

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2012-508017

(P2012-508017A)

(43) 公表日 平成24年4月5日(2012.4.5)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C 12 N 15/09 (2006.01)	C 12 N 15/00	Z N A A 4 B 0 2 4
C 07 K 16/28 (2006.01)	C 07 K 16/28	4 B 0 6 4
C 12 N 5/071 (2010.01)	C 12 N 5/00	2 0 2 A 4 B 0 6 5
C 12 N 1/15 (2006.01)	C 12 N 1/15	4 C 0 7 6
C 12 N 1/19 (2006.01)	C 12 N 1/19	4 C 0 8 4

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 174 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2011-535651 (P2011-535651)	(71) 出願人	511110706 フアプラス エルエルシー
(86) (22) 出願日	平成21年11月4日 (2009.11.4)		アメリカ合衆国、カリフォルニア州 92
(85) 翻訳文提出日	平成23年7月6日 (2011.7.6)		121、サンディエゴ市、サイエンス セ
(86) 國際出願番号	PCT/US2009/063303		ンター ドライブ 10777
(87) 國際公開番号	W02010/054010	(74) 代理人	100109634
(87) 國際公開日	平成22年5月14日 (2010.5.14)		弁理士 鮎谷 威志
(31) 優先権主張番号	61/211,204	(72) 発明者	ボーン スマイダー
(32) 優先日	平成21年3月25日 (2009.3.25)		アメリカ合衆国、カリフォルニア州 92
(33) 優先権主張国	米国(US)		129、サンディエゴ市、ヒーリス プレ
(31) 優先権主張番号	61/198,764		イス 7483
(32) 優先日	平成20年11月7日 (2008.11.7)	(72) 発明者	ヘレン ホンユアン マオ
(33) 優先権主張国	米国(US)		アメリカ合衆国、カリフォルニア州 92
			130、サンディエゴ市、オーバーパーク
			ロード 3571

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】抗DLL4抗体及びその使用

(57) 【要約】

本明細書では、抗DLL4抗体及びDLL4に関連した疾患又は障害における治療薬として抗DLL4抗体の使用法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

anti-DLL4抗体または抗原結合性破片 そこからその点において：

抗体がファブである時には、抗体は組み換え人DLL4に特に結びつきます；そして、抗体は、CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2、およびCDRL3の中から選ばれた最低1つの補足的な決定地域(CDR)から成っています、その点において：

a)

重いチェーンCDR3(CDRH3)は、一連のアミノ酸EEYSSSSAEYKQH(SEQ ID NO:851)；RGYSYGYDYFDY(SEQ ID NO:852)；EYYDFWSGYYTDYFDY(SEQ ID NO:853)；EGYSSSWYFDY(SEQ ID NO:854)；ANWGDYFDY(SEQ ID NO:855)；DDYGGNSDYFDY(SEQ ID NO:856)；EGYCSGGSCYS(SEQ ID NO:857)；EYYYGSGSYYNDYFDY(SEQ ID NO:858)；GCYCSSTSCYADYYYYGMDV(SEQ ID NO:859)；GSCYSYWYFDL(SEQ ID NO:860)；を持つCDRH3の中から選ばれ、そしてアミノ酸の列はSEQ ID NOS:851-860；のどれに対してもアミノ酸の列に最低65%の連続した個性を見せた。

b)

H鎖のCDR2(CDRH2)は、一連のアミノ酸IINPSGGSTSQAQKFQG(SEQ ID NO:844)；IIPGDSDTRYSPSFQG(SEQ ID NO:845)；RTYYRSKWYNDYAVSVKS(SEQ ID NO:846)；EINHSGSTNYNPSLKS(SEQ ID NO:847)；INSNAGNGNTKYSQEFQG(SEQ ID NO:848)；WMNPNSGNTGYAQKFQG(SEQ ID NO:849)；YIYSGSTYYNPSLKS(SEQ ID NO:850)；そして、SEQ ID NOS:844-850；のうちの何にでも適合する一連のアミノ酸の列の中に少なくとも65%の個性を見せた。

c)

H鎖CDR1(CDRH1)はGYTFTSYYMH(SEQ ID NO:830)；GYSFTSYWIG(SEQ ID NO:831)；GDSVSSNSAA(SEQ ID NO:832)；GGSFSGYYWS(SEQ ID NO:833)；GYTFTSYAMH(SEQ ID NO:834)；GYTFTSYAIN(SEQ ID NO:835)；GGSISSSGGYY(SEQ ID NO:836)；として記述させているアミノ酸の列を持つCDRH1の中から選ばれた。SEQ ID NOS:831-836のどのアミノ酸の列に少なくとも65%の個性を見せる。アミノ酸の列はGYTFTSYVIN(SEQ ID NO:904)ではないという但し書き；そして、SEQ ID NO:830の中にあるアミノ酸の列へにおいて少なくとも72%の列に個性が見られた。

d)

軽鎖CDR3(CDRL3)は、QQRSNWPPWT(SEQ ID NO:881)；VLYMGSGISYV(SEQ ID NO:882)；MIWHSSASFV(SEQ ID NO:883)；QQYNNWPPWT(SEQ ID NO:884)；QANSFPPWT(SEQ ID NO:885)；QQYGSSPPWT(SEQ ID NO:886)；QQYNSYSPWT(SEQ ID NO:887)；MQRIEFPSWT(SEQ ID NO:888)；SSYTSSSTLFV(SEQ ID NO:889)；そしてQVYESSANFV(SEQ ID NO:890)；のアミノ酸の列を持つCDRL3の中から選ばれている。そして、ID NOS:881-890のどのアミノ酸の列に対しても少なくとも65%の個性を持つ。

e)

軽鎖CDR2(CDRL2)はDASN RAT(SEQ ID NO:871)；STNTRSS(SEQ ID NO:872)；YYSDSSK(SEQ ID NO:873)；GASTRAT(SEQ ID NO:874)；AASSLQS(SEQ ID NO:875)；GASSRAT(SEQ ID NO:876)；DASSLGS(SEQ ID NO:877)；TLSYRAS(SEQ ID NO:878)；EVSNRPS(SEQ ID NO:879)；HYSDSDK(SEQ ID NO:880)；といったアミノ酸の列を持つCDRL2の中から選ばれている。そしてどのSEQ ID NOS:871-880；の中にあるアミノ酸の列に少なくとも65%の個性ある列のアミノ酸の列が含

10

20

30

40

50

まれていた。

f)

軽鎖CDR1 (CDRL1) はRASQSVSYLA (SEQ ID NO : 861) ;
 GLSSGSVSTSYPPS (SEQ ID NO : 862) ; TLRSGINLGSYRIF (SEQ ID NO : 863) ; RASQSVS
 SNLA (SEQ ID NO : 864) ; RASQGISSWLA (SEQ ID NO : 865) ; RASQVSSSYLA (SEQ ID NO : 866) ; RASQSISSWLA (SEQ
 ID NO : 867) ;

RSSQSLLDSDDGNTYLD (SEQ ID NO : 868) ; TGTSSDVGGTNYVS (SEQ ID NO : 869) ; TLS
 SDLSVGGKNMF (SEQ ID NO : 870) ; からなるアミノ酸の列を持つCDR1の中から選ばれる
 10 そして、どのSEQ ID NOS : 861-870にもあるアミノ酸の列の少なくとも65%の列は個性
 あるものです。

【請求項2】

それが実物大の抗体または抗体破片である主張1の抗体。

【請求項3】

主張2の抗体は、ファブ、ファブ、F(ab')2、軽鎖Fv (scFv)、Fv、dsFv、diabody、Fd
 とFd'破片、Fabフラグメント、Fdフラグメント、scFv破片、またはscFab破片から選ばれた抗体。

【請求項4】

主張2またはファブであるか、または実物大のガンマGである主張3の抗体。

20

【請求項5】

CDRが、SEQ ID

NOS : 830-836と844-890のうちの何にでも記述されたアミノ酸の列に、70%、75%、80%、8
 5%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の列の個性を表している主
 張1-4のうちの何の抗体でも。

【請求項6】

2、3、4、5、または6つの異なったCDRsから成っている抗体と言う点で主張1-5のうちの全
 ての抗体。

【請求項7】

1-6の主張におけるどの抗体においても、CDRがどのSEQ ID NOS:830-836とSEQ ID NOS:844
 -890のどの前に置く事はアミノ酸置換、付加、または削除により修正されます。

30

【請求項8】

1-7の主張におけるどの抗体においても、CDRH1がkabat数字をベースとしているT28、F29
 、T30、S31、およびY33により1つ以上のアミノ酸から選ばれたSEQ ID NO:830の前に置か
 れたCDRH1の修正が含まれている。

【請求項9】

主張8の抗体は、T28A、F29A、T30A、S31A、Y33Aの中から選ばれた1つ以上のアミノ酸置換
 (s) 中にある。

【請求項10】

主張1-7の抗体は、kabat勘定に基づいた、ポジションS28、F29、T30、W33、I34、およびG
 35で1つ以上のアミノ酸置換 (s) 中から選ばれたSEQ ID NO:831の前に位置するCDRH1の
 部分修正を含んでいる。

40

【請求項11】

主張10の抗体によると、1つ以上のアミノ酸置換 (s) が、S28A、S28R、S28K、S28N、F29A
 、T30A、W33A、I34A、G35T、G35A、およびG35Vの中から選ばれる。

【請求項12】

主張1から11のいずれの抗体も、I50、I51、N52、P52a、S53、G54、G55、G56、T57とS58、
 におけるKabatの番号に基づいている、一つ、またはそれ以上のアミノ酸から選ばれたSEQ
 ID

NO:844の前にあるCDRH2の修正を含んでいます。

50

【請求項 1 3】

主張12のどの抗体も、I50A、I50T、I51A、I51T、I51V、I51N、I51R、I51W、I51S、I51G、I51V、I51E、I51H、I51Y、N52A、N52V、N52G、N52T、N52P、N52L、N52W、N52Y、N52V、N52S、N52Q、N52K、P52aA、P52aM、P52aE、P52aH、P52aY、P52aT、P52aN、P52aR、P52aW、P52aS、P52aG、S53A、S53I、S53E、S53R、S53G、S53T、S53L、S53V、S53N、S53P、G54A、G54W、G54D、G55A、G55V、G55E、G55S、G55K、G55T、G55L、G55R、G55H、G55I、G55W、S58A、T57Aおよび/またはS58Aから選ばれた一つかそれ以上のアミノ酸の置換。

【請求項 1 4】

主張12または13の抗体によるとI51V/N52L/S53T/G55H、N52L/S53T/G55H、I51E/N52L/S53T/G55HまたはI51N/N52L/S53T/G55Hは置換されたアミノ酸です。

10

【請求項 1 5】

主張1-11のどの抗体においても、kabat番号に基づいたポジションI50、I51、Y52、P52a、D54、S55、D56、そして/または、T57における一つかそれ以上のアミノ酸から選ばれたSEQ ID NO:845の前にあるCDRH2の修正を含むCDRH2の中にあります。

【請求項 1 6】

主張15の抗体は、I50A、I51A、Y52A、P52aA、D54A、S55G、D56A、T57Dおよび/またはT57Aの中から選択されている一つかそれ以上のアミノ酸の置換の中にあります。

【請求項 1 7】

主張1-16のどの抗体においても、Kabatの番号に基づいているE96、Y97、S98、S99、S100、S100a、A100b、E100c、Q101の、そして/または、H102から選ばれた一つもしくはそれ以上のアミノ酸の置換の中にあるSEQ ID NO:851の前にあるCDRH3の変更が含まれているCDRH3の中にあります。

20

【請求項 1 8】

主張17の抗体は、E96A、Y97A、S98A、S98Q、S98V、S98I、S98G、S99P、S99A、S99L、S99W、S99F、S99N、S99H、S99C、S99G、S100F、S100A、S100G、S100C、S100H、S100L、S100R、S100aA、A100bE、E100cA、Q101A、H102A、H102S、H102FとH102Yから選択され置換された一つもしくはそれ以上のアミノ酸の中にあります。

【請求項 1 9】

主張17または18の抗体は、S98A/S99P/S100F、S98A/S99P/S100F/H102FまたはS98A/S99P/S100F/H102Yの置換されたアミノ酸です。

30

【請求項 2 0】

主張1-16の抗体は、Kabatの番号に基づいたポジションR95、G96、Y97、S98、Y99、G100、Y100a、D100b、および/またはD101の置換された1つ、またはそれ以上のアミノ酸から選ばれているで1つまたは複数の置換されたアミノ酸の中から選ばれたSEQ ID NO:852の前にある修正されたCDRH3を含むCDRH3の中にあります。

【請求項 2 1】

主張20の抗体は、R95A、G96K、G96R、G96L、G96D、G96T、Y97A、Y97H、S98A、Y99A、G100A、G100D、G100L、G100P、G100R、G100M、G100K、G100S、G100R、G100T、Y100aA、D100bAとD101Aから選ばれた1つまたは複数の置換されたアミノ酸の中にあります。

40

【請求項 2 2】

主張20または21の抗体において、置換されたアミノ酸はG96K/G100Tです。

【請求項 2 3】

主張1-22の抗体は、Kabatの番号に基づいたポジションR-24、Q27、S28、S30、S31そして/またはY32の1つまたはそれ以上の置換されたアミノ酸から選ばれたSEQ ID NO:861の前にあるCDRL1の修正の中にあるCDRL1の中にあります。

【請求項 2 4】

主張23の抗体によると、R24G、Q27L、S28P、S28G、S28K、S28V、S28F、S28P、S28T、S28L、S28Q、S28A、S28N、S28H、S28Iの中から選択されている、S28R、S28W、S28M、S28E、S30N、S30W、S30R、S30L、S30C、S30D、S30L、S30T、S30P、S30Y、S30Q、S30A、S30G、S30V、S31K、S31T、S31N、S31K、S31L、S31M、S31F、S31I、S31V、S31H、S31A、S31P、S31D

50

、S31R、S31Y、S31Q、S31E、S31G、Y32VとY32S。から選ばれた1つもしくはそれ以上の置換されたアミノ酸の中にある。

【請求項 2 5】

主張23または24の抗体における、置換されたアミノ酸はS28N/S30D/S31Hです。

【請求項 2 6】

主張1-22のどの抗体においても、Kabatの番号付けに基づくポジションG24、L25、S26、S27、G27a、S27b、V27c、S28、T29、S30、Y31、Y32、P33における1つもしくはそれ以上のアミノ酸置換の中から選ばれたSEQ ID

NO:862の前にある修正されたCDRL1を含むCDRL1です。

10

主張26の抗体は、G24A、G24R、G24L、L25A、S26A、S27A、G27aA、S27bA、V27cA、S28A、T29A、S30A、Y31A、Y32AおよびP33Aの中から選択されている置換された1つまたはそれ以上のアミノ酸です。

【請求項 2 8】

主張1から27のいずれの抗体も、Kabatの番号付けに基づいたポジションD50、A51、S52、N53、R54、A55そして/またはT56から選ばれた1つまたはそれ以上の置換されたアミノ酸から選ばれたSEQ ID

NO:871の前のCDRL2の修正を含むCDRL2の中にあります。

【請求項 2 9】

主張28の抗体は、D50A、A51T、S52A、S52L、S52T、S52R、S52S、S52W、S52N、S52P、S52M、N53A、N53E、N53G、N53M、N53C、N53H、N53P、R54A、A55T、A55R、A55C、A55S、A55GとT56Aの中から選ばれた1つまたはそれ以上の置換されたアミノ酸です。

20

【請求項 3 0】

主張28または29の抗体における置換されたアミノ酸はS52L/A55SまたはS52L/A55Gです。

【請求項 3 1】

主張1-27のどの抗体も、Kabatの番号付けに基づいたポジションS50、T51、N52、T53、R54、S55そして/またはS56で置換された1つまたはそれ以上のアミノ酸から選ばれた、SEQ ID NO:872の前にある修正されたCDRL2含むCDRL2です。

【請求項 3 2】

主張31の抗体は、S50A、S50F、S50G、S50C、S50R、S50L、S50M、S50V

30

S50P,

S50T, S50H, S50Q, S50N, S50K, S50D, S50E, S50W, T51A, T51F, T51L, T51I, T51M, T51V, T51S, T51P, T51Y, T51H, T51Q, T51N, T51K, T51D, T51E, T51W, T51R, T51G, N52A, T53A, R54A, R54I, R54Y, R54D, R54G, S55A, S55F, S55L, S55I, S55M, S55V, S55P, S55T, S55Y, S55H, S55Q, S55N, S55K, S55D, S55E, S55W, S55R, S55G そしてS56Aの中から選ばれた置換された1つまたはそれ以上のアミノ酸の中にあります。

【請求項 3 3】

主張1-32の抗体は、Kabatの番号に基づいたポジションR91、S92、N93、および/またはW94からなる1つまたはそれ以上の置換されたアミノ酸から選ばれたSEQ ID NO:881の前にあるCDRL3の修正を含むCDRL3の中にあります。

40

【請求項 3 4】

主張33の抗体は、R91P、R91L、R91G、S92P、S92A、S92Q、S92V、S92T、S92R、S92G、S92V、S92M、S92N、S92C、N93Y、N93S、N93H、N93Q、W94R、W94S、W94T、W94L、W94PとW94Mの中から選ばれた1つまたはそれ以上の置換されたアミノ酸です。

【請求項 3 5】

主張1-32のいずれかの抗体も、Kabatの番号に基づいたV89、L90、Y91、M92、G93、S94、G95、I95aおよび/またはS95bから1つまたは複数の置換されたアミノ酸の中から選択されたSEQ ID NO:882の前にあるCDRL3の修正を含んでいます。

【請求項 3 6】

主張35の抗体はV89A、V89P、V89T、V89S、V89L、V89R、V89C、V89E、V89W、V89N、V89I、

50

V89G、V89H、L90A、Y91A、M92A、M92E、M92S、M92G、M92L、M92P、M92V、M92D、M92R、M92N、M92T、M92F、G93A、S94A、S94W、S94G、S94P、S94R、S94L、S94M、S94E、S94V、G94A、I95aA、S95bAの中から選択された1つまたはそれ以上の置換されたアミノ酸の中に存在します。

【請求項37】

主張35または36の抗体は、M92R/S94MまたはV89L/S94Pから置換されたアミノ酸のなかに存在します。

【請求項38】

主張1-37のいずれかの抗体も、a) の前にある
CDRH1; b) の前にある CDRH2; c) の前にある
CDRH1; d) の前にあるCDRL3; e) の前にあるCDRL2;
f) の前にあるCDRL1の中から選ばれた少なくとも2つのCDRsを含む。

10

【請求項39】

前記請求項1から38のいずれの抗体も：a) の前にある
CDRH3; b) の前にある CDRH2; c) の前にある
CDRH1; の中から選ばれた最低でも1つのCDRを含む様々なH鎖を含んでいる、そしてd) の前にある CDRH3; e) の前にある CDRH2; f) の前にある CDRH1から選ばれた最低でも一つのCDRを含む様々な軽鎖を含む抗体です。

20

【請求項40】

主張1-39のいずれの抗体も：a) の前にある
CDRH3; b) の前にある CDRH2; c) の前にある
CDRH1; の中から選ばれた最低でも2つのCDRsを含む様々なH鎖を含む、そしてd) の前にある
CDRH3; e) の前にある CDRH2; f) の前にある
CDRH1; から選ばれた最低でも1つのCDRを含む様々な軽鎖を含んでいる。

20

【請求項41】

主張1-40のいずれの抗体も：a) の前にある
CDRH3; b) の前にある CDRH2; c) の前にある
CDRH1; の中から選ばれた最低でも2つのCDRsを含む様々なH鎖を含む、そしてd) の前にある
CDRH3; e) の前にある CDRH2; f) の前にある
CDRH1; から選ばれた最低でも2つのCDRを含む様々な軽鎖を含んでいる。

30

【請求項42】

主張1-41のいずれの抗体も以下を含む：
アミノ酸置換G55Hが含まれているSEQ ID NO:844の前にあるCDRH2。そして
S98A/S99P/S100F/H102Fの置換されたアミノ酸を含むSEQ ID NO:851の前にあるCDRH3。

40

【請求項43】

主張1-41のいずれの抗体も：

置換されたアミノ酸S98A/S99P/S100F/H102Fを含むSEQ ID NO:851の前にあるCDRH3。そして
S28N/S30D/S31Hが含まれている置換されたアミノ酸SEQ ID NO:861の前にあるCDRL1。

40

【請求項44】

主張1-41のいずれの抗体も：

置換されたアミノ酸I51V/N52L/S53T/G55Hを含むSEQ
ID NO:844の前にあるCDRH2。
S98A/S99P/S100F/H102Fを含む置換されたアミノ酸CDRH3:851の前にあるCDRH3。そして
置換されたアミノ酸S28N/S30D/S31Hを含むSEQ ID NO: 861の前にあるCDRL1. そして

【請求項45】

主張1-41のいずれの抗体も：

アミノ酸置換I51V/N52L/S53T/G55Hを含むSEQ ID NO: 844の前にあるCDRL2。

50

アミノ酸置換S98A/S99P/S100F/H102Fを含むSEQ ID NO:851の前にあるCDRL3。
 アミノ酸置換S28N/S30D/S31Hを含むSEQ ID NO:861の前にあるCDRL1。そして
 アミノ酸置換S52L/A55Sを含むSEQ ID NO:871の前にあるCDRL2。

【請求項 4 6】

主張1-41のいずれの抗体も以下を含む：

アミノ酸置換S28R/G35Vを含むSEQ ID NO:831の前にあるCDRH1。

アミノ酸置換G96K/G100Tを含むSEQ ID NO:852の前にあるCDRH3。

アミノ酸置換M92R/S94Mを含むSEQ ID NO:853の前にあるCDRL3。

【請求項 4 7】

主張1-41のいずれの抗体も以下を含む：

アミノ酸置換S28R/G35Vを含むSEQ ID NO:831の前にあるCDRH1。

アミノ酸置換G96K/G100Tを含むSEQ ID NO:852の前にあるCDRH3そして

アミノ酸置換V89L/S94Pを含むSEQ ID NO:882の前にあるCDRL3。

10

【請求項 4 8】

主張1-41のいずれの抗体も：

アミノ酸置換S28R/G35Vを含むSEQ ID NO:831の前にあるCDRH1。

アミノ酸置換G96K/G100Tを含むSEQ ID NO:852の前にあるCDRH3。

アミノ酸置換S50Gを含むSEQ ID NO:872の前にあるCDRL2。そして

アミノ酸置換V89L/S94Pを含むSEQ ID

NO:882の前にあるCDRL3。

20

【請求項 4 9】

主張1-48のいずれの抗体も、さらに抗体のフレームワーク領域内にある1つまたは複数のアミノ酸置換を含んでいる。

【請求項 5 0】

主張49の抗体は抗体のフレームワーク領域で1、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれ以上のアミノ酸置換を含む。

【請求項 5 1】

主張49または50の抗体は、Kabatの番号付けに基づいた、アミノ酸置換の位置62または76で1つまたは複数のアミノ酸置換を含む様々な軽鎖の中にあります。

30

【請求項 5 2】

主張51の抗体において、前記アミノ酸置換はアミノ酸置換F62L、S76E、S76Q、S76P、S76L、S76T、S76G、S76A、S76Y、S76N、T76S、T76E、T76YとT76Mの中から選択された。

【請求項 5 3】

主張49-52のいずれの抗体も、1つまたはそれ以上の置換アミノ酸を含む様々なH鎖抗体と置換アミノ酸はKabatの番号付けに基づいたアミノ酸位置24-82aです。

【請求項 5 4】

主張53の抗体は、前記アミノ酸置換がアミノ酸置換G24T、G24L G24A、および/またはS82a Tの中から選択されたものです。

【請求項 5 5】

主張1-54のいずれの抗体も表面プラズモン共鳴(SPR)によって測定されるように低い10-6M、10-7、10-8M、10-9M、10-10M、10-11Mまたは10-12Mと少なくとも類似点があることを表しています。

40

【請求項 5 6】

主張1-55のいずの抗体も生殖細胞由来の抗体またはその変更されたフォームである

【請求項 5 7】

主張56の抗体は以下を含む：

a. VH、DH、JH生殖細胞部分や修正された生殖細胞部分から構成されたヌクレオチドの配列によってコードされるVHのチェーン：

VHの生殖細胞のセグメントはIGHV1、IGHV4、IGHV5またはIGHV6や遺伝子と対立物である。

DHの生殖細胞のセグメントは、そのIGHD6、IGHD5、IGHD4、IGHD2、IGHD3、またはIGHD7や

50

遺伝子と対立遺伝子であり、

JH生殖細胞部分はIGHJ1、IGHJ2、IGHJ4、またはIGHJ6や遺伝子と対立物；そしてここでV_kとJ_kまたはV_lおよびJ_lの生殖細胞のセグメントから構成されたヌクレオチドの配列によってコードされるVLのチェーン：

V_k生殖細胞のセグメントはIGKV1、IGKV2、またはIGKV3であり、J_k、そのIGKJ1や遺伝子と対立遺伝子である、または

V_k生殖細胞のセグメントはIGLV2、IGLV8、IGLV11またはIGLV5とJ_l生殖細胞のセグメントであり、IGLJ1またはIGLJ4や遺伝子と対立物である前記抗体は、DLL4バインド/またはDLL4の活性を調節する。

【請求項 5 8】

10

主張57の抗体：

VHの生殖細胞のセグメントはIGHV1 - 3 * 01、IGHV1

- 3 * 02、IGHV1 - 8 * 01、IGHV1 -

46 * 01、IGHV1 - 46 * 02、IGHV1 -

46 * 03、IGHV4され、31 * 01、IGHV4 - 31 * 02、IGHV4 - 31 * 03、IGHV4 - 31 * 04

、IGHV4 - 31 * 05、IGHV4 - 31 * 06、IGHV4 - 31 * 07、IGHV4 - 31 * 08、IGHV4 - 31

* 09、IGHV4 - 31 * 10、IGHV4 - 34 * 01、IGHV4 - 34 * 02、IGHV4 - 34 * 03、IGHV4

- 34 * 04、IGHV4 - 34 * 05、IGHV4 - 34 * 06、IGHV4 - 34 * 07、IGHV4 - 34 * 08、

IGHV4 - 34 * 09、IGHV4 - 34 * 10、IGHV4 - 34 * 11、IGHV4 - 34 * 12、IGHV4 - 34

* 13、IGHV5 - 51 * 01、IGHV5 - 51 * 02、IGHV5 - 51 * 03、IGHV5 - 51 * 04、IGHV5

- 51 * 05、IGHV6 - 1 * 01、IGHV6 - 1 * 02、は修正された変更生殖セグメントです。

20

DHの生殖細胞セグメントはIGHD2 - 2 * 01、IGHD2

- 2 * 02、IGHD2 - 15 * 01、IGHD4

- 23 * 01、IGHD6 - 6 * 01、IGHD6

- 13 * 01、IGHD5 - 18 * 01、IGHD3

- 3 * 01、IGHD3 - 3 * 02、IGHD3 -

10 * 01、IGHD3 - 10 * 02、またはIGHD7

- 27 * 01、またはそれらの変更生殖セグメントです。

JH生殖細胞セグメントはIGHJ1 * 01、IGHJ2 * 01、IGHJ4 * 01、IGHJ4 * 02、IGHJ4 *

03、IGHJ6 * 01、IGHJ6 * 02、IGHJ6 * 03またはIGHJ6 * 04またはその変更された生殖細胞のセグメントであり、以上の事から。

30

V 生殖細胞のセグメントは、IGKV1 - 5 * 01、IGKV1

- 5 * 02、IGKV1 - 5 * 03、IGKV1 -

12 * 01、IGKV1 - 12 * 02、IGKV2 - のD - 40 * 01 IGKV3 - 11 * 01、IGKV3 - 11 * 02

、IGKV3 - 15 * 01、IGKV3 - 20 * 01またはIGKV3 - 20 * 02またはそれらの変更生殖セグメントです。

IGKJ1 * 01またはその変更生殖セグメントです。以上の事から

theJ 生殖セグメントはIGKJ * 01または修正された生殖細胞セグメントであり、それによ

りV 生殖細胞セグメントはIGLV2 - 14 * 02、IGLV2 - 14 * 03、IGLV2 - 14 * 04、IGLV

8 - 61 * 01、IGLV8 - 61 * 02、IGLV8 - 61 * 03、IGLV5 - 48 * 01、またはIGLV11 - 55

40

* 01またはそれらの変更生殖セグメントであり、J 生殖セグメントはIGLJ1 * 01、IGLJ

4 * 01、またはその変性生殖セグメントです。

【請求項 5 9】

主張1-58のいずれの抗体も抗体から選ばれた抗体、または、以下を含む部分から選択されている抗体：

a) IGHV1 - 46 * 01、IGHD6 - 6 *

01とIGHJ1 * 01生殖セグメントまたは以下の変更されたフォームそしてIGKV3 - 11 * 01

IGKJ1 * 01生殖細胞セグメントから構成されたヌクレオチドの配列によってコードされるVLのチェーンまたは以下を含む修正された形

b) IGHV5 - 51 * 03、IGHD5 - 18 * 01 IGHJ4 * 01生殖セグメントから構成されたヌクリ

50

- オタイプ結果エンコードされたVHそしてIGLV-61 * 01と
IGLJ1 * 01生殖細胞セグメントまたは変更されたフォームによりエンコードされたVHチェーン、以上の事から；
- c) IGHV6 - 1 * 01、IGHD3 - 3 * 01
IGHJ4 * 01生殖細胞セグメントまたは以上の変更されたフォームそしてIGLV5 - 48 * 01
とIGLJ4 * 01生殖細胞セグメントまたは変更されたフォームのヌクレオチドの結果からコードされるVLのチェーンからVHはエンコードされる、以上の点から；
- d) IGHV1 - 46 * 01、IGHD6 - 13 * 01 10
01 そしてIGHJ4 * 01生殖細胞セグメントまたは変更されたフォーム及びIGKV3 - 15 * 01
IGKJ1 * 01生殖細胞セグメントまたは修正された形から構成されたヌクレオチドの配列によってコードされるVLチェーン、以上の点から；
- e) IGHV4 - 34 * 01、IGHD7 - 27 * 01
01 IGHJ4 * 01生殖細胞セグメントから構成されたヌクレオチドの結果、また修正された形、そしてIGKV1
- 12 * 01 IGKJ1 * 01生殖細胞セグメントまたは修正された形から構成されたヌクレオチドの配列によってコードされるVHのチェーン、以上の点から；
- f) IGHV1 - 46 * 01、IGHD6 - 13 * 01 20
01 IGHJ4 * 01生殖細胞セグメントまたは修正された形のヌクレオチドの配列によってコードされるVLチェーン、そしてIGKV3 - 20 * 01 IGKJ1 * 01生殖細胞配列、または修正された形の構成されたヌクレオチドの配列によってコードされるVHのチェーン。音声を聞く
- g) IGHV1 - 3 * 02、IGHD4 - 23 * 01 IGHJ4 * 01生殖セグメントまたは変更されたフォーム及びそのからコンパイルされたヌクレオチドの配列によってコードされるVLのチェーンからコンパイルされたヌクレオチドの配列によってコードされるVHのチェーンをgのIGKV1 - 5 * 01 IGKJ1 * その01生殖セグメントまたは変更されたフォーム；
- h) をIGHV1 - 46 * 01、IGHD2 - 15 * 30
01 IGHJ2 * その01生殖セグメントまたは変更されたフォームからコンパイルされたヌクレオチドの配列によってコードされるVLのチェーンからコンパイルされたヌクレオチドの配列によってコードされるVHのチェーンIGKV1 - 5 * 01 IGKJ1 * その01生殖セグメントまたは変更されたフォーム；
- i) IGHV1 - 46 * 01、IGHD3 - 10 * 01 30
01 IGHJ4 * 01生殖セグメントまたは変更されたフォームからコンパイルされたヌクレオチドの配列によってコードされるVLのチェーンからコンパイルされたヌクレオチドの配列によってコードされるVHのチェーンIGKV1 - 5 * 01 IGKJ1 * その01生殖セグメントまたは変更されたフォーム；
- j) IGHV1 - 8 * 01、IGHD2 - 2 * 01
IGHJ6 * 01生殖セグメントまたは変更されたフォームからコンパイルされたヌクレオチドの配列によってコードされるVLのチェーンからコンパイルされたヌクレオチドの配列によってコードされるVHのチェーン、IGHD6 - 13 * 01 IGHJ4 * 01その01生殖セグメントまたは変更されたフォーム；
- k) IGHV1-46*01,、IGHD6-13*01、及び 40
IGHJ4*01生殖セグメントまたは変更されたフォームからコンパイルされたヌクレオチドの配列によってコードされるVLのチェーンからコンパイルされたヌクレオチドの配列によってコードされるVHのチェーン、IGKV2D-40*01 及びIGKJ1*01その01生殖セグメントまたは変更されたフォーム；
- l) IGHV4 - 34 * 01、IGHD7 - 27 * 01
01 IGHJ4 * 01生殖セグメントまたは変更されたフォームからコンパイルされたヌクレオチドの配列によってコードされるVLのチェーンからコンパイルされたヌクレオチドの配列によってコードされるVHのチェーン、IGLV2 - 14 * 01とそのIGLJ4 * 01その01生殖セグ 50

メントまたは変更されたフォーム；

m) IGHV4 - 31 * 02、IGHD2 - 15 * 01 IGHJ2 * 生殖セグメントまたは変更されたフォームからコンパイルされたヌクレオチドの配列によってコードされるVLのチェーンからコンパイルされたヌクレオチドの配列によってコードされるVHのチェーン、IGLV2 - 14 * 01 とそのIGLJ4 * 01その01生殖セグメントまたは変更されたフォーム；および

n) IGHV4 - 34 * 01、IGHD7 - 27 * 01 IGHJ4 * 01生殖セグメントまたは変更されたフォームからコンパイルされたヌクレオチドの配列によってコードされるVLのチェーンからコンパイルされたヌクレオチドの配列によってコードされるVHのチェーン、IGLV11 - 55 * 01 IGLJ4 * 01その01生殖セグメントまたは変更されたフォーム；

【請求項 6 0】

主張1から59のいずれかの抗体においても抗体は抗体の構成の中から選ばなくてはいけない。

a) 配列番号に記載されたアミノ酸の配列を含むVHのチェーンSEQ ID NO : 131、配列番号に記載されアミノ酸の配列を含むVLのチェーンSEQ ID NO : 141；

b) 配列番号に記載されたアミノ酸の配列を含むVHのチェーンSEQ ID NO : 132、配列番号に記載されアミノ酸の配列を含むVLのチェーンSEQ ID NO : 142；

c) 配列番号に記載されたアミノ酸の配列を含むVHのチェーンSEQ ID NO : 133配列番号に記載されアミノ酸の配列を含むVLのチェーンSEQ ID NO : 143；

d) 配列番号に記載されたアミノ酸の配列を含むVHのチェーンSEQ ID NO : 135および配列番号に記載されアミノ酸の配列を含むVLのチェーンSEQ ID NO : 145；

e) 配列番号に記載されたアミノ酸の配列を含むVHのチェーンSEQ ID NO : 137、配列番号に記載されアミノ酸の配列を含むVLのチェーンSEQ ID NO : 146；

f) 配列番号に記載されたアミノ酸の配列を含むVHのチェーンSEQ ID NO : 135および配列番号に記載されたアミノ酸の配列を含むVLのチェーンSEQ ID NO : 144；

g) 配列番号に記載されたアミノ酸の配列を含むVHのチェーンSEQ ID NO : 138および配列番号に記載されたアミノ酸の配列を含むVLのチェーンSEQ ID NO : 147；

h) 配列番号に記載されたアミノ酸の配列を含むVHのチェーンSEQ ID NO : 136、配列番号に記載されアミノ酸の配列を含むVLのチェーンSEQ ID NO : 147；

i) 配列番号に記載されたアミノ酸の配列を含むVHのチェーンSEQ ID NO : 134、配列番号に記載されアミノ酸の配列を含むVLのチェーンSEQ ID NO : 147；

j) 配列番号に記載されたアミノ酸の配列を含むVHのチェーンSEQ ID NO : 139および配列番号に記載されアミノ酸の配列を含むVLのチェーンSEQ ID NO : 147；

k) 配列番号に記載されたアミノ酸の配列を含むVHのチェーンSEQ ID NO : 135および配列番号に記載されアミノ酸の配列を含むVLのチェーンSEQ ID NO : 148；

l) 配列番号に記載されたアミノ酸の配列を含むVHのチェーンSEQ ID NO : 137、配列番号に記載されアミノ酸の配列を含むVLのチェーンSEQ ID NO : 149；

m) 配列番号に記載されたアミノ酸の配列を含むVHのチェーンSEQ ID NO : 140、配列番号に記載されアミノ酸の配列を含むVLのチェーンSEQ ID NO : 149、および

n) 配列番号に記載されたアミノ酸の配列を含むVHのチェーンSEQ ID NO : 137、配列番号に記載されアミノ酸の配列を含むVLのチェーンSEQ ID NO : 150。

【請求項 6 1】

主張1から60のいずれの抗体においてもこの点で抗体は以下の抗体の構成から選ばれる：

a) 配列番号に記載されたアミノ酸の配列を含むVHのチェーンSEQ ID NO : 155配列番号に記載されアミノ酸の配列を含むVLのチェーンSEQ ID NO : 141；

b) 配列番号に記載されたアミノ酸の配列を含むVHのチェーンSEQ ID NO : 156及び配列番号に記載されアミノ酸の配列を含むVLのチェーンSEQ ID NO : 141、および

c) 配列番号に記載されたアミノ酸の配列を含むVHのチェーンSEQ ID NO : 385配列番号に記載されアミノ酸の配列を含むVLのチェーンSEQ ID NO : 142。

10

20

30

40

50

【請求項 6 2】

主張1から61のいずれの抗体も、前記抗体は、少なくとも 10^{-9} Mかそれ以下の表面プラズモン共鳴 (SPR) によって測定される結合親和性を持っています。

【請求項 6 3】

主張1から62のいずれの抗体も：

- a) 配列番号に記載されたアミノ酸の配列を含むVHのチェーンSEQ ID NO : 384および配列番号に記載されアミノ酸の配列を含むVLのチェーンSEQ ID NO : 142;
- b) 配列番号に記載されたアミノ酸の配列を含むVHのチェーンSEQ ID NO : 414および配列番号に記載されアミノ酸の配列を含むVLのチェーンSEQ ID NO : 142;
- c) 配列番号に記載されたアミノ酸の配列を含むVHのチェーンSEQ ID NO : 433および配列番号に記載されアミノ酸の配列を含むVLのチェーンSEQ ID NO : 142;
- d) 配列番号に記載されアミノ酸の配列を含むVHのチェーンSEQ ID NO : 433および配列番号に記載されたアミノ酸の配列を含むVLのチェーンSEQ ID NO : 479;
- e) の配列番号に記載されたアミノ酸の配列を含むVHのチェーンSEQ ID NO : 433および配列番号に記載されアミノ酸の配列を含むVLのチェーンSEQ ID NO : 537;
- f) 配列番号に記載されたアミノ酸の配列を含むVHのチェーンSEQ ID NO : 433および配列番号に記載されアミノ酸の配列を含むVLのチェーンSEQ ID NO : 536;
- g) 配列番号に記載されたアミノ酸の配列を含むVLのチェーンSEQ ID NO : 131および配列番号に記載されアミノ酸の配列を含むVHのチェーンSEQ ID NO : 141;
- h) 配列番号に記載されアミノ酸の配列を含むVHのチェーンSEQ ID NO : 151、配列番号に記載されアミノ酸の配列を含むVLのチェーンSEQ ID NO : 141;
- i) は配列番号に記載されアミノ酸の配列を含むVHのチェーンSEQ ID NO : 155配列番号に記載されアミノ酸の配列を含むVLのチェーンSEQ ID NO : 141;
- j) の配列番号に記載されアミノ酸の配列を含むVHのチェーンSEQ ID NO : 156および配列番号に記載されアミノ酸の配列を含むVLのチェーンSEQ ID NO : 141;
- k) は配列番号に記載されアミノ酸の配列を含むVHのチェーンSEQ ID NO : 157、配列番号に記載されアミノ酸の配列を含むVLのチェーンSEQ ID NO : 141;
- l) の配列番号に記載されアミノ酸の配列を含むVHのチェーンSEQ ID NO : 155配列番号に記載されアミノ酸の配列を含むVLのチェーンSEQ ID NO : 266;
- m) の配列番号に記載されアミノ酸の配列を含むVHのチェーンSEQ ID NO : 219および配列番号に記載されアミノ酸の配列を含むVLのチェーンSEQ ID NO : 141;
- n) は配列番号に記載されアミノ酸の配列を含むVHのチェーンSEQ ID NO : 156および配列番号に記載されアミノ酸の配列を含むVLのチェーンSEQ ID NO : 343;
- o) の配列番号に記載されアミノ酸の配列を含むVHのチェーンSEQ ID NO : 239および配列番号に記載されアミノ酸の配列を含むVLのチェーンSEQ ID NO : 343;
- p) の配列番号に記載されアミノ酸の配列を含むVHのチェーンSEQ ID NO : 239および配列番号に記載されアミノ酸の配列を含むVLのチェーンSEQ ID NO : 370; と
- q) の配列番号に記載されアミノ酸の配列を含むVHのチェーンSEQ ID NO : 134、配列番号に記載されアミノ酸の配列を含むVLのチェーンSEQ ID NO : 147。

【請求項 6 4】

1から63のいずれの抗体においても、SEQ ID NO: 433および配列番号に記載されアミノ酸の配列を含むVLのチェーンSEQ ID NO : 537

【請求項 6 5】

1から63のいずれの抗体においても、SEQ ID NO: 433および配列番号に記載されアミノ酸の配列を含むVLのチェーンSEQ ID NO : 536

【請求項 6 6】

1から63のいずれの抗体においても、SEQ ID NO: 239および配列番号に記載されアミノ酸の配列を含むVLのチェーンSEQ ID NO : 343

【請求項 6 7】

1から63のいずれの抗体においても、SEQ ID NO: 239および配列番号に記載されアミノ酸

10

20

30

40

50

の配列を含むVLのチェーンSEQ ID NO : 370

【請求項 6 8】

主張1から67のいずれの抗体も、組換えヒューマンDLL4に類似性のある抗体を含む。

【請求項 6 9】

主張1から68のいずれの抗体も、組換えヒューマンDLL4に類似性のある抗体を含む。

【請求項 7 0】

主張69の抗体は、前記細胞が血管内皮細胞である。

【請求項 7 1】

主張1から70のいずれの抗体もDLL4の活性を調節すること。

【請求項 7 2】

ノックの活性化を阻害する主張71の抗体。

【請求項 7 3】

主張1から72のいずれかの抗体は、アゴニストである。

【請求項 7 4】

主張1から72のいずれかの抗体は拮抗薬である。

【請求項 7 5】

主張1から74のいずれの抗体も、具体的にDLL4のEGF2ドメイン内の抗原決定基に結合することを確認します。

【請求項 7 6】

主張1から75のいずれの抗体も、具体的にDLL4のEGF2及びEGF4ドメイン内の抗原決定基に結合することを確認します。

【請求項 7 7】

主張1から75のいずれの抗体も、具体的にDLL4のEGF3及びEGF4ドメイン内の抗原決定基に結合することを確認します。

【請求項 7 8】

主張1から78のどの抗体も同じ抗原決定基に特に結合します。

【請求項 7 9】

SEQ ID NO:114. 内にあるアミノ酸283

~ 360ヒューマンDLL4 内にある抗原決定基に特に結合します。

【請求項 8 0】

主張79の抗体の抗体の中に：

CDRH1ことGYSFTSYWIG (配列番号は、NO : 831)、またはその配列番号は少なくとも65%の配列同一性を有するSEQ ID NO : 831;

CDRH2ことIYPGDSDTRYSPSFQG

(SEQ ID NO:845)、またはその配列番号は少なくとも65%の配列同一性を有するSEQ ID NO : 845;

CDRH2ことIYPGDSDTRYSPSFQG (SEQ ID NO:852)、またはその配列番号は少なくとも65%の配列同一性を有するSEQ ID NO:852;

CDR3ことVLYMGSGISYV (SEQ ID NO:882)、またはその配列番号は少なくとも65%の配列同一性を有するSEQ ID NO:882;

【請求項 8 1】

主張79の抗体は完全長抗体または欠陥抗体である。

【請求項 8 2】

81の抗体は、a Fab, Fab',

F(ab')₂, 簡鎖 Fv (scFv), Fv, dsFv,

diobody, Fd と Fd' , Fab-フラグメント, Fdフラグメント、 scFvフラグメント, または

a scFab.dsFvフラグメント、diobodyのFDとFd' フラグメント、Fabフラグメント、 fdはフラグメント、scFvをフラグメント、またはscFabフラグメントの中から選ばれた抗体の中にあります。

10

20

30

40

50

【請求項 8 3】

主張80から82のいずれの抗体もFabもしくは完全長抗体であるIgG。

【請求項 8 4】

主張80から83のいずれかの抗体も、どのSEQ ID NOS: 831、845、852、862、872と882を含むアミノ酸の配列に70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%連なった個性を表示するCDR。

【請求項 8 5】

主張80から84のいずれの抗体において、CDRH1はKabatの番号付けに基づいたS28A, S28R, S28K, S28N, F29A, T30A, W33A, I34A, G35T, G35A そしてG35Vから選ばれた1つもしくはそれ以上のアミノ酸によって選ばれたSEQ ID

NO:831の前にあるCDRH1の修正を含むCDRH1の中にあります。.

