with those from normal tissue. This information can be used in the design of anti-cancer therapies. Additionally, probes can be identified for use in the diagnosis of various cancers or for use in identifying cells at a particular stage in tumor development.

[188] *Diagnostic and prognostic evaluation of tumors.* A variety of methods can be employed for the diagnostic and prognostic evaluation of tumor and metastasis, and for the identification of subjects having a predisposition to such conditions. Among the methods well known in the art are the use of bone scans, X-ray imaging, MRI tests, CAT scans, and blood tests for tumor associated antigens (see, American Cancer Society, *Cancer Facts and Figures 1999: Selected Cancers* (1999); American Cancer Society, *Breast Cancer Guidelines and Statistics* (1999); Kopans *Breast Imaging. 2nd Edition* (JB Lippincott, Philadelphia, Pennsylvania, 1998); Potter & Partin, *NCCN Practice Guidelines for Early Detection of Prostate Cancer* 13(11A) Oncology (November 1999). For additional methods of detection, see Franklin *et al.*, *Breast Cancer Research & Treatment* 41(1): 1-13 (1996); Kufe *et al.*, *Cancer Research* 43(2): 851-7 (1983). For bone scans, nuclear medicine imaging can be used. Nuclear medicine may be used in addition to mammography to help identify certain abnormalities. Nuclear medicine is also a good tool for evaluating the metastasis of cancer into the lymphatic system, other organs and skeletal system. Tumor associated antigens include *for example*, BCA 225 (U.S. Pat. No. 5,681,860); Bladder Tumor Associated Antigen (BTA stat test, ARUP Laboratories, Salt Lake City, UT); tumor-associated antigen CA125 (Wagner *et al.*, *Hybridoma* 16(1): 33-40 (1997)); 22-1-1 Ag,

YH 206, GA 733, CA 125, carcinoembryonic antigen, and sialyl Le^x (Sonoda *et al.*, *Cancer* 77(8): 1501-1509 (1996)). For breast cancer prognosis, cancerous cells can be looked for in the patient's bone marrow. *See, for example*, Bruan *et al.*, *New Engl. J. Med.* (Feb. 24, 2000)).

[189] Such methods may, for example, utilize reagents such as VEGF nucleotide sequences and VEGF antibodies. Specifically, such reagents may be used, for example, for: (1) the detection of the presence or over-expression of VEGF mRNA relative to the non-carcinogenic tissue state; (2) the detection of an over-abundance of VEGF protein relative to the non-carcinogenic tissue state; (3) the detection of hypoxic conditions in the tumor mass; (4) the detection of the expression of VEGF tyrosine kinase receptors and other angiogenic receptors in adjacent endothelial tissues; and (5) the detection of the expression of oncogenes. The methods may be performed, for example, by utilizing pre-packaged diagnostic kits comprising at least one specific VEGF nucleotide sequence or VEGF antibody reagent described herein, which may be conveniently used, *e.g.*, in clinical settings, to diagnose patients at risk for tumor angiogenesis and metastasis.

[190] Further, the expression of different oncogene alleles may be assessed using these methods. The additional information obtained regarding the expression of other markers provides guidance for the design of appropriate therapies to inhibit angiogenesis or tumor proliferation tailored to the molecular stage of the cancer in a particular patient.

[191] *Drug discovery.* The invention provides a method for identifying a test compound for reducing solid tumors. The practice of the method can be further determined using the guidance provided in the EXAMPLES below. The steps of the method include assaying the response of tumor cells to biological agent and determining the effects of the biological agent on the tumor stem cell. In other words, the invention provides improved methods of drug discovery by the use of the solid tumor stem cells of the invention.

[192] Proof of principle of the use of the invention for drug discovery is provided in drug discovery in EXAMPLE 11 and FIG. 11, where the epidermal growth factor (EGF) receptor (EGF-R) and HER2/neu markers (known to be involved in cancers) were identified on solid tumor stem cells. Accordingly, therapies directed against the EGF-R (*e.g.*, Yang X *et al.*, *Crit Rev Oncol Hematol.* 38(1): 17-23 (2001)) and HER2/neu markers (*see, Breast Disease, Vol. 11, HER2: Basic Research, Prognosis and Therapy*, Y. Yarden, ed. (IOS Press, Amsterdam, 2000)) can be effectively targeted to solid tumor stem cells.

[193] The identification of biological pathways is an important part of modern drug discovery process. Biological pathways in solid tumor stem cells and other cell populations obtained from solid tumors, particularly pathways involved in drug actions, *i.e.*, pathways that originate at a

drug target (e.g., proteins), can be identified for use as shown by U.S. Pat. No. 5,965,352, which is incorporated herein by reference.

[194] In one set of methods, drugs are screened to determine the binding of test compounds to receptors, in which the binding activates a cell's biological pathway to cause expression of reporter polypeptides. Frequently the reporter polypeptides are coded for on recombinant polypeptides, in which the coding polynucleotide is in operable linkage with a promoter.

[195] The terms "operably associated" or "operably linked," as used herein, refer to functionally related polynucleotides. A promoter is operably associated or operably linked with a coding sequence if the promoter controls the translation of the encoded polypeptide. While operably associated or operably linked nucleic acid sequences can be contiguous and in the same reading frame, certain genetic elements, e.g., repressor genes, are not contiguously linked to the sequence encoding the polypeptide but still bind to operator sequences that control expression of the polypeptide.

[196] The detectable signal can be fluorescence, absorbance, or luminescence, depending on the reporter polypeptide, which can be, for example, luciferase (firefly luciferase, *Vibrio fischeri* luciferase, or *Xenorhabdus luminescens* luciferase), green fluorescent protein, green fluorescent protein variant, chloramphenicol acetyltransferase, β -glucuronidase, β -galactosidase, neomycin phosphotransferase, guanine xanthine phosphoribosyltransferase, thymidine kinase, β -lactamase, alkaline phosphatase, invertase, amylase (for yeast based assays) human growth hormone (for activity based assays). The fluorescent detectable signal can be fluorescence resonance energy transfer (FRET), bioluminescence resonance energy transfer (BRET), time-resolved fluorescence (TRF) or fluorescence polarization (FP). Where appropriate, the detectable signal is detected by a machine such as a fluorometer, luminometer, fluorescence microplate reader, dual-monochromator microplate spectrofluorometer, spectrophotometer, confocal microscope (laser scanner), or a charge-coupled device (CCD). The detectable signal is determined by comparing the amount of signal produced when the reporter polypeptide is expressed in the tumor stem cell with the signal produced when the reporter polypeptide is not expressed in the tumor stem cell.

[197] Another technique for drug screening provides for high throughput screening of compounds (*see, e.g.,* PCT application WO 84/03564.) In this method, large numbers of different small test compounds are synthesized on a solid substrate, such as plastic pins or some other surface. The test compounds are reacted with solid tumor stem cells, or portions thereof, and washed. Bound solid tumor stem cells are then detected by methods well known in the art, using commercially available machinery and methods, for example, the Automated Assay Optimization (AAO) software platforms (Beckman, USA) that interface with liquid handlers to

enable direct statistical analysis that optimizes the assays; modular systems from CRS Robotics Corp. (Burlington, Ontario), liquid handling systems, readers, and incubators, from various companies using POLARA™ (CRS), an open architecture laboratory automation software for a Ultra High Throughput Screening System; 3P (Plug&Play Peripherals) technology, which is designed to allow the user to reconfigure the automation platform by plugging in new instruments (ROBOCON, Vienna, Austria); the Allegro™ system or Staccato™ workstation (Zymark), which enables a wide range of discovery applications, including HTS, ultra HTS, and high-speed plate preparation; MICROLAB Vector software (Hamilton Co., Reno, Nev., USA) for laboratory automation programming and integration; and others.

[198] For any of these machines and methods, the assays measure a response the target cells (solid tumor stem cells or genetically modified solid tumor stem cells) that provides detectable evidence that the test compound may be efficacious. The detectable signal is compared to control cells and the detectable signal identified by subtraction analysis. The relative abundance of the differences between the "targeted" and "untargeted" aliquots are simultaneously compared using a "subtraction" analysis (differential analysis) technique such as differential display, representational difference analysis (RDA), GEM-Gene Expression Microarrays (U.S. Pat. No. 5,545,531), suppressive subtraction hybridization (SSH) and direct sequencing (PCT patent application WO 96/17957). The subtraction analysis can include the methods of differential display, representational differential analysis (RDA), suppressive subtraction hybridization (SSH), serial analysis of gene expression (SAGE), gene expression microarray (GEM), nucleic acid chip technology, or direct sequencing.

[199] The solid tumor stem cell of the invention is particularly useful in the drug development process because solid tumor stem cells provide a limited and enriched set of targets for drug development. One of the most important steps in rational drug design is the identification of a target, the molecule with which the drug itself interacts. Frequently, the target will be a receptor on or in a tumorigenic solid tumor stem cell.

[200] Likewise, the genetically modified solid tumor stem cell of the invention is particularly useful in the drug development. For example, the genetically modified stem cell can contain polynucleotide with a promoter operably linked to the polynucleotide encoding a reporter polypeptide. The reporter polypeptide is expressed in the tumor stem cell after a receptor of the tumor stem cell is activated by binding to a test compound or inactivated by binding to a test compound. Such a detectable signal makes the genetically modified solid tumor stem cell appropriate for use in high throughput screening (HTS).

[201] The detectable signal can be a result of a positive selection or a negative selection. The

positive selection includes manipulations that test the ability of cells to survive under specific culture conditions, ability to express a specific factor, changes in cell structure, or differential gene expression. The selection can be based on the ability of the solid tumor stem cells or genetically modified solid tumor stem cells to:

- (a) Grow or survive under specific culture conditions, such as *in vitro* cell culture.
- (b) Express a specific factor that can be measured, the measurement adaptable for a selection. This factor can be anything that is accessible to measurement, including but not limited to, secreted molecules, cell surface molecules, soluble and insoluble molecules, binding activities, activities that induce activities on other cells or induce other organic or inorganic chemical reactions.
- (c) Changes in cell structure, including morphological changes that are measured by physical methods such as differential sedimentation, differential light scattering, differential buoyant density, differential cell volume selected by sieving.
- (d) Differences in gene expression that can be directly measured, including changes in cell surface markers, changes in biochemical activities, any changes that would be re-selected in changes in binding of fluorescent labeled probes that could be used in conjunction with a Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS) or any property that can be used as a basis for a selection. Genetically modified solid tumor stem cells containing polynucleotides that express reporter polypeptides are particularly useful here.
- (e) Differences in gene expression that can be indirectly measured, including changes in transcription factor activity that are measured by a synthetic gene construct encoding a selective marker (such as a drug resistance marker or a cell surface marker that could be used in a FACS selection). This category would also include changes in mRNA stability, mRNA localization, mRNA translation control. All of these changes could be the basis of a selection because a synthetic construct which is controlled by one of these regulatory events could be constructed which would drive the expression of an easily selected gene product.

[202] *Pharmacogenomics*. The invention provides an improved method of ascertaining propensity for malignancy, monitoring the progress of chemotherapy or other anticancer therapy, screening for re-occurrence of cancer, or other similar detection of present or potential cancer, where such method detects for the expression of at least one gene which is over- or under-expressed in a potential cancer cell, as compared with either a solid tumor stem cell isolated from the patient or a collection of solid tumor stem cells. In one embodiment, the method is the assaying of a biological sample (such as from the patient) to be tested for a signal indicating the transcription of a significant (by comparison with the solid tumor stem cell) polynucleotide

transcript. In addition, screening assays of biological samples are contemplated, where such assays are conducted during the course of chemotherapy alone, or after surgical intervention to treat cancer, to monitor for the continued presence or return of cancerous cells.

[203] *Other embodiments of the invention.* The invention provides an article of manufacture (a system or a kit), comprising packaging material and a primary reagent contained within said packaging material. The primary reagent is solid tumor stem cell preparation as described above. The packaging material includes a label that indicates that the primary reagent can be used for identifying an agent for reducing solid tumors.

Also, the invention provides a kit for determining the activity level of a particular polynucleotide or protein in a cell. Such kits contain arrays or microarrays containing a solid phase, *e.g.*, a surface, to which are bound, either directly or indirectly, solid tumor stem cells (enriched populations of or isolated), polynucleotides extracted from such solid tumor stem cells, or proteins extracted from such solid tumor stem cells. The kit may also contain probes that are hybridized or bound to the solid tumor stem cell components at a known location of the solid phase. These probes consist of nucleic acids of known, different sequence, with each nucleic acid being capable of hybridizing to an RNA species or to a cDNA species derived therefrom. In particular, the probes contained in the kits of this invention are nucleic acids capable of hybridizing specifically to nucleic acid sequences derived from RNA species which are known to increase or decrease in response to perturbations correlated to the particular diseases or therapies to be monitored by the kit. The probes contained in the kits of this invention preferably substantially exclude nucleic acids which hybridize to RNA species that are not increased or decreased in response to perturbations correlated to the particular levels of disease states or therapeutic effects to be determined by the kit.

[204] The details of one or more embodiments of the invention have been set forth in the accompanying description above. Although any methods and materials similar or equivalent to those described herein can be used in the practice or testing of the present invention, the preferred methods and materials are now described. Other features, objects, and advantages of the invention will be apparent from the description and from the claims.

[205] In the specification and the appended claims, the singular forms include plural referents. Unless defined otherwise in this specification, all technical and scientific terms used herein have the same meaning as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which this invention belongs. All patents and publications cited in this specification are incorporated by reference.

[206] The following EXAMPLES are presented in order to more fully illustrate the preferred embodiments of the invention. These EXAMPLES should in no way be construed as limiting the scope of the invention, as defined by the appended claims.

EXAMPLE 1
ISOLATION OF BREAST CANCER STEM CELLS

[207] The purpose of this EXAMPLE is to show structural and cell functional characterization of breast cancer stem cells.

[208] We have developed both a tissue culture and a mouse model to identify the breast tumor clonogenic cell. In the mouse model, NOD/SCID mice Lapidot *et al.*, *Nature* 367(6464): 645-8 (1994)) are treated with VP-16 (Etoposide) (available from commercial sources, such as Moravsek Biochemicals, Brea, CA, USA), and implanted with primary human breast cancer tissue (obtained from mastectomy or lumpectomy specimens). Three of five primary tumors formed tumors in this system.

[209] The tumor cells isolated from malignant pleural effusions obtained from two patients (see, Zhang *et al.*, *Invasion & Metastasis* 11(4): 204-15 (1991)) were suspended in Matrigel™ (available from Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), then were injected into mice. Tumors formed in the injected mice.

[210] By this method, we can generate enough tumor cells for analysis by FACS. We also can generate enough tumor cells to perform biological assays to characterize the cells. (For clonogenic assay for detecting rare tumor cells in hematopoietic samples, see U.S. Pat. No. 5,674,694, incorporated by reference).

[211] Phenotypically distinct subsets of tumor cells can be isolated by any suitable means known in the art, including FACS using a fluorochrome conjugated marker-binding reagent. Any other suitable method including attachment to and detachment from solid phase, is also within the scope of the invention. Procedures for separation may include magnetic separation, using antibody-coated magnetic beads, affinity chromatography and "panning" with antibody attached to a solid matrix, *e.g.* plate, or other convenient technique. Techniques providing accurate separation include fluorescence activated cell sorters, which can have varying degrees of sophistication, such as multiple color channels, low angle and obtuse light scattering detecting channels, impedance channels, *etc.* Dead cells may be eliminated by selection with dyes that bind dead cells (such as propidium iodide (PI), or 7-AAD). Any technique may be employed that is not unduly detrimental to the viability of the selected cells.

[212] The marker-binding reagent can be directly or indirectly conjugated to a magnetic

reagent, such as a superparamagnetic microparticle (microparticle). Direct conjugation to a magnetic particle is achieved by use of various chemical linking groups, as known in the art. Antibody can be coupled to the microparticles through side chain amino or sulfhydryl groups and heterofunctional cross-linking reagents. A large number of heterofunctional compounds are available for linking to entities. A preferred linking group is 3-(2-pyridyldithio)propionic acid N-hydroxysuccinimide ester (SPDP) or 4-(N-maleimidomethyl)-cyclohexane-1-carboxylic acid N-hydroxysuccinimide ester (SMCC) with a reactive sulfhydryl group on the antibody and a reactive amino group on the magnetic particle. Alternatively, the marker-binding reagent is indirectly coupled to the magnetic particles. The marker-binding reagent is directly conjugated to a hapten, and hapten-specific, second stage antibodies are conjugated to the particles. Suitable haptens include digoxin, digoxigenin, FITC, dinitrophenyl, nitrophenyl, avidin, biotin, *etc.* Methods for conjugation of the hapten to a protein, *i.e.* are known in the art, and kits for such conjugations are commercially available. Fluorochrome labeled antibodies are useful for FACS separation, magnetic particles for immunomagnetic selection, particularly high gradient magnetic selection (HGMS), *etc.* Exemplary magnetic separation devices are described in PCT patent applications WO 90/07380 and WO 96/09550, and European patent 0 438 520.

[213] We have extensively studied the tumors formed by one of the primary tumors and one of the malignant pleural effusion cells. We have identified low serum tissue culture conditions in which primary breast cancer cells and cells isolated from a mouse xenograft proliferates for at least 1-3 weeks in tissue culture. Using the *in vitro* tissue culture model, we found that stimulation of a specific receptor can affect the growth and survival of breast cancer cells.

[214] We have used the *in vitro* (tissue culture) and *in vivo* (mouse xenograft) models of human breast cancer. A human tumor growing in the mouse model was harvested and made into a single cell suspension and analyzed by FACS. We found a heterogeneity of expression of cell surface markers on tumor cells. Initially, breast cancer cells isolated from a malignant pleural effusion were separated into groups based upon CD44 expression. Cells were analyzed for expression of markers 520C9 and CD44 (*see*, FIG. 2). 520C9 is known to recognize c-erbB-2 (HER-2/neu). Ring *et al.*, *Molecular Immunology* 28:915 (1991). *See also*, U.S. Pat. No. 4,753,894, which discloses murine monoclonal antibodies that bind selectively to human breast cancer cells. Four populations of cells were identifiable. There was a small population of cells that expressed both markers 520C9 and CD44, a population that expressed either marker alone, as well as a population that expressed neither marker. Cells were isolated with regard to CD44 expression (FIG. 2). CD44⁺ or CD44⁻ cells were tested for their ability to proliferate. Marker CD44⁺ tumor cells, but not marker CD44⁻ tumor cells, were able to form colonies *in vitro* and tumors *in vivo*.

WO 02/12447

PCT/US01/24243

57

(TABLE 1). Note that isolation of CD44⁺ cells results in at least a 2.5-fold purification of the tumorigenic cells.

TABLE 1 ISOLATED POPULATIONS OF BREAST CANCER STEM CELLS		
	CD44 ⁺	CD44 ⁻
Colonies <i>in vitro</i>	+	-
Tumorigenicity in mice	+	-
Human breast cancer cells were collected using FACS. Analysis of <i>in vitro</i> colonies was done in 2 separate wells using 5,000 cells of the respective phenotype. <i>In vivo</i> growth of sorted cells was done by injecting mice with 2x10 ⁶ marker CD44 ⁺ or CD44 ⁻ cells. Mice were analyzed at week in experiment 1 and week 4 in experiment 2. The injections of marker CD44 ⁺ cells, but not marker CD44 ⁻ cells, resulted in tumor formation and growth <i>in vitro</i> . The <i>in vitro</i> experiments have been replicated using frozen cells isolated from the patient and support the <i>in vitro</i> experiments. The <i>in vivo</i> experiments have been replicated twice.		

[215] These results serve as a proof-of-principle of the stem cell model of solid cancer and demonstrate the following:

(a) solid tumor cells are phenotypically and functionally heterogeneous; some tumor cells are tumorigenic, while others have limited proliferative potential and do not form tumors upon transplantation;

(b) by separating cells by FACS, one can enrich for tumorigenic cells; and

(c) by studying the tumorigenic fractions one can isolate tumor stem cells and more carefully focus strategies for identifying therapeutic targets.

[216] This EXAMPLE shows that the clonogenic breast cancer tumor cell from two tumors express CD44. Other markers also allow the further purification of the breast cancer stem cell.

We have analyzed the tumor cells for expression of several antigens. Some antigens with heterogeneous expression patterns include MUC1, Notch-4, annexin V, 317G5, CD9, CD24, 260F9, P-glycoprotein and CD49F. 260F9 binds to a 55 kilodalton glycoprotein (mucin) B cell surface antigen. Weiner LM *et al.*, *Cancer Res.* 49:4062-4067 (1989); Gregg, EO. *et al. J. Immunol.* 138:4502-4508 (1987). See also, U.S. Pat. No. 4,753,894, which discloses murine monoclonal antibodies that bind selectively to human breast cancer cells. Combinations of these markers with CD44 permit increased enrichment of the tumor stem cells beyond what was achieved with CD44 alone.

[217] Remarkably, all of the CD44⁺ (tumorigenic) cells are also B38.1⁺. See, Kufe *et al.*, *Cancer Research* 43(2): 851-7 (1983) for description of B38.1 antibody. Annexin, Notch-4, and CD24 expression is heterogeneous by the B38.1⁺ cells. We can thus further purify the breast

WO 02/12447

58

PCT/US01/24243

cancer stem cell from two tumors by analyzing various subpopulations of B381⁺ or CD44⁺ cells. Indeed, we have isolated B38.1⁺CD24⁺, and B38.1⁺CD24⁻ cells obtained from a primary biopsy and placed them in tissue culture. Only the B38.1⁺CD24⁻ cells formed colonies. In another tumor, we isolated the 260F9⁺CD24⁻, 260F9⁺CD24^{hi}, and the 260F9⁺CD24^{lo} populations of cells. Only the CD24^{lo} population of cells formed tumors (TABLE 2). Note that there is a 5-6 fold enrichment of tumorigenic cells using B38.1 or 260F9 and CD24.

TABLE 2 ANALYSIS OF TUMORIGENICITY OF CD24 ⁺ AND CD24 ^{-/lo} CELLS		
Tumor formation	CD24 ⁺	CD24 ^{-/lo}
Tumor T1	-	+
Tumor T2	-	+
NOD/SCID mice were injected with either 50,000-200,000 CD24 ⁺ or CD24 ^{-/lo} cells and analyzed for tumor formation two weeks later.		

