

(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2017-510626

(P2017-510626A)

(43) 公表日 平成29年4月13日(2017.4.13)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	2 G 0 4 5
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	4 B 0 6 3
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 25/04 (2006.01)	A 6 1 P 25/04	4 C 0 8 5
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 66 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-573676 (P2016-573676)
 (86) (22) 出願日 平成27年3月4日 (2015.3.4)
 (85) 翻訳文提出日 平成28年10月25日 (2016.10.25)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2015/018756
 (87) 国際公開番号 W02015/134627
 (87) 国際公開日 平成27年9月11日 (2015.9.11)
 (31) 優先権主張番号 61/949,511
 (32) 優先日 平成26年3月7日 (2014.3.7)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 62/013,226
 (32) 優先日 平成26年6月17日 (2014.6.17)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

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

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 NOTCH1抗体によって癌を治療するための方法

(57) 【要約】

本発明は、癌を治療するための方法を提供する。より詳細には、本発明は、抗Notch1抗体の用量を投与する段階を含む、癌を治療するための方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

Notch1結合物質の治療的有効量を対象に投与する段階を含む、対象における腺様嚢胞癌を治療する方法。

【請求項 2】

Notch1結合物質の治療的有効量を対象に投与する段階を含む、腺様嚢胞癌を有する対象の疼痛を減少させる方法。

【請求項 3】

疼痛が骨痛である、請求項2記載の方法。

【請求項 4】

腺様嚢胞癌の増殖を阻害する方法であって、該癌をNotch1結合物質の有効量と接触させる段階を含む、方法。

【請求項 5】

腺様嚢胞癌のサイズを縮小させる方法であって、該癌をNotch1結合物質の有効量と接触させる段階を含む、方法。

【請求項 6】

腺様嚢胞癌のNotch1細胞内ドメイン（ICD）のレベルがNotch1 ICDの所定のレベルと比較して上昇しているかまたは高い、請求項1～5のいずれか一項記載の方法。

【請求項 7】

腺様嚢胞癌がNotch1突然変異を含む、請求項1～6のいずれか一項記載の方法。

【請求項 8】

Notch1突然変異が、

(a) ミスセンス突然変異、ナンセンス突然変異、またはフレームシフト突然変異である、

(b) HDドメイン内にある、

(c) TADドメイン内にある、

(d) PESTドメイン内にある、

(e) 活性化突然変異である、

(f) Notch1シグナル伝達を増加させる、かつ/または

(g) Notch1 ICDのレベルを上昇させる、

請求項7記載の方法。

【請求項 9】

(a) 腺様嚢胞癌の (i) Notch1 ICDのレベルがNotch1 ICDの所定のレベルと比較して上昇しているかもしくは高いか否か、または (ii) Notch1突然変異の有無、を判定する段階、および

(b) Notch1結合物質の治療的有効量を対象に投与する段階、を含む、対象における腺様嚢胞癌を治療する方法。

【請求項 10】

(a) 対象から試料を入手する段階、

(b) 試料中のNotch1 ICDのレベルを決定する段階、および

(c) 試料のNotch1 ICDのレベルがNotch1 ICDの所定のレベルと比較して上昇しているかまたは高い場合に、対象をNotch1結合物質による治療のために選択する段階、を含む、腺様嚢胞癌を有する対象をNotch1結合物質による治療のために選択する方法。

【請求項 11】

(a) 対象から試料を入手する段階、

(b) 試料がNotch1突然変異を有しているか判定する段階、および

(c) 試料がNotch1突然変異を有している場合に、対象をNotch1結合物質による治療のために選択する段階、

を含む、腺様嚢胞癌を有する対象をNotch1結合物質による治療のために選択する方法。

【請求項 12】

10

20

30

40

50

Notch1結合物質の治療的有効量を対象に投与する段階を含む、請求項10または請求項11記載の方法。

【請求項13】

Notch1結合物質がヒトNotch1の細胞外ドメインと特異的に結合する抗体である、請求項1～12のいずれか一項記載の方法。

【請求項14】

抗体がヒトNotch1の細胞外ドメインの非リガンド結合性膜基部領域(non-ligand binding membrane proximal region)と特異的に結合する、請求項13記載の方法。

【請求項15】

Notch1受容体の非リガンド結合性膜基部領域がSEQ ID NO:2を含む、請求項14記載の方法。

10

【請求項16】

抗体が、
RGYWIE (SEQ ID NO:15)
を含む重鎖CDR1、
QILPGTGRTNYNEKFKG (SEQ ID NO:16)

を含む重鎖CDR2、および
FDGNYGYAMDY (SEQ ID NO:17)

を含む重鎖CDR3、ならびに
RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:18)

20

を含む軽鎖CDR1、
GTNNRAP (SEQ ID NO:19)
を含む軽鎖CDR2、および
ALWYSNHWVFGGGTKL (SEQ ID NO:20)

を含む、請求項13～15のいずれか一項記載の方法。

【請求項17】

抗体が、

(a) SEQ ID NO:8もしくはSEQ ID NO:26に対して少なくとも90%の配列同一性を有する重鎖可変領域、および/または

30

(b) SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:32もしくはSEQ ID NO:38に対して少なくとも90%の配列同一性を有する軽鎖可変領域、
を含む、請求項13～16のいずれか一項記載の方法。

【請求項18】

抗体が、

(a) SEQ ID NO:8の重鎖可変領域およびSEQ ID NO:14の軽鎖可変領域、

(b) SEQ ID NO:26の重鎖可変領域およびSEQ ID NO:32の軽鎖可変領域、または

(c) SEQ ID NO:26の重鎖可変領域およびSEQ ID NO:38の軽鎖可変領域、

を含む、請求項13～16のいずれか一項記載の方法。

【請求項19】

40

抗体が、

(a) ATCC特許寄託指定番号PTA-9549として寄託されたプラスミドによってコードされる抗体と同じ重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む、

(b) ATCC特許寄託指定番号PTA-9549として寄託されたプラスミドによってコードされる抗体である、

(c) OMP-52M51-H4L3である、または

(d) ATCC特許寄託指定番号PTA-9405として寄託されたハイブリドーマによって産生される抗体のヒト化バージョンである、

請求項13～16のいずれか一項記載の方法。

【請求項20】

50

抗体が、IgG1抗体、IgG2抗体、モノクローナル抗体、組換え抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、二重特異性抗体、または抗原結合部位を含む抗体断片である、請求項13～19のいずれか一項記載の方法。

【請求項21】

腺様嚢胞癌が、再発性である、かつ/または原発部位から転移している、請求項1～20のいずれか一項記載の方法。

【請求項22】

(i) 対象の乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)レベルが所定のレベルもしくは正常レベルと比較して高い、または

(ii) 腺様嚢胞癌のLDHレベルが所定のレベルもしくは正常レベルと比較して高い、請求項1～20のいずれか一項記載の方法。

10

【請求項23】

少なくとも1つのさらなる治療薬を対象に投与する段階をさらに含む、請求項1～3、6～9、または12～22のいずれか一項記載の方法。

【請求項24】

さらなる治療薬が化学療法薬である、請求項23記載の方法。

【請求項25】

さらなる治療薬がさらなる治療用抗体である、請求項23記載の方法。

【請求項26】

対象が放射線療法を受ける、請求項1～3、6～9、または12～25のいずれか一項記載の方法。

20

【請求項27】

対象がNotch1結合物質による治療の前に放射線療法を受ける、請求項26記載の方法。

【請求項28】

Notch1突然変異が、PCRに基づくアッセイ、マイクロアレイ分析、または核酸シーケンシングによって判定される、請求項9または11～27のいずれか一項記載の方法。

【請求項29】

Notch1 ICDのレベルが免疫組織化学アッセイによって決定される、請求項9、10、または12～27のいずれか一項記載の方法。

【請求項30】

試料が、新鮮な腫瘍試料、凍結した腫瘍試料、またはホルマリン固定してパラフィン包埋した試料である、請求項10～29のいずれか一項記載の方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、癌の治療の分野に関する。より詳細には、本発明は、抗Notch1抗体を投与する段階を含む、癌を治療するための方法を提供する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

癌は先進諸国における死亡の主因の1つであり、米国だけでも毎年、100万人以上が癌と診断され、500,000人以上が死亡している。全体として、人々の3人に1人以上が人生の間に何らかの型の癌を発症すると推定されている。

【0003】

腺癌は、腺(分泌)細胞から始まる癌の一種のことである。腺細胞はある種の内臓の内層を構成する組織中に認められ、粘液、消化液または他の液体といった物質を産生して体内に放出する。腺癌には、乳癌、膵癌、肺癌、前立腺癌および結腸癌が非限定的に含まれる。腺様嚢胞癌(ACCまたはAdCC)は、唾液腺に起こることの多い稀な型の腺癌であるが、体内の他の場所に見られることもある。ACCは一般に、複数の局所再発および遠隔転移

40

50

を伴う緩徐進行型の臨床経過を特徴とする。転移が最も多く見られる部位は肺であるが、転移は骨、肝臓、腎臓および脳でも認められている。治療は通常、外科的切除および/または術後アジュバント放射線療法からなり、化学療法は通常、進行した局所性または転移性疾患の治療のために残しておかれる。

【0004】

癌の治療は、次第に、全身作用性の細胞傷害性薬物の使用から、無秩序な細胞増殖および生存を可能にし、かつそれらを支える機序に照準を合わせた、より標的指向性の高い治療法を含めるように移行してきている。例えば、腫瘍が独立した血液供給を確立する過程である腫瘍血管新生は、腫瘍の成長にとって決定的に重要な段階である。腫瘍血管新生を標的とする取り組みは、抗VEGF抗体アバスタチン(AVASTIN)などの新規癌治療薬の開発のための重要な戦略として浮上してきている。

10

【0005】

正常な状態では、シグナル伝達経路は細胞外シグナルを核と結び付け、細胞増殖、細胞分化、細胞生存、および細胞死を直接的または間接的に制御する遺伝子の発現を導く。多種多様な癌では、シグナル伝達経路が調節不全の状態にあり、腫瘍イニシエーションおよび/または腫瘍進行につながっている可能性がある。ヒトの発癌と関連付けられているシグナル伝達経路には、Notch経路、Ras-Raf-MEK-ERK経路すなわちMAPK経路、PI3K-AKT経路、CDKN2A/CDK4経路、Bcl-2/TP53経路、およびWnt経路が非限定的に含まれる。

【0006】

Notchシグナル伝達経路は、普遍的に保存されているシグナル伝達系である。これは、胚パターン形成および後胚期の組織維持を含む、発生期間中の細胞運命の決定に関与している。加えて、Notchシグナル伝達は、造血幹細胞の維持における決定的な因子としても同定されている。

20

【0007】

Notch経路は、血液性および固形の腫瘍および癌のいずれの発生病理とも関連付けられている。細胞増殖、アポトーシス、接着および血管新生を含む、腫瘍発生と関連性のある数多くの細胞機能および微小環境因子(microenvironmental cue)が、Notch経路シグナル伝達によってモジュレートされることが示されている(Leong et al., 2006, Blood, 107:2223-2233(非特許文献1))。加えて、Notch受容体および/またはNotchリガンドは、複数のヒト癌において、発癌の役割を果たす可能性があることも示されている(Leong et al., 2006, Blood, 107:2223-2233(非特許文献1); Nickoloff et al., 2003, Oncogene, 22:6598-6608(非特許文献2))。このように、Notch経路は癌治療法の有望な標的として特定されている。

30

【0008】

薬剤探索および薬剤開発が進展するのに伴い、特に癌の分野では、「1つの薬剤が皆に適合する(one drug fits all)」アプローチから「個別化医療」戦略に移行しつつある。個別化医療戦略には、予後マーカー、薬力学的マーカーおよび予測マーカーを含む癌バイオマーカーに基づく治療レジメンが含まれる。一般に、予測バイオマーカーは、腫瘍または癌が特定の治療薬に反応するかまたはそれに対する感受性を持つであろう見込みを評価し、その薬剤の使用によって最も恩恵を受ける可能性が高いと考えられる患者の同定および/または選択を可能にすると考えられる。

40

【0009】

このため、癌の治療のための現行の治療法の相対的無効性を克服しうる、新たな標的化された治療戦略を設計することに対する需要がある。その上、腫瘍/癌が特定の薬剤に反応するか否かを予測および/または特定することができるアッセイを開発することに対しても明らかな需要がある。この情報は、より優れた患者選択戦略を可能にするとともに、より優れた治療有効性にもつながるはずである。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0010】

50

【非特許文献1】Leong et al., 2006, Blood, 107:2223-2233

【非特許文献2】Nickoloff et al., 2003, Oncogene, 22:6598-6608

【発明の概要】

【0011】

本発明の1つの局面は、対象における腺癌を治療する方法であって、対象に対してNotch1結合物質の治療的有効量を投与する段階を含む方法を提供する。対象における腺様嚢胞癌を治療する方法であって、対象に対してNotch1結合物質の治療的有効量を投与する段階を含む方法も提供される。加えて、腺癌または腺様嚢胞癌の増殖を阻害する方法であって、癌をNotch1結合物質の有効量と接触させる段階を含む方法も提供される。腺様嚢胞癌のサイズを縮小させる方法であって、癌をNotch1結合物質の有効量と接触させる段階を含む方法が提供される。対象における腺様嚢胞癌のサイズを縮小させる方法であって、対象に対してNotch1結合物質の治療的有効量を投与する段階を含む方法が提供される。

10

【0012】

本発明のもう1つの局面は、腺癌を有する対象における疼痛を減少させる方法であって、対象に対してNotch1結合物質の治療的有効量を投与する段階を含む方法を提供する。腺様嚢胞癌を有する対象における疼痛を減少させる方法であって、対象に対してNotch1結合物質の治療的有効量を投与する段階を含む方法も提供される。

【0013】

本明細書に記載の本発明のいくつかの局面および態様において、腺様嚢胞癌は再発性である。いくつかの態様において、腺様嚢胞癌は転移している。

20

【0014】

本明細書に記載の方法のいくつかの態様において、腺癌または腺様嚢胞癌は、高レベルのNotch1細胞内ドメイン(ICD)を含む。いくつかの態様において、腺癌のNotch1 ICDのレベルは、Notch1 ICDの所定のレベルと比較して上昇しているかまたは高い。いくつかの態様において、腺様嚢胞癌は、Notch1 ICDの所定のレベルと比較して高いレベルのNotch1 ICDを含む。いくつかの態様において、腺様嚢胞癌のNotch1 ICDのレベルは、Notch1 ICDの所定のレベルと比較して上昇しているかまたは高い。したがって、本発明はまた、対象における腺癌または腺様嚢胞癌を治療する方法であって、癌のNotch1 ICDのレベルがNotch1 ICDの所定のレベルと比較して上昇しているかまたは高いか否かを判定する段階、および対象に対してNotch1結合物質の治療的有効量を投与する段階を含む方法を提供する。

30

【0015】

本明細書に記載の方法のいくつかの態様において、腺癌はNotch経路シグナル伝達に影響を及ぼす突然変異を含む。いくつかの態様において、腺癌はNotch1突然変異を含む。いくつかの態様において、腺様嚢胞癌はNotch経路シグナル伝達に影響を及ぼす突然変異を含む。いくつかの態様において、腺様嚢胞癌はNotch1突然変異を含む。本発明はまた、対象における腺癌または腺様嚢胞癌を治療する方法であって、癌がNotch1突然変異を含むか否かを判定する段階、および対象に対してNotch1結合物質の治療的有効量を投与する段階を含む方法も提供する。

【0016】

本明細書に記載の方法のいくつかの態様において、腺癌または腺様嚢胞癌はNotch1突然変異を含み、ここでNotch1突然変異はミスセンス突然変異、ナンセンス突然変異、またはフレームシフト突然変異である。いくつかの態様において、Notch1突然変異はフレームシフト突然変異である。いくつかの態様において、Notch1突然変異はヘテロ二量体化(HD)ドメイン内にある。いくつかの態様において、Notch1突然変異はトランス活性化ドメイン(TAD)内にある。いくつかの態様において、Notch1突然変異はPESTドメイン内にある。いくつかの態様において、Notch1突然変異は活性化突然変異である。いくつかの態様において、Notch1突然変異はNotch1シグナル伝達を増加させる。いくつかの態様において、Notch1突然変異はNotch経路のシグナル伝達を増加させる。

40

【0017】

本明細書に記載の方法のいくつかの態様において、突然変異は、Notch1タンパク質のR

50

ガンド非依存的な分解および活性化を生じさせる。いくつかの態様において、突然変異はC末端PESTドメインを除去して、Notch1 ICDを安定化する。いくつかの態様において、突然変異はNotch1 ICDの増大または上昇を生じさせる。いくつかの態様において、突然変異はNotch1遺伝子の中にある。いくつかの態様において、突然変異はNotch1遺伝子以外の遺伝子の中にある。

【0018】

本発明のもう1つの局面は、Notch1結合物質（例えば、抗Notch1抗体）による治療のために、腺癌または腺様嚢胞癌を有する対象を同定する方法または対象を選択する方法を提供する。いくつかの態様において、抗Notch1抗体による治療のために、腺癌または腺様嚢胞癌を有する対象を同定する方法または対象を選択する方法は、癌がNotch1突然変異を有するかどうかを判定する段階を含む。いくつかの態様において、本方法は、癌がNotch1突然変異を有するかどうかを判定する段階、および癌がNotch1突然変異を有する場合に対象を抗Notch1抗体による治療のために選択する段階を含む。いくつかの態様において、抗Notch1抗体による治療のために、腺癌または腺様嚢胞癌を有する対象を同定する方法または対象を選択する方法は、癌のNotch1 ICDのレベルが高いかまたは上昇しているかを判定する段階を含む。いくつかの態様において、本方法は、癌のNotch1 ICDのレベルが高いかまたは上昇しているか否かを判定する段階、および癌のNotch1 ICDのレベルが高いかまたは上昇している場合に対象を抗Notch1抗体による治療のために選択する段階を含む。いくつかの態様において、本方法は、Notch1結合物質の治療的有効量を対象に投与する段階を含む。

【0019】

本明細書に記載の方法のいくつかの態様において、試料は対象から得られる。いくつかの態様において、試料は、新鮮試料、凍結試料または、ホルマリン固定してパラフィン包埋した（FFPE）試料である。

【0020】

本明細書に記載の方法のいくつかの態様において、Notch1突然変異は、PCRに基づくアッセイ、マイクロアレイ分析、または核酸シーケンシングによって判定される。いくつかの態様において、Notch1 ICDのレベルは免疫組織化学アッセイによって決定される。

【0021】

本発明のもう1つの局面は、腺様嚢胞癌の治療のためにNotch1結合物質（例えば、抗Notch1抗体）の投与を受けている対象をモニターする方法を提供する。いくつかの態様において、腺様嚢胞癌の治療のために抗Notch1抗体の投与を受けている対象をモニターする方法は、治療を受けている対象由来の試料における乳酸デヒドロゲナーゼ（LDH）のレベルを決定する段階、および試料におけるLDHのレベルをLDHの所定のレベルと比較する段階を含む。いくつかの態様において、LDHの所定のレベルは、対象から治療の前に得られた試料から決定される。

【0022】

本明細書に記載の本発明のいくつかの局面および態様において、Notch1結合物質は抗Notch1抗体である。いくつかの態様において、抗Notch1抗体はヒトNotch1と特異的に結合する。いくつかの態様において、抗Notch1抗体はヒトNotch1の細胞外ドメインと特異的に結合する。いくつかの態様において、抗Notch1抗体はヒトNotch1の細胞外ドメインの非リガンド結合性膜基部領域（non-ligand binding membrane proximal region）と特異的に結合する。いくつかの態様において、Notch1受容体の非リガンド結合性膜基部領域はSEQ ID NO:2を含む。いくつかの態様において、抗Notch1抗体はSEQ ID NO:2の内部で特異的に結合する。

【0023】

本明細書に記載の方法のいくつかの態様において、抗Notch1抗体は、RGYWIE (SEQ ID NO:15)を含む重鎖CDR1、QILPGTGRTNYNEKFKG (SEQ ID NO:16)を含む重鎖CDR2、および

10

20

30

40

50

FDGNYGYAMDY (SEQ ID NO:17)

を含む重鎖CDR3を含む。いくつかの態様において、抗Notch1抗体は、RSSTGAVTTSNYAN(SEQ ID NO:18)

を含む軽鎖CDR1、

GTNNRAP (SEQ ID NO:19)

を含む軽鎖CDR2、および

ALWYSNHWVFGGGTKL (SEQ ID NO:20)

を含む軽鎖CDR3を含む。いくつかの態様において、抗Notch1抗体は、RGYWIE (SEQ ID NO:15)

を含む重鎖CDR1、

QILPGTGRRTNYNEKFKG (SEQ ID NO:16)

を含む重鎖CDR2、および

FDGNYGYAMDY (SEQ ID NO:17)

を含む重鎖CDR3、ならびに

RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:18)

を含む軽鎖CDR1、

GTNNRAP (SEQ ID NO:19)

を含む軽鎖CDR2、および

ALWYSNHWVFGGGTKL (SEQ ID NO:20)

を含む軽鎖CDR3を含む。

【 0 0 2 4 】

本明細書に記載の方法のいくつかの態様において、抗Notch1抗体は、(a) SEQ ID NO : 8もしくはSEQ ID NO : 26に対して少なくとも90%の配列同一性を有する重鎖可変領域 ; および / または (b) SEQ ID NO : 14、SEQ ID NO : 32もしくはSEQ ID NO : 38に対して少なくとも90%の配列同一性を有する軽鎖可変領域を含む。いくつかの態様において、抗Notch1抗体は、(a) SEQ ID NO : 8の重鎖可変領域およびSEQ ID NO : 14の軽鎖可変領域、(b) SEQ ID NO : 26の重鎖可変領域およびSEQ ID NO : 32の軽鎖可変領域、または(c) SEQ ID NO : 26の重鎖可変領域およびSEQ ID NO : 38の軽鎖可変領域を含む。いくつかの態様において、抗Notch1抗体は、SEQ ID NO : 8の重鎖可変領域およびSEQ ID NO : 14の軽鎖可変領域を含む。いくつかの態様において、抗Notch1抗体はSEQ ID NO : 26の重鎖可変領域およびSEQ ID NO : 32の軽鎖可変領域を含む。いくつかの態様において、抗Notch1抗体はSEQ ID NO : 26の重鎖可変領域およびSEQ ID NO : 38の軽鎖可変領域を含む。いくつかの態様において、抗Notch1抗体は、ATCC特許寄託指定番号PTA-9549として寄託されたプラスミドによってコードされる抗体と同じ重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む。いくつかの態様において、抗Notch1抗体は、ATCC特許寄託指定番号PTA-9549として寄託されたプラスミドによってコードされる抗体である。いくつかの態様において、抗Notch1抗体は、ATCC特許寄託指定番号PTA-9405として寄託されたハイブリドーマによって産生される抗体と同じCDRを含む抗体である。いくつかの態様において、抗Notch1抗体は、ATCC特許寄託指定番号PTA-9405として寄託されたハイブリドーマによって産生される抗体のヒト化バージョンである。いくつかの態様において、抗Notch1抗体はOMP-52M51である。いくつかの態様において、抗Notch1抗体はOMP-52M51-H4L3である。

【 0 0 2 5 】

本明細書に記載のNotch1結合物質 (例えば、抗Notch1抗体) を含む組成物は、さらに、本明細書に記載の方法における使用のために提供される。本明細書に記載のNotch1結合物質 (例えば、抗Notch1抗体) と薬学的に許容される媒体 (または担体) とを含む薬学的組成物が、さらに、本明細書に記載の方法における使用のために提供される。

【 0 0 2 6 】

前述の局面のそれぞれのいくつかの態様、ならびに本明細書の他所に記載された他の局面および態様において、本方法は、併用療法に適する少なくとも1つのさらなる治療薬を投与する段階をさらに含む。いくつかの態様において、さらなる治療薬は化学療法薬であ

10

20

30

40

50

る。いくつかの態様において、さらなる治療薬は抗体である。いくつかの態様において、さらなる治療薬は、アルキル化剤、ニトロソ尿素、タキサン、ビンカルカロイド、トポイソメラーゼ阻害薬、抗生物質、白金ベースの薬剤、プロテインキナーゼ阻害薬、または血管新生阻害薬である。

【0027】

本発明の局面または態様が、マーカッシュグループまたは代替の他のグループに関して記載される場合、本発明は、列記されたグループ全体を全体として範囲に含むだけでなく、グループの各メンバーを個々に、またメイングループのすべての可能性のあるサブグループも範囲に含むほか、グループのメンバーの1つまたは複数が存在しないメイングループも範囲に含む。本発明はまた、特許請求される本発明におけるグループのメンバーのい

10

【図面の簡単な説明】

【0028】

【図1】抗Notch1抗体OMP-52M51による治療を受けた、腺様嚢胞癌を有する対象の乳酸デヒドロゲナーゼアッセイの結果。

【図2】抗Notch1抗体OMP-52M51による治療の前および後の、腺様嚢胞癌を有する対象の肝臓のCTスキャン。

【図3】Notch1シグナル伝達アッセイ。

【図4】Notch1 ICD免疫組織化学アッセイ。図4A. 陽性対照腫瘍OMP-B40. 図4B. 陰性対照腫瘍OMP-C11. 図4C. ACC患者の腫瘍。

20

【発明を実施するための形態】

【0029】

発明の詳細な説明

本発明は、1つまたは複数のヒトNotch受容体、特にNotch1と結合する、抗体などのポリペプチドを非限定的に含む新規作用物質を提供する。Notch1結合物質には、ヒトNotch1のアンタゴニストが含まれる。Notch1結合物質には、ヒトNotch経路を阻害する作用物質が含まれる。Notch1結合物質には、Notchシグナル伝達を阻害する作用物質が含まれる。関連するポリペプチドおよびポリヌクレオチド、Notch1結合物質を含む組成物、ならびにNotch1結合物質を作製する方法も提供される。Notch1結合物質を用いる方法、例えば、腺様嚢胞癌などの腺癌を治療する方法などもさらに提供される。Notch1結合物質による治療のための対象を同定および/または選択する方法も提供され、Notch1結合物質による治療を受けている対象をモニターする方法も提供される。

30

【0030】

本発明は、ヒトNotch1の細胞外ドメインと特異的に結合するNotch1結合物質（例えば、抗体）を提供する。いくつかの態様において、Notch1結合物質（例えば、抗体）は、ヒトNotch1の細胞外ドメインの非リガンド結合性膜基部領域と特異的に結合する。リガンド結合のために必要かつ十分であるNotch1のリガンド結合領域がEGF反復配列11および12として同定されており、このことはNotch1受容体のこの領域がNotchシグナル伝達および腫瘍形成に重要であることを示唆する（Rebay et al., 1991, Cell, 67:687; Lei et al., 2003, Dev., 130:6411; Hambleton et al., 2004, Structure, 12:2173）。予想外のことに、ヒトNotch受容体の細胞外ドメインのリガンド結合ドメインの外側と結合する抗体は、インビボで腫瘍細胞増殖を阻害することが見いだされた（米国特許第7,919,092号および国際公開公報第WO 2010/005567号を参照）。したがって、ヒトNotch受容体 Notch1、Notch2、Notch3およびNotch4 のうち1つまたは複数の細胞外ドメインのリガンド結合ドメインの外側と結合する抗体は、有望な癌治療薬としての価値がある。

40

【0031】

1. 定義

本発明の理解を容易にするために、いくつかの用語および語句を以下に定義する。

【0032】

「抗体」という用語は、免疫グロブリン分子の可変領域内の少なくとも1つの抗原認識

50

部位または抗原結合部位を通じて、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、糖質、ポリヌクレオチド、脂質、または前記のものの組み合わせなどの標的を認識してそれと特異的に結合する免疫グロブリン分子を意味する。本明細書で用いる場合、「抗体」という用語は、無傷のポリクローナル抗体、無傷のモノクローナル抗体、抗体断片 (Fab、Fab'、F(ab')₂、およびFv断片など)、単鎖Fv (scFv) 突然変異体、二重特異性抗体などの多重特異性抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、抗体の抗原結合部位を含む融合タンパク質、および抗原結合部位を含む他の任意の改変免疫グロブリン分子を、それらの抗体が所望の生物活性を示す限り、範囲に含む。抗体は、それぞれ、 μ と称されるそれらの重鎖定常ドメインの実体に基づく、免疫グロブリンの5つの主要なクラス：IgA、IgD、IgE、IgG、およびIgM、またはそれらのサブクラス (アイソタイプ) (例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、およびIgA2) の任意のものであってよい。異なるクラスの免疫グロブリンは、異なる周知のサブユニット構造および三次元立体配置を有する。抗体は裸 (naked) であってもよく、または毒素および放射性同位体を非限定的に含む他の分子とコンジュゲートされていてもよい。

10

20

30

40

50

【0033】

「抗体断片」という用語は、無傷の抗体の一部分のことを指し、本明細書で用いる場合には、無傷の抗体の抗原決定可変領域または抗原結合部位のことを指す。本明細書で用いる「抗体断片」は、抗原結合部位またはエピトープ結合部位を含む。抗体断片の例には、Fab、Fab'、F(ab')₂、およびFv断片、線状抗体、単鎖抗体、ならびに抗体断片から形成される多重特異性抗体が非限定的に含まれる。

【0034】

抗体の「可変領域」という用語は、単独であるかまたは組み合わされた、抗体軽鎖の可変領域または抗体重鎖の可変領域のことを指す。重鎖および軽鎖の可変領域は一般に、4つのフレームワーク領域が3つの相補性決定領域 (CDR) (超可変領域としても知られる) によって接続されたものからなる。各鎖におけるCDRは、フレームワーク領域によって互いに近接して保持され、他の鎖からのCDRとともに抗体の抗原結合部位の形成に寄与する。CDRを決定するための手法には少なくとも2つがある：(1) 異種間の配列多様性に基づくアプローチ (すなわち、Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Edition, National Institutes of Health, Bethesda MD); および (2) 抗原-抗体複合体の結晶学的研究に基づくアプローチ (Al-Lazikani et al., 1997, J. Molec. Biol. 273:927-948)。加えて、これらの2つのアプローチの組み合わせも時折、CDRを決定するために当技術分野において用いられる。