【請求項 8 6】

主張85の抗体は、S28A、S28R、S28K、S28N、F29A、T30A、W33A、I34A、G35T、G35AおよびG35Vの中から選択されてた1つまたは複数のアミノ酸置換(s)の抗体の中にあります。

【請求項 8 7】

主張80から86のいずれの抗体も、Kabatの番号に基づいていたポジションI50、I51、Y52、P52a、D54、S55、D56とT57、の1つもしくはそれ以上の置換されたアミノ酸から選ばれたSEQ ID NO: 845の前にある修正されたCDRH2を含むCDRH2の中にあります。

【請求項 8 8】

主張87の抗体は、I50A、I51A、Y52A、P52aA、D54A、S55G、D56A、T57DとT57Aの中から選択された1つ以上のアミノ酸置換(s)の抗体の中にあります。

【請求項 8 9】

主張80から88のいずれの抗体も、Kabatの番号に基づきポジションR95, G96, Y97, S98, Y99, G100, Y100a, D100b そして D101に置換された1つまたはそれ以上のアミノ酸から選ばれたSEQ ID NO: 852の前にあるCDRH3の修正を含むCDRH3の中にあります。

【請求項 9 0】

主張89の抗体はR95A、G96K、G96R、G96L、G96D、G96T、Y97A、Y97H、S98A、Y99A、G100A、G100D、G100L、G100P、G100R、G100M、G100K、G100S、G100R、G100T、Y100aA、D100bA そしてD101A.の中から選択されている1つまたはそれ以上のアミノ酸の中にあります。

【請求項 9 1】

請求項89または請求項90の抗体は、前記アミノ酸置換(秒)G96K/G100Tです。

【請求項 9 2】

請求項80から91のいずれかにおいて、前記CDRL1の抗体は、配列番号に記載されCDRL1の修正が含まれています：位置に1つまたは複数のアミノ酸置換(秒)の中から選ばれたG24、L25、S26では、S27の、G27a、S27b、V27c、ステップS28、T29、S30の、Y31、Y32およびP33、Kabatの番号に基づいています。

【請求項 9 3】

請求項92は、前記1つまたは複数のアミノ酸置換(s)の抗体は、G24A、G24R、G24L、L25A、S26A、S27A、G27aA、S27bA、V27cA、S28A、T29A、S30A、Y31A、Y32AおよびP33Aの中から選択されている。

【請求項 9 4】

請求項80から93のいずれかの抗体は、前記CDRL2は、配列番号に記載されCDRL2の修正が含まれています：872ポジションS50の、T51で1つまたは複数のアミノ酸置換(秒)の中から選択すると、N52、T53、R54、S55およびS56の、Kabatの番号に基づいています。

【請求項 9 5】

請求項95、前記1つまたは複数のアミノ酸置換(s)の抗体は、S50A、S50F、S50G、S50C、

10

20

30

40

50

S50R、S50L、S50M、S50V、S50P、S50T、S50H、S50Q、S50N、S50K、S50Dの中から選択されている、S50E、S50W、T51A、T51F、T51L、T51I、T51M、T51V、T51S、T51P、T51Y、T51H、T51Q、T51N、T51K、T51Dは、T51Eは、T51Wは、T51Rは、R54Y、N52A、T53A、R54AをR54I、T51G、S55Y、S55H、S55Q、S55N、S55K、S55D、S55E、S55W、S55R、S55GとS56AをS55TをS55A、S55F、S55L、S55I、S55M、S55V、S55PをR54G、R54D。

【請求項 9 6】

請求項80から95のいずれかの抗体は、前記CDRL3は、配列番号に記載されCDRL3の修正が含まれています：882ポジションのV89、L90、Y91、M92、G93で1つまたは複数のアミノ酸置換（秒）の中から選択、S94、G95、I95aおよびS95b、Kabatの番号に基づいています。

10

【請求項 9 7】

主張96の抗体は、V89A、V89P、V89T、V89S、V89L、V89R、V89C、V89E、V89W、V89N、V89I、V89G、V89H、L90A、Y91A、M92A、M92E、M92S、M92G、M92L、M92P、M92V、M92D、M92R、M92N、M92T、M92F、G93A、S94A、S94W、S94G、S94P、S94R、S94L、S94M、S94E、S94V、G94A、I95aAとS95bAの中から選ばれた1つまたは複数のアミノ酸置換の中にある。

【請求項 9 8】

主張96または97の抗体は、前記アミノ酸置換M92R/S94MまたはV89L/S94Pの中にあります。

【請求項 9 9】

80から98のいずれの抗体もSEQ ID NO: 433の中にあるアミノ酸を構成するVHチェーンとSEQ ID NO: 537の中にあるアミノ酸を構成するVLチェーンの中にあります。

20

【請求項 1 0 0】

主張1から99のいずれの抗体も、単離された抗体です。

【請求項 1 0 1】

ポリペプチドは以下を含む：

配列番号のいずれかに掲げるアミノ酸の配列SEQ ID NOS: 830から836及び844から890、またはいかなるSEQ ID NOS:

831-836と844-890を含むアミノ酸の配列を作るために最低でも65%のポリペプチドを有している。それと共にポリペプチドはGYTFTSYVIN (SEQ ID NO:904)アミノ酸列を含まないプロビソを含む。または

SEQ ID NO:830の前に置かれたアミノ酸の配列と等しい少なくとも72%のポリペプチドにより構成されており：それによって；抗体または抗原結合フラグメントまたは抗体またはその断片を含むとき、ヒューマンDLL4に結び付けられます。

30

【請求項 1 0 2】

ポリヌクレオチドは主張1-100におけるあらゆる抗体のエンコーディングまたは主張101のポリペタイドをエンコーディングする。

【請求項 1 0 3】

ポリヌクレオチドは主張1から101のいずれの抗体の可変重鎖をエンコードする。

【請求項 1 0 4】

1~100のいずれの抗体の可変軽鎖をエンコードするポリヌクレオチドクレーム。

【請求項 1 0 5】

主張102のポリヌクレオチドを含むベクター。

40

【請求項 1 0 6】

主張103のポリヌクレオチドを含有するベクター。

【請求項 1 0 7】

主張104のポリヌクレオチドを含有するベクター。

【請求項 1 0 8】

主張105から107までの任意のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 1 0 9】

宿主細胞は原核生物または真核生物である、主張108の宿主細胞。

【請求項 1 1 0】

適当な宿主細胞内の主張105から107までの任意のベクトルを表現を含む抗体反DLL4を作成する。

50

方法。

【請求項 1 1 1】

適当な宿主細胞及び抗体の回復の中に主張106のベクトルと107のベクトルの表現を含む反DLL4抗体を作る方法。

【請求項 1 1 2】

どの主張1～100と抗血管新生阻害剤を含むあらゆる反DLL4抗体を含む組み合わせ。

【請求項 1 1 3】

主張112の組み合わせにおいて、前記抗血管新生阻害剤は、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)の拮抗物質である。

【請求項 1 1 4】

主張113の組み合わせは、前記VEGFの拮抗薬は抗VEGF抗体である。

【請求項 1 1 5】

主張114の組み合わせは、前記抗VEGF抗体はベバシズマブです。

【請求項 1 1 6】

いずれの抗DLL4抗体も、または主張101のポリペプチドまたは主張112から115までの任意の組み合わせを含む医薬組成物。

【請求項 1 1 7】

主張116の医薬組成物は、さらにキャリアを含んでいる。

【請求項 1 1 8】

ゲル、軟膏、クリーム、ペースト、座薬、フラッシュ、液体、懸濁液、エアロゾル、錠剤、丸剤または粉末として定式化する主張116または117の医薬組成物。

【請求項 1 1 9】

非経口、局所、経口、粘膜、鼻腔内、皮下、エアロゾル、静脈、気管支、肺、膣、外陰膣全身または食道投与用に製剤特許請求の116から118のいずれの主張も医薬組成物を含む。

【請求項 1 2 0】

主張116から119のいずれの医薬組成物も、単一の投薬管理のための定式化した。

【請求項 1 2 1】

徐放性製剤である主張116から120の全ての医薬組成物。

【請求項 1 2 2】

主張1から100のどの反DLL4抗体も、またDLL4のに関連付けられている治療するための特許請求の範囲である主張116から121の全ての医薬組成物も治療効果のある全て管理された方法。

【請求項 1 2 3】

主張122の治療の方法は、病気や障害腫瘍、癌や細胞増殖性疾患の中から選択されています。

【請求項 1 2 4】

主張122または123において、疾患または障害の治療方法は、アテローム性動脈硬化症、関節炎、眼血管、子宮内膜症、子宮筋腫、子白前症、がんの中から選択されています。

【請求項 1 2 5】

主張122または123の方法は、病気や障害、がん、がん、前立腺がん、肺がん、大腸がん、肺がん、乳がんの間でフォームを選択されています。

【請求項 1 2 6】

主張122から125のいずれかの方法でも、さらに抗血管新生阻害剤の有効量を投与することを含んでいます。

【請求項 1 2 7】

主張126記載の方法において、前記抗血管新生阻害剤は、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)の拮抗物質である。

【請求項 1 2 8】

主張127の方法は、前記VEGFの拮抗薬は、抗VEGF抗体である。

【請求項 1 2 9】

10

20

30

40

50

主張128の方法において、前記抗VEGF抗体はベバシズマブです。

【請求項 1 3 0】

主張122から129のいずれの方法でも、さらに化学療法剤の有効量を投与することを含んでいます。

【請求項 1 3 1】

病気や障害の発現および/またはDLL4の活動に関連付けられている治療のための薬剤の処方の主張1~100のいずれかの抗DLL4抗体の使用。

【請求項 1 3 2】

病気や障害の発現および/またはDLL4のアクティビティに関連付けられている治療に使用するための主張1~100のいずれの抗DLL4抗体も含む医薬組成物。

10

【請求項 1 3 3】

Notchシグナルを不活性化抗DLL4抗体を投与することを含む抑制ノッチの活性化の方法。

【請求項 1 3 4】

抑制ノッチの活性化に使用するための医薬の製剤中に抗DLL4抗体の使用。

【請求項 1 3 5】

抑制ノッチの活性化で使用するために抗DLL4抗体を含む医薬組成物。

発音を表示

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

20

【0 0 0 1】

血管供給の展開は、多くの生理学的過程及び病理学的過程の基本要件である。例えば、新しい血管の形成を促進する血管形成過程は、活発に成長する組織が適切な血液供給を受けることを保証する。しかしながら、血管形成もまた、様々な疾患の病因に関係している。内皮細胞の分化、増殖及び移動を含む血管発生過程は、厳密に調節されている。例として、Notchシグナリング経路のメンバーは、血管内皮での役割を含む、細胞運命の決定、細胞分化、増殖、生存及びアポトーシスといった調節過程で役割りを果たす。Notchリガンドのデルタ様4(DLL4)は、血管内皮において超選択的発現を示す。また、Notchシグナリングも、多種多様なヒト疾患に関与する。従って、Notchシグナリングを調節する治療として使用することができる薬剤を発展させる必要がある。

30

【先行技術】

【0 0 0 2】

2008年11月7日に出願された米国仮出願シリアル番号第61/198,764号、発明の名称「組合せ抗体ライブラリー及びその使用」、並びに2009年3月25日に出願された米国仮出願シリアル番号第61/211,204号、発明の名称「組合せ抗体ライブラリー及びその使用」に対し、優先権の利益を主張する。上記出願の主題は、可能であれば、参照によってそのまま援用される。

本出願はまた、米国仮出願番号第61/198,764号及び米国仮出願番号第61/211,204号に対する優先権を主張する、本明細書と同日に出願された国際PCT出願番号(代理人整理番号380016-00029/701PC)、発明の名称「組合せ抗体ライブラリー及びその使用」に関する。

40

本出願は、本明細書と同日に出願された米国仮出願番号(代理人整理番号3800016-00004/p702)、発明の名称「親和性成熟に基づく抗体の最適化の方法」にも関する。

上記に関する各出願の主題は、可能であれば、参照によってそのまま援用される。

【0 0 0 3】

電子的に提供される配列表の参照による援用

電子バージョンの配列表は、本明細書で提出されており、その内容は、参照によってそのまま援用される。電子ファイルのサイズは742キロバイトで、タイトルは703SEQ.PC1.txtである。

50

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本明細書では、抗DLL4抗体及びDLL4に関連した疾患又は障害における治療薬として抗DLL4抗体の使用法を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本明細書では、抗DLL4抗体又はヒトDLL4に特異的に結合するその抗原結合フラグメントを提供する。抗DLL4抗体は、CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2又はCDRL3の少なくとも1つの相補決定領域(CDR)を有する抗体を含む。例えば、抗体は、EEYSSSSAEYKQH (配列識別番号:851)、RGYSYGYDYFDY (配列識別番号:852)、EYYDFWSGYYTDYFDY (配列識別番号:853)、EGYSSSWYDYFDY (配列識別番号:854)、ANWGDYFDY (配列識別番号:855)、DDYGGNSDYZFDY (配列識別番号:856)、EGYCSGGSCYS (配列識別番号:857)、EYYYGSGSYYNDYFDY (配列識別番号:858)、GCYCSSTSCYADYYYYYGMVD (配列識別番号:859)、GSCYSYWYFDL (配列識別番号:860)として示すアミノ酸配列、又は配列識別番号:851-860のいずれかで示すアミノ酸配列に対して少なくとも65%の配列同一性を示すアミノ酸配列を有する重鎖CDR3 (CDRH3)を含有し得る。抗体は、IINPSGGSTSYAQKFQG (配列識別番号:844)、IYPGDSTRYSPSFQG (配列識別番号:845)、RTYYRSKWYNDYAVSVKS (配列識別番号:846)、EINHSGSTNYNPSLKS (配列識別番号:847)、INSNAGNGNTKYSQEFQG (配列識別番号:848)、WMNPNSGNTGYAQKFQG (配列識別番号:849)、YIYYSGSTYYNPSLKS (配列識別番号:850)として示すアミノ酸配列、又は配列識別番号:844-850のいずれかを示すアミノ酸配列に対して少なくとも65%の配列同一性を示すアミノ酸配列を有する重鎖CDR2 (CDRH2)を含有し得る。抗体は、GYTFTSYMH (配列識別番号:830)、GYSFTSYWIG (配列識別番号:831)、GDSVSSNSAA (配列識別番号:832)、GGSFSGYYWS (配列識別番号:833)、GYTFTSYAMH (配列識別番号:834)、GYTFTSYAIN (配列識別番号:835)、GGSISGGYY (配列識別番号:836)として示すアミノ酸配列、又はアミノ酸配列がGYTFTSYVIN (配列識別番号:904)でない条件で、配列識別番号 S: 831-836のいずれかで示すアミノ酸配列に対して少なくとも65%の配列同一性を示すアミノ酸配列、及び配列識別番号:830で示すアミノ酸配列に対して少なくとも72%の配列同一性を示すアミノ酸配列を有する重鎖CDR1 (CDRH1)を含有し得る。抗体は、QQRSNWPPWT (配列識別番号:881)、VLYMGSGISYV (配列識別番号:882)、MIWHSSASFV (配列識別番号:883)、QQYNNWPPWT (配列識別番号:884)、QANSFPPWT (配列識別番号:885)、QQYGSSPPWT (配列識別番号:886)、QQYNSYSPWT (配列識別番号:887)、MQR1EFPSWT (配列識別番号:888)、SSYTSSSTLFV (配列識別番号:889)及びQVYESSANFV (配列識別番号:890)として示すアミノ酸配列、並びに配列識別番号:881-890のいずれかで示すアミノ酸配列に対して少なくとも65%の配列同一性を示すアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3 (CDRL3)を含有し得る。抗体は、DASN RAT (配列識別番号:871)、STNTRSS (配列識別番号:872)、YYSDSSK (配列識別番号:873)、GASTRAT (配列識別番号:874)、AASSLQS (配列識別番号:875)、GASSRAT (配列識別番号:876)、DASSLGS (配列識別番号:877)、TLSYRAS (配列識別番号:878)、EVSNRPS (SEQ IDNO:879)、HYSDSDK (配列識別番号:880)として示すアミノ酸配列、又は配列識別番号 S: 871-880のいずれかで示すアミノ酸配列に対して少なくとも65%の配列同一性を示すアミノ酸配列を持つCDRL2から選択される軽鎖CDR2 (CDRL2)を含有し得る。抗体は、RASQSVSSYLA (配列識別番号:861)、GLSSGSVSTSYYPS (配列識別番号:862)、TLRSG1NLGSYRIF (配列識別番号:863)、RASQSVSSNLA (配列識別番号:864)、RASQGISSWLA (配列識別番号:865)、RASQVSSSYLA (配列識別番号:866)、RASQSISSWLA (配列識別番号:867)、RSSQSLLDSDDGNTYLD (配列識別番号:868)、TGTSSDVG GTNYVS (配列識別番号:869)、TLSSDLSVGGKNMF (配列識別番号:870)として示すアミノ酸配列、又は配列識別番号:861-870のいずれかで示すアミノ酸配列に対して少なくとも65%の配列同一性を示すアミノ酸配列を持つ軽鎖CDR1 (CDRL1)を含有し得る。本明細書で提供される抗体は、CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2又はCDRL3である2、3、4、5又は6個の異

10

20

30

40

50

なるCDRを含み得る。

【0006】

本明細書で提供される抗体は、完全長抗体又は抗体フラグメントであるものを含む。例えば、抗体フラグメントは、Fab、Fab'、F(ab')₂、単鎖Fvs (scFv)、Fv、dsFv、diabody、Fd 及び Fd' フラグメント、Fabフラグメント、Fdフラグメント、scFvフラグメント、又はscFabフラグメントであり得る。一般的に、抗体は、Fab又は完全長IgGである。

【0007】

本明細書で提供される抗体は、配列識別番号:830-836及び844-890のいずれかで示すCDRが、アミノ酸置換、添加又は欠失によって修飾される抗体を含む。本明細書で提供される抗体のいずれかにおいて、CDR(CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2又はCDRL3など)は、配列識別番号:830-836及び844-890のいずれかで示すアミノ酸配列に対して70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の配列同一性を示す。

10

【0008】

一例を挙げると、本明細書で提供される抗DLL4は、カバット番号付けに基づいて、T28、F29、T30、S31及びY33の位置において1つ又はそれ以上のアミノ酸置換を有する配列識別番号:830で示すCDRH1の修飾を含む。例えば、抗体は、T28A、F29A、T30A、S31A及び/又はY33Aである1つ又はそれ以上のアミノ酸置換を有することができる。

【0009】

その他の例を挙げると、本明細書で提供される抗DLL4は、カバット番号付けに基づいて、S28、F29、T30、W33、I34及びG35の位置において1つ又はそれ以上のアミノ酸置換を有する配列識別番号:831で示すCDRH1の修飾を含む。例えば、抗体は、S28A、S28R、S28K、S28N、F29A、T30A、W33A、I34A、G35T、G35A及び/又はG35Vである1つ又はそれ以上のアミノ酸置換を有することができる。

20

【0010】

追加の例において、本明細書で提供される抗DLL4抗体は、カバット番号付けに基づいて、I50、I51、N52、P52a、S53、G54、G55、G56、T57及びS58の位置において1つ又はそれ以上のアミノ酸置換を有する配列識別番号: 844で示すCDRH2の修飾を含む。例えば、1つ又はそれ以上のアミノ酸置換は、I50A、I50T、I51A、I51T、I51V、I51N、I51R、I51W、I51S、I51G、I51V、I51E、I51H、I51Y、N52A、N52V、N52G、N52T、N52P、N52L、N52W、N52Y、N52V、N52S、N52Q、N52K、P52aA、P52aM、P52aE、P52aH、P52aY、P52aT、P52aN、P52aR、P52aW、P52aS、P52aG、S53A、S53I、S53E、S53R、S53G、S53T、S53L、S53V、S53N、S53P、G54A、G54W、G54D、G55A、G55V、G55E、G55S、G55K、G55T、G55L、G55R、G55H、G55I、G55W、S58A、T57A及び/又はS58Aであり得る。とりわけ、本明細書で提供される抗体は、I51V/N52L/S53T/G55H、N52L/S53T/G55H、I51E/N52L/S53T/G55H又はI51N/N52L/S53T/G55Hのアミノ酸置換を含む。

30

【0011】

更なる例において、本明細書で提供される抗DLL4抗体は、カバット番号付けに基づいて、I50、I51、Y52、P52a、D54、S55、D56及び/又はT57の位置において1つ又はそれ以上のアミノ酸置換を有する配列識別番号:845で示すCDRH2の修飾を含む。1つ又はそれ以上のアミノ酸置換は、I50A、I51A、Y52A、P52aA、D54A、S55G、D56A、T57D及び/又はT57Aであり得る。

40

別の例において、本明細書で提供される抗DLL4抗体は、カバット番号付けに基づいて、E96、Y97、S98、S99、S100、S100a、A100b、E100c、Q101及び/又はH102の位置において1つ又はそれ以上のアミノ酸置換を有する配列識別番号:851で示すCDRH3の修飾を含む。1つ又はそれ以上のアミノ酸置換は、E96A、Y97A、S98A、S98Q、S98V、S98I、S98G、S99P、S99A、S99L、S99W、S99F、S99N、S99H、S99C、S99G、S100F、S100A、S100G、S100C、S100H、S100L、S100R、S100aA、A100bE、E100cA、Q101A、H102A、H102S、H102F及び/又はH102Yであり得る。とりわけ、アミノ酸置換は、S98A/S99P/S100F、S98A/S99P/S100F/H102F又はS98A/S99P/S100F/H102Yである。

50

【 0 0 1 2 】

本明細書で提供される抗DLL4抗体の例において、前記抗体は、カバット番号付けに基づいて、抗体は、R95、G96、Y97、S98、Y99、G100、Y100a、D100b及び／又はD101の位置において1つ又はそれ以上のアミノ酸置換を有する配列識別番号：852で示すCDRH3の修飾を含む。1つ又はそれ以上のアミノ酸置換は、R95A、G96K、G96R、G96L、G96D、G96T、Y97A、Y97H、S98A、Y99A、G100A、G100D、G100L、G100P、G100R、G100M、G100K、G100S、G100R、G100T、Y100aA、D100bA及び／又はD101Aから選択される。とりわけ、アミノ酸置換は、G96K/G100Tである。

【 0 0 1 3 】

その他の例において、抗体は、カバット番号付けに基づいて、R24、Q27、S28、S30、S31及び／又はY32の位置において1つ又はそれ以上のアミノ酸置換を有する配列識別番号：861で示すCDRL1の修飾を含む。1つ又はそれ以上のアミノ酸置換は、R24G、Q27L、S28P、S28G、S28K、S28V、S28F、S28P、S28T、S28L、S28Q、S28A、S28N、S28H、S28I、S28R、S28W、S28M、S28E、S30N、S30W、S30R、S30L、S30C、S30D、S30L、S30T、S30P、S30Y、S30Q、S30A、S30G、S30V、S31K、S31T、S31N、S31K、S31L、S31M、S31F、S31I、S31V、S31H、S31A、S31P、S31D、S31R、S31Y、S31Q、S31E、S31G、Y32V及び／又はY32Sから選択される。とりわけ、抗体は、S28N/S30D/S31Hであるアミノ酸置換を有する。

追加例において、本明細書で提供される抗DLL4抗体は、カバット番号付けに基づいて、G24、L25、S26、S27、G27a、S27b、V27c、S28、T29、S30、Y31、Y32、P33の位置において1つ又はそれ以上のアミノ酸置換を有する配列識別番号：862で示すCDRL1の修飾を含む。1つ又はそれ以上のアミノ酸置換は、G24A、G24R、G24L、L25A、S26A、S27A、G27aA、S27bA、V27cA、S28A、T29A、S30A、Y31A、Y32A及び／又はP33Aの中から選択される。

【 0 0 1 4 】

更なる例において、本明細書で提供される抗DLL4抗体は、カバット番号付けに基づいて、D50、A51、S52、N53、R54、A55及び／又はT56の位置において1つ又はそれ以上のアミノ酸置換を有する配列識別番号：871で示すCDRL2の修飾を含む。1つ又はそれ以上のアミノ酸置換は、D50A、A51T、S52A、S52L、S52T、S52R、S52S、S52W、S52N、S52P、S52M、N53A、N53E、N53G、N53M、N53C、N53H、N53P、R54A、A55T、A55R、A55C、A55S、A55G及びT56Aから選択される。とりわけ、アミノ酸置換は、S52L/A55S又はS52L/A55Gである。

【 0 0 1 5 】

本明細書で提供される抗DLL4抗体の例において、抗体は、カバット番号付けに基づいて、S50、T51、N52、T53、R54、S55及び／又はS56の位置において1つ又はそれ以上のアミノ酸置換を有する配列識別番号：872で示すCDRL2の修飾を含む。1つ又はそれ以上のアミノ酸置換は、S50A、S50F、S50G、S50C、S50R、S50L、S50M、S50V、S50P、S50T、S50H、S50Q、S50N、S50K、S50D、S50E、S50W、T51A、T51F、T51L、T51I、T51M、T51V、T51S、T51P、T51Y、T51H、T51Q、T51N、T51K、T51D、T51E、T51W、T51R、T51G、N52A、T53A、R54A、R54I、R54Y、R54D、R54G、S55A、S55F、S55L、S55I、S55M、S55V、S55P、S55T、S55Y、S55H、S55Q、S55N、S55K、S55D、S55E、S55W、S55R、S55G及び／又はS56Aから選択される。

追加例において、本明細書で提供される抗DLL4抗体は、カバット番号付けに基づいて、R91、S92、N93及び／又はW94の位置において1つ又はそれ以上のアミノ酸置換を有する配列識別番号：881で示すCDRL3の修飾を含む。1つ又はそれ以上のアミノ酸置換は、R91P、R91L、R91G、S92P、S92A、S92Q、S92V、S92T、S92R、S92G、S92V、S92M、S92N、S92C、N93Y、N93S、N93H、N93Q、W94R、W94S、W94T、W94L、W94P及びW94Mから選択される。

【 0 0 1 6 】

更なる例において、本明細書で提供される抗DLL4抗体は、カバット番号付けに基づいて、V89、L90、Y91、M92、G93、S94、G95、I95a 及び／又はS95bの位置において1つ又はそれ以上のアミノ酸置換を有する配列識別番号：882で示すCDRL3の修飾を含む。1つ又はそれ以上のアミノ酸置換は、V89A、V89P、V89T、V89S、V89L、V89R、V89C、V89E、V89W、V89N、

10

20

30

40

50

V89I、V89G、V89H、L90A、Y91A、M92A、M92E、M92S、M92G、M92L、M92P、M92V、M92D、M92R、M92N、M92T、M92F、G93A、S94A、S94W、S94G、S94P、S94R、S94L、S94M、S94E、S94V、G94A、I95aA及び／又はS95bAから選択される。とりわけ、アミノ酸置換は、M92R/S94M又はV89L/S94Pである。

【0017】

本明細書で提供される上記抗体のいずれかにおいて、抗体は、CDRH3、CDRH2、CDRH1、CDRL3、CDRL2及びCDRL1の何れかの中から選択される少なくとも2つのCDRを含み得る。例えば、抗体は、提供されたCDRH3、CDRH2、CDRH1のいずれかの少なくとも1つのCDRを含む様々な重鎖、及び提供されたCDRL3、CDRL2及びCDRL1のいずれかの少なくとも1つのCDRを含む様々な軽鎖を含み得る。その他の例において、本明細書で提供される抗体は、提供されたCDRH3、CDRH2、CDRH1のいずれかである少なくとも2つのCDRを含む様々な重鎖、及びCDRL3、CDRL2及びCDRL1である少なくとも1つのCDRを含む様々な軽鎖を含有し得る。更なる例において、本明細書で提供される抗DLL4抗体は、提供のCDRH3、CDRH2、CDRH1のいずれかの少なくとも2つのCDRを含む様々な重鎖を含有し、並びに提供されるCDRL3、CDRL2及びCDRL1のいずれかの少なくとも2つのCDRを含む様々な軽鎖を含有する。

10

【0018】

本明細書で提供される抗DLL4抗体において、アミノ酸置換G55Hを含む配列識別番号：844で示すCDRH2、及びアミノ酸置換S98A/S99P/S100F/H102Fを含む配列識別番号：851で示すCDRH3を含有する抗体である。別の例において、本明細書で提供される抗DLL4抗体は、アミノ酸置換S98A/S99P/S100F/H102Fを含む配列識別番号：851で示すCDRH3、及びアミノ酸置換S28N/S30D/S31Hを含む配列識別番号：861で示すCDRL1を含有する。更なる例において、本明細書で提供される抗DLL4抗体は、アミノ酸置換I51V/N52L/S53T/G55Hを含む配列識別番号：844で示すCDRH2、アミノ酸置換S98A/S99P/S100F/H102Fを含む配列識別番号：851で示すCDRH3、及びアミノ酸置換S28N/S30D/S31Hを含む配列識別番号：861で示すCDRL1を含有する。追加の例において、本明細書で提供される抗DLL4抗体は、アミノ酸置換I51V/N52L/S53T/G55Hを含む配列識別番号：844で示すCDRH2、アミノ酸置換S98A/S99P/S100F/H102Fを含む配列識別番号：851で示すCDRH3、アミノ酸置換S28N/S30D/S31Hを含む配列識別番号：861で示すCDRL1、及びアミノ酸置換S52L/A55Sを含む配列識別番号：871で示すCDRL2を含有する。

20

【0019】

本明細書で提供される抗DLL4抗体において、アミノ酸置換S28R/G35Vを含む配列識別番号：831で示すCDRH1、アミノ酸置換G96K/G100Tを含む配列識別番号：852で示すCDRH3、及びアミノ酸置換M92R/S94Mを含む配列識別番号：882で示すCDRL3を含む抗体を更に含有する。その他の例において、本明細書で提供される抗DLL4抗体は、アミノ酸置換S28R/G35Vを含む配列識別番号：831で示すCDRH1、アミノ酸置換G96K/G100Tを含む配列識別番号：852で示すCDRH3、及びアミノ酸置換V89L/S94Pを含む配列識別番号：882で示すCDRL3を含有する。追加の例において、本明細書で提供される抗DLL4抗体は、アミノ酸置換S28R/G35Vを含む配列識別番号：831で示すCDRH1、アミノ酸置換G96K/G100Tを含む配列識別番号：852で示すCDRH3、アミノ酸置換S50Gを含む配列識別番号：872で示すCDRL2、及びアミノ酸置換V89L/S94Pを含む配列識別番号：882で示すCDRL3を含有する。

30

【0020】

本明細書で提供される上記の抗DLL4抗体のいずれかにおいて、抗体は、そのフレームワーク領域において1つ又はそれ以上のアミノ酸置換を更に含有し得る。例えば、抗体は、そのフレームワーク領域において1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個又はそれ以上のアミノ酸置換を有し得る。一例を挙げると、本明細で提供される抗DLL4抗体の様々な軽鎖は、1つ又はそれ以上のアミノ酸置換を含み、カバット番号付けに基づいて、アミノ酸置換は62又は76の位置である。

40

アミノ酸置換は、F62L、S76E、S76Q、S76P、S76L、S76T、S76G、S76A、S76Y、S76N、T76S、T76E、T76Y及び／又はT76Mのアミノ酸置換であり得る。他の例において、本明細書で提

50

供される抗DLL4抗体の様々な重鎖は、カバット番号付けに基づいて、アミノ酸の位置24及び／又は82aにおいて1つ又はそれ以上のアミノ酸置換を含む。例えば、アミノ酸置換は、G24T、G24L、G24A及び／又はS82aTであり得る。

【0021】

本明細書で提供される抗DLL4抗体は、表面プラズモン共鳴(SPR)によって測定されるとおり、少なくとも 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M又は 10^{-12} M或いは更に低い結合親和性を示す。

本明細書で提供される抗DLL4抗体は、生殖細胞系列由来又はその修飾形態の抗体を含む。例えば、本明細書で提供される抗体は、 V_H 、 D_H 及び J_H 生殖細胞系セグメント、若しくは V_H 生殖細胞系セグメントが、IGHV1、IGHV4、IGHV5又はIGHV6或いはその遺伝子及び対立遺伝子で、 D_H 生殖細胞系セグメントがIGHD6、IGHD5、IGHD4、IGHD2、IGHD3又はIGHD7或いはその遺伝子及び対立遺伝子、並びに J_H 生殖細胞系セグメントがIGHJ1、IGHJ2、IGHJ4又はIGHJ6或いはその遺伝子及び対立遺伝子である修飾されたその生殖細胞系セグメントから蓄積されるヌクレオチド配列によってコードされるVH鎖を含む。また、本明細書で提供される抗体も、抗体がDLL4を結合及び／又はDLL4の活性を調節する場合において、 V_k 生殖細胞系セグメントがIGKV1、IGKV2又はIGKV3で、 J がIGKJ1又はその遺伝子及び対立遺伝子で、或いは V_l が生殖細胞系セグメントがIGLV2、IGLV8、IGLV11又はIGLV5であり、 J_l 生殖細胞系セグメントがIGLJ1又はIGLJ4若しくはその遺伝子及び対立遺伝子である V_k 及び J_k 又は V_l 及び J_l 生殖細胞系セグメントから蓄積されたヌクレオチド配列によってコードされたVL鎖を有するものを含む。

10

20

30

40

50

【0022】

例えば、本明細書で提供される抗DLL4抗体は、IGHV1-3*01、IGHV1-3*02、IGHV1-8*01、IGHV1-46*01、IGHV1-46*02、IGHV1-46*03、IGHV4-31*01、IGHV4-31*02、IGHV4-31*03、IGHV4-31*04、IGHV4-31*05、IGHV4-31*06、IGHV4-31*07、IGHV4-31*08、IGHV4-31*09、IGHV4-31*10、IGHV4-34*01、IGHV4-34*02、IGHV4-34*03、IGHV4-34*04、IGHV4-34*05、IGHV4-34*06、IGHV4-34*07、IGHV4-34*08、IGHV4-34*09、IGHV4-34*10、IGHV4-34*11、IGHV4-34*12、IGHV4-34*13、IGHV5-51*01、IGHV5-51*02、IGHV5-51*03、IGHV5-51*04、IGHV5-51*05、IGHV6-1*01、IGHV6-1*02である V_H 生殖細胞系セグメント或いはその修飾された生殖細胞系セグメント、IGHD2-2*01、IGHD2-2*02、IGHD2-15*01、IGHD4-23*01、IGHD6-6*01、IGHD6-13*01、IGHD5-18*01、IGHD3-3*01、IGHD3-3*02、IGHD3-10*01、IGHD3-10*02又はIGHD7-27*01である D_H 生殖細胞系セグメント或いはその修飾された生殖細胞系セグメント、IGHJ1*01、IGHJ2*01、IGHJ4*01、IGHJ4*02、IGHJ4*03、IGHJ6*01、IGHJ6*02、IGHJ6*03、IGHJ6*04である J_H 生殖細胞系セグメント或いはその修飾された生殖細胞系セグメント、IGKV1-5*01、IGKV1-5*02、IGKV1-5*03、IGKV1-12*01、IGKV1-12*02、IGKV2-D-40*01、IGKV3-11*01、IGKV3-11*02、IGKV3-15*01、IGKV3-20*01又はIGKV3-20*02である V 生殖細胞系セグメント或いはその修飾された生殖細胞系セグメント、IGKJ1*01である J 生殖細胞系セグメント、或いはその修飾された生殖細胞系セグメント、IGLV2-14*01、IGLV2-14*02、IGLV2-14*03、IGLV2-14*04、IGLV8-61*01、IGLV8-61*02、IGLV8-61*03、IGLV5-48*01又はIGLV11-55*01である V 生殖細胞系セグメント或いはその修飾された生殖細胞系セグメント、及び／或いはIGLJ1*01又はIGLJ4*01である J 生殖細胞系セグメント或いはその修飾された生殖細胞系セグメントを有するものを含む。

【0023】

本明細書で提供される抗DLL4抗体は、a)IGHV1-46*01、IGHD6-6*01及びIGHJ1*01生殖細胞系セグメント或いはその修飾形態から蓄積されたヌクレオチド配列によってコードされたVH鎖、並びにIGKV3-11*01及びIGKJ1*01生殖細胞系セグメント或いはその修飾形態から蓄積されたヌクレオチド配列によってコードされたVL鎖、b)IGHV5-51*03、IGHD5-18*01及びIGHJ4*01生殖細胞系セグメント或いはその修飾形態から蓄積されたヌクレオチド配列によってコードされたVH、並びにIGLV8-61*01及びIGLJ1*01生殖細胞系セグメント或いはその修飾形態から蓄積されたヌクレオチド配列によってコードされたVL鎖、c)IGHV6-1*01、IG

HD3-3*01及びIGHJ4*01生殖細胞系セグメント或いはその修飾形態から蓄積されたヌクレオチド配列によってコードされたVH鎖、並びにIGLV5-48*01及びIGLJ4*01生殖細胞系セグメント或いはその修飾形態から蓄積されたヌクレオチド配列によってコードされたVL鎖、d)