EXAMPLE 2

ROLE FOR NOTCH IN BREAST CELL PROLIFERATION

[218] The purpose of this EXAMPLE is to provide preliminary evidence that in at least two different tumors, Notch 4 is expressed by a minority of the tumorigenic cells. Cells from tumor T1 and tumor T2 from EXAMPLE 1 were analyzed for expression of Notch 4. Cells were stained with an anti-Notch 4 polyclonal antibody and analyzed by FACS. 5-15% of cells expressed detectable levels of Notch 4. Furthermore, different populations of non-tumorigenic cells express different Notch ligands and members of the Fringe family. To determine which Notch RNAs are expressed by normal breast tissue and breast tumor tissue, we performed RT-PCR using primers specific for each Notch mRNA. Interestingly, Notch 1, Notch 3 and Notch 4, but not Notch 2, were expressed by both normal breast cells and breast tumor cells. We prepared RNA from 100,000 cells. RT-PCR of RNA from normal breast cells or breast tumor cells was performed using primers specific for Notch 1, Notch 2, Notch 3, and Notch 4. A PCR product of the predicted size was present for Notch 1, 3, and 4, showing the presence of these markers in these cells. The signal was lost if the RNA was pretreated with Rnase.

[220] To determine the role of Notch in proliferation, a Notch recombinant ligand or agonist peptides of the ligand were added to the medium in cultures of normal mammary epithelial cells. Both Notch agonists stimulated the survival/proliferation of single cells: in the presence of the Notch agonists, 2-3 times more colonies formed and they included a higher percentage of large, mixed colonies (40% versus 20%). When single cells were plated at clonal density, we obtained

two kinds of colonies. There were large colonies made up of hundreds to thousands of cells, presumably arising from solid tumor stem cells, that were of a mixture of myoepithelial cells and ductal epithelial cells. There were also smaller colonies of cells that appeared to contain only a single lineage and that probably represented the progeny of restricted progenitors.

[221] From a normal breast epithelial cell grown *in vitro*, bilineage colonies (containing both myoepithelial and ductal epithelial cells) were generated by single cells. Myoepithelial cells were identified by staining with an anti-CALLA antibody. Ductal epithelial cells were identified by staining with an anti-ESA antibody. Organoids grown in Matrigel™ in the presence or absence of the Notch agonist peptide branched and proliferated more in the presence of the Notch agonist peptide. This agonist peptide also inhibited differentiation, as indicated by the inhibition of casein production. These results demonstrate that these assays also provide a means for detecting multipotent progenitors from normal breast epithelium. This assay may be used for the purification of normal breast stem cells. These results also demonstrate that Notch has a function in normal breast development.

[222] We then examined Notch 4 expression in breast cancer tumor cells. High levels of Notch 4 were expressed on a minority of the tumor cells. When the B38.1 population, which identifies the tumorigenic population, was analyzed for Notch 4 expression, a distinct minor population of cells that were B38.1^{low}, Notch 4⁺ became apparent.

[223] We sorted Notch 4⁺ and Notch 4⁻ cells and analyzed them *in vitro*. Surprisingly, neither population grew in tissue culture. There were two possible explanations. First, it was possible that interaction between the two populations of cells was required for cell growth. Next, the antibody may be either an agonist or an antagonist of Notch 4 and may inhibit tumor cell growth. To distinguish between these possibilities, tumor cells were incubated with the anti-Notch 4 antibody, and then assayed *in vitro*. Breast cancer cells were placed in tissue culture after exposure to an anti-Notch 4 antibody. Cells were incubated on ice for 1 hr. in HBSS containing no anti-Notch 4 antibody, anti-Notch 4 antibody, or anti-Notch 4 antibody that had been preincubated with the peptide used to generate the antibody. Cells were also grown in the presence of soluble Delta and without soluble Delta as a control.

[224] While control cells grew in tissue culture and formed colonies, cells incubated with the Notch 4 antibody did not. When the anti-Notch 4 antibody was incubated with the peptide used to generate the antibody before addition to the cells, growth was restored. To confirm a role for Notch for growth *in vitro*, cells were incubated in serum free conditions in media that contained soluble Delta, a Notch ligand, or a control culture without Delta. The cultures with Delta formed

many colonies, whereas only a few small colonies formed without soluble Delta or in cultures using cells exposed to the anti-Notch 4 antibody. When the antibody was preincubated with the peptide, the antibody no longer blocked proliferation. Thus, the Notch 4 pathway is critical for breast cancer cell growth *in vitro*.

[225] Tumor cells were exposed to the anti-Notch 4 antibody and then the cells were injected into mice to determine whether the antibody inhibits tumor formation. 35,000 tumor cells were incubated with no antibody, the anti-Notch 4 antibody, or the anti-Notch 4 antibody that had been preincubated with the peptide used to generate the antibody. After two weeks, the diameter of tumors formed by the cells exposed to the anti-Notch 4 antibody was 40% smaller than the control tumors. Thus the cells that were exposed to the anti-Notch 4 antibody formed smaller tumors than cells that were exposed to the anti-Notch 4 antibody that was incubated with the peptide used to generate the antibody.

[226] *Expression of Notch, Notch ligands, and Fringe family members in subpopulations of breast cancer tumor cells.* We examined the expression of members of the Notch receptor family, Notch ligands and Notch signal modifying proteins in populations of breast tumor cells. We initially focused on the markers in the Notch 4⁺ and Notch 4⁻ populations. One hundred Notch 4⁺ or Notch 4⁻ cells were isolated by FACS (*see*, FIG. 4). Forty rounds of PCR were performed to detect the indicated mRNA. The Notch 4⁺ population expressed Notch 1, Notch 4, and Jagged (a Notch ligand). The Notch 4⁻ population expressed Notch 1 and Notch 3 as well as Jagged. Interestingly, Notch 3 (which may inhibit signaling through other Notch receptors) was not expressed by the Notch 4⁺ population.

[227] *Summary.* We have developed *in vitro* and *in vivo* assays for normal human breast cells and human breast tumor stem cells. In two different tumors arising in the NOD/SCID mouse model, the tumor cells were heterogeneous with respect to the expression of several cell surface markers. In both tumors, the phenotype of the clonogenic tumor stem cell was B38.1⁺CD44⁺CD24^{low}. The same population was found to be the clonogenic in the *in vitro* assay. This B38.1⁺ population can be further subdivided using several additional markers. *In vitro* and *in vivo* evidence strongly implicates the Notch pathway, especially Notch 4, as playing a central pathway in tumorigenesis.

WO 02/12447

PCT/US01/24243

61

EXAMPLE 3
MOUSE XENOGRAFT MODEL

[228] We have developed a xenograft model in which we have been able to establish tumors from primary breast tumors via injection of tumors in the mammary gland of severely immunodeficient mice. Xenograft tumors have been established from mastectomy specimens of all five patients that have been tested to date. We have also been able to establish tumors from three malignant pleural effusions. NOD/SCID mice were treated with VP-16, and implanted with primary human breast cancer tissue. Tumor cells isolated from three malignant pleural effusions suspended in Matrigel® were injected into mice and also formed a tumors. This enabled us to generate enough malignant tumor cells to facilitate analysis by flow-cytometry and assay for the ability of different subsets of cells to form tumors. We have extensively studied the tumors formed by one of the primary tumors and one of the malignant pleural effusion cells. Furthermore, in the three tumors that we have attempted to do so, we have been able to make single-cell suspensions and transfer the tumors. These improvements in the xenograft assay have allowed us to do biological and molecular tests to characterize the clonogenic breast cancer cell. In addition, we have found tissue culture conditions in which primary breast cancer cells and cells isolated from a mouse xenograft tumor have proliferated for a short period of time (1-3 weeks) in tissue culture.

[229] A human tumor growing in the mouse model was harvested, made into a single cell suspension, and analyzed by FACS. There was heterogeneity of expression of cell surface markers by tumor cells. Initially, breast cancer cells isolated from a malignant pleural effusion were separated into groups based upon CD44 expression. Cells were analyzed for expression of markers 520C9 and CD44. Three populations of cells were identifiable. There was a small population of cells that expressed both markers 520C9 and CD44, a population that expressed either marker alone, as well as a population that expressed neither marker. Cells were isolated with regard to CD44 expression. CD44⁺ or CD44⁻ cells were tested for their ability to proliferate. Marker CD44⁺ tumor cells, but not marker CD44⁻ tumor cells, were able to form colonies *in vitro* and tumors *in vivo* (TABLE 3). Note that isolation of CD44⁺ cells results in a 2-fold enrichment of the tumorigenic cells.

WO 02/12447

62

PCT/US01/24243

TABLE 3 HUMAN BREAST CANCER CELLS COLLECTED USING FACS		
	CD44 ⁺	CD44 ⁻
Colonies <i>in vitro</i>	+	-
Tumorigenicity in mice	+	-
Analysis of <i>in vitro</i> colonies was done in 2 separate wells using 5,000 cells of the respective phenotype. <i>In vivo</i> growth of sorted cells was done by injecting mice with 2x10 ⁶ marker CD44 ⁺ or CD44 ⁻ cells. Mice were analyzed at week 3 in test 1 and week 4 in test 2. The injections of marker CD44 ⁺ cells, but not marker CD44 ⁻ cells, resulted in tumor formation and growth <i>in vitro</i> . The <i>in vitro</i> tests have been replicated using frozen cells isolated from the patient and support the <i>in vitro</i> tests. The <i>in vivo</i> tests have been replicated twice.		

[230] These results show that the clonogenic breast cancer tumor cell expresses CD44. We have begun to search for other markers that might allow us to further purify the breast cancer stem cell. To do this, we have analyzed the tumor cells for expression of several antigens.

[231] Surprisingly, all of the CD44⁺ (tumorigenic) cells were also B38.1⁺. Indeed, we have isolated B38.1⁺CD24⁺ cells and B38.1⁺CD24⁻ cells obtained from a primary biopsy and placed them in tissue culture. Only the B38.1⁺CD24⁻ cells formed colonies.

[232] We next isolated cells from two of the tumors based upon expression of marker CD24. In tumor T2, we isolated the CD24⁺, the CD24^{lo} and the CD24^{hi} populations. In both cases, only the CD24^{lo} populations formed tumors (TABLE 4). Note that there was a 5-6-fold enrichment of tumorigenic cells using B38.1 and CD24.

TABLE 4 FRACTIONS OF HUMAN BREAST CANCER CELLS ISOLATED BY FLOW-CYTOMETRY		
Mouse tumor formation	CD24 ⁺	CD24 ^{lo}
Tumor T1	-	+
Tumor T2	-	+
Mice were injected with 50,000 CD24 ⁺ or CD24 ^{lo} cells. The formation of tumors was determined 4 weeks after injection.		

[233] *Analysis of tumors arising from the CD24⁻ cell population.* By the solid tumor stem cell model, CD24⁻ cells give rise to tumors that contain both CD24⁺ and CD24⁻ cells. To test this hypothesis, secondary transplants were performed using B38.1⁺CD24⁻ cells.

[234] The resultant tumors were removed and the cells were re-analyzed with respect to B38.1 and CD24 expression. As predicted by the stem cell model, cells obtained from a tumor arising from transplanted B38.1⁺CD24⁻ cells were heterogeneous with respect to expression of both

WO 02/12447

63

PCT/US01/24243

B38.1 and CD24. The marker expression pattern of the cells isolated from the tumor initiated by the B38.1⁺CD24⁻ cells was similar to that of the original tumor.

[235] These results are a proof-of-principle of the solid tumor stem cell model of solid cancer and demonstrate the following:

- (1) tumor cells are phenotypically and functionally heterogeneous;
- (2) by separating cells by FACS, one can enrich for tumorigenic cells; and
- (3) by testing the tumorigenic fractions, one can isolate tumor stem cells and more carefully focus strategies for identifying therapeutic targets.

EXAMPLE 4

ANALYSIS OF PRIMARY BREAST TUMOR CELLS IN A MOUSE MODEL

[236] We have established tumors from eight patients in our mouse model. We also characterize tumors established from three primary tumors and two pleural effusions. Two are fast growing tumors and three are slow growing tumors.

[237] The phenotype of the tumorigenic cell is determined for each different tumor. For analysis, a tumor is removed from the mice and made into a single cell suspension. We first confirm the solid tumor stem cell model of the invention and that the phenotype of tumorigenic cells is indeed B38.1⁺ CD44⁺ CD24^{-lo}. In all tumors, we do limiting dilution analysis of cells isolated by FACS based upon expression of these markers.

[238] Based on our preliminary data, the antibody cocktail that leads to the greatest purification of the putative tumorigenic cell follows: anti-38.1-APC, anti-CD44-FITC, and anti-CD24-PE, anti-CD3-cytochrome, anti-CD2-cytochrome, anti-CD10-cytochrome, , anti-CD14-cytochrome, anti-CD16-cytochrome, anti-CD31-cytochrome, CD45-cytochrome, CD140b-cytochrome, anti-CD64-cytochrome, anti-ESA-Phar-red and 7AAD (a viability marker). All antibodies labeled with cytochrome are considered to be part of a lineage cocktail (LINEAGE⁺). FACS is used to isolate the putative breast cancer stem cell, which in xenograft tumor T1 are the CD44⁺CD24^{-lo}LINEAGE⁻ population of cells, the CD44⁺B38.1⁺CD24^{-lo}LINEAGE⁻ population of cells are more enriched, and the ESA⁺CD44⁺B38.1⁺CD24^{-lo}LINEAGE⁻ population of cells are most enriched for the breast cancer stem cell. The different populations of malignant cells are tested in the *in vivo* and *in vitro* models to confirm that the phenotype of the primary tumorigenic cell does not change while growing in the mouse xenograft model. As we progressively enrich the tumorigenic cells, the number of cells and time needed to form a tumor decreases.

WO 02/12447

64

PCT/US01/24243

EXAMPLE 5

ROLE FOR NOTCH IN BREAST CELL PROLIFERATION

[239] The Notch protein is a receptor for the growth/survival factors Delta and Jagged (Panin *et al.*, *Nature* 387(6636): 908-912 (1997); Perron *et al.*, *Cellular & Molecular Life Sciences* 57(2): 215-23 (2000); Shimizu *et al.*, *Journal of Biological Chemistry* 274(46): 32961-9 (1999)). In some normal stem cells, Notch is known to play a role in proliferation, survival and differentiation. Apelqvist *et al.*, *Nature* 400(6747): 877-81 (1999); Berry *et al.*, *Development* 124(4): 925-36 (1997); Yasutomo *et al.*, *Nature* 404(6777): 506-10 (2000); Morrison, *Cell* 101: 499-510 (2000). In certain situations, stimulation of Notch can promote stem cell self-renewal while in other situations it can promote differentiation. Delta activates all four Notch receptors.

[240] We examined Notch 4 expression in the breast cancer tumor cells. Notch 4 was expressed on the minority of the tumor cells. When the B38.1 population, which identifies the tumorigenic population, was analyzed for Notch 4 expression, a distinct minor population of cells that were B38.1^{lo} and Notch 4⁺ became apparent.

[241] We sorted Notch 4⁺ and Notch 4⁻ cells and analyzed their ability to form colonies *in vitro*. Surprisingly, neither population grew in tissue culture. There are two possible explanations. First, it is possible that interaction between the two populations of cells is required for cell growth. Alternately, the antibody may be either an agonist or antagonist of Notch 4 and inhibition or activation of the receptor may inhibit tumor cell growth.

[242] To distinguish between these possibilities, unseparated tumor cells were incubated with the anti-Notch 4 antibody, and then assayed for the ability to form colonies *in vitro*. While control cells grew in tissue culture and formed colonies (FIG. 5A), cells incubated with the Notch 4 antibody did not grow (FIG. 5B). When the anti-Notch 4 antibody was pre-incubated with the peptide used to generate the antibody (this peptide should theoretically block binding of the antibody to the cells), the ability of the tumor cells to form colonies was restored (FIG. 8C). To confirm that Notch regulates colony formation by tumor cells, cells were incubated in medium with or without soluble Delta (FIG. 5A and FIG. 5D, respectively). The cultures with Delta formed many colonies (FIG. 5A), whereas only a few small colonies formed in medium lacking soluble Delta or in cultures using cells exposed to the anti-Notch 4 antibody (FIG. 5B, FIG. 5D, and FIG. 5E). Taken together, these results show that the Notch 4 pathway regulates the proliferation/survival of breast cancer cells in cells and that the anti-Notch 4 antibody blocks activation *in vitro*.

[243] Next, tumor cells were incubated with the anti-Notch 4 antibody and then the cells were injected into mice to determine whether the antibody inhibits tumor formation. The cells that

were exposed to the anti-Notch 4 antibody formed smaller tumors than cells that were exposed to the anti-Notch 4 antibody that was incubated with the peptide used to generate the antibody before addition to the cells. Approximately 350,000 tumor cells were incubated with no antibody, the anti-Notch 4 antibody, or the anti-Notch 4 antibody that had been incubated with the peptide used to generate the antibody. After two weeks, the diameter of tumors formed by the cells exposed to the anti-Notch 4 antibody was 40% smaller than either of the control tumors. The simplest explanation of the *in vitro* and *in vivo* assays is that Notch 4 activation promotes proliferation/survival of stem cells and that the anti-Notch 4 antibody blocks receptor activation.

EXAMPLE 6 FURTHER CHARACTERIZATION OF BREAST CANCER STEM CELLS

[244] Human breast cancer tumors have been established in NOD/SCID mice from five tumors (mastectomy specimens of three primary breast tumors and two malignant pleural effusions from metastatic breast cancer). The five tumors were initially used to understand neoplastic cell marker heterogeneity. Based upon these results, experiments using cells isolated from primary tumors directly after removal from a patient were done to confirm that the mouse xenograft model accurately reflects human breast cancer.

[245] *CD44 expression and tumorigenicity.* Cells obtained from the metastatic breast cancer, designated T1, and one primary breast tumor, designated T2, were chosen to expand in the mice to obtain sufficient cells for analysis. To accomplish this, 10^6 - 10^7 pleural effusion cells from T1 (a frozen sample) or a 1-2 mm³ piece of T2 (fresh biopsy sample) were grown in the mouse mammary fat pad for 1 to 3 months. The resulting human tumors were then harvested, made into a single cell suspension and analyzed by flow-cytometry for expression of several different antigens. Contaminating mouse cells were gated out of the analysis by eliminating cells expressing mouse H-2K (major histocompatibility complex class I) and dead cells were eliminated using a viability dye.

[246] As predicted by the solid tumor stem cell model, cells displayed heterogeneous expression of a variety of cell surface-markers including CD44 and B38.1. To determine whether these markers could distinguish tumorigenic from non-tumorigenic cells, CD44⁺ and CD44⁻ cells (FIG. 6) were isolated from these *in vivo* passaged T1 or T2 cells and NOD/SCID mice were injected with CD44⁺ or CD44⁻ cells.

[247] *Identification of other informative markers.* Between 6 and 12 weeks after injecting, mice were examined for tumors by observation and palpation, then all mice were necropsied to look for growths at injection sites that might be too small to palpate. All of the CD44⁺ injections gave

WO 02/12447

66

PCT/US01/24243

rise to visible tumors, but none of the CD44⁺ injections formed detectable tumors (TABLE 5). Next, cells from first passage T1 and T2 were sorted based upon the expression of B38.1 and injected into mice. Tumors appeared from all injections of B38.1⁺ cells but no tumor formation was detected from B38.1⁻ cells (TABLE 5). Thus, tumorigenic cells from both passaged tumors were B38.1⁺CD44⁺.

TABLE 5 Tumorigenicity of different populations of tumor T1 and tumor T2 cells			
Cells/injection	# tumors/# of injections		
	8x10 ⁵	5x10 ⁵	2x10 ⁵
T1 cells			
CD44 ⁺	0/2	0/2	-
CD44 ⁻	2/2	2/2	-
B38.1 ⁻	0/2	0/2	-
B38.1 ⁺	2/2	2/2	-
CD24 ⁺	-	-	1/6
CD24 ⁻	-	-	6/6
T2 cells			
CD44 ⁺	0/2	0/2	-
CD44 ⁻	2/2	2/2	-
B38.1 ⁻	0/2	0/2	-
B38.1 ⁺	2/2	2/2	-
CD24 ⁺	-	-	1/6
CD24 ⁻	-	-	6/6

Cells were isolated by flow cytometry as described in FIG. 2 based upon expression of the indicated marker and assayed for the ability to form tumors after injection of 2-8x10⁵ cells into the mammary fat pad of NOD/SCID mice. The number of tumors that formed/ the number of injections that were performed is indicated for each population of cells.

[248] The tumors were also heterogeneous for CD24 expression. When 200,000 CD24⁺ or CD24⁻ cells were injected into NOD/SCID mice, all mice injected with CD24⁻ cells grew tumors (TABLE 5). Although no tumors could be detected by palpation in the locations injected with CD24⁺ cells, two of twelve mice injected with CD24⁺ cells did contain small growths at the injection site that were detected only upon necropsy. The sites injected with CD24⁻ cells, by contrast, all had tumors greater than 1 cm in diameter that were readily apparent visually and by palpation. Since it is extremely difficult to completely eliminate CD24⁺ cells from the CD24⁺ fraction by flow-cytometry, the small growths likely represent contamination by the 1-3% of CD24⁻ cells that are typically present in the sorted CD24⁺ population. Alternately, the small growths might have arisen from CD24⁺ cancer cells that had reduced proliferative capacity. At

present we cannot distinguish between these possibilities. Nonetheless, all of the cells that produced palpable tumors in this xenograft model were B38.1⁺CD44⁺CD24^{-lo}.

[249] Several antigens associated with normal cell types, to which we refer collectively as LINEAGE (CD2, CD3, CD10, CD14, CD16, CD19, CD31, -CD45, -CD64 and -CD140b) markers, were found not to be expressed by the cancer cells based on analyses of tumors that had been passaged multiple times in mice. By eliminating LINEAGE⁺ cells, normal human leukocytes, endothelial cells, and fibroblasts were eliminated, especially from unpassaged or first passage tumors.

[250] Flow-cytometric analysis of four of the tumors established in NOD/SCID mice revealed that all of these tumors were heterogeneous with respect to B38.1, CD44, and CD24 expression (*see, for example*, FIG. 7A, FIG. 7B). However, each of the tumors contained a distinct population of B38.1⁺CD44⁺CD24^{-lo} cells. In four independent tumors that were analyzed after one passage in NOD/SCID mice, the frequency of B38.1⁺CD44⁺CD24^{-lo} cells was 9.5±4.5 % (mean± standard deviation) of live human tumor cells. Seven weeks after inoculation, the injection sites of B38.1⁺CD44⁺CD24^{-lo}LINEAGE⁻ cells and B38.1⁺CD44⁺CD24⁺LINEAGE⁻ cells were examined by histology. The B38.1⁺CD44⁺CD24^{-lo}LINEAGE⁻ injection sites contained tumors greater than 1 cm in diameter while the B38.1⁺CD44⁺CD24⁺LINEAGE⁻ injection sites contained no detectable tumors. Only normal mouse mammary tissue was seen by histology at the sites of the B38.1⁺CD44⁺CD24⁺LINEAGE⁻ injections (FIG. 7K), whereas the tumors formed by B38.1⁺CD44⁺CD24^{-lo}LINEAGE⁻ cells contained malignant cells as judged by morphology in hematoxylin and eosin stained sections (FIG. 7L). Even when B38.1⁺CD44⁺CD24⁺LINEAGE⁻ injection sites were examined after 11 weeks, no tumors were detected.