【0035】

「モノクローナル抗体」という用語は、単一の抗原決定基またはエピトープの極めて特異的な認識および結合に關与する均一な抗体集団のことを指す。これは、種々の異なる抗原決定基を対象とするさまざまな抗体の混合物を典型的に含むポリクローナル抗体とは対照的である。「モノクローナル抗体」という用語は、無傷および完全長のモノクローナル抗体に加えて、抗体断片 (Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv断片など)、単鎖Fv (scFv) 突然変異体、抗体の一部分を含む融合タンパク質、および抗原結合部位を含む他の任意の改変免疫グロブリン分子も範囲に含む。その上、「モノクローナル抗体」とは、ハイブリドーマ作製、ファージ選択、組換え発現、およびトランスジェニック動物を非限定的に含む、いくつかの技法の任意のもので作製されたそのような抗体のことも指す。

【0036】

「ヒト化抗体」という用語は、最小限の非ヒト (例えば、マウス) 配列を含む、特異的な免疫グロブリン鎖、キメラ免疫グロブリン、またはそれらの断片である、抗体のことを指す。

【0037】

「ヒト抗体」という用語は、ヒトによって産生された抗体、または当技術分野において公知の任意の手法を用いて作製された、ヒトによって産生される抗体に対応するアミノ酸配列を有する抗体のことを意味する。ヒト抗体のこの定義には、無傷または完全長の抗体

、およびそれらの断片が含まれる。

【0038】

「キメラ抗体」という用語は、免疫グロブリン分子のアミノ酸配列が2つまたはそれを上回る種に由来する抗体のことを指す。典型的には、軽鎖および重鎖の両方の可変領域は、所望の結合特異性、親和性、および/または能力を有する1つの哺乳動物種（例えば、マウス、ラット、ウサギなど）に由来する抗体の可変領域に対応し、一方、定常領域は、その種における免疫応答を誘発することを避けるために、別の種（通常はヒト）に由来する抗体における配列と相同である。

【0039】

「エピトープ」および「抗原決定基」という用語は、本明細書において互換的に用いられ、特定の抗体によって認識されて特異的な結合を受けることのできる抗原の部分のことを指す。抗原がポリペプチドである場合、エピトープは、連続したアミノ酸（しばしば「線状エピトープ」と称される）、またはタンパク質の三次フォールディングによって並置される非連続的アミノ酸（しばしば「立体配置エピトープ」と称される）のいずれによっても形成されうる。連続したアミノ酸によって形成されるエピトープは、典型的にはタンパク質が変性しても保たれるが、一方、三次フォールディングによって形成されるエピトープは、典型的にはタンパク質が変性すると失われる。エピトープは典型的には、特有の空間立体配置にある少なくとも3個、より一般的には少なくとも5個または8~10個のアミノ酸を含む。

【0040】

「特異的に結合する」または「特異的結合」という用語は、結合性物質または抗体が、関連および非関連タンパク質を含む代替的な物質との場合よりも、より頻繁に、より急速に、より長い持続時間にわたり、より高い親和性で、または上記のいくつかの組み合わせで、反応または結合することを意味する。ある態様において、「特異的に結合する」とは、抗体がタンパク質と、約0.1mMもしくはそれ未満の、しかしより通常には約1 μ M未満の K_D で結合することを意味する。ある態様において、「特異的に結合する」とは、抗体がタンパク質と、ある時には少なくとも約0.1 μ Mもしくはそれ未満の、そして別の時には少なくとも約0.01 μ Mもしくはそれ未満の K_D で結合することを意味する。異なる種における相同タンパク質間の配列同一性が理由で、特異的結合には、複数の種におけるNotch1（例えば、マウスNotch1およびヒトNotch1）を認識する抗体が含まれうる。第1の標的と特異的に結合する抗体または結合モイエティーは第2の標的と特異的に結合してもよく、またはしなくてもよいことが理解されよう。このため、「特異的結合」は、排他的な結合、すなわち単一の標的との結合を（含むことはできるものの）必ずしも必要としない。したがって、抗体は、ある態様において、複数の標的と特異的に結合しうる。ある態様において、複数の標的が抗体上の同一の抗原結合部位による結合を受けてもよい。例えば、抗体が、場合によっては、それぞれが2種またはそれを上回るタンパク質上の同一のエピトープ（例えば、ヒトNotch1およびヒトNotch3）と特異的に結合する、2つの同一な抗原結合部位を含んでもよい。ある代替的な態様において、抗体が二重特異性であって、異なる特異性を有する少なくとも2つの抗原結合部位を含んでもよい。非限定的な一例として、二重特異性抗体は、Notch1タンパク質上のエピトープを認識する1つの抗原結合部位を含むことができ、かつ、DLL4などの第2のタンパク質上の異なるエピトープを認識する第2の異なる抗原結合部位をさらに含む。一般に、ただし必ずではないが、「結合」への言及は特異的結合を意味する。

【0041】

「ポリペプチド」および「ペプチド」および「タンパク質」という用語は、本明細書において互換的に用いられ、任意の長さのアミノ酸重合体のことを指す。重合体は線状または分枝状であってよく、修飾アミノ酸を含んでもよく、非アミノ酸が介在してもよい。これらの用語はまた、天然に、または介入によって；例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化、または他の任意の操作もしくは修飾、例えば標識用構成要素とのコンジュゲーションなどによって修飾されたアミノ酸重合体も範囲に

10

20

30

40

50

含む。また、例えば、1つまたは複数のアミノ酸類似体（例えば、非天然アミノ酸など）、ならびに当技術分野において公知の他の修飾を含有するポリペプチドも、この定義に含まれる。本発明のポリペプチドは抗体を基にしているため、ある態様において、ポリペプチドが単鎖または会合鎖（たとえば二量体または多量体）として存在しうことは理解されよう。

【0042】

「ポリヌクレオチド」および「核酸」という用語は、本明細書において互換的に用いられ、任意の長さのヌクレオチド重合体のことを指し、DNAおよびRNAを含む。ヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、修飾ヌクレオチドまたは塩基、および/もしくはそれらの類似体、またはDNAポリメラーゼもしくはRNAポリメラーゼによって重合体に組み込まれうる任意の基質であってよい。

10

【0043】

「高ストリンジェンシーの条件」は、(1) 洗浄のために低イオン強度および高温を使用する条件、例えば、50 °Cで、15mM塩化ナトリウム / 1.5mMクエン酸ナトリウム / 0.1% ドデシル硫酸ナトリウム；(2) ハイブリダイゼーション中にホルムアミドなどの変性剤を使用するもの、例えば、42 °Cで、50% (v/v) ホルムアミドを、0.1% ウシ血清アルブミン / 0.1% Ficoll / 0.1% ポリビニルピロリドン / 50mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH 6.5 とともに、5×SSC (0.75M NaCl、75mMクエン酸ナトリウム) 中で；または(3) ハイブリダイゼーション中に、42 °Cで、5×SSC中50%ホルムアミド、50mMリン酸ナトリウム (pH 6.8)、0.1% ピロリン酸ナトリウム、5×デンハルト溶液、超音波処理済みサケ精子DNA (50 μg/ml)、0.1% SDS、および10% デキストラン硫酸を使用し、42 °Cで0.2×SSC中および50%ホルムアミド中で洗浄し、その後EDTAを含有する0.1×SSCからなる高ストリンジェンシー洗浄を55 °Cで行うもの、によって特定することができる。

20

【0044】

2つまたはそれを上回る核酸またはポリペプチドの文脈における「同一の」または「一致」度 (percent "identity") という用語は、配列同一性の要素としていかなる保守的アミノ酸置換も考慮せずに、対応が最大になるように（必要であれば、ギャップを導入して）比較およびアラインメントを行った場合に、同じであるか、または同じであるヌクレオチドまたはアミノ酸残基を指定のパーセンテージで有する、2つまたはそれを上回る配列または部分配列のことを指す。一致度は、配列比較ソフトウェアもしくはアルゴリズムを用いて、または目視検査によって測定することができる。アミノ酸配列またはヌクレオチド配列のアラインメントを得るために用いられる、さまざまなアルゴリズムおよびソフトウェアが、当技術分野において公知である。これらには、BLAST、ALIGN、Megalign、BestFit、およびそれらの変形物が非限定的に含まれる。いくつかの態様において、本発明の2つの核酸またはポリペプチドは実質的に同一であり、このことは、対応が最大になるように比較およびアラインメントを行って、配列比較アルゴリズムを用いるかまたは目視検査によって測定した場合に、それらが、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、および、いくつかの態様においては、少なくとも95%、96%、97%、98%、99%のヌクレオチド同一性またはアミノ酸残基同一性を有することを意味する。いくつかの態様において、同一性は、長さが少なくとも約10残基、少なくとも約20残基、少なくとも約40~60残基、またはそれらの間の任意の整数値である配列の領域にわたって存在する。いくつかの態様において、同一性は、60~80残基よりも長い領域、例えば少なくとも約90~100残基にわたって存在し、いくつかの態様においては、配列は、ヌクレオチド配列のコード領域というような、比較される配列の完全長にわたって実質的に同一である。

30

40

【0045】

「保守的アミノ酸置換」とは、1つのアミノ酸残基が、類似の側鎖を有する別のアミノ酸残基によって置き換えられることをいう。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは当技術分野において定義されており、これには、塩基性側鎖（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極

50

性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、 γ -分枝側鎖（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）および芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）が含まれる。例えば、チロシンのフェニルアラニンへの置換は保存的置換と見なされる。好ましくは、本発明のポリペプチドおよび抗体の配列における保存的置換は、そのアミノ酸配列を含むポリペプチドまたは抗体の、そのポリペプチドまたは抗体が結合する抗原、すなわちNotchタンパク質との結合に影響を与えたり無効にしたりしない。抗原結合を消失させないヌクレオチドおよびアミノ酸の保存的置換を同定する方法は、当技術分野において周知である。

10

【0046】

本明細書で用いる「ベクター」という用語は、宿主細胞において関心対象の1つまたは複数の遺伝子または配列を送達することができ、通常発現することができる構築物を意味する。ベクターの例には、ウイルスベクター、裸のDNAまたはRNA発現ベクター、プラスミド、コスミドまたはファージベクター、カチオン性縮合剤に付随しているDNAまたはRNA発現ベクター、およびリポソーム内に封入されたDNAまたはRNA発現ベクターが非限定的に含まれる。

【0047】

「単離された」ポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、または組成物とは、天然には見られない形態にあるポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、または組成物のことである。単離されたポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞もしくは組成物には、それらがもはや天然に見られる形態ではない程度まで精製されたものが含まれる。いくつかの態様において、単離されたポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、または組成物は実質的に純粋である。

20

【0048】

本明細書で用いる場合、「実質的に純粋な」とは、純度が少なくとも50%（すなわち、混入物を含まない）である材料のことを指す。いくつかの態様において、材料は、純度が少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%である。

【0049】

「腫瘍」および「新生物」という用語は、過度の細胞成長または増殖に起因する、良性（非癌性）であるか、または前癌病変を含む悪性（癌性）であるかのいずれかである、あらゆる組織塊のことを指す。

30

【0050】

本明細書で用いる「転移」という用語は、癌が元の部位から身体の他の領域に波及または移行して、新たな場所に類似の癌病変が発生する過程のことを指す。「転移性」または「転移しつつある」細胞とは、近傍細胞との付着接着を失い、疾患の原発部位から続発部位へと（例えば、血流またはリンパを經由して）遊走する細胞のことである。

【0051】

「癌幹細胞」および「CSC」および「腫瘍幹細胞」および「腫瘍始原細胞」および「固形腫瘍幹細胞」および「腫瘍形成性幹細胞」という用語は、本明細書において互換的に用いられ、（1）高度の増殖能を有し；2）非対称細胞分裂を行って、増殖能力または発生能力の低下した1つまたは複数の種類の分化した子孫を生じることができ；かつ（3）自己複製または自己維持のために対称細胞分裂を行うことができる、腫瘍由来の細胞の集団のことを指す。いくつかの態様において、これらの特性は「癌幹細胞」または「腫瘍始原細胞」に対して、免疫低下宿主（例えば、マウス）に累代移植された時に、腫瘍を形成できない大部分の腫瘍細胞と比べ、腫瘍触知可能な腫瘍を形成する能力を付与する。癌幹細胞は、無秩序な様式で自己複製と分化とを行い、突然変異が起こるにつれて経時的に変化する異常な細胞型を伴う腫瘍を形成する。

40

【0052】

「癌細胞」または「腫瘍細胞」という用語、および文法的同等物は、腫瘍細胞集団の大

50

部分を構成する非腫瘍形成性細胞、および腫瘍形成性幹細胞（癌幹細胞）の両方を含む、腫瘍または前癌病変に由来する細胞の全集団のことを指す。本明細書で用いる場合、「腫瘍細胞」という用語は、複製および分化する能力がない腫瘍細胞のみを指す場合には、そのような腫瘍細胞を癌幹細胞と区別するために「非腫瘍形成性」という用語で修飾される。

【0053】

本明細書で用いられる「腫瘍形成性の」という用語は、自己複製（さらなる腫瘍形成性癌幹細胞を生じる）および他のすべての腫瘍細胞を生じさせる増殖（分化した、それ故に非腫瘍形成性である腫瘍細胞を生じる）の特性を含む、癌幹細胞の機能的特徴のことを指す。

10

【0054】

本明細書で用いる「腫瘍形成能」という用語は、腫瘍由来の細胞のランダムな試料が、免疫力低下宿主（例えば、マウス）への連続移植後に触知可能腫瘍を形成する能力のことを指す。この定義は、免疫力低下宿主（例えば、マウス）への連続移植後に触知可能腫瘍を形成する、癌性幹細胞の濃縮および/または単離された集団も含む。

【0055】

「対象」という用語は、特定の治療のレシピエントとなる予定の、ヒト、非ヒト霊長動物、イヌ科動物、ネコ科動物、齧歯動物などを非限定的に含む、任意の動物（例えば、哺乳動物）のことを指す。「対象」および「患者」という用語は、本明細書において互換的に用いられる。典型的には、本明細書で用いる「対象」および「患者」という用語はヒト対象に言及している。

20

【0056】

「薬学的に許容される」という用語は、ヒトを含む動物における使用に関して、連邦政府もしくは州政府の規制当局により認可されている（もしくは認可可能である）か、または米国薬局方もしくは他の一般に認められている薬局方に列記されている、生成物または化合物のことを指す。

【0057】

「薬学的に許容される添加剤、担体または補助剤」または「許容される薬学的担体」という用語は、本開示の少なくとも1つの作用物質と一緒に対象に投与することができ、かつその作用物質の活性を損なわない、添加剤、担体または補助剤のことを指す。添加剤、担体または補助剤は、治療効果を送達するのに十分な用量で作用物質とともに投与された場合に無毒性であるべきである。薬学的に許容される添加剤、担体または補助剤は、当業者によって、およびFDAによって、任意の製剤の不活性成分であると一般に判断されている。

30

【0058】

「薬学的に許容される媒体」という語句は、本開示の活性物質の少なくとも1つとともに投与される希釈剤、補助剤、添加剤または担体のことを指す。

【0059】

「治療的有効量」という用語は、対象または哺乳動物における疾患または障害を「治療する」のに有効な、結合物質、抗体、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、有機小分子または他の薬物の量のことを指す。癌の場合には、薬物（例えば、抗体）の治療的有効量は、癌細胞数を減少させること；腫瘍サイズを縮小させること；例えば、軟部組織および骨の中への癌の波及を含む、末梢臓器への癌細胞浸潤を阻害および/または停止させること；腫瘍転移を阻害および/または停止させること；腫瘍増殖を阻害および/または停止させること；癌に関連した症状の1つもしくは複数がある程度軽減すること；罹病率および死亡率を低下させること；生活の質を向上させること；腫瘍の腫瘍形成性、腫瘍形成頻度、もしくは腫瘍形成能を低下させること；腫瘍内の癌幹細胞の数もしくは頻度を減少させること；腫瘍形成細胞を非腫瘍形成状態に分化させること；またはそのような効果の組み合わせが可能である。薬物が既存の癌細胞の増殖を防止し、かつ/またはこれを死滅させる限りにおいて、それは細胞分裂抑制性および/または細胞傷害性であると称することがで

40

50

きる。

【0060】

「治療する」または「治療」または「治療すること」または「緩和する」または「緩和すること」などの用語は、1) 診断された病的状態または障害を治癒させる、緩徐化する、その症状を和らげる、および/またはその進行を停止させる治療的手段、ならびに2) 標的とする病的状態または障害の発症を予防および/または緩徐化する予防処置的または予防的手段の両方を指す。したがって、治療を必要とする者には、既に障害を有する者；障害を有しやすい者；および障害を予防すべきである者が含まれる。ある態様において、患者が以下のうち1つまたは複数を示すならば、対象は本発明の方法によって癌が首尾よく「治療されている」：癌細胞または腫瘍細胞の数の減少または完全な欠如；腫瘍サイズの縮小；例えば軟部組織および骨の中への癌の波及を含む、末梢臓器への癌細胞の浸潤の阻害もしくは欠如；腫瘍転移の阻害もしくは欠如；腫瘍増殖の阻害もしくは欠如；特定の癌に関連した1つもしくは複数の症状の緩和；罹病率および死亡率の低下；生活の質の向上；腫瘍の腫瘍形成性、腫瘍形成頻度、もしくは腫瘍形成能の低下；腫瘍内の癌幹細胞の数もしくは頻度の減少；腫瘍形成細胞の非腫瘍形成状態への分化；またはこれらの効果の何らかの組み合わせ。

10

【0061】

本開示および特許請求の範囲において用いられる場合、「1つの(a)」「1つの(an)」および「その(the)」という単数形は、文脈上明らかに別の指示がない限り、複数形も含む。

20

【0062】

本明細書において態様が「含む」という言葉で記述されている場合は常に、「からなる」および/または「から本質的になる」によって記述される他の類似の態様も提供されることは了解されよう。同じく、本明細書において態様が「から本質的になる」という言葉で記述されている場合は常に、「からなる」によって記述される他の類似の態様も提供されることも了解されよう。

【0063】

本明細書において「Aおよび/またはB」のような語句に用いられる「および/または」という用語は、AおよびBも、AまたはBも、A(のみ)およびB(のみ)も含むものとする。同様に、「A、B、および/またはC」のような語句に用いられる「および/または」という用語は、以下の態様のそれぞれを範囲に含むものとする：A、B、およびC；A、B、またはC；AまたはC；AまたはB；BまたはC；AおよびC；AおよびB；BおよびC；A(のみ)；B(のみ)；ならびにC(のみ)。

30

【0064】

III. 使用方法および薬学的組成物

本発明は、対象における癌を、本明細書に記載のNotch1結合物質を用いて治療するための方法を提供する。いくつかの態様において、対象における癌を治療する方法は、対象に対してNotch1結合物質の治療的有効量を投与する段階を含む。いくつかの態様において、癌を治療する方法は、対象に対してNotch1結合物質の治療的有効量を投与する段階を含む、対象における腺癌を治療する段階を含む。いくつかの態様において、対象における腺癌を治療する方法は、対象に対してNotch1結合物質の治療的有効量を投与する段階を含む。いくつかの態様において、癌を治療する方法は、対象に対してNotch1結合物質の治療的有効量を投与する段階を含む、対象における腺様嚢胞癌を治療する段階を含む。いくつかの態様において、対象における腺様嚢胞癌を治療する方法は、対象に対してNotch1結合物質の治療的有効量を投与する段階を含む。

40

【0065】

いくつかの態様において、対象における腺様嚢胞癌を治療する方法は、(a)腺様嚢胞癌のNotch1 ICDのレベルがNotch1 ICDの所定のレベルと比較して上昇しているかまたは高いか否かを判定する段階；および(b)Notch1結合物質の治療的有効量を対象に投与する段階を含む。いくつかの態様において、対象における腺様嚢胞癌を治療する方法は、(a

50

）対象から試料を入手する段階、（b）試料中のNotch1 ICDのレベルを決定する段階；および（c）Notch1 ICDのレベルがNotch1 ICDの所定のレベルと比較して上昇しているかまたは高い場合にNotch1結合物質の治療的有効量を対象に投与する段階を含む。いくつかの態様において、対象における腺様嚢胞癌を治療する方法は、（a）腺様嚢胞癌がNotch1突然変異を有するか否かを判定する段階、および（b）Notch1結合物質の治療的有効量を対象に投与する段階を含む。

【0066】

いくつかの態様において、対象における腺様嚢胞癌を治療する方法は、（a）腺様嚢胞癌のNotch1 ICDのレベルがNotch1 ICDの所定のレベルと比較して上昇しているかまたは高いか否かを判定する段階；および（b）ヒトNotch1と特異的に結合する抗体の治療的有効量を対象に投与する段階を含み、ここで抗体は

RGYWIE (SEQ ID NO:15)

を含む重鎖CDR1、

QILPGTGRRTNYNEKFKG (SEQ ID NO:16)

を含む重鎖CDR2、および

FDGNYGYAMDY (SEQ ID NO:17)

を含む重鎖CDR3、ならびに

RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:18)

を含む軽鎖CDR1、

GTNNRAP (SEQ ID NO:19)

を含む軽鎖CDR2、および

ALWYSNHWVFGGGTKL (SEQ ID NO:20)

を含む軽鎖CDR3を含む。いくつかの態様において、対象における腺様嚢胞癌を治療する方法は、（a）腺様嚢胞癌がNotch1突然変異を有するか否かを判定する段階；および（b）ヒトNotch1と特異的に結合する抗体の治療的有効量を対象に投与する段階を含み、ここで抗体は

RGYWIE (SEQ ID NO:15)

を含む重鎖CDR1、

QILPGTGRRTNYNEKFKG (SEQ ID NO:16)

を含む重鎖CDR2、および

FDGNYGYAMDY (SEQ ID NO:17)

を含む重鎖CDR3、ならびに

RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:18)

を含む軽鎖CDR1、

GTNNRAP (SEQ ID NO:19)

を含む軽鎖CDR2、および

ALWYSNHWVFGGGTKL (SEQ ID NO:20)

を含む軽鎖CDR3を含む。いくつかの態様において、対象における腺様嚢胞癌を治療する方法は、ヒトNotch1と特異的に結合する抗体の治療的有効量を対象に投与する段階を含み、ここで抗体は

RGYWIE (SEQ ID NO:15)

を含む重鎖CDR1、

QILPGTGRRTNYNEKFKG (SEQ ID NO:16)

を含む重鎖CDR2、および

FDGNYGYAMDY (SEQ ID NO:17)

10

20

30

40

50

を含む重鎖CDR3、ならびに
RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:18)
を含む軽鎖CDR1、
GTNNRAP (SEQ ID NO:19)

を含む軽鎖CDR2、および
ALWYSNHWVFGGGTKL (SEQ ID NO:20)

を含む軽鎖CDR3を含み、対象は腺様嚢胞癌のNotch1 ICDのレベルがNotch1 ICDの所定のレベルと比較して上昇しているかまたは高いことに基づいて選択される。いくつかの態様において、対象における腺様嚢胞癌を治療する方法は、ヒトNotch1と特異的に結合する抗体の治療的有効量を対象に投与する段階を含み；ここで抗体は RGYWIE (SEQ ID NO:15)

10

を含む重鎖CDR1、
QILPGTGRRTNYNEKFKG (SEQ ID NO:16)

を含む重鎖CDR2、および
FDGNYGYAMDY (SEQ ID NO:17)
を含む重鎖CDR3、ならびに
RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:18)
を含む軽鎖CDR1、
GTNNRAP (SEQ ID NO:19)

20

を含む軽鎖CDR2、および
ALWYSNHWVFGGGTKL (SEQ ID NO:20)
を含む軽鎖CDR3を含み、かつ、対象は、Notch1変異を有する腺様嚢胞癌に基づいて選択される。

【0067】

いくつかの態様において、腺癌の増殖を阻害する方法は、腺癌をNotch1結合物質の有効量と接触させる段階を含む。いくつかの態様において、腺様嚢胞癌の増殖を阻害する方法は、腺様嚢胞癌をNotch1結合物質の有効量と接触させる段階を含む。いくつかの態様において、対象における腺癌の増殖を阻害する方法は、Notch1結合物質の治療的有効量を対象に投与する段階を含む。いくつかの態様において、対象における腺様嚢胞癌の増殖を阻害する方法は、Notch1結合物質の治療的有効量を対象に投与する段階を含む。

30

【0068】

いくつかの態様において、腺様嚢胞癌のサイズを縮小させる方法は、癌をNotch1結合物質の有効量と接触させる段階を含む。いくつかの態様において、対象における腺様嚢胞癌のサイズを縮小させる方法は、Notch1結合物質の治療的有効量を対象に投与する段階を含む。

40

【0069】

本明細書に記載の方法のいくつかの態様において、腺様嚢胞癌は再発性である。いくつかの態様において、腺様嚢胞癌は転移している。いくつかの態様において、腺様嚢胞癌は肺、肝臓、骨、腎臓、および/または脳に転移している。いくつかの態様において、腺様嚢胞癌はある特定の治療に対して不応性である。いくつかの態様において、腺様嚢胞癌は化学療法不応性である。

【0070】

本明細書に記載の方法のいくつかの態様において、抗Notch1抗体OMP-52M51に対する腫瘍（例えば、腺様嚢胞癌）の感受性は、Notch1 ICDの発現レベルによって予想される。Notch1 ICDが高レベルであることと抗Notch1抗体OMP-52M51に対する腫瘍の反応性との相関

50

を利用することで、癌を治療するための方法を改良することができる。Notch1 ICDのレベルに基づいて腫瘍が治療に反応する可能性が高いと判定された癌患者を抗Notch1抗体OMP-52M51による治療のために選択することにより、全体的な治療的価値が高まるはずである。また、腫瘍が治療に反応しない可能性が高いと判定された癌患者をOMP-52M51療法のために選択しないことによって、治療有効性も改善することができる。

【0071】

本明細書に記載の方法のいくつかの態様において、腺癌はNotch1 ICDのレベルが高い。いくつかの態様において、腺様嚢胞癌はNotch1 ICDのレベルが高い。いくつかの態様において、腺癌のNotch1 ICDのレベルはNotch1 ICDの所定のレベルと比較して上昇しているかまたは高い。いくつかの態様において、腺様嚢胞癌のNotch1 ICDのレベルは、Notch1 ICDの所定のレベルと比較して上昇しているかまたは高い。

10

【0072】

本明細書に記載の方法のいくつかの態様において、腺癌はNotchシグナル伝達を生じさせる突然変異を含む。いくつかの態様において、腺様嚢胞癌はNotchシグナル伝達を生じさせる突然変異を含む。いくつかの態様において、腺癌はNotch1突然変異を含む。いくつかの態様において、腺様嚢胞癌はNotch1突然変異を含む。いくつかの態様において、Notch1突然変異はNotch1のヘテロ二量体化(HD)ドメイン内にある。いくつかの態様において、Notch1突然変異はNotch1のトランス活性化ドメイン(TAD)内にある。いくつかの態様において、Notch1突然変異はNotch1のPESTドメイン内にある。いくつかの態様において、Notch1突然変異はNotch1のアミノ酸1570~1736の内部にある。いくつかの態様において、Notch1突然変異はNotch1のアミノ酸2090~2320の内部にある。いくつかの態様において、Notch1突然変異はNotch1のアミノ酸2300~2555の内部にある。いくつかの態様において、Notch1突然変異はSEQ ID NO: 41のアミノ酸1570~1736の内部にある。いくつかの態様において、Notch1突然変異はSEQ ID NO: 41のアミノ酸2090~2320の内部にある。いくつかの態様において、Notch1突然変異はSEQ ID NO: 41のアミノ酸2300~2555の内部にある。いくつかの態様において、Notch1突然変異は活性化突然変異である。いくつかの態様において、Notch1突然変異はミスセンス突然変異である。いくつかの態様において、Notch1突然変異はナンセンス突然変異である。いくつかの態様において、Notch1突然変異はフレームシフト突然変異である。いくつかの態様において、Notch1突然変異はNotch経路シグナル伝達を増加させる。いくつかの態様において、Notch1突然変異はNotch1シグナル伝達を増加させる。

20

30

【0073】

いくつかの態様において、突然変異はNotch1タンパク質のリガンド非依存的な分解および活性化を生じさせる。いくつかの態様において、突然変異はC末端PESTドメインを除去して、Notch1 ICDを安定化する。いくつかの態様において、突然変異は腫瘍細胞におけるNotch1 ICDレベルの増大または上昇を生じさせる。いくつかの態様において、突然変異はNotch1遺伝子またはNotch1タンパク質の中にある。いくつかの態様において、突然変異はNotch1以外の遺伝子またはタンパク質の中にあり、その場合にNotch1シグナル伝達が増加する。いくつかの態様において、突然変異はFBXW7(これはNotchの負の調節因子である)中にある。いくつかの態様において、突然変異はFBXW7中にある機能喪失型突然変異である。

40

【0074】

いくつかの態様において、腺癌はp53中に突然変異を含む。いくつかの態様において、腺様嚢胞癌はp53中に突然変異を含む。p53の配列は当技術分野において周知であり、UniProtKB No. P04637およびGenBank No. NP_000537.3で参照することができる。いくつかの態様において、p53中の突然変異はDNA結合性コアダメイン(DBD)の内部にある。いくつかの態様において、p53中の突然変異はSEQ ID NO: 40のアミノ酸102~292の内部にある。いくつかの態様において、p53中の突然変異はp53の残基248にある。いくつかの態様において、p53中の突然変異はSEQ ID NO: 40の残基248にある。いくつかの態様において、p53の残基248にあるp53中の突然変異は、アルギニンからグルタミンへの置換である。いくつか