IGHV1-46*01、IGHD6-13*01及びIGHJ4*01生殖細胞系セグメント或いはその修飾形態から蓄積されたヌクレオチド配列によってコードされたVH鎖、並びにIGKV3-15*01及びIGKJ1*01生殖細胞系セグメント或いはその修飾形態から蓄積されたヌクレオチド配列によってコードされたVL鎖、e) IGHV4-34*01、IGHD7-27*01及びIGHJ4*01生殖細胞系セグメント或いはその修飾形態から蓄積されたヌクレオチド配列によってコードされたVH鎖、並びにIGKV1-12*01及びIGKJ1*01生殖細胞系セグメント或いはその修飾形態から蓄積されたヌクレオチド配列によってコードされたVL鎖、f) IGHV1-46*01、IGHD6-13*01及びIGHJ4*01生殖細胞系セグメント或いはその修飾形態から蓄積されたヌクレオチド配列によってコードされたVH鎖、並びにIGKV3-20*01及びIGKJ1*01生殖細胞系セグメント或いはその修飾形態から蓄積されたヌクレオチド配列によってコードされたVL鎖、g) IGHV1-3*02、IGHD4-23*01及びIGHJ4*01生殖細胞系セグメント或いはその修飾形態から蓄積されたヌクレオチド配列によってコードされたVH鎖、並びにIGKV1-5*01及びIGKJ1*01生殖細胞系セグメント或いはその修飾形態から蓄積されたヌクレオチド配列によってコードされたVL鎖、h) IGHV1-46*01、IGHD2-15*01及びIGHJ2*01生殖細胞系セグメント或いはその修飾形態から蓄積されたヌクレオチド配列によってコードされたVH鎖、並びにIGKV1-5*01及びIGKJ1*01生殖細胞系セグメント或いはその修飾形態から蓄積されたヌクレオチド配列によってコードされたVL鎖、i)

IGHV1-46*01、IGHD3-10*01及びIGHJ4*01生殖細胞系セグメント或いはその修飾形態から蓄積されたヌクレオチド配列によってコードされたVH鎖、並びにIGKV1-5*01及びIGKJ1*01生殖細胞系セグメント或いはその修飾形態から蓄積されたヌクレオチド配列によってコードされたVL鎖、j) IGHV1-8*01、IGHD2-2*01及びIGHJ6*01生殖細胞系セグメント或いはその修飾形態から蓄積されたヌクレオチド配列によってコードされたVH鎖、並びにIGKV1-5*01及びIGKJ1*01生殖細胞系セグメント或いはその修飾形態から蓄積されたヌクレオチド配列によってコードされたVL鎖、k) IGHV1-46*01、IGHD6-13*01及びIGHJ4*01生殖細胞系セグメント或いはその修飾形態から蓄積されたヌクレオチド配列によってコードされたVH鎖、並びにIGKV2D-40*01及びIGKJ1*01生殖細胞系セグメント或いはその修飾形態から蓄積されたヌクレオチド配列によってコードされたVL鎖、l) IGHV4-34*01、IGHD7-27*01及びIGHJ4*01生殖細胞系セグメント或いはその修飾形態から蓄積されたヌクレオチド配列によってコードされたVH鎖、並びにIGLV2-14*01及びIGLJ4*01生殖細胞系セグメント或いはその修飾形態から蓄積されたヌクレオチド配列によってコードされたVL鎖、m) IGHV4-31*02、IGHD2-15*01及びIGHJ2*01生殖細胞系セグメント或いはその修飾形態から蓄積されたヌクレオチド配列によってコードされたVH鎖、並びにIGLV2-14*01及びIGLJ4*01生殖細胞系セグメント或いはその修飾形態から蓄積されたヌクレオチド配列によってコードされたVL鎖、並びにn) IGHV4-34*01、IGHD7-27*01及びIGHJ4*01生殖細胞系セグメント或いはその修飾形態から蓄積されたヌクレオチド配列によってコードされたVH鎖、並びにIGLV11-55*01及びIGLJ4*01生殖細胞系セグメント或いはその修飾形態から蓄積されたヌクレオチド配列によってコードされたVL鎖を含有する抗体又はその一部を含む。

【 0 0 2 4 】

例えば、本明細書で提供される例示的な抗DLL4抗体は、a) 配列識別番号:131で示すアミノ酸配列から成るVH鎖及び配列識別番号:141で示すアミノ酸配列から成るVL鎖、b) 配列識別番号:132で示すアミノ酸配列から成るVH鎖及び配列識別番号:142で示すアミノ酸配列から成るVL鎖、c) 配列識別番号:133で示すアミノ酸配列から成るVH鎖及び配列識別番号:143で示すアミノ酸配列から成るVL鎖、d) 配列識別番号:135で示すアミノ酸配列から成るVH鎖及び配列識別番号:145で示すアミノ酸配列から成るVL鎖、e) 配列識別番号:137で示すアミノ酸配列から成るVH鎖及び配列識別番号:146で示すアミノ酸配列から成るVL鎖、f) 配列識別番号:135で示すアミノ酸配列から成るVH鎖及び配列識別番号:144で示すアミノ酸配列から成るVL鎖、g) 配列識別番号:138で示すアミノ酸配列から成るVH鎖及び配列識別番号:147で示すアミノ酸配列から成るVL鎖、h) 配列識別番号:136で示すアミノ酸配列か

10

20

30

40

50

ら成るVH鎖及び配列識別番号:147で示すアミノ酸配列から成るVL鎖、i)配列識別番号:134で示すアミノ酸配列から成るVH鎖及び配列識別番号:147で示すアミノ酸配列から成るVL鎖、j)配列識別番号:139で示すアミノ酸配列から成るVH鎖及び配列識別番号:147で示すアミノ酸配列から成るVL鎖、k)配列識別番号:135で示すアミノ酸配列から成るVH鎖及び配列識別番号:148で示すアミノ酸配列から成るVL鎖、l)配列識別番号:137で示すアミノ酸配列から成るVH鎖及び配列識別番号:149で示すアミノ酸配列から成るVL鎖、m)配列識別番号:140で示すアミノ酸配列から成るVH鎖及び配列識別番号:149で示すアミノ酸配列から成るVL鎖、或いはn)配列識別番号:

137で示すアミノ酸配列から成るVH鎖及び配列識別番号:150で示すアミノ酸配列から成るVL鎖を含む抗体である。

10

【0025】

とりわけ、本明細書で提供される抗DLL4抗体は、a)配列識別番号:

155で示すアミノ酸配列から成るVH鎖及び配列識別番号:141で示すアミノ酸配列から成るVL鎖、b)配列識別番号:156で示すアミノ酸配列から成るVH鎖及び配列識別番号:141で示すアミノ酸配列から成るVL鎖、又はc)配列識別番号:385で示すアミノ酸配列から成るVH鎖及び配列識別番号:142で示すアミノ酸配列から成るVL鎖を含む。

【0026】

一例を挙げると、本明細書で提供される抗DLL4抗体は、表面プラズモン共鳴(SPR)によって測定されるとおり、少なくとも 10^{-9} M又は更に低い結合親和性を有する。このような抗体は、a)配列識別番号:384で示すアミノ酸配列から成るVH鎖及び配列識別番号:142で示すアミノ酸配列から成るVL鎖、b)配列識別番号:414で示すアミノ酸配列から成るVH鎖及び配列識別番号:142で示すアミノ酸配列から成るVL鎖、c)配列識別番号:433で示すアミノ酸配列から成るVH鎖及び配列識別番号:142で示すアミノ酸配列から成るVL鎖、d)配列識別番号:433で示すアミノ酸配列から成るVH鎖及び配列識別番号:479で示すアミノ酸配列から成るVL鎖、e)配列識別番号:433で示すアミノ酸配列から成るVH鎖及び配列識別番号:537で示すアミノ酸配列から成るVL鎖、f)配列識別番号:433で示すアミノ酸配列から成るVH鎖及び配列識別番号:536で示すアミノ酸配列から成るVL鎖、g)配列識別番号:131で示すアミノ酸配列から成るVH鎖及び配列識別番号:141で示すアミノ酸配列から成るVL鎖、h)配列識別番号:151で示すアミノ酸配列から成るVH鎖及び配列識別番号:141で示すアミノ酸配列から成るVL鎖、i)配列識別番号:155で示すアミノ酸配列から成るVH鎖及び配列識別番号:141で示すアミノ酸配列から成るVL鎖、j)配列識別番号:156で示すアミノ酸配列から成るVH鎖及び配列識別番号:141で示すアミノ酸配列から成るVL鎖、k)配列識別番号:157で示すアミノ酸配列から成るVH鎖及び配列識別番号:141で示すアミノ酸配列から成るVL鎖、l)配列識別番号:155で示すアミノ酸配列から成るVH鎖及び配列識別番号:266で示すアミノ酸配列から成るVL鎖、m)配列識別番号:219で示すアミノ酸配列から成るVH鎖及び配列識別番号:141で示すアミノ酸配列から成るVL鎖、n)配列識別番号:156で示すアミノ酸配列から成るVH鎖及び配列識別番号:343で示すアミノ酸配列から成るVL鎖、o)配列識別番号:239で示すアミノ酸配列から成るVH鎖及び配列識別番号:343で示すアミノ酸配列から成るVL鎖、p)配列識別番号:239で示すアミノ酸配列から成るVH鎖及び配列識別番号:370で示すアミノ酸配列から成るVL鎖、或いはq)配列識別番号:

134で示すアミノ酸配列から成るVH鎖及び配列識別番号:147で示すアミノ酸配列から成るVL鎖を含有する抗体を含む。

20

【0027】

とりわけ、本明細書で提供される抗DLL4抗体において、配列識別番号:433で示すアミノ酸配列から成るVH鎖及び配列識別番号:537で示すアミノ酸配列から成るVL鎖を含有する抗体を含む。その他の例において、本明細書で提供されるDLL4抗体は、配列識別番号:433で示すアミノ酸配列から成るVH鎖及び配列識別番号:536で示すアミノ酸配列から成るVL鎖を含む。更なる例において、本明細書で提供される抗DLL4抗体は、配列識別番号:239で示すアミノ酸配列から成るVH鎖及び配列識別番号:343で示すアミノ酸配列から成るVL鎖を含む。追加の例において、本明細書で提供される抗DLL4抗体は、配列識別番号:239で示すア

30

40

50

アミノ酸配列から成るVH鎖及び配列識別番号:370で示すアミノ酸配列から成るVL鎖を含む。

【0028】

本明細書で提供される抗DLL4抗体において、組み換え型ヒトDLL4に対する親和性を示すものである。いくつかの例において、抗体は、細胞の表面で発現するヒトDLL4に対する親和性を示す。例えば、抗DLL4抗体は、内皮細胞で発現するDLL4に結合できる。

また、本明細書で提供される抗DLL4抗体においては、DLL4の活性を調節するものも含む。例えば、本明細書で提供される抗DLL4抗体は、Notch活性を阻害することができる。抗DLL4抗体は、アゴニストのもの及びアンタゴニスト抗体のものを含む。

【0029】

本明細書で提供される抗DLL4抗体において、DLL4のEGF2ドメインにおけるエピトープに特異的に結合するものを更に含む。他の例において、本明細書で提供されるDLL4のEGF2からEGF4度メイン内のエピトープに特異的に結合する。更なる例において、本明細書で提供される抗DLL4抗体は、DLL4のEGF3からEGF4ドメイン内のエピトープに特異的に結合するものである。

【0030】

本明細書では、上記の抗体のいずれかと同じエピトープに特異的に結合する抗DLL4抗体が提供される。

【0031】

本明細書では、配列識別番号:114で示すヒトDLL4のアミノ酸283から360内におけるヒトDLL4エピトープに特異的に結合する抗DLL4抗体が提供される。このような抗DLL4は、GYSFTSYWIG (配列識別番号:831)で、又は配列識別番号:831に対して少なくとも65%の配列同一性を有するCDRH1、IIYPGDSSTRYSPSFQG (配列識別番号:845)で、又は配列識別番号:845に対して少なくとも65%の配列同一性を有するCDRH2、RGYSYGYDYFDY(配列識別番号:852)で、又は配列識別番号:852に対して少なくとも65%の配列同一性を有するCDRH3、GLSSGSVSTSYYPS(配列識別番号:862)で、又は配列識別番号:862に対して少なくとも65%の配列同一性を有するCDRL1、STNTRSS (配列識別番号:872)で、又は配列識別番号:872に対して少なくとも65%の配列同一性を有するCDRL2、及びVLYMGSGISYV (配列識別番号:882)で、又は配列識別番号:882に対して少なくとも65%の配列同一性を有するCDRL3を含有する抗体を含む。

【0032】

一例を挙げると、このような抗体は、完全長抗体又は抗体フラグメントであり得る。例えば、抗体フラグメントは、Fab、Fab'、F(ab')₂、単鎖Fvs (scFv)、Fv、dsFv、diabody、Fd及びFd'フラグメント、Fabフラグメント、Fdフラグメント、scFvフラグメント、又はscFabフラグメントであり得る。一般的に、抗体はFab又は完全長IgGである。

他の例を挙げると、アミノ酸283から360内でエピトープに特異的に結合する抗DLL4は、CDRが、配列識別番号:831、845、852、862、872及び882のいずれかで示すアミノ酸配列に対して、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の配列同一性を示す抗体を含む。例えば、抗DLL4抗体は、カバット番号付けに基づいて、S28、F29、T30、W33、I34及びG35の位置において1つ又はそれ以上のアミノ酸置換を有する配列識別番号:831で示すCDRH1の修飾を含有するCDRH1を含む。1つ又はそれ以上のアミノ酸置換は、S28A、S28R、S28K、S28N、F29A、T30A、W33A、I34A、G35T、G35A及び/又はG35Vから選択される。また、抗体は、カバット番号付けに基づいて、I50、I51、Y52、P52a、D54、S55、D56及び/又はT57の位置において1つ又はそれ以上のアミノ酸置換を有する配列識別番号:845で示すCDRH2の修飾も含み得る。1つ又はそれ以上のアミノ酸置換は、I50A、I51A、Y52A、P52aA、D54A、S55G、D56A、T57D及び/又はT57Aから選択される。更なる例において、抗DLL4抗体は、カバット番号付けに基づいて、R95、G96、Y97、S98、Y99、G100、Y100a、D100b及び/又はD101の位置において1つ又はそれ以上のアミノ酸置換を有する配列識別番号:852で示すCDRH3の修飾を含むことができる。1つ又はそれ以上のアミノ酸置換は、95A、G96K、G96R、G96L、G96D、G96T、Y97A、Y97H、S98A、Y99A、G100A、G100D

10

20

30

40

50

、G100L、G100P、G100R、G100M、G100K、G100S、G100R、G100T、Y100aA、D100bA及び／又はD101Aから選択される。とりわけ、アミノ酸置換は、G96K/G100Tである。追加の例において、抗DLL4は、カバット番号付けに基づいて、G24、L25、S26、S27、G27a、S27b、V27c、S28、T29、S30、Y31、Y32及び／又はP33の位置において1つ又はそれ以上のアミノ酸置換を有する配列識別番号:862で示すCDRL1の修飾を含む。1つ又はそれ以上のアミノ酸置換は、G24A、G24R、G24L、L25A、S26A、S27A、G27aA、S27bA、V27cA、S28A、T29A、S30A、Y31A、Y32A及び／又はP33Aから選択される。別の例を挙げると、本明細書で提供される抗DLL4抗体は、カバット番号付けに基づいて、S50、T51、N52、T53、R54、S55及び／又はS56の位置において1つ又はそれ以上のアミノ酸置換を有する配列識別番号:872で示すCDRL2の修飾を含む。1つ又はそれ以上のアミノ酸置換は、S50A、S50F、S50G、S50C、S50R、S50L、S50M、S50V、S50P、S50T、S50H、S50Q、S50N、S50K、S50D、S50E、S50W、T51A、T51F、T51L、T51I、T51M、T51V、T51S、T51P、T51Y、T51H、T51Q、T51N、T51K、T51D、T51E、T51W、T51R、T51G、N52A、T53A、R54A、R54I、R54Y、R54D、R54G、S55A、S55F、S55L、S55I、S55M、S55V、S55P、S55T、S55Y、S55H、S55Q、S55N、S55K、S55D、S55E、S55W、S55R、S55G及び／又はS56Aから選択される。更に別の例を挙げると、抗DLL4抗体は、カバット番号付けに基づいて、V89、L90、Y91、M92、G93、S94、G95、I95a及び／又はS95bの位置において1つ又はそれ以上のアミノ酸置換を有する配列識別番号:882で示すCDRL3の修飾を含むことができる。1つ又はそれ以上のアミノ酸置換は、V89A、V89P、V89T、V89S、V89L、V89R、V89C、V89E、V89W、V89N、V89I、V89G、V89H、L90A、Y91A、M92A、M92E、M92S、M92G、M92L、M92P、M92V、M92D、M92R、M92N、M92T、M92F、G93A、S94A、S94W、S94G、S94P、S94R、S94L、S94M、S94E、S94V、G94A、I95aA及び／又はS95bAから選択される。とりわけ、アミノ酸置換は、M92R/S94M又はV89L/S94Pである。本明細書で提供される例示的なこのした抗DLL4抗体は、配列識別番号:433で示すアミノ酸配列から成るVH鎖及び配列識別番号:537で示すアミノ酸配列から成るVL鎖を有する抗体である。

【0033】

抗DLL4抗体は、どれも分離された抗体で提供される。

【0034】

また、本明細書では、抗体又は抗原結合フラグメント或いはヒトDLL4に特異的に結合するその抗体フラグメントで含まれる場合、ポリペプチドがGYTFTSYVIN(配列識別番号:904)のアミノ酸配列から成っておらず、又は配列識別番号:830で示すアミノ酸配列に対して少なくとも72%の同一性を有するという条件で、配列識別番号:830-836及び844-890のいずれかで示すアミノ酸配列を有し、又は配列識別番号:831-836及び844-890のいずれかで示すアミノ酸配列に対して少なくとも65%の同一性を有するポリペプチドが提供される。

【0035】

本明細書では、上記の抗DLL4抗体のどれもをコードするポリヌクレオチドが提供される。また、本明細書では、上記の抗DLL4抗体のどれもの可変重鎖をコードするポリヌクレオチドも提供される。本明細書では、上記の抗DLL4抗体のどれもの可変軽鎖をコードするポリヌクレオチドも提供される。

【0036】

本明細書では、上記ポリヌクレオチドのどれもを含むベクターが提供される。また、提供のベクターのどれもを含む宿主細胞も提供される。宿主細胞は、原核又は真核性であり得る。

【0037】

本明細書では、適切な宿主細胞において提供のベクターのいずれかを発現し、抗DLL4抗体を回収することにより、前記抗体を作成する方法が提供される。

【0038】

本明細書では、上記の抗DLL4抗体及び血管新生阻害剤のいずれかを含む組合せが提供される。血管新生阻害剤は、血管内皮細胞成長因子(VEGF)のアンタゴニストである。一例を挙げると、VEGFのアンタゴニストは、抗VEGF抗体である。例えば、抗VEGF抗体は、ベバシズ

10

20

30

40

50

マブ(bevacizumab)である。

【0039】

本明細書では、提供される抗DLL4抗体、ポリペプチド又はその組合せのいずれかを含む医薬組成物が提供される。医薬物は、更に、担体を含むことができる。医薬組成物は、ゲル、軟膏、クリーム、ペースト、坐剤、フラッシュ液、液体、懸濁液、エアロゾル、タブレット、錠剤又は粉末として製剤化することができる。医薬組成物は、全身、非経口、局所、経口、粘膜、鼻内、皮下、噴霧、静脈内、気管支内、経肺、腔内、外陰腔又は食道の投与に対して製剤化できる。いくつかの例において、医薬組成物は、単一用量の投与に対し製剤化される。他の例において、医薬組成物は、徐放性製剤で製剤化される。

【0040】

本明細書では、治療学的有効量の本明細書で提供される抗DLL4抗体のいずれか1つ、或いはDLL4の発現及び/又は活性と関連する疾病又は障害の治療に対し本明細書で提供される医薬組成物のいずれかを投与することによる治療方法を提供する。疾病又は障害は、腫瘍、癌又は細胞増殖性疾患であり得る。例えば、疾病又は障害は、アテローム性動脈硬化症、関節炎、眼血管新生、子宮内膜症、子宮筋腫、子癟前症及び癌であり得る。一例を挙げると、疾病又は障害は癌で、癌は、前立腺癌、膀胱癌、結腸癌、肺癌又は乳癌である。

【0041】

本明細書の治療法において、抗DLL4抗体のいずれかは、有効量の血管新生阻害剤と併用で更に投与可能である。血管新生阻害剤は、血管内皮成長因子(VEGF)のアンタゴニストであり得る。例えば、VEGFのアンタゴニストは、抗VEGF抗体である。一例を挙げると、抗VEGF抗体は、ベバシズマブ(bevacizumab)である。更に、本明細書では、有効量の化学療法剤と併用で、本明細書で提供される抗DLL4抗体のいずれかを投与することによる治療法を提供する。

【0042】

また、本明細書では、DLL4の発現及び/又は活性に関連する疾病又は障害の治療に対する薬剤の製剤化において、本明細書で提供される抗DLL4抗体のいずれかの用途を提供する。更に、本明細書では、DLL4の発現及び/又は活性に関連する疾病又は障害を治療する用途に対し、本明細書で提供される抗DLL4抗体のいずれかを含む医薬組成物を提供する。

【0043】

本明細書では、Notchシグナリングを不活性化する提供の抗DLL4抗体のいずれかを投与することにより、Notch活性を阻害する方法を提供する。また、Notch活性を阻害するのに使用する薬剤の製剤において、抗DLL4抗体のいずれかの用途も提供する。更に、Notch活性の阻害で使用するため、提供の抗DLL4抗体のいずれかを含む医薬組成物を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0044】

図1. DLL4抗体VH1-46_IGHD6-6*01_IGHJ1*01 &

L6_IGKJ1*01の配列

図1は、抗体VH1-46_IGHD6-6*01_IGHJ1*01 & L6_IGKJ1*01 (配列識別番号:131及び141)の配列を示す(ボールド体)。図1Aは、可変重鎖VH1-46_IGHD6-6*01_IGHJ1*01の配列を示す。図1Bは、可変軽鎖L6_IGKJ1*01の配列を示す。配列は、順次的なアミノ酸の順番(1列目)で、並びにカバット番号付け(3列)及びショティア(Chothia)番号付け(4列目)によって番号を付ける。

図2. DLL4抗体VH5-51_IGHD5-18*01>3_IGHJ4*01 &

V3-4_IGLJ1*01の配列

図2は、抗体VH5-51_IGHD5-18*01>3_IGHJ4*01 & V3-4_IGLJ1*01 (配列識別番号:132及び142)の配列を示す(ボールド体)。図2Aは、可変重鎖VH5-51_IGHD5-18*01>3_IGHJ4*01の配列を示す。図2Bは、可変軽鎖V3-4_IGLJ1*01の配列を示す。配列は、順次的なアミノ酸の順番(1列目)で、並びにカバット番号付け(3列目)及びショティア(Chothia)番号付け(4列目)によって番号を付ける。フレームワーク(FW)及び相補性決定領域(CDR)を同定する。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 5 】

詳細な説明

概要

A. 定義

B. DLL4

1. 構造

2. 発現

3. 機能

C. 抗体

1. 生殖細胞系由来の抗DLL4抗体

a. 生殖細胞系由来の抗DLL4抗体の例

b. 生殖細胞系由来の修飾抗体

10

i. 可変重鎖

ii. 可変軽鎖

iii. 生殖細胞系由来の修飾抗体の例

2. 抗DLL4:

相補性決定領域(CDR)

20

D. 更なる修飾

1. 免疫原性を低減する修飾

2. Fc修飾

3. ペグ化

4. 検出可能部分の共役

5. 結合特異性を改良する修飾

E. 抗DLL4抗体を産生又は同定する方法

1. 免疫及びハイブリドーマスクリーニング

2. スクリーニング検定

a. 提示ライブラリー

30

ファージ提示ライブラリー

b. アドレス可能なライブラリー

組み合わせのアドレス可能な抗体ライブラリーの生成方法

3. 最適化及び親和性成熟

F. 抗DLL4抗体の性質及び活性の評価

1. 結合

a. 結合アッセイ

b. 結合親和性

2. 機能活性

3. 生動物モデル

G. 抗体の産生方法

1. ベクター

2. 細胞及び発現系

a. 原核発現

b. 酵母菌

c. 虫

d. 哺乳類細胞

e. 植物

40

50

3. 精製

H. 製剤、投与及び製品／キット

1. 製剤

2. 製品及びキット

1. 抗体の方法及び用途

1. 治療及び用途の方法

併用療法

2. 診断及び発見

J.

例

10

【0046】

A.

定義

他に定義がない限り、本明細書で使用される全ての技術的及び科学的用語は、本発明の属する技術分野の当事者によって一般的に理解されるものと同様の意味を有する。本明細書で開示される全てを通じ参照される全特許、特許出願、公開された出願及び刊行物、Genbankの配列、データベース、ウェブサイト並びに他の公開物は、他に記載のない限り、参考によってそのまま援用される。本明細書において用語の定義が複数ある場合、本章の定義が有効である。URL或いは他のこのような識別子又はアドレスを参照する場合、こうした識別子は変えることができ、インターネット上の特定情報の出入りは可能であるが、インターネットで検索することによって相当の情報を得ることができることを理解する。それらを参照することにより、こうした情報の利用及び公開を証明する。

本明細書で使用されるとおり、デルタ様4(DLL4)は、Notch受容体1及び4のリガンドであるタンパク質を示す。DLL4は、組み換えにより生産されたポリペプチド、合成的に生産されたポリペプチド、天然DLL4ポリペプチド、及び内皮細胞などの細胞又は組織から抽出されたDLL4ポリペプチドを含むがこれらに限定されるものではなく、あらゆるDLL4ポリペプチドを含む。また、DLL4は、ヒト及び非ヒト由来の生動物を含むがこれらに制限されるものではなく、異なる種からの関連ポリペプチドを含む。ヒトDLL4は、DLL4、対立遺伝子アイソフォーム、核酸からの合成分子、ヒト組織及び細胞から単離されたタンパク質、及びその修飾形態を含む。例示的なDLL4は、配列識別番号:114で示すアミノ酸配列を有し、配列識別番号:113で示すヌクレオチド配列によってコードされるヒトDLL4を含む。本明細書での目的に対し、DLL4は、特に明記しない限り、通常はヒトDLL4に関する事を示す。

20

30

40

50

【0047】

本明細書で使用されるとおり、抗体は、天然或いは組換え技術などによる部分的又は完全合成で產生されようと、抗原結合部位を形成するのに十分な免疫グロブリン分子の可変領域部分を少なくとも含む抗体のあらゆる部分を含有した免疫グロブリン及び免疫グロブリン部分を示す。従って、抗体又はその部分は、免疫グロブリンの抗原結合部位に対し相同又は実質的に相同である結合ドメインを持つあらゆるタンパク質を含む。例えば、抗体は、2つの重鎖(H及びH'表すことができる)並びに2つの軽鎖(L及びL'で表すことができる)を含有する抗体を示し、各重鎖は、完全長免疫グロブリンの重鎖又は抗原結合部位を形成するのに十分なその部分であり得(例えば、重鎖は、VH鎖、VH-CH1鎖及びVH-CH1-CH2-CH3鎖を含むがそれらに限定されるものでない)、並びに各軽鎖は、完全長軽鎖又は抗原結合部位を形成するのに十分なその部分であり得る(例えば、軽鎖は、VL鎖及びVL-CL鎖を含むがそれらに限定されるものでない)。各重鎖(H及びH')は軽鎖1つ(それぞれL及びL')と組合わせる。通常、抗体は、全体又は最小の重鎖可変領域(VH)及び/又は軽鎖可変領域(VL)の部分を最低限に含む。また、抗体は、全体又は最小の定常領域も含む。

本明細書の目的に対し、用語の抗体は、完全長抗体及びFab、Fab'F(ab')₂、単一鎖Fv s (scFv)、Fv、dsFv、diabody、Fd及びFd'フラグメント、Fabフラグメント、Fdフラグメント及びscFvフラグメントといったその抗体フラグメントを含むがそれらに制限されるものでない。その他の既知のフラグメントは、scFabフラグメント(Hust et al.、BMC Biote

chnology (2007)、7:14)を含むがそれに限定されるものでない。抗体は、IgG、IgM、IgA、IgD及びIgEなどのあらゆる免疫グロブリン類の一員を含む。

【0048】

本明細書で使用されるとおり、完全長抗体は、2つの完全長重鎖(VH-CH1-CH2-CH3又はVH-CH1-CH2-CH3-CH4など)及び2つの完全長軽鎖(VL-CL)並びに抗体分泌B細胞によって產生されるヒト抗体及び合成的に產生される同じドメインを持つ抗体といったヒンジ領域を有する抗体である。

本明細書で使用されるとおり、抗体フラグメント又は抗体の部分は、完全長以下ではあるが少なくとも抗原結合部位(1つ又はそれ以上のCDR)を形成するのに十分な抗体の可変領域部分を含み、従って、完全長抗体の結合特異性及び/又は活性を保持する完全長抗体のあらゆる部分を示し、抗体フラグメントは、完全長抗体の酵素的処理によって產生される抗体誘導体、並びに組み換えなどの合成的に產生される誘導体を含む。抗体フラグメントの例は、Fab、Fab'、F(ab')₂、単一鎖Fvs (scFv)、Fv、dsFv、Fd及びFd' フラグメント(例えばMethods

in Molecular Biology、Vol 207: Recombinant Antibodies

for Cancer Therapy Methods and Protocols (2003)、第1章、p 3-25、Kipriyanovを参照)を含むがそれらに制限されるものでない。フラグメントは、ジスルフィド架橋及び/又はペプチドリンカーなどによって結合される複数の鎖を含み得る。抗体フラグメントは、一般的に少なくとも約50個のアミノ酸及び通常は少なくとも200個のアミノ酸を含む。

【0049】

本明細書で使用されるとおり、Fv抗体フラグメントは、非共有結合的な相互作用によって結合される1つの可変重鎖ドメイン(VH)及び1つの可変軽鎖ドメインから成る。

【0050】

本明細書で使用されるとおり、dsFvは、VH-VL対を安定させる人工的な分子間ジスルフィド結合を伴うFvを示す。

【0051】

本明細書で使用されるとおり、Fdフラグメントは、可変ドメイン(VH)及び抗体重鎖の定常領域ドメイン(CH1)1つを含む抗体のフラグメントである。

【0052】

本明細書で使用されるとおり、Fabフラグメントは、パパインを伴う完全長免疫グロブリンの消化に起因する完全長抗体の部分を含む抗体フラグメント、又は組み換えなどの合成的に產生される同様の構造を持つフラグメントである。Fabフラグメントは、軽鎖(VL及びCL部分を含む)、及び重鎖の可変ドメイン(VH)を含む他の鎖、及び重鎖の定常領域ドメイン部分の1つを含み、それは組み換え產生され得る。

【0053】

本明細書で使用されるとおり、F(ab')₂フラグメントは、pH4.0-4.5においてペプシンを伴う免疫グロブリンの消化に起因する抗体フラグメントで、又は組み換えなどの合成的に產生された同様の構造を持つ抗体である。F(ab')₂フラグメントは、2つのFabフラグメントを含むが、各重鎖部分は、2つのフラグメントをつなぐジスルフィド結合を形成するシステイン残基を含有するいくつかの追加のアミノ酸を含み、それは組み換えで產生することができる。

【0054】

本明細書で使用されるとおり、Fab' フラグメントは、F(ab')₂フラグメントの片方(重鎖1つ及び軽鎖1つ)を含むフラグメントである。

【0055】

本明細書で使用されるとおり、Fd' フラグメントは、F(ab')₂フラグメントの1つの重鎖部分を含む抗体のフラグメントである。

【0056】

本明細書で使用されるとおり、Fvフラグメントは、抗体分子のV_H及びV_Lドメインのみを含

10

20

30

40

50

むフラグメントである。

【0057】

本明細書で使用されるとおり、scFvフラグメントは、任意の順でポリペプチドリンカーによって共有結合で結ばれる、軽鎖可変領域(VL)及び重鎖可変領域(VH)を含む抗体フラグメントを示す。リンカーは、2つの可変ドメインを実質的な干渉なしで架橋する長さである。例示的なリンカーは、溶解度を高めるため分散するいくつかのClu又はLys残基を伴う(Gly-Ser)_n残基である。

【0058】

本明細書で使用されるとおり、diabodyは、二量体のscFvで、通常diabodyは、scFvより短いペプチドリンカーを有し、それらは選択的に二量化する。

10

【0059】

本明細書で使用されるとおり、hsFvは、本来Fabフラグメントで存在する定常ドメインが、ヘテロ二量体のコイルドコイルドメインと置換された抗体フラグメントを示す(Arndt et al. (2001) J Mol Biol. 7:312:221-228などを参照)。

【0060】

本明細書で使用されるとおり、ポリペプチドドメインは、構造的及び/又は機能的に区別できる又は定義できるポリペプチドの一部(3つ又はそれ以上、一般的に5つ又は7つ又はそれ以上のアミノ酸配列)である。例示的なポリペプチドドメインは、1つ又はそれ以上の構造的モチーフ(ループ領域によって繋がれた ラ旋及び/又は ストランドの組合せなど)で構成されたポリペプチド内の独自の折り畳み構造を形成することができ、並びに/若しくは酵素活性又は抗原結合といった特定の機能的活性によって認識されるポリペプチドの一部である。ポリペプチドは、1つの、通常は1つ以上のはっきりと異なるドメインを有し得る。例えば、ポリペプチドは、1つ又はそれ以上の構造的ドメイン及び1つ又はそれ以上の機能的ドメインを有し得る。単一のポリペプチドドメインは、構造及び機能に基づいて区別することができる。ドメインは、アミノ酸の隣接する直鎖状配列を含むことが可能である。或いは、ドメインは、複数の非隣接アミノ酸部分を含むことが可能で、それらはポリペプチドのアミノ酸の直鎖状配列に沿って非隣接である。通常、ポリペプチドは、複数のドメインを含む。例えば、抗体分子の各重鎖及び各軽鎖は、複数の免疫グロブリン(Ig)ドメインで、約110アミノ酸長を含む。ドメイン(EGF、Ig様ドメインなど)は、頻繁に、特定のタンパク質のドメインに対する構造的相同性及び/又は配列相同性の効力によって同定される。本明細書の例に対しては、定義が提供されるが、名称によって特定のドメインを区別することを当業者には理解されたい。必要に応じて、適切なソフトウェアを使用し、ドメインを同定することが可能である。更に、本明細書のドメインのアミノ酸位置は、例示目的のみに対するものであることを示す。相互作用が動的ため、言及のアミノ酸位置は参照及び例示用である。言及の位置は、2、3、4、5個又はそれ以上のアミノ酸によって変化する座位の範囲を示す。また、変異も対立遺伝子変異型及び種変異型で存在する。当業者は、目視比較又は容易に利用可能なアルゴリズム及びソフトウェアなどの他の比較によって対応の配列を同定することができる。

20

【0061】

本明細書で使用されるとおり、Igドメインは、当業者に認識されルドメインで、免疫グロブリン(Ig)の折畳みと称される構造によって区別され、それは2つの プリーツシートで、それぞれループによって繋がれたアミノ酸の逆平行 ストランドを含む。疎水性相互作用及び保存された鎖内ジスルフィド結合により、Ig折畳みの2つの シートを一緒に挟持する。抗体鎖内の個々の免疫グロブリンのドメインは、機能に基づいて更に区別することができる。例えば、軽鎖は、1つ可変領域ドメイン(VL)及び1つの定常領域ドメイン(CL)を含み、その一方で、重鎖は1つの可変領域ドメイン(VH)及び3つ又は4つの定常領域ドメイン(CH)を含む。VL、CL、VH及びCHの各ドメインは、免疫グロブリンのドメインの例である。

30

【0062】

本明細書で使用されるとおり、抗体に関する可変ドメインは、異なる抗体において変わるもの

40

50

アミノ酸配列を含む抗体の重鎖又は軽鎖の特定のIgドメインである。

【0063】

軽鎖及び重鎖の各々は、1つの可変領域ドメイン(VL及びVH)を有する。可変ドメインは、抗原特異性を提供し、従って、抗原認識に関与する。各々の可変領域は、抗原結合部位ドメイン及びフレームワーク領域(FR)の一部であるCDRを含む。

本明細書で使用されるとおり、「超可変領域」、「HV」、「相補性決定領域」、「CDR」及び「抗体CDR」は、抗体の抗原結合部位を共に形成する各可変領域内の複数部分の1つを示し、互換的に使用する。各可変領域ドメインは、CDR1、CDR2及びCDR3と称する3つのCDRを含む。その3つのCDRは、アミノ酸の直鎖状配列に沿って非隣接であるが、折り畳みポリペプチドで隣接する。CDRは、可変ドメインにおけるシートの平行ストランドを結合するループ内に位置する。

【0064】

本明細書で使用されるとおり、フレームワーク領域(FR)は、シート内に位置する抗体の可変領域ドメイン内のドメインで、FR領域は、それらのアミノ酸配列に関して、超可変領域よりも比較的保存されている。

【0065】

本明細書で使用されるとおり、定常領域ドメインは、可変領域ドメインよりも抗体において比較的保存されているアミノ酸配列を含む抗体の重鎖又は軽鎖におけるドメインである。各軽鎖は、単一軽鎖定常領域(CL)ドメインを有し、各重鎖は、1つ又はそれ以上の重鎖定常領域(CH)ドメインを含有し、これはCH1、CH2、CH3及びCH4を含む。完全長IgA、IgD及びIgGアイソタイプは、CH1、CH2、CH3及びヒンジ領域を含有し、一方で、IgE及びIgMは、CH1、CH2、CH3及びCH4を含む。CH1及びCLドメインは、抗体分子のFabアームを広げ、従って、抗原及び抗体アームの回転との相互作用に関係している。抗体の定常領域は、様々な細胞、生体分子及び組織との相互作用によるなど、抗体が特異的に結合する抗原、病原体及び毒素の一掃といったエフェクター機能を提供するがこれらに制限されるものでない。

【0066】

本明細書で使用されるとおり、ヒト化抗体は、ヒトへの投与が免疫反応を誘発しないようアミノ酸の「ヒト」配列を含むため修飾される抗体を示す。こうした抗体の調製法は周知である。例えば、非可変領域のアミノ酸組成物の抗体は、ヒト抗体に基づき得る。こうした領域を同定するにあたり、コンピュータープログラムが考案されている。

【0067】

本明細書で使用されるとおり、「抗原結合部位」は、1つ又はそれ以上の相補性決定領域(CDR、超可変領域とも称す)によって形成される接合部分を示す。各抗原結合部位は、重鎖可変領域からの3つのCDR及び軽鎖可変領域からの3つのCDRを含む。抗体分子は、2つの抗原結合部位を有し、各々は、重鎖可変領域の一部及び軽鎖可変領域の一部を含む。抗原結合部位は、CDRに加えて可変領域ドメインの他の部分を含み得る。

【0068】

本明細書で使用されるとおり、「抗体又は抗原結合部位を形成するのに十分なその一部」は、抗体又はその一部が、全6つのCDRを含む対応の完全長抗体の結合特異性の少なくとも一部を保持するのに十分なVH及びVLにおける少なくとも1つ又は2つ、通常は、3つ、4つ、5つ又は全6つのCDRを含有を意味することを示す。一般的に、十分な抗原結合部位は、少なくとも、重鎖のCDR3(CDRH3)を必要とする。通常は、軽鎖のCDR3(CDRL3)を更に必要とする。本明細書に記載のとおり、当業者は、カバット又はショティア(Chothia)番号付けに基づいてCDRを周知しており、同定することができる(Kabat,E.A. et al.(1991)

Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、U.S. Department of Health and Human Services、NIH Publication No. 91-3242及びChothia,C. et

al. (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917を参照)。例えば、カバット番号付けに基づいて、CDR-L1は残基L24-L34に対応し、CDR-L2は残基L50-L56に対応して、CDR-L3は残基L89-L97に対応し、CDR-H1は長さによって残基H31-H35、35a又は35bに対応し、CDR-H2は残基H50-

10

20

30

40

50

H65に対応して、及びCDR-H3は残基H95-H102に対応する。

【0069】

本明細書で使用されるとおり、「標的タンパク質」は、抗体又はその部分及び／又はその活性によって特異的に認識される候補タンパク質又はペプチドが、抗体又はその部分によって修飾されることを示す。標的タンパク質は、抗体認識に対するエピトープを含有するあらゆるペプチド又はタンパク質を含む。標的タンパク質は、発現又は活性の効力によって疾病又は障害の病因に関するタンパク質を含む。例示的な標的タンパク質はDLL4である。

【0070】

本明細書で使用されるとおり、標的タンパク質に対する活性(DLL4など)は、標的タンパク質の機能的活性における結合特異性及び／又は調節、或いは抗体又は標的タンパク質に対する抗体又はその部分の活性を反映する他の測定法を示す。

10

【0071】

本明細書で使用されるとおり、評価という用語は、標的タンパク質と抗体又はその一部との結合の絶対値の獲得及び／或いは抗体又はその一部による標的タンパク質の活性の調節、並びに結合又は活性のレベルを示す指標、比率、割合、視覚的又は他の価値も取得するという意味の量的及び質的決定を含むことを意図している。評価は、直接的又は間接的になり得る。例えば、結合は、直接的に抗体又はその一部を検出可能な標識で標識化することにより、及び／又は独自に標識化される二次抗体を使用することにより決定することができる。加えて、機能的活動は、例えば、増殖、細胞毒性及び本明細書に記載のその他のアッセイといった当業者に周知の様々なアッセイいずれかを使用し、並びに抗体又はその一部の存在下に対して不存在下で、標的タンパク質の活性を比較し決定できる。

20

【0072】

本明細書で使用されるとおり、「機能的活性」は、ポリペプチド(標的タンパク質など)又は完全長(完全)タンパク質と関連するその一部の活性を示す。機能的活性は、生物学的活性、触媒又は酵素活性、抗原性(抗ポリペプチド抗体に結合するため、ポリペプチドと結合又は競合する能力)、免疫原性、マルチマーを形成する能力、ポリペプチドの受容体又はリガンドに特異的に結合する能力並びにシグナリング及び下流のエクタ－機能を含むがそれらに制限されるものでない。本明細書の目的に対し、抗体又はその一部によるポリペプチドの機能的活性の調節(活性又は阻害など)は、抗体又はその一部の不在と比べて抗体の存在下で、ポリペプチドの機能的活性を変化又は改変することを意味する。