[251] *Enrichment of tumorigenic cells using B38.1, CD44, CD24, and LINEAGE markers.* T1, T2, and T3, a third tumor that had been passaged once in NOD/SCID mice, were tested to determine whether tumorigenic cells could be enriched based upon expression of B38.1, CD44, CD24 and LINEAGE markers. In all cases, the B38.1⁺CD44⁺CD24^{-lo} cells were markedly enriched for tumorigenic cells. When injecting unsorted T1 or T2 cells, 5x10⁴ cells consistently gave rise to a tumor, but 10⁴ cells gave rise to tumors in only a minority of cases (TABLE 6). In contrast when B38.1⁺CD44⁺CD24^{-lo}LINEAGE⁻ cells were isolated from T1 or T2 (FIG. 7), as few as 10³ cells from this population were able to give rise to tumors in all cases (TABLE 6, FIG. 7J and FIG. 7L). Cells that were B38.1⁺CD44⁺LINEAGE⁻ but CD24⁺ failed to form tumors. These data indicate that the B38.1⁺CD44⁺CD24^{-lo}LINEAGE⁻ population is at least 10-

fold enriched for the ability to form tumors in NOD/SCID mice relative to unfractionated tumor cells. This population accounted for 4-17% of the cells in T1 and T2 (5-23% of cancer cells).

EXAMPLE 7

ANALYSIS OF PRIMARY HUMAN TUMOR CELLS

[252] To rule out the possibility that the tumorigenic activity in the enriched population of EXAMPLE 7 arose as a result of propagation in the xenograft model, we isolated unfrozen pleural effusion breast cancer cells based upon expression of CD44 and CD24. Approximately 11% of the neoplastic cells were CD44⁺CD24^{-lo}LINEAGE⁻ and 75% CD44⁺CD24⁺LINEAGE⁻. All three injections of 100,000 CD44⁺CD24^{-lo}LINEAGE⁻ cells, but none of the CD44⁺CD24⁺LINEAGE⁻ cells, formed tumors (TABLE 6). We next tested whether the B38.1⁺CD44⁺CD24^{-lo} population from unpassaged breast tumor specimens (FIG. 7D) was tumorigenic. Of four independent tumors that were analyzed after being passaged in mice, there were only enough frozen unpassaged cells available of T1 to permit flow-cytometry. In addition, frozen unpassaged cells from a fifth patient (T5) were analyzed. Five percent of unpassaged T1 cells and 35% of unpassaged T5 cells were B38.1⁺CD44⁺CD24^{-lo}LINEAGE⁻.

[253] All 40,000 B38.1⁺CD44⁺CD24^{-lo}LINEAGE⁻ cells or 40,000 B38.1⁺CD44⁺CD24⁺LINEAGE⁻ cells that were isolated by flow-cytometry from unpassaged T1 were injected into a single mouse. From the unpassaged T5 cells, 60,000-100,000 cells of the B38.1⁺CD44⁺CD24^{-lo}LINEAGE⁻ (FIG. 7I) and B38.1⁺CD44⁺CD24⁺LINEAGE⁻ (FIG. 7F) populations were isolated and injected into each of three NOD/SCID mice. The CD24^{-lo} population formed tumors from the T1 cells and in 2 of 3 injections from T5 cells, but the CD24⁺ population never formed tumors, demonstrating that the tumorigenic population identified in the passaged tumors also existed in the unpassaged T1 and T5 samples. When tumors that arose from the unpassaged T1 cells were analyzed, the frequency of B38.1⁺CD44⁺CD24^{-lo}LINEAGE⁻ cells was similar in both passaged and unpassaged T1 samples.

WO 02/12447

PCT/US01/24243

69

TABLE 6 Tumorigenic breast cancer cells are highly enriched in the CD44 ⁺ B38 ⁺ CD24 ⁻ population									
Cells / injection	Number of tumors/number of injections for each cell dose								
	5x10 ⁵	1x10 ⁵	5x10 ⁴	2x10 ⁴	1x10 ⁴	5x10 ³	1x10 ³	5x10 ²	2x10 ²
T1 cells (xenograft)									
Unsorted	4/4	4/4	6/6	-	2/6	-	0/6	-	-
B38.1 ⁺ CD44 ⁺ CD24 ⁻	-	-	-	0/5	0/5	0/5	0/5	-	-
B38.1 ⁺ CD44 ⁺ CD24 ⁺	-	-	-	5/5	5/5	5/5	5/5	-	-
ESA ⁺ B38 ⁺ CD24 ⁻	-	-	-	-	-	-	8/8*	2/2	1/2
ESA ⁺ B38 ⁺ CD24 ⁺	-	-	-	-	-	-	0/8*	0/2	0/2
T2 cells (xenograft)									
Unsorted	4/4	4/4	4/4	-	1/6	-	0/6	-	-
B38.1 ⁺ CD44 ⁺ CD24 ⁻	-	-	-	0/5	0/5	0/5	0/5	-	-
B38.1 ⁺ CD44 ⁺ CD24 ⁺	-	-	-	5/5	5/5	5/5	5/5	-	-
T3 cells (xenograft)									
B38.1 ⁺ CD44 ⁺ CD24 ⁻	-	-	-	-	0/2	-	-	-	-
B38.1 ⁺ CD44 ⁺ CD24 ⁺	-	-	-	-	2/2	-	-	-	-
T5 cells (primary cells)									
CD44 ⁺ CD24 ⁻		0/3							
CD44 ⁺ CD24 ⁺		3/3							
T1 cells (primary cells)									
B38.1 ⁺ CD44 ⁺ CD24 ⁻			0/1						
B38.1 ⁺ CD44 ⁺ CD24 ⁺			1/1						
T6 cells (primary cells)									
B38.1 ⁺ CD44 ⁺ CD24 ⁻		0/1	0/2						
B38.1 ⁺ CD44 ⁺ CD24 ⁺		1/1	1/2						

Cells were isolated from first passage tumor T1, tumor T2, or tumor T3 cells.
B38.1⁺CD44⁺CD24⁻LINEAGE⁻ and B38.1⁺CD44⁺CD24⁺LINEAGE⁻ cells were isolated by flow-cytometry as described in FIG. 3. The indicated number of cells of each phenotype was injected into the mammary fat pad of NOD/SCID mice. The number of tumors that formed from injections of each group of cells is indicated. Note that isolation of B38.1⁺CD44⁺CD24⁻LINEAGE⁻ cells results in more than a ten-fold enrichment in tumorigenic cells and that no tumors arose from injection of B38.1⁺CD44⁺CD24⁺LINEAGE⁻ cells. When cells were sorted as ESA⁺ in addition to B38.1⁺CD24⁻, injections of as few as 200 cells gave rise to a tumor, an approximately 50-fold enrichment in tumorigenicity relative to unsorted cells.* for these injections 2x10³ cells were used instead of 1x10³.

EXAMPLE 8 FURTHER CHARACTERIZATION OF THE CELL POPULATIONS FROM A BREAST CANCER TUMOR

[254] In one tumor, tumorigenic cells were further enriched by selecting the ESA⁺ subset of the B38.1⁺CD44⁺CD24⁻ population. When ESA⁺CD44⁺CD24⁻LINEAGE⁻ cells were isolated from T1 (FIG. 8A), as few as 200 cells from this population were able to give rise to a tumor while injection of 2,000 B38.1⁺CD24⁻LINEAGE⁻ but ESA⁻ cells failed to form tumors in any case (TABLE 6). At least 10,000 unfractionated cells were required to form any tumors. Thus, the ESA⁺B38.1⁺CD24⁻LINEAGE⁻ population was at least 50 fold enriched for the ability to

WO 02/12447

PCT/US01/24243

70

form tumors relative to unsorted tumor cells. The $\text{ESA}^+\text{B38.1}^+\text{CD24}^{\text{lo}}\text{LINEAGE}^-$ population accounted for 2-4% of T1 cells (2.5-5% of cancer cells). The $\text{ESA}^+\text{B38.1}^+\text{CD24}^{\text{lo}}\text{LINEAGE}^-$ and the non-tumorigenic cells were examined by cytology and both populations consisted of malignant cells that were virtually indistinguishable in appearance.

EXAMPLE 9
USE OF CANCER STEM CELLS TO IMPROVE TISSUE CULTURE CONDITIONS FOR GROWTH OF BREAST CANCER CELLS

[255] In tissue culture, it has long been known that only a minority of primary tumor cells are capable of forming colonies. According to the solid tumor stem cell model, while the non-tumorigenic population of cells might retain some ability to proliferate, the tumorigenic population of cells would have a greater capacity to do so. Equal numbers of the tumorigenic phenotype and the non-tumorigenic cells, isolated either directly from a primary tumor or from tumor T1 and tumor T4 growing in mice, were seeded at clonal density in tissue culture plates and colony formation was measured. The primary patient cells were from an aliquot of frozen primary cells from a tumor that easily forms a breast cancer cell line and proliferates well in tissue culture.

[256] Cytology showed that each population contained cancer cells of epithelial origin (FIG. 9).

[257] Initially, colonies formed from not only the tumorigenic cells but in some tumors also from the non-tumorigenic cells (FIG. 9). However, by day twelve, the colonies formed by the tumorigenic cells had grown while the non-tumorigenic cells had died (FIG. 9). By day 14, only $\text{B38.1}^+\text{CD44}^+\text{CD24}^+\text{LINEAGE}^-$ cells formed numerous large colonies of cancer cells (FIG. 9C).

[258] We have passed these cells in tissue culture over 3 passages, and the epithelial neoplastic cells continue to proliferate. By contrast, the non-tumorigenic cells were capable of forming only small colonies consisting of 2-4 cells that stopped proliferating after a few days (FIG. 9C).

[259] These results illustrate two important points. First, the phenotype of the stem cells is not an artifact of the immune-deficient mouse assay. The fact that the phenotypically identical population of cells had increased proliferative ability in both the mouse xenograft model and the *in vitro* assays shows that this population is the tumorigenic population of cells found in patients with breast cancer.

[260] Second, at least some of the non-tumorigenic cells have the capacity for limited proliferation. This shows that the markers used to identify the non-tumorigenic population were not simply selecting for cells that lacked viability.

[261] These results of this EXAMPLE provides a solution to the problem that the use of the *in vitro* clonogenic assay to predict chemotherapy drug sensitivity frequently does not predict a particular patient's response to therapy. In one of the tumors used in this EXAMPLE, the non-tumorigenic population of cells formed colonies almost as efficiently as the tumorigenic cells (the solid tumor stem cells of the invention) on day 4. In using this tumor for a drug-screening assay, if the non-tumorigenic and tumorigenic cells that are clonogenic *in vitro* respond differently to a particular test compound, then the assay, especially if scored early, would not have reflected the ability of the test compound to eliminate breast cancer stem cells *in vivo*.

EXAMPLE 10
THE STEM CELL POPULATION REGENERATES BOTH THE STEM CELL AND THE
NON-TUMORIGENIC POPULATIONS OF CELLS

[262] According to the deterministic solid tumor stem cell model (FIG. 1B), B38.1⁺CD44⁺CD24^{low}LINEAGE⁻ tumorigenic cells form tumors that contain additional B38.1⁺CD44⁺CD24^{low}LINEAGE⁻ tumorigenic cells as well as phenotypically heterogeneous populations of non-tumorigenic cells. Classical models would suggest that tumors that form from B38.1⁺CD44⁺CD24^{low}LINEAGE⁻ cells consist solely of expanded numbers of B38.1⁺CD44⁺CD24^{low}LINEAGE⁻ cells.

[263] Tumors arising from 1,000 B38.1⁺CD44⁺CD24^{low}LINEAGE⁻ cells were dissociated and analyzed by flow-cytometry with respect to B38.1, CD44 and CD24 expression (FIG. 10). As expected from the deterministic solid tumor stem cell mode, cells obtained from a tumor arising from transplanted B38.1⁺CD44⁺CD24^{low}LINEAGE⁻ cells were heterogeneous with respect to expression of all markers (FIG. 10C and FIG. 10F). In both cases, the marker expression pattern of the cells isolated from the tumor initiated by the B38.1⁺CD44⁺CD24^{low}LINEAGE⁻ cells was similar to that of the original tumors (compare FIG. 10A and FIG. 10B with FIG. 10C and FIG. _____).

WO 02/12447

PCT/US01/24243

72

none of the B38.1⁺CD44⁺CD24⁺LINEAGE⁻ population, gave rise to new tumors.

[265] This EXAMPLE demonstrates that the B38.1⁺CD44⁺CD24^{-lo}LINEAGE⁻ population gives rise to both additional tumorigenic B38.1⁺CD44⁺CD24^{-lo}LINEAGE⁻ cells and phenotypically distinct non-tumorigenic cells.

EXAMPLE 11 EXPRESSION OF POTENTIAL THERAPEUTIC TARGETS BY THE DIFFERENT POPULATIONS OF NEOPLASTIC CELLS

[266] In the deterministic solid tumor stem cell model (FIG. 1B), expression of genes by the tumorigenic and non-tumorigenic populations of tumor cells may differ. Accordingly, the inability of current cancer treatments to significantly improve outcome is due to the tendency of therapeutics to target non-tumorigenic cells but not the rare tumorigenic solid tumor stem cells.

If only the non-tumorigenic populations are killed by particular therapies, then tumors may shrink, but the remaining tumorigenic solid tumor stem cells can drive regrowth of the tumor.

[267] We examined first passage T1 cells for expression of either the EGF receptor (EGF-R) or HER2/neu. The EGF-R and HER2/neu are potential therapeutic targets that have been implicated in breast cancer cell proliferation. Tumorigenic T1 cells stained with lower levels of anti-EGF-R antibody than non-tumorigenic cells, and EGF-R expression could not be detected at the single cell level in tumorigenic cells (FIG. 11).

[268] To test whether cells that did not express detectable levels of the EGF-R were tumorigenic, 1,000-2,000 EGFR⁻B38.1⁺CD24⁺LINEAGE⁻ cells were injected into NOD/SCID mice. Tumors formed in four out of four cases, confirming that the EGF-R⁻ cells are tumorigenic. By contrast, we could not detect a substantial difference in HER2/neu expression between tumorigenic and non-tumorigenic T1 cells (FIG. 11B and FIG. 11E).

[269] As expected from the solid tumor stem cell model, 1,000-2,000

HER2/neu⁺B38.1⁺CD24⁺LINEAGE⁻ cells gave rise to tumors in four out of four cases. This EXAMPLE shows that there can be differences in the expression of therapeutic targets between the tumorigenic and non-tumorigenic populations.

[270] These experiments serve as a proof-of-principle of our stem cell model of solid cancer and demonstrate the following:

- (a) tumor cells are phenotypically and functionally heterogeneous;
- (b) by separating cells by FACS one can enrich for tumorigenic cells; and
- (c) by studying the tumorigenic fractions, one can isolate solid tumor stem cells to more carefully focus molecular and biological assays.

EXAMPLE 12
FURTHER EVIDENCE FOR A ROLE FOR NOTCH IN BREAST CELL PROLIFERATION

[271] To determine whether Notch was a solid tumor stem cell marker, we sorted Notch 4⁺ and Notch 4⁻ cells and analyzed their ability to form colonies *in vitro*. Surprisingly, neither population grew in tissue culture.

[272] There are two possible explanations for these results. First, interaction between the two populations of cells may be required for cell growth. Alternately, the antibody may be either an agonist or antagonist of Notch 4 and inhibition or activation of the receptor may inhibit tumor cell growth. To distinguish between these possibilities, unseparated tumor cells were incubated with the anti-Notch 4 antibody, and then assayed for the ability to form colonies *in vitro* in tissue culture medium containing soluble Delta, a Notch ligand. Delta was essential for colony formation from cells isolated from this tumor. While control cells grew in tissue culture and formed colonies (FIG. 12A), cells incubated with the Notch 4 antibody did not grow (FIG. 12B). When the anti-Notch 4 antibody was pre-incubated with the peptide used to generate the antibody (this peptide should theoretically block binding of the antibody to the cells), the ability of the tumor cells to form colonies was restored (FIG. 12C). An anti-Notch 2 antibody did not affect colony formation.

[273] To confirm that Notch regulates colony formation by tumor cells, cells were incubated in medium with or without soluble Delta (FIG. 12A and FIG. 12D, respectively). The cultures with Delta formed many colonies (FIG. 12A), whereas only a few small colonies formed in medium lacking soluble Delta or in cultures using cells exposed to the anti-Notch 4 antibody (FIG. 12B, FIG. 12D, and FIG. 12E). Taken together, these data suggest that the Notch 4 pathway regulates the proliferation/survival of breast cancer cells in cells and that the anti-Notch 4 antibody blocks activation *in vitro*.

[274] We also tested whether the anti-Notch 4 antibody inhibits breast cancer tumor cell growth *in vivo*. To do this, 20,000, 10,000 or 5,000 tumorigenic cells were incubated with the anti-Notch 4 antibody or the anti-Notch 4 antibody and the blocking peptide. The antibody delayed the appearance of the tumors by one week when either 20,000 or 10,000 tumorigenic cells were injected, and by 13 days when 5,000 cells were injected. This suggests that the antibody may block tumor formation *in vivo*.

[275] We then tested four breast cancer cell lines for expression of Notch 4 and growth inhibition by the anti-Notch 4 antibody. We found that the MCF-7 and the SKBR-3 breast cancer cell lines expressed Notch 4 and that the anti-Notch 4 antibody inhibited the growth of these

WO 02/12447

PCT/US01/24243

74

cells. RT-PCR showed that both expressed Notch 4. To determine whether the anti-Notch 4 antibody inhibits growth, 5,000 MCF-7 cells were incubated with the anti-Notch 4 antibody, the anti-Notch 4 antibody and the peptide used to generate the antibody, or an irrelevant control antibody. The anti-Notch 4 antibody, inhibited colony formation of both cell lines by more than ten-fold.

[276] This EXAMPLE shows that Notch 4 activation promotes proliferation/survival of solid tumor stem cells and that the anti-Notch 4 antibody blocks receptor activation.

EXAMPLE 13 TARGETING BREAST CANCER STEM CELLS WITH A GENE THERAPY SUICIDE VECTOR

[277] The breast cancer stem cell comprises a minority of the tumor cells in a breast tumor. It is an object of the invention that gene therapy strategies target these cells (FIG. 13).

[278] We targeted virus vectors to breast cancer stem cells using markers expressed by stem cells. To do this, we stained different cell lines with the B38.1 antibody and analyzed them by flow cytometry. MCF7, SKBR3, T47D and BT474 breast cancer cell lines were highly positive. We had the anti-fiber and the B38.1 antibodies conjugated with the Prolinx (Prolinx, Inc., Bothell, WA, USA) method (FIG. 14, *see Douglas JT et al., Nature Biotechnology*, 14(11):1574-8 (1996)). When we mixed the modified anti-knob and anti-B38.1 antibodies together, they became cross-linked and generated the bi-specific conjugate (FIG. 15). The anti-fiber antibody part of the conjugate binds to the adenovirus, while the anti-B38.1 moiety binds to the breast cancer stem cell. Incubation of the AdLacZ virus with the anti-fiber alone blocks the infectivity of the virus (FIG. 16). If we incubate the virus with the bi-specific conjugate, the infectivity is restored only in the cells that express high levels of the B38.1 antigen (FIG. 18). The re-targeting is specific, because it can be inhibited by free B38.1 antibody (FIG. 18).

[279] The conclusion is that the new bi-specific conjugate modifies the infectivity of Adenovirus, blocking its natural tropism and directing the infection to cells that express the breast cancer stem cell surface marker.

EXAMPLE 14 DOWNSTREAM TARGETS IN THE BREAST CANCER STEM CELLS

[280] The methods used in this EXAMPLE provide guidance for the development of Notch-related and other anti-cancer therapies using the cancer stem cells of the invention. We

use array technology to begin to understand the molecular pathways that might be regulated by Notch-signaling induced by specific Notch ligands. Sequence verified human cDNAs from Research Genetics, provided by the University of Michigan Microarray Network, are arrayed by the Cancer and Microarray Facility. Probes are prepared from self-renewing breast cancer stem cells or cells from the various populations of cells found in a tumor. Probes are hybridized to the arrays and the hybridization patterns are read by the Cancer and Microarray Facility. We then analyze the hybridization patterns to identify genes that hybridize to probe from the breast cancer stem cells stimulated with various Notch ligands and non-stimulated cells. Such genes may represent those that are involved in the regulation of breast cancer cell survival or self-renewal.

[281] *Preparation of microarrays.* We have used the microarray technology to analyze gene expression of hematopoietic stem cells. We now extend this work to cancer stem cells.

[282] The University of Michigan Microarray Network currently has 32,500 sequence verified human cDNAs from Research Genetics. A "cancer" chip has been assembled in collaboration with the NCI. This chip contains a comprehensive constellation of 1,200 genes involved in proliferation and tumorigenesis. There is also an "apoptosis chip" developed by the University of Michigan that contains all genes known to be involved in programmed cell death. Note that the HES genes, known to be downstream targets of Notch, are included in the arrays.

[283] *Preparation of probe from breast cancer stem cells.* Messenger RNA is isolated either from freshly purified breast cancer stem cells or from breast cancer stem cells incubated in the presence or absence of various Notch ligands. The RNA is amplified if necessary, such as by PCR or linear RNA amplification Wang *et al.*, *Nature Biotechnology*. 18: 457-459 (April 2000). Probe are prepared by reverse transcription from an oligo-dT primer, and labeled by incorporating CY3 or CY5 conjugated nucleotides. Gene expression profiles are examined using probe prepared from freshly isolated, uncultured breast cancer cells, as well as from cultured breast cancer cells, such as cells that have been exposed to the appropriate Notch ligands (including Fringe family members, either singly or in combination as determined by which ligands are expressed by the different populations of tumor cells. To do these assays, we expose the cells to a soluble form of Delta or Jagged family members in which the transmembrane region has been deleted, or one of the Fringes. The Fringes are secreted proteins. We make recombinant protein of each Notch ligand of the Delta, Jagged and Fringe families from insect cells or mammalian cells transfected with a baculovirus or mammalian expression vector, respectively.