50

かの態様において、p53中の突然変異はp53の残基282にある。いくつかの態様において、p53中の突然変異はSEQ ID NO:40の残基282にある。いくつかの態様において、残基282にあるp53中の突然変異は、アルギニンからトリプトファンへの置換である。

【0075】

いくつかの態様において、腺癌または腺様嚢胞癌の増殖を阻害する方法は、癌を抗Notch1抗体と接触させる段階を含む。いくつかの態様において、対象における腺癌または腺様嚢胞癌を治療する方法は、対象に抗Notch1抗体の治療的有効量を投与する段階を含む。いくつかの態様において、対象における腺様嚢胞癌を治療する方法は、(a)腺様嚢胞癌がNotch1突然変異を含むか否かを判定する段階、および(b)対象に対してNotch1結合物質の治療的有効量を投与する段階を含む。いくつかの態様において、対象における腺癌または腺様嚢胞癌を治療する方法は、(a)癌のNotch1 ICDのレベルがNotch1 ICDの所定のレベルと比較して上昇しているかまたは高いか否かを判定する段階、および(b)対象に対してNotch1結合物質の治療的有効量を投与する段階を含む。

10

【0076】

本明細書に記載の方法のある態様において、Notch1結合物質はヒトNotch1と特異的に結合する抗体(抗Notch1抗体)である。いくつかの態様において、抗Notch1抗体は、

RGYWIE (SEQ ID NO:15)

を含む重鎖CDR1、

QILPGTGRTNYNEKFKG (SEQ ID NO:16)

20

を含む重鎖CDR2、および

FDGNYGYAMDY (SEQ ID NO:17)

を含む重鎖CDR3を含む。いくつかの態様において、抗Notch1抗体は、

RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:18)

を含む軽鎖CDR1、

GTNNRAP (SEQ ID NO:19)

を含む軽鎖CDR2、および

ALWYSNHWVFGGGTKL (SEQ ID NO:20)

を含む軽鎖CDR3を含む。ある態様において、抗Notch1抗体は、

30

RGYWIE (SEQ ID NO:15)

を含む重鎖CDR1、

QILPGTGRTNYNEKFKG (SEQ ID NO:16)

を含む重鎖CDR2、および

FDGNYGYAMDY (SEQ ID NO:17)

を含む重鎖CDR3、ならびに

RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:18)

40

を含む軽鎖CDR1、

GTNNRAP (SEQ ID NO:19)

を含む軽鎖CDR2、および

ALWYSNHWVFGGGTKL (SEQ ID NO:20)

を含む軽鎖CDR3を含む。ある態様において、抗Notch1抗体は、SEQ ID NO:8またはSEQ ID NO:26を含む重鎖可変領域を含む。ある態様において、抗Notch1抗体は、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:32、またはSEQ ID NO:38を含む軽鎖可変領域をさらに含む。ある態様において、抗Notch1抗体は、SEQ ID NO:8を含む重鎖可変領域およびSEQ ID NO:14を含む軽鎖可変領域を含む。ある態様において、抗Notch1抗体は、SEQ ID NO:26を含む重鎖可変

50

領域およびSEQ ID NO : 32を含む軽鎖可変領域を含む。ある態様において、抗Notch1抗体は、SEQ ID NO : 26を含む重鎖可変領域およびSEQ ID NO : 38を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの態様において、抗Notch1抗体はSEQ ID NO : 23を含む。いくつかの態様において、抗Notch1抗体は、SEQ ID NO : 29またはSEQ ID NO : 35をさらに含む。いくつかの態様において、抗Notch1抗体はSEQ ID NO : 23およびSEQ ID NO : 29を含む。いくつかの態様において、抗Notch1抗体はSEQ ID NO : 23およびSEQ ID NO : 35を含む。ある態様において、抗Notch1抗体は、寄託番号PTA-9549を有する、ATCCに寄託されたプラスミドによってコードされる抗体と同じ重鎖アミノ酸配列および軽鎖アミノ酸配列を含む。ある態様において、抗Notch1抗体は、ブダペスト条約の規定に基づいて2008年10月15日にAmerican Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA, 20110に寄託された、ATCC寄託番号PTA-9549を有するプラスミドによってコードされる。ある態様において、抗Notch1抗体は、ブダペスト条約の規定に基づいて2008年8月7日にAmerican Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA, 20110に寄託された、ATCC寄託番号PTA-9405を有する、ATCCに寄託されたハイブリドーマによって産生される抗体と同じCDR配列を含む。ある態様において、抗Notch1抗体は、寄託番号PTA-9405を有する、ATCCに寄託されたハイブリドーマによって産生される抗体のヒト化バージョンである。ある態様において、抗Notch1抗体はOMP-52M51である。ある態様において、抗Notch1抗体はOMP-52M51のヒト化バージョンである。ある態様において、抗Notch1抗体はOMP-52M51-H4L3である。

10

【0077】

20

本明細書に記載の方法のある態様において、抗Notch1抗体は、ヒトNotch1に対する特異的結合をめぐって、寄託番号PTA-9549を有する、ATCCに寄託されたプラスミドによってコードされるのと同じ重鎖可変領域および軽鎖可変領域と競合する。ある態様において、抗Notch1抗体は、ヒトNotch1に対する特異的結合をめぐって、寄託番号PTA-9549を有する、ATCCに寄託されたプラスミドによってコードされる抗体と競合する。ある態様において、抗Notch1抗体は、ヒトNotch1に対する特異的結合をめぐって、寄託番号PTA-9405を有する、ATCCに寄託されたハイブリドーマによって産生される抗体と競合する。ある態様において、抗Notch1抗体は、ヒトNotch1に対する特異的結合をめぐって、OMP-52M51と競合する。ある態様において、抗Notch1抗体は、ヒトNotch1に対する特異的結合をめぐって、OMP-52M51のヒト化バージョンと競合する。ある態様において、抗Notch1抗体は、ヒトNotch1に対する特異的結合をめぐって、OMP-52M51-H4L3と競合する。

30

【0078】

もう1つの局面において、本発明は、Notch1結合物質による治療に反応する（「感受性である」）かまたは反応しない（「抵抗性である」）可能性が高い腫瘍を、および/または腺癌もしくは腺様嚢胞癌を有する患者を同定するため、選択するため、および/または層別化するための方法を提供する。加えて、Notch1結合物質による治療に反応する可能性が高い、治療に反応すると予想される、および/または治療に反応すると同定された、腺癌または腺様嚢胞癌を有する患者を治療するための方法も提供される。

【0079】

いくつかの態様においては、本明細書に記載のNotch1結合物質のそれぞれを非限定的に含むNotch1結合物質（例えば、抗Notch1抗体）による治療のための、腺癌または腺様嚢胞癌を有する対象を同定する方法または対象を選択する方法が提供される。いくつかの態様において、腺様嚢胞癌を有する対象をNotch1結合物質による治療のために選択する方法は、（a）腺様嚢胞癌におけるNotch1 ICDのレベルを決定する段階；および（b）腺様嚢胞癌のNotch1 ICDのレベルがNotch ICDの所定のレベルと比較して上昇しているかまたは高い場合に、対象をNotch1結合物質による治療のために選択する段階を含む。いくつかの態様において、腺様嚢胞癌を有する対象をNotch1結合物質による治療のために選択する方法は、（a）対象から試料を入手する段階、（b）試料中のNotch1 ICDのレベルを決定する段階；および（c）試料のNotch1 ICDのレベルがNotch1 ICDの所定のレベルと比較して上昇しているかまたは高い場合に、対象をNotch1結合物質による治療のために選択する段階を含

40

50

む。いくつかの態様において、Notch1結合物質による治療のために腺様嚢胞癌を有する対象を選択する段階は、(a)腺様嚢胞癌がNotch1突然変異を有するか否かを判定する段階、および(b)腺様嚢胞癌がNotch1突然変異を有する場合に、対象をNotch1結合物質による治療のために選択する段階を含む。いくつかの態様において、Notch1結合物質による治療のために腺様嚢胞癌を有する対象を選択する段階は、(a)対象から試料を入手する段階；(b)試料がNotch1突然変異を有するか否かを判定する段階、および(c)試料がNotch1突然変異を有する場合に、対象をNotch1結合物質による治療のために選択する段階を含む。いくつかの態様において、本方法は、本明細書に記載のNotch1結合物質の治療的有効量を対象に投与する段階を含む。

【0080】

いくつかの態様において、腺様嚢胞癌を有する対象をヒトNotch1と特異的に結合する抗体による治療のために選択する方法は、(a)腺様嚢胞癌におけるNotch1 ICDのレベルを決定する段階；(b)腺様嚢胞癌のNotch1 ICDのレベルがNotch1 ICDの所定のレベルと比較して上昇しているかまたは高い場合に、対象を抗体による治療のために選択する段階；および(c)抗体の治療的有効量を対象に投与する段階を含み、ここで抗体は

RGYWIE (SEQ ID NO:15)

を含む重鎖CDR1、

QILPGTGRTNYNEKFKG (SEQ ID NO:16)

を含む重鎖CDR2、および

FDGNYGYAMDY (SEQ ID NO:17)

を含む重鎖CDR3、ならびに

RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:18)

を含む軽鎖CDR1、

GTNNRAP (SEQ ID NO:19)

を含む軽鎖CDR2、および

ALWYSNHWVFGGGTKL (SEQ ID NO:20)

を含む軽鎖CDR3を含む。いくつかの態様において、腺様嚢胞癌を有する対象をヒトNotch1と特異的に結合する抗体による治療のために選択する方法は、(a)腺様嚢胞癌がNotch1突然変異を有するか否かを判定する段階；(b)腺様嚢胞癌がNotch1突然変異を有する場合に、対象を抗体による治療のために選択する段階；および(c)抗体の治療的有効量を対象に投与する段階を含み、ここで抗体は、抗体は

RGYWIE (SEQ ID NO:15)

を含む重鎖CDR1、

QILPGTGRTNYNEKFKG (SEQ ID NO:16)

を含む重鎖CDR2、および

FDGNYGYAMDY (SEQ ID NO:17)

を含む重鎖CDR3、ならびに

RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:18)

を含む軽鎖CDR1、

GTNNRAP (SEQ ID NO:19)

を含む軽鎖CDR2、および

ALWYSNHWVFGGGTKL (SEQ ID NO:20)

を含む軽鎖CDR3を含む。

【0081】

本明細書に記載の方法のいくつかの態様において、Notch1 ICDの所定のレベルは、正常組織試料におけるNotch1 ICDの量である。いくつかの態様において、所定のNotch1 ICDの

10

20

30

40

50

レベルは、Notch1活性化突然変異を伴わない癌試料または腫瘍試料におけるNotch1 ICDの量である。いくつかの態様において、所定のNotch1 ICDのレベルは、免疫組織化学アッセイにおけるH-スコアが1またはそれ未満である組織試料におけるNotch1 ICDの量である。いくつかの態様において、所定のNotch1 ICDのレベルは、IHCアッセイにおいて陽性対照および陰性対照を用いて決定されたH-スコアのカットオフレベルである。

【0082】

腫瘍または癌が特定の遺伝子の内部に突然変異を有するか否かを判定するための方法は当業者に公知である。腫瘍または癌がNotch1突然変異を有するか否かを判定するための方法は当業者に公知である。核酸レベルでの判定の場合、方法には、PCRに基づくアッセイ、マイクロアレイ分析およびヌクレオチドシーケンシング（例えば、NextGenシーケンシング、全ゲノムシーケンシング（WGS））が非限定的に含まれる。

10

【0083】

腫瘍試料におけるNotch1を検出するための方法は当業者に公知である。腫瘍試料内部のNotch1 ICDを検出するための方法は、本明細書において提供される。

【0084】

本明細書に記載の方法のいくつかの態様において、試料は対象から得られる。いくつかの態様において、試料は細胞溶解物へと処理される。いくつかの態様において、試料はDNAへと処理される。いくつかの態様において、試料はRNAへと処理される。

【0085】

本明細書に記載の方法のいくつかの態様において、試料には、腫瘍生検試料、コア生検組織試料、細針吸引試料、毛包、または体液の試料、例えば血液、血漿、血清、リンパ、腹水、嚢胞液または尿などといった、あらゆる臨床的に妥当な組織試料が非限定的に含まれる。いくつかの態様において、試料は、腺癌または腺様嚢胞癌を有する患者から採取される。いくつかの態様において、試料は原発性腫瘍である。いくつかの態様において、試料は転移物である。試料は、ヒトから、または非ヒト哺乳動物、例えばマウス、ラット、非ヒト霊長動物、イヌ科動物、ネコ科動物、反芻動物、ブタもしくはヒツジなどから採取することができる。いくつかの態様において、試料は複数の時点で、例えば、治療前、治療中、および/または治療後に、対象から採取される。いくつかの態様において、試料は、例えば、原発性腫瘍からの試料、および離れた場所にある転移からの試料というように、対象における異なる場所から採取される。

20

30

【0086】

本明細書に記載の方法のいくつかの態様において、試料は、パラフィン包埋し固定した組織試料である。いくつかの態様において、試料はホルマリン固定してパラフィン包埋した（FFPE）組織試料である。いくつかの態様において、試料は新鮮な組織（例えば、腫瘍）試料である。いくつかの態様において、試料は凍結した組織試料である。いくつかの態様において、試料は新鮮な凍結（FF）組織（例えば、腫瘍）試料である。いくつかの態様において、試料は液体から単離された細胞である。いくつかの態様において、試料は血中循環腫瘍細胞（CTC）である。いくつかの態様において、試料は保管組織試料である。いくつかの態様において、試料は、診断、治療、および/または転帰の経歴が判明している保管組織試料である。いくつかの態様において、試料は組織のブロックである。いくつかの態様において、試料は分散細胞である。いくつかの態様において、試料サイズは細胞約1個～細胞約 1×10^6 個またはそれを上回る。いくつかの態様において、試料サイズは細胞約10個～細胞約 1×10^5 個である。いくつかの態様において、試料サイズは細胞約10個～約10,000細胞である。いくつかの態様において、試料サイズは細胞約10個～細胞約1,000個である。いくつかの態様において、試料サイズは細胞約10個～細胞約100個である。いくつかの態様において、試料サイズは細胞約1個～細胞約10個である。いくつかの態様において、試料サイズは単細胞である。

40

【0087】

いくつかの態様において、Notch1発現は、タンパク質発現を遺伝子発現と比較して評価することによって分析される。タンパク質発現の分析のために一般的に用いられる方法に

50

は、免疫組織化学（IHC）に基づく方法、抗体に基づく方法、および質量分析に基づく方法が非限定的に含まれる。遺伝子産物（例えば、タンパク質）の発現を検出するには、抗体、一般にモノクローナル抗体を用いることができる。いくつかの態様において、抗体は抗体自体の直接標識によって検出することができる。他の態様においては、標識されていない一次抗体を、標識された二次抗体とともに用いる。

【0088】

いくつかの態様において、Notch1発現は、多分析物プロファイル検査、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、放射線免疫アッセイ、ウエスタンブロットアッセイ、免疫蛍光アッセイ、酵素免疫アッセイ、免疫沈降アッセイ、化学発光アッセイ、免疫組織化学（IHC）アッセイ、ドットブロットアッセイ、スロットブロットアッセイ、タンパク質アレイ、およびFACSを非限定的に含む、当業者に公知のアッセイによって決定される。いくつかの態様において、Notch1 ICDのレベルはIHCアッセイによって決定される。

10

【0089】

本明細書に記載の方法のいくつかの態様において、Notch1 ICDのレベルは、Notch1 ICDと特異的に結合する作用物質を用いて決定される。いくつかの態様において、Notch1 ICDのレベルは、Notch1 ICDと特異的に結合するが完全長Notch1とは結合しない作用物質を用いて決定される。Notch1 ICDに対する特異的結合を示すあらゆる分子実体を、試料におけるNotch1 ICDタンパク質のレベルを決定するために使用することができる。特異的結合物質には、抗体、抗体模倣体、およびポリヌクレオチド（例えば、アプタマー）が非限定的に含まれる。当業者は、要求される特異性の度合いは、Notch1 ICDを検出するために用いられる特定のアッセイによって決まることを理解している。いくつかの態様において、Notch1 ICDのレベルを検出および/または決定するために用いられる作用物質は抗Notch1 ICD抗体である。いくつかの態様において、抗Notch1 ICD抗体は抗体D3B8（番号4147、Cell Signaling Technology）である。

20

【0090】

抗体がアッセイに用いられるいくつかの態様において、抗体は検出可能なように標識されている。検出可能な物質の例には、さまざまな酵素、配合団、蛍光性材料、発光性材料、生物発光性材料、および放射性材料が含まれる。適した酵素の例には、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼが含まれる；適した配合団複合体の例には、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンが含まれる；適した蛍光性材料の例には、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリドまたはフィコエリトリンが含まれる；発光性材料の例には、ルミノールが含まれる；生物発光性材料の例には、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびエクオリンが含まれる；ならびに、適した放射性材料の例には ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 、または ^3H が含まれる。

30

【0091】

本明細書に記載の方法のいくつかの態様において、Notch1 ICDのレベルはIHCアッセイを用いて決定される。例えば、4 μm 厚のFFPE切片を腫瘍試料から切り出して、コーティングしたスライドガラス上にマウントする。組織を脱パラフィン処理して、抗原回収のためにそれらをキシレン、100%エタノール、95%エタノール、70%エタノール、および蒸留水中で連続してインキュベートすることによって再水和させる。スライドを回収用溶液の中に入れ、抗原回収用のデクローカー（decloaker）の中に入れる。内因性ペルオキシダーゼ活性を阻止するためにスライドを過酸化水素中でインキュベートし、PBS中で洗浄する。非特異的なバックグラウンド染色を阻止するためにスライドをブロッカー中でインキュベートする。スライドを抗Notch1 ICD抗体とともに適切な時間にわたってインキュベートする。特異的結合を、ジアミノベンジジン（DAB）を含むキットを用いて検出する。切片をヘマトキシリンで対比染色する。いくつかの態様においては、FFPE切片を、コーティングしたスライドガラス上にマウントした上で、自動システム、例えばVentana BenchMark ULTRA装置を用い、Ventana試薬を用いて染色する。いくつかの態様において、IHCアッセ

40

50

イに用いられる抗体は抗Notch1 ICD抗体D3B8である。

【0092】

IHCスライドは自動装置を用いて分析してもよく、または顕微鏡によって手作業で評価してもよい。各腫瘍の核の染色強度(0:発現なし、1:弱い発現、2:中程度の発現、3:強い発現)を測定し、各染色レベルの核を計数して、各タイプのパーセンテージを算出する。これらのデータを総合して各組織切片に関する加重H-スコアとする:H-スコア = $[3 \times (3+\text{核の}\%)] + [2 \times (2+\text{核の}\%)] + [1 \times (1+\text{核の}\%)]$ 。これらのパラメータを用いて得られる最高スコアは、H-スコア = 300である。いくつかの態様において、H-スコアが1またはそれ未満であれば陰性で見なされる。いくつかの態様において、IHCアッセイはカットオフ値を有する。いくつかの態様において、IHCアッセイは特異性に関するカットオフ値を有する。いくつかの態様において、IHCアッセイは有効性に関するカットオフ値を有する。いくつかの態様において、IHCアッセイは、陽性および陰性の腫瘍組織のスクリーニングによって決定されたカットオフ値を有する。いくつかの態様において、IHCアッセイは約25というカットオフ値を有する。いくつかの態様において、IHCアッセイは、約30、約40、約50、約60、約70、約80、約90、約100、または約110、または約120というカットオフ値を有する。いくつかの態様において、カットオフ値を確立するためにIHCアッセイに用いられる抗体は、抗Notch1 ICD抗体D3B8である。

10

【0093】

もう1つの局面において、本発明は、腺癌を有する対象における疼痛を減少させる方法であって、Notch1結合物質の治療的有効量を対象に投与する段階を含む方法を提供する。いくつかの態様において、本発明は、腺様嚢胞癌を有する対象における疼痛を減少させる方法であって、Notch1結合物質の治療的有効量を対象に投与する段階を含む方法も提供する。いくつかの態様において、疼痛は骨痛である。いくつかの態様において、Notch1結合物質は本明細書に記載の抗Notch1抗体である。

20

【0094】

いくつかの態様において、腺癌または腺様嚢胞癌を治療する方法は、約0.25mg/kg、約0.5mg/kg、約1.0mg/kg、約2.5mg/kg、約5mg/kg、約10mg/kg、約12.5mg/kg、約15mg/kg、または約20mg/kgの抗Notch1抗体の用量の投与を含む。いくつかの態様において、抗Notch1抗体は、週1回、2週間毎に1回、3週間毎に1回、または4週間毎に1回投与される。いくつかの態様において、腺癌または腺様嚢胞癌を治療する方法は、約1mg/kgの4週間毎に1回の投与を含む。いくつかの態様において、腺癌または腺様嚢胞癌を治療する方法は、約2.5mg/kgの4週間毎に1回の投与を含む。いくつかの態様において、腺癌または腺様嚢胞癌を治療する方法は、約5mg/kgの4週間毎に1回の投与を含む。いくつかの態様において、腺癌または腺様嚢胞癌を治療する方法は、約2.5mg/kgの3週間毎に1回の投与を含む。いくつかの態様において、腺癌または腺様嚢胞癌を治療する方法は、約5mg/kgの3週間毎に1回の投与を含む。

30

【0095】

当業者には公知であるように、いかなる治療薬の投与も、副作用および/または毒性をもたらすことがある。場合によっては、副作用および/または毒性は、治療的有効用量での特定の作用物質の投与を不可能にするほどに重篤である。場合によっては、薬物療法を中止しなければならず、他の作用物質を試すことになる。しかし、同じ治療クラスの多くの作用物質は類似の副作用および/または毒性を示すことが多く、このことは、対象が治療法を中止しなければならないか、または可能であったとしても、その治療薬に関連した不快な副作用に悩まされることを意味する。

40

【0096】

治療薬による副作用には、蕁麻疹、皮疹、掻痒感、悪心、嘔吐、食欲減退、下痢、悪寒、発熱、疲労、筋痛および筋肉痛、頭痛、低血圧、高血圧、低カリウム血症、血球数減少、出血、ならびに心臓障害が非限定的に含まれる。

【0097】

したがって、本発明の1つの局面は、対象における腺癌または腺様嚢胞癌を治療する方

50

法であって、間欠的投薬レジメンを用いて抗Notch1抗体を投与する段階を含む方法を対象とする。本明細書で用いる場合、「間欠的投薬」とは、週1回を上回る間隔での投薬、例えば、2週間毎に1回、3週間毎に1回、4週間毎に1回といった投薬を用いる投薬レジメンのことを指す。いくつかの態様において、対象における腺癌または腺様嚢胞癌を治療するための方法は、対象に対して抗Notch1抗体の有効用量を間欠的投薬レジメンに従って投与する段階を含む。いくつかの態様において、対象における腺癌または腺様嚢胞癌を治療するための方法は、対象に対して抗Notch1抗体の有効用量を間欠的投薬レジメンに従って投与する段階、および抗Notch1抗体の治療指数を高める段階を含む。いくつかの態様において、間欠的投薬レジメンは、抗Notch1抗体の初回用量を対象に投与する段階、および抗Notch1抗体の追加用量を約2週間毎に1回投与する段階を含む。いくつかの態様において、間欠的投薬レジメンは、抗Notch1抗体の初回用量を対象に投与する段階、および抗Notch1抗体の追加用量を約3週間毎に1回投与する段階を含む。いくつかの態様において、間欠的投薬レジメンは、抗Notch1抗体の初回用量を対象に投与する段階、および抗Notch1抗体の追加用量を約4週間毎に1回投与する段階を含む。

10

【0098】

ある態様において、対象における腺様嚢胞癌を治療する方法は、対象に対して本明細書に記載の抗Notch1抗体を約0.25、0.5、1.0または2.5mg/kgの用量で4週間毎に1回投与する段階を含む。ある態様において、対象における腺様嚢胞癌を治療する方法は、対象に対して本明細書に記載の抗Notch1抗体を約2.5、5.0または10.0mg/kgの用量で3週間毎に1回投与する段階を含む。ある態様において、対象における腺様嚢胞癌を治療する方法は、対象に対して抗Notch1抗体を約2.5mg/kgの用量で3週間毎に1回投与する段階を含み、ここで抗Notch1抗体は、

20

RGYWIE (SEQ ID NO:15)

を含む重鎖CDR1、

QILPGTGRNTNYNEKFKG (SEQ ID NO:16)

を含む重鎖CDR2、および

FDGNYGYYAMDY (SEQ ID NO:17)

30

を含む重鎖CDR3、ならびに

RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:18)

を含む軽鎖CDR1、

GTNNRAP (SEQ ID NO:19)

を含む軽鎖CDR2、および

ALWYSNHWVFGGGTKL (SEQ ID NO:20)

を含む軽鎖CDR3を含む。

【0099】

いくつかの態様において、投薬レジメンは特定の投与回数または「サイクル」に限定されることがある。いくつかの態様において、抗Notch1抗体は、3、4、5、6、7、8サイクル、またはそれを上回るサイクルにわたって投与される。例えば、抗Notch1抗体は3週間毎に6サイクルにわたって投与される、抗Notch1抗体は4週間毎に6サイクルにわたって投与される、抗Notch1抗体は3週間毎に4サイクルにわたって投与される、抗Notch1抗体は4週間毎に4サイクルにわたって投与される、などである。投薬スケジュールは当業者（例えば、治療に当たる医師）による決定およびその後の変更が可能である。

40

【0100】

抗Notch1抗体の諸用量に関する送達方法の選択は、対象が抗Notch1抗体の体内への導入に耐える能力に応じて行いうる。したがって、本明細書に記載の局面および/または態様の任意のものにおいて、抗Notch1抗体の投与は静脈内注射によるものでよい。いくつかの

50

態様において、投与は静脈内注入による。本明細書に記載の局面および/または態様の任意のものにおいて、抗Notch1抗体の投与は非静脈内経路によるものでよい。

【0101】

本発明はさらに、本明細書に記載のNotch1結合物質（例えば、抗Notch1抗体）を含む薬学的組成物を提供する。ある態様において、薬学的組成物は、薬学的に許容される媒体をさらに含む。いくつかの態様において、これらの薬学的組成物は、対象（例えば、ヒト対象）における腫瘍増殖を阻害するのに、および/または癌を治療するのに利用される。

【0102】

ある態様において、薬学的組成物または製剤は、本発明の精製された抗体または作用物質を薬学的に許容される媒体（例えば、担体または添加剤）と混ぜ合わせることによって、貯蔵および使用のために調製される。適した薬学的に許容される媒体には、無毒性緩衝剤、例えば、リン酸、クエン酸、および他の有機酸など；塩、例えば塩化ナトリウムなど；アスコルビン酸およびメチオニンを含む抗酸化剤；保存料、例えば、塩化オクタデシルジメチルベンジルアンモニウム、塩化ヘキサメトニウム、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、フェノール、ブチルアルコールまたはベンジルアルコール、メチルパラベンまたはプロピルパラベンなどのアルキルパラベン、カテコール、レゾルシノール、シクロヘキサノール、3-ペンタノール、およびm-クレゾールなど；低分子量ポリペプチド（例えば、約10アミノ酸残基未満）；タンパク質、例えば、血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリンなど；親水性ポリマー、例えばポリビニルピロリドンなど；アミノ酸、例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、またはリジンなど；炭水化物、例えば、単糖類、二糖類、グルコース、マンノース、またはデキストリンなど；キレート剤、例えばEDTAなど；糖、例えば、スクロース、マンニトール、トレハロース、またはソルビトールなど；塩形成対イオン、例えばナトリウムなど；金属錯体、例えばZn-タンパク質複合体など；ならびに非イオン性界面活性剤、例えば、TWEENまたはポリエチレングリコール（PEG）などが非限定的に含まれる（Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22st Edition, 2012, Pharmaceutical Press, London.）。

10

20

【0103】

本発明の薬学的組成物または製剤は、局所療法または全身療法のためのいくつかの方法で投与することができる。投与は、表皮パッチもしくは経皮パッチ、軟膏、ローション、クリーム、ゲル、滴剤、座薬、噴霧剤、液剤および粉剤による局所投与；ネブライザーによるもの、気管内および鼻腔内を含む、粉剤もしくはエアロゾルの吸入もしくは吹送による肺投与；経口投与；または静脈内（例えば、注射または注入）、動脈内、腫瘍内、皮下、腹腔内、筋肉内（例えば、注射または注入）、もしくは頭蓋内（例えば、髄腔内または脳室内）を含む非経口投与であってよい。

30

【0104】

治療用製剤は単位剤形で存在してもよい。そのような製剤には、錠剤、丸剤、カプセル剤、粉剤、顆粒剤、水もしくは非水媒体中にある溶液もしくは懸濁液、または座薬が含まれる。錠剤などの固体組成物において、主要な有効成分は薬学的担体と混合される。従来の錠剤化成分には、コーンスターチ、ラクトース、スクロース、ソルビトール、タルク、ステアリン酸、ステアリン酸マグネシウム、リン酸ニカルシウム、またはゴム、および希釈剤（例えば、水）が含まれる。これらを用いて、本発明の化合物またはその薬学的に許容される無毒性塩の均一な混合物を含む固体予備製剤組成物を形成することができる。続いて、固体予備製剤組成物を、上記のタイプの単位剤形に細分する。製剤または組成物の錠剤、丸剤などは、コーティングされるかまたは別の方法で調合されて、長時間作用という利点を与える剤形をもたらすことができる。例えば、錠剤または丸剤は、外側成分によって被覆された内側組成物を含みうる。さらに、崩壊に耐えるように働き、かつ内側成分がインタクトのまま胃を通過するかまたはその放出が遅延されることを可能にする腸溶層によって、2つの成分を分離することもできる。種々の材料をそのような腸溶層またはコーティングのために用いることができ、そのような材料には、いくつかのポリマー酸、ならびにポリマー酸とシェラック、セチルアルコールおよび酢酸セルロースなどの材料との