30

【0073】

本明細書で使用されるとおり、標的タンパク質の機能的活性における抗体又はその一部の効果に關し、「調節する」又は「調節」及び他の様々なその文法的形態は、活性の誘導又は増強など活性の増大、並びに標的タンパク質の1つ又はそれ以上の活性の阻害を示す。こうして、調節は、活性の増大(上方調節又はアゴニスト活性)、活性の減少(下方調節又は阻害)又は他のあらゆる活性の変化(周期性、頻度、持続時間、反応速度又は他のパラメータ)を含むことが可能である。調節は、状況依存の可能性があり、一般的に調節は、例えば、野生型タンパク質、構造的状態のタンパク質、或いは特定の細胞型又は状況で発現するタンパク質といった特定の状態と比較する。抗体又はその一部による標的タンパク質の機能的活性は、抗体又はその一部の不在下における標的タンパク質の活性と比較すると、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%又はそれ以上を調節することが可能である。

40

【0074】

本明細書で使用されるとおり、「アゴニスト」は、受容体のシグナル伝達活性又は他の機能的活性を増強、誘導、さもなければ強化することにより、受容体のシグナル伝達又はその他の機能的活性を調節する抗体又はその一部を示す。アゴニストは、単独で使用するとき、シグナル変換又は他の機能的活動を調節することができ、或いは受容体又は他の受容体刺激物の天然リガンドの存在下において、シグナル変換又は他の機能的活性を改変して、リガンドのみと比較し、受容体によりシグナル伝達を強化することができ

50

る。

【0075】

本明細書で使用されるとおり、「アンタゴニスト」は、受容体のシグナル変換活性又はその他の機能的活性を阻止又は低減することにより、受容体のシグナル変換又はその他の機能的活性を調節する抗体又はその一部を示す。

【0076】

本明細書で使用されるとおり、標識は、分子又はそれに関連するものに直接的又は間接的に結合又は連結することが可能な検出可能マーカーである。検出方法は、当業者に周知の方法のいずれかで行うことができる。

【0077】

本明細書で使用されるとおり、結合活性は、プリペチドなどの分子の特性が、1つ又はそれ以上の結合パートナーと結合するかどうか、及びどのように結合に関わりがあることを示す。結合活性は、結合パートナーとの結合能力、結合パートナーに結合する親和性(高親和性など)、結合パートナーに結合する活性、結合パートナーとの結合強度並びに結合パートナーとの結合特異性を含む。

【0078】

本明細書で使用されるとおり、「親和性」又は「結合親和性」は、抗体分子又はその一部が標的タンパク質のエピトープ又は抗原に結合する強度を示す。親和性は、大抵の場合、会合平衡定数(K_A)又は平衡解離定数(K_D)で測定される。低親和性の抗体 抗原相互作用は弱く、分子は迅速に解離する傾向があるが、一方で、高親和性の抗体 抗原結合は強く、分子は更に長時間結合を維持する。高い抗体親和性は、約 10^6 M^{-1} 以上又はそれと同等、約 10^7

M^{-1} 以上又はそれと同等、約 10^8 M^{-1} 以上又はそれと同等、又は約 10^9 M^{-1} 、 10^{10} M^{-1} 、 10^{11} M^{-1} 又は 10^{12} M^{-1} 以上又はそれと同等の会合平衡定数(K_A)を用いて、抗体が標的タンパク質に特異的に結合することを意味する。また、抗体も、例えば、 10^{-6} M 、 10^{-7} M 、 10^{-8} M 、 10^{-9} M 、 10^{-10} M 、 10^{-11} M 又は 10^{-12} M 又はそれ未満の平衡解離定数(K_D)で特徴付ける。一般的に、ナノモル解離定数又はサブナノモル解離定数を有する抗体は、高親和性の抗体であると考えられる。このような親和性は、平衡透析、表面プラズモン共鳴の使用、放射性標識の標的抗原を用いたラジオイムノアッセイ、又は優れた技術者に知られる他の方法などにより、従来の方法を使用して容易に決定することができる。親和性データは、例えばScatchard et al.、Ann N.Y. Acad. ScL、51:660 (1949)の方法により分析することができる。

【0079】

本明細書で使用されるとおり、抗体又はその抗原結合フラグメントに関する「特異的結合」又は「免疫特異的結合」は、本明細書で交互に用いられ、抗体及び抗原の抗体結合部位間の非共有結合的な相互作用により(ヒトDLL4)、同系の抗原と1つ又はそれ以上の非共有結合を形成する抗体又は抗原結合フラグメントの能力を示す。通常、抗原に免疫特異的に結合する(又は特異的に結合する)抗体は、約 $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ 又は $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ 又はそれ以上の親和性定数(又は $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ 又は $1 \times 10^{-8} \text{ M}$ 又はそれ未満の解離定数(K_d))で抗原に結合する抗体である。親和性定数は、例えば、免疫学的検定、表面プラズモン共鳴(SPR) (Rich and Myska (2000) Curr. Opin. Biotechnol 11:54、Englebienne (1998) Analyst. 123:1599)、等温滴定熱量計(ITC)又は当事者には周知の他の動力学的相互作用アッセイ(Paul, ed., Fundamental Immunology、第2版、Raven

Press、New York、P332-336 (1989)などを参照、米国特許第7,229,619号、a description of exemplary SPR and

ITC methods for calculating the binding affinity of anti-RSV antibodiesも参照)の抗体反応に対し、標準的な動力学的方法論により決定できる。リアルタイム検出及び結合率の監視に対する分析機械装置及び方法は周知のもので、市販されている(BiaCore 2000、Biacore AB, Upsala, Sweden及びGE Healthcare Life Sciences;

Malmqvist (2000) Biochem. Soc. Trans. 27:335)。

10

20

30

40

50

【0080】

本明細書で使用されるとおり、ポリペプチド又は本明細書で提供される抗体に関し、「選択的に結合する」又は「選択結合」の用語は、ポリペプチド又は抗体が、他のエピトープと実質的には結合しない選択エピトープと結合することを意味する。通常、選択エピトープに選択的に結合する抗体又はそのフラグメントは、約 $1 \times 10^7 M^{-1}$ 又は $1 \times 10^8 M^{-1}$ 又はそれ以上の親和性定数Kaなどで、エピトープに特異的に結合する。

【0081】

本明細書で使用されるとおり、「エピトープ」は、抗原又は抗体によって認識されるタンパク質の表面の局所領域を示す。エピトープは、直線状又は立体構造エピトープであり得、連続又非連続的であり得る。一般的に、直線状エピトープは、1つの一続きのアミノ酸で構成されるなど連続的である。立体構造エピトープは、非連続的であり得、すなわち、抗原が折り畳まれるとき、エピトープを形成するため一体となるアミノ酸の2つ又はそれ以上の非連続的セグメントで構成される。抗体が同じエピトープに結合するかどうかを決定する方法は当業者には周知である。エピトープは、当業者によく知られる標準的な方法によって定義又はマッピングすることができる。例えば、ペプチドライブラー又は抗原の特定部位突然変異誘発(抗原のアラニンスキャニングなど)を利用するELISAアッセイといったアッセイを用いてエピトープをマッピングすることができる。

10

【0082】

本明細書で使用されるとおり、2つ又はそれ以上の抗体に関し、「同じエピトープへの結合」は、アミノ酸の連続的又は非連続的セグメントを重複又は包含し、抗体が抗原に結合することに対して競合し、同じものに結合することを意味する。当業者は、「同じエピトープへ結合」の表現が、必ずしも抗体が厳密に同じアミノ酸へ結合することを意味しないことを理解されたい。抗体が結合するまさにそのアミノ酸は異なるものである。例えば、一次抗体は、二次抗体によって結合されるアミノ酸のセグメントで完全に包含されるアミノ酸のセグメントに結合できる。別の例において、一次抗体は、二次抗体で結合される1つ又はそれ以上のセグメントをかなり重複する1つ又はそれ以上のアミノ酸のセグメントを結合する。本明細書の目的に対し、このような抗体は、「同じエピトープへ結合」と考えられる。

20

【0083】

抗体競合アッセイは、別の抗体として、抗体が「同じエピトープに結合」するかどうかを決定するのに使用することができる。こうしたアッセイは、当業者によく知られており、本明細書で説明されている(実施例9を参照)。通常、二次抗体が過剰で、一次抗体が全部位で飽和する条件下において、70%、71%、72%、73%、74%、75%、80%、85%、90%、95%又はそれ以上の70%又はそれ以上の二次抗体によるエピトープとの相互作用で知られる抗体の競合は、抗体が「同じエピトープと結合」することを示す。2つの抗体間の競合レベルを評価するため、例えば、ラジオイムノアッセイ又は抗体に対し他の標識を使用するアッセイを用いることができる。例えば、DLL4抗原は、飽和量の非標識化された二次抗DLL4抗体の存在下において、同量の一次抗DLL4抗体又は標識化合物(3H 、 ^{125}I 、ビオチン、又はルビジウムなど)に共役されるその抗原結合フラグメントでインキュベートすることができる。非標識遮断抗体の存在下において、抗原に結合する前記量の標識抗体を評価し、非標識遮断抗体の存在下における結合と比較する。遮断抗体の存在下と比較した非標識遮断抗体の存在下において、結合シグナルの変化率によって競合を決定する。従って、遮断抗体の存在下における結合と比較して、遮断抗体の存在下における標識抗体の結合で70%の阻害がある場合、70%の2つの抗体間で競合がある。こうして、70%、71%、72%、73%、74%、75%、80%、85%、90%、95%又はそれ以上といつた70%又はそれ以上の一次及び二次抗体間の競合は、一次抗体が、70%、71%、72%、73%、74%、75%、80%、85%、90%、95%又はそれ以上で抗原への二次抗体の結合を阻害すること(又は逆も)を示す(一次抗体の存在下において二次抗体による抗原の結合と比較)。従って、70%、72%、73%、74%、75%、80%、85%、90%、95%又はそれ以上の二次抗体による抗原への一次抗体の結合における阻害は、2つの抗体が同じエピトープに結合することを示す。

30

40

50

【0084】

本明細書で使用されるとおり、「表面プラズモン共鳴」の用語は、例えば、BioCoreシステム(GE Healthcare Life Sciences)を使用し、バイオセンサーマトリックス内のタンパク質濃度の変化を検出することにより、リアルタイムの相互作用分析を可能にする光学現象を示す。

【0085】

本明細書で使用されるとおり、「二重特異的」抗体は、2つ又はそれ以上の抗原結合部位を含む多特異的抗体で、2つの異なるエピトープに免疫特異的に結合することができる。「三重特異的」抗体は、3つ又はそれ以上の抗原結合部位を含み、3つの異なるエピトープに免疫特異的に結合することができる多特異的抗体で、「四重特異的」抗体は、4つ又はそれ以上の抗原結合部位を含む多特異的抗体で、4つの異なるエピトープに免疫特異的に結合できる。

10

【0086】

本明細書で使用されるとおり、「エピトープマッピング」は、抗体 抗原認識の分子決定基の同定の過程である。

【0087】

本明細書で使用されるとおり、Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)は、例えば、配列同一性に基づき、タンパク質又はDNAデータベースを別々に探索するため、Altschul et al. J

20

Mol Biol. 215(3):403-10 (1990)によって開発された探索アルゴリズムである。例えば、blastnは、ヌクレオチド配列データベース(GenBankなど)に対し、ヌクレオチドクエリ-配列を比較するプログラムである。BlastPは、タンパク質配列データベースに対し、アミノ酸クエリー配列を比較するプログラムである。

【0088】

本明細書で使用されるとおり、BLASTビットスコアは、ギャップの数及び整列した各配列に関連する置換からの計算値である。スコアが高いほど、整列はより有意である。

【0089】

本明細書で使用されるとおり、ヒトタンパク質は、全対立遺伝子多型及びその保守的変形を含むヒトゲノムに存在するDNAといった核酸分子によってコードされるものである。タンパク質の変形又は修飾は、修飾がヒトタンパク質の野生型又は卓越配列に基づく場合はヒトタンパク質である。

30

【0090】

本明細書で使用されるとおり、「天然アミノ酸」は、ポリペプチドで発生する20個のLアミノ酸を示す。残基は、ヒトにおける同族mRNAのコドンと装填されたtRNA分子の特異的認識によってタンパク質に組み込まれる天然に見出されたこれら20個のアミノ酸である。

30

【0091】

本明細書で使用されるとおり、「非天然アミノ酸」は、遺伝子的にコードされていないアミノ酸を示す。例えば、非天然アミノ酸は、天然アミノ酸と同様の構造を持つ有機化合物であるが、天然アミノ酸の構造及び反応性を擬似的に構造上修飾している。従って、非天然アミノ酸は、例えば、20個の天然アミノ酸以外のアミノ酸又はアミノ酸の類似体を含み、及びアミノ酸のD-イソステレオマーを含むがそれに制限されるものでない。例示的な非天然アミノ酸は、当業者には知られている。

40

【0092】

本明細書で使用されるとおり、核酸は、ペプチド核酸(PNA)及びその混合物を含むDNA、PNA及びそれらの擬似体を含有する。核酸は、一本鎖又は二本鎖であり得る。蛍光性又は放射性標識といった検出可能な標識など、任意に標識化されるプローブ又はプライマーを示す場合は、一本鎖分子が考えられる。こうした分子は、通常、それらの標的が統計的に独特である長さ又はライブラリーのプロービング又はプライミングに対してコピー数(通常は5未満、一般的には3未満)は低い。一般的に、プローブ又はプライマーは、目的遺伝子

50

に相補的な配列又は目的遺伝子と同一の配列において少なくとも14、16又は30個の隣接又クレオチドを含む。プローブ又はプライマーは、10、20、30、50、100又はそれ以上の長さの核酸であり得る。

【0093】

本明細書で使用されるとおり、ペプチドは、2から40個の長さのアミノ酸からのポリペプチドを示す。

本明細書で使用されるとおり、本明細書で提供される様々なアミノ酸配列で産出するアミノ酸は、周知の3文字又は1文字の略語によって同定される(表1)。様々な核酸フラグメントで産出するヌクレオチドは、当業者に定期的に使用される標準的な1文字の記号で示す。

10

【0094】

本明細書で使用されるとおり、「アミノ酸」は、アミノ基及びカルボン酸基を含む有機化合物である。ポリペプチドは、2又は3個のアミノ酸を含む。本明細書の目的に対し、アミノ酸は、20個の天然アミノ酸、非天然アミノ酸及びアミノ酸類似体を含む(炭素が側鎖を有するアミノ酸など)。

【0095】

本明細書で使用されるとおり、「アミノ酸残基」は、そのペプチド結合におけるプリペプチドの化学的消化(加水分解)で形成されるアミノ酸を示す。本明細書に記載のアミノ酸残基は、「L」異性型であると推測される。そうように定められる「D」異性型の残基は、所望の機能特性がポリペプチドによって保持される限り、あらゆるL-アミノ酸残基の代わりになることができる。 NH_2 は、ポリペプチドのアミノ末端で存在する遊離アミノ基を示す。 COOH は、ポリペプチドのカルボキシル末端で存在する遊離カルボキシ基を示す。J. Biol. Chem., 243: 3557-3559 (1968)に記載されており、37 C.F.R. §§ 1.821-1.822で採用されたポリペプチドの標準的な用語体系に従い、アミノ酸残基の略語を表1で示す：

20

【表1】

記号		
1文字	3文字	アミノ酸
Y	Tyr	チロシン
G	Gly	グリシン
F	Phe	フェニルアラニン
M	Met	メチオニン
A	Ala	アラニン
S	Ser	セリン
I	Ile	イソロイシン
L	Leu	ロイシン
T	Thr	トレオニン
V	Val	バリン
P	Pro	プロリン
K	Lys	リジン
H	His	ヒスチジン
Q	Gln	グルタミン
E	Glu	グルタミン酸
Z	Glx	Glu及び/又はGln
W	Trp	トリプトファン
R	Arg	アルギニン
D	Asp	アスパラギン酸
N	Asn	アスパラギン
B	Asx	Asn及び/又はAsp
C	Cys	システィン
X	Xaa	不明又はその他

10

20

30

40

ここに公式によって表示された全アミノ酸残基配列はアミノ末端からカルボキシル終点の従来の方向に左右オリエンテーションを持っていることが注目されている。さらに「アミノ酸残基」という表現は対応表(表1)に記載されたアミノ酸、37C.F.R. §§ 1.821-1.822で言及されたもののような変更された珍しいアミノ酸を含むように広く定義されている。そして、ここに参照で組み込まれている。その上、アミノ酸残基系列の始めか終わりでのダッシュが1つ以上のアミノ酸残基系列、NH₂などのようなアミノ末端グループかCOOHなどのようなカルボキシル末端グループのペプチド結合を示す。いずれの保護的なグループ、アミノ酸と他の化合物の略語はそれらの共通使用、認められた略語または生化学命名法のUPAC-IUB委員会(見ること、(1972年の)生物化学11:1726)に従い、別 の方法で示される。自然発生の各L-アミノ酸は標準の3レター・コード(または、ただ一つのレター・コード)か接頭語「L」がついている基準の3レター・コード(または、ただ一つのレター・コード)によって特定される。接頭語「D」は、アミノ酸の立体異性体はDであることを示す。

ここに使用されるように、等運動性混合物にはアミノ酸のモル比がそれらの報告された反応速度に基づいて調整されたものだ(見ること、例えば、Ostreshet他、(1994)生体高分子34:1681)。

ここに使用されるように、変更は、ポリペプチドのアミノ酸の系列か核酸分子の中のヌクレオチド配列の変更について、それぞれアミノ酸とヌクレオチドの削除、投入、および交換を含んでいる。ポリペプチドを変更する方法は組み換えDNA方法論を使用することなどといった芸術におけるそれらの日常的技能である。

ここに使用されるように、アミノ酸の適当な保守的な代替はこの芸術におけるそれら

50

の技能だと知られており、得られた分子の生物活動を変更せずに一般的に作ることができる。この芸術におけるそれらの技能は一般に、ポリペプチドの不要不急な領域での单一アミノ酸代替が実質的に生物活動を変更しないと認める(見ること、例えば、Geneのワツソンなどの分子生物学、第四版、1987、ベンジャミン/カミングズPub.co.、p.224)。以下のTABLE2に詳しく説明されたものに従ってそのような代替をすることができます:

【表2】

オリジナル残留	模範的 同類置換
Ala (A)	Gly; Ser
Arg (R)	Lys
Asn (D)	Gln; His
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp
Gly (G)	Ala; Pro
His (H)	Asn; Gln
Ile (I)	Leu; Val
Leu (L)	Ile; Val
Lys (K)	Arg; Gln; Glu
Met (M)	Leu; Tyr; Ile
Phe (F)	Met; Leu; Tyr
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe
Val (V)	Ile; Leu

10

20

30

【0096】

他の置換も容認できるし実験的にも決定できる。そして、知られている保守的な置換に従い、決定できる。

ここに使用されるように、DNA構築物は現実に見つけられなかった方法で結合され、並置されたDNAのセグメントを含む一本鎖か二本鎖、線状か環状DNA分子である。DNA構築物は、人間の操作の結果、存在していて、クローンと操られた分子の他のコピーを含んでいる。

ここに使用されるように、DNA断片は、指定された属性を持っているより大きいDNA分子の部分だ。例えば、指定されたポリペプチドをコード化するDNA断片は、5'から3'方向まで読まれると、指定されたポリペプチドのアミノ酸の系列をコード化するプラスミド、プラスミド断片といったようなより長いDNA分子の一部である。

ここに使用されるように、「核酸」という用語は、デオキシリボ核酸(DNA)、リボ核酸(RNA)、および、RNAかDNAのどちらかのアナログか派生物といったような本鎖の、そして/または、二本鎖のポリヌクレオチドを言及する。

また、「核酸」という用語に含まれているのは、ペプチド核酸(PNA)、ホスホロチオエート

40

50

DNA, 他のそのようなアナログおよび派生物やそれの組み合わせなどの核酸のアナログだ。核酸はデオキシリボ核酸(DNA)とリボ核酸(RNA)といったようなポリヌクレオチドを言及する。また用語は同等、誘導体、変異そしてヌクレオチドアナログ、一本鎖(センスまたはアンチセンス)と二本鎖のポリヌクレオチドから作られたRNAかDNAのアナログも含んでいる。デオキシリボヌクレオチドはデオキシアデノシン、デオキシシチジン、デオキシグアノシン、およびデオキシチミジンを含んでいる。リボ核酸に関しては、ウラシル塩基はウリジンだ。

【0097】

ここに使用されるように、「核酸分子コード化」は特異タンパクかペプチドの表現を指示する核酸分子を言及する。核酸配列はリボ核酸に転写されるDNA鎖系列とタンパク質かペプチドに翻訳されるリボ核酸配列の両方を含んでいる。核酸分子は完全な長さの核酸配列と完全な長さの熟したポリペプチドから生成された非完全な長さの配列含んでいる。例えば、先駆配列を欠いている完全な長さのポリペプチドのようなもの。またここに、目的のため、核酸配列は天然配列の縮退コドンか特定の宿主にコドン選択を提供するため紹介できる配列を含んでいる。

【0098】

ここに使用されるように、「ポリヌクレオチド」という用語は少なくとも2つの繋がっているヌクレオチドかデオキシリボ核酸(DNA)、リボ核酸(RNA)とヌクレオチドアナログまたはリン酸ジエステル結合以外のphosphotriester結合 phosphoramidate結合、phosphorothioate結合チオエステル結合、またはペプチド結合(ペプチド核酸)といったような骨格結合を含むDNAかRNA誘導体を含むヌクレオチド誘導体を持つオリゴマーかポリマーを言及する。「オリゴヌクレオチド」という用語も「ポリヌクレオチド」と共にここに本質的には同じ意味で使用される。しかし、当業者は、オリゴヌクレオチド例えば、PCRプライマーが一般に、長さにおいて約50-100ヌクレオチド未満であると認める。

ポリヌクレオチドはポリヌクレオチドの大規模分化を考慮する大規模改質ヌクレオチドを含むヌクレオチドアナログ、ポリヌクレオチドの検出を考慮する蛍光、放射性、発光か化学発光ラベルといった検出可能のラベルを含むヌクレオチド、ポリヌクレオチドの固相担体への固定化を促進するビオチンまたはチオール基といった反応基を持つヌクレオチドを含むことができる。ポリヌクレオチドも化学的に、酵素的に、光分解で開裂できる1個以上の背骨結合を含むことができる。例えば、ポリヌクレオチドは1つ以上のデオキシリボヌクレオチドに引き続く1つ以上のリボヌクレオチド、またそれに引き続く1つ以上のデオキシリボヌクレオチドというものを含むことができる。こういう配列はリボヌクレオチド配列においてベース加水分解で開裂可能である。ポリヌクレオチドも開裂に比較的に耐性のある1個以上の結合を含むことができる。例えば、キメラオリゴヌクレオチドプライマーは、リン酸ジエステル結合か他の適当な結合によって繋がっている3'末端でペプチド核酸結合と少なくとも1つのヌクレオチドで繋がっているヌクレオチドを含むことができ、そしてポリメラーゼによって広げられる。周知の方法を使用することでペプチド核酸配列を作ることができる(見ること、例、ウィーラーなどの核酸Res.25:2792-2799(1997))。

【0099】

ここに使用されるように、2個のタンパク質か核酸の間の「類似性」はタンパク質のアミノ酸の配列か核酸のヌクレオチド配列の間の同系性を言及する。類似性は恒等の度合い、そして、残留の配列相同性および、そこに含まれた残留に基づくことができる。タンパク質か核酸の間の類似度を算定するための方法は芸術におけるそれらの技能にて知られている。例えば、配列相同性を評価する1つの方法では、2つアミノ酸かヌクレオチド配列が配列の間の最大レベルの恒等をもたらすように整列している。「恒等」はアミノ酸かヌクレオチド配列が不变である範囲を示す。また、アミノ酸配列の整列およびある程度ヌクレオチド配列の整列は、アミノ酸またはヌクレオチドの中で保存している違い、そして/または、頻繁な代替を考慮に入れることができる。保存している違いは、かかわった残留の物理化学の特性を保持するものだ。整列は、グローバル(すべての残留を含む全長の上

10

20

30

40

50

の比較された配列の整列)である場合もまたはローカル(もっとも同様である地域だけを含む配列部分の整列)である場合もある。

【0100】

恒等そのものは芸術で認識された意味を持っていて、公になった技術使用によって計算できる。(見ること: コンピュータによる分子生物学、レスク、A.M.、教育、; オックスフォード大学出版局、ニューヨーク、1988、バイオコンピューティング、情報学およびゲノム企画、スミス、D.W.教育、アカデミックプレス社、ニューヨーク、1993; 配列データのコンピューター解析、パート I、グリフィン、A.M.およびグリフィン、H.G.、eds.、ヒューマナプレス社、ニュージャージー1994分子生物学の配列分析、フォンヒエンジ、G.、アカデミックプレス社、1987; と配列分析プライマー、グリブスコブ、M.とデベロー、J.、eds.、Mストックトンプレス社、ニューヨークは1991)。2つのポリヌクレオチドかポリペプチドの間のアイデンティティを測定するための多くの方法が存在しているが、「アイデンティティ」という用語は当業者(カリロとH.トリプトン、D.、シャムJ応用数学48:1073(1988))の間でよく知られている。

10

【0101】

ここに使用されるように、同種((核酸、そして/または、アミノ酸配列に関する)は25%以上の配列相同性、通常25%以上、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%または95%の配列相同性を意味する。必要なら、正確な割合を指定できる。目的のために、「相同性」と「恒等」という用語はここに、別に指定されない場合は、しばしばほとんど同じ意味で使われることもある。一般に、パーセンテージ相同性または恒等の決断に配列は、最も高いオーダーマッチを入手するように、並べられる。(見ること: コンピュータによる分子生物学、レスク、A.M.、教育、; オックスフォード大学出版局、ニューヨーク、1988、バイオコンピューティング、情報学およびゲノム企画、スミス、D.W.教育、アカデミックプレス社、ニューヨーク、1993; 配列データのコンピューター解析、パート I、グリフィン、A.M.およびグリフィン、H.G.、eds.、ヒューマナプレス社、ニュージャージー1994分子生物学の配列分析、フォンヒエンジ、G.、アカデミックプレス社、1987; と配列分析プライマー、グリブスコブ、M.とデベロー、J.、eds.、Mストックトンプレス社、ニューヨークは1991カリロなど(1988)シャムJ応用数学48: 1073)。配列相同性で、保存されたアミノ酸の数は標準整列アルゴリズムプログラムで測定され、各供給者によって確立されるデフォルトギャップペナルティと共に使用できる。

20

実質的に相同性の核酸分子は通常あまり高くない厳密性か関心ある核酸の全長さにわたる高い厳密性において交配される。また、熟考されているのは交配核酸分子の中のコドンに代わって、退化コドンを含む核酸分子である。

30

【0102】

少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一か相同であるアミノ酸配列かヌクレオチド配列を持つ何か2個の分子はファスタプログラムといった知られているコンピューターアルゴリズムを使用することで決定できる。例えば、ピアソンなど(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444(他のプログラムはGCGプログラムパッケージ(Devereux, J.など、核酸研究、12(1):387 (1984) BLASTP, BLASTN, 40 FASTA(Atschul, S.F., など., J Molec Biol 215:403 (1990)を含む); Hugeコンピュータへのガイド、マーチンJ.司教(教育)、アカデミックプレス社、サンディエゴ、1994、およびカリロなど(1988)のシャムJ Applied Math48:1073)の使用。例えば、バイオテクノロジー情報ナショナルセンターのBLAST機能はデータベースはアイデンティティを決定するため使用できる。他の商業的または公的に利用可能なプログラムがDNAスター"MegAlign"プログラム(マディソン、WI)とウィスコンシンジェネティクスコンピュータグループ大学(UWG)「ギャップ」プログラ(ムマディソン、WI)を含む。タンパク質、そして/または、核酸分子のパーセント相同かアイデンティティがGAPコンピュータ・プログラムを使用し、配列情報を比較することによって決定できる。(例えば、スミスとウォーターマン(1981) Adv. Appl. Math.

40

50

2:482によって改訂されたニードルマンなど(1970) J. Mol. Biol. 48:443). 簡潔に、GAPプログラムは相似を二つの配列のうちより短い配列のシンボルの総数に割られた同様の並べられたシンボル(すなわち、ヌクレオチドかアミノ酸)の数として定義する。GAPプログラムのためのデフォルトパラメタは以下のものを含むことができる。(1)単項比較マトリクス(アイデンティティのため1とノンアイデンティティのため0価値を含んでいる)とSchwartzとDayhoff、eds.ナショナル生物医学研究財団pp. 353 358 (1979); によって説明されたようなGribskovなどの加重比較マトリクス (1986) 核酸Res. (2) 各ギャップのための3.0のペナルティーと各ギャップの各シンボルのための追加0.10ペナルティー。そして、(3)終わりのギャップへのペナルティーなし。

【0103】

10

したがって、ここに使用されるように、「アイデンティティ」か「相同性」という用語はテストと参照ポリペプチドかポリヌクレオチドでの比較を表す。ここに使用されるように、少なくとも「90%同じ」という用語は参照核酸かポリペプチドのアミノ酸配列に対する99-99.99%のパーセントアイデンティティを言及する。90%以上のレベルのアイデンティティは、例証の推定がテストと参照ポリペプチドの100アミノ酸の長さが比較されると仮定して、テストポリペプチドの10%以下のアミノ酸は参照ポリペプチドのと異なるということを暗示している。テストと参照ポリヌクレオチドの間で同様の比較をすることができる。このような差異はポリペプチドの全長にわたって、ランダムに分布した、または許容できる最大まで例えば、10/100アミノ酸差(約90%のアイデンティティ)の異なった長さの1つ以上の位置に群生した点突然変異として表すことができる。差異は核酸かアミノ酸の置換、挿入または削除として定義される。約85-90%より上の相同性またはアイデンティティーのレベルでは結果はプログラムとギャップパラメターセットから独立している場合がある。このような高いレベルのアイデンティティーはしばしばソフトウェアに頼らずに手動の配列によって容易に評価できる。

20

【0104】

ここに使用されるように、参照ポリペプチドに示される特定なパーセンテージのアミノ酸からなるポリペプチドはポリペプチドと参照ポリペプチドとの間で共有される隣接同一であるアミノ酸の割合を言及する。SEQ ID NO:XXに記載されているアミノ酸の配列を持つ参照ポリペプチドに表される70%のアミノ酸からなるイソフォームは174アミノ酸を列挙する。これは、参照ポリペプチドがEQ ID NO:XXのアミノ酸配列に表される少なくとも103の隣接のアミノ酸を含んでいることを意味する。

30

【0105】

ここに使用されるように、整列している配列は、ヌクレオチドかアミノ酸の配列に対応位置を合わせるため、相同(類似性、そして/または、アイデンティティ)を使用することを言及する。通常、50%以上のアイデンティティによって関係づけられる2つ以上の配列が合わせられる。合わせられたセットの配列は、対応位置に整列し、ゲノムDNA配列と合わせられたRNAsから由來した整列配列例えば、ESTsと他のcDNAsを含む2つ以上の配列を言及する。

【0106】

40

ここに使用されるように、プライマは、適切な状況(例えば、4つの異なったヌクレオシド3リン酸塩とDNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼまたは逆転写酵素などなどといった重合剤面前で)、適切な緩衝と適切な温度のなかで、テンプレート向けのDNA合成の開始点の役割を果たせる核酸分子を言及する。ある核酸分子が「徹底的調査」かプライマーとして機能できるのが認められる。しかしながら、プライマーは、拡張のための3フィートの水酸基がある。プライマーは様々な方法で使われる。例えば、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、逆転写酵素(RT)-PCR、RNA

PCR、LCR、多重PCR、パンハンドルPCR、キャプチャ-PCR、表現PCR、3' と 5' レース、原位置PCR、結紮-仲介のPCRと他の増幅プロトコール。

ここに使用されるように、「プライマー対」は、増幅される配列(例えば、PCRによって)の5'エンドと雑種を生じる5'(上流)プライマーと増幅される配列の3'エンドの相補体と

50

雑種を生じる3' (下流) プライマーを含むプライマーのあるセットを言及する。

ここに使用されるように、「特に、雑種を生じる」というのは核酸分子(例えば、オリゴヌクレオチド)の目的の核酸分子に相補的塩基対合によるアニーリングを言及する。当事者は、特定な雑種形成に影響を与えるインビトロとインビボパラメタになじみ深いだ。例えば、特定の分子の長さと構成。特に生体外の交配に関連しているパラメタは、さらに、アニーリングと洗浄温度、緩衝液組成および塩濃度を含んでいる。高い厳密性で非特定束縛核酸分子を取り外すための典型的な洗浄状況は0.1 x SSPE, 0.1% SDS, 65 °C, で、そして培地厳密性での典型的な洗浄状況は0.2 x SSPE, 0.1% SDS, 50 °Cである。同等な厳重性状況は当事者に良く知られている。特定のアプリケーションに適切である目標核酸分子に核酸分子の特定な交配を達成するように当事者は、これらのパラメターを容易に調整できる。

10

【0107】

ここに使用されるように、製品と実質的に同じであることは十分同様であることを意味するので対象の特性も実質的に変更していない。だから、製品に代わって、実質的に同じである製品は使えられるここに使用されているように、当事者がもう理解しているように、「実質的に同じである」と「同様」という表現は場合によってことなることがある。

【0108】

ここに使用されるように「対立遺伝子多型」という用語も、遺伝子の対立遺伝子多型の変形によってコード化されるタンパク質を意味するために使われています。典型的に、遺伝子の参照形は、集団や種の単一のリファレンスマンバーからポリペプチドの野生型または優勢型をエンコードします。典型的には、種の間に異変体を含む対立遺伝子多型が、通常、同種からの野生型または優勢型と少なくとも80%、90%またはそれ以上のアミノ酸相同性がある；アイデンティティの程度は、比較が種間または種内であるかどうか、そして、遺伝子に依存する。一般的には、種内の対立遺伝子多型が野生型または優勢型と少なくとも80%、85%、90%以上のアイデンティティで、ポリペプチドの優勢型または野生型と96%、97%、98%、99%以上のアイデンティティを含む。ここにで対立遺伝子多型への参照は、一般に同じ種のメンバーの間で、バリエーションnタンパク質 (variations n proteins) に言及します。

20

【0109】

ここに使用されるように、「対立遺伝子多型」で取り換えられて、使われている「対立遺伝子」は、遺伝子またはその部分の代わりの形に言及します。

30

対立遺伝子が相同染色体では同じ遺伝子座や位置を占めている。対象が遺伝子の2つの同一の対立遺伝子を持っている場合、対象はその遺伝子または対立遺伝子にとってホモ接合性であると言われています。対象が遺伝子の2つの異なる対立遺伝子を持っている場合、対象は遺伝子にとってヘテロ接合であると言われています。特定の遺伝子の対立遺伝子は、お互いと単一のヌクレオチドまたは複数のヌクレオチドでは、異なることができ、ヌクレオチドの置換、削除、挿入を含むことができます。遺伝子の対立遺伝子も、突然変異を含んでいる遺伝子の形であります。

【0110】

ここに使用されるように使用されるように、種の変異体は、さまざまな動物種(例えばマウスや人など)を含むさまざまな種間でのポリペプチドの変異体に言及します。

40

【0111】

ここに使われるよう、スプライ異変体は、複数種類のmRNAをもたらすゲノムDNAの一次転写産物の微分処理によって生み出される異変体に言及します。

【0112】

ここに使用されるように使用されるように、プロモーターという用語は、RNAポリメラーゼの結合と転写の開始を提供するDNA配列を含む遺伝子の一部を意味します。プロモーター配列は、一般に、しかし、常ではなく、遺伝子の5' 非コード領域で見つかります。

化学的合成する際、ここに書いてある分離や精製されたポリペプチドや蛋白質や生理

50

活性物質は蛋白質が派生された細胞又は組織の細胞物質や汚染する蛋白質又は化学的前駆体や他化学から物質的に切り離される。もし、この調合液 { ちょうごう えき } はさらに精製しても物質の物理的 { ぶつり てき } および化学的性質例：酵素および生物学的活性 { せいぶつがく てき かっせい } が検出で明確にならない様な精製或いは十分の精製を洗い出せる機能で充実した方法標準分析方法例：薄層 { はくそう } クロマトグラフィー (TLC) 、ゲル電気泳動、高速液体 { こうそく えきたい } クロマトグラフ分析 (HPLC) { でんき えより定められた容易 { ようい } に検出される汚染物質から離れていけば、これは確実に切り離されたと見なされる。確実に化学的純物質を作れる精製方法は標準分析方法の特殊です。ここ化学的純物質だと言っても、立体異性体のミックスチャーがある可能性が高いので、さらに、精製することにより、物質の独特な活性を拡大できる。

10

【 0 1 1 3 】

細胞物質から実質的に分離する方法とは細胞から分離された或いは組み換えて作られた物質から分離し、蛋白質の生産すると言うことを示す。具体的に、普段 20 % 或いは 10 % 或いは 5 % 以下なのですがここノンプロテアーゼ { けつごう } タンパク質 (ここ汚染する蛋白質とも言える) の 30 % (乾燥重量法) 以下が入ってあるプロテアーゼ { けつごう } タンパク質の生産する。プロテアーゼ { けつごう } タンパク質又は生理活性物質が組み換えて作られた場合も、養培地 (養培地とは 20 %、10 %、5 % 又は以下のプロテアーゼ { けつごう } タンパク質の生産を示す) から実質的に分離される。

化学的前駆体や他化学物から物質的に分離する方法は蛋白質合成の時、使用された化学的前駆体や他化学物から蛋白質を分離し、プロテアーゼ { けつごう } タンパク質の生産を示す。作られたプロテアーゼ { けつごう } タンパク質において、化学的前駆体やノンプロテアーゼ化学物又は部分が 30 % (乾燥重量法)、20 %、10 %、5 % 以下に限る。

20

【 0 1 1 4 】

ここで使用された合成物質例：合成核酸分子や合成遺伝子や合成 { ごうせい } ペプチド { かくさん ぶんし } とは、組み換えおよび/又は化学合成方法より核酸分子やポリペプチド分子の生産を示す。

組み換え方法で生産するとは、組み換えDNA法で生産するつまり、クローニングされたDNAでコードされた蛋白質を説明するため、使う一番良く知られている方法の使用。

30

ベクター (又はプラスミド) とは、発現又は複製のため、細胞に異種核酸を導入する際、使用される離散要素を示す。ベクターは普段エピソームとして複製 { ふくせい } するのですが、ゲノムでの染色体における遺伝子又はその部分の統合に影響を及ぼせるような形に変えられる。それに加えて、いくつかの人工的染色体例：イースト、哺乳類がベクターでそれぞれの選定と使い方がこの分野でよく知られている。 { ふくせい }

【 0 1 1 5 】

ここで使用された発現ベクターで調節配列 (例：このようなDNAフラグメントの発現に影響を与えるプロモータ領域) { りょういき } と動作可能なようにリンクされているDNAを発現できるベクターが含まれている。このような追加のセグメントは、プロモーターおよびターミネーター配列を含めることができるし、任意的に複製の一つか複数の起源、一つか複数の選択マーカー、エンハンサー、ポリアデニル化信号を含めることができる。

40

普段、発現ベクターがプラスミドか { いでんし ちょうせつ はいれつ } ウィルスDNAから派生され、両方の成分が持てる可能性がある。したがって、発現ベクターが組み換えDNA或いはRNA構造 (例：プラスミド、ファージ、組み換えウィルス又は適切な宿主細胞に導入してクローニングされたDNAの発現を結果として出せる他のベクター) を示す。これは当技術分野で良く知られているし、真核細胞及び/又は原核細胞に複製可能な、エピソームのままか宿主細胞のゲノムに統合されるベクターを含む。 { しゅくしゅ さいぼう }

【 0 1 1 6 】

50

ここに書いてある様に、ベクターがウイルスベクターも含む。これはもともと外来遺伝子を細胞に転送する（媒体）ように、外来遺伝子と動作可能なようにリンクされている人工ウイルスである。

DNAセグメントを参照する時、使用した言葉「動作可能なようにリンクされた」とは、本来の目的（例：転写がプロモーターに開始し、コーディングセグメントを通してターミネータヘに向かう）を達成できるように、セグメントが互換的に付き合わせて配列されると言う意味を示す。

【0117】

ここで書かれている「生体 { せいたい } サンプル」とは、生物やウイルス源から得られたサンプルさらに、そこに核酸や蛋白質や高分子が抽出できる細胞や細胞の組織が含まれていると言う意味です。しかし、このサンプルは体液（例：血液、プラズマ、血清、脳脊髄液、滑液、尿、汗、動植物からの細胞の組織と臓器サンプル）のみならず土壤や水と他の環境サンプル、ウイルス、細菌、菌類、藻類、原生動物と物質も含める。したがって、細菌、ウイルス、他食品の汚染と環境がサンプルとして使われる。普段、生体サンプルが使われているのですがいくつか（例：プロファイリング）の場合、どのサンプルでも検査に使用できる。

高分子とは、数百から数百万の分子量を持つと言う意味で、ペプチド、蛋白質、又クレオチド、核酸と普段生物体より合成されるが合成的又は組み換え分子生物学方法より生産される他のこのような分子が含まれている。