[284] Comparisons of gene expression patterns between control breast cancer tumorigenic cells and tumorigenic cells exposed to various Notch ligands are made. Probe from breast cancer stem

cells from each tumor is combined with probe labeled with a different fluor made from cultured breast cancer stem cells exposed to various Notch ligands to compare their hybridization patterns. To do this, breast cancer stem cells are isolated by FACS. Cells are seeded at single cell density to preclude Notch interactions between cells. Cells are exposed to soluble forms of Delta (*see, EXAMPLE 6*), Delta-like, Jagged 1, Jagged 2, or each of the Fringes. Cells are exposed to each protein both alone and in combinations suggested by the Notch-ligand expression pattern of individual cell populations. The microarrays hybridized with probe from each test condition are compared and analyzed to gain insights into molecular pathways affected by Notch ligand interactions. For example, if a particular population of cells expresses Delta and Manic Fringe, then one group of breast cancer stem cells is exposed to Delta alone, a second to Delta and Manic Fringe and a third to Manic Fringe alone. cDNA is made from each population with Cy5 or Cy3 labeling, and used to probe a microarray chip. In addition, cDNA from each population is used with cDNA made from cells cultured in control medium and freshly isolated breast cancer cells to probe a microarray chip. Each group is compared 5 times to assure that any differences in expression profiles of the arrayed genes by each test groups are real.

[285] *Preparation of probe from cells treated with the anti-Notch 4 antibody.* An antibody against Notch 4 inhibits growth *in vitro* and tumorigenesis *in vivo*. This effect could be explained if the antibody acts as either a Notch-4 agonist or antagonist. Since soluble Delta promotes cancer cell growth *in vitro*, the antibody most likely is a Notch 4 antagonist. To confirm the mechanism by which the anti-Notch 4 antibody inhibits tumor growth, probe is made from cells incubated in the presence or absence of the anti-Notch 4 or control irrelevant antibody and the various combinations of the Notch ligands and used for microarray expression analysis as described above. Another control group includes cells incubated with the antibodies and no Notch ligand. Each comparison is performed in at least six independent tests employing independently prepared batches of probe. By comparing the gene expression patterns of each group, we should be able to determine how the anti-Notch 4 antibody affects Notch signaling.

[286] *Making the cDNA probe.* 1-2 μg of mRNA is commonly used to synthesize probe for screening gene expression profiles on microarrays (Wang *et al.*, *Nature Biotechnology*, 18: 457-459 (April 2000)). Since we screen a set of three slides (containing a total of 32,500 cDNAs) in each test, 6 μg of mRNA is required per assay (reverse transcription of 6 μg of mRNA should yield around 3 μg of cDNA probe, or 1 μg of probe per slide). Cancer cells tend to have a high RNA content. In past assays, 10^7 cancer cells yielded around 100 μg of total RNA, which in turn yielded around 3 μg of poly A⁺ RNA. Thus in order to generate 6 μg of mRNA, around 2×10^7

cells would be required. As described in the preliminary data, that number of flow-cytometrically purified breast cancer stem cells can be isolated from approximately five-ten 1 cm tumors.

[287] The breast cancer stem cells represent approximately 5% of the total number of cells within a tumor. It is not practical to isolate more than 10^6 freshly dissociated (uncultured) breast cancer stem cells by flow-cytometry in one day. This would yield less than 0.5 μ g of mRNA from one day of sorting. While breast cancer stem can be combined from multiple days of sorting to pool enough mRNA to prepare probe from freshly isolated cells, it may not be practical to perform all assays in this manner. Some assays require brief periods of tissue culture. Plating efficiency of the sorted cells is approximately 10%. Thus it may be necessary to enzymatically amplify the template prior to synthesizing probe. This can be done either by PCR or by linear amplification of RNA using T7 RNA polymerase. Our protocol employs 15-18 rounds of PCR to amplify cDNA from small numbers of stem cells. This protocol was used to construct a high quality hematopoietic stem cell (HSC) cDNA library and to make probe from hematopoietic stem cells. To produce probe from freshly isolated breast cancer stem cells, we test the same approach. Alternately, a number of groups have reported success in using linear RNA amplification to produce probe for microarray hybridization. Thus we compare the two methods by preparing probe both ways and examining the hybridization patterns that result. cDNA is primed using an oligo-dT primer that contains a T7 RNA polymerase binding site and synthesized by Superscript reverse transcriptase (Gibco) and the Clontech 5's switch oligomer that allows the tagging of the 5' end of the cDNA. Second strand cDNA is synthesized using *E. coli* DNA polymerase. Then amplified RNA (aRNA) is produced using T7 RNA polymerase or PCR. Which of the two that amplification methods are used is determined by comparing probe made with standard cDNA synthesis. After preparing aRNA, cDNA is re-synthesized using random hexamers. This cDNA can then be used for probe, or if necessary, additional rounds of amplification can be performed. Both approaches are used to prepare probe from 40,000 MCF-7 cells (a human breast cancer stem cell line). This probe is hybridized to human cDNA microarrays along with probe from unamplified MCF-7 cells. The amplification approach that most closely reproduces the hybridization pattern of the unamplified probe is selected. Then amplification conditions are modified until the amplified probe reproduces the hybridization pattern of the unamplified probe as closely as possible.

[288] *Analysis of the hybridization pattern.* Hybridization patterns are analyzed in the Cancer and Microarray Core facility using their laser scanning system. The use of an integrated system for arraying, hybridizing, scanning, and analyzing hybridization patterns in which all components are provided by Genomics Solutions permits a seamless and efficient analysis of

hybridization patterns.

[289] A transcript is differentially expressed if there is at least a 3-fold difference in normalized hybridization levels between probes. Hybridization signals from Cy3 and Cy5 labeled probes within a single test are normalized to each other to correct for potential differences in the effective concentration of each probe and replicates of each test are done using the opposite fluor for each group to correct for differences in the amounts or labeling efficiencies of probes.

[290] *Verification of differential expression.* cDNAs that consistently hybridize to probe from groups of cells but not to probe from the control groups of cells are further characterized. The sequences of these cDNAs are obtained from the Microarray Network. Two approaches are used to confirm the differential expression of candidate genes between cell populations. The first is to prepare *in situ* hybridization probes against candidate genes, and then perform *in situ* hybridizations on breast cancer stem cells cultured in medium with or without various Notch ligands as described above. *In situ* hybridizations are then performed on cultured cells. The advantage of this approach would be that expression could be compared at the level of individual cells.

[291] An alternate approach is to design nested PCR primers against candidate genes, and to perform RT-PCR on multiple 1-10-cell aliquots of freshly purified breast cancer stem cells (isolated as described above). By performing RT-PCR on small numbers of cells it is possible to observe a difference in the ability to amplify particular transcripts, even if the "non-expressing" population contains rare expressing cells. We used this approach to demonstrate the differential expression of RGS18 between different subpopulations of multipotent hematopoietic progenitors.

[292] Differential expression can be confirmed by Northern analysis. Poly A⁺ RNA from 1-2 x 10⁷ breast cancer stem cells cultured with or without the Notch ligands, are hybridized to probes of the differentially expressed cDNAs. Hybridization signals are quantitatively compared between these samples.

[293] We then confirm that genes are differentially expressed at the protein level. In cases where immunocytochemical staining is uninformative we also perform western blots on protein from the different cells.

[294] Certain molecular analyses are difficult using the primary breast cancer cells that only proliferate for prolonged periods of time in the xenograft model. These analyses can be done in cell lines. One can use any of a large number of breast cancer cell lines, including early passages of lines that we have studied in the past. Clarke *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92: 11024-28 (November 1995); Hernandez-Alcoceba *et al.*, *Human Gene Therapy*. 11(11): 20 (September

2000). These cell lines are plated at single-cell density with and without various Notch ligands, as well as the anti-Notch 4 or control antibodies as described in the assays with the primary breast cancer cells. If clonogenicity is affected by Notch signaling, then probe for the microarray analysis is made using cDNA made from the cell line incubated in medium with or without the various Notch ligands or anti Notch 4 or control antibodies. Since a virtually unlimited number of cells can be analyzed, we can make probe that has not been amplified.

[295] Finally, cell lines are useful for confirming whether the anti-Notch 4 antibody is an agonist or antagonist. If a cell line is identified that clonogenicity is enhanced by soluble Delta and inhibited by the anti-Notch 4 antibody, then it is used in these assays. The cells are stably transfected with a luciferase minigene under the control of the Notch-inducible HET-1 promoter. Jarriault *et al.*, *Molecular & Cellular Biology*, 18(12): 7423-31 (Dec. 1998). The cells are plated at single cell density to prevent cell-cell Notch-Notch ligand interactions. They are treated with the various combinations of Notch ligands and either the anti-Notch 4 antibody or a control antibody. The cells are harvested and a luciferase assay is done to determine how each condition affects Notch signal transduction as reflected by transactivation of the HET1 promoter.

[296] A comprehensive functional analysis of candidate genes that emerge from the microarray analysis can be performed. Full-length cDNAs are isolated and cloned into a retroviral expression vector. Breast cancer cell lines and breast cancer stem cells isolated from the five xenograft tumors are infected *in vitro* and the effect of the retroviral transgene on self-renewal and tumorigenicity is assayed relative to clones infected with a control vector. The transgene is expressed as a bicistronic message that contains IRES-GFP. This allows identification of transduced cells via FACS or fluorescent microscopy. The effect of the transgene on Notch signaling is examined *in vitro* and *in vivo*. To do this, transduced cells are tested for response to the various combinations of Notch ligands found to affect colony formation in tissue culture and tumorigenicity in mice.

[297] The expression patterns of candidate genes are examined in detail *in vivo* to determine how widely the genes are expressed beyond the xenograft. In addition to performing more extensive *in situ* hybridizations of tissue sections from slices of primary breast cancer, we make antibodies against selected gene products being studied. The Hybridoma Core facility at the University of Michigan has extensive experience preparing monoclonal antibodies using both peptides, and expressed recombinant proteins.

[298] Ultimately, the functions of unknown genes are tested *in vivo*, using gene targeting to make knockout mice. The University of Michigan Transgenic Core has established murine ES

cell technology, they provide ES cells that 'go germline' at a high rate and assist with the generation of homologous recombinant ES clones.

[299] The ability of microarray analysis to simultaneously compare the expression of many genes provides unparalleled power to screen for changes in gene expression patterns. Combined with the ability to purify stem cells and to regulate their self-renewal and differentiation *in vitro*, microarray analyses can be applied with great precision to screen for specific types of regulatory genes.

EXAMPLE 15

HOW NOTCH SIGNALING AFFECTS BREAST CANCER TUMORIGENESIS

[300] To verify the importance of Notch in normal mammary growth and development, we test the effects of Notch ligands or agonist peptides on the growth and tumor formation of mammary tumor stem cells.

[301] *Effect of Notch activation on tumor formation in vivo.* The effects of the various combinations of Notch ligands on tumor formation are correlated with the microarray data obtained in EXAMPLE 14. These assays are done using xenograft tumor cells before and after enrichment of populations of malignant breast cells, allowing us to differentiate Notch effects on both stem and progenitor cells respectively. The effects of Notch ligands on growth and differentiation of each population of cancer cells are determined utilizing the *in vivo* assay.

[302] To determine the effect of Notch stimulation on tumor growth *in vivo*, one thousand, ten thousand, and one hundred thousand breast cancer tumor cells are incubated with soluble Notch ligands, alone or in combination, or control media and then injected (6 replicates of each) into NOD/SCID mice. The soluble forms of Delta, Delta-like, Jagged 1, and Jagged 2 are used as well as members of the Fringe family. The cells are incubated with each ligand individually, as well as combinations of different ligands, for two hours. The cells are suspended in Matrigel® with the Notch ligands and then injected into the mice. The effects of each ligand of Notch stimulation on both the number of cells needed to form a tumor as well as the time needed to form a tumor are determined. This allows us to determine whether Notch affects tumor growth *in vivo*.

[303] In previous EXAMPLES, the anti-Notch 4 antibody retarded tumor formation after a single, brief incubation with cells. Next, one thousand, ten thousand, and one hundred thousand tumorigenic cells from each of the five xenograft tumors are incubated with either a control antibody or the anti-Notch 4 antibody alone, or with various combinations of Delta, Jagged and Fringe family proteins. Each group is then mixed in Matrigel® containing the same antibody or

WO 02/12447

PCT/US01/24243

81

Notch ligands and injected into mice. The effects of the anti-Notch 4 antibody on the number of cells and time needed to form a tumor are measured. The results are correlated with the microarray expression data, obtained in EXAMPLE 14.

[304] Stimulation of Notch should drive the proliferation of the normal breast stem cells. Like in normal stem cells, members of the Fringe family should modulate Delta or Jagged signaling. Notch should also play a role in the self-renewal of the breast cancer stem cell.

EXAMPLE 15 HUMAN SUBJECTS

[305] The following human sources of material are obtained for use in the methods of diagnosis of the invention: (1) primary tumors from patients with breast cancer and (2) pleural fluid from patients with metastatic breast cancer. A portion of the tumor or the pleural fluid is obtained during routine treatment when the patient's physician deems removal of the tumor or pleural fluid to be clinically indicated.

[306] For example, at the University of Michigan Hospital, there is an IRB approved protocol to obtain the specimens. Patients are asked to sign an informed consent where indicated. There are no additional risks to patients.

EXAMPLE 16 VERTEBRATE ANIMALS

[307] The University of Michigan complies with the Animal Welfare Act as amended (7 U.S.C. § 2131 *et seq.*), and other Federal statutes and regulations relating to animals. We use the laboratory mouse strain NOD/SCID mice and other strains of immunocompromised mice, such as Beige/SCID mice.

[308] There should not be any discomfort from cancer cell growth, because mice undergo euthanasia prior to development of illness. If the mice do show evidence of discomfort from tumors (posture, appetite, or behavior changes, weight loss), they can be immediately sacrificed. Should the mice show evidence of more than mild discomfort (posture, appetite, or behavior changes) they are given analgesics such as oral morphine or codeine. Mice have bone marrow cells inoculated into their retro-orbital vein while anaesthetized with either ether or a similar general anesthetic agent.

[309] Mice are killed by the use of CO₂, which is consistent with the recommendations of the Panel on Euthanasia of the American Veterinary Medical Association. This method was chosen because it is safe and humane.

EXAMPLE 17
CELL CYCLE ANALYSIS OF BREAST CANCER STEM CELLS AND
NON-TUMORIGENIC BREAST CANCER CELLS

[310] We tested cells from a mouse xenograft tumor. The cell cycle status of the breast cancer stem cell (FIG. 19A) and non-tumorigenic populations of cells (FIG. 19B) in the tumor was determined by flow cytometry. There was a similar distribution of cells in the G1, S, and G2/M phases of the cell cycle in both populations. Thus, both the tumorigenic and non-tumorigenic populations exhibited similar cell-cycle distributions.

[311] This EXAMPLE rules out the possibility that all cells that expressed the solid tumor stem cell markers were at a particular stage of the cell cycle in the tumor that was analyzed. By selecting cells at a particular stage of the cell-cycle by flow-cytometric sorting of Hoechst stained tumor stem cells it may be possible to further enrich tumorigenic activity, just as it has been possible to enrich hematopoietic stem cell activity by selecting cells with low levels of Hoechst staining

EXAMPLE 18
RHODAMINE 123 STAINING OF BREAST CANCER STEM CELLS AND
NON-TUMORIGENIC BREAST CANCER CELLS

[312] The purpose of this EXAMPLE is to examine the activity of the multi-drug resistance pump in breast cancer stem cells and the non-tumorigenic cancer cells. We have stained the $ESA^{+}CD44^{+}CD24^{-}LINEAGE^{-}$ cells (breast cancer stem cells) and the non-tumorigenic cells obtained from one of the xenograft tumors with Rhodamine 123.

[313] One of the major factors that determines the intensity of Rhodamine 123 staining in a cell is the MDR pump activity that eliminates this dye from the cells. Yumoto R. *et al.*, *Drug Metabolism & Disposition* 29(2): 145-51 (2001); Daoud R. *et al.*, *Biochemistry* 39(50): 15344-52 (2000). We found that some of the solid tumor stem cells from this tumor stained less intensely with Rhodamine 123 than did the non-tumorigenic cancer cells (FIG. 20).

[314] This EXAMPLE shows tumor cell heterogeneity and indicates that MDR pump activity may be higher in a solid tumor cells.

WO 02/12447

PCT/US01/24243

83

EXAMPLE 19

A B38.1⁺CD44⁺CD24^{-lo}LINEAGE⁻ POPULATION OF CELLS EXISTS IN OVARIAN CANCER TUMORS

[315] We analyzed cancer cells obtained from both a tumor and ascites fluid obtained from a cyto-reduction surgery for a patient with ovarian cancer. Notably, B38.1 is known to be expressed by ovarian cancer cells. Surprisingly, the flow cytometry analysis revealed multiple cell populations, and there was a distinct B38.1⁺CD44⁺CD24^{-lo}LINEAGE⁻ population of cells (FIG. 21).

[316] This distinct cell population phenotypically resembles the breast cancer stem cell and may represent an ovarian cancer stem cell.

EXAMPLE 20

A B38.1⁺CD44⁺CD24^{-lo}LINEAGE⁻ POPULATION OF CELLS EXISTS IN SARCOMA TUMORS/ COMPARISON TO BREAST CANCER STEM CELL DATA

[317] The B38.1 antigen had previously been described to be expressed only in breast cancer and ovarian cancer. We established two sarcomas by placing sarcoma cells in the flanks of NOD/SCID mice that had been treated with VP16. One of the tumors was excised and examined by flow cytometry. Surprisingly, the sarcoma cells expressed the B38.1 antigen. Furthermore, there were three distinct cell populations with respect to CD44: high, low and negative (FIG. 22).

[318] . Thus sarcoma cells include a CD44⁺ population that phenotypically resembles breast cancer stem cells and that may represent sarcoma stem cells.

TABLE 7 Tumorigenicity of Different Populations of Tumor T1 and T2 Cells			
Cells/injection	# tumors/# of injections		
	8x10 ⁵	5x10 ⁵	2x10 ⁵
T1 cells			
CD44 ⁺	0/2	0/2	-
CD44 ⁺	2/2	2/2	-
B38.1 ⁺	0/2	0/2	-
B38.1 ⁺	2/2	2/2	-
CD24 ⁺	-	-	1/6
CD24 ⁺	-	-	6/6
T2 cells			
CD44 ⁺	0/2	0/2	-
CD44 ⁺	2/2	2/2	-
B38.1 ⁺	0/2	0/2	-
B38.1 ⁺	2/2	2/2	-
CD24 ⁺	-	-	1/6
CD24 ⁺	-	-	6/6

Cells were isolated by flow cytometry as described in figure 2 based upon expression of the indicated marker and assayed for the ability to form tumors after injection of 2-8x10⁵ cells into the mammary fat pad of NOD/SCID mice. The number of tumors that formed/ the number of injections that were performed is indicated for each population of cells.

EXAMPLE 21

PREPARATION OF POLYNUCLEOTIDE PROBES

[319] *Single round RT labeling from total RNA source.* The polynucleotides isolated from isolated solid tumor stem cells or enriched populations of solid tumor stem cells can be RNA extracted from the cells or complementary DNA (cDNA) made from the extracted RNA.

[320] For some embodiments of the methods of the invention (such as those involving hybridization), labeled cDNA is useful. In one embodiment, we use the methods of single round RT labeling from total RNA source.

[321] The quality of the RNA coming into a labeling reaction will have a marked effect on the quality of the hybridization. RNA preparations that look good by the standard molecular biology criteria can give poor results. Typical problems include disperse, fine-grain noise over the entire hybridized surface and non-specific binding of fluor to the zones of DNA immobilization on the slide. These problems seem likely to have some roots in contaminating carbohydrate, and as would be expected with carbohydrate, the problems are exacerbated by ethanol precipitations before and after labeling. Very impure preparations frequently produce visible aggregates if precipitated after labeling and ethanol precipitation, which are essentially resistant to solubilization. It is well known that nucleic acids form strong aggregates with carbohydrate when either dried together or when co-precipitated. This interaction is the basis for nucleic acid "immobilization onto chromatography supports such as cellulose. To minimize this sort of

problem, we recommend " preparative procedures which use few or preferably no ethanol precipitations during RNA preparation and labeling. We use at least the volumes of extractant and washing solutions suggested for" the number of cells being processed. Appropriate or slightly excessive extraction/wash volumes tend to minimize noise in a hybridization assay.

[322] Methods that give satisfactory results are Triazol extraction (BRL) and Rneasy (Quiagen).

[323] Total RNA is prepared from tissue (from solid tumor or xenograft tumor), tissue culture or enriched populations of solid tumor stem cells obtained by flow cytometry . We resuspend the prepared RNA in a volume that produces an RNA concentration of >6 mg/ml in DEPC water. If the RNA is recovered from a matrix as the final preparative step, and is still too dilute, we concentrate as needed for labeling, using a MicroCon 30 (Amicon) determine the concentration of the RNA. We test by reading a small sample (A260) in 50 mM NaOH.

[324] For the nucleotide mix, we use 10X low T dNTPs (using 100mM dNTPs from Pharmacia (St. Louis, MO, USA) [27-2035-02])

TABLE 8
NUCLEOTIDE MIX

Nucleotide	μ l	mM final (1/10) concentration
dGTP	25	0.5
dATP	25	0.5
dCTP	25	0.5
dTTP	10	0.2
water	415	
total volume	500	

[325] Fluorescent Nucleotides are from Amersham Life Sciences or Perkin Elmer Applied Biosystems Division. We use FluoroLink Cy3-dUTP (#401-896) or FluoroLink Cy5-dUTP. The Cy 3 and Cy 5 nucleotides come at concentration of 1 mM.

[326] The R110 nucleotide comes at concentration of 0.1 mM, and must be dried and resuspended at 0.1 x the initial volume to bring it to 1 mM. Currently, the factors of labeling efficiency, fluorescent yield, spectral separation, and tendency toward non-specific binding make the Cy3/Cy5 pair the most useful for the detection system.

[327] For the labeling reaction, the primer can be Pharmacia oligo (dT) 12-18 (27-7858-01). Unlabeled nucleotide mixes are prepared from Pharmacia 100 mM stocks. The reverse transcriptase is BRL SuperScript II (18064-014). The 5X buffer is the buffer supplied with the polymerase.

[328] For use in microarrays, normalization in a two fluor labeling is achieved by reference to housekeeping genes distributed through the microarray.

[329] A cocktail of synthetic cDNAs produced using phage RNA polymerases on cloned *E. coli* genes in the pSP64 poly(A) vector as a mass standard and RNA quality standard. If possible, we also prepare a total RNA solution containing 100 µg of RNA in 17 µl of DEPC water.

Otherwise, we ethanol precipitate 100 mg of total RNA to concentrate sample for labeling reaction. We take care to remove all residual 70% ethanol wash either by air drying or vacuum, as residual ethanol may impede the efficiency of labeling.