40

50

混合物が含まれる。

【0105】

本明細書に記載のNotch1結合物質をマイクロカプセル中に封入することもできる。そのようなマイクロカプセルは、例えば、コアセルベーション手法または界面重合によって調製され、これには例えば、"Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 22st Edition, 2012, Pharmaceutical Press, London."に記載されているように、ヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチン-マイクロカプセルおよびポリ-(メチルメタクリレート)マイクロカプセルがそれぞれ、コロイド状薬物送達システム(例えば、リポソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子およびナノカプセル)中に、またはマクロエマルジョン中にあるものがある。

10

【0106】

ある態様において、本発明のNotch1結合物質(例えば、抗体)はリポソームと複合体化される。リポソームを作製する方法は、当業者に公知である。例えば、ある種のリポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール、およびPEG誘導体化ホスファチジルエタノールアミン(PEG-PE)を含む脂質組成物を用いた逆相蒸発によって生成させることができる。リポソームを規定の孔径のフィルターを通して押し出して、所望の直径を有するリポソームを得ることができる。

【0107】

ある態様においては、徐放性調製物を作製することができる。徐放性調製物の適した例には、Notch1結合物質(例えば、抗体)を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスが含まれ、そのマトリックスは、成形された物品(例えば、フィルムまたはマイクロカプセル)の形態にある。徐放性マトリックスの例には、ポリエステル、ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)またはポリ(ビニルアルコール)などのヒドロゲル、ポリラクチド、L-グルタミン酸と7エチル-L-グルタメートとのコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、LUPRON DEPOT(商標)(乳酸-グリコール酸コポリマーおよび酢酸ロイプロリドで構成される注射可能なミクロスフェア)などの分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、スクロース酢酸イソ酪酸エステル、およびポリD-(-)-3-ヒドロキシ酪酸が含まれる。

20

【0108】

本発明のもう1つの局面において、本明細書に記載の方法は、少なくとも1種のさらなる治療薬を投与する段階をさらに含む。さらなる治療薬は、抗Notch1抗体の投与の前に、それと並行して、および/またはその後投与することができる。抗Notch1抗体とさらなる治療薬とを含む薬学的組成物も提供される。いくつかの態様において、少なくとも1種のさらなる治療薬は、1種、2種、3種またはそれを上回るさらなる治療薬を含む。

30

【0109】

少なくとも2種の治療薬による併用療法では、異なる作用機序によって働く作用物質を用いることが多いが、それが必要とされるわけではない。異なる作用機序を有する作用物質を用いる併用療法は、相加効果または相乗効果をもたらさう。併用療法は単剤療法において用いられるよりも各作用物質の用量を低くすることを可能にし、それによって毒性副作用を減少させることができる。併用療法は、耐性癌細胞が発生する可能性を減らさう。いくつかの態様において、併用療法は、主として非腫瘍形成性細胞に影響を及ぼす(例えば、阻害するかまたは死滅させる)治療薬と、主として腫瘍形成性CSCに影響を及ぼす(例えば、阻害するかまたは死滅させる)治療薬とを含む。

40

【0110】

抗Notch1抗体とさらなる治療薬との組み合わせが、任意の順序で、または並行して投与されうことは理解されるであろう。いくつかの態様において、抗Notch1抗体は、第2の治療薬による治療を以前に受けたことのある患者に投与される。他のある態様において、抗Notch1抗体および第2の治療薬は、実質的に同時に、または並行して投与される。例えば、対象は、第2の治療薬による治療過程(例えば、化学療法)を受けると同時に、抗Notch1抗体の投与を受けてもよい。ある態様において、抗Notch1抗体は、第2の治療薬による治療から1年以内に投与される。ある代替的な態様において、抗Notch1抗体は、第2の治療

50

薬によるいずれかの治療から10カ月以内、8カ月以内、6カ月以内、4カ月以内、または2カ月以内に投与される。他のある態様において、抗Notch1抗体は、第2の治療薬によるいずれかの治療から4週間以内、3週間以内、2週間以内、または1週間以内に投与される。いくつかの態様において、抗Notch1抗体は、第2の治療薬によるいずれかの治療から5日以内、4日以内、3日以内、2日以内、または1日以内に投与される。さらに、2種の（またはそれを上回る）作用物質または治療を、数時間以内または数分以内に（すなわち、実質的に同時に）対象に投与してもよいことも理解されるであろう。

【0111】

有用な治療薬のクラスには、例えば、抗チューブリン剤、アウリスタチン、DNA副溝結合剤、DNA複製阻害薬、アルキル化剤（例えば、白金錯体、例えばシスプラチン、モノ（白金）、ビス（白金）および三核白金錯体、ならびにカルボプラチンなど）、アントラサイクリン、抗生物質、抗葉酸剤、代謝拮抗薬、化学療法増感剤、デュオカルマイシン、エトポシド、フッ化ピリミジン、イオノフォア、レキシトロプシン、ニトロソ尿素、プラチノール、プリン代謝拮抗薬、ピューロマイシン、放射線増感剤、ステロイド、タキサン、トポイソメラーゼ阻害薬、ピンカルカロイドなどが含まれる。ある態様において、さらなる治療薬は、アルキル化剤、代謝拮抗薬、有糸分裂阻害剤、トポイソメラーゼ阻害薬、または血管新生阻害薬である。

【0112】

抗Notch1抗体と組み合わせて投与しうる治療薬には、化学療法薬が含まれる。したがって、いくつかの態様において、前記方法または治療は、本発明の抗Notch1抗体と、1種の化学療法薬または複数の異なる化学療法薬の混合物との併用投与を伴う。抗Notch1抗体による治療は、化学療法の投与の前に、それと並行して、またはその後に行うことができる。併用投与には、単一の薬学的製剤の形での、もしくは別個の製剤を用いるかのいずれかによる同時投与、またはいずれの順序でもよいが一般に、活性作用物質のすべてがそれらの生物活性を同時に発揮しうる期間内での連続投与が含まれる。そのような化学療法薬の調製および投薬スケジュールは、製造元の説明書に従って、または当業者によって経験的に決定されるように用いることができる。そのような化学療法に関する調製および投薬スケジュールは、The Chemotherapy Source Book, 4th Edition, 2008, M. C. Perry, Editor, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, PAにも記載されている。

【0113】

本発明において有用な化学療法薬には、アルキル化剤、例えば、チオテパおよびシクロホスファミド（シトキササン（CYTOXAN））など；アルキルスルホネート、例えば、ブスルファン、インプロスルファンおよびピボスルファンなど；アジリジン、例えば、ベンゾドーパ（benzodopa）、カルボコン、メツレドーパ（meturedopa）、およびウレドーパ（uredopa）など；アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチレンチオホスホラミド、およびトリメチローロメラミン（trimethylolomelamine）を含む、エチレンイミンおよびメチルアメラミン（methylamelamine）；ナイトロジェンマスタード、例えばクロラムブシル、クロルナファジン、クロロホスファミド（cholophosphamide）、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、塩酸メクロレタミンオキシド、メルファラン、ノベムビシン（novembichin）、フェネステリン（phenesterine）、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスタードなど；ニトロソ尿素、例えば、カルムスチン、クロロゾトシン、ホテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、ラニムスチンなど；抗生物質、例えば、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、アウスラマイシン（authramycin）、アザセリン、プレオマイシン、カクチノマイシン、カリケアマイシン、カラビシン（carabycin）、カミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、デトルピシン、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ドキシソルピシン、エピルピシン、エソルピシン、イダルピシン、マルセロマイシン、マイトマイシン、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン（potfiromycin）、ピューロマイシン、クエラマイシン（quelamycin）、ロドルピシン（rodorubicin）、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベル

シジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルピシンなど；代謝拮抗薬、例えば、メトトレキサートおよび5-フルオロウラシル（5-FU）など；葉酸類似体、例えば、デノブテリン、メトトレキサート、プテロプテリン、トリメトトレキサートなど；プリン類似体、例えば、フルダラビン、6-メルカプトプリン、チアミプリン（thiamiprine）、チオグアニンなど；ピリミジン類似体、例えば、アンシタビン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフル、シトシンアラビノシド、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、フロクスウリジン、5-FUなど；アンドロゲン、例えば、カルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトンなど；抗副腎薬、例えば、アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタンなど；葉酸補給剤、例えば、フォリン酸など；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド；アミノレプリン酸；アムサクリン；ベストラブシル；ピサントレン；エダトレキサート（edatraxate）；デフォファミン（defofamine）；デメコルチン；ジアジクオン；エルフォルミチン（elformithine）；酢酸エリプチニウム；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシ尿素；レンチナン；ロニダミン；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モピダモール；ニトラクリン；ペントスタチン；フェナメット；ピラルピシン；ポドフィリン酸；2-エチルヒドラジド；プロカルバジン；PSK；ラゾキササン；シゾフィラン（sizofuran）；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジクオン；2,2',2"-トリクロロトリエチルアミン；ウレタン；ビンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトプロニトール；ミトラクトール；ピポプロマン；ガシトシン（gacytosine）；アラビノシド（「Ara-C」）；タキソイド、例えば、バクリタキセル（タキソール（TAXOL））およびドセタキセル（タキソテール（TAXOTERE））；クロランブシル；ゲムシタビン；6-チオグアニン；メルカプトプリン；白金類似体、例えば、シスプラチンおよびカルボプラチンなど；ビンブラスチン；白金；エトポシド（VP-16）；イホスファミド；マイトマイシンC；ミトキサントロン；ピンクリスチン；ピノレルピン；ナベルピン；ノバントロン；テニポシド；ダウノマイシン；アミノプテリン；イバンドロン酸；CPT11；トポイソメラーゼ阻害薬RFS2000；ジフルオロメチルオルニチン（DMFO）；レチノイン酸；エスペラミシン；カペシタビン（XELODA）；および上記のいずれかの薬学的に許容される塩、酸または誘導体が非限定的に含まれる。化学療法薬にはまた、腫瘍に対するホルモン作用を調節または阻害するように作用する抗ホルモン薬、例えば、タモキシフェン、ラロキシフェン、アロマターゼ阻害性4(5)-イミダゾール、4-ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン、ケオキシフェン、LY117018、オナプリストン、およびトレミフェン（フェアストン（FARESTON））を含む抗エストロゲン薬；ならびに抗アンドロゲン薬、例えば、フルタミド、ニルタミド、ピカルタミド、ロイプロリド、およびゴセレリンなど；ならびに前記のいずれかの薬学的に許容される塩、酸または誘導体も含まれる。

10

20

30

40

50

【0114】

ある態様において、化学療法薬はトポイソメラーゼ阻害薬である。トポイソメラーゼ阻害薬は、トポイソメラーゼ酵素（例えば、トポイソメラーゼIまたはII）の作用を妨害する化学療法薬である。トポイソメラーゼ阻害薬には、ドキシゾルピシンHCl、クエン酸ダウノルピシン、ミトキサントロンHCl、アクチノマイシンD、エトポシド、トポテカンHCl、テニポシド（VM-26）、およびイリノテカン、ならびにこれらのいずれかの薬学的に許容される塩、酸、または誘導体が非限定的に含まれる。

【0115】

ある態様において、化学療法薬は代謝拮抗薬である。代謝拮抗薬は、正常な生化学反応に必要な代謝産物に類似しているものの、細胞の1つまたは複数の正常機能、例えば細胞分裂を妨害するには十分な程度に異なる構造を有する化学物質である。代謝拮抗薬には、ゲムシタビン、フルオロウラシル、カペシタビン、メトトレキサートナトリウム、ラリトレキセド、ペメトレキセド、テガフル、シトシンアラビノシド、チオグアニン、5-アザシチジン、6-メルカプトプリン、アザチオプリン、6-チオグアニン、ペントスタチン、リン酸フルダラビン、およびクラドリピン、ならびにこれらのいずれかの薬学的に許容される塩、酸、または誘導体が非限定的に含まれる。

【0116】

ある態様において、化学療法薬は、チューブリンと結合する作用物質を非限定的に含む有糸分裂阻害薬である。いくつかの態様において、作用物質はタキサンである。ある態様において、作用物質は、パクリタキセルもしくはドセタキセル、またはパクリタキセルもしくはドセタキセルの薬学的に許容される塩、酸、もしくは誘導体である。ある態様において、作用物質は、パクリタキセル（タキソール（TAXOL））、ドセタキセル（タキソテール（TAXOTERE））、アルブミン結合パクリタキセル（アブラキサン（ABRAXANE））、DHA-パクリタキセル、またはPG-パクリタキセルである。ある代替的な態様において、有糸分裂阻害薬には、ピンカアルカロイド、例えば、ピンクリスチン、ピンプラスチン、ピノレルピン、もしくはビンデシンなど、またはその薬学的に許容される塩、酸、もしくは誘導体が含まれる。いくつかの態様において、有糸分裂阻害薬は、キネシンEg5の阻害薬、またはAuroraAもしくはPIk1といった分裂期キナーゼの阻害薬である。

10

【0117】

いくつかの態様において、さらなる治療薬は、小分子などの作用物質を含む。例えば、治療は、本発明の抗Notch1抗体と、EGFR、ErbB2、HER2、および/またはVEGFを非限定的に含む、さらなる腫瘍関連タンパク質に対する阻害薬として作用する小分子との併用投与を伴うことができる。ある態様において、さらなる治療薬は、癌幹細胞経路を阻害する小分子である。いくつかの態様において、さらなる治療薬はNotch経路の小分子阻害薬である。いくつかの態様において、さらなる治療薬はWnt経路の小分子阻害薬である。いくつかの態様において、さらなる治療薬はBMP経路の小分子阻害薬である。いくつかの態様において、さらなる治療薬は、 β -カテニンシグナル伝達を阻害する小分子である。

20

【0118】

いくつかの態様において、さらなる治療薬は、抗体などの生体分子を含む。例えば、治療は、本発明の抗Notch1抗体と、EGFR、ErbB2、HER2、および/またはVEGFと結合する抗体を非限定的に含む、さらなる腫瘍関連タンパク質に対する他の抗体との併用投与を伴うことができる。ある態様において、さらなる治療薬は、抗癌幹細胞マーカー抗体である抗体である。いくつかの態様において、さらなる治療薬は、Notch経路のさらなる構成要素と結合する抗体である。いくつかの態様において、さらなる治療薬は、Wnt経路の構成要素と結合する抗体である。ある態様において、さらなる治療薬は、癌幹細胞経路を阻害する抗体である。いくつかの態様において、さらなる治療薬はNotch経路の抗体阻害薬である。いくつかの態様において、さらなる治療薬はWnt経路の抗体阻害薬である。いくつかの態様において、さらなる治療薬はBMP経路の抗体阻害薬である。いくつかの態様において、さらなる治療薬は、 β -カテニンシグナル伝達を阻害する抗体である。ある態様において、さらなる治療薬は、血管新生の阻害薬またはモジュレーターである抗体（例えば、抗VEGF抗体または抗VEGF受容体抗体）である。ある態様において、さらなる治療薬は、ペバシズマブ（アバスタチン（AVASTIN））、トラスツズマブ（ハーセプチン（HERCEPTIN））、パニツムマブ（ベクチピックス（VECTIBIX））、またはセツキシマブ（アービタックス（ERBITUX））である。併用投与は、単一の薬学的製剤の形での、もしくは別個の製剤を用いるかのいずれかによる同時投与、またはいずれの順序でもよいが一般に、活性作用物質のすべてがそれらの生物活性を同時に発揮しうる期間内での連続投与が含まれる。

30

40

【0119】

本明細書に記載の抗Notch1抗体による治療は、1つもしくは複数のサイトカイン（例えば、リンホカイン、インターロイキン、腫瘍壊死因子、および/または増殖因子）といった他の生体分子との併用治療も含むことができ、または、腫瘍、癌細胞の外科的除去、もしくは治療に当たる医師によって必要と判断される他の任意の治療法を伴うこともできる。

【0120】

本明細書に記載の方法のある態様において、治療は、放射線療法と組み合わせた本発明の抗Notch1抗体の投与を伴う。抗Notch1抗体による治療は、放射線療法の施行の前に、それと同時に、またはその後に行うことができる。医療の当業者は、そのような放射線療法

50

の施行スケジュールを決定することができる。

【0121】

もう1つの局面において、本発明は、抗Notch1抗体による治療を受けている対象をモニターする方法であって、治療を受けている対象由来の試料におけるバイオマーカのレベルを決定する段階、および試料におけるバイオマーカのレベルを所定のバイオマーカのレベルと比較する段階を含む方法を提供する。いくつかの態様において、試料におけるバイオマーカのレベルが所定のバイオマーカのレベルと比較して低いことにより、治療の正の効果が指し示される。治療の正の効果には、腫瘍のサイズの縮小、腫瘍の数の減少、転移の数の減少、疼痛の減少、腫瘍サイズの安定化、または腫瘍数の安定化などが非限定的に含まれる。多くの型の癌で乳酸デヒドロゲナーゼ（LDH）レベルが上昇しており、LDHレベルを測定することは治療のモニタリングに役立つ。したがって、いくつかの態様において、対象は、所定のレベルまたは正常レベルと比較して高いLDHレベルを有する。いくつかの態様において、腺様嚢胞癌の治療のために抗Notch1抗体を投与される対象をモニターする方法は、治療後の対象由来の試料における乳酸デヒドロゲナーゼ（LDH）のレベルを決定する段階、および試料におけるLDHのレベルを治療前の対象由来のLDHの所定のレベルと比較する段階を含む。いくつかの態様において、腺様嚢胞癌の治療のために抗Notch1抗体を投与される対象をモニターする方法は、治療を受けている対象から試料を入手する段階、試料におけるLDHのレベルを決定する段階、および試料におけるLDHのレベルを治療前の対象由来のLDHの所定のレベルと比較する段階を含む。いくつかの態様において、腺様嚢胞癌の治療のために抗Notch1抗体を投与される対象をモニターする方法は、治療を受けている対象から試料を入手する段階、試料におけるLDHのレベルを決定する段階、および試料におけるLDHのレベルを治療前の対象由来のLDHの所定のレベルと比較する段階を含み、そのLDHのレベルが低いことによって治療の正の効果が指し示される。いくつかの態様において、試料は血液、血清、または血漿である。

10

20

30

40

【0122】

III. Notch1結合物質

本発明は、ヒトNotch1と特異的に結合する作用物質、そのような結合物質を含む組成物、および癌を治療するためにそのような結合物質を用いるための方法を提供する。ある態様において、本発明は、Notch1と結合する作用物質、および腺癌を治療するために結合物質を用いる方法を提供する。ある態様において、Notch1結合物質は腺癌の増殖を阻害する。ある態様において、Notch1結合物質は、腺様嚢胞癌を治療するために用いられる。ある態様において、Notch1結合物質は腺様嚢胞癌の増殖を阻害する。ある態様において、Notch1結合物質は、ヒトNotch1と特異的に結合する抗体である（抗Notch1抗体）。いくつかの態様において、抗Notch1抗体は、ヒトNotch1の細胞外ドメインと特異的に結合する。いくつかの態様において、抗Notch1抗体は、ヒトNotch1の細胞外ドメインの非リガンド結合性膜基部領域と特異的に結合する。いくつかの態様において、抗Notch1抗体は、アミノ酸約1427からアミノ酸約1732までを含むヒトNotch1の領域と結合する。いくつかの態様において、抗Notch1抗体は、SEQ ID NO: 2を含む領域と結合する。いくつかの態様において、抗Notch1抗体は、SEQ ID NO: 2の内部の領域と特異的に結合する。いくつかの態様において、抗Notch1抗体は、SEQ ID NO: 2を含む領域の内部のエピトープと特異的に結合する。

【0123】

ある態様において、ヒトNotch1と特異的に結合する抗体は、抗体OMP-52M51のCDRのうち1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、および/または6つを含む（表1参照）。いくつかの態様において、抗体は、OMP-52M51のCDRのうち1つまたは複数、OMP-52M51のCDRのうち2つまたはより多く、OMP-52M51のCDRのうち3つまたはより多く、OMP-52M51のCDRのうち4つまたはより多く、OMP-52M51のCDRのうち5つまたはより多く、またはOMP-52M51のCDRのうち6つすべてを含む。いくつかの態様において、抗体は、CDR当たり最大で4つ（すなわち、0個、1つ、2つ、3つまたは4つ）のアミノ酸置換を有するCDRを含む。ある態様において、重鎖CDRは重鎖可変領域内に含まれる。ある態様において、軽鎖CDRは軽鎖可変領域内に含まれる。

【0124】

50

【表 1】

OMP-52M51	
HC CDR1	RGYWIE (SEQ ID NO:15)
HC CDR2	QILPGTGRRTNYNEKFKG (SEQ ID NO:16)
HC CDR3	FDGNYGYAMDY (SEQ ID NO:17)
LC CDR1	RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:18)
LC CDR2	GTNNRAP (SEQ ID NO:19)
LC CDR3	ALWYSNHWVFGGGTKL (SEQ ID NO:20)

10

【 0 1 2 5 】

ある態様において、ヒトNotch1と結合する抗体は、(a)
RGYWIE (SEQ ID NO:15)
を含む重鎖CDR1、

20

QILPGTGRRTNYNEKFKG (SEQ ID NO:16)

を含む重鎖CDR2、および
FDGNYGYAMDY (SEQ ID NO:17)
を含む重鎖CDR3、ならびに / または (b)
RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:18)
を含む軽鎖CDR1、

GTNNRAP (SEQ ID NO:19)

を含む軽鎖CDR2、および
ALWYSNHWVFGGGTKL (SEQ ID NO:20)

30

を含む軽鎖CDR3を含む。いくつかの態様において、ヒトNotch1と結合する抗体は、(a)
RGYWIE (SEQ ID NO:15)

を含む重鎖CDR1、または1つ、2つ、3つもしくは4つのアミノ酸置換を含むそれらの変異体
; (b)

QILPGTGRRTNYNEKFKG (SEQ ID NO:16)

を含む重鎖CDR2、または1つ、2つ、3つもしくは4つのアミノ酸置換を含むそれらの変異体
; および (c)

40

FDGNYGYAMDY (SEQ ID NO:17)

を含む重鎖CDR3、または1つ、2つ、3つもしくは4つのアミノ酸置換を含むそれらの変異体
、を含む重鎖可変領域を含む。他の態様において、ヒトNotch1と結合する抗体は、(a)

RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:18)

を含む軽鎖CDR1、または1つ、2つ、3つもしくは4つのアミノ酸置換を含むそれらの変異体
; (b)

GTNNRAP (SEQ ID NO:19)

を含む軽鎖CDR2、または1つ、2つ、3つもしくは4つのアミノ酸置換を含むそれらの変異体
; および (c)

50

ALWYSNHWVFGGGTKL (SEQ ID NO:20)

を含む軽鎖CDR3、または1つ、2つ、3つもしくは4つのアミノ酸置換を含むそれらの変異体、を含む軽鎖可変領域を含む（またはさらに含む）。いくつかの態様において、アミノ酸置換は保存的アミノ酸置換である。

【0126】

いくつかの態様において、ヒトNotch1と結合する抗体は、SEQ ID NO: 8に対して少なくとも約90%の配列同一性を有する重鎖可変領域、および/またはSEQ ID NO: 14に対して少なくとも約90%の配列同一性を有する軽鎖可変領域を含む。いくつかの態様において、ヒトNotch1と結合する抗体は、SEQ ID NO: 8に対して少なくとも約95%、少なくとも約97%もしくは少なくとも約99%の配列同一性を有する重鎖可変領域、および/またはSEQ ID NO: 14に対して少なくとも約95%、少なくとも約97%もしくは少なくとも約99%の配列同一性を有する軽鎖可変領域を含む。いくつかの態様において、ヒトNotch1と結合する抗体は、SEQ ID NO: 8に対して少なくとも約95%の配列同一性を有する重鎖可変領域、および/またはSEQ ID NO: 14に対して少なくとも約95%の配列同一性を有する軽鎖可変領域を含む。いくつかの態様において、ヒトNotch1と結合する抗体は、SEQ ID NO: 8を含む重鎖可変領域および/またはSEQ ID NO: 14を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの態様において、ヒトNotch1と結合する抗体は、SEQ ID NO: 8を含む重鎖可変領域およびSEQ ID NO: 14を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの態様において、抗体はモノクローナル抗体または抗体断片である。

【0127】

いくつかの態様において、ヒトNotch1と結合する抗体は、SEQ ID NO: 26に対して少なくとも約90%の配列同一性を有する重鎖可変領域、および/またはSEQ ID NO: 32に対して少なくとも約90%の配列同一性を有する軽鎖可変領域を含む。いくつかの態様において、ヒトNotch1と結合する抗体は、SEQ ID NO: 26に対して少なくとも約95%、少なくとも約97%もしくは少なくとも約99%の配列同一性を有する重鎖可変領域、および/またはSEQ ID NO: 32に対して少なくとも約95%、少なくとも約97%もしくは少なくとも約99%の配列同一性を有する軽鎖可変領域を含む。いくつかの態様において、ヒトNotch1と結合する抗体は、SEQ ID NO: 26に対して少なくとも約95%の配列同一性を有する重鎖可変領域、および/またはSEQ ID NO: 32に対して少なくとも約95%の配列同一性を有する軽鎖可変領域を含む。いくつかの態様において、ヒトNotch1と結合する抗体は、SEQ ID NO: 26を含む重鎖可変領域および/またはSEQ ID NO: 32を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの態様において、ヒトNotch1と結合する抗体は、SEQ ID NO: 26を含む重鎖可変領域およびSEQ ID NO: 32を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの態様において、抗体はモノクローナル抗体または抗体断片である。

【0128】

いくつかの態様において、ヒトNotch1と結合する抗体は、SEQ ID NO: 26に対して少なくとも約90%の配列同一性を有する重鎖可変領域、および/またはSEQ ID NO: 38に対して少なくとも約90%の配列同一性を有する軽鎖可変領域を含む。いくつかの態様において、ヒトNotch1と結合する抗体は、SEQ ID NO: 26に対して少なくとも約95%、少なくとも約97%もしくは少なくとも約99%の配列同一性を有する重鎖可変領域、および/またはSEQ ID NO: 38に対して少なくとも約95%、少なくとも約97%もしくは少なくとも約99%の配列同一性を有する軽鎖可変領域を含む。いくつかの態様において、ヒトNotch1と結合する抗体は、SEQ ID NO: 26に対して少なくとも約95%の配列同一性を有する重鎖可変領域、および/またはSEQ ID NO: 38に対して少なくとも約95%の配列同一性を有する軽鎖可変領域を含む。いくつかの態様において、ヒトNotch1と結合する抗体は、SEQ ID NO: 26を含む重鎖可変領域および/またはSEQ ID NO: 38を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの態様において、ヒトNotch1と結合する抗体は、SEQ ID NO: 26を含む重鎖可変領域およびSEQ ID NO: 38を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの態様において、抗体はモノクローナル抗体または抗体断片である。

【0129】

いくつかの態様において、Notch1結合物質は、ブダペスト条約の規定に基づいて2008年8月7日にAmerican Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA, USAに寄託され、番号PTA-9405が割り当てられたハイブリドーマ細胞株によって産生される抗体、OMP-52M51 (52M51とも称される)である。いくつかの態様において、抗体はOMP-52M51のヒト化バージョンである。いくつかの態様において、抗体は、ブダペスト条約の規定に基づいて2008年10月15日にATCC, 10801 University Boulevard, Manassas, VA, USAに寄託され、番号PTA-9549が割り当てられたプラスミドによってコードされる、OMP-52M51のヒト化バージョン、「OMP-52M51-H4L3」である。いくつかの態様において、抗体は、OMP-52M51のヒト化バージョン、「OMP-52M51-H4L4」である。いくつかの態様において、本発明は、抗体OMP-52M51が結合するエピトープと同じエピトープと結合する抗体を提供する。他の態様において、本発明は、前述の局面のそれぞれのいくつかの態様、ならびに本明細書の他所に記載された他の局面および態様において、本方法は、ヒトNotch1の細胞外ドメインの非リガンド結合性膜基部領域に対する特異的結合をめぐって、前述の態様および/または局面、ならびに本明細書の他所に記載された他の局面/態様に記載された抗体のいずれかと競合する抗体を提供する。

10

【0130】

本発明は、抗体および抗体の断片を非限定的に含む、種々のポリペプチドを提供する。ある態様において、ポリペプチドは単離されている。いくつかの態様において、ポリペプチドは実質的に純粋である。

【0131】

ある態様において、ポリ本発明のペプチドは、SEQ ID NO : 4、SEQ ID NO : 6、SEQ ID NO : 8、SEQ ID NO : 10、SEQ ID NO : 12、SEQ ID NO : 14、SEQ ID NO : 22、SEQ ID NO : 23、SEQ ID NO : 25、SEQ ID NO : 26、SEQ ID NO : 28、SEQ ID NO : 29、SEQ ID NO : 31、SEQ ID NO : 32、SEQ ID NO : 34、SEQ ID NO : 35、SEQ ID NO : 37、またはSEQ ID NO : 38の配列を含む(シグナル/リーダー配列を伴うかまたは伴わない)、組換えポリペプチド、天然ポリペプチド、または合成ポリペプチドであってよい。いくつかの態様において、ポリペプチドは、SEQ ID NO : 4、SEQ ID NO : 10、SEQ ID NO : 22、SEQ ID NO : 23、SEQ ID NO : 28、SEQ ID NO : 29、SEQ ID NO : 34、および/またはSEQ ID NO : 35にそれぞれ提供された(シグナル/リーダーシグナル配列を伴うかまたは伴わない)、重鎖および/または軽鎖を含む。ある態様において、ポリペプチドは抗体である。ある態様において、ポリペプチドはヒトNotch1と特異的に結合する。ある態様において、ポリペプチドはヒトNotch1の細胞外ドメインと特異的に結合する。ある態様において、ポリペプチドは、ヒトNotch1の細胞外ドメインの非リガンド結合性膜基部領域と特異的に結合する。ある態様において、ポリペプチドは、SEQ ID NO : 8を含む重鎖可変領域配列およびSEQ ID NO : 14を含む軽鎖可変領域配列を含む。ある態様において、ポリペプチドは、SEQ ID NO : 26を含む重鎖可変領域配列およびSEQ ID NO : 32を含む軽鎖可変領域配列を含む。ある態様において、ポリペプチドは、SEQ ID NO : 26を含む重鎖可変領域配列およびSEQ ID NO : 38を含む軽鎖可変領域配列を含む。ある態様において、ポリペプチドは抗体である。