【0118】

ここで書いてある「生体高分子」とは、二つ又はその以上の単量体サブユニットやデリバティブより構成され、それからボンドや高分子でリンクされた生体分子を含める。例えば：ポリヌクレオチド、ポリペプチド、炭水化物、脂質、デリバティブ、又はその組み合わせ。核酸分子ではそれぞれペプチド核酸部又は糖蛋白質が含まれている。生体高分子は核酸、蛋白質、多糖、脂質、他高分子を含めるのですがただそれに限定されない。核酸ではDNA, RNAとそのフラグメントが含まれている。核酸はゲノムDNA、RNA、ミトコンドリア核酸、葉緑体の核酸、別の遺伝物質のある他の細胞小器官より抽出できる。

【0119】

ここで、生体分子は自然またはその誘導体で発見された化合物である。生体分子はオリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオシド、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、ペプチド核酸（PNAs）、オリゴ糖類と单糖類などを含むが、それに限定されない。

ここで、生物学的小片は、ウイルス（例えば包装された核酸の有無にかかわらないウイルス・ベクトルまたはウイルス・キップシッド）、ファージ・ベクトルまたはファージ・キップシッドを含むファージ（カプセル化された核酸の有無にかかわらない）、真核および原核細胞またはその断片を含む单細胞、リポソームまたは、ミセルエージェントまたはその他の包装粒子とそのような他の生物学的材料などに言及している。

【0120】

ここで、組成物は、どんな混合にでも言及します。これは、溶液、懸濁液、液体、粉末、ペースト、水性、非水性あるいはそのどんな組合せでもあり得る。

ここで、化合は二つ以上のアイテムの間でどんな会合にでも言及します。

化合は、2つ以上のアイテムを1つの混合物、またはそれらの任意の変化など、その混合物であることができる2つの組成物または2つのコレクションなど、2つ以上の個別の項目でありえる。

ここで、キットはパックされた組合せに言及します。そして、それらの使用のために任意に指示や試薬を含む。

ここで、流体は流れることのできるどんな組成物にでも言及します。流体はこのように半固体、ペースト、溶液、水性混合物、ゲル類、ローション、クリームとその他の組成物の形態である組成物を包含する。

ここで、抗原手段は、ポリペプチドが免疫応答を誘導することを確認します。高抗原性ポ

10

20

30

40

50

リペプチドは、再現性よく、そして、予測可能性に免疫応答を誘発する。

【0121】

ここで、医薬効果や治療効果が病気または障害の治療、または、その徴候の改良を目的とする薬剤の投与を観察される効果に言及します。

ここで使用されるように、「病気や障害」は原因や状態に起因する生体内の病的状態に言及し、感染症、取得状況、遺伝的状況などを含むがそれに限定されていない。そして、識別可能な症状によって特徴づけられている。

ここで、標的タンパク質によって調停されるものと標的タンパク質が病因または病理学で役割を果たすものを含む特異的標的タンパク質を関与した病気と障害は関心あるものである。

【0122】

ここで、典型的な標的タンパク質と関連する病気と障害は、どこか他の所で記述されている。

ここで、病気や状態のある対象の「治療」は対象の症状が部分的または完全に緩和されていること、または治療後、静的のままであることを意味します。

したがって、治療は予防、治療、治療法を含みます。

予防は、潜在的病気の予防や病気の症状または進行の悪化の防止に言及します。

治療は、ここで提供されている組成物と変更されたインターフェロンのいずれかの製薬学的用途をも含む。

ここで、治療剤、治療的な療法、放射線防護体または、化学療法薬は、従来の薬と薬物治療（ワクチンを含む）を意味します。そして、それは当業者に知られています。放射線治療薬は、当技術分野でよく知られている。

ここで、治療はどんな方法でも、症状、障害、病気や他の徴候が改善されるかまたは、有利に変更されるかということを意味します。

ここで、治療効果は、対象の治療に起因する効果が変化すること、典型的に向上することや病気または状態の症状を改善すること、または、その治療法を状態や病気を治療することを意味します。治療的に有効な量は、対象に投与後の治療効果をもたらす組成物、分子または化合物の量を意味する。

ここで、「主題」というテーマは、哺乳類（例えば人間）を含む動物に言及します。ここで、患者は被験者に言及します。

【0123】

ここに使われるよう、特定の病気の症状または障害の治療による改良（例えば医薬組成物または他の治療的な投与による）が、永久であるか一時的であるか、続いているか、一時的であるかといった組成物または治療的投与に起因し、または関連した症状のどんな軽減にも言及している。

ここに使われるよう、防止または予防は、病気または状態を進展させる危険の軽減方法に言及します。

【0124】

ここに使用されるよう、有効な量と言うのは予防する事、回復する事、改善する事、捕まえる事あるいは部分的に病気または身体の異常の症状を捕まえるための必要な治療薬の量です。

ここに使用されるよう、管理はそこからの抗体やprotectionがターゲットタンパク質に触れられる方法を示します。管理は生体内のヴィーヴォや、生体外のヴィーヴォや生体内のヴィトロで有効出来ます。例えば、生体外のヴィーヴォ管理において、血液などのような体液は、対象から取り除かれてボディーでそこからの抗体や部分に触れられる。生体内ヴィーヴォの管理において、ローカル、局部的、体系的または/あるいは導入の他のルートなどを通して、そこからの抗体や部分をボディーに導入ができる。生体内のV

10

20

30

40

50

イトロ管理において細胞培養方法などの方法を包含します。

ここに使用されるように、1服用量フォームは芸術で知られている通り、人間と動物対象に適する事または個別にそのままでパッケージされた物理的な離散の1服用量を言及します。

【0125】

ここに使用されるように、ただ一つの投与量定式化は直接投与について定式化について言及します。

ここに使用されるように、「生産品物」は作られて販売される製品です。このアプリケーションでずっと使用されるように、この用語がコンパイルされたgermline抗体やパッケージ品物の中から得られた抗体を取り囲むことを意図されています。 10

ここに使用されるように、流体は流れることが出来る構成の事である。その結果、流体は準固体、ペースト、解答、水の混合物、ゲル、ローション、クリーム、および他のこのような形である構成を包含します。

ここに使用されるように、動物の中には靈長類である人間、ゴリラ、および猿を除いてどんな動物が含まれますが、例えば齧歯動物であるハツカネズミやネズミなど、鶏であるチキンなど、反芻動物であるヤギ、牛、鹿、羊など、哺乳動物であるブタや他の動物などが含まれる。非人間動物は熟考された動物として人間を除きます。ここに提供されたgermlineセグメントと生じた抗体は動物、植物、原核生物、菌性植物のソースから由来している。ほとんどのgermlineセグメントと生じた抗体が、哺乳類を含んで、全ては動物から由来されています。 20

【0126】

ここに使用されるように、コントロールは実質的に診察サンプルと同じサンプルを示しますが、違う点の中にはそれがテストパラメタで扱われないまたはサンプル血漿試料であれば、好みの状態で影響を受けず、普通のボランティアから来ることができるのが挙げられる。コントロールも内部コントロールであるかもしれません。

【0127】

ここに使用されるように、単数が形成される、「a」、「an」と「the」は文脈が別の方法で明確にされない場合、複数の指示物を含みます。したがって、参照化合物の場合、もし「細胞外ドメイン」を合成すれば、一つか多数の細胞外ドメインがある化合物を包含します。 30

ここに使用されるように、範囲と量は、「について」で表れ、特定の値や範囲を示します。「についても」には正確な量が含まれます。

したがって、「約5個のベース」は、「約5個のベース」を意味し、また、「5個のベース」をも意味します。

ここに使用されるように、「任意である」や「任意に」は、次に説明された出来事が発生するかどうかを意味しています。そして、説明の中には、前述の出来事や状況が起る例と起こらない例が含まれています。例えば、任意に代用されたグループと言うのは、グループが非代用されるか、または代用されるかを意味します。

【0128】

ここに使用されるように、それぞれの共通使用に合っているどんな保護的なグループ、アミノ酸と他の化合物に対しての略語は別の方法で示されない限り、認められた略語、または生化学的な学術用語に対してのIUPAC-IUB委員会が記述されています。(1972) 生物化学、11:1726、参考) 40

B.

DLL4

ここに提供しているのは、抗体や明確に人間のデルタのような配位子4(DLL4)に固まる抗原結合抗体フラグメントです。

【0129】

50

1.

構造

DLL4 (SEQ ID

NO: 114 で先へ設定され、ヌクレオチド配列によってSEQ ID NO:113で先へ設定され、コード化されています。) はNotch膜貫通受容体のための膜貫通タンパク質配位子です。その細胞外領域は8つのEGFのような反復と同様に、すべてのNotch配位子の中に保存された、受容体結合に必要なDSLドメインにを含みます。また、このタンパク質は膜貫通領域と触媒作用のモチーフのない細胞質尾部をも含んでいます。人間DLL4は685アミノ酸タンパク質であり、SEQ ID NO: 114で先へ設定されたアミノ酸に対応する、以下のドメインを含んでいます。シグナル・ペプチド(アミノ酸1-25)；MNNL(アミノ酸26-92)；DSL(アミノ酸155-217)；EGF-Like1(EGF1；アミノ酸221-251)；EGF-Like2(EGF2；アミノ酸252-282)；EGF-Like 3(EGF3；アミノ酸284-322)；EGF-Like 4(EGF4；アミノ酸324-360)；EGF-5(EGF5；アミノ酸366-400)；EGF-Like 6(EGF6；アミノ酸402-438)；EGF-Like 7(EGF7；アミノ酸440-476)；EGF-Like 8(EGF8；アミノ酸480-518)；筋肉膜(アミノ酸529-551)；そして、細胞質ドメイン(アミノ酸553-685)。

10

20

30

40

50

【 0 1 3 0 】

2.

表現

DLL4は様々な組織で広く表れます。この表現は主に脈管構造に局所化されています。それは、通常の血管発生に必要であり、腫瘍血管の上で表現されます。それは腫瘍新脈管形成の間の血管でupregulatedされます、そして、表現はVEGFシグナリングに依存しています。DLL4もリポ多糖類や、インターロイキン-1 や、Tollのような受容体4配位子や他の代理扇動的刺激などのような代理扇動的刺激に露出された活性化マクロファージとNotch小道劇を通してこのシグネーリングはマクロファージ活性化で特徴付けられた炎症状態において役割をはたします。(Fung その他 (2007) *Circulation*, 115: 2948-2956)。

【 0 1 3 1 】

3. 機能

DLL4は、Notch受容体に結合します。進化的保存されたNotch経路は、多くの開発プロセスの重要な調節因子ならびに、自己更新臓器システムです。無脊椎動物から哺乳類、Notchシグナルは、無数の細胞運命決定へガイドし、増殖、分化、アポトーシスに影響を与える。(ミーレとオズボーン (1999) *J Cell Physiol*, 181 : 393-409)。ノッチの家族は、DSLの遺伝子ファミリー(線虫C.

*elegans*からデルタとショウジョウバエからSerrateのためのラグ- 2という名前)の膜結合リガンドによって活性化される構造的な保存された細胞表面受容体で構成されています。哺乳類は、4つのレセプター(ノッチ1、ノッチ2、ノッチ3とノッチ4)と5つのリガンド(ギザギザ1、ギザギザ2、DLL1、DLL3とDLL4)をもっています。隣接細胞の上に提示リガンドによって活性化されると、Notch受容体は、連続したタンパク質分解切断を受ける；A DAMプロテアーゼによって仲介された細胞外切断及び セクレターゼによって仲介されたt rnamembrane領域の中の切断である。これはノッチ細胞内ドメイン(ニッカド)の発散につながり、細胞核へ移行し、DNA結合性タンパク質、RBP-Jk(別名CBF1/Su(H)/Lag-1のためのCSL)と他の転写共同因子と転写複合体を形成します。ノッチの活性化の主な標的遺伝子は、HES(毛深い/強化スプリット)の遺伝子ファミリーとHESに関する遺伝子(Hey, CHF, HRT, HESR)を含み、組織と細胞型に特有の方法で下流の転写効果器を順番に調節する。(Iso et al. (2003) *J Cell Physiol*, 194 : 237-255; Liとハリス (2005) ガン細胞8:1-3)。

Notch受容体によるシグナル伝達は、細胞プロセスのバラエティに富んでおり、造血幹細胞の通常のメンテナンスと白血病性形質転換などを含むがそれに限定されていない (HSCs; ロッパーとアイドゥー (2004) *Pathol. Oncol. Res.*, 10:69-73) ; 脳ガンだけでなく通常のメンテナンスにおいても含む神経幹細胞のメンテナンス (ロッパーとアイドゥー (2004) *Pathol. Oncol. Res.* 10: 69-73) ; Purwoその他 (2005) ガン研究 65:2353-6365 : 2353-63; ハラハーンその他 (2004) ガン Res. 64:7794-800) ; リンパ芽球性白血病/リンパ腫に含まれる人のガンの数世代 (Elliisenその他 (1991) セル、66: 649-61) ; Robey その他 (1996) セル、87:483-92; Pear その他 (1996) *J. Exp. Med.* 183:2283-91; Yan その他、(2001) 血 98:3793-9; Bellavia その他 (2000) *EMBO J.* 19:3337-48; Pear と Aster (2004) *Curr. Opin. Hematol.*, 11:416-33) ; 乳がん (Gallaher & Callahan (1987) *J. Virol.*, 61:66-74; Brennan & Brown (2003) 乳がん Res., 5:6; Politi その他 (2004) *Semin. 癌生物学*, 14:341-7; Weijzen その他. (2002) *Nat. Med.*, 8:979-86; Parr その他 (2004) *Int. J. Mol. Med.*, 14:779-86) ; 子宮頸がん (Zagouras)

その他 (1995) PNAS, 92:6414-8) ; 腎細胞癌 (Rae その他 (2000) *Int. J. 癌*, 88:726-32) ; 頭と首扁平上皮癌 (Leethanakul その他 (2000) *Oncogene*, 19:3220-4) ; 子宮体がん (Suzuki)

その他. (2000) *Int. J. 癌.*, 17:1131-9) ; と神経芽細胞腫 (van Limpert その他. (2000) *Med. Pediatr. Oncol.*, 35:554-8).

Notch小道は血管成長の複合的見地、例えば増殖、移動、平滑筋分化、新脈管形成、および動脈に静脈の分化にもかかわります (Iso その他 (2003) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23:543) 。

【 0 1 3 2 】

特に、DLL4はNotch-1(Uniprot就任番号.P46531; SEQ ID NO: 899)とNotch-4受容体 (Uniprot就任番号.Q99466; SEQ ID NO: 900)を活性化します。DLL4は幹細胞の自己更新と軸の細胞の成長と多くの家系と腫瘍型の種類にかかわります (Wilson and Radtke (2006), (FEBS Lett), 580: 2860-8)。その上DLL4が血管成長にもかかわります。DLL4の単一遺伝子の削除の結果、脈管構造の開発における欠陥によって胚死率が引き起こされます (Duarte その他 (2004) *Genes Dev.*, 18:2474-8; Gale その他. (2004) PNAS, 101:15949-54; Krebs その他 (2004), *Genes Dev.*, 18:2469-73) 。

【 0 1 3 3 】

DLL4によって調停されたNotchシグナリングは胎児の血管成長にかかわります。例えば、新生児網膜で内皮細胞を育てるところにおけるDLL4表現はDLL4に対して網膜の血管成長において役割を表します。DLL4は腫瘍新脈管形成にもかかわります。 DLL4表現の下向き調整は、VEGFによって調停された内覆組織細胞増殖、移動、およびネットワーク形成 (Patel その他 (2005) 癌の Res. 65: 8690-7) を抑制します。しかし、血管由来の内覆細胞に対してのDLL4表現は、腫瘍新脈管形成と血管の増殖の負の調節として機能します (Ridgway その他 (2006) *自然*, 444:1083; Noguera-Troise その他 (2006) *自然*, 444:1032)。 DLL4の封鎖は、増加する新脈管形成に特徴付けられて、血管の発芽する事と分岐する事に関連しています。また、これは血管の機能の減少にも関連し、腫瘍の成長をへらします (Ridgway その他. (2006) *自然*, 444:1083; Noguera-Troise その他 (2006) *自然*, 444:1032)。それに従って、腫瘍血管密度からの腫瘍成長が離されることによって、DLL4機能は規制緩和された新脈管形成に関連しています。その結果、DLL4シグナリングを有効に妨げれば、造り出された新脈管形成を分裂させることによって、腫瘍成長が減少します。腫瘍成長の減少に通じる腫瘍血管の超増殖を引き起こす事によって、新脈管形成に対してのDLL4の抑制効果は伝統的な非新脈管形成と異なっています (Sainson and Harris (2007) *Trend Mol. Med.*, 13:389-395; Thurston その他 (2007),

10

20

30

40

50

Nat Rev. 癌 7:327-331)。また、DLL4を妨げると、腫瘍成長を減少させる事、化学療法剤治療の後に腫瘍成長を遅らせること、腫瘍由来の組織(Hoey その他 (2009) Cell Stem Cell, 5:168-177) 割合を減少させることによって、血管由来のメカニズムの如何にかかわらず腫瘍成長と発癌性細胞頻度は抑制されます。DLL4活動を妨げる事はHES1 (Hoeyその他 (2009) のCell Stem Cell, 5: 168-177)の減少する遺伝子表現に関連します。

【0134】

C. 抗体

ここに提供されている抗体は、DLL4の活動を調整し、DLL4の表現や活動に関連する病または状態の治療に利用することができる。そのような抗体は抗原結合部位を形成するのに十分であるVH鎖およびVL鎖を含んでいる。抗体はなお、定常領域を含むことができる。反DLL4抗体は実物大の抗体と抗原結合性抗体フラグメントを含み、フラグメントまたはその抗体の一部が抗原結合部位を形成するのに十分である。

ここに提供されている抗体メンバーのフラグメントまたはその一部にはFab, Fab', F(ab')₂, 一本鎖 Fvs (scFv), Fv, dsFv, diabody, Fd and Fd' フラグメント, Fab フラグメント, Fd フラグメント, scFv フラグメント, または

scFab フラグメントなどが含まれている。Fab抗体はこのような抗体の典型的である。

ここに提供されている抗体が分離された抗体を含んでいる。ここに提供される抗体またはフラグメントは、DLL4を結合する。抗体はDLL4のための結合親和性が 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M,

10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M, 10^{-12} Mかそれより低いのを含み、特に、ナノモルまたはサブナノモルの結合親和性をもつどれでも。例えば、それは 1×10^{-9} M, 2×10^{-9} M, 3×10^{-9} M, 4×10^{-9} M, 5×10^{-9} M, 6×10^{-9}

M, 7×10^{-9} M, 8×10^{-9} M, 9×10^{-9} M, 1

$\times 10^{-10}$ M, 2×10^{-10} M, 3×10^{-10} M, 4×10^{-10}

M, 5×10^{-10} M, 10^{-11} M, 10^{-12} Mかそれより低い。

【0135】

いくつかの実施態様では、抗体は具体的にDLL4を結合する。他の例では、抗体はDLL4と一つ以上の標的タンパク質のために、多特异性または二重特异性をもつ。それで、ここに提供される反DLL4抗体は二重特異または多選択性であり、少なくとも異なった2つの抗原のための結合の特异性を持っている。

例えば、反DLL4抗体はDLL4と少なくとも1つの他の標的タンパク質であるサイトカイン受容体、受容体キナーゼ、受容体ホスファターゼ、細胞間相互作用に関与する受容体または、細胞付着の分子のための結合特異性などを示すことができるたとえば、反DLL4抗体も標的タンパク質の結合特異性を示すことができ、VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3、上皮増殖因子受容体(EGFR) ErbB-2, ErbB-3,

IGF-R1, C-Met, TNF-R1, TNF-R2, BTLA, HVEM, LT-R, CD20, CD3, CD25, NOTCH, DLL4, DDR1 (ディスコイジンドメイン受容体)、CIT (受容体のためのキット)、FGFR1、FGFR2

、FGFR4 (纖維芽細胞の成長因子の受容体1、2、4)、RON (recepteur d'origine nantais

; 別名、1受容体を刺激しているマクロファージ) TEK (内皮特異的受容体チロシンキナーゼ)、TIE (免疫グロブリンとチロシンキナーゼそして、上皮成長因子の相同性ドメイン受容体)、CSF1R (colnglyは因子1受容体を刺激する)、PDGFRB (血小板由来増殖成長因子B受容体)、EPHA1、EPHA2、EPHB1 (エリスロポエチン産生細胞受容体A1, A2 とB1) (recepteur d'origine nantais; 別名、1つのレセプターを刺激しているマクロファージ)

、G-CSF-R、GM-CSF-R、EPO-Rカドヘリン (例p-カドヘリン)、インテグリン、CD5

2とCD44、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、PIGF、EGF、HGF、TNF-、光、リ

ンフォトキシン(LT)、IgE、G-CSF、GM-CSFとEPOなどを含むがそれに限定されていない。

普段、ここに提供し、示しているデュアルまたはマルチ特異的結合抗体が標的抗原のそれに対する結合親和性は 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M,

10

20

30

40

50

10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M, 10^{-12} Mか以下である。

【0136】

いくつかの態様において、抗体は、具体的にDLL4細胞外ドメインに結合する(ECD)たとえば、ここに提供されている反DLL4抗体は、ECDの範囲内で、どんな一つ以上のドメインでエピトープと結合します。そして、MNNL、DSL、EGF1、EGF2、EGF3、EGF4、EGF5、EGF6、EGF7またはEGF8ドメインなどを含むが、エピトープに限定されていない。特に、ここに提供されている反DLL4抗体が、ECDの範囲内でEGF8とEGF2との間にあるエピトープと結合し、たとえば、配列番号：114で述べられるDLL4のアミノ酸残基252～524の範囲内である。1つの例では、ここに提供されている反DLL4抗体は、配列番号：114で述べられるDLL4のアミノ酸252～280の範囲内のエピトープと対応するEGF2以内にあるECDの範囲内であるエピトープと結合します。

10

別の例では、ここに提供されている反DLL4抗体は、EGF3からEGF4領域に、配列番号：114で述べられるDLL4のアミノ酸残基283～360の範囲内で、エピトープと結合する。

【0137】

ここに提供されている反DLL4抗体は、受容体結合の通常の影響をまねする作用薬、または、受容体結合の通常の影響を妨げる拮抗薬を含む。

標的タンパク質と結合し、細胞内信号を調整する抗体は、特に興味のあるものである。

若干の具体化において、抗体は、生体内または試験管内で、DLL4活動を減らし、禁止し、妨害します

20

若干の具体化において、抗体はDLL4-リガンド(DLL4にNotch受容体結合を減らしてまたは妨害します)と結合することを、争います。

若干の具体化において、抗体は、DLL4関連の影響の一つ以上の面を調整することができ、どんな一つ以上の、Notch受容体活性化の縮小やブロッキング、Notch受容体の縮小や下流の分子シグナリングを妨げること、DLL4へのNotch受容体結合の崩壊やブロッキングまたは、内皮細胞増殖の昇進または、内皮細胞分化の抑制または、腫瘍脈管の散水の抑制または、腫瘍の治療や予防または、細胞増殖的な障害あるいは、ガン、またはDLL4発現に関連する障害の治療や予防または、Notch受容体表現や活動に関連した障害の活動や治療や予防などを含むが限定されていない。

反DLL4抗体によって調整される典型的な活動は、血管形成、腫瘍の成長または、腫瘍形成性の細胞頻度などを抑制することを含む。

30

ここに提供されている反DLL4抗体は、生殖細胞由来の反DLL4抗体または、その変更された抗体を含む。

また、ここに提供されている反DLL4抗体はDLL4と結合することに関係している一つ以上の相補性決定領域(CDR)をも含む。

【0138】

1. 生殖細胞由来反DLL4抗体

ここに提供されている反DLL4抗体は、人間の起源の生殖細胞系部分に由来するものを含みます。

典型的な抗体生殖細胞系源は、全国バイオテクノロジー情報(NCBI)センターのデータベース、国際的な免疫遺伝学情報システム(R)(IMGT)、カバット・データベースとトムリンソンのVBaseデータベースに限られていない(ルフラン(2003)核酸Res.31:307-310; ;

40

マーティン他、治療的な抗体のハンドブックの抗体工学のためのバイオインフォマティクスツールワイリーVCH(2007)、pp.104から107)などを含むが、それに限定されていない。

可変的な遺伝子部分は、 V_H , D_H , J_H , V_k , J_k , V_l と J_l を含みます。それゆえに、ここに提供されている反DLL4抗体の重い鎖は、 V_H , D_H , と J_H 生殖細胞系部分によってコード化されるアミノ酸を含みます

【0139】

50

表3は、典型的なヒト重鎖の生殖細胞系遺伝子部分を示しています。ここに提供されている反DLL4抗体の軽鎖は、V_k、J_k、V_lとJ_l生殖細胞系部分によってコード化されるアミノ酸を含みます。表4と5は、典型的なヒトの軽鎖の生殖細胞系遺伝子部分を示しています。

ここでの目的については、生殖細胞系部分はIMGT遺伝子名と以前にヒトゲノム解析機構(HUGO)命名法委員会の承認された定義を使って、示されています。

部分はIMGT命名法を使って名付けられ、最初の3文字は遺伝子座(IGH、IGKまたはIGL)を示し、第4の文字は遺伝子(例えば、V遺伝子のためにV、D-遺伝子のためにD、J-遺伝子のためにJ)を表し、第5の位置はサブグループの数を示し、そして、遺伝子番号分類を示しているハイフンが続きます。

対立遺伝子については、IMGT名の後に、星印と2数字番号が続きます。抗体生殖細胞系部分を特定するのにどんな望ましい命名規則でも用いられる。

ここでの目的については、殖細胞系部分(例、3-5表を参照)に由来した重鎖核酸配列または、軽鎖核酸配列を記述する時、どんな対立遺伝子でも特定されないで、VH生殖細胞系部分が、IMGT命名法を使って名付けられる。VK生殖細胞系部分がツアッハウ命名法を使って名をつけられる；そして、VL生殖細胞系部分は、川崎命名法を使って特定されます。DH、JH、JKとJL生殖細胞系部分は、IMGT命名法を使って名をつけられます。

【表3-1】

表3: 人重鎖の生殖細胞V遺伝子		Dセグメント		Jセグメント	
Vセグメント	IMGT番号	IMGT	対立遺伝子とIMGT番号	IMGT	対立遺伝子とIMGT番号
574	IGHV1-18*01	VH1-18	690	IGHD2-15*01	719
575	IGHV1-18*02		691	IGHD2-2*01	720
576	IGHV1-2*01		692	IGHD2-2*02	721
577	IGHV1-2*02	VH1-2	693	IGHD2-2*03	722
578	IGHV1-2*03		694	IGHD2-21*01	723
579	IGHV1-2*04		695	IGHD2-21*02	724
580	IGHV1-24*01	VH1-24	696	IGHD2-8*01	725
581	IGHV1-3*01		697	IGHD2-8*02	726
582	IGHV1-3*02	VH1-3	698	IGHD3-10*01	727
583	IGHV1-45*01		699	IGHD3-10*02	728
584	IGHV1-45*02	VH1-45	700	IGHD3-16*01	
585	IGHV1-45*03		701	IGHD3-16*02	
586	IGHV1-46*01	VH1-46	702	IGHD3-22*01	
587	IGHV1-46*02		703	IGHD3-3*01	
588	IGHV1-46*03		704	IGHD3-3*02	
589	IGHV1-58*01		705	IGHD3-9*01	
590	IGHV1-58*02	VH1-58	706	IGHD4-11*01	
591	IGHV1-69*01		707	IGHD4-17*01	
592	IGHV1-69*02		708	IGHD4-23*01	
593	IGHV1-69*03		709	IGHD4-4*01	
594	IGHV1-69*04		710	IGHD5-12*01	
595	IGHV1-69*05		711	IGHD5-18*01	
596	IGHV1-69*06	VH1-69	712	IGHD5-24*01	
597	IGHV1-69*07		713	IGHD5-5*01	
598	IGHV1-69*08		714	IGHD6-13*01	
599	IGHV1-69*09		715	IGHD6-19*01	
600	IGHV1-69*10		716	IGHD6-25*01	
601	IGHV1-69*11		717	IGHD6-6*01	
602	IGHV1-69*12		718	IGHD7-27*01	
603	IGHV1-69*13				
604	IGHV1-8*01	VH1-8			
605	IGHV1-c*01				
606	IGHV1-f*01				
607	IGHV1-f*02				
608	IGHV4-28*01	VH4-28			
609	IGHV4-28*02				
610	IGHV4-28*03				
611	IGHV4-28*04				
612	IGHV4-28*05				

10

20

30

40

【表3-2】

613	IGHV4-30-2*01				
614	IGHV4-30-2*02				
615	IGHV4-30-2*03				
616	IGHV4-30-2*04				
617	IGHV4-30-4*01				
618	IGHV4-30-4*02				
619	IGHV4-30-4*03				
620	IGHV4-30-4*04				
621	IGHV4-30-4*05				
622	IGHV4-30-4*06				
623	IGHV4-31*01				
624	IGHV4-31*02	VH4-31			
625	IGHV4-31*03				
626	IGHV4-31*04				
627	IGHV4-31*05				
628	IGHV4-31*06				
629	IGHV4-31*07				
630	IGHV4-31*08				
631	IGHV4-31*09				
632	IGHV4-31*10				
633	IGHV4-34*01	V4-34			
634	IGHV4-34*02				
635	IGHV4-34*03				
636	IGHV4-34*04				
637	IGHV4-34*05				
638	IGHV4-34*06				
639	IGHV4-34*07				
640	IGHV4-34*08				
641	IGHV4-34*09				
642	IGHV4-34*10				
643	IGHV4-34*11				
644	IGHV4-34*12				
645	IGHV4-34*13				
646	IGHV4-39*01	VH4-39			
647	IGHV4-39*02				
648	IGHV4-39*03				
649	IGHV4-39*04				
650	IGHV4-39*05				
651	IGHV4-39*06				
652	IGHV4-39*07				
653	IGHV4-4*01				
654	IGHV4-4*02				
655	IGHV4-4*03				

10

20

【表 3 - 3】

656	IGHV4-4*04				
657	IGHV4-4*05				
658	IGHV4-4*06				
659	IGHV4-4*07	VH4-4			
660	IGHV4-59*01	VH4-59			
661	IGHV4-59*02				
662	IGHV4-59*03				
663	IGHV4-59*04				
664	IGHV4-59*05				
665	IGHV4-59*06				
666	IGHV4-59*07				
667	IGHV4-59*08				
668	IGHV4-59*09				
669	IGHV4-59*10				
670	IGHV4-61*01				
671	IGHV4-61*02				
672	IGHV4-61*03				
673	IGHV4-61*04				
674	IGHV4-61*05				
675	IGHV4-61*06				
676	IGHV4-61*07				
677	IGHV4-61*08	VH4-61			
678	IGHV4-b*01				
679	IGHV4-b*02				
680	IGHV5-51*01				
681	IGHV5-51*02				
682	IGHV5-51*03	VH5-51			
683	IGHV5-51*04				
684	IGHV5-51*05				
685	IGHV5-a*01				
686	IGHV5-a*03				
687	IGHV5-a*04				
688	IGHV6-1*01	VH6-1			
689	IGHV6-1*02				

10

20

【表4-1】

表4: ヒト経鎖の生殖細胞のカッパVの遺伝子				
配列番号	対立遺伝子とIMGT	ヴァッハウ	配列番号	Jセグメント
729	IGKV1-12*01	L5	795	IGKJ1*01
730	IGKV1-12*02			
731	IGKV1-13*02	L4/18a		
732	IGKV1-16*01	L1		
733	IGKV1-17*01	A30		
734	IGKV1-17*02			
735	IGKV1-27*01	A20		
736	IGKV1-33*01	018		
737	IGKV1-37*01	014		
738	IGKV1-39*01	012		
739	IGKV1-39*02	012a		
740	IGKV1-5*01	L12		
741	IGKV1-5*02			
742	IGKV1-5*03	L12a		
743	IGKV1-6*01	L11		
744	IGKV1-8*01	L9		
745	IGKV1-9*01	L8		
746	IGKV1-NL1*01			
747	IGKV1/OR2-0*01	Z0		
748	IGKV1/OR2-108*01			
749	IGKV1D-12*01	L19		
750	IGKV1D-12*02			
751	IGKV1D-13*01	L18		
752	IGKV1D-16*01	L15		
753	IGKV1D-16*02	L15a		
754	IGKV1D-17*01	L14		
755	IGKV1D-33*01	08		
756	IGKV1D-37*01	04		
757	IGKV1D-39*01	02		
758	IGKV1D-42*01	L22		
759	IGKV1D-43*01	L23		

10

20

【表 4 - 2】

760	IGKV1D-8*01	L24		
761	IGKV2-24*01	A23		
762	IGKV2-28*01	A19		
763	IGKV2-29*02	A18b		
764	IGKV2-29*03			
765	IGKV2-30*01	A17		
766	IGKV2-40*01	011		
767	IGKV2-40*02	011a		
768	IGKV2D-24*01	A7		
769	IGKV2D-26*01	A5		
770	IGKV2D-26*02			
771	IGKV2D-28*01	A3		
772	IGKV2D-29*01	A2		
773	IGKV2D-29*02			
774	IGKV2D-30*01	A1		
775	IGKV2D-40*01	01		
776	IGKV3-11*01	L6		
777	IGKV3-11*02			
778	IGKV3-15*01	L2		
779	IGKV3-20*01	A27		
780	IGKV3-20*02			
781	IGKV3-7*01	L10		
782	IGKV3-7*02	L10a		
783	IGKV3-7*03			
784	IGKV3-NL1*01			
785	IGKV3-NL2*01			
786	IGKV3-NL3*01			
787	IGKV3-NL4*01			
788	IGKV3-NL5*01			
789	IGKV3/0R2-268*01			
790	IGKV3/0R2-268*02			
791	IGKV3D-11*01	L20		
792	IGKV3D-15*01	L16		
793	IGKV3D-20*01	A11		
794	IGKV3D-7*01	L25		

10

20

【表5】

表5：ヒト軽鎖の生殖細胞ラムダVの遺伝子				
Vセグメント	カワサキ	配列番号	Jセグメント	Vセグメント
796	IGLV2-11*01	V1-3	828	IGLJ1*01
797	IGLV2-11*02		829	IGLJ4*01
798	IGLV2-11*03			
799	IGLV2-14*01	V1-4		
800	IGLV2-14*02			
801	IGLV2-14*03			
802	IGLV2-14*04			
803	IGLV2-18*01	V1-5		
804	IGLV2-18*02			
805	IGLV2-18*03			
806	IGLV2-18*04			
807	IGLV2-23*01			
808	IGLV2-23*02			
809	IGLV2-23*03	V1-7		
810	IGLV2-33*01	V1-9		
811	IGLV2-33*02			
812	IGLV2-33*03			
813	IGLV2-8*01	V1-2		
814	IGLV2-8*02			
815	IGLV2-8*03			
816	IGLV5-37*01	V4-1		
817	IGLV5-39*01			
818	IGLV5-39*02			
819	IGLV5-45*01			
820	IGLV5-45*02			
821	IGLV5-45*03	V4-2		
822	IGLV5-48*01	V4-3		
823	IGLV5-52*01	V4-4		
824	IGLV8-61*01	V3-4		
825	IGLV8-61*02			
826	IGLV8-61*03			
827	IGLV11-55*01	V4-6		

10

20

30

40

50

【0140】

特に、ここで提供されている抗体や抗原結合抗体フラグメントは、DLL4の活動を特異的に結合し、または調整する。

たとえば、特異的にDLL4の活動を結合し、または、調整する抗体は、IGHV1（例えば、配列番号：574-607のどれででも述べられるなんでも）、IGHV4（例えば、配列番号：608-679で述べられるなんでも）、IGHV5（例えば、配列番号：680-687で述べられる何でも）または、IGHV6（例えば、配列番号：688または689のどれででも述べられるなんでも）であるVH生殖細胞系部分；IGHD6（例えば、配列番号：714-717で述べられる何でも）、IGHD5（例えば、配列番号：710-713のどれででも述べられる何でも）、IGHD4（例えば、配列番号：706-709で述べられる何でも）、IGHD2（例えば、配列番号：690-697で述べられる何でも）、IGHD3（例えば、配列番号：698-705のどれででも述べられる何でも）、またはIGHD7（例えば配列番号：718で述べられる）であるDH生殖細胞系部分；そして、IGHJ1（例えば、配列番号：719で述べられる）、IGHJ2（配列番号：720で述べられる）、IGHJ4（例えば、配列番号：722-724のどれででも、述べられるなんでも）、またはIGHJ6（例えば、配列番号：725-728で述べられる何でも）であるJH生殖細胞系部分などから編集される生殖細胞系構成要素を含んでいる一連のヌクレオチドによってコード化されるVH鎖のあるどれをも含む。

そのような抗体は、IGKV1（例えば、配列番号：729-760のどれででも述べられる何でも）、IGKV2（例えば、配列番号：761-775で述べられる何でも）、またはIGKV3（例えば、配列番号：776-794のどれででも述べられる何でも）とIGKJ1（例えば、配列番号：795で述べられる）であるJ生殖細胞系部分；またはIGLV2（例えば、配列番号：796-815のどれ

ででも述べられる何でも)、IGLV8(例えば、配列番号:824-826のどれででも、述べられるなんでも)、IGLV11(例えば、配列番号:827のどれででも述べられる何でも)、またはIGLV5(例えば、配列番号:816-823のどれででも述べられる何でも)であるV 生殖細胞系部分;そしてIGLJ1(例えば配列番号:828で述べられる)またはIGLJ4(例えば、配列番号:829で述べられる)であるV 生殖細胞系部分などから編集される生殖細胞系構成要素を含んでいる一連のヌクレオチドによってコード化されるVL鎖のあるどれをも含む。

そのような抗体は、上記の生殖細胞系部分のどれの異変体でもある生殖細胞系部分を含んでいる一連のヌクレオチドによって、コード化されるもののどれをも含みます。(たとえば、保守的な突然変異または他のヌクレオチド突然変異により、結果として生じる抗体が機能的で生産的な抗体で、DLL4と結合してまたは機能的な活動を調整する限り)

【0141】

DLL4に対する典型的な抗体は、IGHV1-3(例えば、IGHV1-3*01またはIGHV1-3*02)、IGHV1-8*01、IGHV1-46(例えばIGHV1-46*01、IGHV1-46*02またはIGHV1-46*03)、IGHV4-31(例えば、IGHV4-31*01、IGHV4-31*02、IGHV4-31*03、IGHV4-31*04、IGHV4-31*05、IGHV4-31*06、IGHV4-31*07、IGHV4-31*08、IGHV4-31*09またはIGHV4-31*10)、IGHV4-34(例えば、IGHV4-34*01、IGHV4-34*02、IGHV4-34*03、IGHV4-34*04、IGHV4-34*05、IGHV4-34*06、IGHV4-34*07、IGHV4-34*08、IGHV4-34*09、IGHV4-34*10、IGHV4-34*11、IGHV4-34*12またはIGHV4-34*13)、IGHV5-51(例えば、IGHV5-51*01、IGHV5-51*02、IGHV5-51*03、IGHV5-51*04またはIGHV5-51*05)、あるいは、IGHV6-1(例えば、IGHV6-1*01またはIGHV6-1*02)であるVH生殖細胞系部分;IGHD2-2(例えば、IGHD2-2*01またはIGHD2-2*02)、IGHD2-15*01、IGHD4-23*01、IGHD6-6*01、IGHD6-13*01、IGHD5-18*01、IGHD3-3(例えば、IGHD3-3*01またはIGHD3-3*02)、IGHD3-10(例えば、IGHD3-10*01またはIGHD3-10*02)または、IGHD7-27*01であるDH生殖細胞系部分;そして、IGHJ1*01、IGHJ2*01、IGHJ4(例えば、IGHJ4*01、IGHJ4*02またはIGHJ4*03)または、IGHJ6(例えば、IGHJ6*01、IGHJ6*02、IGHJ6*03、IGHJ6*04)などであるJH生殖細胞系部分から編集される一連のヌクレオチドによって、コード化されるVH鎖を含む。IGKV1-5(例えばIGKV1-5*01、IGKV1-5*02またはIGKV1-5*03)、IGKV1-12(例えば、IGKV1-12*01またはIGKV1-12*02)、IGKV2-D-40*01、IGKV3-11(例えば、IGKV3-11*01またはIGKV3-11*02)、IGKV3-15*01、またはIGKV3-20(例えばIGKV3-20*01、IGKV3-20*02)などであるV 生殖細胞系部分、そしてIGKJ1*01であるJ 生殖細胞系部分から編集された一連のヌクレオチドによってVL鎖は、コード化される;あるいは、IGLV2-14(例えば、IGLV2-14*01、IGLV2-14*02、IGLV2-14*03またはIGLV2-14*04)、IGLV8-61(例えば、IGLV8-61*01、IGLV8-61*02またはIGLV8-61*03)、IGLV5-48*01またはIGLV11-55*01であるV 生殖細胞系部分とIGLJ1*01またはIGLJ4*01であるJ 生殖細胞系部分から編集します。

a. 典型的な生殖細胞由来の反DLL4抗体

ここに提供されている、DLL4の活動を特異的に結合し、または調整する典型的抗体は、表6で述べられている。

10

20

30

【表6】

重い鎖生殖細胞系部分	配列番号		軽鎖生殖細胞系部分	配列番号	
	スクレオチド	アミノ酸		スクレオチド	アミノ酸
IGHV1-46*01; IGHD6-6*01; IGHJ1*01	88	131	IGKV3-11*01; IGHJ1*01	98	141
IGHV5-51*03; IGHD5-18*01; IGHJ4*01	89	132	IGLV8-61*01; IGHJ1*01	99	142
IGHV6-1*01; IGHD3-3*01; IGHJ4*01	90	133	IGLV5-48*01; IGHJ4*01	100	143
IGHV1-46*01; IGHD6-13*01; IGHJ4*01	92	135	IGKV3-15*01; IGHJ1*01	102	145
IGHV4-34*01; IGHD7-27*01; IGHJ4*01	94	137	IGKV1-12*01; IGHJ1*01	103	146
IGHV1-46*01; IGHD6-13*01; IGHJ4*01	92	135	IGKV3-20*01; IGHJ1*01	101	144
IGHV1-3*02; IGHD4-23*01; IGHJ4*01	95	138	IGKV1-5*01; IGHJ1*01	104	147
IGHV1-46*01; IGHD2-15*01; IGHJ2*01	93	136	IGKV1-5*01; IGHJ1*01	104	147
IGHV1-46*01; IGHD3-10*01; IGHJ4*01	91	134	IGKV1-5*01; IGHJ1*01	104	147
IGHV1-8*01; IGHD2-2*01; IGHJ6*01	96	139	IGKV1-5*01; IGHJ1*01	104	147
IGHV1-46*01; IGHD6-13*01; IGHJ4*01	92	135	IGKV2D-40*01; IGHJ1*01	105	148
IGHV4-34*01; IGHD7-27*01; IGHJ4*01	94	137	IGLV2-14*01; IGHJ4*01	106	149
IGHV4-31*02; IGHD2-15*01; IGHJ2*01	97	140	IGLV2-14*01; IGHJ4*01	106	149
IGHV4-34*01; IGHD7-27*01; IGHJ4*01	94	137	IGLV11-55*01; IGHJ4*01	107	150

10

20

30

【0142】

生殖細胞由来の変更された抗体

ここに提供されている反DLL4抗体は、抗DLL4生殖細胞由来の抗体または抗原結合抗体フレグメントと比べて、最適化されている抗体を含む。

生殖細胞由来の変更された抗体は、生殖細胞由来の抗体と比べて、VL鎖やVH鎖での一つ以上の突然変異を含む。

たとえば、抗体は、それに対応する生殖細胞由来の抗体と比べて、VH鎖またはVL鎖で1, 2, 3,

4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20また、それ以上のアミノ酸置換を含むことができる。

【0143】

40

突然変異は、VH鎖にもすることができる。(たとえば、V_H, D_HまたはJ_H領域のどんな一つ以上のアミノ酸残基でも)。

元の抗体(変更を含んでいない生殖細胞由来の抗体など)と比べて一つ以上の突然変異を含んでいる最適化された抗体は、改善された活動を示します。

抗体は、DLL4標的タンパク質に対して改善された機能的な活動(アゴニスト、またはアンタゴニスト)を示します。

他の例では、抗体がDLL4のために改善された結合親和性を示す。

一般的に、活動や結合親和性は、元の抗体の活動または結合親和性(たとえば、変更を含んでいない生殖細胞由来の抗体)と比べて、およそ1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8、9、10倍-、20倍の倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、200倍

50

、300、400倍倍、500倍、600倍、700倍、800倍、900倍、1000倍以上、増加されたたとえば、実施例に記載されているように、ここに提供されている最適化された反DLL4抗体は、元の抗体と比べて、少なくとも100倍～1000倍改善される結合親和性を表す。このような抗体は、ナノモルの結合親和性を示す。

【0144】

一般的に、ここに提供されている生殖細胞由来の変更された反DLL4抗体は、少なくとも、 10^{-9} Mの結合親和性を示し、たとえば、それは、およそ 1×10^{-9} M, 2×10^{-9} M, 3×10^{-9} M, 4×10^{-9} M, 5×10^{-9} M, 6×10^{-9} M, 7×10^{-9} M, 8×10^{-9} M, 9 $\times 10^{-9}$ M, 1×10^{-10} M, 2×10^{-10} M, 3×10^{-10} M, 4×10^{-10} M, 5×10^{-10} M, 10^{-11} M, 10^{-12} Mか、

または、それ以下である。.