[330] We resuspend the pellet in DEPC water to give a final volume of 17 ml. Any residual precipitate is removed by centrifugation. The RNA is added to the reaction last.

[331] *Fluor nucleotide (NTP) RT labeling*: We add the following:

TABLE 9 REVERSE TRANSCRIPTASE LABELING	
Component	µl
5X first strand buffer	8
Oligo (dT)12-18 (500 µg/ml)	2
10X low dT NTP mix	4
Fluor dUTP (1 mM)	4
0.1 M DTT	4
RNAasin	1
syn mRNA std (0.06 µg)	0.5
100mg total RNA	17.0
total	40

[332] We vortex the sample after adding RNAasin. We minimize bubbles and foaming during the vortex or quick spin.

[333] Next, we hold at 65°C for 5 minutes, bring to 42°C (program R1). Then, add 2 µl of SSII enzyme. Make sure enzyme is well mixed into the reaction. Next, incubate 42°C for 25 minutes. Add 2 µl of SSII enzyme. Make sure enzyme is well mixed into the reaction. Then, incubate 42°C for 35 minutes. Add 5 µl of 500 mM EDTA. Be sure to stop the reaction with EDTA before adding NaOH.

[334] Add 10 ml of 1M NaOH. Incubate at 65°C for 60 minutes to hydrolyze residual RNA. Cool to room temperature and add 25 µl of 1 M Tris-HCl (pH 7.5)

[335] For probe cleanup and analysis, we transfer to a Microcon 30, concentrate to about 20 µl (approx 3.5 min at 14,000 rpm in Eppendorf 5415C). We wash by adding 200 µl of TE (pH 7.5) and concentrating to about 20 µl (4-4.5 min @ 14,000 rpm). We recover the product by inverting

the concentrator over a clean collection tube and spinning for 3 min @ 3000 rpm.

[336] In some cases, the Cy5 probe may produce a gelatinous blue precipitate which is recovered in the concentrated volume. The presence of this material signals the presence of contaminants. The more extreme the contamination, the greater the fraction of probe which will be captured in this gel. Even if heat solubilized, this material tends to produce uniform, non-specific binding to the DNA targets.

[337] When concentrating by centrifugal filtration, the times required to achieve the desired final volume are variable. Overly long spins can remove nearly all the water from the solution being filtered. Then, when fluor tagged nucleic acids are concentrated onto the filter in this fashion, they are very hard to remove. Thus, we approach the desired volume by conservative approximations of the required spin times.

[338] We take a 2µl aliquot of Cy5 probe for analysis, leaving 17-18 µl for hybridization, then run this probe on a 2% agarose gel in TAE (gel size is 6 cm wide x 8.5cm long, 2 mm wide teeth). For maximal sensitivity when running samples on a gel for fluor analysis, we use loading buffer with minimal dye and do add ethidium bromide to the gel or running buffer.

[339] We scan the gel on a Molecular Dynamics Storm fluorescence scanner (Settings - red fluorescence, 200 micron resolution, 1000 volts on PMT). A successful labeling produces a dense smear of probe from 400 bp to >1000 bp, with little pile-up of low molecular weight transcripts. Weak labeling and significant levels of low molecular weight material indicate a poor labeling.

[340] *Hybridization.* The blocking species is poly(dA) from Pharmacia (27-7988-01) (resuspended at 8 mg/ml); yeast tRNA from Sigma (R8759) (resuspended at 4 mg/ml); and CoT1 DNA from Life Technologies Inc. (concentrated 10 fold to 10 mg/ml).

[341] The volume required for the hybridization is dependent on the size of array used. For hybridizations that require small volumes (20-25 µl), the probe volumes after microconcentration can be too large. If so, then we add the blockers to the Cy3 probe and precipitate the Cy3 probe.

[342] We add 8 mg poly (dA); 4 mg tRNA; and 10 mg CoT1 DNA per 10 ml hybridization.

TABLE 10
HYBRIDIZATION PROBE MIX

Cy3 labeled probe	~20 µl
poly dA (8 mg/ml)	1 µl
yeast tRNA (4 mg/ml)	1 µl
CoT1 DNA (10 mg/ml)	1 µl

[343] We add 2 μ l of 3 M sodium acetate (pH 5.5), then add 60 μ l of ethanol, centrifuge, dry lightly, and resuspend in the $\sim$ 17 μ l of Cy5 probe. If the array requires approximately 40 μ l of probe, then the Cy3 and Cy5 concentrates are pooled and the blockers are added directly, so no precipitation is required.

[344] Then, we add 3 μ l of 20X SSC per 20 μ l of hybridization mix volume. At this point, we optionally add 1 μ l of 50X Denhardt's blocking solution per 20 μ l of hybridization mix. With very clean probe, the Denhardt's does not make any visible difference.

[345] Then, we heat at 98° C for 2 minutes, cool to 45° C and add 0.2 μ l of 10% SDS per 20 μ l of hybridization mix volume, then apply to the array, and hybridize (16-24) hours at 65° C in a sealed, humidified chamber.

[346] *Washing.* Residual unbound probe is removed from the slides by washing 2-5 minutes each at room temperature. The first wash is 0.5X SSC, 0.01%SDS. The second wash is 0.06X SSC. Air drying of the slides after this step can leave a fluorescent haze on the slide surface, so buffer is removed from the slides by a brief spin at low G. We place the slides in a slide holder and spin in a centrifuge equipped with a swinging carrier (horizontal) which can hold the slide holder. Most centrifuges that are adaptable to centrifuging microtiter plates can be used for this purpose

[347] The foregoing description has been presented only for the purposes of illustration and is not intended to limit the invention to the precise form disclosed, but by the claims appended hereto.

WO 02/12447

89

PCT/US01/24243

CLAIMS

1. An isolated solid tumor stem cell, wherein:
 - (a) the solid tumor stem cell is derived from a solid tumor;
 - (b) the solid tumor stem cell expresses the cell surface marker CD44;
 - (c) the solid tumor stem cell expresses lower levels of the marker CD24 than the mean expression of CD24 by non-tumorigenic cancer cells derived from the solid tumor; and
 - (d) the solid tumor stem cell is tumorigenic.
2. The isolated solid tumor stem cell of claim 1, further wherein:
 - (e) the solid tumor stem cell expresses the cell surface marker B38.1.
3. The isolated solid tumor stem cell of claim 1, wherein the solid tumor stem cell does not express detectable levels of one or more LINEAGE markers, wherein a LINEAGE marker is selected from the group consisting of CD2, CD3, CD14, CD16, and CD64.
4. The isolated solid tumor stem cell of claim 3, wherein the solid tumor stem cell does not express detectable levels LINEAGE markers, wherein the LINEAGE marker comprise CD2, CD3, CD14, CD16, and CD64.
5. The isolated solid tumor stem cell of claim 1, further wherein:
 - (e) the solid tumor stem cell expresses the cell surface marker epithelial specific antigen (ESA).
6. The isolated solid tumor stem cell of claim 4, wherein the LINEAGE markers further comprise CD10, CD31, and CD140b.
7. The isolated solid tumor stem cell of claim 1, wherein the solid tumor is a sarcoma cell or an epithelial cancer.
8. The isolated solid tumor stem cell of claim 1, wherein the epithelial cancer is a breast cancer or an ovarian cancer.

WO 02/12447

PCT/US01/24243

90

9. The isolated solid tumor stem cell of claim 1, wherein the solid tumor stem cell contains a polynucleotide vector.
10. The isolated solid tumor stem cell of claim 9, wherein the polynucleotide vector is a viral vector or a plasmid.
11. The isolated solid tumor stem cell of claim 9, wherein the polynucleotide vector contains a reporter polynucleotide.
12. The isolated solid tumor stem cell of claim 11, wherein the reporter polynucleotide is provides a detectable signal when active in a solid tumor stem cell.
13. The isolated solid tumor stem cell of claim 1, wherein the solid tumor stem cell further comprises a recombinant polynucleotide.
14. The isolated solid tumor stem cell of claim 13, wherein the recombinant polynucleotide is integrated into a chromosome of the solid tumor stem cell.
15. The isolated solid tumor stem cell of claim 1, wherein the solid tumor stem cell is introduced into a host mammal.
16. The isolated solid tumor stem cell of claim 15, wherein the solid tumor stem cell forms a new tumor upon transplantation into the host animal.
17. The isolated solid tumor stem cell of claim 15, wherein the host animal is an immunocompromised mouse.
18. The isolated solid tumor stem cell of claim 1, further comprising a culture medium, in which culture medium the solid tumor stem cell is situated.
19. The isolated solid tumor stem cell of claim 18, wherein the culture medium comprises a Notch ligand.

WO 02/12447

PCT/US01/24243

91

20. The isolated solid tumor stem cell of claim 1, wherein the solid tumor stem cell is affixed to a substrate.
21. The isolated solid tumor stem cell of claim 1, wherein the solid tumor stem cell has been treated to reduce proliferation.
22. The isolated solid tumor stem cell of claim 1, wherein the solid tumor stem cell has been treated to increase proliferation.
23. An enriched population of solid tumor stem cells, wherein:
 - (a) the tumor cells are derived from a solid tumor
 - (b) the solid tumor stem cell expresses the cell surface marker CD44;
 - (c) the solid tumor stem cell expresses lower levels of the marker CD24 than the mean expression of CD24 by non-tumorigenic cancer cells derived from the solid tumor;
 - (d) the solid tumor stem cell is tumorigenic; and
 - (e) the solid tumor stem cell population is enriched at least 2-fold relative to unfractionated tumor cells.
24. The enriched population of claim 23, wherein the solid tumor is a sarcoma or an epithelial cancer.
25. The enriched population of claim 23, wherein solid tumor stem cell expresses the cell surface marker B38.1.
26. The enriched population of claim 23, wherein solid tumor stem cell fails to express at least one lineage marker selected from the group consisting of CD2, CD3, CD14, CD16, CD45 and CD64.
27. The enriched population of claim 23, wherein the enrichment is in the ability to form new tumors relative to unfractionated tumor cells.
28. The enriched population of claim 23, wherein the population is at least 5-fold enriched.

WO 02/12447

PCT/US01/24243

92

29. The enriched population of claim 23, wherein the population is at least 10-fold enriched.
30. The enriched population of claim 23, wherein the population is at least 50-fold enriched.
31. A population of cells that have been enriched for non-tumorigenic solid tumor cells, wherein:
 - (a) the population is derived from a solid tumor;
 - (b) the population is depleted for the ability to form tumors relative to unfractionated solid tumor cells; and
 - (c) the population is depleted for cells that expresses the cell surface marker CD44 relative to unfractionated solid tumor cells.
32. A method for enriching a population of cells for solid tumor stem cells, comprising the steps of:
 - (a) dissociating a solid tumor to form a cell suspension;
 - (b) contacting the dissociated cells with at least one reagent, wherein the reagent either selectively binds to a solid tumor stem cell positive marker or negative marker; and
 - (c) selecting cells that bind to the reagent that selectively binds to a positive marker and/or that do not bind to the reagent that selectively binds to a negative marker, wherein the selected cells are enriched in tumor stem cells as compared with the unfractionated population of solid tumor cells.
33. The method of claim 32, wherein the solid tumor is a sarcoma or epithelial cancer.
34. The method of claim 32, wherein the reagent is an antibody or a lectin.
35. The method of claim 32, wherein the reagent is conjugated to a fluorochrome or to magnetic particles.
36. The method of claim 32, wherein the solid tumor stem cell positive marker is a marker selected from the group consisting of CD44, B38.1 and ESA.

WO 02/12447

PCT/US01/24243

93

37. The method of claim 32, wherein the solid tumor stem cell negative marker is a marker selected from the group consisting of CD2, CD3, CD14, CD16, and CD64.
38. The method of claim 32, wherein the cell selection is performed is by flow cytometry, fluorescence activated cell sorting, panning, affinity column separation, and/or magnetic selection.
39. The method of claim 32, wherein the steps of contacting and selecting comprise:
- (a) contacting a population of cells containing a solid tumor stem cell with a combination of reagents, wherein each reagent in the combination either selectively binds to either a solid tumor stem cell positive marker or negative marker and
 - (b) selecting cells that bind to reagents that selectively bind to the positive marker or that do not bind to reagents that selectively bind to the negative marker or a combination thereof, wherein the selected cells are enriched in tumor stem cells as compared with the population of unfractionated cells.
40. The method of claim 32, further comprising the step of:
- (e) isolating the proliferated solid tumor stem cell.
41. The method of claim 32, further comprising the steps of:
- (d) introducing at least one selected cell to a culture medium that supports the growth of tumor stem cells; and
 - (e) proliferating the selected cell in the culture medium.
42. The method of claim 41, further comprising the step of:
- (f) introducing the proliferated cell into a host mammal.
43. The method of claim 41, further comprising the steps of:
- (f) contacting the proliferated cell with a test compound; and
 - (g) determining the effect of the test compound on the proliferated cell.
44. The method of claim 41, further comprising the steps of:
- (f) mixing a population of non-tumorigenic tumor cells with the solid tumor stem

WO 02/12447

PCT/US01/24243

94

cells in culture, wherein the population of non-tumorigenic tumor cells

- (i) is derived from a solid tumor;
- (ii) is depleted for the ability to form tumors relative to unfractionated solid tumor cells; and
- (iii) is depleted for cells that expresses the cell surface marker CD44 relative to unfractionated solid tumor cells.

45. The method of claim 44, further comprising the steps of :
- (g) transplanting the mixture into a host animal.
46. The method of claim 44, further comprising the steps of:
- (g) analyzing the mixture for an increase or decrease the ability of the solid tumor stem cells to survive or proliferate.
47. A method for stimulating an immune response to a solid tumor stem cell, comprising the steps of:
- (a) obtaining an enriched population of solid tumor stem cells; wherein
 - (i) the tumor cells are derived from a solid tumor;
 - (ii) the solid tumor stem cell expresses the cell surface marker CD44;
 - (iii) the solid tumor stem cell expresses lower levels of the marker CD24 than the mean expression of CD24 by non-tumorigenic cancer cells derived from the solid tumor;
 - (iv) the solid tumor stem cell is tumorigenic; and
 - (v) the solid tumor stem cell population is enriched 2-fold relative to unfractionated tumor cells;
 - (b) treating the population to prevent cell replication; and
 - (c) administering the treated cell to a human or animal subject in an amount effective for inducing an immune response to solid tumor stem cells.
48. The method of claim 47, wherein the enriched population of solid tumor stem cells is an isolated solid tumor stem cell.
49. The method of claim 47, wherein the treatment kills the solid tumor stem cell.

WO 02/12447

95

PCT/US01/24243

50. The method of claim 47, wherein the administration is by injection or by oral administration.
51. The method of claim 47, wherein the solid tumor stem cell expresses the cell surface marker B38.1.
52. The method of claim 47, wherein the solid tumor stem cell fails to express at least one lineage marker selected from the group consisting of CD2, CD3, CD14, CD16, CD45 and CD64.
53. The method of claim 47, further comprising the step of:
 - (d) obtaining antibodies or antibody secreting hybridomas from the human or animal subject.
54. The method of claim 53, further comprising the step of:
 - (e) testing the obtained antibody for the ability to specifically bind to solid tumor stem cells.
55. The method of claim 53, further comprising the step of:
 - (e) testing the obtained antibody for the ability to bind to a polypeptide present on solid tumor stem cells.
56. The method of claim 53, further comprising the step of:
 - (e) immunologically identifying a polypeptide present on solid tumor stem cells.
57. The method of claim 53, further comprising the step of:
 - (e) immunologically identifying a polynucleotide encoding a polypeptide present on solid tumor stem cells.
58. The method of claim 53, further comprising the step of:
 - (e) testing the obtained antibody for the ability to reduce tumor growth.

59. A method for stimulating an immune response to a solid tumor stem cell, comprising the steps of:
- (a) obtaining an enriched population of solid tumor stem cells; wherein
 - (i) the tumor cells are derived from a solid tumor;
 - (ii) the solid tumor stem cell expresses the cell surface marker CD44;
 - (iii) the solid tumor stem cell expresses lower levels of the marker CD24 than the mean expression of CD24 by non-tumorigenic cancer cells derived from the solid tumor;
 - (iv) the solid tumor stem cell is tumorigenic; and
 - (v) the solid tumor stem cell population is enriched 2-fold relative to unfractionated tumor cells;
 - (b) mixing the tumor stem cells in an *in vitro* culture with immune effector cells;
 - (c) removing the immune effector cells from the culture; and
 - (d) transplanting the immune effector cells into a host animal in a dose that is effective to stimulate an immune response in the animal.
60. The method of claim 59, wherein the solid tumor expresses the cell surface marker B38.1.
61. The method of claim 59, wherein the solid tumor fails to express at least one lineage marker selected from the group consisting of CD2, CD3, CD14, CD16, CD45 and CD64.
62. A purified population of polynucleotides, wherein the polynucleotides have been purified from an enriched population of solid tumor stem cells, wherein:
- (a) the tumor cells are derived from a solid tumor
 - (b) the solid tumor stem cell expresses the cell surface marker CD44;
 - (c) the solid tumor stem cell expresses lower levels of the marker CD24 than the mean expression of CD24 by non-tumorigenic cancer cells derived from the solid tumor;
 - (d) the solid tumor stem cell is tumorigenic; and
 - (e) the solid tumor stem cell population is enriched at least 2-fold relative to unfractionated tumor cells.

WO 02/12447

PCT/US01/24243

97

63. The polynucleotide population of claim 63, wherein the solid tumor is a sarcoma or an epithelial cancer.
64. The polynucleotide population of claim 63, wherein the enriched population of solid tumor stem cells is an isolated solid tumor stem cell.
65. The polynucleotide population of claim 63, wherein solid tumor stem cell expresses the cell surface marker B38.1.
66. The polynucleotide population of claim 63, wherein the solid tumor fails to express at least one lineage marker selected from the group consisting of CD2, CD3, CD14, CD16, CD45 and CD64.
67. The polynucleotide population of claim 63, wherein the polynucleotides are affixed to a solid surface.
68. The polynucleotide population of claim 67, wherein the polynucleotides are affixed to the solid surface in an orderly array.
69. The polynucleotide population of claim 68, wherein the orderly array is a microarray.
70. The polynucleotide population of claim 63, wherein the polynucleotides are in a cDNA library.
71. The polynucleotide population of claim 63, wherein the polynucleotides have been amplified.
72. The polynucleotide population of claim 63, wherein the polynucleotides are labeled.
73. The polynucleotide population of claim 63, wherein the polynucleotides are used as a hybridization probe.
74. The polynucleotide population of claim 73, further comprising a microarray of polynucleotide sequences.

75. A purified population of polypeptides, wherein the polypeptides have been purified from an enriched population of solid tumor stem cells, wherein:
- (a) the tumor cells are derived from a solid tumor
 - (b) the solid tumor stem cell expresses the cell surface marker CD44;
 - (c) the solid tumor stem cell expresses lower levels of the marker CD24 than the mean expression of CD24 by non-tumorigenic cancer cells derived from the solid tumor;
 - (d) the solid tumor stem cell is tumorigenic; and
 - (e) the solid tumor stem cell population is enriched at least 2-fold relative to unfractionated tumor cells.
76. The polypeptide population of claim 75, wherein the solid tumor is a sarcoma or an epithelial cancer.
77. The polypeptide population of claim 75, wherein the solid tumor stem cells expresses the cell surface marker B38.1.
78. The polypeptide population of claim 75, wherein the solid tumor fails to express at least one lineage marker selected from the group consisting of CD2, CD3, CD14, CD16, CD45 and CD64.
79. The polypeptide population of claim 75, wherein the enriched population of solid tumor stem cells is an isolated solid tumor stem cell.
80. The polypeptide population of claim 75, wherein the polypeptides are affixed to a solid surface.
81. The polypeptide population of claim 75, wherein the polypeptides are affixed to the solid surface in an orderly array.
82. The polypeptide population of claim 81, wherein the orderly array is a microarray.
83. The polypeptide population of claim 75, wherein the polypeptides are labeled.

84. The polypeptide population of claim 75, wherein the polypeptides are used as a probe.
85. The polypeptide population of claim 84, further comprising a microarray of components, wherein the components are selected from the group consisting of cells, polynucleotides, polypeptides, and test compounds.
86. A method for analyzing a population of cells enriched for solid tumor stem cells for gene expression patterns, comprising the steps of:
- (a) obtaining an population of cells enriched for solid tumor stem cells; wherein
 - (i) the tumor cells are derived from a solid tumor;
 - (ii) the solid tumor stem cell expresses the cell surface marker CD44;
 - (iii) the solid tumor stem cell expresses lower levels of the marker CD24 than the mean expression of CD24 by non-tumorigenic cancer cells derived from the solid tumor;
 - (iv) the solid tumor stem cell is tumorigenic; and
 - (v) the solid tumor stem cell population is enriched at least 2-fold relative to unfractionated tumor cells; and
 - (b) analyzing the population of cells for gene expression patterns.
87. The method of claim 86, wherein the analysis is by a method selected from the group consisting of resequencing, high throughput screening, use of a microarray, use of analytical software for data collection and storage, use of analytical software for flexible formatting of data output, use of analytical software for statistical analysis of individual spot intensities to provide grouping and cluster analyses, and use of analytical software for linkage to external databases.
88. The method of claim 86, wherein the solid tumor is a sarcoma or an epithelial cancer.
89. The method of claim 86, wherein the solid tumor stem cell expresses the cell surface marker B38.1.

WO 02/12447

PCT/US01/24243

100

90. The method of claim 86, wherein the solid tumor stem cell fails to express at least one lineage marker selected from the group consisting of CD2, CD3, CD14, CD16, CD45 and CD64.
91. The method of claim 86, wherein the enriched population of solid tumor stem cells is an isolated solid tumor stem cell.
92. A method for analyzing a population of cells enriched for solid tumor stem cells for protein expression patterns, comprising the steps of:
- (a) obtaining an population of cells enriched for solid tumor stem cells; wherein
 - (i) the tumor cells are derived from a solid tumor;
 - (ii) the solid tumor stem cell expresses the cell surface marker CD44;
 - (iii) the solid tumor stem cell expresses lower levels of the marker CD24 than the mean expression of CD24 by non-tumorigenic cancer cells derived from the solid tumor;
 - (iv) the solid tumor stem cell is tumorigenic; and
 - (v) the solid tumor stem cell population is enriched at least 2-fold relative to unfractionated tumor cells; and
 - (b) analyzing the population of cells for protein expression patterns.
93. The method of claim 92, wherein the analysis is by a method selected from the group consisting of mass spectrometry, high throughput screening, use of a microarray, use of analytical software for data collection and storage, use of analytical software for flexible formatting of data output, use of analytical software for statistical analysis of individual spot intensities to provide grouping and cluster analyses, and use of analytical software for linkage to external databases.
94. The method of claim 92, wherein the solid tumor is a sarcoma or an epithelial cancer.
95. The method of claim 92, wherein the solid tumor stem cell expresses the cell surface marker B38.1.