20

30

【0132】

本発明のポリペプチドは、SEQ ID NO : 8のポリペプチド、ならびにSEQ ID NO : 8に対して少なくとも90%の配列同一性、およびSEQ ID NO : 8に対して少なくとも95%の配列同一性を有するポリペプチドを含んでよく、さらに他の態様において、SEQ ID NO : 8に対して少なくとも96%、97%、98%または99%の配列同一性を有するポリペプチドを含んでよい。本発明のポリペプチドは、SEQ ID NO : 14のポリペプチド、ならびにSEQ ID NO : 14に対して少なくとも90%の配列同一性、およびSEQ ID NO : 14に対して少なくとも95%の配列同一性を有するポリペプチドを含んでよく、さらに他の態様において、SEQ ID NO : 14に対して少なくとも96%、97%、98%または99%の配列同一性を有するポリペプチドを含んでよい。

40

【0133】

本発明のポリペプチドは、SEQ ID NO : 26のポリペプチド、ならびにSEQ ID NO : 26に対

50

して少なくとも90%の配列同一性、およびSEQ ID NO : 26に対して少なくとも95%の配列同一性を有するポリペプチドを含んでよく、さらに他の態様において、SEQ ID NO : 26に対して少なくとも96%、97%、98%または99%の配列同一性を有するポリペプチドを含んでよい。本発明のポリペプチドは、SEQ ID NO : 32のポリペプチド、ならびにSEQ ID NO : 32に対して少なくとも90%の配列同一性、およびSEQ ID NO : 32に対して少なくとも95%の配列同一性を有するポリペプチドを含んでよく、さらに他の態様において、SEQ ID NO : 32に対して少なくとも96%、97%、98%または99%の配列同一性を有するポリペプチドを含んでよい。本発明のポリペプチドは、SEQ ID NO : 38のポリペプチド、ならびにSEQ ID NO : 38に対して少なくとも90%の配列同一性、およびSEQ ID NO : 38に対して少なくとも95%の配列同一性を有するポリペプチドを含んでよく、さらに他の態様において、SEQ ID NO : 38に対して少なくとも96%、97%、98%または99%の配列同一性を有するポリペプチドを含んでよい。

10

【0134】

ある態様において、Notch1結合物質（例えば、抗体）はNotch1と結合して、Notch1活性をモジュレートする。いくつかの態様において、Notch1結合物質はアンタゴニストであり、Notch1活性をモジュレートする。

【0135】

ある態様において、Notch1結合物質（例えば、抗体）はNotch1のアンタゴニストであり、Notch1活性を阻害する。ある態様において、Notch1結合物質は、結合を受けたヒトNotch1の活性の少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約50%、少なくとも約75%、少なくとも約90%、または約100%を阻害する。いくつかの態様において、Notch1結合物質は、突然変異したNotch1の活性を阻害する。いくつかの態様において、Notch1結合物質は、構成的に活性化されているNotch1の活性を阻害する。いくつかの態様において、突然変異したNotch1は腺癌中にある。ある態様において、突然変異したNotch1は腺様嚢胞癌中にある。

20

【0136】

ある態様において、Notch1結合物質（例えば、抗体）は、Notchシグナル伝達を阻害する。Notchシグナル伝達を阻害するNotch1結合物質は、ある態様において、1つまたは複数のNotchによるシグナル伝達を阻害してもよいが、すべてのNotchによるシグナル伝達を必ずしも阻害する必要はないことが理解されよう。ある代替的な態様において、すべてのヒトNotchによるシグナル伝達が阻害されてもよい。ある態様においては、Notch1、Notch2、Notch3およびNotch4からなる群より選択される1つまたは複数のNotchによるシグナル伝達が阻害される。ある態様において、Notch1結合物質によるNotchシグナル伝達の阻害は、Notch1シグナル伝達のレベルの少なくとも約10%、少なくとも約25%、少なくとも約50%、少なくとも約75%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%の低下である。

30

【0137】

ある態様において、Notch1結合物質（例えば、抗体）は、Notch活性化を阻害する。Notchシグナル活性化を阻害するNotch1結合物質は、ある態様において、1つまたは複数のNotchの活性化を阻害してもよいが、すべてのNotchの活性化を必ずしも阻害する必要はないことが理解されよう。ある代替的な態様において、すべてのヒトNotchの活性化が阻害されてもよい。ある態様においては、Notch1、Notch2、Notch3およびNotch4からなる群より選択される1つまたは複数のNotchの活性化が阻害される。ある態様において、Notch1結合物質によるNotch活性化の阻害は、Notch1活性化のレベルの少なくとも約10%、少なくとも約25%、少なくとも約50%、少なくとも約75%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%の低下である。

40

【0138】

Notch1結合物質（またはNotch1結合物質の候補）がNotch活性化を阻害するか否かを判定するためのインピボおよびインピトロのアッセイは、当技術分野において公知である。いくつかの態様において、ホタルルシフェラーゼレポーター遺伝子の上位にTCF結合ドメインの複数のコピーを含むTCF / Lucレポーターベクターを利用する細胞ベースのルシフェ

50

ラーゼレポーターアッセイを、インビトロでNotchシグナル伝達レベルを測定するために用いてもよい。他の態様において、ホタルルシフェラーゼレポーター遺伝子の上流にCBF結合ドメインを含むCBF/Lucレポーターベクターを利用する細胞ベースのルシフェラーゼレポーターアッセイを用いてもよい。Notch1結合物質の存在下でNotchリガンドによって誘導されるNotch活性化のレベルを、Notch1結合物質の非存在下でNotchリガンドによって誘導されるNotch活性化のレベルと比較する。

【0139】

ある態様において、Notch1結合物質（例えば、抗体）は、以下の効果のうち1つまたは複数を有する：癌細胞の増殖を阻害する、癌細胞の成長を阻害する、癌細胞の転移を防止するかまたは減少させる、腫瘍または癌における癌性幹細胞の頻度を低下させる、癌細胞の細胞死（例えば、アポトーシスによる）を誘発する、癌細胞集団における癌性幹細胞の頻度を低下させることによって癌細胞の腫瘍形成能を低下させる、腫瘍形成性細胞を非腫瘍形成状態に分化させる、または患者の生存期間を延長する。

10

【0140】

ある態様において、Notch1結合物質（例えば、抗体）は、癌細胞の増殖を阻害することができる。ある態様において、Notch1結合物質は、インビトロでの癌細胞の増殖を阻害することができる（例えば、インビトロで癌細胞を抗体と接触させる）。ある態様において、Notch1結合物質は、インビボで癌増殖を阻害することができる（例えば、異種移植マウスモデルおよび/または癌を有するヒトにおいて）。

【0141】

ある態様において、Notch1結合物質（例えば、抗体）は、腺癌の腫瘍形成能を低下させることができる。ある態様において、Notch1結合物質（例えば、抗体）は、腺様嚢胞癌の腫瘍形成能を低下させることができる。ある態様において、Notch1結合物質または抗体は、マウス異種移植モデルなどの動物モデルにおいて癌性幹細胞を含む癌の腫瘍形成能を低下させることができる。いくつかの態様において、Notch1結合物質は、癌における癌性幹細胞の頻度を低下させることによって癌の腫瘍形成能を低下させることができる。ある態様において、癌における癌性幹細胞の数または頻度は、少なくとも約2分の1、約3分の1、約5分の1、約10分の1、約50分の1、約100分の1、または約1000分の1に低下する。ある態様において、癌性幹細胞の頻度の低下は、動物モデルを用いる限界希釈アッセイ（LDA）によって決定される。腫瘍における癌性幹細胞の数または頻度の低下を決定するための限界希釈アッセイの使用に関する例および手引きは、例えば、国際公開公報第WO2008/042236号、ならびに米国特許出願公開第2008/0064049号および2008/0178305号に記載がある。

20

30

【0142】

ある態様において、Notch1結合物質または抗体は、抗体依存性細胞傷害作用（ADCC）を介して、Notch1を発現する細胞の細胞死を媒介する。ADCCは、抗体のFc部分を認識するエフェクター細胞による細胞溶解を伴う。例えば、多くのリンパ球、単球、組織マクロファージ、顆粒球および好酸球がFc受容体を有しており、細胞溶解を媒介することができる。

【0143】

ある態様において、抗Notch1抗体は、ヒトNotch1と、約1 μ Mもしくはそれ未満、約100nMもしくはそれ未満、約40nMもしくはそれ未満、約20nMもしくはそれ未満、約10nMもしくはそれ未満、約1nMもしくはそれ未満、約0.5nMもしくはそれ未満、または約0.1nMもしくはそれ未満の解離定数（ K_D ）で結合する。ある態様において、抗Notch1抗体は、ヒトNotch1と、約1nMまたはそれ未満の K_D で結合する。ある態様において、抗Notch1抗体は、ヒトNotch1と、約0.8nMまたはそれ未満の K_D で結合する。ある態様において、抗Notch1抗体は、ヒトNotch1と、約0.6nMまたはそれ未満の K_D で結合する。ある態様において、抗Notch1抗体は、ヒトNotch1と、約0.5nMまたはそれ未満の K_D で結合する。ある態様において、抗Notch1抗体は、ヒトNotch1と、約0.4nMまたはそれ未満の K_D で結合する。ある態様において、抗Notch1抗体は、ヒトNotch1と、約0.3nMまたはそれ未満の K_D で結合する。いくつかの態様において、 K_D は表面プラズモン共鳴によって測定される。いくつかの態様において、抗

40

50

体のNotch1に対する解離定数は、Biacoreチップ上に固定化されたNotch1の細胞外ドメインを含むNotch融合タンパク質（例えば、Notch1 ECD-Fc融合タンパク質）を用いて決定される解離定数である。

【0144】

ある態様において、抗Notch1抗体は、ヒトNotch1と、約1 μ Mもしくはそれ未満、約100nMもしくはそれ未満、約40nMもしくはそれ未満、約20nMもしくはそれ未満、約10nMもしくはそれ未満、または約1nMもしくはそれ未満の半値有効濃度（EC₅₀）で結合する。ある態様において、抗Notch1抗体は、ヒトNotch1と、約40nMもしくはそれ未満、約20nMもしくはそれ未満、約10nMもしくはそれ未満、または約1nMもしくはそれ未満のEC₅₀で結合する。

【0145】

いくつかの態様において、抗Notch1抗体は組換え抗体である。いくつかの態様において、抗Notch1抗体はキメラ抗体である。ある態様において、抗Notch1抗体はIgG抗体である。いくつかの態様において、抗Notch1抗体はIgG1抗体である。いくつかの態様において、抗Notch1抗体はIgG2抗体である。ある態様において、抗Notch1抗体はモノクローナル抗体である。ある態様において、抗Notch1抗体はヒト化抗体である。ある態様において、抗Notch1抗体はヒト抗体である。ある態様において、抗Notch1抗体は、抗原結合部位を含む抗体断片である。

【0146】

いくつかの態様において、抗Notch1抗体はポリクローナル抗体である。ポリクローナル抗体は、任意の公知の方法によって調製することができる。いくつかの態様において、ポリクローナル抗体は、関連抗原（例えば、精製ペプチド断片、完全長組換えタンパク質、融合タンパク質など）の複数回の皮下注射または腹腔内注射により、動物（例えば、ウサギ、ラット、マウス、ヤギ、ロバなど）に免疫処置を行うことによって調製される。抗原を任意で、キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）または血清アルブミンなどの担体タンパク質とコンジュゲートさせてもよい。抗原（担体タンパク質を伴うかまたは伴わない）を滅菌食塩水中に希釈し、通常はアジュバント（例えば、完全フロイントアジュバントまたは不完全フロイントアジュバント）と組み合わせて安定な乳濁液を形成させる。十分な期間の後に、免疫処置した動物の血液、腹水などからポリクローナル抗体を回収する。ポリクローナル抗体は、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル電気泳動、および透析を非限定的に含む、当技術分野において標準的な方法に従って、血清または腹水から精製することができる。

【0147】

いくつかの態様において、抗Notch1抗体はモノクローナル抗体である。いくつかの態様において、モノクローナル抗体は、当業者に公知のハイブリドーマ法を用いて調製される。ハイブリドーマ法を用いる場合は、マウス、ハムスター、または他の適切な宿主動物に対して上記のように免疫処置を行い、免疫抗原と特異的に結合すると考えられる抗体を産生するようにリンパ球を誘発する。いくつかの態様においては、リンパ球にインビトロで免疫処置を行う。いくつかの態様において、免疫抗原（例えば、Notchタンパク質）はヒトタンパク質またはその一部分である。いくつかの態様において、免疫抗原（例えば、Notchタンパク質）はマウスタンパク質またはその一部分である。いくつかの態様において、免疫抗原はヒトNotchタンパク質の細胞外ドメインである。いくつかの態様において、免疫抗原はマウスNotchタンパク質の細胞外ドメインである。いくつかの態様において、マウスはヒト抗原による免疫処置を受ける。いくつかの態様において、マウスはマウス抗原による免疫処置を受ける。

【0148】

免疫処置の後に、リンパ球を単離し、例えばポリエチレングリコールを用いて、適した骨髄腫細胞株と融合させる。当技術分野において公知の特殊な培地を用いてハイブリドーマ細胞を選別するが、融合していないリンパ球および骨髄腫細胞はこの選別過程を生き延びることができない。標的抗原を対象とするモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、免疫沈降法、イムノプロット法、およびインビトロ結合アッセイ（例えば、フロー

10

20

30

40

50

サイトメトリー、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA)、またはラジオイムノアッセイ (RIA) を非限定的に含む、種々の手法によって同定することができる。ハイブリドーマは、インビトロの組織培養下で標準的な方法を用いて、またはインビボで宿主動物における腹水として増やすことができる。モノクローナル抗体は、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル電気泳動、および透析を非限定的に含む、当該技術分野において標準的な方法に従って、培養培地または腹水から精製することができる。

【0149】

いくつかの態様において、モノクローナル抗体は、当業者に公知の組換えDNA手法を用いて作製することができる。いくつかの態様においては、モノクローナル抗体をコードするポリヌクレオチドを、成熟B細胞またはハイブリドーマ細胞から、例えば、抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子の特異的に増幅するオリゴヌクレオチドプライマーを用いるRT-PCRによって単離し、それらの配列を従来の手順を用いて決定する。重鎖および軽鎖をコードする単離されたポリヌクレオチドを、通常であれば免疫グロブリンタンパク質を産生しない宿主細胞、例えば、大腸菌 (*E. coli*) 細胞、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、または骨髄腫細胞にトランスフェクトされた時にモノクローナル抗体を産生する、適した発現ベクター中にクローニングする。ある態様において、組換えモノクローナル抗体またはその断片は、所望の種の変域領域またはCDRを発現するファージディスプレイライブラリーから単離することができる。

10

【0150】

モノクローナル抗体をコードするポリヌクレオチドを、例えば、代替的な抗体を作製するために組換えDNA技術を用いることによって、改変することができる。いくつかの態様においては、例えばマウスモノクローナル抗体の軽鎖および重鎖の定常ドメインによって、例えばヒト抗体のものを置換してキメラ抗体を作製すること、または非免疫グロブリンポリペプチドを置換して融合タンパク質を作製することができる。いくつかの態様においては、モノクローナル抗体の所望の抗体断片を作製するために、定常領域を短縮または除去する。いくつかの態様においては、変域領域の部位指定突然変異誘発または高密度突然変異誘発を用いて、モノクローナル抗体の特異性、親和性、および/または他の生物学的特性を最適化することができる。いくつかの態様においては、いくつかの態様においては、CDRの部位指定突然変異誘発を用いて、モノクローナル抗体の特異性、親和性、および/または他の生物学的特性を最適化することができる。

20

30

【0151】

いくつかの態様において、抗Notch1抗体はヒト化抗体である。典型的には、ヒト化抗体は、CDR由来の残基が、当業者に公知の方法によって、所望の特異性、親和性、および/または結合能を有する非ヒト種 (例えば、マウス、ラット、ウサギ、ハムスター等) のCDR由来の残基によって置き換えられたヒト免疫グロブリンである。いくつかの態様において、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク領域残基は、所望の特異性、親和性、および/または結合能を有する非ヒト種由来の抗体における対応する残基によって置き換えられる。いくつかの態様において、ヒト化抗体は、抗体の特異性、親和性、および/または能力を改良および最適化するために、Fvフレームワーク領域および/または置き換えられた非ヒト残基のいずれかにおけるさらなる残基の置換によって、さらに改変される。一般に、ヒト化抗体は、非ヒト免疫グロブリンに対応するCDRのすべてまたは実質的にすべてを含む、少なくとも1つ、典型的には2つまたは3つの変域領域のすべてまたは実質的にすべてを含むが、一方、フレームワーク領域のすべてまたは実質的にすべては、ヒト免疫グロブリン配列のものである。いくつかの態様において、ヒト化抗体はまた、免疫グロブリンの定常領域またはドメイン (Fc)、典型的にはヒト免疫グロブリンのもの少なくとも一部分も含みうる。ある態様において、そのようなヒト化抗体は治療的に用いられるが、これは、それらはヒト対象に投与された時に抗原性およびHAMA (ヒト抗マウス抗体) 反応が低下する可能性があるためである。当業者は、公知の手法に従って、免疫原性の低下した機能的なヒト化抗体を得ることができるであろう。

40

50

【0152】

ある態様において、抗Notch1抗体はヒト抗体である。ヒト抗体は、当技術分野において公知のさまざまな手法を用いて直接調製することができる。いくつかの態様において、ヒト抗体は、インビトロで免疫処置を受けた不死化ヒトBリンパ球から、または免疫処置を受けた個体から単離したリンパ球から作製することができる。いずれの場合にも、標的抗原を対象とする抗体を産生する細胞を作製して単離することができる。

【0153】

いくつかの態様において、ヒト抗体はファージライブラリーから選択することができ、ここでこのファージライブラリーはヒト抗体を発現する。ファージディスプレイ技術を用いることで、免疫処置を受けていないドナー由来の免疫グロブリン可変ドメイン遺伝子レパートリーから、ヒト抗体および抗体断片をインビトロで生成させることができる。抗体ファージライブラリーの作製および使用のためのさまざまな手法が当技術分野において周知である。

10

【0154】

抗体がひとたび同定されれば、鎖シャッフリングおよび部位指定突然変異誘発を非限定的に含む、当技術分野において公知の親和性成熟戦略を、高親和性ヒト抗体を作製するために利用することができる。

【0155】

いくつかの態様において、ヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン遺伝子座を含むトランスジェニックマウスにおいて作り出すことができる。免疫処置を受けると、これらのマウスは内因性免疫グロブリン産生を伴わずにヒト抗体の全レパートリーを産生することができる。

20

【0156】

ある態様において、抗Notch1抗体は二重特異性抗体である。二重特異性抗体は、少なくとも2種類の異なるエピトープを特異的に認識して、それと結合することができる。異なるエピトープは同じ分子内にあってもよく、または異なる分子上にあってもよい。いくつかの態様において、抗体は、第1の抗原標的を発現する細胞に細胞防御機構を集中させるために、第1の抗原標的（例えば、Notch1）に加えて、白血球上のエフェクター分子（例えば、CD2、CD3、CD28、もしくはB7）またはFc受容体（例えば、CD64、CD32、もしくはCD16）といった第2の抗原標的も特異的に認識して結合することができる。いくつかの態様において、これらの抗体を用いて、特定の標的抗原、例えばNotchタンパク質などを発現する細胞に細胞傷害性物質を向かわせることができる。これらの抗体は、抗原結合アームと、細胞傷害性物質または放射性核種キレート剤、例えばEOTUBE、DPTA、DOTA、もしくはTETAなどと結合するアームとを保有する。ある態様において、抗体は、血管新生に影響を与えるために使用しうる。ある態様において、二重特異性抗体は、Notch1ならびにVEGFと特異的に結合する。ある態様において、二重特異性抗体は、Notch1、ならびにNotchリガンド（例えば、DLL4、Jagged1もしくはJagged2）、またはNotch2、Notch3、およびNotch4からなる群より選択される少なくとも1つの他のNotch受容体と特異的に結合する。

30

【0157】

二重特異性抗体を作り出すための技法は当業者に公知であり、例えば、Millstein et al., 1983, Nature, 305:537-539; Brennan et al., 1985, Science, 229:81; Suresh et al., 1986, Methods in Enzymol., 121:120; Traunecker et al., 1991, EMBO J., 10:3655-3659; Shalaby et al., 1992, J. Exp. Med., 175:217-225; Kostelny et al., 1992, J. Immunol., 148:1547-1553; Gruber et al., 1994, J. Immunol., 152:5368; 米国特許第5,731,168号、および米国特許出願公開第2011/0123532号を参照されたい。二重特異性抗体は無傷の抗体であってもよく、または抗体断片であってもよい。三価以上の結合価を有する抗体も想定している。例えば、三重特異性抗体を調製することができる (Tutt et al., 1991, J. Immunol., 147:60)。したがって、ある態様において、Notch1に対する抗体は多重特異性である。

40

【0158】

50

ある態様において、本明細書に記載の抗Notch1抗体は、単一特異性であってよい。例えば、ある態様において、抗体が含む1つまたは複数の抗原結合部位のそれぞれは、Notch1上の相同なエピトープと結合することができる（または結合する）。

【0159】

ある態様において、抗Notch1抗体は抗体断片である。抗体断片は無傷の抗体とは異なる機能または能力を有してもよく；例えば、抗体断片の腫瘍浸透性が増大していてもよい。無傷の抗体のタンパク質分解消化を非限定的に含む、抗体断片の生成のためのさまざまな手法が公知である。いくつかの態様において、抗体断片には、抗体分子のペプシン消化によって産生されるF(ab')₂断片が含まれる。いくつかの態様において、抗体断片には、F(ab')₂断片のジスルフィド架橋を還元することによって作製されるFab断片が含まれる。他の態様において、抗体断片には、パインおよび還元剤による抗体分子の処理によって作製されるFab断片が含まれる。ある態様において、抗体断片は組換え法によって生産される。いくつかの態様において、抗体断片にはFvまたは単鎖Fv(scFv)断片が含まれる。Fab、FvおよびscFv抗体断片は大腸菌または他の宿主細胞内で発現させて、それらから分泌させることができることから、これらの断片の大量生産が可能である。いくつかの態様において、抗体断片は、本明細書で考察したような抗体ファージライブラリから単離される。例えば、Fab発現ライブラリの構築のための方法を用いて、Notch1、またはそれらの誘導体、断片、類似体またはホモログに対する所望の特異性を有するモノクローナルFab断片の迅速かつ効果的な同定を可能にすることができる。いくつかの態様において、抗体断片は、線状の抗体断片である。ある態様において、抗体断片は単一特異性または二重特異性である。ある態様において、抗Notch1抗体はscFvである。さまざまな手法を、Notch1に対して特異的な単鎖抗体の生産のために用いることができる。

10

20

【0160】

特に抗体断片の場合には、その血清中半減期を変更するため（例えば、延長または短縮するため）に、抗体を改変することがさらに望ましいことがある。これは例えば、抗体断片内の適切な領域の突然変異による、抗体断片へのサルベージ受容体結合エピトープの組み入れによって、またはペプチドタグにエピトープを組み入れ、それを続いて抗体断片のいずれかの端もしくは中央部に融合させること（例えば、DNA合成またはペプチド合成による）によって達成することができる。

【0161】

ヘテロ結合体抗体も本発明の範囲内にある。ヘテロ結合体抗体は、共有結合性に接続された2つの抗体で構成される。そのような抗体は、例えば、免疫細胞を不必要な細胞に標的化する目的で提案されている（米国特許第4,676,980号）。また、ヘテロ結合体抗体を、架橋剤を必要とする方法を含む、合成タンパク質化学における公知の方法を用いてインビトロで調製しうることも想定している。例えば、ジスルフィド交換反応を用いて、またはチオエステル結合を形成させることによって、イムノトキシンを構築することができる。この目的のために適した試薬の例には、イミノチオレートおよびメチル-4-メルカプトブチリミデートが含まれる。

30

【0162】

本発明においては、改変抗体、またはそれらの断片が、抗体とヒトNotch1との会合をもたらすあらゆる種類の可変領域を含みうるということが理解されるべきである。いくつかの態様において、可変領域は、体液性応答を開始して所望の抗原に対する免疫グロブリンを生成するように誘導しうる、あらゆる種類の哺乳動物を含むか、それに由来してよい可変領域である。そのため、改変抗体の可変領域は、例えば、ヒト、マウス、非ヒト霊長動物（例えば、カニクイザル、マカクザルなど）またはウサギ由来であってよい。いくつかの態様において、改変された免疫グロブリンの可変領域および定常領域は両方ともヒトのものである。他の態様において、適合性のある抗体（通常は、ヒトでない源に由来）の可変領域を、分子の結合特性を改善するため、または分子の免疫原性を低下させるために操作すること、または特異的に適応させることができる。この点に関して、移入アミノ酸配列を含めることにより、本発明において有用な可変領域をヒト化すること、または他の様式で変

40

50

更することができる。

【0163】

ある態様において、重鎖および軽鎖の両方の可変ドメインは、1つもしくは複数のCDRの少なくとも部分的な置き換えによって、または必要な場合には、部分的なフレームワーク領域の置き換えならびに配列改変および/または変更によって変更される。CDRは、フレームワーク領域の由来となった抗体と同じクラス、またはさらには同じサブクラスに由来してもよいが、CDRが、異なるクラスの抗体、多くは異なる種からの抗体に由来しうることとも想定される。ある可変ドメインの抗原結合能を別の可変ドメインに移行させるために、CDRのすべてをドナー可変領域由来のCDRのすべてによって置き換えることは必要でない場合がある。より正確に言えば、抗原結合部位の活性を維持するのに必要な残基を移行させることだけが必要な場合がある。

10

【0164】

可変領域の変更にかかわらず、当業者は、本発明の改変抗体に、ネイティブ性定常領域または変更されていない定常領域を含む免疫原性がほぼ同じ抗体と比較して腫瘍局在性の増大、腫瘍浸透性の増大、血清中半減期の短縮または血清中半減期の延長といった所望の生化学的特性が得られるように、定常領域ドメインのうち1つまたは複数の少なくとも一部分が欠失しているか、または他の様式で変更されている抗体（例えば、完全長抗体またはそれらの抗原結合性断片）が含まれると考えられることを理解するであろう。いくつかの態様において、改変抗体の定常領域はヒト定常領域を含む。定常領域の改変には、1つまたは複数のドメインにおける1つまたは複数のアミノ酸の付加、欠失、または置換が含まれる。本明細書に開示された改変抗体は、3つの重鎖定常ドメイン（CH1、CH2またはCH3）の1つもしくは複数、および/または軽鎖定常ドメイン（CL）に対する変更または改変を含みうる。いくつかの態様においては、1つまたは複数のドメインが、改変抗体の定常領域から部分的または完全に欠失している。いくつかの態様においては、CH2ドメイン全体が除去されている（CH2構築物）。いくつかの態様において、取り除かれた定常領域ドメインは、存在しない定常領域によって典型的には付与される分子柔軟性の一部を与える、短いアミノ酸スペーサー（例えば、10アミノ酸残基）によって置き換えられる。

20

【0165】

ある態様において、改変抗体は、CH3ドメインが抗体のヒンジ領域と直接融合するように操作される。他の態様においては、ペプチドスペーサーが、ヒンジ領域と改変されたCH2および/またはCH3ドメインとの間に挿入される。例えば、CH2ドメインが欠失しており、残りのCH3ドメイン（改変されているか、または改変されていない）が5~20アミノ酸のスペーサーによってヒンジ領域と接続している構築物を発現させることができる。そのようなスペーサーを付加することにより、確実に、定常ドメインの調節エレメントを障害物のないアクセス可能な状態に保つこと、またはヒンジ領域を柔軟なままに保つことができる。しかし、アミノ酸スペーサーが、場合によっては、免疫原性であって、構築物に対する望まれない免疫応答を誘発することが判明する恐れがあることに留意すべきである。したがって、ある態様において、構築物に付加されるあらゆるスペーサーは、改変抗体の所望の生化学的特質を維持するように、比較的非免疫原性であると考えられる。

30

【0166】

いくつかの態様において、改変抗体は、定常ドメインの部分的欠失、または少数もしくは単一のアミノ酸の置換のみを有しうる。例えば、CH2ドメインの選択された区域における単一のアミノ酸の突然変異だけで、Fc結合を大幅に低下させ、それによって腫瘍局在性および/または腫瘍浸透性を増大させるのに十分な場合がある。同様に、調節しようとする特定のエフェクタ機能（例えば、補体C1q結合）を制御する1つまたは複数の定常領域ドメインの部分を単に欠失させることが望ましい場合もある。定常領域のそのような部分的欠失により、当該定常領域ドメインに関連する他の望ましい機能をそのままにしておく一方で、抗体の選択された特性（血清中半減期）が改善される可能性がある。さらに、上に示唆したように、開示された抗体の定常領域は、結果として得られる構築物のプロファイルを向上させる、1つまたは複数のアミノ酸の突然変異または置換によって改変されても

40

50

よい。この点に関して、改変抗体の構成および免疫原性プロファイルを実質的に維持する一方で、保存された結合部位（例えば、Fc結合性）によってもたらされる活性を妨害することが可能な場合がある。ある態様において、改変抗体は、エフェクター機能の低下もしくは増大といった望ましい特徴を強化するように、またはさらに多くのサイトトキシンもしくは糖質の結び付きをもたらすように、定常領域への1つまたは複数のアミノ酸の付加を含む。