I. 可変重鎖

たとえば、ここで提供されている生殖細胞由来の変更された反DLL4抗体は、反DLL4 HitのVH鎖で一つ以上の突然変異を含む。(たとえば、配列番号: 131-140.のどれででも述べられる何でも)。

一つの例では、生殖細胞由来の変更された反DLL4抗体は、VH鎖に配列番号: 132で述べられる一つ以上の突然変異を含む。

配列番号: 132で述べられ、VH鎖で述べられる位置G24、Y27、S28、F29、T30、S31、Y32、W33、I34、G35、I50、I51、Y52、P52a、G53、D54、S55、D56、T57、S82a、R95、G96、Y97、S98、Y99、G100、Y100a、D100b、Y100c、F100d、D101やY102などでは、突然変異が一つ以上の突然変異を含む(kabat番号付けに基づく)。

【0145】

突然変異は他のどのアミノ酸残基にもすることができます。特に、突然変異はアラニン(A)、フェニルアラニン(F)、プロリン(P)、チロシン(Y)、グルタミン(Q)、バリン(V)、イソロイシン(I)、グリシン(G)、ロイシン(L)、トリプトファン(W)、リジン(K)、アスパラギン(N)、ヒスチジン(H)、システイン(C)、グルタミン酸(E)、セリン(S)、アルギニン(R)またはトレオニン(T)などである。

そのような突然変異の典型的は、配列番号: 132で述べられるVH鎖でのアミノ酸代わりG24A、G24S、G24R、G24T、S28A、S28R、S28K、S28N、F29A、T30A、W33A、I34A、G35T、G35A、G35V、I50A、I51A、Y52A、P52aA、D54A、S55G、D56A、T57D、T57A、S82aV、S82aL、R95A、G96K、G96R、G96L、G96D、G96T、Y97A、Y97H、S98A、Y99A、G100A、G100D、G100L、G100P、G100R、G100M、G100K、G100S、G100R、G100T、Y100aA、D100bA、

G24LまたはD101Aである。

特に、アミノ酸代わりG24A、G24T、G24L、S28A、S28R、S28K、G35A、G25V、T57A、T57D、G96A、G96K、G96L、G96R、G100A、G100TやG100Dなどは、そのような突然変異の典型的である。

たとえば、アミノ酸代わりG24A、G24T、G24L、S28R、G35V、G96KやG100Tなどは、そのような突然変異の典型的です。

別の例では、ここに提供されている生殖細胞由来の変更された反DLL4抗体は、配列番号: 131で述べられるVH鎖では、一つ以上の突然変異を含む。

配列番号: 131で述べられ、VH鎖で述べられる位置T28、F29、T30、S31、Y33、I50、I51、N52、P52a、S53、G54、G55、S56、T57、S58、S82a、E96、Y97、S98、S99、S100、S100a、A100b、E100c、F100e、Q101やH102などでは、突然変異は、一つ以上の突然変異を含む(kabat番号付けに基づく)。

10

20

30

40

50

【0146】

突然変異は他のどのアミノ酸残基にもすることができる。特に、突然変異はアラニン(A)、フェニルアラニン(F)、プロリン(P)、チロシン(Y)、グルタミン(Q)、バリン(V)、イソロイシン(I)、グリシン(G)、ロイシン(L)、トリプトファン(W)、リジン(K)、アスパラギン(N)、アスパラギン酸(D)、ヒスチジン(H)、システイン(C)、グルタミン酸(E)、セリン(S)、アルギニン(R)またはトレオニン(T)などである。

配列番号：131で述べられるVH鎖のアミノ酸代わりT28A、F29A、T30A、S31A、Y33A、150A、150T、151A、

I51T、I51V、I51N、I51R、I51W、I51S、I51G、I51V、I51E、I51H、I51Y、N52A、N52V、N52G、N52T、N52P、N52L、N52W、N52Y、N52V、N52S、N52Q、N52K、
P52aA、P52aM、P52aE、P52aH、P52aY、P52aT、P52aN、P52aR、P52aW、P52aS、
P52aG、S53A、S53I、S53E、S53R、S53G、S53T、S53L、S53V、S53N、S53P、
G54A、G54W、G54D、G55A、G55V、G55E、G55S、G55K、G55T、G55L、G55R、G55H、
G55I、G55W、S58A、T57A、S58A、S82aG、S82aQ、S82aN、S82aH、S82aR、
S82aK、S82aT、E96A、Y97A、S98A、S98Q、S98V、S98I、S98G、S99P、S99A、
S99L、S99W、S99F、S99N、S99H、S99C、S99G、S100F、
S100A、S100G、S100C、S100H、S100L、S100R、S100aA、A100bE、E100cA、Q101A、

H102A、H102S、H102FやH102Yなどは、そのような突然変異の典型的です。

特に、アミノ酸代わりT28A、T30A、S31A、151A、I51T、

I51V、I51E、N52A、N52V、N52L、N52W、N52G、N52T、N52S、N52Q、N52K、P52Aa、S53A、S53G、S53T、G55A、G55V、G55E、G55N、G55S、G55K、G55D、G55T、
G55L、G55H、G55R、G55I、G55W、S56A、S82aT、S98A、S98Q、S98V、S98I、
S99A、S99L、S99W、S99C、S99P、S100A、S100H、S100F、S100L、S100R、S100G、
H102A、H102Y、H102F、H102Sなどは、そのような突然変異の典型的である。

たとえば、アミノ酸代わりI51A、I51V、N52L、S53A、S53T、G55H、S98A、S99P、S100F、H102Y、H102Fなどは、そのような突然変異の典型的である。

ii 可変軽鎖

また、ここに提供されている最適化された反DLL4抗体は、VL鎖で一つ以上のアミノ酸突然変異を含むことができます。

たとえば、ここで提供されている生殖細胞由来の変更された反DLL4抗体は、反DLL4 Hit（たとえば、配列番号：141-150のどれででも述べられる何でも）のVH鎖で一つ以上の突然変異を含む。

【0147】

一つの例では、生殖細胞由来の変更された反DLL4抗体は、配列番号：141で述べられるVL鎖で一つ以上の突然変異を含みます

突然変異は、Kabat番号付けに基づいて、配列番号：141で述べられ、VL鎖で述べられる位置R24、Q27、S28、S30、S31、Y32、D50、A51、S52、N53、R54、A55、T56、F62、S76、R91、S92、N93、W94などでは、一つ以上の突然変異を含みます。

突然変異は、他のどのアミノ酸残基にもすることができ、特に、突然変異はアラニン(A)、phenylalanine(F)、プロリン(P)、チロシン(Y)、グルタミン(Q)、バリン(V)、イソロイシン(I)、グリシン(G)、ロイシン(L)、トリプトファン(W)、リジン(K)、アスパラギン(N)、ヒスチジン(H)、システイン(C)、グルタミン酸(E)、セリン(S)、アスパラギン酸(D)、メチオニン(M)、アルギニン(R)またはトレオニン(T)などである。

【0148】

アミノ酸代わりR24G、Q27L、S28P、S28G、S28K、S28V、S28F、S28P、S28T、S28L、S28Q、S28A、S28N、S28H、S28I、S28R、S28W、S28M、S28E、S30N、S30W、S30R、S30L、S30C、S30D、S30L、S30T、S30P、S30Y、S30Q、S30A、S30G、S30V、S31K、S31T、S31N、S31K、S31L、S31M、S31F、S31I、S31V、S31H、S31A、S31P、S31D、S31R、S31Y、S31Q、S31E、S31G、Y32V、Y32S、D50A、A5

10

20

30

40

50

1T、S52A、S52L、S52T、S52R、S52S、S52W、S52N、
 S52P、S52M、
 N53A、N53E、N53G、N53M、N53C、N53H、N53P、R54A、A55T、A55R、A55C、A55S、A55G、T56A、F62L、S76E、S76Q、S76P、S76L、S76T、S76G、S76A、S76Y、
 S76N、R91P、R91L、R91G、S92P、S92A、S92Q、S92V、S92T、S92R、S92G、S92V、
 S92M、S92N、S92C、N93Y、N93S、N93H、N93Q、W94R、W94S、W94T、W94L、
 W94P やW94Mなどは、そのような突然変異の典型的である。

特に、アミノ酸代わりS28N、S28G、S28H、S28T、S30A、S30D、S30Q、S30G、S30W、S30R、
 S31A、S31T、S31N、S31H、S31K、S31Y、S31R、S52A、S52L、S52T、S52R、S52M、N53A、N53H、N53G、A55T、A55S、A55G、S76TやS76Yなどは、そのような突然変異の典型的です。

たとえば、アミノ酸代わりS28N、S30D、S31H、S31K、S52L、A55SやA55Gなどは、そのような突然変異の典型的である。

一つの例では、生殖細胞由来の変更された反DLL4抗体は、配列番号：142で述べられるVL鎖で一つ以上の突然変異を含みます。

突然変異は、Kabat番号付けに基づいて、配列番号：142で述べられ、VL鎖で述べられる位置G24、L25、S26、S27、G27a、S27b、V27c、S28、T29、S30、Y31、Y32、P33、S34、S50、T51、N52、T53、R54、S55、S56、T76、V89、L90、Y91、M92、G93、S94、G95、I95aやS95bなどでは、一つ以上の突然変異を含みます。

変異は、他のどのアミノ酸残基にもすることができます。特に、変異は、アラニン(A)、phenylalanine(F)、プロリン(P)、チロシン(Y)、グルタミン(Q)、バリン(V)、イソロイシン(I)、グリシン(G)、ロイシン(L)、トリプトファン(W)、リジン(K)、アスパラギン(N)、ヒスチジン(H)、システイン(C)、グルタミン酸(E)、セリン(S)、アスパラギン酸(D)、メチオニン(M)、アルギニン(R)またはトレオニン(T)である。

アミノアミノ酸置換G24A、G24R、G24L、L25A、S26A、S27A、G27aA、S27bA、V27cA、S28A、T29A、S30A、Y31A、Y32A、P33A、S34A、S50A、S50F、S50G、S50C、S50R、S50L、S50M、S50V、S50P、S50T、S50H、S50Q、S50N、S50K、S50D、S50E、S50W、T51A、T51F、T51L、T51I、T51M、T51V、T51S、T51P、T51Y、T51H、T51Q、T51N、T51K、T51D、T51E、T51W、T51R、T51G、N52A、T53A、R54A、R54I、R54Y、R54D、R54G、S55A、S55F、S55L、S55I、S55M、S55V、S55P、S55T、S55Y、S55H、S55Q、S55N、S55K、S55D、S55E、S55W、S55R、S55G、S56A、T76S、T76E、T76Y、T76M、T76L、T76K、T76V、V89A、V89P、V89T、V89S、V89L、V89R、V89C、V89E、V89W、V89N、V89I、V89G、V89H、L90A、Y91A、M92A、M92E、M92S、M92G、M92L、M92P、M92V、M92D、M92R、M92N、M92T、M92F、G93A、S94A、S94W、S94G、S94P、S94R、S94L、S94M、S94E、S94V、G94A、I95aAやS95bAは、そのような突然変異の典型的である。

特に、G24A、S26A、

S27A、G27aA、S27bA、S28A、T29A、S30A、S50A、S50G、S50M、S50H、S50N、S50V、S50K、S50L、T51A、N52A、T53A、R54A、R54G、R54Y、R54S、S55A、S56A、T76E、T76M、T76Y、V89A、V89L、M92A、M92R、S94A、S94M、S94GやS94Pはアミノ酸置換の典型的である。

たとえば、このような変異の典型的は、S50G、S50M、R54A、R54Y、V89L、M92R、S94M、S94Pなどである。

26-29

Prashant

From page 26 to

29

【 0 1 4 9 】

iii 典型的な生殖細胞由来の抗体

ここに変数可変重鎖異形を持つ反DLL4抗体が提供されている。SEQ ID NO:151-263、381-438、894-898に規定されるのはその例である。特に、ここに提供されている反DLL4抗体の

10

20

30

40

50

うち、反DLL4抗体がSEQ

ID NOS:155-157、195、219、233、238-239、244、263、384、414、420 and 433-434に規定されているアミノ酸例の可変重鎖列を持つ。

典型的な変数軽鎖異形がSEQ ID NOS: 264-380、439-571に規定されているのを含む。特に、ここに提供されている典型的な反DLL4抗体のうち、反DLL4抗体がSEQ ID NOS:343、351、367-370、479、536-537に規定されているアミノ酸例がある可変重鎖列を持つ。

ここに提供されている典型的な反DLL4抗体では、どの可変重鎖がどの可変軽鎖とペアにすることができる。典型的な反DLL4抗体は、例5番に(表30と表31)規定されているどの可変重鎖と可変軽鎖抗体とのペアを含む。

10

【0150】

2. 抗DLL4: 相補性決定領域(CDRs)

ここには、DLL4と結合することに関係しているCDR残基がある変数軽鎖(VL)とか可変重鎖(VH)を持つ反DLL4抗体が提供されている。ここに提供されるDLL4抗体は提供されるCDRsの1, 2, 3, 4, 5, 6(CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2またはCDRL3)あるいはその変更されたCDRを含むことができる。また、ここに提供されるDLL4抗体は特別なところで示されているように抗体に他のところに他の変更を含むことができる。例えば、フレームワーク内に反DLL4抗体がどの一つまたは一つ以上の変更を含むことができる。

20

【0151】

例えば、ここに提供される反DLL4抗体は以下に述べている点があるVHチェーンを持つ:

GYTFTSYMMH

(SEQ ID NO: 830)、GYSFTSYWIG (SEQ ID NO:831)、GDSVSSNSAA (SEQ ID NO:832)、GGSFSGYYWS (SEQ ID NO:833)、GYTFTSYAMH (SEQ ID NO:834)、GYTFTSYAIN (SEQ

ID NO:835)、or GGSISGGYYY (SEQ ID NO:836)のアミノ酸配列があるあるいはどのSEQ ID NOS: 830-836ものサブセットのアミノ酸配列、あるいはどのSEQ

ID NOS: 830-836もの変更した形式のアミノ酸配列を持つCDRH1 (kabat付番システムに基づき、アミノ酸位置25-26置に対応する);あるいは

30

IIINPSGGSTSQAQKFQG

(SEQ ID NO:844)、IYPGDSDTRYSPSFQG (SEQ ID NO:845)、

RTYYRSKWKNDYAVSVKS (SEQ ID NO:846)、EINHSGSTNYNPSLKS

(SEQ ID NO:847)、INSNAGNGNTKYSQEFQG (SEQ ID NO: 848)、WMNPNSGNTGYAQKFQG (SEQ ID NO:849)のアミノ酸配列がある、あるいはどのSEQ ID NOS: 844-850もの変更した形式のアミノ酸配列を持つCDRH1 (kabat付番システムに基づき、アミノ酸位置25-26置に対応する);あるいは

EEYSSSSAEYKQH

(SEQ ID NO:851)、RGYSYGYDYFDY (SEQ ID NO:852)、

EYYDFWSGYTDYFDY (SEQ ID NO:853)、EGYSSSWYDYFDY (SEQ ID

40

NO:854)、ANWGDYFDY (SEQ ID NO:855)、DDYGGNSDYFDY (SEQ ID NO:856)、EGYCSGGSCYS (SEQ ID NO:857)、EYYYGSGSYNDYFDY (SEQ ID NO:858)、GCYCSSTSCYADYYYYGMDV (SEQ ID NO:859)、or

GSCCSYWYFDL (SEQ ID NO:860)のアミノ酸配列がある、あるいはどのSEQ ID

NOS: 851-860もの変更した形式のアミノ酸配列を持つCDRH1 (アミノ酸位置95-102に対応する);あるいは

【0152】

例えば、ここに提供される反DLL4抗体は以下に述べている点がある変数軽鎖(VH)チェーンを持つ:

50

RASQSVSSYLA

(SEQ ID NO: 861)、 GLSSGSVSTSYYPS (SEQ ID NO:862)、
 TLRSGINLGSYRIF (SEQ ID NO:863)、 RASQSVSSNLA (SEQ ID
 NO:864)； RASQGISSWLA (SEQ ID NO:865)； RASQVSSSYLA (SEQ ID NO:866)、 RASQSISSWLA
 (SEQ ID NO:867)、 RSSQSLLDSDDGNTYLD
 (SEQ ID NO:868)、 TGTSSDVGGTNYVS (SEQ ID NO:869)、 or TLSSDLSVGGKNMF (SEQ ID NO:
 870)のアミノ酸配列がある、あるいはどのSEQ ID NOS: 861-870もの変更した形式のアミ
 ノ酸配列を持つCDRL1 (kabat付番システムに基づき、アミノ酸位置 24 から 33 または 3
 4までに対応する)

10

【 0 1 5 3 】

DASNRAT

(SEQ ID NO:871)、 STNTRSS (SEQ ID NO: 872)、 YYSDSSK (SEQ ID
 NO:873)、 GASTRAT (SEQ ID NO:874)、 AASSLQS (SEQ ID NO:875)、 GASSRAT (SEQ ID
 NO:876)、 DASSLGS (SEQ ID NO:877)、 TLSYRAS (SEQ ID NO:878)、 EVSNRPS (SEQ
 IDNO:879)、 or HYSDSDK (SEQ ID NO:880) のアミノ酸配列がある、あるいはどのSEQ ID
 NOS: 871-880もの変更した形式のアミノ酸配列を持つCDRL2 (kabat付番システムに基づき
 、アミノ酸位置 50 から 56 までに対応する)

QQRSNWPPWT

(SEQ ID NO:881)、 VLYMGSGISYV (SEQ ID NO:882)、 MIWHSSASFV
 (SEQ ID NO: 883)、 QQYNNWPPWT (SEQ ID NO: 884) QANSFPPWT
 (SEQ ID NO:885)、 QQYGSSPPWT (SEQ ID NO: 886)、 QQYNSYSPWT (SEQ ID NO:887)、
 MQRIEFPSWT (SEQ ID NO: 888)、 SSYTSSSTLFV (SEQ ID NO:
 889)、 or QVYESSANFV (SEQ ID NO: 890) のアミノ酸配列がある、あるいはどのSEQ ID N
 OS: 871-880もの変更した形式のアミノ酸配列を持つCDRL3 (kabat付番システムに基づき
 、アミノ酸位置89から97までに対応する)

20

表 7 - 8 に示されているように可変重鎖あるいは変数軽鎖を持つのは反DLL4抗体の典型と
 なる。そのSEQ ID NOSを含めて、CDR s も表に示されている。

【表7】

表7. DLL4抗体の重鎖			
体の重鎖	CDR1	CDR2	CDR3
VH1-46_IGHD6-6*01_IGHJ1*01	GYTFTSYVMH (SEQ ID NO: 830)	IINPSGGSTSVAQKFQG (SEQ ID NO: 844)	EEYSSSSAELYKQH (SEQ ID NO: 851)
	SYVMH (SEQ ID NO: 837)		
VH5-51_IGHD5-18*01_IGHJ4*01	GYSFTSYWIG (SEQ ID NO: 831)	IIYPGDSDTRYSPSFQG (SEQ ID NO: 845)	RGYSYGYDYFDY (SEQ ID NO: 852)
	SWIG (SEQ ID NO: 838)		
VH6-1_IGHD3-3*01_IGHJ4*01	GDSVSSNSAA (SEQ ID NO: 832)	RTYYRSKWYNDYAVSVKS (SEQ ID NO: 846)	EYYDFWMSGYYTDYFDY (SEQ ID NO: 853)
	SNSAA (SEQ ID NO: 839)		
VH1-46_IGHD6-13*01_IGHJ4*01	GYTFTSYVMH (SEQ ID NO: 830)	IINPSGGSTSVAQKFQG (SEQ ID NO: 844)	EGYSSSWDYFDY (SEQ ID NO: 854)
	SYVMH (SEQ ID NO: 837)		
VH4-34_IGHD7-27*01_IGHJ4*01	GGSFSGTYWS (SEQ ID NO: 833)	EINHSGSTYNPNSLKS (SEQ ID NO: 847)	ANWGDYFDY (SEQ ID NO: 855)
	GYWWS (SEQ ID NO: 840)		
VH1-3_IGHD4-23*01_IGHJ4*01	GYTFTSYAMH (SEQ ID NO: 834)	IINSNAGNNGNTKYSQEFQG (SEQ ID NO: 848)	DDYGGNSDYFDY (SEQ ID NO: 856)
	SYAMH (SEQ ID NO: 841)		
VH1-46_IGHD2-15*01_IGHJ2*01	GYGFTSYVMH (SEQ ID NO: 830)	IINPSGGSTSVAQKFQG (SEQ ID NO: 844)	EGYCSGGSCYS (SEQ ID NO: 857)
	SYVMH (SEQ ID NO: 837)		
VH1-46_IGHD3-10*01_IGHJ4*01	GYTFTSYVMH (SEQ ID NO: 830)	IINPSGGSTSVAQKFQG (SEQ ID NO: 844)	EYYYGSGSYYNDYFDY (SEQ ID NO: 858)
	SYVMH (SEQ ID NO: 837)		
VH1-8_IGHD2-2*01_IGHJ6*01	GYTFTSYAIN (SEQ ID NO: 835)	WMNPNSGNTGYAQKFQG (SEQ ID NO: 849)	GCYCSSTSCYADYYYYYGMDV (SEQ ID NO: 859)
	SYAIN (SEQ ID NO: 842)		
VH4-31_IGHD2-15*01_IGHJ2*01	GGSISSGGYY (SEQ ID NO: 836)	YIIVYSGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO: 850)	GSCYSWYFDL (SEQ ID NO: 860)
	SGGYY (SEQ ID NO: 843)		

10

20

【表8】

表 8. DLL4 抗体軽いチェーン			
体軽鎖	CDR1	CDR2	CDR3
L6_IGKJ1*01	RASQSVSSYLA (SEQ ID NO:861)	DASNRAT (SEQ ID NO:871)	QQRSNWPPWT (SEQ ID NO:881)
V3-4_IGLJ1*01	GLSSGSVSTSYVPS (SEQ ID NO:862)	STNTRSS (SEQ ID NO:872)	VLYMGSGISYV (SEQ ID NO:882)
V4-3_IGLJ4*01	TLRSGINLGSYRIF (SEQ ID NO:863)	YYSDSSK (SEQ ID NO:873)	MINWHSSASFV (SEQ ID NO:883)
L2_IGKJ1*01	RASQSVSSNLA (SEQ ID NO:864)	GASTRAT (SEQ ID NO:874)	QQQINNWPPWT (SEQ ID NO:884)
L5_IGKJ1*01	RASQGISSWLA (SEQ ID NO:865)	AASSLQS (SEQ ID NO:875)	QANSFPPWT (SEQ ID NO:885)
A27_IGKJ1*01	RASQVSSSYLA (SEQ ID NO:866)	GASSRAT (SEQ ID NO:876)	QQYGSSPPWT (SEQ ID NO:886)
L12_IGKJ1*01	RASQSISSWLA (SEQ ID NO:867)	DASSLGS (SEQ ID NO:877)	QQQINSYSPWT (SEQ ID NO:887)
01_IGKJ1*01	RSSQSLLDDDDGNTYLD (SEQ ID NO:868)	TLSYRAS (SEQ ID NO:878)	MQRIEFPPWT (SEQ ID NO:888)
V1-4_IGLJ4*01	TGTSSDVGGTNV (SEQ ID NO:869)	EVSNRPS (SEQ ID NO:879)	SSYTTSSTLFV (SEQ ID NO:889)
V4-6_IGLJ4*01	TLSSDLSVGGKNMF (SEQ ID NO:870)	HYSDSDK (SEQ ID NO:880)	QVTESSANFV (SEQ ID NO:890)

10

20

30

40

50

【0154】

どのSEQ ID NOS: 830-836に規定されているCDRH1、どのSEQ ID NOS: 844-850に規定されているCDRH2、どのSEQ ID NOS: 851-860に規定されているCDRH3、どのSEQ ID NOS: 861-870に規定されているCDRL1、どのSEQ ID NOS: 871-880に規定されているCDRL2、どのSEQ ID NOS: 881-890に規定されているCDRL3と比較して、変更した一つまたは一つ以上のCDRs (1、2、3、4、5、6、など)を持つ反DLL4抗体もここに提供されている。こうした変更した形式はどのSEQ ID NOS: 830-836、844-890に規定されているCDRHと少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%配列同一性を示す。

例えば、SEQ ID NO: 830またはSEQ ID NO: 831に規定されていると比較して、変更したCDRH1を持つ反DLL4抗体もここに提供されている。アミノ酸置換は他のどのアミノ酸残基にもあり得る。特にアラニン(A)、フェニルアラニン(F)、プロリン(P)、チロシン(Y)、グルタミン(Q)、バリン(V)、イソロイシン(I)、グリシン(G)、ロイシン(L)、トリプトファン(W)、リジン(K)、アスパラギン(N)、アスパラギン酸(D)、ヒスチジン(H)、システイン(C)、グルタミン酸(E)、セリン(S)、アルギニン(R)またはトレオニン(T)などである。一例を挙げれば、SEQ ID NO: 830に規定されているCDRH1は配列番号:T28、F29、T30、S31またはY33 (kabat番号付けに基づく)などでは、一つ以上の突然変異を持つために変更される。例えば、こうしたアミノ酸置換の典型はT28A、F29A、T30A、S31A、Y33Aを含む。別の例では、SEQ ID NO: 831に規定されているCDRH1は配列番号:S28、F29、

W33、I34またはG35 (kabat番号付けに基づく) などでは、一つ以上の突然変異を持つために変更される。CDRH1は1、2、3、4、5、6またはそれ以上の変更を持つことができる。ある組み合わせ変異体の典型は28R/G35Vである。

【 0 1 5 5 】

別の例では、SEQ ID NO: 8 4 4 またはSEQ ID NO: 8 4 5 に規定されていると比較して、変更したCDRH2を持つ反DLL4抗体もここに提供されている。アミノ酸置換は他のどのアミノ酸残基にもあり得る。特にアラニン(A)、フェニルアラニン(F)、プロリン(P)、チロシン(Y)、グルタミン(Q)、バリン(V)、イソロイシン(I)、グリシン(G)、ロイシン(L)、トリプトファン(W)、リジン(K)、アスパラギン(N)、アスパラギン酸(D)、ヒスチジン(H)、システイン(C)、グルタミン酸(E)、セリン(S)、アルギニン(R)またはトレオニン(T)などである。

別の例では、SEQ ID NO: 8 4 4 に規定されているCDRH2は配列番号：I50、I51、N52、P52a、S53、G54、G55、G56、T57またはS58 (kabat番号付けに基づく) などでは、一つ以上の突然変異を持つために変更される。例えば、こうしたアミノ酸置換の典型はI50A、I50T、I51A、I51T、I51V、

I51N、I51R、I51W、I51S、I51G、I51V、I51E、I51H、I51Y、N52A、N52V、N52G、N52T、N52P、N52L、N52W、N52Y、N52V、N52S、N52Q、N52K、P52aA、P52aM、P52aE、P52aH、P52aY、P52aT、P52aN、P52aR、P52aW、P52aS、P52aG、S53A、S53I、S53E、S53R、S53G、S53T、S53L、S53V、S53N、S53P、G54A、G54W、G54D、G55A、G55V、G55E、G55S、G55K、G55T、G55L、G55R、G55H、G55I、G55W、S58A、T57A またはS58Aを含む。別の例では、SEQ ID NO: 8 4 5 に規定されているCDRH2は配列番号：I50、I51、Y52、P52a、D54、S55、D56またはT57 (kabat番号付けに基づく) などでは、一つ以上の突然変異を持つために変更される。例えば、こうしたアミノ酸置換の典型はI50A、I51A、Y52A、P52Aa、D54A、S55G、D56A、T57DまたはT57Aを含む。CDRH2は1、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれ以上のアミノ酸の変更を持つことができる。ある組み合わせ変異体の典型は28R/G35Vである。SEQ ID NO: 8 4 4 に規定されているCDRH2の典型的な組み合わせの変更はI51V/N52L/S53T/G55H、N52L/S53T/G55H、I51E/N52L/S53T/G55HまたはI51N/N52L/S53T/G55Hなどを含む。

【 0 1 5 6 】

更なる例では、ここに提供しているのは、SEQ ID NOに詳しく説明されたCDRH3と比べて、変更されたCDRH3を含む反DLL4抗体です： 851かSEQ

ID NO:852。変異は、いかなる他のアミノ酸残基にはもアミノ酸置換があることができます、特に、アラニン(A)、フェニルアラニン(F)、プロリン(P)、チロシン(Y)、グルタミン(Q)、バリン(V)、イソロイシン(I)、グリシン(G)、ロイシン(L)、トリプトファン(W)、リジン(K)、アスパラギン(N)、アスパラギン酸(D)、ヒスチジン(H)、システイン(C)、グルタミン酸(E)、セリン(S)、アルギニン(R)またはトレオニン(T)です。1つの例では、SEQ ID NO:851で述べたCDRH3はカバート付番に基づいて位置の96E、Y97、S98、S99、S100、S100a、A100b、E100c、Q101、そして/または、H102に1回以上の変異を含むように変更されます。例えばそのようなアミノ酸置換の模範的な例がEの96A、Y97A、S98A、S98Q、S98V、S98I、S98G、S99P、S99A、S99L、S99W、S99F、S99N、S99H、S99C、S99G、S100F、S100A、S100G、S100C、S100H、S100L、S100R、S100aA、A100bE、E100cA、Q101A、H102A、H102S、H102F、そして/または、H102Yを含みます。

1つの例では、SEQ ID NO:852で述べたCDRH3はカバート付番に基づいて位置のR95、G96、Y97、S98、Y99、G100、Y100a、D100b、そして/または、D101に1回以上の変異を含むように変更されます。例えばそのようなアミノ酸置換の模範的な例R95A、G96K、G96R、G96L、G96D、G96T、Y97A、Y97H、S98A、Y99A、G100A、G100D、G100L、G100P、G100R、G100M、G100K、G100S、G100R、G100T、Y100aA、D100bA、そして/または、D101Aを含みます。

CDRH3は1、2、3、4、5、6、7、8、9、10以上のアミノ酸変更を含むことができます。SEQ ID NO: 851に述べたCDRH3での模範的組み合わせ変更は

10

20

30

40

50

例えばS98A/S99P/S100F、S98A/S99P/S100F/H102F、そして/または、S98A/S99P/S100F/H102Yを含んでいます。 SEQID NO: 852に述べたCDRH3での模範的組み合わせ変更は例えばG96K/G100Tを含んでいます。

【 0 1 5 7 】

また、ここに提供しているのは、SEQ ID NOに詳しく説明されたCDRL1と比べて、変更されたCDRL1を含む反DLL4抗体です：861かSEQ ID NO: 862。

861かSEQ ID NO: 862。変異は、いかなる他のアミノ酸残基にもアミノ酸置換があることができます、特に、アラニン(A)、フェニルアラニン(F)、プロリン(P)、チロシン(Y)、グルタミン(Q)、バリン(V)、イソロイシン(I)、グリシン(G)、ロイシン(L)、トリプトファン(W)、リジン(K)、アスパラギン(N)、ヒスチジン(H)、システイン(C)、グルタミン酸(E)、セリン(S)、アスパラギン酸(D)、メチオニン(M)、アルギニン(R)またはトレオニン(T)です。

1つの例では、SEQ ID NO: 861に述べたCDRL1はカバート付番に基づいて位置のR24、Q27、S28、S30、S31、そして/または、Y32に1回以上の変異を含むように変更されます。 例えればそのようなアミノ酸置換の模範的な例がR24G、Q27L、S28P、S28G、S28K、S28V、S28F、S28P、S28T、S28L、S28Q、S28A、S28N、S28H、S28I、S28R、S28W、S28M、S28E、S30N、S30W、S30R、S30L、S30C、S30D、S30L、S30T、S30P、S30Y、S30Q、S30A、S30G、S30V、S31K、S31T、S31N、S31K、S31L、S31M、S31F、S31I、S31V、S31H、S31A、S31P、S31D、S31R、S31Y、S31Q、S31E、S31G、Y32V、そして/または、Y32Sを含みます。

別の例では、SEQ ID NO: 862に述べたCDRL1は、カバート付番に基づいてG24、L25、S26、S27、G27a、S27b、V27c、S28、T29、S30、Y31、Y32、P33を位置に1回以上の変異を含むように変更されます。

そのようなアミノ酸置換の模範的な例がG24A、G24R、G24L、L25A、S26A、S27A、G27aA、S27bA、V27cA、S28A、T29A、S30A、Y31A、Y32A、そして/または、P33Aを含みます。

CDRL1は1、2、3、4、5、6、7、8、9、10以上のアミノ酸変更を含むことができます。

SEQID NO: 861に述べたCDRL3での模範的組み合わせ変更は例えばS28N/S30D/S31Hを含んでいます。

【 0 1 5 8 】

更なる例では、ここに提供しているのは、SEQ ID NOに詳しく説明されたCDRL2と比べて、変更されたCDRH3を含む反DLL4抗体です：871かSEQ

ID NO: 872。いかなる他のアミノ酸残基にもアミノ酸置換があることができます、変異は特に、アラニン(A)、フェニルアラニン(F)、プロリン(P)、チロシン(Y)、グルタミン(Q)、バリン(V)、イソロイシン(I)、グリシン(G)、ロイシン(L)、トリプトファン(W)、リジン(K)、アスパラギン(N)、ヒスチジン(H)、システイン(C)、グルタミン酸(E)、セリン(S)、アスパラギン酸(D)、メチオニン(M)、アルギニン(R)またはトレオニン(T)です。

1つの例では、SEQ ID NO: 871に述べたCDRL2はカバート付番に基づいて位置のD50、A51、S52、N53、554、A55そして/または、T56に1回以上の変異を含むように変更されます。 例えればそのようなアミノ酸置換の模範的な例がD50A、A51T、S52A、S52L、S52T、S52R、S52S、S52W、S52N、S52P、S52M、N53A、N53E、N53G、N53M、N53C、N53H、N53P、R54A、A55T、A55R、A55C、A55S、A55G、そして/または、T56Aを含みます。

1つの例では、SEQ ID NO: 872に述べたCDRL2はカバート付番に基づいて位置のS50、T51、N52、T53、R54、S55、そして/または、S56に1回以上の変異を含むように変更されます。 例えればそのようなアミノ酸置換の模範的な例がD50A、A51T、S52A、S52L、S52T、S52R、S52S、S52W、S52N、S52P、S52M、N53A、N53E、N53G、N53M、N53C、N53H、N53P、R54A、A55T、A55R、A55C、A55S、A55G、そして/または、T56Aを含みます。

1つの例では、SEQ ID NO: 872に述べたCDRL2はカバート付番に基づいて位置のS50、T51、N52、T53、R54、S55、そして/または、S56に1回以上の変異を含むように変更されます。 例えればそのようなアミノ酸置換の模範的な例がS50A、S50F、S50G、S50C、S50R、S50L、S50M、S50V、S50P、S50T、S50H、S50Q、S50N、S50K、S50D、S50E、S50W、T51A、T51F、T51L、T51I、T51M、T51V、T51S、T51P、T51Y、T51H、T51Q、T51N、T51K、T51D、T51E、T51W、T51R、T51G、N52A、T53A、R54A、R54I、R54Y、R54D、R54G、S55A、S55F、S55L、S55I、S55M、S55V、S55P、S55T、S55Y、S55H、S55Q、S55N、S55K、S55D、S55E、S55W、S55R、S55G、そして/または、S56Aを含みます。

CDRL2は1、2、3、4、5、6、7つ以上のアミノ酸変更を含むことができます。 SEQID NO:

10

20

30

40

50

871に述べたCDRL2での模範的組み合わせ変更は例えばS28N/S30D/S31Hを含んでいます。

【0159】

更なる例では、ここに提供しているのは、SEQ ID NOに詳しく説明されたCDRH3と比べて、変更されたCDRH3を含む反DLL4抗体です： 881かSEQ

ID NO : 882。いかなる他のアミノ酸残基にはもアミノ酸置換ができます、変異は特に、アラニン(A)、フェニルアラニン(F)、プロリン(P)、チロシン(Y)、グルタミン(Q)、バリン(V)、イソロイシン(I)、グリシン(G)、ロイシン(L)、トリプトファン(W)、リジン(K)、アスパラギン(N)、ヒスチジン(H)、システイン(C)、グルタミン酸(E)、セリン(S)、アスパラギン酸(D)、メチオニン(M)、アルギニン(R)またはトレオニン(T)です。1つの例では、SEQ ID NO : 881に述べたCDRL3はカバート付番に基づいて位置のR91、S92、N93、そして/または、W94に1回以上の変異を含むように変更されます。. そのようなアミノ酸置換の模範的な例がR91P、R91L、R91G、S92P、S92A、S92Q、S92V、S92T、S92R、S92G、S92V、S92M、S92N、S92C、N93Y、N93S、N93H、N93Q、W94R、W94S、W94T、W94L、W94P、そして/または、W94Mを含みます。1つの例では、SEQ ID NO: 882で述べたCDRL3はカバート付番に基づいて位置のV89、L90、Y91、M92、G93、S94、G95、I95a、そして/またはS95bに1回以上の変異を含むように変更されます。 例えばそのようなアミノ酸置換模範的な、例がV89A、V89P、V89T、V89S、V89L、V89R、V89C、V89E、V89W、V89N、V89I、V89G、V89H、L90A、Y91A、M92A、M92E、M92S、M92G、M92L、M92P、M92V、M92D、M92R、M92N、M92T、M92F、G93A、S94A、S94W、S94G、S94P、S94R、S94L、S94M、S94E、S94V、G94A、I95aA、S95bAを含みます。 CDRL3は1、2、3、4、5、6、7、8、9以上のアミノ酸変更を含むことができます。 SEQ ID NO : 882に述べたはCDRL3での模範的変更は例えばM92R/S94M、そして/または、V89L/S94Pを含んでいます。

10

20

20

【0160】

ここに提供された反DLL4抗体で模範的であるのは、表8aの各列に中に述べた抗体です、それぞれの抗体がCDRL1、CDRL2、そして/または、CDRL3に指定されたアミノ酸置換を含む可変重鎖を含み、CDRL1、CDRL2、そして/または、CDRL3に指定されたアミノ酸置換を含む可変軽いチェーンを含んでいます。アミノ酸変更が全く示されないところでは、抗体は参照抗体のCDR系列を含みます。表では、変更はSEQ ID NO.がアミノ酸の系列を示す参照CDR系列に対応するコバットナンバリングに関して例示されます。

括弧では、変更はそれぞれのSEQ ID NO.の彼らのアミノ酸位置に基づいて例示されます。

30

【表 8 A - 1】

表 8A						
	CDRH1	CDRH2	CDRH3	CDRL1	CDRL2	CDRL3
	GYTFITSYMH (SEQ ID NO:830)	IINPGGGSSTSYAQKFQG (SEQ ID NO:844)	EYSSSSAETYQH (SEQ ID NO:851)	RASQSVSSYLA (SEQ ID NO:861)	DASNRAT (SEQ ID NO:871)	QQRSNWPPWT (SEQ ID NO:881)
1			S100F (S104F)			
2			S99P (S103P)			
3			S98F (S102A)			
4			S98A/S99P/S100F (S102A/S103P/S104F)			
5			S98A/S99P/S100F/H102Y (S102A/S103P/S104F/H111Y)			
6			S98A/S99P/S100F/H102F (S102A/S103P/S104F/H111F)			
7			S98A/S99P/S100F/H102F (S102A/S103P/S104F/H111F)	S31K (S31K)		
8			S98A/S99P/S100F/H102F (S102A/S103P/S104F/H111F)	S28N/S30D/S31H (S28N/S30D/S31H)		
9		G55H (G56H)	S98A/S99P/S100F/H102F (S102A/S103P/S104F/H111F)			
10		I51V/N52L/S53S/G55H (I51V/N52L/S54T/G56H)	S98A/S99P/S100F/H102F (S102A/S103P/S104F/H111F)	S28N/S30D/S31H (S28N/S30D/S31H)		
11		I51V/N52L/S53S/G55H (I51V/N52L/S54T/G56H)	S98A/S99P/S100F/H102F (S102A/S103P/S104F/H111F)	S28N/S30D/S31H (S28N/S30D/S31H)	S52L/A55S (S52L/A55S)	

10

20

【表 8 A - 2】

	CDRH1	CDRH2	CDRH3	CDRL1	CDRL2	CDRL3
	GYSFITSYIG (SEQ ID NO:831)	IIPGDSDTRYSPSPFQG (SEQ ID NO:845)	RGYSGYDIFDY (SEQ ID NO:852)	GLSSGSVSTSYT (SEQ ID NO:862)	STNTRSS (SEQ ID NO:872)	VLYMGSGISYV (SEQ ID NO:882)
1			G96K/G100T (G100K/G104T)			
2			G96K/G100T (G100K/G104T)			
3	S28R (S28R)		G96K/G100T (G100K/G104T)			
4	S28R/G35V (S28R/G35V)		G96K/G100T (G100K/G104T)			
5	S28R/G35V (S28R/G35V)		G96K/G100T (G100K/G104T)			M92R/S94M (M94R/S96M)
6	S28R/G35V (S28R/G35V)		G96K/G100T (G100K/G104T)			V89L/S94P (V91L/S96P)
7	S28R/G35V (S28R/G35V)		G96K/G100T (G100K/G104T)		S50G (S52G)	V89L/S94P (V91L/S96P)

30

40

1CDRsを含む、ここに提供された上の反DLL4抗体のいずれでも、抗体はさらに可変重いか軽いチェーンのフレームワーク領域への1つ以上のアミノ酸変更を含むことができます。

変異はいずれかがアミノ酸添加、削除または代替であったならばそうすることができます。 一般に、どんな異なる変更も、以下のセクションDで説明されるように、抗体への改良不動産に貢献するとして特定されるものです。 可変重鎖で変更で模範的であるのは、kabat付番に基づく、位置24、そして/または、82aのアミノ酸置換です。 例えば、模範的変更はkabat付番に基づいてG24A、G24L、G24S、G24R、G24T、S82aV、S82aL、S82aG、

50

S82aQ、S82aN、S82aH、S82aR、S82aK、そして/または、S82aTのアミノ酸置換を含んでいます。 例えば、模範的変更はG24T、G24L G24A、そして/または、S82aTを含んでいます。

可変軽いチェーンで変更で模範的であるのは、62、76kabat付番にを拠点とする位置でのアミノ酸置換です。 例えば、模範的変更はF62L、S76E、S76Q、S76P、S76L、S76T、S76G、S76A、S76Y、S76N、T76S、T76E、T76Y、そして/または、T76Mのアミノ酸置換を含んでいます。 例えば、模範的変更はT76E、T76YまたはT76Mを含んでいます。

さらに、模範的組み合わせ変更はSEQ ID NOに詳しく説明されたCDRH1のS28R/G35Vのアミノ酸置換、831、G24T、G24AまたはG24Lの変更を含んでいます。

【0161】

いくつかの例では、1CDRs、またはその変更されたフォームを含む上の反DLL4抗体のいすれは上のセクション.C.1で説明されるようにgermlineによって派生させられた抗体が変更されたgermlineによって派生させられた抗体でのとおりのものであります。

例えば、1CDRsを含んだか、またはそのここに提供された、フォームを変更した模範的反DLL4抗体が、SEQ ID NOSに可変重鎖について詳しく説明するいすれも含んでいるので： 151-263、そして/または、381-438と、894-898、SEQ ID NOSで述べた可変軽いチェーン： 264-380, 439-571.