WO 02/12447

PCT/US01/24243

101

96. The method of claim 92, wherein the solid tumor stem cell fails to express at least one lineage marker selected from the group consisting of CD2, CD3, CD14, CD16, CD45 and CD64.
97. The method of claim 92, wherein the enriched population of solid tumor stem cells is an isolated solid tumor stem cell.
98. A method for determining the effect of a test compound on a solid tumor stem cell, comprising the steps of:
- (a) obtaining an enriched population of solid tumor stem cells, wherein;
 - (i) the tumor cells are derived from a solid tumor;
 - (ii) the solid tumor stem cell expresses the cell surface marker CD44;
 - (iii) the solid tumor stem cell expresses lower levels of the marker CD24 than the mean expression of CD24 by non-tumorigenic cancer cells derived from the solid tumor;
 - (iv) the solid tumor stem cell is tumorigenic; and
 - (v) the solid tumor stem cell population is enriched 2-fold relative to unfractionated tumor cells;
 - (b) contacting the obtained cells with the test compound; and
 - (c) determining the response of the contacted cells to the test compound.
99. The method of claim 98, wherein the solid tumor is a sarcoma or an epithelial cancer.
100. The method of claim 98, wherein the solid tumor stem cell expresses the cell surface marker B38.1.
101. The method of claim 98, wherein the solid tumor stem cell fails to express at least one lineage marker selected from the group consisting of CD2, CD3, CD14, CD16, CD45 and CD64.
102. The method of claim 98, wherein the enriched population of solid tumor stem cells is an isolated solid tumor stem cell.

WO 02/12447

PCT/US01/24243

102

103. The method of claim 98, wherein the solid tumor stem cells are localized in a manner selected from the group consisting of in monolayers in culture, in suspension in culture, and affixed to a solid surface.
104. The method of claim 98, wherein the contacting is effected at more than one concentration of the test compound being tested.
105. The method of claim 98, wherein the contacting is effected using microfluidic methods.
106. The method of claim 98, wherein the determination of the response of the contacted cells to the test compound comprises assaying for an effect selected from the group consisting of tumor formation, tumor growth, tumor stem cell proliferation, tumor cell survival, tumor cell cycle status, and tumor stem cell survival.
107. The method of claim 98, wherein the test compound is attached to a solid surface.
108. The method of claim 107, wherein the test compound is attached to a solid surface as a microarray.
109. The method of claim 98, wherein the test compound is in a set of other molecules.
110. The method of claim 98, wherein the test compound is in an array of other molecules.
111. The method of claim 98, further comprising the step of:
 - (d) identifying the target in the contacted cells with which the test compound interacts.

WO 02/12447

PCT/US01/24243

103

112. A method for determining the effect of a test compound on a solid tumor stem cell, comprising the steps of:
- (a) obtaining an enriched population of solid tumor stem cells, wherein:
 - (i) the tumor cells are derived from a solid tumor;
 - (ii) the solid tumor stem cell expresses the cell surface marker CD44;
 - (iii) the solid tumor stem cell expresses lower levels of the marker CD24 than the mean expression of CD24 by non-tumorigenic cancer cells derived from the solid tumor;
 - (iv) the solid tumor stem cell is tumorigenic; and
 - (v) the solid tumor stem cell population is enriched at least 2-fold relative to unfractionated tumor cells;
 - (b) transplanting the obtained cells into an immunocompromised mouse;
 - (c) administering a test compound to the immunocompromised mouse; and
 - (d) determining the response of the transplanted solid tumor stem cells to the test compound.
113. The method of claim 112, wherein the solid tumor is a sarcoma or an epithelial cancer.
114. The method of claim 112, wherein the solid tumor stem cell expresses the cell surface marker B38.1.
115. The method of claim 112, wherein the solid tumor stem cell fails to express at least one lineage marker selected from the group consisting of CD2, CD3, CD14, CD16, CD45 and CD64.
116. The method of claim 112, wherein the enriched population of solid tumor stem cells is an isolated solid tumor stem cell.

WO 02/12447

PCT/US01/24243

104

117. A method for screening for a test compound that specifically binds to a solid tumor stem cell, comprising the steps of:
- (a) obtaining an enriched population of solid tumor stem cells, wherein:
 - (i) the tumor cells are derived from a solid tumor;
 - (ii) the solid tumor stem cell expresses the cell surface marker CD44;
 - (iii) the solid tumor stem cell expresses lower levels of the marker CD24 than the mean expression of CD24 by non-tumorigenic cancer cells derived from the solid tumor;
 - (iv) the solid tumor stem cell is tumorigenic; and
 - (v) the solid tumor stem cell population is enriched at least 2-fold relative to unfractionated tumor cells;
 - (b) contacting the enriched population of solid tumor stem cells with a test compound under conditions suitable to allow complex formation; and
 - (c) detecting complex formation between the test compound and a solid tumor stem cell, wherein the presence of the complex identifies the test compound as specifically binding the tumor stem cell.
118. The method of claim 117, wherein the solid tumor is a sarcoma or an epithelial cancer.
119. The method of claim 117, wherein the enriched population of solid tumor stem cells is an isolated solid tumor stem cell.
120. The method of claim 117, wherein the solid tumor stem cell expresses the cell surface marker B38.1.
121. The method of claim 117, wherein the solid tumor stem cell fails to express at least one lineage marker selected from the group consisting of CD2, CD3, CD14, CD16, CD45 and CD64.

WO 02/12447

PCT/US01/24243

105

122. A method for diagnosing the presence of solid tumor stem cells, comprising the steps of:
- (a) contacting the cells from a solid tumor with a reagent that binds to a positive marker for solid tumor stem cells; and
 - (b) detecting the contact between the reagent and the cells from the solid tumor, wherein an increased detection of the number of contacted cells as compared with the number of contacted cells in a benign tumor identifies the tumor as containing solid tumor stem cells.
123. The method of claim 122, wherein the detection is by flow-cytometry or immunohistochemistry.
124. The method of claim 122, wherein the solid tumor is a sarcoma or an epithelial cancer.
125. The method of claim 122, wherein the positive marker is a marker selected from the group consisting of CD44, B38.1 and ESA.
126. An *in vitro* method for the proliferation of a tumor stem cells, comprising the steps of:
- (a) obtaining an enriched population of solid tumor stem cells, wherein:
 - (i) the tumor cells are derived from a solid tumor;
 - (ii) the solid tumor stem cell expresses the cell surface marker CD44;
 - (iii) the solid tumor stem cell expresses lower levels of the marker CD24 than the mean expression of CD24 by non-tumorigenic cancer cells derived from the solid tumor;
 - (iv) the solid tumor stem cell is tumorigenic; and
 - (v) the solid tumor stem cell population is enriched 2-fold relative to unfractionated tumor cells; and
 - (b) proliferating the obtained cells in a culture medium.
127. The method of claim 126, wherein the solid tumor is a sarcoma or an epithelial cancer.
128. The method of claim 126, wherein the solid tumor stem cell expresses the cell surface marker B38.1.

WO 02/12447

PCT/US01/24243

106

129. The method of claim 126, wherein the solid tumor stem cell fails to express a marker selected from the group consisting of CD2, CD3, CD14, CD16, CD45 and CD64.
130. The method of claim 126, wherein the enriched population of solid tumor stem cells is an isolated solid tumor stem cell.
131. An *in vivo* method for the proliferation of a tumor stem cells, comprising the steps of:
- (a) obtaining an enriched population of solid tumor stem cells, wherein;
 - (i) the tumor cells are derived from a solid tumor;
 - (ii) the solid tumor stem cell expresses the cell surface marker CD44;
 - (iii) the solid tumor stem cell expresses lower levels of the marker CD24 than the mean expression of CD24 by non-tumorigenic cancer cells derived from the solid tumor;
 - (iv) the solid tumor stem cell is tumorigenic; and
 - (v) the solid tumor stem cell population is enriched at least 2-fold relative to unfractionated tumor cells; and
 - (b) transplanting the isolated cell into a host mammal under conditions that allow the proliferation of solid tumor stem cells in the host mammal.
132. The method of claim 131, wherein the solid tumor is a sarcoma or an epithelial cancer.
133. The method of claim 131, wherein the solid tumor stem cell expresses the cell surface marker B38.1.
134. The method of claim 131, wherein the solid tumor stem cell fails to express a marker selected from the group consisting of CD2, CD3, CD14, CD16, CD45 and CD64.
135. The method of claim 131, wherein the enriched population of solid tumor stem cells is an isolated solid tumor stem cell.
136. The method of claim 131, further comprising the step of:
- (c) isolating the proliferated tumor cells from the host mammal.

137. A method for producing genetically modified tumor stem cells, comprising the steps of:
- (a) obtaining an enriched population of solid tumor stem cells, wherein;
 - (i) the tumor cells are derived from a solid tumor;
 - (ii) the solid tumor stem cell expresses the cell surface marker CD44;
 - (iii) the solid tumor stem cell expresses lower levels of the marker CD24 than the mean expression of CD24 by non-tumorigenic cancer cells derived from the solid tumor;
 - (iv) the solid tumor stem cell is tumorigenic; and
 - (v) the solid tumor stem cell population is enriched at least 2-fold relative to unfractionated tumor cells; and
 - (b) genetically modifying the obtained cells.
138. The method of claim 137, wherein the solid tumor is a sarcoma or an epithelial cancer.
139. The method of claim 137, wherein the solid tumor stem cell expresses the cell surface marker B38.1.
140. The method of claim 137, wherein the solid tumor stem cell fails to express a marker selected from the group consisting of CD2, CD3, CD14, CD16, CD45 and CD64.
141. The method of claim 137, wherein the enriched population of solid tumor stem cells is an isolated solid tumor stem cell.
142. The method of claim 137, in which the genetic modification is performed *in vitro*.
143. The method of claim 142, in which the genetic modification is performed *in vivo*.
144. The method of claim 137, wherein the genetic modification is the introduction of a plasmid into the solid tumor stem cell.
145. The method of claim 137, wherein the genetic modification is the introduction of a viral vector into the solid tumor stem cell.

WO 02/12447

PCT/US01/24243

108

146. The method of claim 137, in which the virus has been modified to express a protein that recognizes an antigen on the solid tumor stem cell, thus specifically targeting the virus to solid tumor stem cell.
147. The method of claim 137, further comprising the step of:
- (c) examining the effect of the genetic modification on tumor formation, tumor growth, tumor cell proliferation, tumor cell survival, tumor stem cell survival, tumor stem cell proliferation, tumor cell cycle status, and tumor stem cell frequency.
148. An *in vivo* method for proliferating a population of cancer cells, comprising:
- (a) introducing an enriched population of solid tumor stem cells into an immunocompromised mouse; wherein:
 - (i) the tumor cells are derived from a solid tumor;
 - (ii) the solid tumor stem cell expresses the cell surface marker CD44;
 - (iii) the solid tumor stem cell expresses lower levels of the marker CD24 than the mean expression of CD24 by non-tumorigenic cancer cells derived from the solid tumor;
 - (iv) the solid tumor stem cell is tumorigenic; and
 - (v) the solid tumor stem cell population is enriched 2-fold relative to unfractionated tumor cells; and
 - (b) proliferating the solid tumor stem cells in the mouse; and
 - (c) purifying the proliferated solid tumor stem cells from the mouse.
149. The method of claim 148, wherein the solid tumor is a sarcoma or an epithelial cancer.
150. The method of claim 148, wherein the solid tumor stem cell expresses the cell surface marker B38.1.
151. The method of claim 148, wherein the solid tumor stem cell fails to express a marker selected from the group consisting of CD2, CD3, CD14, CD16, CD45 and CD64.
152. The method of claim 148, wherein the enriched population of solid tumor stem cells is an isolated solid tumor stem cell.

WO 02/12447

PCT/US01/24243

109

153. The method of claim 148, wherein the mouse is a NOD/SCID mouse or a SCID/Beige mouse.
154. The method of claim 148, wherein the cells are introduced subcutaneously or into the mammary fat pad.
155. The method of claim 148, wherein tumors grow in the mammal in greater than 75% of the introductions.
156. The method of claim 148, wherein tumors grow in the mammal in greater than 90% of the introductions.
157. The method of claim 148, wherein the population of cells has been enriched at least 2-fold.
158. The method of claim 148, wherein the population of cells has been enriched at least 5-fold.
159. The method of claim 148, wherein the population of cells has been enriched at least 10-fold.
160. The method of claim 148, wherein the mice have been further immunosuppressed by a method selected from the group consisting of administration of VP16, radiation therapy and chemotherapy.
161. The method of claim 148, further comprising:
 - (d) isolating an enriched population of solid tumor stem cells from the proliferated cells
162. The method of claim 161, wherein the isolation comprises the use of flow-cytometry.

WO 02/12447

PCT/US01/24243

110

163. A method for growing a solid tumor stem cell from a solid tumor, comprising the steps of
- (a) separating the cells of the solid tumor;
 - (b) suspending the separated tumor cells in suspension; and
 - (c) introducing the suspended cell into a host mammal, such that the cancer stem cell in the introduced suspension forms a tumor in the host mammal.
164. The method of claim 163, wherein the solid tumor is a sarcoma or an epithelial cancer.
165. The method of claim 163, wherein the solid tumor stem cell expresses the cell surface marker B38.1.
166. The method of claim 163, wherein the solid tumor stem cell fails to express a marker selected from the group consisting of CD2, CD3, CD14, CD16, CD45 and CD64.
167. A tumor bank, comprising cells derived from a single tumor, wherein the tumor has been produced by the steps of:
- (a) introducing an enriched population of tumor stem cells into a host mammal; wherein
 - (i) the tumor cells are derived from a solid tumor;
 - (ii) the solid tumor stem cell expresses the cell surface marker CD44;
 - (iii) the solid tumor stem cell expresses lower levels of the marker CD24 than the mean expression of CD24 by non-tumorigenic cancer cells derived from the solid tumor;
 - (iv) the solid tumor stem cell is tumorigenic; and
 - (v) the solid tumor stem cell population is enriched at least 2-fold relative to unfractionated tumor cells;
 - (b) proliferating the introduced cells in the host mammal; and
 - (c) isolating the proliferated cells from the host mammal.
168. The tumor bank of claim 167, wherein the solid tumor is a sarcoma or an epithelial cancer.
169. The tumor bank of claim 167, wherein the solid tumor stem cell expresses the cell surface marker B38.1.

WO 02/12447

PCT/US01/24243

111

170. The tumor bank of claim 167, wherein the solid tumor stem cell fails to express a marker selected from the group consisting of CD2, CD3, CD14, CD16, CD45 and CD64.
171. The tumor bank of claim 167, wherein the enriched population of solid tumor stem cells is an isolated solid tumor stem cell.
172. A chimeric mammal, comprising:
- (a) the mammal; and
 - (b) an enriched population of solid tumor stem cells, wherein
 - (i) the tumor cells are derived from a solid tumor;
 - (ii) the solid tumor stem cell expresses the cell surface marker CD44;
 - (iii) the solid tumor stem cell expresses lower levels of the marker CD24 than the mean expression of CD24 by non-tumorigenic cancer cells derived from the solid tumor;
 - (iv) the solid tumor stem cell is tumorigenic; and
 - (v) the solid tumor stem cell population is enriched at least 2-fold relative to unfractionated tumor cells; and
 - (vi) the cells of the enriched population have been injected into the mammal.
173. The chimeric mammal of claim 172, wherein the solid tumor of (b)(iv) is a sarcoma or an epithelial cancer.
174. The chimeric mammal of claim 172, wherein the solid tumor stem cell expresses the cell surface marker B38.1.
175. The chimeric mammal of claim 172, wherein the solid tumor stem cell fails to express at least one lineage marker selected from the group consisting of CD2, CD3, CD14, CD16, CD45 and CD64.
176. The chimeric mammal of claim 172, wherein the enriched population of solid tumor stem cells is an isolated solid tumor stem cell.

WO 02/12447

112

PCT/US01/24243

177. The chimeric mammal of claim 172, wherein the mammal is an immunocompromised mouse.
178. An *in vivo* method for modeling a tumor treatment regime, comprising the steps of:
- (a) introducing an enriched population of solid tumor stem cells into an immunocompromised mouse under conditions that allow the solid tumor stem cells to proliferate to form a tumor; wherein
 - (i) the tumor cells are derived from a solid tumor;
 - (ii) the solid tumor stem cell expresses the cell surface marker CD44;
 - (iii) the solid tumor stem cell expresses lower levels of the marker CD24 than the mean expression of CD24 by non-tumorigenic cancer cells derived from the solid tumor;
 - (iv) the solid tumor stem cell is tumorigenic; and
 - (v) the solid tumor stem cell population is enriched at least 2-fold relative to unfractionated tumor cells; and
 - (b) testing the effects of treatment regimens on the solid tumor cells in the immunocompromised mouse by monitoring the effect of the treatment regimen.
179. The method of claim 178, wherein the solid tumor is a sarcoma or an epithelial cancer.
180. The method of claim 178, wherein the solid tumor stem cell expresses the cell surface marker B38.1.
181. The method of claim 178, wherein the solid tumor stem cell fails to express a marker selected from the group consisting of CD2, CD3, CD14, CD16, CD45 and CD64.
182. The method of claim 178, wherein the enriched population of solid tumor stem cells is an isolated solid tumor stem cell.
183. A method for reducing the size of a solid tumor, comprising contacting the cells of the solid tumor with a therapeutically effective amount of an antibody directed against a Notch protein.
184. The method of claim 183, wherein the antibody is directed against a Notch 4 polypeptide.