【0167】

定常領域がいくつかのエフェクター機能を媒介することは、当技術分野において公知である。例えば、補体のC1成分と（抗原と結合した）IgGまたはIgM抗体のFc領域との結合により、補体系が活性化される。補体の活性化は、細胞病原体のオプソニン化および溶解において重要である。補体活性化は炎症反応も刺激し、自己免疫性過敏症にも関与する場合がある。加えて、抗体のFc領域は、Fc受容体（FcR）を発現する細胞と結合することもできる。IgG（ γ 受容体）、IgE（ ϵ 受容体）、IgA（ α 受容体）およびIgM（ μ 受容体）を含む、種々のクラスの抗体に対して特異的な、いくつかのFc受容体がある。抗体と細胞表面上のFc受容体との結合により、抗体でコーティングされた粒子の貪食および破壊、免疫複合体の排除、抗体でコーティングされた標的細胞のキラー細胞による溶解、炎症メディエーターの放出、胎盤通過および免疫グロブリン産生の制御を含む、いくつかの重要な生物学的応答が誘発される。

10

【0168】

ある態様において、抗Notch1抗体はエフェクター機能の変更をもたらし、これが続いて、投与された抗体の生物学的プロファイルに影響を与える。例えば、いくつかの態様において、定常領域ドメインの（点突然変異または他の手段を通じての）欠失または不活性化は、流血中改変抗体（例えば、抗Notch1抗体）のFc受容体との結合を減少させ、それによって腫瘍局在性および/または浸透性を増大させることができる。他の態様において、定常領域の改変は、抗体の血清中半減期を延長させるか、または短縮させる。いくつかの態様において、定常領域は、腫瘍局在性および/または浸透性の強化が可能になるように、ジスルフィド結合またはオリゴ糖モイエティーを除去するように改変される。

20

【0169】

ある態様において、抗Notch1抗体は、1つまたは複数のエフェクター機能を有しない。いくつかの態様において、抗体は、抗体依存性細胞傷害（ADCC）活性を有しない、かつ/または補体依存性細胞傷害（CDC）活性を有しない。ある態様において、抗体は、Fc受容体および/または補体因子と結合しない。ある態様において、抗体はエフェクター機能を有しない。

30

【0170】

本発明は、本明細書に記載されるキメラ抗体、ヒト化抗体、およびヒト抗体、またはこれらの抗体断片と実質的に相同である変種および同等物をさらに包含する。これらは、例えば、保存的置換突然変異、すなわち、類似のアミノ酸による1つまたは複数のアミノ酸の置換を含む。

【0171】

本発明の抗Notch1抗体は、当技術分野において公知の任意の方法によって、特異的結合に関してアッセイすることができる。用いるイムノアッセイには、例えば、Biacore分析、FACS分析、免疫蛍光、免疫細胞化学、ウエスタンブロット分析、ラジオイムノアッセイ、ELISA法、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、沈殿反応、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、補体固定アッセイ、免疫放射線測定アッセイ、蛍光イムノアッセイ、およびプロテインAイムノアッセイなどの手法を用いる、競合的アッセイ系および非競合的アッセイ系が非限定的に含まれる。そのようなアッセイは日常的なものであり、当技術分野において周知である（例えば、Ausubel et al., Editor s, 1994-present, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., New York, NYを参照）。

40

【0172】

50

例えば、抗Notch1抗体とヒトNotch1との特異的結合は、ELISAを用いて判定しうる。ELISAアッセイには、抗原を調製する段階、96ウェルマイクロタイタープレートのウェルを抗原でコーティングする段階、酵素基質（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼ）などの検出可能な化合物とコンジュゲートさせた抗体をウェルに添加する段階、一定時間にわたってインキュベートする段階、および結合性物質または抗体の存在を検出する段階が含まれる。いくつかの態様において、抗体は検出可能な化合物とコンジュゲートされず、その代わりに、抗体を認識する第2の結合抗体がウェルに添加される。いくつかの態様において、ウェルを抗原でコーティングする代わりに、抗体をウェルにコーティングしてもよく、コーティングされたウェルに抗原を添加した後に、検出可能な化合物をコンジュゲートさせた第2の抗体を添加する。当業者は、検出されるシグナルを増強するために改変および/または最適化しうるパラメータ、ならびに用いうるELISAの他の変形物に精通しているであろう（例えば、Ausubel et al., Editors, 1994-present, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., New York, NYを参照）。

10

【0173】

もう1つの例では、ヒトNotch1に対する抗Notch1抗体の特異的結合を、FACSを用いて決定しうる。FACSスクリーニングアッセイは、融合タンパク質として抗原を発現するcDNA構築物を作製する段階、構築物を細胞にトランスフェクトする段階、抗原を細胞の表面上に発現させる段階、抗Notch1抗体をトランスフェクトされた細胞と混合する段階、およびある時間にわたってインキュベートする段階を含みうる。抗体による結合を受けた細胞は、検出可能な化合物とコンジュゲートさせた二次抗体（例えば、PE結合抗Fc抗体）およびフローサイトメーターを用いることによって同定しうる。当業者は、検出されるシグナルを最適化するために改変しうるパラメータ、ならびにスクリーニング（例えば、遮断抗体に関するスクリーニング）を強化しうるFACSの他の変法について精通しているであろう。

20

【0174】

抗Notch1抗体の結合親和性および抗体-抗原相互作用の結合-解離速度（on-off rate）は、競合結合アッセイによって決定することができる。いくつかの態様において、競合結合アッセイは、漸増量の非標識抗原の存在下における、標識抗原（例えば、³Hまたは¹²⁵I）またはその断片もしくは変異体と関心対象の抗体とのインキュベーションと、それに続く、標識抗原と結合した抗体の検出を含むラジオイムノアッセイである。抗原に対する抗体の親和性および結合-解離速度は、データからスキャッチャードプロット分析によって決定することができる。いくつかの態様においては、Biacore速度論的分析を用いて、抗体、またはNotch1と結合する抗体の結合親和性および結合-解離速度を決定する。Biacore速度論的分析は、Biacoreチップの表面上に固定化した抗原（例えば、Notchタンパク質）に対する抗原の結合およびそれからの解離を分析する段階を含む。いくつかの態様において、Biacore速度論的分析は、定性的エピトープ競合結合アッセイにおいて種々の抗体の結合を決定するために用いられる。

30

【0175】

したがって、本発明は、ヒトNotch1の細胞外ドメインと結合する抗体を作製するための方法を提供する。いくつかの態様において、本発明は、ヒトNotch1の細胞外ドメインと結合する抗体を作製するための方法を提供する。いくつかの態様において、本発明は、ヒトNotch1の細胞外ドメインの非リガンド結合性膜基部領域と結合する抗体を作製するための方法を提供する。いくつかの態様において、Notch1と結合する抗体を作製するための方法は、ハイブリドーマ手法を用いる段階を含む。いくつかの態様において、本方法は、マウスNotch1またはヒトNotch1の細胞外ドメインを免疫抗原として用いる段階を含む。いくつかの態様において、Notch1と結合する抗体を作製する方法は、ヒトファージライブラリーをスクリーニングする段階を含む。本発明はさらに、ヒトNotch1と結合する抗体を同定する方法を提供する。いくつかの態様において、抗体は、フローサイトメトリー（FACS）による、Notch1に対する結合に関するスクリーニングによって同定される。いくつかの態様において、抗体は、ヒトNotch1に対する結合に関してスクリーニングされる。いくつかの

40

50

態様において、抗体は、マウスNotch1に対する結合に関してスクリーニングされる。いくつかの態様において、抗体は、Notch活性化の阻害または遮断に関するスクリーニングによって同定される。

【0176】

ある態様において、本明細書に記載の抗体は単離される。ある態様において、本明細書に記載の抗体は実質的に純粋である。

【0177】

抗Notch1抗体の非限定的な例は、例えば、米国特許第8,435,513号に記載されている。

【0178】

本発明のいくつかの態様において、抗Notch1抗体はポリペプチドである。ポリペプチドは、Notch1の細胞外ドメインと結合する組換えポリペプチド、天然ポリペプチド、または合成ポリペプチドであってよい。当業者は、タンパク質の構造または機能に大きな影響を与えずにポリペプチドのいくつかのアミノ酸配列を変化させることを認識しているであろう。したがって、本ポリペプチドには、ヒトNotch1タンパク質のエピトープに対して実質的な結合活性を示す、ポリペプチドの変形物がさらに含まれる。いくつかの態様において、ポリペプチドのアミノ酸配列の変形物には、欠失、挿入、逆位、反復、および/または型置換が含まれる。

10

【0179】

ポリペプチドおよびそれらの変異体は、通常はそのポリペプチドの部分ではない、さらなる化学的モイエティーを含有するようにさらに改変することができる。誘導体化されたモイエティーは、ポリペプチドの溶解性、生物学的半減期または吸収を向上させることができる。モイエティーはまた、ポリペプチドおよび変異体の何らかの望ましくない副作用を軽減するか、または消失させることもできる。そのような化学的モイエティーに関する概説は、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22nd Edition, 2012, Pharmaceutical Press, Londonに見いだすことができる。

20

【0180】

本明細書に記載の単離されたポリペプチドは、当技術分野において公知の任意の適した方法によって生産することができる。そのような方法は、直接的なタンパク質合成法から、単離されたポリペプチド配列をコードするDNA配列を構築して、そのような配列を適した宿主において発現させることまでの範囲にわたる。いくつかの態様において、DNA配列は、組換え技術を用いて、関心対象の野生型タンパク質をコードするDNA配列を単離または合成することによって構築される。任意で、配列に、その機能的変異体を得るために部位特異的突然変異誘発によって突然変異を誘発させることもできる。

30

【0181】

いくつかの態様において、関心対象のポリペプチドをコードするDNA配列は、オリゴヌクレオチド合成装置を用いる化学合成によって構築することができる。オリゴヌクレオチドは、所望のポリペプチドのアミノ酸配列に基づき、組換え関心対象のポリペプチドが産生されると考えられる宿主細胞において好まれるコドンを選択することによって設計することができる。標準的な方法を適用して、関心対象のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を合成することができる。例えば、完全なアミノ酸配列を用いて、逆翻訳された遺伝子を構築することができる。さらに、特定のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含有するDNAオリゴマーを合成することもできる。例えば、所望のポリペプチドの一部をコードするいくつかの小さなオリゴヌクレオチドを合成し、続いて連結させることができる。個々のオリゴヌクレオチドは、典型的には相補的アセンブリのための5'および/または3'突出部を含有する。

40

【0182】

ひとたびアセンブリが行われれば（合成、部位指定突然変異誘発、または別の方法によって）、関心対象の特定のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を発現ベクターに挿入し、所望の宿主におけるポリペプチドの発現のために適切な発現制御配列と機能的に連結することができる。アセンブリの正しさは、ヌクレオチド配列決定、制限酵素マ

50

ッピング、および/または適した宿主における生物活性ポリペプチドの発現によって確認することができる。当技術分野において周知のように、宿主におけるトランスフェクトされた遺伝子の高い発現レベルを得るためには、遺伝子を、選択された発現宿主において機能する転写発現制御配列および翻訳発現制御配列と機能的に連結させなければならない。

【0183】

ある態様においては、Notch1抗体またはその断片をコードするDNAの増幅および発現のために、組換え発現ベクターが用いられる。例えば、組換え発現ベクターは、抗Notch1抗体またはその断片のポリペプチド鎖をコードする合成DNA断片またはcDNA由来DNA断片が、哺乳動物遺伝子、微生物遺伝子、ウイルス遺伝子、または昆虫遺伝子に由来する適した転写調節エレメントまたは翻訳調節エレメントと機能的に連結されたものを有する、複製可能なDNA構築物であってよい。転写単位は一般に、(1) 遺伝子発現において役割を果たす1つまたは複数の調節エレメント、例えば、転写プロモーターおよび/またはエンハンサー、(2) mRNAへと転写され、タンパク質へと翻訳される構造配列またはコード配列、ならびに(3) 適切な転写および翻訳の開始配列および終結配列、のアセンブリを含む。調節エレメントには、転写を制御するためのオペレーター配列が含まれる。複製起点によって通常付与される、宿主において複製する能力、および形質転換体の認識を容易にする選択遺伝子も組み入れることができる。DNA領域は、それらが互いに機能的に関連している場合に、「機能的に連結」されている。例えば、シグナルペプチド(分泌リーダー)のDNAは、ポリペプチド分泌に参与する前駆体としてそれが発現されるならば、ポリペプチドのDNAと機能的に連結されており; プロモーターは、コード配列の転写を制御するならば、それと機能的に連結されており; またはリボソーム結合部位は、翻訳が可能となるように配置されているならば、コード配列と機能的に連結されている。酵母発現系における使用を目的とする構造エレメントには、翻訳されたタンパク質の宿主細胞による細胞外分泌を可能にするリーダー配列が含まれる。または、組換えタンパク質がリーダー配列も輸送配列も伴わずに発現される場合には、それはN末端メチオニン残基を含みうる。この残基は、任意で、最終産物を得るために、発現された組換えタンパク質から後に切り離されてもよい。

【0184】

発現ベクターおよび制御エレメントの選択は宿主の選択に応じて決まる。多種多様な発現宿主/ベクターの組み合わせを利用することができる。真核生物宿主において有用な発現ベクターには、例えば、SV40、ウシパピローマウイルス、アデノウイルスおよびサイトメガロウイルスに由来する発現制御配列を含むベクターが含まれる。細菌宿主において有用な発現ベクターには、公知の細菌プラスミド、例えばpCR1、pBR322、pMB9およびそれらの誘導体などを含む大腸菌由来のプラスミド、ならびにより宿主範囲の広いプラスミド、例えばM13など、ならびに他の繊維状一本鎖DNAファージが含まれる。

【0185】

抗Notch1抗体(または抗原として用いるためのNotchタンパク質)の発現のために適した宿主細胞には、適切なプロモーターの制御下にある原核生物細胞、酵母細胞、昆虫細胞、または高等真核細胞が含まれる。原核生物には、グラム陰性生物またはグラム陽性生物、例えば、大腸菌または桿菌が含まれる。高等真核細胞には、下記のような哺乳動物由来の樹立細胞株が含まれる。無細胞翻訳系を使用することもできる。

【0186】

組換えタンパク質を発現させるために、さまざまな哺乳動物培養系または昆虫細胞培養系が用いられる。哺乳動物細胞における組換えタンパク質の発現は、そのようなタンパク質が一般に正しく折り畳まれ、適切に修飾され、かつ生物学的に機能することから好まれることがある。適した哺乳動物宿主細胞株の例には、COS-7(サル腎臓由来)細胞株、L-929(マウス線維芽細胞由来)細胞株、C127(マウス乳腺腫瘍由来)細胞株、3T3(マウス線維芽細胞由来)細胞株、CHO(チャイニーズハムスター卵巣由来)細胞株、HeLa(ヒト子宮頸癌由来)細胞株、BHK(ハムスター腎臓線維芽細胞由来)細胞株、およびHEK-293(ヒト胚性腎臓由来)細胞株、ならびにそれらの変種が含まれる。哺乳動物発現ベクターは

、例えば、複製起点、発現させようとする遺伝子に連結される適したプロモーターおよびエンハンサー、ならびに他の5'または3'隣接非転写配列、ならびに5'または3'非翻訳配列、例えば、必要なりボソーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライスドナー部位およびスプライサクセプター部位、ならびに転写終結配列といった非転写性エレメントを含みうる。

【0187】

昆虫細胞培養系（例えば、バキュロウイルス）における組み換えタンパク質の発現はまた、正しく折りたたまれた生物学的に機能的なタンパク質を産生するための頑健な方法を提供する。昆虫細胞における異種タンパク質の産生のためのバキュロウイルス系は、当業者に周知である（例えば、Luckow and Summers, 1988, Bio/Technology, 6:47を参照）。

10

【0188】

形質転換宿主によって産生されたタンパク質（例えば抗体）は、任意の適した方法に従って精製することができる。そのような方法には、クロマトグラフィー（例えば、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、およびサイジングカラムクロマトグラフィー）、遠心分離、溶解性の差、またはタンパク質精製のための他の任意の標準的な手法が含まれる。適切なアフィニティークラムの通過による容易な精製を可能にするために、ヘキサヒスチジン、マルトース結合ドメイン、インフルエンザコート配列およびグルタチオン-S-トランスフェラーゼといったアフィニータグをタンパク質に結び付けることができる。単離されたタンパク質は、タンパク質分解、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、核磁気共鳴（NMR）、およびX線結晶解析のような手法を用いて、物理的に特徴付けることができる。

20

【0189】

例えば、組換えタンパク質を培地中に分泌する系からの上清を、市販のタンパク質濃縮フィルター、例えば、AmiconまたはMillipore Pellicon限外濾過ユニットを用いて、まず濃縮することができる。濃縮段階の後に、濃縮物を適した精製マトリックスに適用することができる。いくつかの態様においては、陰イオン交換樹脂、例えば、ジエチルアミノエチル（DEAE）ペンダント基を有するマトリックスまたは基質を使用することができる。マトリックスは、アクリルアミド、アガロース、デキストラン、セルロース、またはタンパク質精製に一般に使用される他の種類のものであってよい。いくつかの態様においては、陽イオン交換の段階を使用することができる。適した陽イオン交換体には、スルホプロピル基またはカルボキシメチル基を含むさまざまな不溶性マトリックスが含まれる。いくつかの態様においては、セラミックハイドロキシアパタイト（CHT）を非限定的に含むハイドロキシアパタイト媒質が使用される。いくつかの態様においては、タンパク質をさらに精製するために、疎水性RP-HPLC媒質（例えば、ペンダントメチル基または他の脂肪族基を有するシリカゲル）を使用する1つまたは複数の逆相HPLC段階が使用される。前述の精製段階のいくつかまたはすべてをさまざまな組み合わせで使用することにより、均質な組換えタンパク質を得ることができる。

30

【0190】

いくつかの態様において、細菌培養で産生された組換えタンパク質は、例えば、まず細胞ペレットから抽出し、その後1回または複数回の濃縮、塩析、水性イオン交換クロマトグラフィー、またはサイズ排除クロマトグラフィーの段階を行うことによって単離することができる。ある態様において、最後の精製段階にはHPLCが使用される。組換えタンパク質の発現に使用される微生物細胞は、凍結融解サイクル、超音波処理、機械的破壊、または細胞溶解剤の使用を含む、任意の従来の方法によって破壊することができる。

40

【0191】

抗体および他のタンパク質の精製のための当技術分野において公知の方法には、例えば、米国特許出願公開第2008 / 0312425号；第2008 / 0177048号；および第2009 / 0187005号に記載されたものも含まれる。

【0192】

タンパク質標的と高い親和性で結合する、抗体でないポリペプチドの同定および生産の

50

ための種々の方法が、当技術分野において公知である。例えば、Skerra, 2007, Curr. Opin. Biotechnol., 18:295-304 ; Hosse et al., 2006, Protein Science, 15:14-27 ; Gill et al., 2006, Curr. Opin. Biotechnol., 17:653-658 ; Nygren, 2008, FEBS J., 275:2668-76 ; およびSkerra, 2008, FEBS J., 275:2677-83を参照。ある態様においては、ファージディスプレイ技術を用いて、Notch1結合性ポリペプチドを生産および/または同定することができる。ある態様において、Notch1結合性ポリペプチドは、プロテインA、プロテインG、リボカリン、フィブロネクチンドメイン、アンキリンコンセンサス反復ドメイン、およびチオレドキシンからなる群より選択される種類のタンパク質スカフォールドを含む。

【0193】

ある態様において、抗Notch1抗体は、いくつかの結合形態（例えば、免疫結合体もしくは放射性結合体）または非結合形態のいずれか1つとして用いることができる。ある態様において、抗体は、CDCおよび/またはADCCを含む対象の天然の防御機構を利用して悪性細胞または癌細胞を排除するために、非結合形態で用いられる。

【0194】

ある態様において、抗Notch1抗体は細胞傷害性物質とコンジュゲートされる。いくつかの態様において、細胞傷害性物質は、メトトレキサート、アドリアマイシン、ドキソルビシン、メルファラン、マイトマイシンC、クロラムブシル、ダウノルビシンまたは他のインターカレート剤を非限定的に含む化学療法薬である。いくつかの態様において、細胞傷害性物質は、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合性活性断片、エキソトキシンA鎖、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシンA鎖、 α -サルシン、シナアブラギリ (*Aleurites fordii*) タンパク質、ジアンシタンパク質、アメリカヤマゴボウ (*Phytolaca americana*) タンパク質 (PAPI, PAPII, およびPAP-S)、ニガウリ (*Momordica charantia*) インヒビター、クルシン、クロチン、サボンソウ (*Sapaonaria officinalis*) インヒビター、ゲロニン、レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシン、およびトリコテセンを非限定的に含む、細菌、真菌、植物もしくは動物に由来する酵素活性を有する毒素、またはその断片である。ある態様において、細胞傷害性物質は、放射線結合体または放射線結合抗体を生成させるための放射性同位体である。放射性結合抗体の生成のためには、 ^{90}Y 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{123}I 、 ^{111}In 、 ^{131}In 、 ^{105}Rh 、 ^{153}Sm 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{166}Ho 、 ^{177}Lu 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re および ^{212}Bi を非限定的に含む、種々の放射性核種を利用することができる。抗体と1つまたは複数の小分子毒素、例えばカリケアマイシン、メイタンシノイド、トリコテン、およびCC1065、ならびにこれらの毒素の毒素活性を有する誘導体との結合体を用いることもできる。抗体と細胞傷害性物質との結合体は、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルチオール (pyridyidithiol)) プロピオネート (SPDP)、イミノチオラン (IT)、イミドエステルの二官能基誘導体 (ジメチルアジプイミダートHCLなど)、活性エステル (ジスクシンイミジルスベラートなど)、アルデヒド (グルタルアルデヒドなど)、ビス-アジド化合物 (ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミンなど)、ビス-ジアゾニウム誘導体 (ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミンなど)、ジイソシアネート (トルエン2,6-ジイソシアネートなど)、およびビス活性フッ素化合物 (1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼンなど) といった、種々の二官能基性タンパク質カップリング剤を用いて作り出される。

【0195】

ヘテロ結合体抗体も本発明の範囲内にある。ヘテロ結合体抗体は、共有結合性に接続された2つの抗体で構成される。そのような抗体は、例えば、免疫細胞を不必要な細胞に標的化する目的で提案されている (米国特許第4,676,980号)。この抗体は、架橋剤を必要とする方法を含む、合成タンパク質化学における公知の方法を用いて、インビトロで調製すると想定している。

【0196】

IV. ポリヌクレオチド

ある態様において、本発明は、ヒトNotch1の細胞外ドメインと特異的に結合するポリペ

10

20

30

40

50

プチド、またはそのようなポリペプチドの断片をコードするポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを範囲に含む。「あるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド」という用語は、ポリペプチドのコード配列だけを含むポリヌクレオチド、ならびにさらなるコード配列および/または非コード配列を含むポリヌクレオチドを範囲に含む。例えば、本発明は、ヒトNotch1に対する抗体をコードするか、またはそのような抗体の断片をコードする核酸配列を含むポリヌクレオチドを提供する。本発明のポリヌクレオチドは、RNAの形態にあってもよく、DNAの形態にあってもよい。DNAにはcDNA、ゲノムDNA、および合成DNAが含まれ、これらは二本鎖でも一本鎖でもよく、一本鎖である場合はコード鎖でも非コード鎖（アンチセンス）鎖でもよい。

【0197】

ある態様において、ポリヌクレオチドは、SEQ ID NO : 3、SEQ ID NO : 5、SEQ ID NO : 7、SEQ ID NO : 9、SEQ ID NO : 11、SEQ ID NO : 13、SEQ ID NO : 21、SEQ ID NO : 24、SEQ ID NO : 27、SEQ ID NO : 30、SEQ ID NO : 33、およびSEQ ID NO : 36からなる群より選択される配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。いくつかの態様において、ポリヌクレオチドは、SEQ ID NO : 24およびSEQ ID NO : 30からなる群より選択されるポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの態様において、プラスミドは、SEQ ID NO : 24を含むポリヌクレオチドを含む。いくつかの態様において、プラスミドは、SEQ ID NO : 30を含むポリヌクレオチドを含む。

【0198】

ある態様において、ポリヌクレオチドは、SEQ ID NO : 3、SEQ ID NO : 5、SEQ ID NO : 7、SEQ ID NO : 9、SEQ ID NO : 11、SEQ ID NO : 13、SEQ ID NO : 21、SEQ ID NO : 24、SEQ ID NO : 27、SEQ ID NO : 30、SEQ ID NO : 33、およびSEQ ID NO : 36からなる群より選択される配列を含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%同一な、少なくとも85%同一な、少なくとも90%同一な、少なくとも95%同一な、さらにいくつかの態様においては、少なくとも96%、97%、98%または99%同一なヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドを含む。また、SEQ ID NO : 3、SEQ ID NO : 5、SEQ ID NO : 7、SEQ ID NO : 9、SEQ ID NO : 11、SEQ ID NO : 13、SEQ ID NO : 21、SEQ ID NO : 24、SEQ ID NO : 27、SEQ ID NO : 30、SEQ ID NO : 33、およびSEQ ID NO : 36とハイブリダイズするポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドも提供される。また、SEQ ID NO : 3、SEQ ID NO : 5、SEQ ID NO : 7、SEQ ID NO : 9、SEQ ID NO : 11、SEQ ID NO : 13、SEQ ID NO : 21、SEQ ID NO : 24、SEQ ID NO : 27、SEQ ID NO : 30、SEQ ID NO : 33、およびSEQ ID NO : 36の相補鎖とハイブリダイズするポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドも提供される。ある態様において、ハイブリダイゼーションは高ストリンジェンシーの条件下である。

【0199】

本発明の結合物質は、1つまたは複数のポリヌクレオチドによってコードされうる。例えば、いくつかの態様において、重鎖ポリペプチドは1つのポリヌクレオチドによってコードされ、軽鎖ポリペプチドは第2のポリヌクレオチドによってコードされる。いくつかの態様において、重鎖ポリペプチドおよび軽鎖ポリペプチドは1つのポリヌクレオチドによってコードされる。

【0200】

ある態様において、ポリヌクレオチドは、例えば、宿主細胞からのポリペプチドの発現および分泌を補助するポリヌクレオチド（例えば、細胞からのポリペプチドの輸送を制御するための分泌配列として機能するリーダー配列）と同じリーディングフレームで融合した、成熟ポリペプチドのコード配列を含む。リーダー配列を有するポリペプチドはプレタンパク質であり、宿主細胞によって切断されて成熟型ポリペプチドを生じるリーダー配列を有しうる。ポリヌクレオチドはまた、成熟タンパク質にさらなる5'アミノ酸残基が付加されたプロタンパク質をコードすることもできる。プロ配列を有する成熟タンパク質はプロタンパク質であり、不活性型のタンパク質である。プロ配列がひとたび切断されると、活性のある成熟タンパク質が残る。

【0201】

10

20

30

40

50

ある態様において、ポリヌクレオチドは、例えば、コードされるポリペプチドの精製および/または同定を可能にするマーカー配列と同じリーディングフレームで融合した、成熟ポリペプチドのコード配列を含む。例えば、細菌宿主の場合、マーカー配列は、マーカーと融合した成熟ポリペプチドを精製するための、pQE-9ベクターによって供給されるヘキサヒスチジンタグであってもよく、または哺乳動物宿主（例えば、COS-7細胞）が用いられる場合、マーカー配列はインフルエンザ血球凝集素タンパク質に由来する血球凝集素（HA）タグであってもよい。いくつかの態様において、マーカー配列はFLAGタグ、すなわち配列

DYKDDDDK (SEQ ID NO:39)

のペプチドであり、これを他のアフィニティータグとともに用いてもよい。

10

【0202】

本発明はさらに、例えば、断片、類似体および/または誘導体をコードする、上記のポリヌクレオチドの変異体にも関する。

【0203】

ある態様において、本発明は、本明細書に記載の抗体またはその断片を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに対して少なくとも80%同一な、少なくとも85%同一な、少なくとも90%同一な、少なくとも95%同一な、さらにいくつかの態様においては、少なくとも96%、97%、98%または99%同一なヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドを含む、単離されたポリヌクレオチドを提供する。

【0204】

本明細書で用いる場合、参照ヌクレオチド配列と少なくとも、例えば、95%「同一な」ヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドという語句は、参照ヌクレオチド配列の各100ヌクレオチド毎に最大5個までの点突然変異をポリヌクレオチド配列が含むことを除き、ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列が参照配列と同一であることを意味するものとする。換言すれば、参照ヌクレオチド配列と少なくとも95%同一なヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドを得るには、参照配列のヌクレオチドの最大5%までが欠失するか、もしくは別のヌクレオチドで置換されてもよく、または参照配列における全ヌクレオチドの最大5%までのいくつかのヌクレオチドが参照配列中に挿入されてもよい。参照配列のこれらの突然変異は、参照ヌクレオチド配列の5'もしくは3'末端の位置または末端位置間の任意の場所に存在してもよく、参照配列の中のヌクレオチドの間に個々に、または参照配列内の1つもしくは複数の連続した群として分散してもよい。

20

30

【0205】

ポリヌクレオチド変異体は、コード領域、非コード領域、またはその両方に変化を含有しうる。いくつかの態様において、ポリヌクレオチド変異体は、サイレントな置換、付加、または欠失を生じるものの、コードされるポリペプチドの性質または活性を変えない変化を含有する。いくつかの態様において、ポリヌクレオチド変異体は、遺伝暗号の縮重による「サイレントな」置換を含有する。ポリヌクレオチド変異体は、さまざまな理由で、例えば、特定の宿主に向けてコドン発現を最適化するように作製することができる（例えば、ヒトmRNAのコドンを、大腸菌などの細菌宿主に好まれるコドンに変える）。