【0162】

ここに提供しているのは、特に、DLL4のためのnanomolar結合親和力がある抗体です。

これらは、包含しますが、テーブル32に詳しく説明された有限で、反DLL4でない抗体です。 模範的抗体はSEQ ID NOSに先へ可変重くて軽いチェーンシーケンスセットを持っていする抗体を含んでいます： 384と142。 414と142。 433と142。 433と479。 433と537。 433と536。 131と141。 151と141。 155と141。 156と141。 157と141。 155と266。 219と141。 156と343。 239と343。 239と370。 134と147。

D. 更なる変更

【0163】

さらにここに提供された反DLL4抗体は変更できます。 反DLL4抗体の変更は抗体の1つ以上の特性を改良できます、抗体の免疫原性を減少させる、敏感さをタンパク質加水分解に減少させる、そして/または、敏感さを酸化に減少などにさせることなどの抗体の半減期を改良させる、抗体の結合特性を変わるか、または向上させる、そして/または、抗体のエフェクター機能を調節するなどなどを含んでいますが、制限されません。 模範的変更は抗体の第一の系列の変更、そして/または、抗体の翻訳後修飾の変更を含んでいます。 模範的翻訳後変更は例えばセル配位子か他のタンパク質への糖鎖付加、アセチル化、PEG化、りん酸化、アミド化、グループを保護するかまたは妨げる誘導体化、タンパク分解的切断、およびリンクエージを含んでいます。 他の模範的変更は、抗体の1つ以上の特性を変更するか、または改良するために1つ以上の異種ペプチドの付属を抗体に含んでいます。

【0164】

一般に、変更は、その抗体が抗原結合断片の増加する免疫原性をもたらしませんし、かなり否定的に抗体の結合にDLL4に影響もしません。 変更された抗体の結合をDLL4に評価する方法は、ここに提供されて、芸術で知られています。 例えば、制限しませんが、エリーサまたはFACS結合の方法で変更された抗体はDLL4に結合するために検査できます。

【0165】

ここに生産された反DLL4抗体の変更は引き出された親抗体からの自然変異か人間の操作からの1つ以上のアミノ酸置換、削除または追加を含むことができます。 抗体などのポリペプチドの変更のための方法を芸術で知っていて、ここに提供されたどんな抗体や抗原結合断片の変更にも使うことができます。 いくつかの例では、当業者に知られているテクニックでFc変更で抗体が提供した反DLL4の薬物速度論的特性を充実させることができます。 抗体が1つ以上のアミノ酸置換でポリペプチドを生産するためにここに提供された抗原結合断片をコード化しながらヌクレオチド分子の中で変異を導入するのに芸術にお

10

20

30

40

50

ける技能がそれらに知られている標準的方法を使用できます。変異導入のための模範的テクニックは、部位特異的変異処理、およびPCRによって調停された変異誘発を含んでいますが制限されない。

【0166】

どちらのNで繋がっているかで繋がっている糖鎖付加はここに提供された反DLL4抗体を変更できます。N結合型糖鎖合成はトリペプチド系列アスパラギンXセリンとアスパラギンXトレオニンの中のアスパラギン残基の側鎖に炭水化物成分の付属を含めます。そのプロリン以外のXがアミノ酸のいずれかです。5ヒドロキシプロリンか5ヒドロキシリジンも使用できますが、Oで繋がっている糖鎖付加は砂糖N-acetylgalactosamine、ガラクトース、またはキシロースの1つの付属をヒドロキシアミノ酸、最も一般的にセリンまたはトレオニンに含めます。アミノ酸配列を変更することによって追加糖鎖付加部位を組み込むようにさらに反DLL4抗体を変更できるので、それは上で説明されたトリペプチド系列(N結合型糖鎖合成サイトへの)の1つ以上を含んでいます。

また、オリジナルの抗体(Oで繋がっている糖鎖付加部位への)の系列への1つ以上のセリンかトレオニン残基の添加か代替で変更をすることができる。抗体が定常領域を包括するところでそれに添付の炭水化物を変更できる(例えば見てください、米国特許パブ No.2003/0157108、2005/0123546と米国2004/0093621;国際特許パブ、No.WO2003/011878、WO1997/30087、WO1998/58964、WO1999/22764、および米国特許番号6,602,684)。

例えば、糖鎖付加変化が抗体の定常領域にあります。(そこでは、定常領域に取り付けられた糖鎖構造が、フコースを欠いています)。そのような異形で、改良されたADCCは機能します。任意に、定常領域はさらにそこにさらにADCCを改良する1つ以上のアミノ酸置換を含んでいます、例えば、位置298、333での代替; また/そしてFc領域の334(残りのぬナンバリング)(例えば US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; Okazaki et al. J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87. 614 (2004))。

defucosylated抗体を生産する細胞株の例がタンパク質fucosylationが不十分なLec13 CHOセルを含んでいます、(Ripka et al. Arch生物化学Biophys 249: 533-545 (1986); 特に例11)、およびノックアウトセルの米国2003/0157108A1、Presta、L. および WO2004/056312A1、Adams et alがアルファ-1、6フコシルトランスフェラーゼ遺伝子、FUT 8などのように裏打ちする米国パットAppl No、ノックアウトCHOセル、(Yamane-Ohnuki et al.バイオテクノロジー. Bioeng 87 614 (2004))。

【0167】

ここに提供された反DLL4抗体は、異種ペプチドの付属によって変更されて、浄化を容易にすることができます。抗体を含む融合タンパク質が、抗体のCかN終点のペプチドに溶かされたので、一般にそのようなペプチドは表現されます。一般的に浄化に使用する模範的ペプチドはhexa-ヒスチジンペプチド、赤血球凝集素(HA)ペプチド、および旗がペプチドにタグ付けを含みますが制限してません。

(1984) Cell 37:767; Witzgall et al.

(1994) Anal Biochem 223:2, 291-8).

溶融は、必ずダイレクトであることが必要であるというわけではありませんが、リンカーペプチドを通して起こることができます。いくつかの例では、リンカーペプチドは明確に蛋白酵素切断部位を認識する蛋白酵素を胸の谷間で浄化に続けて、浄化ペプチドの取り外しを考慮する蛋白酵素切断部位を含んでいます。

【0168】

生体外または生体内で抗体か抗原結合断片を特定の細胞種類に狙う異種ポリペプチドの付属は反DLL4抗体とそれについてここに提供された断片も変更できます。いくつかの例では、ここに提供された反DLL4抗体が、特定の細胞の表面にある受容体か特定のセル受容体

10

20

30

40

50

と対話する他のポリペプチドの抗体にこの抗体を融合することによって、特定の細胞種類に狙うことができます。 その反DLL4抗体が断片に他の様々な異種ポリペプチドを付けることができます、抗体、そして/または、酵素(例えば、ADEPTのための)の血中半減期を増加させるものを含んでいます。

診断しているそして/または、治療法の半分の付属はここに提供された反DLL4抗体を抗体に変更できます。 抗体に共有結合は、抗体が対応するエピトープに付くのを防がないためにどんなタイプの分子の共有結合でも、例えば診断しているか治療法の分子のように、ここに提供された反DLL4抗体は変更できます 例えば、分子の共有結合でさらにここに提供された反DLL4抗体は変更できるので、共有結合は、抗体がDLL4に付くのを防ぎません。

いくつかの例では、抗体は、組換え型にN-終点かC-終点の異種ポリペプチドに溶断できたか、または化学的に結合しました、異種ポリペプチドか他の構成への共有原子価の、そして、非共有原子価の結合を含んでいます。 例えば、異種ポリペプチドか構成が、診断ポリペプチド、他の診断半分、治療法のポリペプチドまたは他の治療法の半分であるかもしれません。 模範的診断と治療法が、ドラッグ、放射性核種、毒素、蛍光分子含んでいますが、制限されない(例えば、国際PCT Publication No. WO92/08495; WO91/14438; WO89/12624、米国特許番号5,314,995、およびEP396,387)。 例えば、生体内の、または、生体外の検出にラベルとして診断ポリペプチドか診断半分を使用できます。

ここに提供された反DLL4抗体の追加融合タンパク質は遺伝子シャフリング、モチーフシャッフル、エキソンシャッフル、そして/または、コードンシャッフル(「DNAシャッフル」とまとめて呼ばれる)のテクニックで発生できます。 そして、例えばより高い親近感と低い解離速度がある抗体を生産するためにここに提供された反DLL4抗体の活動を変更するのにDNAシャッフルを使うことができます(例えば、U.S. Pat. Nos. 5,605,793; 5,811,238;

5,830,721; 5,834,252; and 5,837,458, and Patten et al.

(1997) *Curr.*

Opinion Biotechnol. 8:724-33; *Harayama (1998) Trends*

Biotechnol. 16(2):76-82; *Hansson et al., (1999) J. Mol. Biol.* 287:265-76; と *Lorenzo* と *Blasco (1998) Biotechniques*

24(2):308-13).

1.

免疫原性を減少させる変更

【0169】

免疫原性を減少させる変更いくつかの例では、人間の対象のように、対象の免疫原性を減少させるようにさらにここに提供された抗体は変更できます。 例えば、対象の免疫システムに露出されると、抗体の免疫原性を根絶するか、または減少させて、人間のT細胞のために潜在的エピトープを変更するように抗体の1つ以上のアミノ酸を変更できます。

模範的変更は抗体の免疫原性を根絶するか、またはアミノ酸は減少させる1つ以上のアミノ酸の代替、削除、および挿入を含んでいます。 一般に、そのような変更はそれぞれの抗原のために抗体の結合特異性を変更しません。 抗体の免疫原性を減少させると、抗体の1つ以上の特性を改良できます、例えば、抗体の治療法の効力を向上させる、そして/または、抗体の半減期を生体内で増加させるなどように。

2. Fc変更

【0170】

ここに提供された反DLL4抗体は、野生型か変更されたFc領域を含むことができます。 いくつかの例では、Fcポリペプチドの1つ以上の特性を変更するようにFc領域を変更できます。 例えば、野生型免疫グロブリン重鎖遺伝子の定常領域のエフェクター機能と比べて、エフェクター機能を変更する(すなわち、増減する)ようにFc領域を変更できます。 抗体のFc領域はエフェクター機能と呼ばれた重要な機能的な能力の勢ぞろいを伝えて多くのFc受容体、および配位子とお互いに作用します。 Fcエフェクター機能は例えば、Fc受

10

20

30

40

50

容体結合、補体結合、およびTセル使い果たす活動を含んでいます(例えば米国特許番号6,136,310を見てください)。活動を使い果たすTセル、Fcエフェクター機能、および抗体の安定性について検査する方法は芸術で知られています。例えば、免疫グロブリン分子のFc領域はFc Rsとお互いに作用します。これらの受容体はさまざまな免疫体で表現されます、例えば単核細胞、大食細胞、好中球、樹状細胞、好酸性、肥満細胞、血小板、B細胞、大型顆粒リンパ球、ランゲルハンスの細胞、ナチュラルキラー(NK)セル、およびTセルを含んでいます。Fc/Fc R複合体の構成は制限された抗原のサイトにこれらの効果細胞を募集します、炎症仲介、B細胞活性化、エンドサイトーシス、食作用、および細胞毒の攻撃のリリースなどのセルと重要なその後の免疫反応の中でシグナル伝達事象を通常もたらします。細胞毒の、そして、食細胞のエフェクター機能を調停する能力は抗体が標的細胞を破壊する潜在的機序です。Fc Rsを表示する傷害性細胞によって標的細胞の上の制限された抗体の認識と病勢減退が細胞抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)と呼ばれます。様々な抗体アイソタイプのための他のFc受容体はFceRs (IgE)、FcαRs (IgA)、およびFc μ Rs (IgM)を含んでいます。

10

20

30

40

50

【0171】

したがって、Fcドメインは変更された親近感を持つことができます、増加するか低いか含んでいないか、Fc受容体のためのどんな親近感を含みますが制限されない。例えば、異なった免疫グロブリン下位分類には、Fc Rsのための異なった親近感があります、IgG1とIgG3が実質的に通常IgG2とIgG4より受容体によく付いています。さらに、異なったFc Rsは異なったエフェクター機能を調停します。Fc R1、Fc RIIa/c、およびFc RIIIaは、免疫受容体のチロシンベースの活性化モチーフ(ITAM)を持っている細胞内ドメインを持っていることによって特徴付けられた、免疫複合物の引き起こされた起動の積極的の調節因子です。Fc RIIbはしかしながら、免疫受容体のチロシンベースの抑制モチーフ(ITIM)を持って、したがって、抑制されています。したがって、受容体のために定常領域の親近感を変更すると、Fcドメインによって引き起こされたエフェクター機能は調節できます。

【0172】

1つの例では、Fc領域は使用されています、すなわち、よりよく調停エフェクタ機能のためにあるFc Rsとの最適化に結合されます、例のようなもの、抗体依存細胞性細胞毒素、ADCC。そのような変更された定常領域はアミノ酸残基の1つ以上に変更を含むことができます、(カバットナンバリングスキームに従った

免疫関心、米国保健・福祉省のタンパク質のカバット他(1991)の系列);

アミノ酸の位置249、252、259、262、268、271、273、277、280、281、285、287、296、300、317、323、343、345、346、349、351、352、353、および424を含んでいますが制限されない; 例えば、定常領域での変更を以下の1つか、より多くで対応するようにすることができます、G119A、S122D、S122E、S122N、S122Q、S122T、K129H、K129Y、D132Y、R138Y、E141Y、T143H、V147I、S150E、H151D、E155Y、E155I、E155H、K157E、G164D、E166L、E166H、S181A、S181D、S187T、S207G、S207I、K209T、K209E、K209D、A210D、A213Y、A213L、A213I、I215D、I215E、I215N、I215Q、E216Y、E216A、K217T、K217F、K217A、およびSEQ ID NO: 891で述べた模範的FcシーケンスセットのP279L、またはその組み合わせ; これらの変異を含む変更されたFcは、例えば、FcRに増大結合を持つことができます。動かす受容体Fc IIIa、そして/または、抑制性受容体Fc RIIbに結合減少を持つことができます(例えば米国2006/0024298を見てください)。FcRsに結合増加を持つように変更された定常領域は真菌細胞入院患者の破壊を容易にすることでは、より効果的である場合があります。

【0173】

いくつかの例では、抗体の生体内の半減期、薬物動力学を増加させるようにFcRn受容体との抗体の相互作用を改良するようにさらにここに提供された抗体か抗原結合フラグメント

は変更できます(U.S.Patent No.7,217,797、およびU.Sパットパブ見てください、例えば、No.2006/0198840と2008/0287657)。FcRnは新生児FcRです。その結合はエンドソームから血流までendocytosed抗体を再生します。完全な長さの分子の大判による腎臓濾過の除外に結びつけられたこの過程は、1-3週間及び好ましい抗体血清半減期に結果として生じます。また、FcRnへのFcの結合は抗体輸送における役割を果たします。

Fc領域の模範的変更は、米国で特許No.7,217,797について説明したFcの変異が；U.SパットパブNo.2006/0198840、2006/0024298、および2008/0287657を包含しますが、制限されない。そして、国際特許パブ. WO2005/063816、例えばアミノ酸残基の1つ以上での変異など、(カバットのナンバリング、Kabat et al). (1991)、CH2ドメインの251-256、285-90、308-314そして/または、アミノ酸の385-389、定常領域Fc重鎖のCH3ドメインでの428-436、この領域に

変更は変更されていない抗体に比例してFc受容体結合親和力、そして/または、血中半減期を変更します。いくつかの例では、定常領域はCH2ドメインのアミノ酸位置250、251、252、254、255、256、263、308、309、311、312、および314、そして/または、Fc重鎖定常領域のCH3ドメインのアミノ酸位置385、386、387、389、428、433、434、436、および459の1つ以上で変更されます。そのような変更はアミノ酸のGly120、Pro121、Ser122、Phe124 Leu125、Phe126、Thr133、Pro174、Arg175、Glu177、Gln178、CH2ドメインのAsn180、Gln245、Val246、Ser247、Thr249、Ser283、Gly285、Ser286、Phe288、および891SEQ ID NOで述べた模範的FcシーケンスセットのCH3ドメインのMet311に対応しています。いくつかの例には、1つ以上の表面で露出している残りに変更があります、そして、変更は残りへの同様の電荷、極性または疎水性の残りを代用している代替です。

【0174】

特に例、Fc重鎖定常領域はアミノ酸位置251、252、254、255、および256(カバットのナンバリング)の1つ以上で変更されます；そこに位置251がLeuかArgと共に代用し、ティールと共に位置252を代用して、Phe、Ser、TrpまたはThr、ThrかSerと共に位置254を代用して、Leuと共に位置255を代用して、Ser、Arg、Gln、Glu、Asp、アラー、AspまたはThrと共にGlyかIleかArg、そして/または、位置256を代用します。いくつかの例では、アミノ酸位置308、309、311、312、および314(カバットのナンバリング)の1つ以上でFc重鎖定常領域を変更します；そこにThrかIleと共に位置308を代用し、Proと共に位置309を代用します、そして、セリンかGluと共に位置311を代用します、そして、Aspと共に位置312を代用します、そして、Leuと共に位置314を代用します。いくつかの例では、アミノ酸位置428、433、434、および436(カバットの付番)の1つ以上でFc重鎖定常領域を変更します。(そこでは、位置428はMet、Thr、Leu、Phe、またはSと共に代用されます)。または、または、Lys, Arg, Ser, Ile, Pro, Gln, or

Hisと共に位置433を代用します、Arg、Ser、Ile、Pro、Gln、彼、Phe、ティールと共に位置434を代用し、また/そしてHis, Asn, Asp, Thr, Lys, Met, or Thr.と共に436の位置を代用します。いくつかの例では、Fc重鎖定常領域はアミノ酸位置263と459(カバットのナンバリング)の1つ以上で変更されます。(そこでは、GlnかGluと共に位置263を代用して、LeuかPheと共に位置459を代用します)。

【0175】

いくつかの例では、補数タンパク質C1qに結合を機能アップするようにFc重鎖定常領域を変更できます。また、FcRsと対話することに加えて、Fcは、補体依存性細胞傷害(CDC)を調停するために補数タンパク質C1qと対話します。C1qは、C1複合体を形成するためにセリン・プロテアーゼのC1rとC1sと共に複合体を形成します。

2つの免疫グロブリンまで付くのは、補体力スケードを動かすために十分ですが、C1qは6つの抗体を縛ることができます。. FcRsとのFc相互作用と同様で、異なった免疫グロブリン下位分類には、C1qのための異なった親近感があります、IgG1とIgG3が実質的に通常IgG2とIgG4よりよく付いていて。したがって、C1qに結合増加を持っている変更されたFcは、高められたCDCを調停できて、真菌細胞の破壊を機能アップできます。C1qに拘束力を増加する模範的定常領域での変更は、位置345と253(カバットのナンバリング)

10

20

30

40

50

でのアミノ酸変更を含んでいますがでの制限されない。模範的変更はSEQ ID NO: 891に述べた模範的FcシーケンスでK209W、K209Y、および216Eに対応するそれらです。

【0176】

別の例では、Fc Rsとの抑える代替か切断術結合があるさまざまなFc変異体も知られています。そのような突然変異蛋白質はFcによって調停された減少したか排除されたエフェクター機能の必要がある例で役に立ちます。

しばしばこれは、殺害ではなく、目標抗原に堪えるセルの敵意が望まれているそうです。

そのような模範的Fcは、米国特許番号5,457,035で説明されたFc突然変異蛋白質でアミノ酸位置248、249、および251(カバットのナンバリング)で変更されます。SEQ ID NO: 891のアミノ酸100-330の中で述べた模範的Fcシーケンスにはアミノ酸118はLeuからアラ

10

ーまで変更されて、アミノ酸119はLeuからGluまで変更されて、アミノ酸121はGlyからアラバマ州まで変更されます。例えば、模範的Fc系列などのどんなFc系列でも同様の変異を作ることができます。この突然変異蛋白質はFc受容体のために減少している親近感を示します。

【0177】

変更された定常領域を含むようにここに提供された抗体は設計できます。例えば、抗体(すなわち、作成Fc融合タンパク質)の定常領域への融合か活用ポリペプチドのための方法は、芸術で知られて、例えば、米国特許番号5,336,603、5,622,929、5,359,046、5,349,053、5,447,851、5,723,125、5,783,181、5,908,626、5,844,095、および5,112,946で説明されます。EP307,434。EP367,166。EP394,827。PCT刊行物WO91/06570、WO96/04388、WO96/22024、WO97/34631、およびWO99/04813。Ashkenazi et al. (1991)

20

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10535-10539; Traunecker et al. (1988) Nature 331:84-86; Zheng et al. (1995) J. Immunol. 154:5590-5600; とVil et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:11337-11341 (1992) そして、ほかの場所で、ここに説明されます。いくつかの例、FcRn結合親和力を増加させる、そして/または、向上する1つ以上の変更を持っている変更されたFc領域では、ここに提供された反DLL4抗体に半減期を溶断できます。

3. PEGylation

ここに提供された反DLL4抗体は、半減期を増加させる、そして/または、それらの薬物動態プロファイルを改良するために、高分子、または水溶性の重合体、例えば高分子重さのポリエチレン・グリコール(PEG)などに結合できます。水溶性の重合体はポリエチレン・グリコール(PEG)、エチレン・グリコール/プロピレン・グリコールの共重合体、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニル・アルコール、ポリビニール・ピロリドン、ポリ-1、3-dioxolane、ポリ-1です、3、6-trioxane、エチレン/が無水物共重合体をmaleicするということではありません;

30

polyaminoacids(ホモポリマーかランダム共重合体のどちらか)とデキストランかポリーの(nビニルピロリドン)のポリエチレン・グリコール、propyleneグリコールホモポリマー、propylene酸化工チレン共同酸化物/重合体がポリオル(例えば、グリセロール)、ポリビニル・アルコール、およびその混合物を含みますが制限されない。

40

ポリエチレン・グリコールプロピオンアルデヒドは水溶安定性によって製造する利点があります。

重合体は、どんな分子の重さもあることができます、そして、分岐しているか、または枝状に分かれていません。

抗体に付けられた重合体の数は異なることができます、そして、1つ以上の重合体が付属しているなら、それらは同じであるか異なった分子であるかもしれません。一般に、誘導体化に使用される重合体の数、そして/または、タイプが問題に基づいて決定できます。改良される抗体の特定の特性または機能、抗体派生物が限定条件の療法で使用されるかどうかを含みますが制限されない。

当業者に知られているテクニックは、活用を行うことができます。PEGとの治療抗体の結合は、機能を妨げていない間、薬力学を高めるために示されています。(例えばDeckert

50

et al., Int. J. Cancer 87を見てください:

382-390, 2000; Knight et al., Platelets 15: 409-418, 2004; Leong et al., Cytokine 16: 106-119, 2001; とYang et al., Protein Eng.

16: 761-770, 2003). リンカも抗体か抗原結合フラグメントのNかC-終点へのPEGのサイト特有の結合を通した、または、リジンの残りの現在の -アミノ基を通した多機能リンカもなしで抗体か抗原結合フラグメントにPEGを取り付けることができます。生物活動の最小量の損失をもたらす直線的であるか枝分かれ重合体誘導体化は使用できます。結合の度合いはSDS-ページと質量分析によってモニターされて、PEG分子の適切な結合を抗体に確実にすることができます。

反応を起こしていないPEGによる切り離されて、抗体-PEGから、サイズ排除かイオン交換クロマトグラフィーが例えば結合するということできます。 DLL4への結合活性と生体内の効力がないかどうか当業者に知られている方法を使用することでPEG-derivatized抗体をテストできます、例えば、ここに説明された機能分析で。

4. 検出可能な半分の結合

【0178】

いくつかの例では、検出可能な半分への結合でここに提供された反DLL4抗体と抗体フラグメントはさらに変更できます。直接または間接的に検出可能な半分を検出できます。

選択された検出可能な半分によって、生体内生体外に検出可能な半分を検出できます。

検出可能な半分を使うことができます、例えば、DLL4のために反DLL4抗体の結合親和力を決定するための結合分析で。反DLL4抗体の準備の方法で検出可能な半分も使うことができます、例えば、抗体の浄化などのように。検出可能な半分が通常、選択されているので、検出可能な半分の活用は抗体の結合を標的エピトープに妨げません。一般に、検出可能な半分のこの選択は必要である感度、化合物がある結合の容易さ、安定性要件、利用可能な計装、および処分条項次第です。芸術中の1つ技能は、ラベルにじみ深く、使われる分析評価との適当でコンパチブル検出可能なラベルを特定できます。検出可能な半分で抗体をラベルする方法は、芸術で知られていて、例えば、組換え型の、そして、化学の方法を含んでいます。

【0179】

検出可能な半分は検出可能な物理的であるか化学の性質があるどんな材料であってもよいです。

そのような検出可能なラベルは免疫学的検定法の分野でよく開発しています、そして、一般に、提供された方法でいずれもそのような方法で役に立つとラベルする大部分を適用できます。したがって、ラベルが分光器の、そして、光化学の、そして、生化学のimmunochemical、電気的であるか、光学の、または、化学の手段で検出可能な構成のいずれかです。役に立つラベルは蛍光でない染料(例えば、フルオレセインイソチオシアネート、テキサス赤、ローダミン、および同様のもの)、radiolabels(例えば、³H、¹²⁵I、³⁵S代、¹⁴C、または³²P)、ガンマ、および陽電子はラジオアイソトープ(例えば、¹⁵⁷Gd、⁵⁵Mn、¹⁶²Dy、⁵²Cr、および⁵⁶Fe)を放っています;

金属イオン(例えば、¹¹¹In、⁹⁷Ru、⁶⁷Ga、⁶⁸Ga、⁷²As、⁸⁹Zr、および²⁰¹Ti)、酵素(例えば酵素結合免疫吸着検定法に一般的に使用される、山葵ペルオキシダーゼ類、アルカリ・ホスファターゼ、および他のもの)、電子はエージェント(例えば、金属結合タンパク質と化合物を含んでいます)を移します。ルミネッセンスと化学発光ラベル(例えば、ルシフェリンと2、3-dihydroptahiazinediones、例えば、ルミノール)、電磁ビーズ(例えば、DYNABEADSTM)、およびコロイド金、色ガラスまたはプラスチックビーズなどの比色分析のラベル(例えば、ポリスチレン、ポリプロピレン、ラテックスなど)を含みますが制限されない。使用できる様々なラベリングか信号生産システムのレビューに関しては、見てください、例えば合衆国のNo.4,391,904の特許。

5. 繼る特異性を改良する変更

【0180】

10

20

30

40

50

ここにほかの場所で詳細で説明されるファージ提示法などのテクニックで、抗体と抗体フラグメントが提供した反DLL4の結合特異性を変更するか、または改良できます。

一般に、ファージ提示法のための方法はライプラリの抗体種をクローンを作って表現する線状ファージ(phagemid)表面発現ベクター系の使用を伴います。結合のライプラリを作り出す様々なphagemidクローニングシステムは他のものによって説明されます。例えば、カン、他によって説明されるphagemidsにおける結合の抗体ライプラリーの準備を見てください。Kang, et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88:4363-4366 (1991); Barbas, et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88:7978-7982 (1991); Zebedee, et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89:3175-3179 (1992); Kang, et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88:11120-11123 (1991); Barbas, et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89:4457-4461 (1992); とGram, et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89:3576-3580 (1992), それが参考でここに援用します。 10

【0181】

特に例、VHをコード化するDNA配列、およびVLドメインは動物cDNAライプラリー(例えば、リンパ系組織に関する人間かネズミ科cDNAライプラリー)から増幅されます。

VHとVLドメインをコード化するDNAは、PCRによって再結合されてscFvリンクと共にphagemidベクトルにクローンです(例えば、p CANTAB6かpComb3HSS)。ベクトルはE.coliでelectroporatedされます、そして、E.coliは介助ファージに感染しています。これらの方 20 法で使用されるファージは、fd、M13、およびVHを含む通常糸状のファージです、そして、通常、VLドメインは組換え型にファージの遺伝子IIIか遺伝子VIIIのどちらかに溶断されます。 DLL4抗原に付く抗原結合ドメインを表現するファージは、選択するか、または抗原、例えば、組換え型のDLL4と同一視できます。ファージ提示法による抗体を作るファージ表示方法の例は明らかにされたものを含みます。例えばBrinkman et al. (1995) J. Immunol.

Methods 182:41-50; Ames et al. (1995) J. Immunol. Methods 184:177-186; Kettleborough et al. (1994) Eur. J. Immunol. 24:952-958; Persic et al. (1997) Gene 187:9-18; Burton et al.

(1994) 免疫学の進歩 57:191-280; PCT application No. PCT/GB91/0134; PCT publication Nos.

WO90/02809、WO91/10737、WO92/01047、WO92/18619、WO93/1 1236、WO95/15982、WO95/2 30 0401、およびWO97/13844。米国特許番号5,698,426、5,223,409、5,403,484、5,580,717、5,427,908、5,750,753、5,821,047、5,571,698、5,427,908、5,516,637、5,780,225、5,658,727、5,733,743、および5,969,108。それのそれがここに参照で全体として組み込んでいます。 40

【0182】

ファージ選択の後に上記の参照で説明されるように、ファージからの抗体コーディング領域を人間の抗体を含む全体の抗体かいなる他の希望の抗原結合断片も発生させるのに隔離されて使用されます、哺乳類細胞、昆虫細胞、植物細胞、イースト、およびバクテリアを含むどんな希望のホストでも表現できます、例えば、ここに説明されるように。Fab、Fab' とF(ab') 2個の断片を生産する組換え型であるテクニックはPCT公表No. WO92/22324; Mullinax et alで明らかにした芸術で知られている方法を使用することで使うことができます。 (1992) BioTechniques 12(6):864-869; Sawai et al. (1995) AJRI 34:26-34; とBetter et al. (1988) 科学240: 1041-1043.

【0183】

改良特性がある追加抗体を生産して、次に認識するために抗体のimmunospecificitiesかライプラリの抗体フラグメントを増加する、そして/または、変更するために結果として起こるphagemidライプラリを操ることができます、目標抗原への結合増加などのように。

例えば、どちらかまたは両方に関しては、DNAをコード化するHとLチェーンは、免疫グロブリンポリペプチドの可変部の相補性決定領域(CDR)でmutagenizedして、次に、望ましい免疫反応と中立能u21147 力のために上映できます。変更のために候補超可変領域 50

サイトを特定して、抗原結合にかなり貢献する超可変領域の残りを特定するためにアラニンスキャン変異誘発を実行できます。

代わりに、さらに、抗体と抗原の間の接点を特定するために抗原抗体複合体の結晶構造を分析するのは、有益である場合があります。

そのような接触残基と隣接残基はここに詳しく説明されたテクニックに従った代替の候補です。 そのような異形がいったん発生すると、ここに説明されるように、異形のパネルを選別にかけます、そして、さらなる展開のために1つ以上の関連分析評価における優れた特性がある抗体を選択できます。

E 反DLL4抗体を発生するかまたは特定する方法

【0184】

ここに提供された反DLL4抗体が、芸術で技能u12364

か1つに知られているどんな方法も使用することで発生するか特定することができます。

例えば、反DLL4抗体は、従来の免疫と雑種細胞選別法を使用することで発生できます。

他の例では、反DLL4抗体は芸術における、いずれなどの技能u12364 か1つにここに説明されていた状態で知られているさまざまな選別法のいずれでも特定されます。

抗体工学と親和性成熟方法を使用することで特定されたか発生している抗体もさらに最適化できます。

【0185】

1. 免疫と雑種細胞選別

【0186】

最初にKohler et alによって説明された雑種細胞方法を使用することでDLL4に、特定の抗体を作ることができます。 (1975) ネイチャー、256: 495、 または、組み換えDNA方法で、(米国特許番号4,816,567)。

【0187】

雑種細胞方法で、ハムスターなどのマウスか他の適切なホスト動物が、生産するか、または明確に免疫に使用されるタンパク質に付く抗体を生産できるリンパ球を引き出すために免れさせられます。 動物でタンパク抗原と助手の複数の皮下の(Sc)か腹膜内の(ip)注射で目標抗原への抗体を上げることができます。 2週間後に、動物は上げられます。 7-14日間後に遅い動物は出血します、そして、血清は目標抗原に、特定の抗体測定濃度のために検査されます。 動物は測定濃度停滞期まで上げられます。

【0188】

あるいはまた、生体外にリンパ球を免れさせることができます。 そして、骨髄腫細胞がポリエチレン・グリコールなどの適当な融剤を使用している状態で、リンパ球は、雑種細胞セル(Monoclonal Antibodies: Goding、プリンシブルズ、およびPractice、ページ59-103(アカデミックプレス社、1986))を形成するために溶断されます。

プリンシブルズ、およびPractice、ページ 59-103(アカデミックプレス社、1986))

【0189】

準備された雑種細胞セルは、一般に、融解していなくて、親の骨髄腫細胞の成長か生存を抑制する1つ以上の物質を含む適切な培地で、種種を蒔かれて、育てられます。 例えば、親の骨髄腫細胞が酵素ヒポキサンチングアミニンphosphoribosylトランスフェラーゼ(HGPRTかHPRT)を欠いていると、雑種細胞のための培地はヒポキサンチン、アミノブテリン、およびチミジン(HAT媒体)を通常入れるでしょ。 その物質はHGPRT-不完全細胞の成長を防ぎます。

【0190】

骨髄腫細胞は、効率的に融合するものを含んで、選択された抗体産生細胞で抗体の安定したハイレベルの生産を支持して、HAT媒体などとの媒? このうち、骨髄腫細胞株はネズミ科骨髄腫線です、ソu12540 -ク研究所細胞分布センター、サンディエゴ(カリフォルニア)(米国)利用可能u12394 なMOPC-21およびMPC-11のマウス腫瘍から得られたもの、やアメリカ培養細胞系統保存機関(ATCC)、ロックヒル、メリーランド州(米国)か

10

20

30

40

50

ら利用可能u12394 なSP-2、X63-Ag8-653セルのように。 人間骨髄腫とマウス人間heterocytomaセル線もヒトモノクローナル抗体の生産のために説明されます。(Kozbor, (1984) J. Immunol., 133:3001; とBrodeur et al., モノクローナル抗体の生産技術、とアプリケーションpp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., ニューヨーク, 1987)).