WO 02/12447

113

PCT/US01/24243

185. The method of claim 184, wherein the antibody is directed against the extracellular domain of Notch 4.

1/26

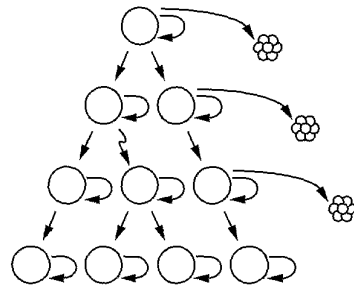


FIG. 1A

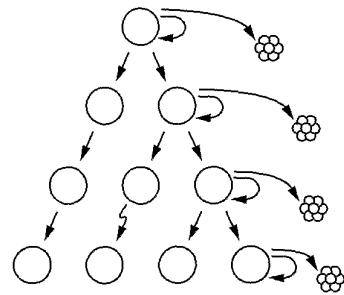


FIG. 1B

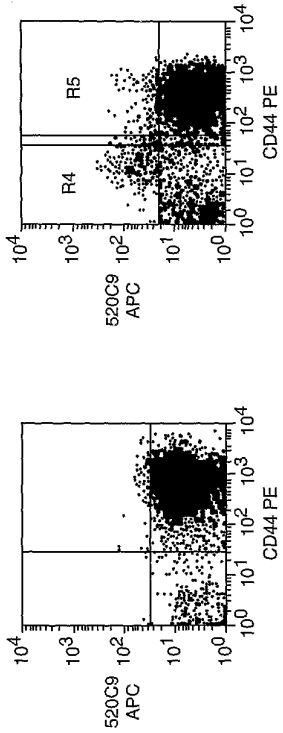


FIG. 2B

FIG. 2A

3/26

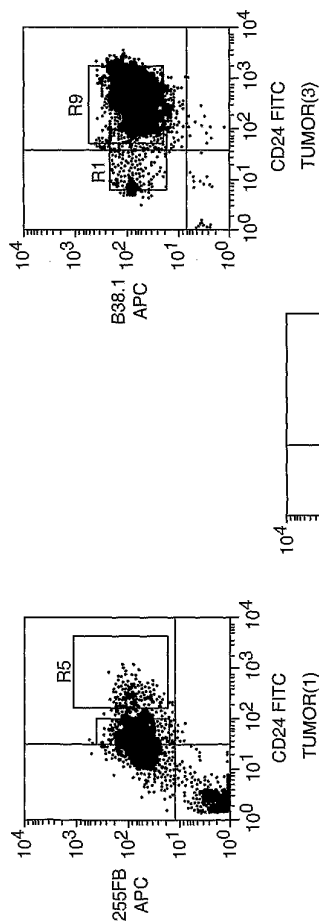


FIG. 3A

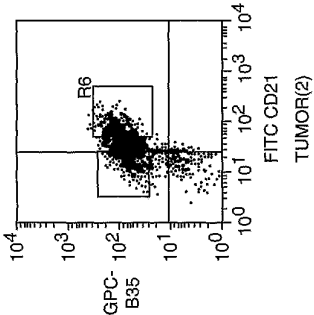


FIG. 3B

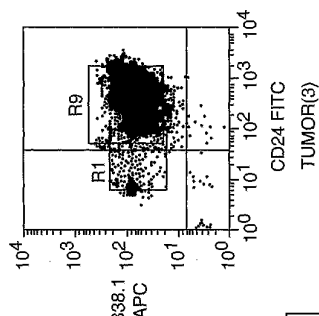


FIG. 3C

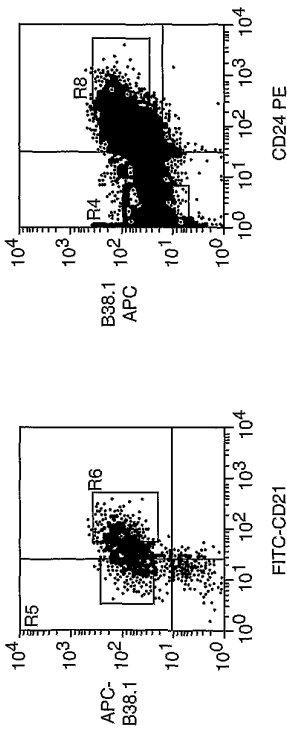


FIG. 4B

FIG. 4A

5/26

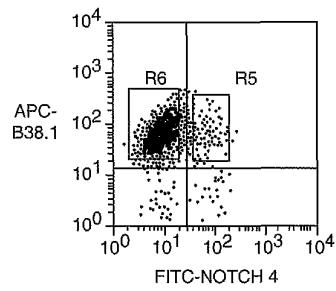


FIG. 5

WO 02/12447

PCT/US01/24243

6/26

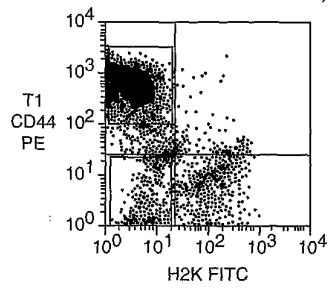


FIG. 6A

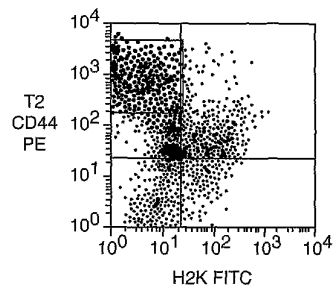


FIG. 6B

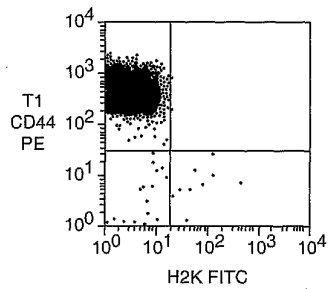


FIG. 6C

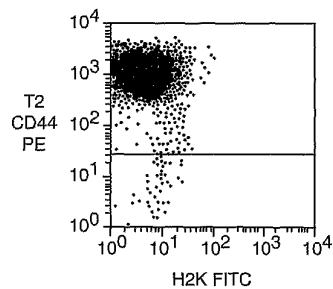


FIG. 6D

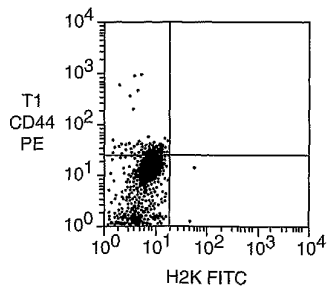


FIG. 6E

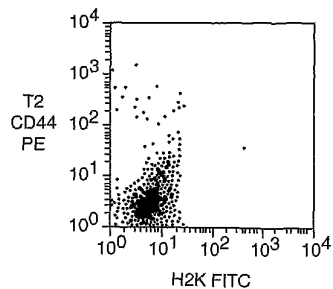


FIG. 6F

7/26

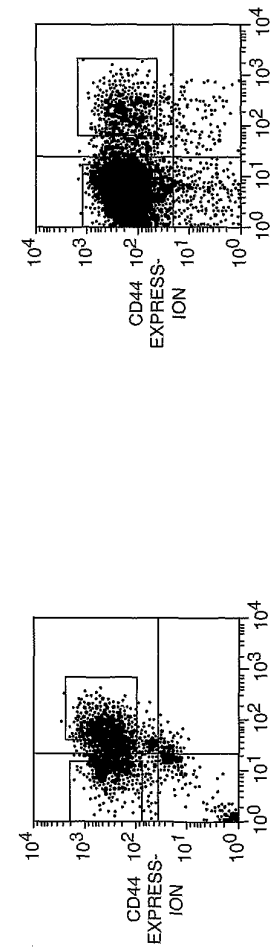


FIG. 7A

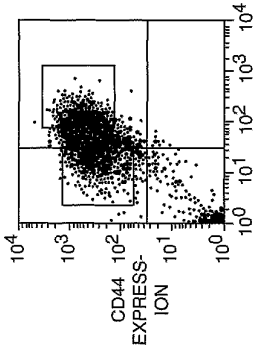


FIG. 7B

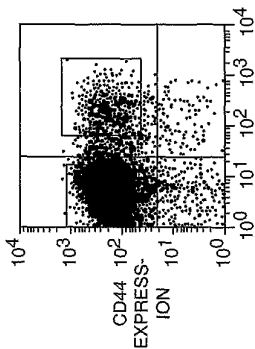


FIG. 7C

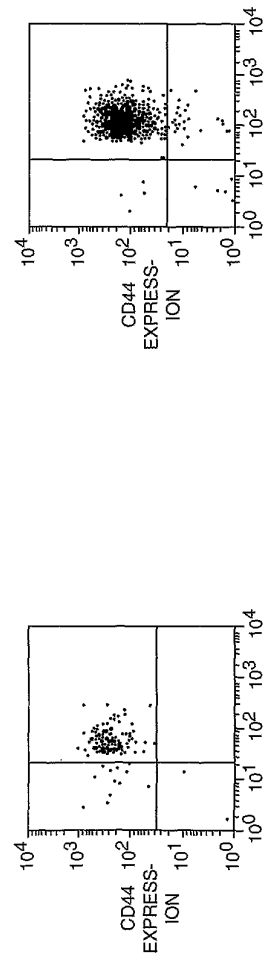


FIG. 7D

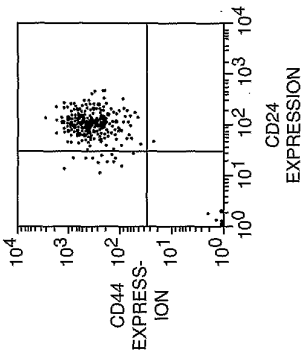


FIG. 7E

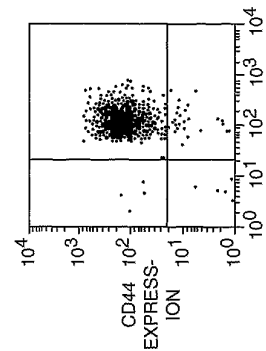
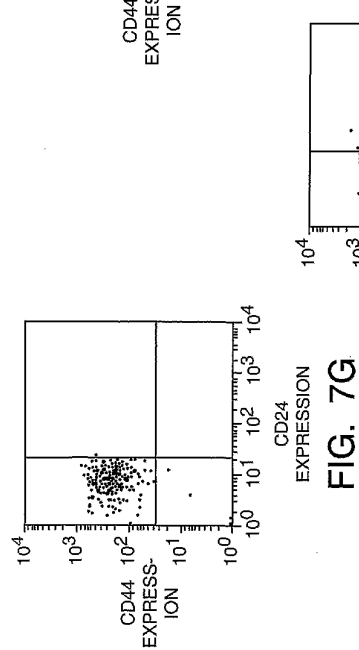
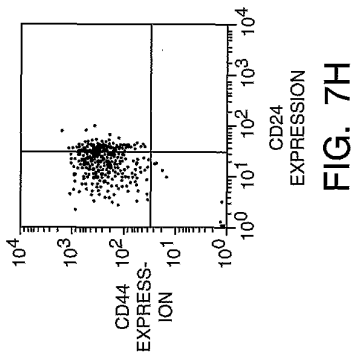
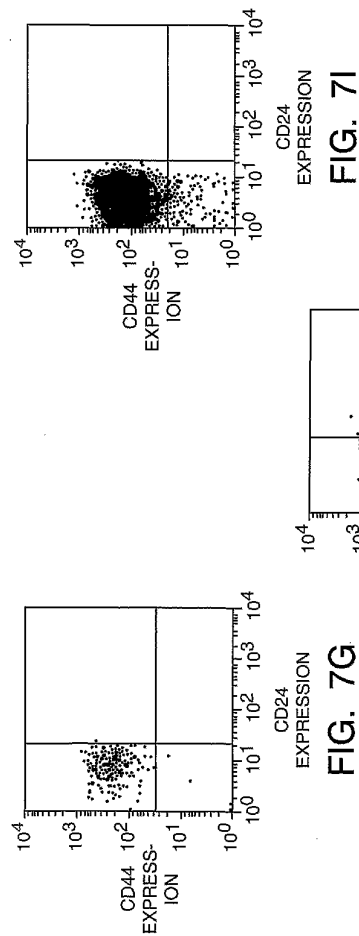


FIG. 7F



WO 02/12447

PCT/US01/24243

10/26

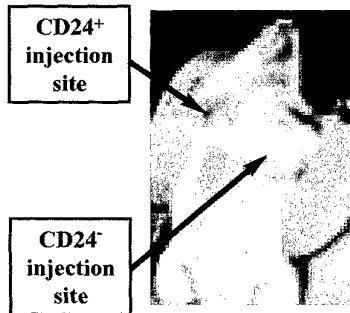


FIG.7J



FIG.7K



FIG.7L

WO 02/12447

PCT/US01/24243

11/26

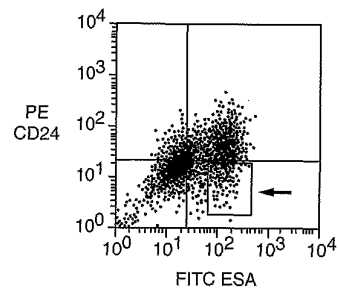
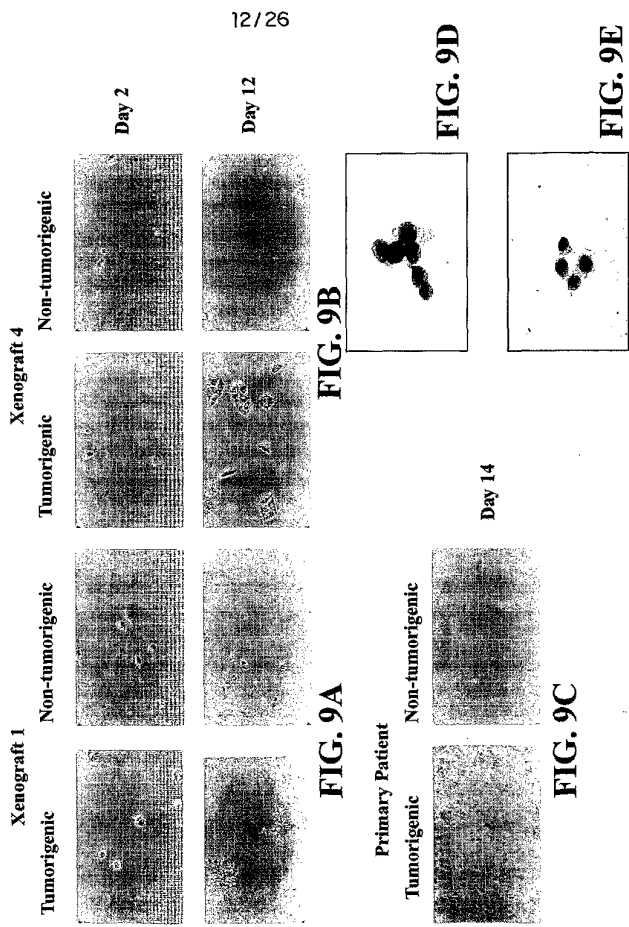


FIG. 8

WO 02/12447

PCT/US01/24243



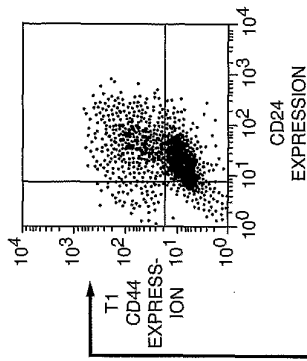


FIG. 10C

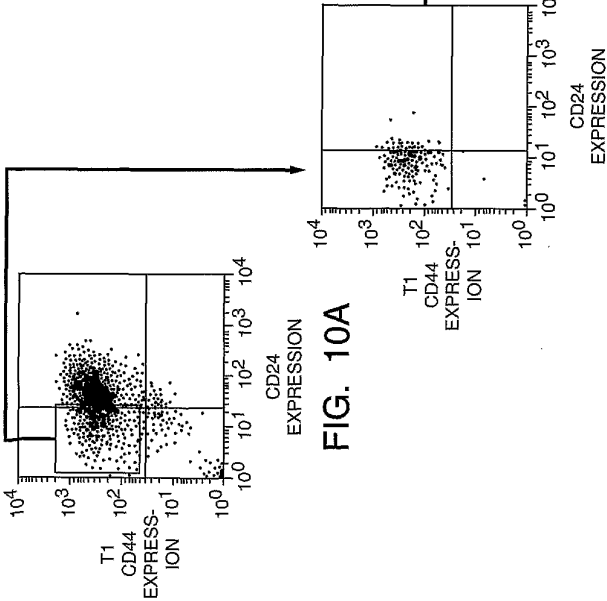
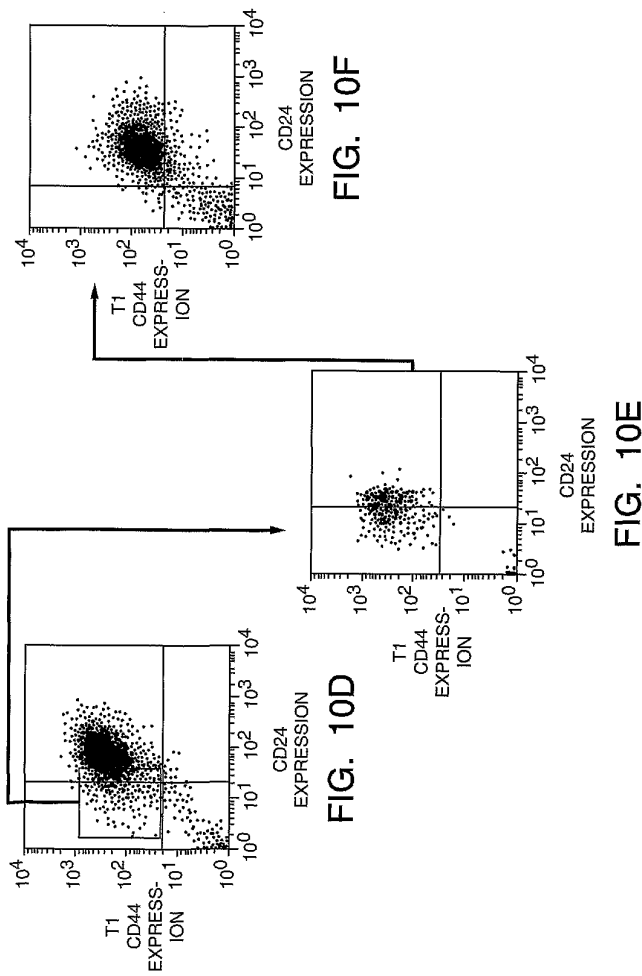


FIG. 10A

FIG. 10B



WO 02/12447

PCT/US01/24243

15/26

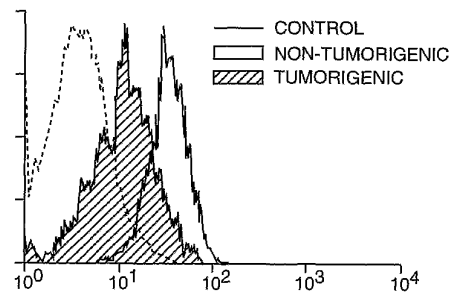


FIG. 11A

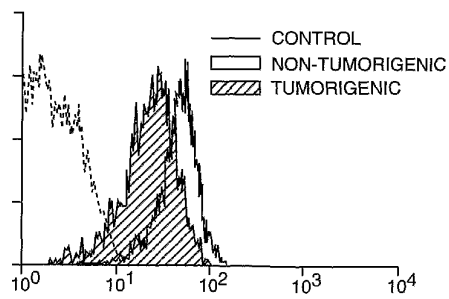
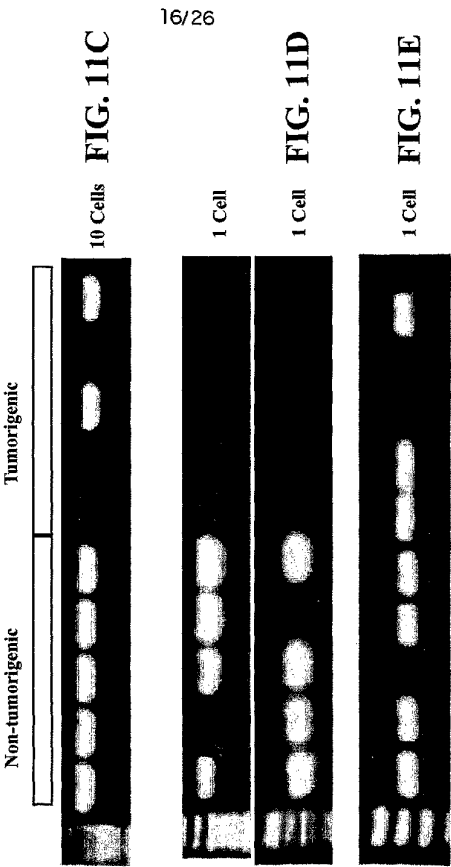