【0206】

ある態様において、ポリヌクレオチドは単離される。ある態様において、ポリヌクレオチドは実質的に純粋である。

40

【0207】

本明細書に記載のポリヌクレオチドを含むベクターおよび細胞も提供される。いくつかの態様において、発現ベクターはポリヌクレオチドを含む。いくつかの態様において、宿主細胞は、ポリヌクレオチドを含む発現ベクターを含む。いくつかの態様において、宿主細胞はポリヌクレオチドを含む。

【0208】

V. キット

本発明は、本明細書に記載の抗体または他の作用物質を含み、かつ本明細書に記載の方

50

法を行うために用いるキットを提供する。いくつかの態様において、キットは、1つまたは複数の容器内に抗Notch1抗体を含む。いくつかの態様において、キットは、すべての対照、アッセイを行うための指示書、ならびに分析および結果の提示のための任意の必要なソフトウェアを含む、検出アッセイ、例えばNotch1突然変異の検出を行うのに必要および/または十分な成分のすべてを含む。いくつかの態様において、キットは、すべての対照、アッセイを行うための指示書、ならびに分析および結果の提示のための任意の必要なソフトウェアを含む、検出アッセイ、例えば組織試料におけるNotch1 ICDの検出を行うのに必要および/または十分な成分のすべてを含む。当業者は、本発明の開示された抗体または作用物質が、当技術分野において周知の確立されたキット形式の1つに容易に組み込まれうることを容易に認識するであろう。

10

【0209】

抗Notch1抗体のほかに、少なくとも1つのさらなる治療薬も含むキットがさらに提供される。ある態様において、さらなる治療薬は化学療法薬である。ある態様において、さらなる治療薬は血管新生阻害薬である。ある態様において、さらなる治療薬はさらなる抗体である。

【0210】

本開示の態様を、癌の治療のための抗Notch1抗体の使用について説明している以下の非限定的な実施例を参照することによって、さらに明確に定めることができる。本開示の範囲から逸脱することなく、材料および方法の両方に対して多くの変更を加えることは、当業者には明白であろう。

20

【実施例】**【0211】**

実施例1

第1a相試験

再発性または不応性のある種の固形腫瘍を有する対象において、抗Notch1抗体OMP-52M51のオープンラベル第1a相用量漸増試験が進行中である。この試験は、用量漸増相および拡張相を含む。試験エンドポイントには、安全性プロフィール、薬物動態(PK)、免疫原性、薬力学(PD)、および予備的有効性の判定を含めた。

【0212】

登録の前に、対象は試験への適格性を判定するためのスクリーニングを受ける。試験組み入れの時点で、対象は全員、保管腫瘍組織を用いて、または保管腫瘍組織が得られていない場合には新鮮なコア生検組織もしくは穿刺生検組織を用いて、Notch1経路活性化の存在に関する評価を受ける。

30

【0213】

試験の初期段階では、OMP-52M51の最大耐量を決定するための用量漸増を行う。薬物を、0.25、0.5、1.0および2.5mg/kgの用量レベルで4週間毎に1回(Q4W)、ならびに2.5、5および10mg/kgの用量レベルで3週間毎に1回(Q3W)、静脈内投与する。薬物に関連する毒性が認められた場合には、薬物を、2.0、1.5および1.0mg/kgの用量レベルで3週間毎に1回、静脈内投与する。個々の用量コホート内では用量漸増も用量減少も行わないこととする。

40

【0214】

0.25mg/kgの初期用量レベルで開始し、各コホートにおいて最低でも投薬コホート当たり1人の対象が組み入れられるように加速漸増(accelerated titration)アプローチを採用した上で、試験薬物に関連するグレード2の毒性も用量規定毒性(DLT)も観察されなければ、次の(より高い)用量レベルへの用量漸増を許可する。追加の対象は、彼らが同定されて第1の対象から2週間以内に最初の用量を投与されているという条件付きで、コホートに組み入れる。その後の各用量レベルに第1の対象を組み入れる前には、以前のコホート内のすべての対象を、最低でも28日間(Q3W投薬スケジュールを用いる場合には21日間)観察しなければならない。

【0215】

50

2人の対象が試験薬物に関連するグレード2もしくはそれを上回る毒性をきたすか、またはDLTをきたした対象が1例でもいた場合には、加速漸増を中止して、最低でも3人の対象をその現行の投薬コホートおよびその後の任意のコホートに組み入れる。DLTが観察された場合には、6人の対象全員を組み入れる前に第2のDLTが起こった場合を除き、少なくとも6人の対象をその投薬コホートに組み入れる。それまでに試験していない用量による投薬を、同じ日に2人の対象で開始しないようにする。しかし、24時間が経過した後であれば、さらなる対象を組み入れてよい。2人の対象がDLTをきたした場合には、そのレベルではさらなる対象への投薬を行わないこととし、3人のさらなる対象を、その以前の用量コホート（その用量レベルの処置を6人の対象がまだ受けていない場合）または中間的な用量レベルのいずれかに加える。対象をDLTに関して、Q4W投薬の場合は第0～28日について、Q3W投薬の場合は第0～21日について評価する。

【0216】

2014年2月12日の時点でのこの試験の概要を表2Aに示す。2015年2月24日の時点でのこの試験の概要を表2Bに示す。

【0217】

【表2A】

	用量 mg/kg				
	Q4W				Q3W
	0.25	0.5	1	2.5	2.5
処置を受けた対象の数	1	3	3	6	7
DLTに関して評価可能な対象の数	1	3	2	6	5
処置継続中の対象の数	0	0	0	0	4
DLTの数	0	0	0	1	1
下痢	1	2	2	4	5

【0218】

【表2B】

	用量 mg/kg							
	Q4W				Q3W			
	0.25	0.5	1	2.5	2.5	2.0	1.0	1.5
処置を受けた対象の数	1	3	3	6	7	4	3	6
DLTに関して評価可能な対象の数	1	3	2	6	6	4	3	6
処置継続中の対象の数	0	0	0	0	0	0	0	3
DLTの数	0	0	0	1	1	1	0	0
下痢	1	2	2	5	6	4	2	2

【0219】

この試験の用量漸増相では、患者7人が高Notch1 ICD腫瘍を有し、19人が低Notch1 ICD

10

20

30

40

50

腫瘍を有しており、患者7人については腫瘍材料がないためにNotch1 ICD腫瘍状態を判定できなかった。

【0220】

さらに、試験の用量拡張コホート相を開始して患者を組み入れている。このコホートには高Notch1 ICD腫瘍を有する患者のみを組み入れる。

【0221】

実施例2

腺様嚢胞癌を有する対象

2.5mg/kg Q3Wコホートに組み入れられた対象の1人は、肝臓、肺および骨に転移を有する、再発性腺様嚢胞癌の28歳男性である。この対象の腫瘍は、Notch1遺伝子のエクソン34に、翻訳の早期終結を伴うフレームシフト突然変異を引き起こすことが予想されているNotch1突然変異を有する。この突然変異の標準化された名称は、NM_017617.3(NOTCH1):c.7398_7401del p.S2467fs*である。この突然変異はNotch1のPESTドメイン内にあり、活性化突然変異であると考えられている。2013年3月から2013年12月までの間に、対象は事前に4種の治療を受けていた。これらの治療はシスプラチン/アドリアマイシン/サイトキサン、カルボプラチン/ピノレルピン、ISIS 481464およびセツキシマブであり、この対象ではこれらの治療のそれぞれの後に疾患の進行が認められた。

10

【0222】

多くの型の癌で乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)レベルが上昇しており、LDHレベルを測定することは、それらが高値である場合に治療のモニタリングに役立つ。この対象のLDHレベルは高値であったことから、このマーカーを用いてOMP-52M51による治療をモニターした。第0日には、対象のLDHレベルは1125IU/Lであった。OMP-52M51の初回投薬後の第7日には対象のLDHレベルは500IU/Lに低下し、第14日にはLDHレベルは254IU/Lにさらに低下した。第21日には対象のLDHレベルはほぼ475IU/Lに上昇したが、OMP-52M51の2回目の投薬後にはLDHレベルは再び低下して第28日にはほぼ280IU/Lとなり、第35日にはさらに少し低下した(図1参照)。

20

【0223】

この対象には、骨転移によるかなりの量の疼痛があった。OMP-52M51による治療の前には、対象は60mg/日のオキシコンチンを服用していた。OMP-52M51の初回投薬後、第2日から第20日までに対象には骨痛の顕著な減少が認められ、オキシコンチンの服用量を0~8mg/日に減らすことができた。第21日に、対象は疼痛の増加をきたしたが、OMP-52M51の2回目の投薬後には、対象は再び第23日および第28日の時点で疼痛の軽減を報告した。

30

【0224】

OMP-52M51の2回の投薬後に対象の胸部、腹部および骨盤部のCTスキャンを入手し、およそ5週間前に行ったCTスキャンと比較した。肺内の小結節は安定した状態を保ち、新たな転移性病変はないように思われた。肝臓のCTスキャンでは、いくつかの転移性肝臓腫瘍のサイズの著しい縮小が示された(図2)。加えて、肝臓転移および硬化性骨転移の数の減少も報告された。

【0225】

したがって、抗Notch1抗体OMP-52M51による治療は、活性化Notch1突然変異を含む腺様嚢胞癌に対して有効な影響を及ぼすように思われる。これらの初期結果は、対象の腫瘍が、化学療法、アンチセンス療法、および細胞キナーゼを標的とするモノクローナル抗体を含むいくつかの種類の治療に不応性であったという事実を考えると、驚くべきかつ予想外のものであった。

40

【0226】

実施例3

Notch1シグナル伝達アッセイ

実施例2に上述したように、Notch1突然変異、c.7398_7401del p.S2467fsが、ACC患者の腫瘍において同定された。Notch1シグナル伝達に対するこの突然変異の影響を明らかにするために、所望の4bp欠失を有するDNA断片(c.7398_7401del)を合成することによって、

50

完全長突然変異体Notch1.S2467fsタンパク質を発現するプラスミドを構築した。対照には、エンブレクター、Notch1野生型 (Notch1.WT)、EGF9ドメイン内に突然変異を有するNotch1 (Notch1.F357delF)、および乳癌患者由来の異種移植腫瘍 (OMP-B40) において以前同定された活性化突然変異を有するNotch1 (Notch1.G2427fs) を含めた。

【0227】

ヒトPC3細胞に対して、被験プラスミド、およびNotchシグナル伝達に反応するホタルルシフェラーゼレポーターベクター (8×CBF-ルシフェラーゼレポーター) をトランスフェクトした。細胞には、トランスフェクション効率に関する内部対照として、ウミシイタケ (Renilla) ルシフェラーゼレポーター (Promega, Madison WI) もトランスフェクトした。トランスフェクトされたPC3細胞を37°Cで一晩インキュベートした。ルシフェラーゼ活性はDual-Gloルシフェラーゼアッセイシステム (Promega, Madison WI) を用いて決定し、ホタルルシフェラーゼ活性をウミシイタケルシフェラーゼ活性に対して正規化した。

10

【0228】

Notch1タンパク質のそれぞれのルシフェラーゼ活性は、1.0に設定した野生型Notch1 (NOTCH1-WT) の活性に対する相対値とする。図3に示されているように、Notch1.S2467fsは、リガンドの非存在下では野生型Notch1 (NOTCH1.WT) の3.3倍の高さの活性を示した。このデータは、Notch1のPESTドメイン内でのこのフレームシフト突然変異 (Notch1.S2467fs) が構成的に活性であることを指し示している。構成的活性化の度合いは、乳癌患者由来の異種移植腫瘍 (OMP-B40) において以前同定されたフレームシフト突然変異 (Notch1.G2427fs) で観察されたものと同程度であった。

20

【0229】

実施例4

IHCによって評価したNotch1 ICD発現

Notch1 ICD免疫組織化学 (IHC) アッセイを開発し、ウサギモノクローナル抗体D3B8 (番号4147、Cell signaling Technology, Danvers, MA) を用いて最適化した。この抗体は、Notch1細胞内ドメイン (ICD) を、Gly1753とVal1754との間の切断によってこのポリペプチドが放出された場合にのみ検出する。この抗体は、完全長Notch1も、他の位置で切断されたNotch1断片も認識しない。4 μm厚のFFPE切片を切り出して、コーティングしたスライドガラス上にマウントする。組織をVentana BenchMark ULTRA装置にてVentana試薬 (Ventana Medical Systems, Inc. Tucson AZ) を用いて染色した。切片をextended Cell Conditioning 1で処理した後に、抗体を9 μg/ml含むユーザー指定の調製キットから投入した抗体とのインキュベーションを37°Cで30分間行った。抗体は、ジアミノベンジジン (DAB) を用いるultraViewおよび増幅キットならびにヘマトキシリンによる対比染色を用いて検出した。

30

【0230】

スライドはAperio装置 (Leica Biosystems) を用いて分析した。各腫瘍の核の染色強度 (0: 発現なし、1: 弱い発現、2: 中程度の発現、3: 強い発現) を測定し、各染色レベルの核を計数して、各タイプのパーセンテージを算出した。これらのデータを総合して各組織切片に関する加重H-スコアとした: $H\text{-スコア} = [3 \times (3+\text{核の}\%)] + [2 \times (2+\text{核の}\%)] + [1 \times (1+\text{核の}\%)]$ 。陽性対照および陰性対照には、Folio Biosciences (Columbus OH) から購入したヒト組織切片、ならびにNotch1 ICDの発現レベルが判明しているOncome腫瘍バンク由来の患者由来異種移植 (PDX) 試料を含めた。

40

【0231】

このIHCアッセイを用いて、実施例2で説明した患者由来の腫瘍試料を検討した。図4に示されているように、この患者の腫瘍ではNotch1 ICDが高レベルであり、このことはこの患者の腫瘍が活性化Notch1突然変異を有していたという観察所見に一致する。加えて、OMP-52M51による治療を受け、最長10カ月にわたって疾患が安定していたもう1人の患者も、高レベルのNotch1 ICDを発現する腫瘍を有することが示された。対照的に、OMP-52M51による治療中に疾患が進行した1人の患者は、Notch1 ICDのレベルが低いまたは検出不能である腫瘍を有することが示された。これらの結果は、抗Notch1治療用抗体OMP-52M51に

50

よる治療に反応する可能性が高い腫瘍および患者を同定するための、Notch1 ICD IHCに基づく予測アッセイに対して、極めて強固な基盤を与えるものである。

【0232】

本明細書に記載された実施例および態様が例示のみを目的とすること、ならびに、それらに鑑みてさまざまな修正または変更が当業者には想起されるであろうが、それらは本出願の趣旨および範囲内に含まれることは理解されるであろう。

【0233】

本明細書に引用された刊行物、特許、および特許出願はすべて、それぞれの個々の刊行物、特許、または特許出願が参照により本明細書に組み入れられるように具体的かつ個別的に示されるのと同じ程度に、目的を問わず、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。

10

【0234】

以下は、本出願において開示される配列である：

アミノ酸1427～1732をコードするヒトNotch1ポリヌクレオチド (SEQ ID NO : 1)

CACATCCTGGACTACAGCTTCGGGGGTGGGGCCGGGCGGACATCCCCCGCCGCTGATC
GAGGAGGCGTGCAGCTGCCGAGTGCCAGGAGGACGCGGGCAACAAGGTCTGCAGCCTG
CAGTGCAACAACCACGCGTGCAGCTGGGACGGCGGTGACTGCTCCCTCAACTTCAATGAC
CCCTGGAAGAACTGCACGCAGTCTCTGCAGTGCTGGAAGTACTTCAGTGACGGCCACTGT
GACAGCCAGTGCAACTCAGCCGGCTGCCTCTTCGACGGCTTTGACTGCCAGCGTGCGGAA
GGCCAGTGCAACCCCTGTACGACCAGTACTGCAAGGACCACTTCAGCGACGGGCACTGC
GACCAGGGCTGCAACAGCGCGGAGTGCGAGTGGGACGGGCTGGACTGTGCGGAGCATGTA
CCCGAGAGGCTGGCGGCCGGCACGCTGGTGGTGGTGGTGTGATGCCGCCGGAGCAGCTG
CGCAACAGCTCCTTCCACTTCTGCGGGAGCTCAGCCGCGTGCTGCACACCAACGTGGTC
TTCAAGCGTGACGCACACGGCCAGCAGATGATCTTCCCCTACTACGGCCGCGAGGAGGAG
CTGCGCAAGCACCCCATCAAGCGTGCCGCCGAGGGCTGGGCCGCACCTGACGCCCTGCTG
GGCCAGGTGAAGGCCTCGCTGCTCCCTGGTGGCAGCGAGGGTGGCGGCGGCGGAGGGAG
CTGGACCCATGGACGTCCGCGGCTCCATCGTCTACCTGGAGATTGACAACCGGCAGTGT
GTGCAGGCCTCCTCGCAGTGCTTCCAGAGTGCCACCGACGTGGCCGCATTCCTGGGAGCG
CTCGCCTCGCTGGGCAGCCTCAACATCCCCTACAAGATCGAGGCCGTGCAGAGTGAGACC
GTGGAGCCGCCCCCGCCG

20

ヒトNotch1アミノ酸1427～1732 (SEQ ID NO : 2)

HILDYSFGGGAGRDI PPPLIEEACELPECQEDAGNKVCSLQCNNHACGWDGGDCSLNFND
PWKNCTQSLQCWKYFSDGHCDSDQNSAGCLFDGFDQRAEGQCNPLYDQYCKDHFSDGHC
DQGCNSAECEWDGLDCAEHVPERLAAGTLVVVVLMPPEQLRNSSFHFLRELSRVLHTNVV
FKRDAHGQQMIFPYYGREEELRKHPIKRAAEGWAAPDALLGQVKASLLPGGSEGRRRRE
LDPMDVRGSIVYLEIDNRQCVQASSQCFQSATDVA AFLGALASLGLSLNIPYKIEAVQSET
VEPPPP

30

マウス抗体52M51の配列

52M51重鎖ポリヌクレオチド配列 (SEQ ID NO : 3)

ATGGAATGGACCTGGGTCTTTCTCTTCCTCCTGTGTCAGTAACTGCAGGTGTCCACTCCCAG
 GTTCAGCTGCAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGATGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGATATCC
 TGCAAGGCTGCTGGCTACACAATGAGAGGCTACTGGATAGAGTGGATAAAGCAGAGGCCT
 GGACATGGCCTTGAGTGGATTGGACAGATTTTACCTGGAAGTGGGAGAACTAACTACAAT
 GAGAAGTTC AAGGGCAAGGCCACATTC ACTGCAGATACATCCTCCAACACAGCCAACATG
 CAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCCGTCTATTACTGTGCAAGATTTGATGGT
 AACTACGGTTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGATCCTCAGTCACCGTCTCCTCA
 GCCAAAACGACACCCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCCTGGATCTGCTGCCCAAATAAC
 TCCATGGTGAACCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACC
 TGGAACTCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTGCAGTCTGAC
 CTCTACACTCTGAGCAGCTCAGTGACTGTCCCTCCAGCCCTCGGCCAGCGAGACCGTC
 ACCTGCAACGTTGCCACCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGTGCCCAGG
 GATTGTGGTTGTAAGCCTTG CATATGTACAGTCCCAGAAGTATCATCTGTCTTCATCTTC
 CCCCCAAGCCCAAGGATGTCTCACCATTACTCTGACTCCTAAGGTACCGTGTGTTGTG
 GTAGACATCAGCAAGGATGATCCCAGGTC CAGTTCAGCTGGTTGTAGATGATGTGGAG
 GTGCACACAGCTCAGACGCAACCCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACTTTCCGCTCAGTC
 AGTGAACTTCCCATCATGCACCAGGACTGGCTCAATGGCAAGGAGTTCAAATGCAGGGTC
 AACAGTGCAGCTTTCCCTGCCCCCATCGAGAAAACCATATCCAAAACCAAAGGCAGACCG
 AAGGCTCCACAGGTGTACACCATTCCACCTCCCAAGGAGCAGATGGCCAAGGATAAAGTC
 AGTCTGACCTGCATGATAACAGACTTCTTCCCTGAAGACATAACAGTGGAGTGGCAGTGG
 AATGGGCAGCCAGCGGAGAACTACAAGAACA CTGAGCCATCATGAACACGAATGGCTCT
 TACTTCGTCTACAGCAAGCTCAATGTGCAGAAGAGCAACTGGGAGGCAGGAAATACTTTC
 ACCTGCTCTGTGTTACATGAGGGCCTGCACAACCACCATACTGAGAAGAGCCTCTCCCAC
 TCTCCTGGTAAATGA

10

20

52M51重鎖アミノ酸配列 予想されるシグナル配列に下線を付している (SEQ ID NO : 4)

MEWTWVFLFLLSVTAGVHSQVQLQQSGAELMKPGASVKISCKAAGYTMRGYWIEWIKQRP
GHGLEWIGQILPGTGRNTYNEKFKGKATFTADTSSNTANMQLSSLTSEDSAVYYCARFDG
 NYGYAMDYWGQSSSVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVT
 WNSGSLSSGVHTFPVAVLQSDLYTLSSSVTVSPSPRPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPR
 DCGCKPCICTVPEVSSVFI FPPKPKDVLTI TLPKVT CVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVE
 VHTAQTPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAIEKTI SKTKGRP
 KAPQVYTI PPPKEQMAKDKVSLTCMI TDFFPEDI TVEWQWNGQPAENYKNTQPIMNTNGS
 YFVYSKLVNPKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNNHTEKLSLHSPGK

30

52M51重鎖可変領域ポリヌクレオチド配列 (SEQ ID NO : 5)

ATGGAATGGACCTGGGTCTTTCTCTTCCTCCTGTGTCAGTAACTGCAGGTGTCCACTCCCAG
 GTTCAGCTGCAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGATGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGATATCC
 TGCAAGGCTGCTGGCTACACAATGAGAGGCTACTGGATAGAGTGGATAAAGCAGAGGCCT
 GGACATGGCCTTGAGTGGATTGGACAGATTTTACCTGGAAGTGGGAGAACTAACTACAAT
 GAGAAGTTC AAGGGCAAGGCCACATTC ACTGCAGATACATCCTCCAACACAGCCAACATG
 CAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCCGTCTATTACTGTGCAAGATTTGATGGT
 AACTACGGTTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGATCCTCAGTCACCGTCTCCTCA

52M51重鎖可変領域アミノ酸配列 予想されるシグナル配列に下線を付している (SEQ ID NO : 6)

MEWTWVFLFLLSVTAGVHSQVQLQQSGAELMKPGASVKISCKAAGYTMRGYWIEWIKQRP
GHGLEWIGQILPGTGRNTYNEKFKGKATFTADTSSNTANMQLSSLTSEDSAVYYCARFDG
 NYGYAMDYWGQSSSVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVT

40

予想されるシグナル配列を伴わない52M51重鎖可変領域ポリヌクレオチド配列 (SEQ ID NO : 7)

CAGGTT CAGCTGCAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGATGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGATA
 TCCTGCAAGGCTGCTGGCTACACAATGAGAGGCTACTGGATAGAGTGGATAAAGCAGAGG
 CCTGGACATGGCCTTGAGTGGATTGGACAGATTTTACCTGGAAGTGGGAGAACTAACTAC
 AATGAGAAGTTC AAGGGCAAGGCCACATTC ACTGCAGATACATCCTCCAACACAGCCAAC
 ATGCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCCGTCTATTACTGTGCAAGATTTGAT
 GGTAAC TACGGTTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGATCCTCAGTCACCGTCTCC
 TCA

50

予想されるシグナル配列を伴わない52M51重鎖可変領域アミノ酸配列 (SEQ ID NO : 8)
 QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKAAGYTMRGYWI EWIKQRPGHGLEWIGQILPGTGRITNY
 NEKFKGKATFTADTSSNTANMQLSSLTSEDSAVVYCARFDGNYGYAMDYWGQSSVTVS
 SA

52M51軽鎖ポリヌクレオチド配列 (SEQ ID NO : 9)

ATGGCCTGGATTTCACTTATACTCTCTCTCTCTGGCTCTCAGCTCAGGGGCCATTTCCCAG
 GCTGTTGTGACTCAGGAATCTGCACTCACCACATCACCTGGTGAACAGTCACACTCACT
 TGTCGCTCAAGTACTGGGGCTGTTACAACTAGTAACTACGCCAACTGGGTCCAAGAAAAA
 CCTGATCATTATTTCACTGGTCTAATAGGTGGTACCAACAACCGAGCTCCAGGTGTTCCCT
 GCCAGATTCTCAGGCTCCCTGATTGGAGACAAGGCTGCCCTCACCATCACAGGGGCACAG
 ACTGAGGATGAGGCAATATATTTCTGTGCTCTATGGTACAGCAACCACTGGGTGTTCCGGT
 GGAGGAACCAAACCTGACTGTCTAGGCCAGCCCAAGTCTTCGCCATCAGTCACCCTGTTT
 CCACCTTCTCTGAAGAGCTCGAGACTAACAAGGCCACACTGGTGTGTACGATCACTGAT
 TTCTACCCAGGTGTGGTGACAGTGGACTGGAAGGTAGATGGTACCCCTGTCACTCAGGGT
 ATGGAGACAACCCAGCCTTCCAAACAGAGCAACAACAAGTACATGGCTAGCAGCTACCTG
 ACCCTGACAGCAAGAGCATGGGAAAGGCATAGCAGTTACAGCTGCCAGGTCATCATGAA
 GGTCACTGTGGAGAAGAGTTTGTCCCGTGCTGACTGTTCCCTAG

10

52M51軽鎖アミノ酸配列 予想されるシグナル配列に下線を付している (SEQ ID NO : 10)

MAWISLILSLLALSSGAISQAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEK
PDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNHWFVFG
 GGTKLTVLGQPKSSPSVTLFPPSSELETNKATLVCTITDFYPGVVTVDWKVDGTPVTQG
 METTQPSKQSNKYMSSYLTLTARAWERHSSYSQVTHEGHTVEKLSLRADCS

20

52M51軽鎖可変領域ポリヌクレオチド配列 (SEQ ID NO : 11)

ATGGCCTGGATTTCACTTATACTCTCTCTCTCTGGCTCTCAGCTCAGGGGCCATTTCCCAG
 GCTGTTGTGACTCAGGAATCTGCACTCACCACATCACCTGGTGAACAGTCACACTCACT
 TGTCGCTCAAGTACTGGGGCTGTTACAACTAGTAACTACGCCAACTGGGTCCAAGAAAAA
 CCTGATCATTATTTCACTGGTCTAATAGGTGGTACCAACAACCGAGCTCCAGGTGTTCCCT
 GCCAGATTCTCAGGCTCCCTGATTGGAGACAAGGCTGCCCTCACCATCACAGGGGCACAG
 ACTGAGGATGAGGCAATATATTTCTGTGCTCTATGGTACAGCAACCACTGGGTGTTCCGGT
 GGAGGAACCAAACCTGACTGTCTAGGC

52M51軽鎖可変領域アミノ酸配列 予想されるシグナル配列に下線を付している (SEQ ID NO : 12)

MAWISLILSLLALSSGAISQAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEK
PDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNHWFVFG
 GGTKLTVLGQPKSSPSVTLFPPSSELETNKATLVCTITDFYPGVVTVDWKVDGTPVTQG

30

予想されるシグナル配列を伴わない52M51軽鎖可変領域ポリヌクレオチド配列 (SEQ ID NO : 13)

CAGGCTGTTGTGACTCAGGAATCTGCACTCACCACATCACCTGGTGAACAGTCACACTC
 ACTTGTGCTCAAGTACTGGGGCTGTTACAACTAGTAACTACGCCAACTGGGTCCAAGAA
 AACCTGATCATTATTTCACTGGTCTAATAGGTGGTACCAACAACCGAGCTCCAGGTGTT
 CCTGCCAGATTCTCAGGCTCCCTGATTGGAGACAAGGCTGCCCTCACCATCACAGGGGCA
 CAGACTGAGGATGAGGCAATATATTTCTGTGCTCTATGGTACAGCAACCACTGGGTGTTCC
 GGTGGAGGAACCAAACCTGACTGTCTAGGC

40

予想されるシグナル配列を伴わない52M51軽鎖可変領域アミノ酸配列 (SEQ ID NO : 14)

QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNNRAPGV
 PARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNHWFVGGGTKLTVLG

52M51重鎖CDR1 (SEQ ID NO : 15)

RGYWIE

52M51重鎖CDR2 (SEQ ID NO : 16)

QILPGTGRITNYNEKFKG

52M51重鎖CDR3 (SEQ ID NO : 17)

50

FDGNYGYAMDY

52M51 軽鎖CDR1 (SEQ ID NO : 18)

RSSTGAVTTSNYAN

52M51 軽鎖CDR2 (SEQ ID NO : 19)

GTNNRAP

52M51 軽鎖CDR3 (SEQ ID NO : 20)

ALWYSNHWVFGGGTKL

ヒト化52M51の配列

52M51-H4重鎖ポリヌクレオチド配列 (SEQ ID NO : 21)

ATGGATTGGACATGGAGGGTGTTCCTGCCTCCTCGCTGTGGCTCCTGGAGTCCTGAGCCAG
 GTCCAGCTCGTCCAGAGCGGGGCTGAAGTCAAGAAGCCTGGCGCTAGCGTCAAATCAGC
 TGTAAGGTCAGCGGATACACACTGAGGGGATACTGGATCGAGTGGGTGAGGCAGGCTCCA
 GGAAAGGGCCTGGAATGGATCGGCCAGATCCTGCCTGGAACCGGAAGGACAAATTACAAT
 GAGAAGTTTAAGGGAAGGGTCACAATGACAGCAGACACAAGCACAGACACAGCTTATATG
 GAACTCAGCTCCCTCAGATCCGAGGACACCGCTGTCTACTATTGTGCCAGGTTTCGATGGA
 AATTACGGATACTATGCCATGGATTAAGGGGACAGGGGACAACGGTCAACCGTGAGCTCA
 GCCAGCACAAAGGGCCCTAGCGTCTTCCCTCTGGCTCCCTGCAGCAGGAGCACCAGCGAG
 AGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCG
 TGGAACTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTACAGTCTCTCA
 GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCAGCCAGACC
 TACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGC
 AAATGTTGTGTCGAGTGCCACCGTGCCAGCACCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTC
 CTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTCACGTGC
 GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC
 GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGT
 GTGGTCAGCGTCTCACCGTTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGC
 AAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGG
 CAGCCCCGAGAACACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAAC
 CAGGTACAGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG
 GAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGAC
 GGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC
 GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTC
 TCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