FIG. 11B

WO 02/12447

PCT/US01/24243



WO 02/12447

PCT/US01/24243

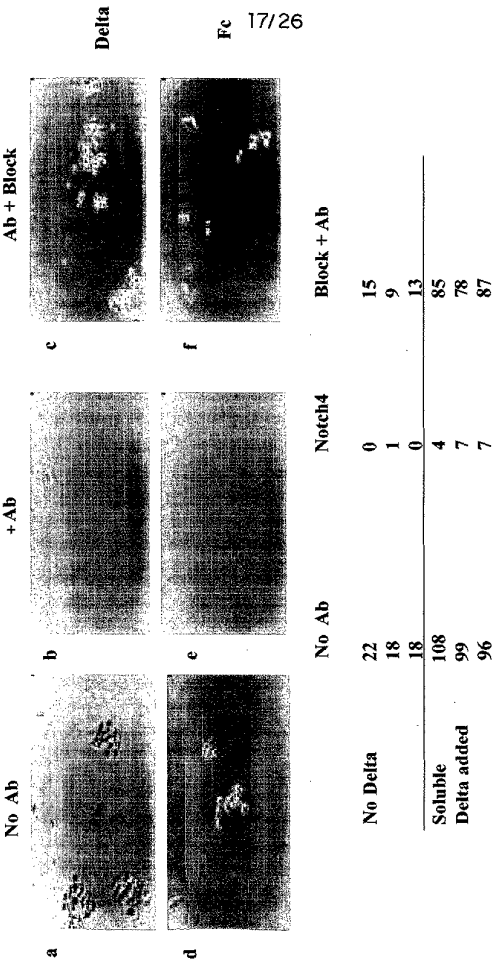


FIG. 12

WO 02/12447

PCT/US01/24243

18/26

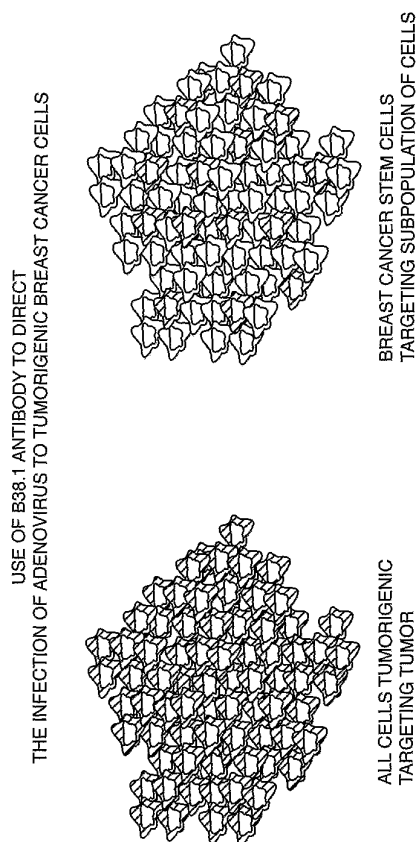


FIG. 13

19/26

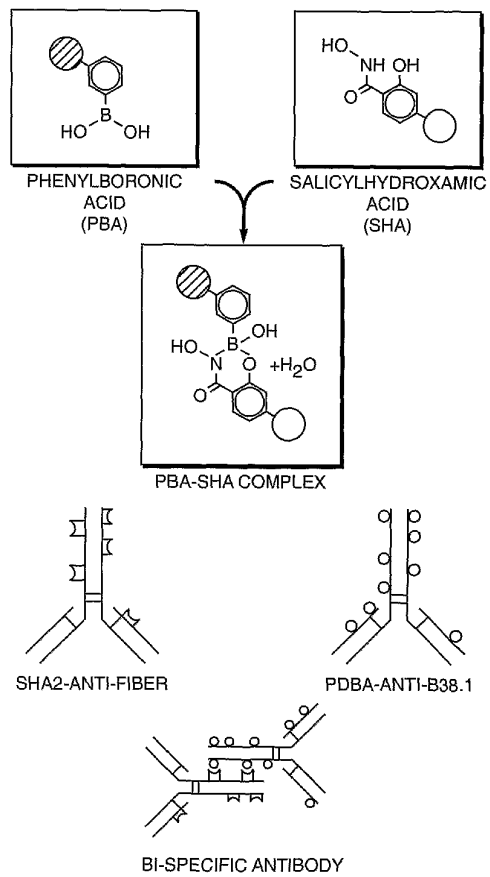


FIG. 14

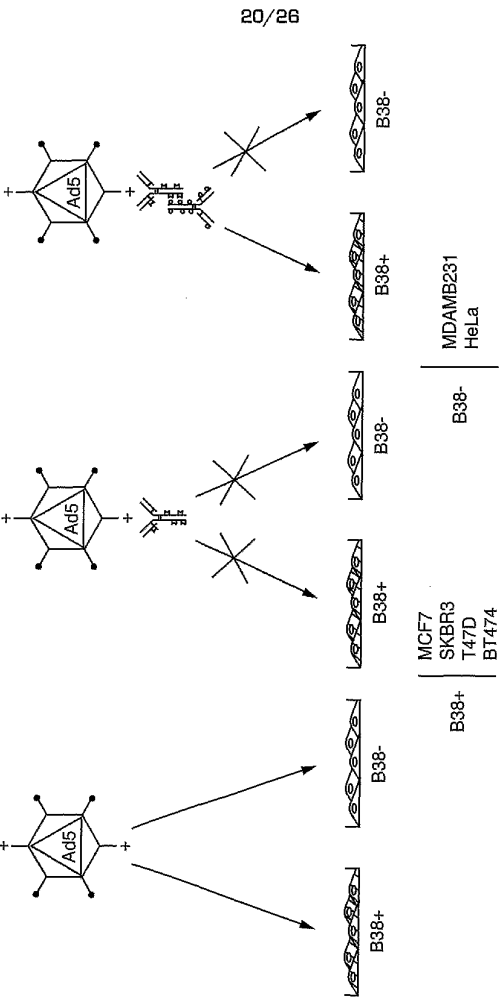


FIG. 15

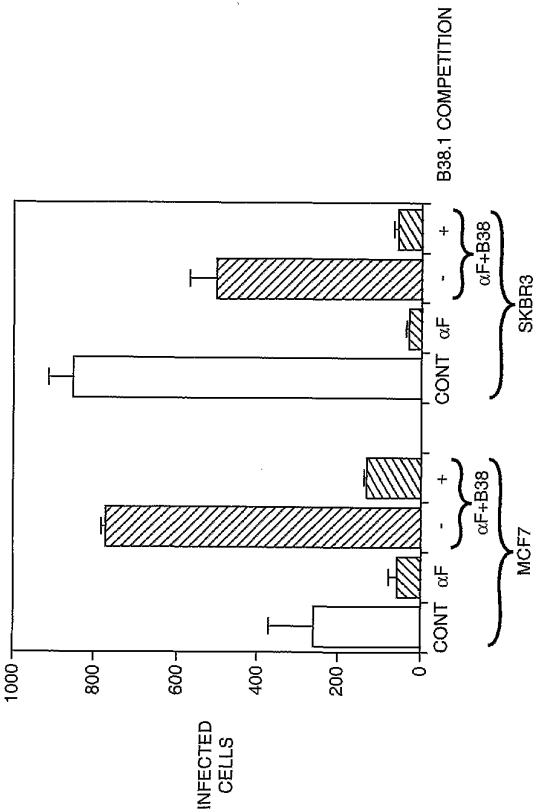


FIG. 16

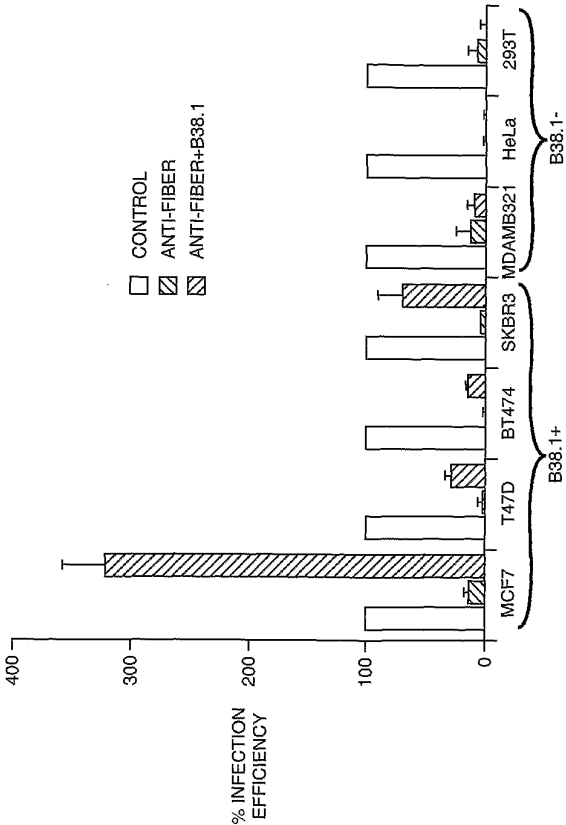


FIG. 17

Specific targeting of adenovirus
to breast cancer cells expressing B38.1

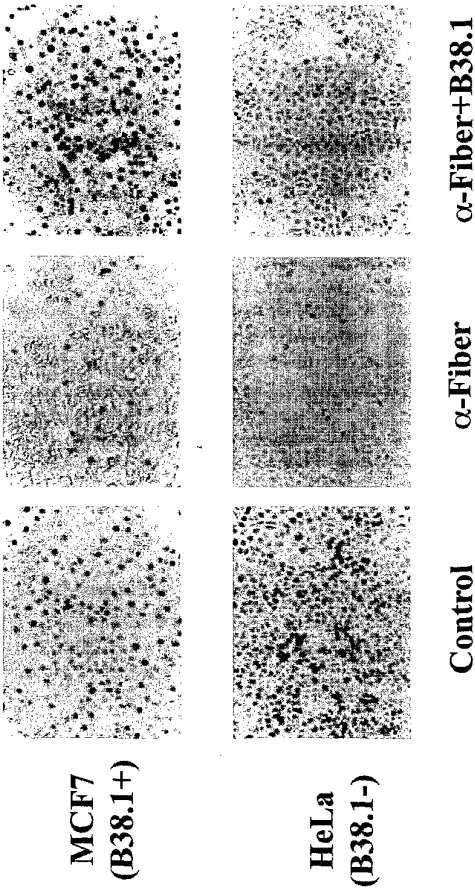


FIG. 18

24/26

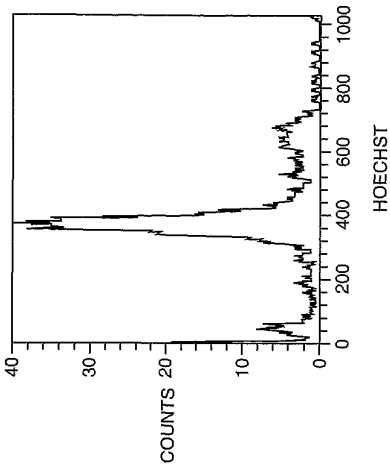


FIG. 19B

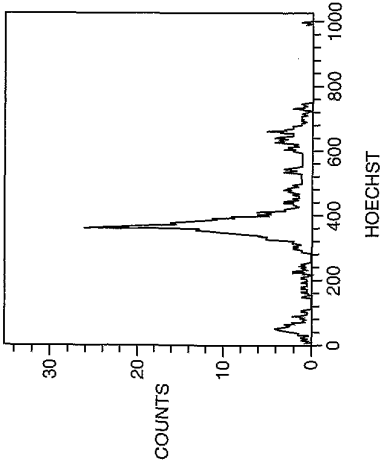


FIG. 19A

WO 02/12447

PCT/US01/24243

25/26

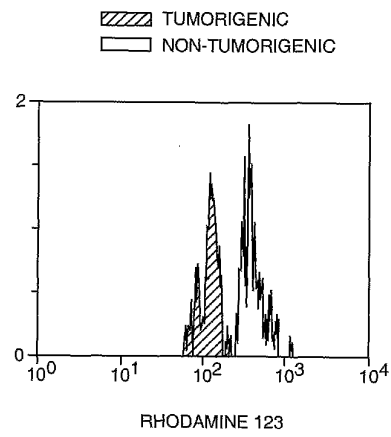


FIG. 20

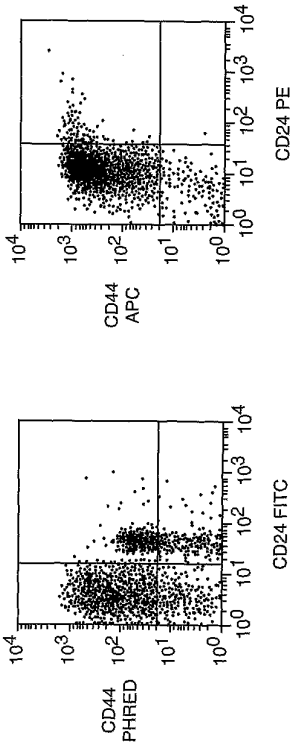


FIG. 22

FIG. 21

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
14 February 2002 (14.02.2002)

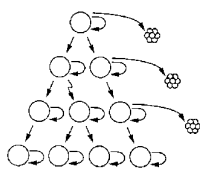
PCT

(10) International Publication Number
WO 02/012447 A3

- (51) International Patent Classification: C12N 5/06, 5/08, 5/10, A61K 39/00, C12Q 1/68, 1/02, A01K 67/027, A61K 39/395, 49/00
- (21) International Application Number: PCT/US01/24243
- (22) International Filing Date: 2 August 2001 (02.08.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
00/222,794 3 August 2000 (03.08.2000) US
00/240,317 13 October 2000 (13.10.2000) US
00/920,517 1 August 2001 (01.08.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): **REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN** [US/US]; Wolverine Tower, Room 2071, 3003 S. State Street, Ann Arbor, MI 48109-1280 (US).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): **CLARKE, Michael, F.** [US/US]; 3377 Craig Road, Ann Arbor, MI 48103 (US); **MORRISON, Sean, J.** [US/US]; 3513 Barton Farm, Ann Arbor, MI 48105 (US); **WICHA, Max, S.** [US/US]; 2865 Parkridge Street, Ann Arbor, MI 48109 (US); **AL-HAJJ, Muhammad** [US/US]; 2035 Commere, Apt #316, Ann Arbor, MI 48103 (US).
- (74) Agent: **PRINCE, John, T.**; McDermott, Will & Emery, 28 State Street, Boston, MA 02109 (US).
- (81) Designated States (national): AT, AU, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, 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, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SI, SG, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

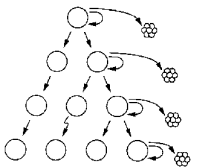
[Continued on next page]

(54) Title: ISOLATION AND USE OF SOLID TUMOR STEM CELLS



A

(57) Abstract: A small percentage of cells within an established solid tumor have the properties of stem cells. These solid tumor stem cells give rise both to more tumor stem cells and to the majority of cells in the tumor that have lost the capacity for extensive proliferation and the ability to give rise to new tumors. Thus, solid tumor heterogeneity reflects the presence of tumor cell progeny arising from a solid tumor stem cell. We have developed a xenograft model in which we have been able to establish tumors from primary tumors via injection of tumors in the mammary gland of severely immunodeficient mice. These xenograft assay have allowed us to do biological and molecular assays to characterize clonogenic solid tumor stem cells. We have also developed evidence that strongly implicates the Notch pathway, especially Notch 4, as playing a central pathway in carcinogenesis.



B

WO 02/012447 A3

WO 02/012447 A3 

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KI, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(88) Date of publication of the international search report: 24 April 2003

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.

Published:
— with international search report

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
14 February 2002 (14.02.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/012447 A3(51) International Patent Classification: C12N 5/06,
5/08, 5/10, A61K 3940, C12Q 1/68, 1/02, A01K 67/027,
A61K 39/395, 49/00Arbor, MI 48105 (US). **WICHA, Max, S.** [US/US]; 2865
Parkridge Street, Ann Arbor, MI 48109 (US). **AL-HAJI,
Muhammad** [US/US]; 2035 Commere, Apt #316, Ann Ar-
bor, MI 48103 (US).

(21) International Application Number: PCT/US01/24243

(74) Agent: **PRINCE, John, T.**, McDermott, Will & Emery, 28
State Street, Boston, MA 02109 (US).

(22) International Filing Date: 2 August 2001 (02.08.2001)

(25) Filing Language: English

(81) Designated States (*national*): AE, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, CA, CL, CN, CU, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, GB, GD, GH, GM, GR, HU, ID, IL, IN, IS, JP,
KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD,
SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ,
VN, YU, ZA, ZW.

(26) Publication Language: English

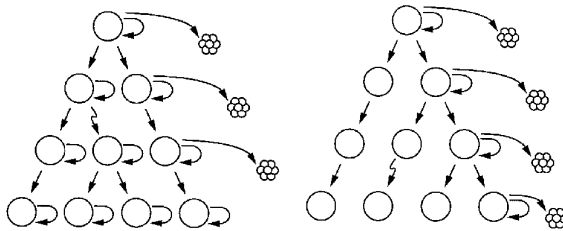
(30) Priority Data:
60/222,794 3 August 2000 (03.08.2000) US
60/240,317 13 October 2000 (13.10.2000) US
09/920,517 1 August 2001 (01.08.2001) US(84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD,
TG).(71) Applicant (*for all designated States except US*): **RE-
GENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN**
[US/US]; Wolverine Tower, Room 2071, 3003 S. State
Street, Ann Arbor, MI 48109-1280 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (*for US only*): **CLARKE, Michael,
P.** [US/US]; 3377 Craig Road, Ann Arbor, MI 48103 (US).
MORRISON, Sean, J. [US/US]; 3513 Barton Farm, Ann**Published:**
— with international search report
with amended claims and statement

[Continued on next page]

(54) Title: ISOLATION AND USE OF SOLID TUMOR STEM CELLS



(57) Abstract: A small percentage of cells within an established solid tumor have the properties of stem cells. These solid tumor stem cells give rise both to more tumor stem cells and to the majority of cells in the tumor that have lost the capacity for extensive proliferation and the ability to give rise to new tumors. Thus, solid tumor heterogeneity reflects the presence of tumor cell progeny arising from a solid tumor stem cell. We have developed a xenograft model in which we have been able to establish tumors from primary tumors via injection of tumors in the mammary gland of severely immunodeficient mice. These xenograft assay have allowed us to do biological and molecular assays to characterize clonogenic solid tumor stem cells. We have also developed evidence that strongly implicates the Notch pathway, especially Notch 4, as playing a central pathway in carcinogenesis.

WO 02/012447 A3

WO 02/012447 A3



(88) Date of publication of the international search report: 24 April 2003
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.

Date of publication of the amended claims and statement: 3 July 2003

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				Int'l Application No PCT/US 01/24243
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N5/06 C12N5/08 C12N5/10 A61K39/00 C12Q1/68 C12Q1/02 A01K67/027 A61K39/395 A61K49/00				
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 C12N A61K				
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) MEDLINE, BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data, PAJ				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages			Relevant to claim No.
A	KUMMERMEHR JOHANN ET AL: "Tumour stem cells." 1997, STEM CELLS, PAGE(S) 363-399, ACADEMIC PRESS LTD.; ACADEMIC PRESS, INC. 14 BELGRAVE SQUARE, 24-28 OVAL ROAD, LONDON NW1 70X, ENGLAND, UK; 1250 SIXTH AVE., SAN DIEGO, CALIFORNIA 92101, USA XP001093829 ISBN: 0-12-563455-2 the whole document --- ---			1-182
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ 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" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "S" document member of the same patent family				
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report		
20 November 2002		13.12.02		
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patonlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 940-2040, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 940-3016		Authorized officer Niebuhr-Ebel, K		

Form PCT/ISA(2/10) (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Int'l Application No
 PCT/US 01/24243

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GUNTHER U ET AL: "A NEW VARIANT OF GLYCOPROTEIN CD44 CONFERS METASTATIC POTENTIAL TO RAT CARCINOMA CELLS" CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, MA, US, vol. 65, no. 1, 5 April 1991 (1991-04-05), pages 13-24, XP000470199 ISSN: 0092-8674 abstract page 18, right-hand column, paragraph 2 -left-hand column, paragraph 1 page 20, left-hand column, paragraph 3 -page 21, right-hand column, paragraph 1 ---	1-182
A	HAMBURGER A W ET AL: "PRIMARY BIOASSAY OF HUMAN TUMOR STEM CELLS" SCIENCE (WASHINGTON D C), vol. 197, no. 4302, 1977, pages 461-463, XP001094575 ISSN: 0036-8075 the whole document ---	1-182
A	WO 97 37004 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH ;CASORATI GIULIA (IT); DELLABONA PAOLO (I)) 9 October 1997 (1997-10-09) "Method for the production of activated marked tumor-specific T cells" the whole document ---	59-61
P, A	VORMOOR JOSEF ET AL: "Establishment of an in vivo model for pediatric Ewing tumors by transplantation into NOD/scid mice." PEDIATRIC RESEARCH, vol. 49, no. 3, March 2001 (2001-03), pages 332-341, XP001094985 ISSN: 0031-3998 abstract page 339, left-hand column, paragraph 2 -page 340, right-hand column, paragraph 2 ---	126-136, 148-162, 172-182
T	REYA T ET AL: "Stem cells, cancer, and cancer stem cells." NATURE. ENGLAND 1 NOV 2001, vol. 414, no. 6859, 1 November 2001 (2001-11-01), pages 105-111, XP002206733 ISSN: 0028-0836 the whole document --- -/--	1-182

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/24243
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 98 57621 A (UYTTENDAELE HENDRIK ;UNIV COLUMBIA (US); KITAJEWSKI JAN (US)) 23 December 1998 (1998-12-23) "New nucleic acid encoding Notch4 protein - used to modulate angiogenesis, e.g. for treatment of tumours, ischaemia, ulcers and wounds" page 29, line 19 -page 30, line 4 claims 58-61 -----	183-185
A	LI LINGHENG ET AL: "Cloning, characterization, and the complete 56.8-kilobase DNA sequence of the human NOTCH4 gene" GENOMICS, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, US, vol. 51, no. 1, 1 July 1998 (1998-07-01), pages 45-58, XP002172754 ISSN: 0888-7543 the whole document ----	183-185
A	SUGAYA KIMIHIKO ET AL: "Gene organization of human NOTCH4 and (CTG)-n polymorphism in this human counterpart gene of mouse proto-oncogene Int3" GENE: AN INTERNATIONAL JOURNAL ON GENES AND GENOMES, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, BARKING, GB, vol. 189, no. 2, 1997, pages 235-244, XP002178175 ISSN: 0378-1119 the whole document -----	183-185

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 01/24243
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)		
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	☐	Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.	☐	Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3.	☐	Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:		
see additional sheet		
1.	☒	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2.	☐	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	☐	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	☐	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Remark on Protest		☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
		☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US 01/24243

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1-182

Isolated solid tumor stem cell derived from a solid tumor expressing CD44, lower levels of CD24 and being tumorigenic, polypeptides and polynucleotides purified from said cell, methods making use of said cell.

2. Claims: 183-185

Method for reducing the size of a solid tumor by treating it with an antibody directed against a Notch (4) protein.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.
PCT/US 01/24243

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9737004	A	09-10-1997	AU 2160297 A	22-10-1997
			CA 2250394 A1	09-10-1997
			DE 69713336 D1	18-07-2002
			WO 9737004 A1	09-10-1997
			EP 0914416 A1	12-05-1999
			JP 2000515364 T	21-11-2000
			US 6399054 B1	04-06-2002
WO 9857621	A	23-12-1998	AU 8162898 A	04-01-1999
			WO 9857621 A1	23-12-1998
			US 6379925 B1	30-04-2002

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 35/00	A 6 1 K 39/395	T 4 C 0 8 7
C 0 7 K 14/82	A 6 1 P 35/00	4 H 0 4 5
C 1 2 N 5/10	C 0 7 K 14/82	
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	A
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/543	G 0 1 N 33/543	5 4 1 A
G 0 1 N 33/574	G 0 1 N 33/543	5 4 1 Z
G 0 1 N 37/00	G 0 1 N 33/543	5 9 7
	G 0 1 N 33/574	A
	G 0 1 N 33/574	D
	G 0 1 N 37/00	1 0 2
	G 0 1 N 37/00	1 0 3
	C 1 2 N 5/00	B
	C 1 2 N 15/00	F

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CA,CH,CN,CU,CZ,DE,DK,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,MD,MG,MK,MN,MW,MX,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 ショーン ジェイ. モリソン

アメリカ合衆国 4 8 1 0 5 ミシガン、アン アーバー、バートン ファーム 3 5 1 3

(72)発明者 マックス エス. ウィッカ

アメリカ合衆国 4 8 1 0 9 ミシガン、アン アーバー、パークリッジ ストリート 2 8 6 5

(72)発明者 ムハンマド アルハジ

アメリカ合衆国 4 8 1 0 3 ミシガン、アン アーバー、コマー 2 0 3 5、アパートメント
ナンバー 3 1 6

F ターム(参考) 2G045 AA26 AA40 BA14 BB03 BB20 BB24 CB01 CB17 DA12 DA13

DA14 DA36 DA78 FA16 FA37 FB02 FB03 FB07 FB12

4B024 AA01 AA11 BA63 CA04 DA02 EA04 GA11 HA01

4B063 QA07 QA18 QQ08 QQ58 QR32 QS34

4B065 AA90X AA99Y AB01 BA02 CA24 CA44 CA46

4C085 AA03 AA14 AA15 AA16 BB01 CC03 CC22 CC23 GG01 GG08

4C087 AA02 BB64 MA52 MA66 NA14 ZB26

4H045 AA10 BA10 CA41 DA50 EA22 EA28 FA74

专利名称(译)	实体瘤干细胞的分离与应用		
公开(公告)号	JP2004527211A	公开(公告)日	2004-09-09
申请号	JP2002517738	申请日	2001-08-02
[标]申请(专利权)人(译)	密歇根大学		
申请(专利权)人(译)	密歇根大学董事会		
[标]发明人	マイケルエフクラーク ショーンジェイモリソン マックスエスウィッカ ムハンマドアルハジ		
发明人	マイケル エフ.クラーク ショーン ジェイ.モリソン マックス エス.ウィッカ ムハンマド アルハジ		
IPC分类号	A01K67/027 A61K35/12 A61K39/00 A61K39/395 A61P35/00 C07K14/82 C12N5/095 C12N5/10 C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/574 G01N37/00		
CPC分类号	C12N5/0695 A01K67/0271 A61K39/39558 A61K2039/505 A61K2039/5152 A61K2039/5158 C07K14/705 C07K14/70585 C07K14/71 C07K16/28 C07K16/2863 C07K16/30 C12N2501/42 C12N2503/00 C12N2503/02 C12Q1/6886 G01N33/5011 G01N33/57492		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A01K67/027 A61K35/12 A61K39/00.H A61K39/395.E A61K39/395.T A61P35/00 C07K14/82 C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.M G01N33/543.541.A G01N33/543.541.Z G01N33/543.597 G01N33/574.A G01N33/574.D G01N37/00.102 G01N37/00.103 C12N5/00.B C12N15/00.F		
F-TERM分类号	2G045/AA26 2G045/AA40 2G045/BA14 2G045/BB03 2G045/BB20 2G045/BB24 2G045/CB01 2G045/CB17 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/DA78 2G045/FA16 2G045/FA37 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB07 2G045/FB12 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA63 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4B063/QA07 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ58 4B063/QR32 4B063/QS34 4B065/AA90X 4B065/AA99Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA03 4C085/AA14 4C085/AA15 4C085/AA16 4C085/BB01 4C085/CC03 4C085/CC22 4C085/CC23 4C085/GG01 4C085/GG08 4C087/AA02 4C087/BB64 4C087/MA52 4C087/MA66 4C087/NA14 4C087/ZB26 4H045/AA10 4H045/BA10 4H045/CA41 4H045/DA50 4H045/EA22 4H045/EA28 4H045/FA74		
优先权	60/222794 2000-08-03 US 60/240317 2000-10-13 US 09/920517 2001-08-01 US		
其他公开文献	JP2004527211A5 JP5352037B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

已建立的实体瘤中的一小部分细胞具有干细胞的特征。这些实体肿瘤干细胞产生更多的肿瘤干细胞和大规模的增殖，并且肿瘤中的大多数细胞丧失了产生新肿瘤的能力。因此，实体瘤的异质性反映了由实体肿瘤干细胞产生的肿瘤细胞的后代的存在。发明人能够开发异种移植模型并通过将肿瘤注射到严重免疫缺陷小鼠的乳腺中来建立来自原发肿瘤的肿瘤。这些异种移植测定允许进行生物学和分子测定以表征克隆形成的实体瘤干细胞。我们还强烈证明Notch途径，尤其是Notch4，在癌发生中起着中心作用。

表 1 乳癌幹細胞の単離集団		
	CD44 ⁺	CD44 ⁻
in vitro コロニー	+	-
マウスにおける腫瘍形成性	+	-
ヒト乳癌細胞を、FACSを用いて採集した。in vitro でのコロニーの分析を、それぞれの表現型の5,000の細胞を用いて、別個の2ウェル内で実施した。選別された細胞の in vivo 増殖を、2 x 10⁶のマーカーCD44⁺又はCD44⁻細胞をマウスに注入することによって実施した。マウスを、実験1では毎週、実験2では4週日に分析した。マーカーCD44⁻細胞でなく、マーカーCD44⁺細胞の注入は、in vitro での腫瘍の形成及び増殖を招いた。in vitro 実験は、患者から単離した凍結細胞でも複製し、in vitro 実験を裏付けた。in vivo 実験は、2回複製した。		