10

20

30

52M51-H4重鎖アミノ酸配列 予想されるシグナル配列には下線を付している (SEQ ID NO : 22)

MDWTWRVFCLLAVAPGVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKVSGYTLRGYWIEWVRQAP
GKGLEWIGQILPGTGRITNYNEKFKGRVTMTADTSTDYAYMELSSLRSEDYAVYYCARFDG
 NYGYAMDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS
 WNSGALTSKVHTFPFAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVR
 KCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDG
 VEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSIVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI SKTKG
 QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSD
 GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVHEALHNHYTQKSLSLSPGK

予想されるシグナル配列を伴わない52M51-H4重鎖アミノ酸配列 (SEQ ID NO : 23)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKVSGYTLRGYWIEWVRQAPGKGLEWIGQILPGTGRITNY
 NEKFKGRVTMTADTSTDYAYMELSSLRSEDYAVYYCARFDGNYGYAMDYWGQGTITVTVS
 SASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPFAVLQS
 SGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVRERKCCVECPPCPAPPVAGPSV
 FLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF
 RVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK
 NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
 NVFSCSVMSVHEALHNHYTQKSLSLSPGK

40

52M51-H4重鎖可変領域ポリヌクレオチド配列 (SEQ ID NO : 24)

ATGGATTGGACATGGAGGGTGTTCCTGCCTCCTCGCTGTGGCTCCTGGAGTCCTGAGCCAG
 GTCCAGCTCGTCCAGAGCGGGCTGAAGTCAAGAAGCCTGGCGCTAGCGTCAAATCAGC
 TGTAAGGTCAGCGGATACACACTGAGGGGATACTGGATCGAGTGGGTGAGGCAGGCTCCA
 GGAAAGGGCCTGGAATGGATCGGCCAGATCCTGCCTGGAACCGGAAGGACAAATTACAAT
 GAGAAGTTTAAGGGAAGGGTCAACAATGACAGCAGACACAAGCACAGACACAGCTTATATG
 GAACTCAGCTCCCTCAGATCCGAGGACACCGCTGTCTACTATTGTGCCAGGTTTCGATGGA
 AATTACGATACTATGCCATGGATTACTGGGGACAGGGGACAACGGTCACCGTGAGCTCA
 GCC

52M51-H4重鎖可変領域アミノ酸配列 予想されるシグナル配列には下線を付している (SEQ ID NO : 25)

MDWTWRVFCLLAVAPGVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKVSGYTLRGYIEWVRQAP
 GKGLEWIGQILPGTGRITNYNEKFKGRVTMTADTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCARFDG
 NYGYYAMDYWGQGTITVTVSSA

10

予想されるシグナル配列を伴わない52M51-H4重鎖可変領域アミノ酸配列 (SEQ ID NO : 26)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKVSGYTLRGYIEWVRQAPGKGLEWIGQILPGTGRITNY
 NEKFKGRVTMTADTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCARFDGNYGYYAMDYWGQGTITVTVS
 SA

52M51-L3軽鎖ポリヌクレオチド配列 (SEQ ID NO : 27)

ATGAGCGTCCCTACAATGGCTTGGATGATGCTCCTGCTGGGACTCCTGGCTTATGGAAGC
 GGAGTGGATAGCCAGGCCGTCGTCACACAGGAACCTAGCCTCACCGTTAGCCCTGGAGGA
 ACAGTCACACTGACCTGTAGGAGCTCCACAGGAGCTGTGACAACAAGCAATTACGCTAAC
 TGGTTCACAGCAGAAGCCCGGTCAAGCCCCCTAGAACCCTCATCGGCGGCACCAATAACAGA
 GCTCCCGGAGTCCCGCCAGGTTCTCCGGCTCCCTCCTGGGTGGCAAGGCTGCTCTGACA
 CTCAGCGGTGCCAGCCAGAGGATGAAGCGGAGTACTACTGTGCACTGTGGTACAGCAAC
 CATTGGGTTTTTCGGAGCGGAACAAAGTTAACCGTCCTCGGGCAGCCTAAGGCTGCTCCT
 AGCGTCACACTGTTCCCCCATCTAGCGAGGAGCTGCAGGCTAACAAAGGCAACCCTCGTC
 TGCTGGTTAGCGACTTCTACCCTGGCGCTGTACAGTGGCTGGAAAGCTGACGGCTCC
 CCTGTGAAAGTTGGCGTCAAACCACAAAGCCTTCTAAGCAGAGCAATAATAAATATGCC
 GCAAGCTCCTACCTCTCCCTGACTCCTGAGCAGTGGAAAAGCCATAGGAGCTACTCCTGC
 CGGGTCACACACGAAGGAAGCACAGTGGAAAAGACAGTCGCCCCTGCTGAGTGTAGCTGA

20

52M51-L3軽鎖アミノ酸配列 予想されるシグナル配列には下線を付している (SEQ ID NO : 28)

MSVPTMAWMMLLLGLLAYGSGVDSQAVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYAN
 WFQQKPGQAPRTLIGGTNNRAPGVPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSN
 HWVFGGKTLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLVSDFYFPGAVTVAWKADGS
 PVKVGVEVETTKPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSRSYSCRVTHEGSTVEKTVAPAECS

30

予想されるシグナル配列を伴わない52M51-L3軽鎖アミノ酸配列 (SEQ ID NO : 29)

SGVDSQAVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWFQQKPGQAPRTLIGGTNN
 RAPGVPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNHWVFGGKTLTVLGQPKAA
 PSVTLFPPSSEELQANKATLVCLVSDFYFPGAVTVAWKADGSPVKVGVEVETTKPSKQSNKY
 AASSYLSLTPEQWKSRSYSCRVTHEGSTVEKTVAPAECS

40

52M51-L3軽鎖可変領域ポリヌクレオチド配列 (SEQ ID NO : 30)

ATGAGCGTCCCTACAATGGCTTGGATGATGCTCCTGCTGGGACTCCTGGCTTATGGAAGC
 GGAGTGGATAGCCAGGCCGTCGTCACACAGGAACCTAGCCTCACCGTTAGCCCTGGAGGA
 ACAGTCACACTGACCTGTAGGAGCTCCACAGGAGCTGTGACAACAAGCAATTACGCTAAC
 TGGTTCACAGCAGAAGCCCGGTCAAGCCCCCTAGAACCCTCATCGGCGGCACCAATAACAGA
 GCTCCCGGAGTCCCGCCAGGTTCTCCGGCTCCCTCCTGGGTGGCAAGGCTGCTCTGACA
 CTCAGCGGTGCCAGCCAGAGGATGAAGCGGAGTACTACTGTGCACTGTGGTACAGCAAC
 CATTGGGTTTTTCGGAGCGGAACAAAGTTAACCGTCCTCGGG

52M51-L3軽鎖可変領域アミノ酸配列 予想されるシグナル配列には下線を付している (SEQ ID NO : 31)

MSVPTMAWMMLLLGLLAYGSGVDSQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYAN
WFQQKPGQAPRTLIGGTNNRAPGVPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSN
HWVFGGGTKLTVLG

予想されるシグナル配列を伴わない52M51-L3軽鎖可変領域アミノ酸配列 (SEQ ID NO : 32)

SGVDSQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWFQQKPGQAPRTLIGGTNN
RAPGVPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVLG

52M51-L4軽鎖ポリヌクレオチド配列 (SEQ ID NO : 33)

ATGAGCGTCCCTACAATGGCTTGGATGATGCTCCTGCTGGGACTCCTGGCTTATGGAAGC
GGAGTGGATAGCCAGACCGTCGTCACACAGGAACCTAGCTTTTCCGTTAGCCCTGGAGGA
ACAGTCACACTGACCTGTAGGAGCTCCACAGGAGCTGTGACAACAAGCAATTACGCTAAC
TGGTATCAGCAGACTCCCGGTCAAGCCCCTAGAACCCTCATCGGCGGCACCAATAACAGA
GCTCCCGGAGTCCCCGACAGGTTCTCCGGCTCCATCCTGGGAAATAAAGCTGCTCTGACA
ATCACAGGTGCCAGGCTGACGATGAAAGCGACTACTACTGTGCACTGTGGTACAGCAAC
CATTGGGTTTTTCGGAGGCGGAACAAAGTTAACCGTCCTCGGGCAGCCTAAGGCTGCTCCT
AGCGTCACACTGTTCCCCCATCTAGCGAGGAGCTGCAGGCTAACAAGGCAACCCTCGTC
TGCTTGGTTAGCGACTTCTACCCTGGCGCTGTACAGTGGCTGGAAAGCTGACGGCTCC
CCTGTGAAAGTTGGCGTCGAAACCACAAAGCCTTCTAAGCAGAGCAATAATAAATATGCC
GCAAGCTCCTACCTCTCCCTGACTCCTGAGCAGTGGAAAAGCCATAGGAGCTACTCCTGC
CGGGTCACACACGAAGGAAGCACAGTGGAAAAGACAGTCGCCCTGCTGAGTGTAGCTGA

10

52M51-L4軽鎖アミノ酸配列 予想されるシグナル配列には下線を付している (SEQ ID NO : 34)

MSVPTMAWMMLLLGLLAYGSGVDSQTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYAN
WYQQTTPGQAPRTLIGGTNNRAPGVDRFSGSILGNKAALITGAQADDESYYCALWYSN
HWVFGGGTKLTVLQGPKAAPSVTLPFPSSSEELQANKATLVCLVSDFYPGAVTVAWKADGS
PVKGVVETTKPSKQSNKYAASSYLSLTPQWKSQRSYSCRVTHEGSTVEKTVAPAEC

20

予想されるシグナル配列を伴わない52M51-L4軽鎖アミノ酸配列 (SEQ ID NO : 35)

SGVDSQTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWYQQTTPGQAPRTLIGGTNN
RAPGVDRFSGSILGNKAALITGAQADDESYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVLQGPKAA
PSVTLPFPSSSEELQANKATLVCLVSDFYPGAVTVAWKADGSPVKGVVETTKPSKQSNKY
AASSYLSLTPQWKSQRSYSCRVTHEGSTVEKTVAPAEC

30

52M51-L4軽鎖可変領域ポリヌクレオチド配列 (SEQ ID NO : 36)

ATGAGCGTCCCTACAATGGCTTGGATGATGCTCCTGCTGGGACTCCTGGCTTATGGAAGC
GGAGTGGATAGCCAGACCGTCGTCACACAGGAACCTAGCTTTTCCGTTAGCCCTGGAGGA
ACAGTCACACTGACCTGTAGGAGCTCCACAGGAGCTGTGACAACAAGCAATTACGCTAAC
TGGTATCAGCAGACTCCCGGTCAAGCCCCTAGAACCCTCATCGGCGGCACCAATAACAGA
GCTCCCGGAGTCCCCGACAGGTTCTCCGGCTCCATCCTGGGAAATAAAGCTGCTCTGACA
ATCACAGGTGCCAGGCTGACGATGAAAGCGACTACTACTGTGCACTGTGGTACAGCAAC
CATTGGGTTTTTCGGAGGCGGAACAAAGTTAACCGTCCTCGG

52M51-L4軽鎖可変領域アミノ酸配列 予想されるシグナル配列には下線を付している (SEQ ID NO : 37)

MSVPTMAWMMLLLGLLAYGSGVDSQTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYAN
WYQQTTPGQAPRTLIGGTNNRAPGVDRFSGSILGNKAALITGAQADDESYYCALWYSN
HWVFGGGTKLTVLG

40

予想されるシグナル配列を伴わない52M51-L4軽鎖可変領域アミノ酸配列 (SEQ ID NO : 38)

SGVDSQTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWYQQTTPGQAPRTLIGGTNN
RAPGVDRFSGSILGNKAALITGAQADDESYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVLG

FLAG-タグ (SEQ ID NO : 39)

DYKDDDDK

ヒトp53 (SEQ ID NO : 40)

50

MEEPQSDPSVEPPLSQETFSDLWKLLPENNVLSPLPSQAMDDLMLSPDDIEQWFTEDPGP
 DEAPRMPEAAPPVAPAPAAPTPAAPAPAPSWPLSSSVPSQKTYQGSYGFRLGFLHSGTAK
 SVTCTYSPALNKMFCQLAKTQCPVQLWVDSTPPPGTRVRAMAIYKQSQHMTEVVRRCPHHE
 RCSDSDGLAPPQHLIRVEGNLRVEYLDDRNTFRHSVVVPYEPPEVGSDC'TTIHYNYMCNS
 SCMGGMNRRPILTIITLEDSSGNLLGRNSFEVRCACACPRDRRTEENLRKKKGEPHHELP
 PGSTKRALPNNTSSSPQPKKKPLDGEYFTLQIRGRERFEMFRELNEALELKDAQAGKEPG
 GSRAHSSHLKSKKGQSTSRHKKLMFKTEGPDSD

ヒ ト Notch1 (SEQ ID NO : 41)

MPPLLAPLLCLALLPALAARGPRCSQPGETCLNGGKCEAANGTEACVCGGAFVGPQCQP
 NPCLSTPCKNAGTCHVVDRRGVADYACSCALGFSGPLCLTPLDNACLTNPCRNGGTCDLL
 TLTEYKCRCPPGWSGKSCQQADPCASNPCANGGQCLPFEASYICHCPPSFHGPTCRQDVN
 ECGQKPLCRHGGTCHNEVGSYRCVCRATHGTGPNCEPYPVPCSPSPCQNGGTCRPTGDVT
 HECACLPGFTGQNCENIDDCPGNCKNGGACVDGVNTYNCRCPPPEWTGQYCTEDVDECQ
 LMPNACQNGGTCHNTHGGYNCVVCVNGWTGEDCSENIDDCASAACFHGATCHDRVASFYCE
 CPHGRTGLLCHLNDACISNPCNEGSNCDTNPVNGKAICTCPSGYTGPAQSQDVDECSLGA
 NPCEHAGKCINTLGSFECQLQGYTGPRCEIDVNECVSNPCQNDATCLDQIGEFQCI
 GYEGVHCEVNTDECASSPCLHNGRCLDKINEFQCECPTGFTGHLCQYDVDECASTPCKNG
 AKCLDGPNTYTCVCTEGYTGTHCEVDIDECDDPDPCHYGSCKDGVATFTCLCRPGYTGHH
 ETNINECSSQPCRHHGGTCQDRDNAYLCFLKGTGPNCEINLDDCASSPCDSGTCLDKID
 GYECACEPGYTGSMCNINIDECAGNPCHNGGTCEGINGFTCRCPEGYHDPCLSEVNEC
 NSNPCVHGACRDSLNGYKCDCEPGWSGTNCDINNECESNPCVNGGTCKDMTSGYVCTCR
 EGFSGPNCQTNINECASNPCLNQGTICDDVAGYKCNCLLPYTGATCEVVLAPCAPSPCRN
 GGECRQSEDIYESFSCVCTGWGQGTCEVDINECVLSPCRHGASCQNTGGYRCHCQAGYS
 GRNCETDIDDCRPNPCHNGGSCDGTGINTAFCDCLPGFRGTFCEEDINECASDPCRNGANC
 TDCVDSYTCTCPAGFSGIHCENNTPDCTESSCFNGGTCVDGINSFTCLCPPGFTGYSYQ
 DVNECDSQPCLHGGTCQDGCYSYRCTCPQGYTGPNQNLVHWCDSSPCKNGGKCVQTHQ
 YRCECPSGWTGLYCDVPSVSCVAAQRQGVVARLQCQHGGLCVDAGNTHHCRCQAGYTG
 YCEDLVDECSPPCQNGATCTDYLGYSCKCVAGYHGVNCSEIIDECLSHPCQNGGTCLD
 LPNTYKCS CPRGTQGVHCEINVDCCNPPVDPVSRSPKCFNNGTCVDQVGGYSCTCPPGFV
 GERCEGDVNECLSNPCDARGTQNCVQVRVDFHCECRAGHTGRRCESVINGCKGKPKNGG
 TCAVASNTARGFICKCPAGFEGATCENDARTCGSLRCLNGGTCISGPRSPTCLCLGPF
 PECQFPASSPCLGGNPNYNQGTCEPTSESPFYRCLCPAKFNGLLCHILDYSGGGAGRDI
 PPPLIEEACELPECQEDAGNKVCSLQCNNHACGWDGGDCSLNFNDPWKNCTQSLQCWKYF
 SDGHCDSDQNSAGCLFDGFDQRAEQCNPLYDQYCKDHFSDGHCDQGCNSAECEWDGLD
 CAEHVPERLAAGTLVVVVLMPPEQLRNSSFHFLRELRLVHTNVVFKRDAHGQOMIFPYY
 GREEELRKHPIKRAAEGWAAPDALLGQVKASLLPGGSEGGRRRRELDPMDVRGSI VYLEI
 DNRQCVQASSQCFQSATDVA AFLGALASLGSINI PYKIEAVQSETVEPPPPAQLHFMYVA
 AA AFVLLFFVCGVLLSRKRRRQHGQLWFPEGFVKVSEASKKKRREPLGEDSVGLKPLKNA
 SDGALMDDNQNEWGDEDLETKKFRFEPPVLPDLDDQTDHRQWTQQLDAADLRMSAMAP
 TPPQGEVDADCMDVNVRGPDGFTPLMIASCSSGGLETGNSEEEEDAPAVISDFIYQGASL
 HNQTDRTGETALHLAARYSRSDAAKRLLEASADANIQDNMGRTPHAAVSADAQGVFQIL
 IRNRATDL DARMHDGTTPLI LAARLAVEGMLEDL INSHADVNAVDDLKKSALHWAAVNN
 VDAAVVLLKNGANKDMQNNREETPLFLAAREGSYETAKVLLDHFANRDI TDHMDRLPRDI
 AQERMHHDIVRLLD EYNLVRSPQLHGAPLGGTPTLSPPLCSPNGYLGSLKPGVQGGKVRK
 PSSKGLACGSKEAKDLKARRKKSQDGKGLLDSSGMLS PVDSLES PHGYLSDVASPPLL
 SPFQQSPSVPLNHLPGMPDTHLGI GHLNVAAKPEMAALGGGRLAFETGPPRLSHLPVAS
 GTSTVLGSSSGALNFTVGGSTSLNGQCEWLSRLQSGMVPNQYNPLRGSVAPGPLSTQAP
 SLQHGMVGPLHSSLAASALSQMMSYQGLPSTRLATQPHLVQTQQVQPQNLQMQQNLQPA
 NIQQQSLQPPPPPPPHLGVSSAASGHLGRSFLSGEPSQADVQPLGPPSSLAVHTILPQE
 SPALPTSLPSSLVPPVTAQFLTPPSQHSYSSPVDNTPSHQLQVPEHPFLTPSPESPQW
 SSSSPHSNVSDWSEGVSPPPTSMQSQIARIPEAFK

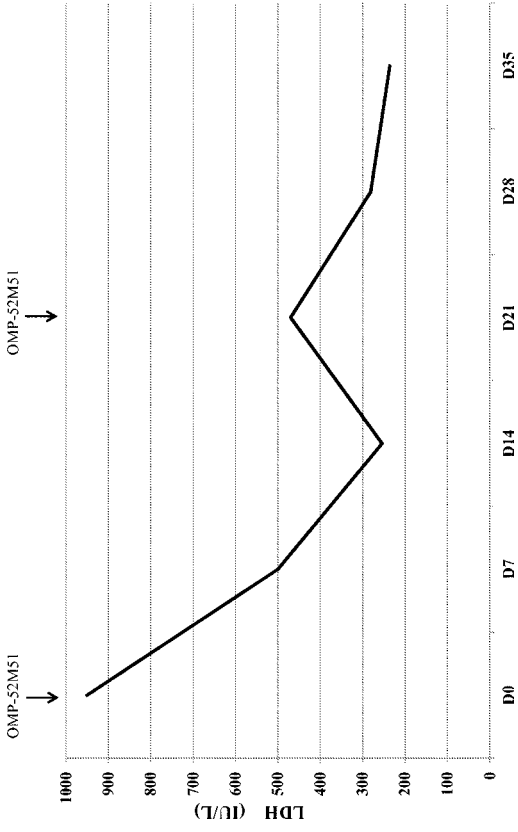
10

20

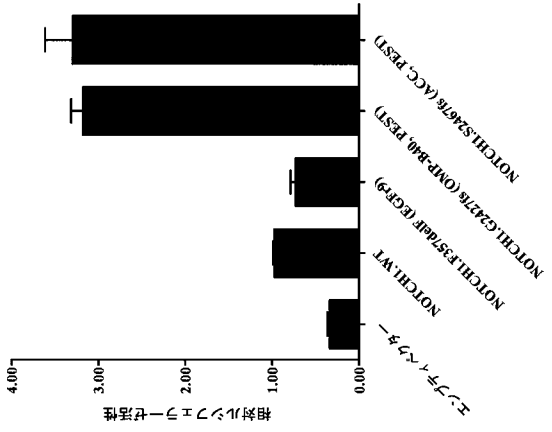
30

40

【 図 1 】

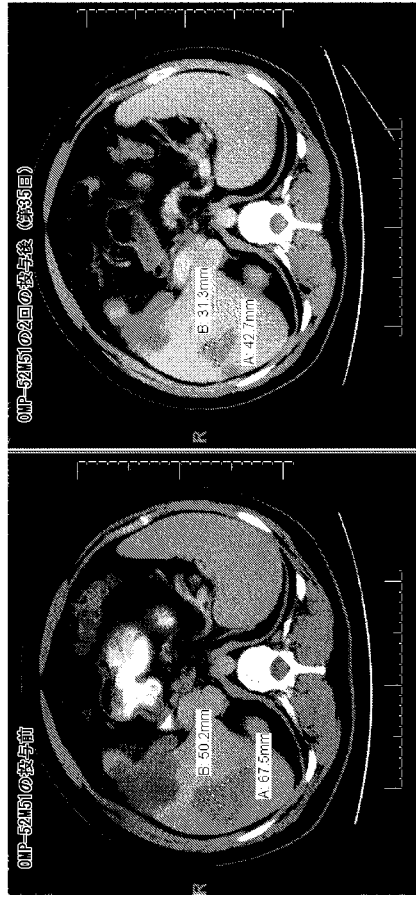


【 図 3 】



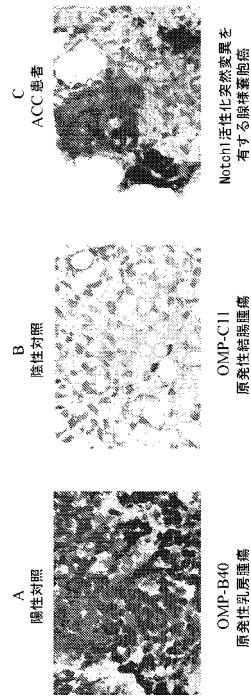
【 図 2 】

肝臓のCTスキャン



【 図 4 】

Notch1 IOD免疫組織化学アッセイ



【手続補正書】

【提出日】平成28年11月16日(2016.11.16)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2017510626000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 15/16756
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(B) - A61K 39/395, G01N 33/574, C12Q 1/68 (2015.01) CPC - A61K 39/3955, G01N 33/574, C12Q 1/6886 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(B): A61K 39/395, G01N 33/574, C12Q 1/68 (2015.01) CPC: A61K 39/3955, G01N 33/574, C12Q 1/6886 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched CPC: A61K 39/395, C12Q 2600/112, G01N 2800/56 (keyword limited; terms below) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBase, PubWest, Google Patents, Google Scholar: Cancer, tumor, adenoid cystic carcinoma, AdCC, Notch1, Notch 1, TAN1, hN1, Notch1-binding agent, Notch1 antibody, Notch1, intracellular domain, Notch1 ICD, mutation		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2013/074596 A1 (CAIN et al.) 23 May 2013 (23.05.2013), abstract, para [0032], [0034], [0124], [0182], SEQ ID NOs: 5, 9, 10, 12, 14, 16	1-6, 15-21, 38 and 49-56
Y	DING et al., Notch-4 contributes to the metastasis of salivary adenoid cystic carcinoma, Oncology Reports, March 13, 2010, Vol. 24, pages 363-368; pg 265, col 2, para 1; pg 367, col 2, para 2	1-6, 15-21, 38 and 49-56
Y	US 2014/0065205 A1 (ANTHONY et al.) 06 March 2014 (06.03.2014); para [0011], [0060]	38
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 28 May 2015 (28.05.2015)		Date of mailing of the international search report <div style="text-align: center; font-size: 1.2em; font-weight: bold;">02 JUL 2015</div>
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer: <div style="text-align: center;">Lee W. Young</div> PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 15/18756

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

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

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

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

3. Claims Nos.: 7-14, 22-37, 39-48, 57-68
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

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

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I		テーマコード(参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q	1/68	A
C 1 2 Q 1/32 (2006.01)	C 1 2 Q	1/68	Z
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	C 1 2 Q	1/32	
G 0 1 N 33/573 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	D
G 0 1 N 33/48 (2006.01)	G 0 1 N	33/573	A
G 0 1 N 37/00 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	Y
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	G 0 1 N	33/48	R
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	G 0 1 N	37/00	1 0 2
	C 0 7 K	16/28	Z N A
	C 1 2 N	15/00	A

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

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889

弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 デュボン ヤコブ

アメリカ合衆国 9 4 0 1 0 カリフォルニア州 ヒルズボロー カーディガン ロード 1 2 2
9

(72)発明者 カポウン アン エム .

アメリカ合衆国 9 4 0 4 1 カリフォルニア州 マウンテン ビュー アーホーン アベニュー
6 8 6

(72)発明者 キャンシラ ベリンダ

アメリカ合衆国 9 4 0 6 1 カリフォルニア州 レッドウッドシティー ダンベリー レーン
1 3 4

F ターム(参考) 2G045 AA26 CB02

4B063 QA01 QA17 QA19 QQ03 QQ24 QQ42 QQ58 QR08 QR42 QR55
QR62 QS25 QS28 QS34 QX02

4C084 AA17 NA14 ZA081 ZA082 ZB261 ZB262
4C085 AA13 AA14 AA16 CC02 DD62 EE01 GG02
4H045 AA11 AA30 CA40 DA76 EA20 FA74

专利名称(译)	用NOTCH1抗体治疗癌症的方法		
公开(公告)号	JP2017510626A	公开(公告)日	2017-04-13
申请号	JP2016573676	申请日	2015-03-04
[标]申请(专利权)人(译)	昂考梅德药品有限公司		
申请(专利权)人(译)	オンコメッドファーマシューティカルズインコーポレイテッド		
[标]发明人	デュボンヤコブ カポウンアンエム キャンシラベリンダ		
发明人	デュボン ヤコブ カポウン アン エム. キャンシラ ベリンダ		
IPC分类号	A61K45/00 A61P43/00 A61P35/00 A61P25/04 A61K39/395 C12Q1/68 C12Q1/32 G01N33/53 G01N33/573 G01N33/48 G01N37/00 C07K16/28 C12N15/09		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P25/04 C07K16/28 C07K2317/24 C07K2317/76 C12Q1/6886 C12Q2600/106 C12Q2600/156 C12Q2600/158 G01N33/57407 G01N2800/52 A61K39/3955 A61K39/39558 A61K45/06 A61K2039/507 C07K16/32 C07K2317/565 G01N33/53 G01N2333/705		
FI分类号	A61K45/00 A61P43/00.111 A61P35/00 A61P25/04 A61K39/395.N C12Q1/68.A C12Q1/68.Z C12Q1/32 G01N33/53.D G01N33/573.A G01N33/53.Y G01N33/48.R G01N37/00.102 C07K16/28.ZNA C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA26 2G045/CB02 4B063/QA01 4B063/QA17 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ24 4B063/QQ42 4B063/QQ58 4B063/QR08 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS28 4B063/QS34 4B063/QX02 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZA081 4C084/ZA082 4C084/ZB261 4C084/ZB262 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/CC02 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/GG02 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/FA74		
代理人(译)	清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 正人大关 五十嵐弘		
优先权	61/949511 2014-03-07 US 62/013226 2014-06-17 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了用于治疗癌症的方法。更具体地，本发明包括施用一定剂量的抗Notch1抗体的步骤，提供了用于治疗癌症的方法。

(5) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	2 G 0 4 5
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1 4 B 0 6 3
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 25/04 (2006.01)	A 6 1 P 25/04	4 C 0 8 5
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N 4 H 0 4 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 66 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-573676 (P2016-573676)	(71) 出願人	308031072
(86) (22) 出願日	平成27年3月4日(2015.3.4)		オンコメッド ファーマシューティカルズ
(85) 翻訳文提出日	平成28年10月25日(2016.10.25)		インコーポレイテッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2015/018756		アメリカ合衆国 カリフォルニア州
(87) 国際公開番号	W02015/134627		ドウッドシティー チェサピーク
(87) 国際公開日	平成27年9月11日(2015.9.11)		ブ 8 0 0
(31) 優先権主張番号	61/949,511	(74) 代理人	100102978
(32) 優先日	平成26年3月7日(2014.3.7)		弁理士 清水 初志
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100102118
(31) 優先権主張番号	62/013,226		弁理士 峯名 雅夫
(32) 優先日	平成26年6月17日(2014.6.17)	(74) 代理人	100160923
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 山口 裕季
		(74) 代理人	100119507
			弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 NOTCH1 抗体によって癌を治療するための方法