【0191】

雑種細胞セルが成長している培地は目標抗原に対して向けられたモノクロナール抗体の生産のために検査されます。 雜種細胞セルによって生産されたモノクロナール抗体の結合特異性は芸術(例えば、セクションE.1で説明されるように)における技能u12364 か例えば免疫沈降反応か生体外の結合分析で1つに知られているどんな方法でも決定できます、放射線検定法(RIA)や酵素で繋がっている免疫吸着アッセイ(酵素結合免疫吸着検定法)のように。 例えば、結合親和力も、スキヤッチャードの分析を使用することで決定できます。

希望の特異性、親近感、そして/または、活動の抗体を生産する雑種細胞セルが、特定された後に、クローンを限界希釈法手順で副無性生殖して、標準方法で育てることができます。(Monoclonal Antibodies: Goding、プリンシブルズ、およびPractice、ページ59-103(アカデミックプレス社、1986)) 適当な培地はこのために例えばD-MEMかRPMI-1640などがあります。

さらに、動物の腹水腫瘍として生体内で雑種細胞セルを育てることができます。

【0192】

例えば、プロテインA -セファロース、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、またはアフィニティークロマトグラフィーなどの従来の免疫グロブリンの精製方法によって、サブクローンにより分泌されるモノクロナール抗体は、培養培地、腹水、または血清から分離されています。

【0193】

従来の手順を用いることで雑種細胞で派生しているモノクロナール抗体をDNAでコード化するのを容易に隔離して、配列できます。 例えば、明確に雑種細胞からの興味がある重くて軽いチェーンコーディング領域を増幅するように設計されたオリゴ・スクレオチド・プライマーを使用することで配列は作用できます。 B いったん隔離されると、希望のモノクロナール抗体の統合を得るために免疫グロブリンタンパク質を作り出さないcoli セルは、E.coli セル、猿のようなCOSセル、チャイニーズハムスター(CHO)セルなどの宿主細胞の中にトランスフェクトする発現ベクターにDNAを置くことができます。

【0194】

2. スクリーニング検定

【0195】

スクリーニング検 抗体クローンのために希望の活動か活動でを抗体ライブラリーを使用することで反DLL4抗体を特定できます。

【0196】

a. ディスプレイラリ

選別法の典型であることは、抗体ライブラリーの高処理量選別です。 例えば、ライブラリの個別分子(表現型)とそれらをコード化する遺伝情報(遺伝子型)の間の物理的なリンクがあるように、抗体ライブラリーは、ディスプレー技術を使用することで上映されます。

これらの方法はセル表これらの方法としては、細菌ディスプレイ、酵母ディスプレイと哺乳類のディスプレイ、ファージディスプレイ(スミス、GP (1985) サイエンス228:1315-1317)、mRNAのディスプレイ、リボソームディスプレイとDNAの表示を含む、セルの表示が、これらに限定されない。ディスプレー技術を使用して、それぞれの個々の抗体のアイデンティティは選別の前に未知です; しかし、表現型遺伝子型リンクは選択されることの軽快な識別のために抗体を許容します。 ライブラリーはでは、通常、人間か動物から取り入れられた免疫体から抗体遺伝子断片をコード化する核酸を得ます; 抗原特定の抗体を支持して偏っているライブラリを望んでいるなら、目標抗原で対象を免れさせて、抗体応答を発生させる、ライブラリー構築のために脾臓細胞、そして/または、B細胞

10

20

30

40

50

か他の周囲の血中のリンパ球(PBLs)を循環させるのを回復します。 特定の膜で縛られたは抗体を表現するB細胞を分離するのに適当な選別手順を用いることで抗原特定の抗体反応細胞人口のための追加裕福を得ることができます。 例えば、蛍光活性化細胞分類(FACS)が蛍光色素標識抗原へのセルの抗原親和性クロマトグラフィーか吸着のあとに続いている細胞分離で。

あるいはまた、非免疫られたドナーからの脾臓細胞、そして/または、B細胞か他のPB 10 Lsの使用は、可能な抗体レパートリーの、より良い表現を提供して、また、目標抗原が抗原性でないどんな動物の(人間か非人間)の種も使用することで抗体ライブラリーの建設を可能にします。 生体外の抗体遺伝子構造を取り入れるライブラリーに関しては、幹細胞は、非再配列された抗体遺伝子断片をコード化する核酸を提供するために対象から取り入れられます。 興味の免疫細胞は、ヒト、マウス、ラット、ウサギ目、ルピナス、イヌ、ネコ、ブタ、ウシ、ウマ、および鳥類などの動物種、各種のから得ることができます。

【0197】

抗体バリアブル遺伝子セグメント(VHとVLセグメントを含んでいる)をコード化する核酸は、興味があるセルを取り戻して、拡張できます。 再配列されたVHとVL遺伝子ライブラリーの場合では、プリマが再配列されたVHとVLの遺伝子の5'フィートと3'末端に合っていて、オルランディ他((1989)Proc)で説明されるように、ポリメラーゼ連鎖反応があとに続いたリンパ球(PCR)からゲノムDNAかmRNAを隔離することによって、希望のDNAを得ることができます。 Natl.

Acad. 科学。 (米国), 86: 3833-3837、その結果、表現のためにさまざまのVを遺伝子レパートリーにします。 n. cDNAとゲノムDNAからVの遺伝子を拡張できます、エキソの5'末端の逆入門書が熟しているV-ドメインをコード化して、前進のプリマがJ-セグメントの中に基づいていて、オルランディ他、(1989)およびWARD他、(1989)ネイチャーの341:544-54 20 6:

に説明されるように。 しかしながら、cDNAから増幅するのにおいて、また、逆プリマは Jones et al., (1991) バイオテクノロジー, 9:88-89,

Sastry et al. に説明されるように一定の領域内に前方プライマー、,

(1989) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86:5728-5732に説明されるように、補完性を最大にするために、オルランディ他で説明されるように、退化をプリマに取り入れることができます。 (1989) またはSastry et al. (1989). すべての利用可能免疫細胞の核酸サンプル中に存在する、

使用可能なすべてのVHおよびVLの配列を増幅するために各V-遺伝子ファミリーに狙うPCR入門書と免疫体核酸のサンプルの現在のVLアレンジメントを使用することによって、ライブラリーの多様性を最大にすることができます、例えば、Marks et al., (1991) J. Mol. Biol., 222:581-597方法で、またはOrum et al., (1993) Nucleic Acids Res., 21:4491-4 30 498の方法で説明されるように。 発現ベクターへの増幅されたDNAのクローニングにおいて、オルランディ他で説明される片端のタグとしてPCRプリマの中でまれな制限サイトを紹介できます。 (1989), またはClackson et al., (1991) Nature, 352:624-628に説明したようにタグプライマーと、さらにPCR増幅によります。

【0198】

抗体ライブラリーを発生させることの別の例では、V遺伝子断片から総合的に再配列されたVの遺伝子のレパートリーを生体外に得ることができます。 人間VH-遺伝子断片の大部分は、クローンを作られて、配列されました。(例えばTomlinson et al., (1992) J. Mol. Biol., 227:776-798、)、写像される、(例えばMatsuda

et al., (1993) Nature Genet., 3:988-94) HoogenboomとWinter(1992)J.MolBiol、227: 381-388で説明されるように、さまざまの系列と長さのH3輪をコード化しているPCRプリマが付くさまざまのVH遺伝子レパートリーを発生させるのにこれらのセグメントを使用できます。 Barbas

et al., (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4457-4461で説明されるように、配列多様性のすべてがただ一つの長さの長いH3 loopで焦点を合わせられている状態で、VHレ

10

20

30

40

50

パートリーも作ることができます。

人間VとVセグメントは、クローンを作られて、配列されました。(ウィリアムズとWinter (1993) *Eur. J. Immunol.*,

23:1456-1461)、合成の軽いチェーンレパートリーを作るのに使用できます。 さまざまなVH、VL折り目、L3およびH3の長さに基づいた合成のV遺伝子レパートリーはかなりの構造多様性の抗体をコード化します。 DNAsをコード化しながらV-遺伝子の増幅に続いて、HoogenboomとWinter(1992) *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388の方法によると、生体外に生殖V遺伝子断片を再配列できます。

【0199】

いくつかの方法でVHとVL遺伝子レパートリーを一緒に結合することによって、抗体フラグメントのレパートリーを構成できます。 異なったベクトルで各レパートリーを作成できます、そして、ベクトルは結合の感染で(例えば、鮭の燻製Pシステムを使用して)生体外(例えば、Hogrefe et al., (1993)

Gene, 128:119-126)が生体内で再結合された(Waterhouse et al., (1993)

Nucl. Acids Res., 21:2265-2266). 生体内的再結合アプローチは、E.

coli 転換効率によって課されたライブラリサイズでの制限を克服するためにFab断片の2チェーンの本質を利用します。 あるいはまた、レパートリーを同じベクトル(例えばBarbas et al., (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:7978-7982)に連続してクローンを作るか、PCRによって一緒に組み立てられて、または次に、クローンを作ることができます(例えば、Clackson et al., (1991) *Nature*, 352:624-628)。 また、ただ一つのチェーンFv(scFv)レパートリーを形成するためにフレキシブルなペプチド逆電流器をコード化するDNAにVHとVL DNAsを接合するのにPCRアセンブリを使用できます。 別のテクニックで、リンパ球の中でPCRでVHとVLの遺伝子を合成して、連鎖遺伝子のレパートリーがその時クローンであるのに「セルPCRアセンブリ」を使用できます。(例えばEmbleton (1992) *Nucl. Acids Res.*, 20:3831-3837).

【0200】

典型的な表示ライブラリーでは、VHとVLチェーンのレパートリーがライブラリのそれぞれのメンバーの系列が知られていないように1ポットのライブラリとして構成されます。

DLL4に、特定の抗体の識別に続いて、それに従って、配列が必要です。 したがって、同じくらい上では、雛種細胞で発生している抗体に関して、従来の手順を用いることで表示ライブラリから特定されたDNAをコード化する抗体クローンは、容易に隔離して、配列できます。

例えば、明確にDNA錶型からの興味がある重くて軽いチェーンコーディング領域を増幅するように設計されたオリゴ・スクレオチド・プライマーを使用することで配列は作用できます、例えば、ファージDNAテンプレート。

【0201】

選別に使用できるそのような抗体ライブラリーで模範的であるのは、以下のいずれでも説明されたものです:

ヨーロッパ特許アプリケーションのNos EP0368684とEP89311731。

国際発行した特許出願Nos. WO92/001047、WO02/38756、WO97/08320、WO2005/023993、WO 07/137616、およびWO2007/054816；米国特許Nos. US 6,593,081 とUS 6,989,250；米国発行した特許出願Nos. US 2002/0102613, US 2003/153038, US 2003/0022240, US 2005/0119455, US 2005/0079574 とUS 2006/0234302; とOrlandi et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 86:3833-3837;

Ward et al. (1989) *Nature*, 341:544-546; Huse et al. (1989) *Science*, 246:1275-1281; Burton et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 88:10134-10137; Marks et al. (1991) *J. Mol. Biol.*, 222:581-591; Hoogenboom et al. (1991) *J. Mol. Biol.*, 227:381-388; Nissim et al. (1994) *EMBO J.*, 13:692-698; Barbas et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 89:4457-4461; Akamatsu et al.

10

20

30

40

50

(1993) *J. Immunol.*, 151:4651-1659; Griffiths et al. (1994) *EMBO J.*, 13:3245-3260; Fellouse (2004) *PNAS*, 101:12467-12472; Persson et al. (2006) *J. Mol. Biol.* 357:607-620; Knappik et al. (2000) *J. Mol. Biol.* 296:57-86; Rothe et al. (2008) *J. Mol. Biol.* 376:1182-1200; Mondon et al. (2008) *Frontiers in Bioscience*, 13:1117-1129; and Behar, I. (2007) *Expert Opin. Biol. Ther.*, 7:763-779.

【 0 2 0 2 】

ファージ提示法ライブラリー

10 例えは、自然であるか合成の抗体は、ファージコートタンパク質に溶断された抗体可変領域(Fv)の様々な断片を表す、ファージを含む選別ファージライブラリーによって選択されます。. ファージの上に可変領域を機能上表示できます、単一のチェーンフラグメントFv(scFv)のようにVHとVLは短くて、フレキシブルなペプチドを通して電子対を共有してリンクされます。または、Fabフラグメントとして、Winter et al., (1994) *Ann. Rev. Immunol.*, 12:433-455で説明されるように、それらがどれであるかに、それぞれ定常部に融合して、非電子対を共有して相互作用しています。

そのようなファージライブラリーは親和性クロマトグラフィーによって希望の抗原に対して撮影されます。希望の抗原に付くことができるFv断片を急送するクローニングが、抗原に縛られて、ライブラリーの拘束力がないクローニングとこのようにして切り離されます。. 拘束力があるクローニングを次に、抗原から溶出して、追加サイクルの抗原結合/溶離法でさらに豊かにすることができます。

完全な長さの抗体クローニングの造りをあとに続いた興味があるファージクローニングからFv系列を使用することであとに続いた関心と適当な定常領域(Fc)順序のファージクローニングのために選択する適当な抗原スクリーニング手順を設計することによって、Kabat et al., *Sequences ofタンパク質 of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda Md.* (1991), vols. 1-3で説明されるように、どんな抗体も得ることができます。

【 0 2 0 3 】

VHのレパートリーとVLの遺伝子をポリメラーゼ連鎖反応(PCR)で別々にクローニングを作つて、ファージライブラリーで手当たりしだいに再結合させることができます。次に、ファージライブラリーは抗原結合クローニングを搜すことができます。 aWinter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12:

30 433-455 (1994)で説明されたように 433-455 (1994). 免疫させられたソースからのレパートリーはイムノゲンへの組み立てることの要件のない高いアフィニティー抗体の雑種細胞を提供します。. あるいはまた、Griffiths et al., *EMBO J.* 12によって説明されるように、少しも免疫なしでさまざまな非自己と自己抗原にも人間の抗体の単独の源を提供するためにナイーブなレパートリーのクローニングを作ることができます。 725-734 (1993). また、最終的に、幹細胞から非再配列されたV遺伝子断片のクローニングを作つて、HoogenboomとWinter(*J. Mol.*)によって説明されるように、非常に可変なCDR3領域をコード化して、生体外に配列換えを実行するのにランダム・シーケンスを含むPCR入門書を使用することによって、総合的にナイーブなライブラリを作ることができます。 *Biol.* 227:381-388 (1992) 381-388 (1992).

VHとVLレパートリーは別々にクローニングを作られて、phagemidとファージベクトルへのもう片方への1つです。 次に、2つのライブラリがphagemidを含んでいるバクテリアのファージ感染によって合併されるので、各セルは異なった組み合わせを含みます、そして、現在の細胞数(約1012のクローニング)だけによってライブラリサイズは制限されます。 両方のベクトルが生体内の再結合信号を含んでいるので、VHとVLの遺伝子は、ただ一つの複製単位と再結合して、ファージビリオンに共同パッケージされます。. ライブラリは良い親近感(約10-8MのKd-1)の多くのさまざまの抗体を提供できます。

線状ファージは、コートタンパク質への溶融で抗体フラグメントを表示するのに使用され

10

20

30

40

50

ます、例えば、小さい方のコートタンパク質pIII。シングルのチェーンFv(VHとVLドメインはフレキシブルなポリペプチド逆電流器によって同じポリペプチド鎖につなげられる)が断片化するとき、抗体フラグメントを表示できます、例えば、Marks et al., J. Mol. Biol., 222によって説明されるようです: 581-597(1991)またFabフラグメントとして、チェーンがどれでpIIIともう片方に溶断されるかはバクテリアの宿主セルペリプロラズムに分泌されます。そこにファージ表面でいくつかの野生型コートタンパク質を置き換えることによってHoogenboom et al., Nuclに表示するようになるFab-コート立体構造のアセンブリします。Acids Res., 19:で説明されるように。4133-4137(1991).

【0204】

10

b. アドレス可能なライブラリー

ターゲットプロテインのための特異性、そして/または希望の特異性を含む反DLL4抗体、またはその断片は活動がアドレス可能な結合の抗体ライブラリーを含みます。U.S. Provisional Application Nos. 61/198,764と61/211,204、ここに参照で組み込まれた。

ライブラリを表示するために比較されたアドレス可能な結合のライブラリの利点は、各座がアイデンティティがアドレスによって知られている異なったライブラリメンバーの代理をするということです。そのようなライブラリーでは、ライブラリの各個が個別に発生します、そして、その結果、それぞれのメンバーの系列が知られています。. どんな希望の形式でもライブラリのメンバーの表示を達成できます。(それは、結合のために検査するだけではなく、機能のためにもメンバーを検査することを許可します)。系列、選別結果があるコインシデンスで包含して、すぐに“ヒット”を特定できます。配列は、特定された“ヒット”的系列が先駆的に知られているので、特定された抗体の構造的な情報を得るのに必要ではありません。.

20

【0205】

30

アドレス可能な結合の抗体ライブラリーは可変重鎖と可変軽いチェーンが再結合している人間のgermlineセグメントで構成されている抗体を含みます。図書館の抗体組み合わせ多様性は可変重鎖を構成している個人Vと、DとJセグメントと可変軽いチェーンを構成している個々のV(V(V))とJ(J(J))セグメントの再結合から存在しています。. 追加組み合わせ多様性が異なった可変重鎖と可変軽いチェーンの組み合わせに由来しています。

それぞれのVHチェーン、そして/または、VLチェーンをコード化する核酸分子は、標準のDNA合成手法を使用して、アドレス可能な形式で個別に合成されます。(各場所における、それぞれのVHチェーン、そして/または、VLチェーンの核酸配列のアイデンティティはそれが知られています)。次に、ライブラリのそれぞれのメンバーのアイデンティティがその場所かアドレスに基づいて知られているようにVHチェーンとVLチェーンはアドレス可能な形式で対にされます。結合か活動のためにターゲットプロテインに対してアドレス可能な結合の抗体ライブラリーをスクリーンできます、DLL4などのように抗体かその部分を特定するために、それは、ターゲットプロテインに付く、そして/または、ターゲットプロテインの活動を調節します。これらのライブラリーが整列させられるという事実によって、収集における、それぞれの個人会員のアイデンティティはスクリーンのときに知られています、をその結果、“ヒット”と関連する非“ヒット”抗体の軽快な比較を許します。

40

【0206】

50

ライブラリー館米国Provisional Appl No.61/198,764と61/211,204ここに参照で組み込まれた結合のアドレス可能な抗体ライブラリーを生成するメソッドははあらゆる抗体のアイデンティティが抗体メンバーの結合の世代による選別時点で知られている結合の抗体ライブラリーを生成するメソッドを提供します。結合のアドレス可能な図書館では、ライブラリの可変重い(VH)と可変な軽い(VL)チェーンのメンバーがDNA統合で組換え型または総合的に発生します、知られているgermline抗体系列かその変更された系列から。ライブラリーの抗体組み合わせ多様性は可変重鎖を構成している個人V

と、DとJセグメントと可変軽いチェーンを構成している個々のV(V(V))とJ(J(J))セグメントの再結合から存在しています。追加組み合わせ多様性が異なった可変重鎖と可変軽いチェーンの組み合わせに由来しています。

【0207】

ライブラリーの抗体のそれぞれのVLチェーンはV(J(人間のgermlineセグメント、その縮重コドン、またはVとJを包括する核酸分子の人間のgermlineセグメントかその縮重コドンによってコード化されます。(セグメントは縮重コドンによって組み立てにリンクされます)。germlineセグメントが接合されるので、VLセグメントはJLセグメントの5フィートです。

ライブラリーの抗体のそれぞれのVHチェーンはVHとDHとセグメントが組み立てにリンクされるJH germlineセグメントを包括する核酸分子によってコード化されます。germlineセグメントが接合されるので、VHセグメントはDHセグメントの5フィートです。(それは、JHセグメントの5フィートです)。

【0208】

再結合が作用しているので、各遺伝子断片は組み立てなって、結果になるのが核酸分子を再結合させたようなものが機能的なVHかVLポリペプチドをコード化するということです。

例えば、再結合しているセグメントが接合されるので、再結合している完全な長さの核酸が組み立てに終えて5フィートの開始コドン(ATG)をもってあります、その結果、完全な長さのポリペプチドの表現を許容します。それぞれのセグメントのリーディング・フレームを保存している間、組み立てになるコンパイルされたV(D)J系列を発生させるようにV(D)Jの組み合わせをすることができます。合流点変更の選択は、接合されるV(D)Jの組み合わせの機能と、それぞれの遺伝子断片の適切なリーディング・フレームです。いくつかでは、例、VHチェーン、そして/または、VLチェーンをコード化する核酸分子は、結果として起こるコード化されたポリペプチドが組み立てと機能的になるように、終止コドン、そして/または、制限酵素サイトを取り除くようにさらに変更されていてです。.

【0209】

可変重鎖か可変軽いチェーンをコード化する核酸は、以下の通り発生します。そして、第一歩では、個々のgermlineセグメント(重いチェーンかV(J)、または軽いチェーンのためのV(J)のためのVH、DH、およびJH)が再結合のために選択されます(ここに例えばTables3-5を見てください) germlineセグメントは、人間のgermlineセグメントか、そのdgenerate系列であるかもしれませんかあるいはまたgermlineセグメントを変更できます。例えば、どんなオーブン・リーディング・フレームでも可変重鎖のDH区分を翻訳できますか、あるいはまた、DHセグメントはDH germlineセグメントの逆の補数であるかもしれません。一旦選択されると、再結合している完全な長さの核酸が組み立てになって5フィートの開始コドン(ATG)をもってあるようにgermlineセグメントが接合されます、その結果、完全な長さのポリペプチドの表現を許容します。それぞれのセグメントのリーディング・フレームを保存している間、組み立てになるコンパイルされたV(D)J系列を発生させるようにV(D)Jの組み合わせをすることができます。合流点が変更できます。

Vセグメントはいつもフレーム1を読んでいます。正しいアミノ酸はコード化されるようにJセグメントのリーディング・フレームが選択されます。

Dセグメントがどんなリーディング・フレームにもあることができますが、通常、リーディング・フレームが選ばれているので、得られたアミノ酸は支配的に恐水病です。必要に応じて、合流点のときに各セグメントが希望のリーディング・フレームにあるように、遺伝子断片の間で核酸変更をします。例えば、V-D合流点のときに、Dの5'末端から1つ以上のヌクレオチドを削除できますか、Vの3'末端から1つ以上のヌクレオチドを削除できますか、またはVとDの間に1つ以上のヌクレオチドを挿入できます(例えばVの3'末端にヌクレオチドを加えることができます)。合流点がいったん形成されると、系列は、ヌクレオチドの代替でどんな終止コドンも取り除くように、変更されます。そうすると終止コドンTAAをコードンTATに取り替える、終止コドンTAGをコードンTATに取り替える、そし

10

20

30

40

50

て、終止コドンTGAをコードンTCAに取り替えます。

最終的に、例えば、潜在的に効率的な翻訳に有害なドナー、アクセプタサイト、または他のヌクレオチド系列を継いで求められない制限サイトを取り除くようにさらに核酸を変更できます。核酸配列の変更は交換、代替、入、ヌクレオチドの削除、またはそれのどんな組み合わせも含んでいます。

それぞれのVHチェーン、そして/または、VLチェーンをコード化する核酸分子は、標準のDNA合成手法を使用して、アドレス可能な形式で個別に合成されます。(各場所における、それぞれのVHチェーン、そして/または、VLチェーンの核酸配列のアイデンティティはそれが知られています)。

【0210】

10

次に、ライブラリのそれぞれのメンバーのアイデンティティがその場所かアドレスに基づいて知られているようにVHチェーンとVLチェーンはアドレス可能な形式で対にされます。

例えば、ライブラリの結果として起こるメンバーは再結合している可変部の遺伝子と一緒にコード化する核酸分子の共同表現で生産されます、VHとVLチェーンか、その部分を最少量で含んでいて、表現されると、結合の抗体メンバーが発生するように。方法のいくつかの例では、単一の核酸分子としてVHとVLチェーンをコード化する核酸分子は急送できます。(重くて軽いチェーンをコード化する遺伝子は、それでリンクによって接合されます)。方法の別の例では、別々にVHとVLチェーンをコード化する核酸分子は表現と一緒に提供できます。したがって、再結合している核酸分子からの表現によって、ライブラリのそれ程異なったメンバーがgermlineをコード化したは抗体を表します、それで多様性がどうしてV(D)Jセグメントの組み合わせ多様性と重いと軽いの組み合わせの多様性で達成されるかは鎖を作ります。

20

抗体のライブラリは、VHチェーンをコード化する核酸分子とVLチェーンをコード化する核酸の共同表現のときに多くの異なったメンバーを含む結合のライブラリを発生させるように発生できます。結合のアドレス可能なgermline抗体ライブラリーの中の抗体は可変重鎖(VH)と可変軽いチェーン(VL)のすべてか一部を含みます、結果として起こる抗体が抗原結合部位を形成できる限り。結合のアドレス可能なgermline抗体は通常、Fabです。どんな目標抗原に対して“ヒット”抗体を特定するために結合のアドレス可能な抗体ライブラリーをスクリーンできます、例えば、DLL4に対して。

【0211】

30

3. 最適化と親和性成熟

工学か親和性成熟方法で上の方法か他の方法のいずれでも発生するか、または特定されるいずれなどの反DLL4抗体を芸術における技能が1つに知られているか、最適化するか、または改良できます。例えば、DLL4への結合親和力を最適化するか、または改良できます。そのような方法は、例えば、テンプレートとして誤り傾向があるPCRを使用することによって無作為に生体外に変異を導入することによって以前に特定された抗体を使用することで抗体ライブラリーを発生して、スクリーンするのを含んでいます(周他、Nucleic Acids Research(1991)19(21): 6052、およびUS2004/0110294); より高い親近感クローニング(WO96/07754)のための1CDRsを手当たりしだいに変異させる、例えば、興味があるCDRにかかるランダム・シーケンスを載せるプリマと共に選択された個々のFvクローニングでPCRを使用して、および選別; オリゴヌクレオチドは変異誘発を指示しました(Rosok et al., The Journal of Immunology, (1998) 160:2353-2359); コードンカセット変異(Keller-Ebo et al., Nucleic Acids Research, (1994) 22(9):1593-1599); ツーステップPCRとオーバラップPCRを含むプリマPCRを退化します、米国 (U.S. Patent Nos. 5,545,142, 6,248,516, と7,189,841; Higuchi et al., Nucleic Acids Research (1988); 16(15):7351-7367; とDubreuil et al., 生物化学学会(2005)

40

280(26):24880-24887)。そして、非免」られたドナーから自然に起こっているVドメイン異形のレパートリーを得て、チェーンの数ラウンドにおける、より高い親近感のための選別がマーク他、バイオテクノロジー10で説明されるように、改造されているファージ提示

50

法で選択されたVHかVLドメインを再結合させます: 779-783 (1992).

【0212】

また、親和性成熟メソッドは、米国臨時アプリケーションNo[Attorney Docket No.38000 16-00004/p702]で説明されるように、親和性成熟の原理メソッドを含んでいます。ここに参照で組み込まれました。 例えば、合理的に抗体の結合親和力が活動を最適化するか、または改良するのに親かテンプレート抗体の構造親近感/活動関係(SAR)は使用できます;

一般に、親和性成熟の方法では、抗体でmutagenizeする残りは以下で説明されたスキヤン変異誘発か目標抗原のための活性低下を示す関連する抗体のそれぞれの可変重いか軽いチェーンとの抗体の可変重いか軽いチェーンのアミノ酸配列の比較で特定されます;

抗体と関連する抗体か抗体の間のこの構造親近感/活動関係分析は、活動親和性成熟方法に、重要な抗体ポリペプチドの目標領域が提供されたのを明らかにします。 ここに、さらに結合親和力を最適化する実行された繰り返しがあることができます。

【0213】

例えば、可変重いか軽いチェーンの等身大の系列の向こう側に、または、可変重いか軽いチェーンの領域(例えば、CDR)で変異誘発(例えば、アラニンスキヤン変異誘発)をスキヤンすることによって、SARは作用できます。スキヤン変異誘発は目標抗原に付くことへのそれぞれの残り貢献を明らかにすることができます。活動(例えば、付く)に、不可欠の残り(すなわち、変異誘発が目標抗原と活動を減少させるそれら)は完全であるか部分的な飽和突然変異誘発にかけられません。結合には、不可欠でない残り(すなわち、変異誘発が目標抗原に結合を保存するか、または増加させるそれら)は完全であるか部分的な飽和突然変異誘発にかけられます; 变異体は目標抗原への結合親和力を増加させる変異を特定するために目標抗原に付くのがどうかテストされます。

【0214】

F.

抗DLL4抗体の特性と活性の評価

本明細書において提供される抗DLL4抗体は、当業者によく知られた測定法を用いて測定される結合及びその他の活性によって特徴付けられる。例えば、抗DLL4抗体が免疫特異的にDLL4と結合する能力を測定することができる。また、DLL4に対する親和性と特異性を測定することもできる。更に、本明細書において提供される抗DLL4抗体を使用したインビトロ(試験管内)及びインビボ(生体内)動物モデルがこれらの効果、一般的には、DLL4活性を阻害する拮抗効果の測定に用いられる。

【0215】

1. 結合

本明細書において提供される抗DLL4抗体は、DLL4(例えば、細胞表面に発現したDLL4、又は分離、合成的に生産された、もしくは遺伝子組換えによって発現したタンパク質又はペプチド(例えば、エピトープ))と特異的に結合する能力、及び当業者によく知られた方法で測定される特異性を評価され得る。例示的な測定は本明細中以下において記載する。結合アッセイは、溶液、懸濁液、又は固体支持体において実施することができる。陰性対照には、背景結合の計測などの測定が含まれる。結合親和性は、スキヤッチャード解析(Munson他、Anal. Biochem., 107:220 (1980))、表面プラズモン共鳴法、等温熱量測定、又は当業者によく知られた方法でも測定することができる。

【0216】

a.

結合アッセイ

一般的に結合は、典型的に標的に付着させるか、又は必要によって抗体に直接付着させた検出可能な成分又は標識(例えば、酵素、放射性核種、蛍光プローブ、電気化学ルミネンス標識、又は染料)を使用することで検出することができる。あるいは、それ自身が標識となるか又は検出可能な第三の試薬を用いて結合を検出することもできる。例えば、標

10

20

30

40

50

的タンパク質と結合した抗体の検出は、サンドイッチ法における標識化された捕獲分子を利用することで可能となる。免疫グロブリン定常領域と特異的に結合する能力を持つその他のタンパク質、例えばAタンパク質又はGタンパク質なども標識薬剤として利用することができる。これらのタンパク質は、様々な種に由来する免疫グロブリン定常領域に対して強い非免疫原性反応性を示す(例えばKronval他.,

(1973) *J. Immunol.* 111:1401-1406; Akerstrom他., (1985)

J. Immunol. 135:2589-2542を参照のこと)。検出試薬は、ストレプトアビジンのような他の分子と特異的に結合する検出可能な成分、例えばビオチンで改変することができる。様々な検出可能成分が当業者によく知られている。

測定で使用される抗体の特異的結合を大幅に阻害しない限り、測定で用いられる標識や検出可能な群の選択は重要ではない。一般的に選択は、要求される感度、化合物との結合が容易か否か、要求される安定性、使用できる器材、そして廃棄規定によって決定される。当業者はこれらの標識に通じており、実施する測定に適した検出可能な標識を特定することができる。

検出可能な群は、検出可能な物理的又は化学的特性を備えていればどのような物資でもあり得る。そのような検出可能標識は、免疫測定の分野でよく発達しており、一般的に、ほとんどの有用な標識が測定において適用可能である。そのため、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、電子的、光学的又は化学的方法で検出可能なあらゆる組成物が標識として利用されている。有用な標識としては、電磁ビーズ(例えば、DYNABEADSTM)、蛍光染料(例えば、フルオレセインイソチオシアネート、Texas Red、ローダミン及び類似物)、放射性標識(例えば、³H, ¹²⁵I,

³⁵S, ¹⁴C, 又は ³²P)、酵素(例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ELISA法で通常使用されるその他の酵素)、化学発光標識(ルシフェリン及び2,3-ジヒドロフラジンジオン 例、例えばルミノール)、コロイド金又は染色ガラス、又はプラスチックビーズなどの比色標識(例えば、ポリスチレン、ポリプロピレン、ラテックス他)がある。使用可能な様々な標識やシグナル発生システムについては、米国特許第4,391,904を参照のこと。

【0217】

標識の検出方法は、当業者によく知られている。そのため、例えば放射性標識の場合、検出方法としてはシンチレーション検出器、又はオートラジオグラフィーにおいて見られるように写真用フィルムを使用する。蛍光標識の場合は、適当な波長の光りを当てて蛍光色素を励起させ、その結果発生した蛍光を検出する。蛍光発光は、電荷結合素子(CCDs)又は光電子増倍管などを使用することで視覚的に検出可能である。同様に、酵素に適した基質を用いて反応生成物を検出することにより、酵素標識を検出することができる。最後に、簡易比色標識は、標識と関連した色を観察することで簡単に検出することができる。

いくつかの測定フォーマットでは、標識化した成分の使用を必要としない。例えば、標的抗体の存在を検出するために凝集アッセイを利用することができる。この場合、抗原でコーティングされた粒子が、標的抗体を含む試料によって凝集させられる。このフォーマットでは、いかなる成分も標識化されることではなく、標的抗体の存在は簡単な視覚的検査で検出される。

あるいは、本明細書において提供される抗体は、全細胞パニングを利用して細胞と結合する能力をスクリーニングされ得る。スクリーニングは、生きた細胞又は未処理の弱く固定された標的細胞に対して実施される。全細胞パニングの方法については、既に記述されている(以下を参照のこと: Siegel他 (1997) *J. Immunol. Methods*

206:73-85 ここで参照することにより組み込まれている)。その他の適用可能なスクリーニング技術には、蛍光活性化セルソーティング(FACs)を含む。例8において、細胞表面に発現したDLL4への抗DLL4結合のための結合アッセイを例示している。

【0218】

ハイスループットのスクリーニングのために、測定を多重化することができる。これによ

10

20

30

40

50

って、数多くの異なった標的タンパク質に対する抗体の結合親和性を同時に測定する事が可能になる。ひとつの例として、異なった標的タンパク質は、異なった検出可能成分で個別に標識化することができる。例えば、異なった抗原を色分けされたビーズ (Schwenk 他. (2007) Mol. Cell. Prot.,

6:125-132) と結合させることができる。もうひとつ例としては、マルチスポットプレートを使用し、プレートの中で100種類までのタンパク質を吸着することで測定の多重化が可能となる(例えば、メソスケールディスカバリー (MSD, Gaithersburg, MD) のマルチアレイ又はマルチスポットプレートを使用)。これらの例においては、マルチスポットプレートの各々のウェルに異なった抗体を加えることで抗体のスクリーニングが可能となっている。この測定では、数多くの標的タンパク質に対して何千もの抗体を同時にスクリーニングすることができる。例3においては、マルチスポット電気化学ルミネセンス (ECL) 結合アッセイを利用して、DLL4と結合する抗体を特定する結合アッセイを例示をしている。

【0219】

例えば、DLL4発現細胞が、まず抗DLL4抗体を使って培養され、引き続き一次抗体を認識する二次抗体を使って二次培養が行われ、FITCのような検出可能標識と結合させられる。標識化の後、抗体結合を分析するため、細胞はフローサイトメーターを用いてカウントされる。もうひとつの例としては、DLL4抗原が固体支持体(例えば、炭素又はプラスチックの表面、組織培養皿又はチップ)に固定され、そして抗体と接触する。結合しない抗体又は標的タンパク質は洗い流され、次に結合複合体が検出される。結合アッセイは、非特異結合を減少させる条件下で、例えば、非イオン性界面活性剤(例えば0.1%トリトンX-100又はトウイーン20)及び/又は阻害タンパク質(例えば、ウシ血清アルブミン又はゼラチン)を含む高イオン強度緩衝液(例えば、0.3-0.4 M NaCl)を使用して実施することができる。

【0220】

免疫特異性結合と交差反応性を分析するため、その他の免疫測定も使用することが可能で、それらには以下にのような技術を用いた(ただしそれらに限定されない)競合及び非競合測定を含む: ウエスタンプロット法、放射性免疫測定、ELISA(酵素結合免疫吸着測定)、メソスケールディスカバリー法 (MSD, Gaithersburg, Maryland)、“サンドイッチ”免疫測定、免疫沈降法、ELISPOT、沈降反応、ゲル内沈降反応、免疫拡散法、凝集法、補体結合法、免疫放射定量測定、蛍光免疫法、Aタンパク質免疫測定、免疫組織化学法、免疫電子顕微鏡法。これらの測定は常用されており、当分野でよく知られている(例えば、Ausubel 他, 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, 1巻, John Wiley & Sons, Inc., ニューヨークを参照のこと。ここで参照することで全文が組み込まれている)。他の測定フォーマットとしてはリボゾーム免疫測定 (LIA) を含み、これは特定の分子(例えば、抗体)と結合し、被包性の試薬又はマーカーを放出するように設計されたリボゾームを使用している。放出された化学物質は、次に標準的な技術 (Monroe 他., (1986) *Amer. Clin. Prod. Rev.*

5:34-41を参照のこと)によって検出される。例示的な免疫測定を簡潔に記載するが、これらに限定されるものではない。

【0221】

免疫沈降法の手順は一般的に以下から成っている: 細胞個体群を、タンパク質ホスタファーゼ及び/又はプロテアーゼ阻害剤(例えばEDTA, PMSF, アプロチニン, バナジウム酸ナトリウム)が添加されたRIPA緩衝液(1% NP-40又はトリトンX-100, 1% デオキシコール酸ナトリウム, 0.1% SDS, 0.15 M NaCl, 0.01 M リン酸ナトリウムpH7.2, 1%、トラジロール)のような溶解緩衝液で溶解する。次に、目的となる抗体又はその抗原結合性フラグメントを細胞溶解物に加え、摂氏40度で一定期間(例えば1~4日間)培養する。Aタンパク質及び/又はGタンパク質セファロースビーズを細胞溶解物に加え、

10

20

30

40

50

摂氏40度で一時間又はそれ以上培養してから、溶解緩衝液の中のビーズを洗い流し、これらのビーズをSDS/試料緩衝液の中で再懸濁させる。目的の抗体が特定の抗原を免疫沈降させる能力は、例えばウェスタンプロット法によって評価できる。抗原に対する抗体結合を増強し、バックグラウンドを減少させるために調節されるパラメーターは、当業者が熟知している（例えば、セファロースビーズを用いた細胞溶解物の事前除去）。免疫沈降法の手順に関する更なる考察については、例えば、Ausubel 他., 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, 1巻, John Wiley & Sons, Inc., ニューヨーク 10.16.1.を参照のこと。

【0222】

10

ウェスタンプロット分析は、一般的に以下の手順を含んでいる：細胞抽出物、特にDLL4を発現した細胞の抽出物の調整、ポリアクリルアミドゲル（例えば 8%-20% SDS-PAGE、抗原の分子量による）における試料の電気泳動、又は 2-D ゲル電気泳動。試料をポリアクリルアミドゲルから、ニトロセルロース、PVDF 又はナイロンなどのメンブレンへ移動させる。メンブレンをブロッキング溶液（例えば 3% BSA 又は無脂肪乳を加えた PBS）に入れて遮断する。メンブレンを洗浄液（例えば PBS-トウイーン 20）で洗浄する。一次抗体（即ち目的の抗体）を用いてブロッキング溶液に希釈されたメンブレンをプローブする。洗浄液の中のメンブレンを洗浄する、メンブレンを酵素基質（例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼ又はアルカリホスファターゼ）又はブロッキング溶液で希釈された放射性分子（例：32P or 125I）に結合された二次抗体（これが一次抗体を認識する、例えば抗ヒト抗体）でプローブする。洗浄液の中のメンブレンを洗浄する、そして抗原の存在を検出する。当業者は、検出されるシグナルを増幅し、そしてバックグラウンドノイズを減少させるよう調整されるパラメーターを熟知している。ウェスタンプロット法の手順に関する更なる考察については、例えば Ausubel 他, 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, 1巻, John Wiley & Sons, Inc., ニューヨーク 10.8.1.を参照のこと。

20

【0223】

ELISAは、結合を評価するためにも使用される。ELISAは、一般的に以下の手順が含んでいる。抗原の調製（一般的に、遺伝子組換えタンパク質、合成タンパク質又はこれらのエピトープを含むようなペプチド）、96ウェル微量定量プレートを抗原でコーティングする、酵素基質（例えばホースラディッシュペルオキシダーゼ又はアルカリホスファターゼ）など検出可能な化合物と結合した目的抗体をウェルに添加し、一定期間培養してから抗原の存在を検出する。ELISAにおいて、目的抗体は検出可能な化合物と結合する必要がなく、その代わりに検出可能な化合物に結合した二次抗体（これが目的抗体を認識する）がウェルに添加される。更に、ウェルを抗原でコーティングする代わりに、抗体がウェルにコーティングされ得る。この場合、コーティングされたウェルに目的抗原が添加された後に、検出可能な化合物と結合した二次抗体が添加される。当業者は、検出されるシグナルを増幅させるよう調節するためのパラメーター及びELISAの各種変型法について熟知している。ELISAに関する更なる考察については、例えば Ausubel 他, 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, 1巻, John Wiley & Sons, Inc., ニューヨーク 11.2.1.を参照のこと。例 7 は、DLL 4 に対する抗 DLL 4 抗体の投与量依存性結合を評価する ELISA 結合測定を例示している。

30

【0224】

40

免疫組織化学法を用いることができる。免疫組織化学法には以下の手順が含まれる：組織試料（例えば DLL4 の発現した細胞から）の調製、タンパク質分子の天然構造を保持するために組織を固定する、試料を透過処理試薬（例えばトウイーン、ノニデット P40）に浸して組織に透過させる、ブロッキング溶液（例えば 3% BSA 又は無脂肪乳を加えた PBS）で試料を遮断する、洗浄緩衝液（例えば PBS-トウイーン 20）で試料を洗浄する、ブロッキング緩衝液で希釈された一次抗体（即ち目的抗体）で試料をプローブする、洗浄緩衝液で試料を洗浄する、蛍光染料（例えば フルオレセインイソチオシアネート、アレクサフル

50

オル、ローダミン)と結合し、ブロッキング緩衝液で希釈された二次抗体(これが、例えば抗ヒト抗体のような一次抗体を認識する)を用いて試料をプローブする、洗浄緩衝液で試料を洗浄する、そして蛍光顕微鏡検査法を用いて抗原の存在を検出する。当業者は、検出シグナルの増強及びバックグランドノイズの減少のために調節されるパラメーターを熟知している。

【0225】

以上のどの結合アッセイにおいても競合実験の実施が可能である。例えば、抗DLL4抗体の、NotchレセプターのDLL4に対する結合を遮断する能力を評価することができる。そのため、測定には、抗DLL4抗体の存在における、DLL4-Notch相互作用の阻害を評価するための結合アッセイも含まれている。このような測定は、アンタゴニスト抗体の特定にも使用される。これは例10と例11において例示されている。

10

【0226】

b.

結合親和性

抗体の抗原に対する結合親和性を測定することができる。当業者に知られているいかなる方法も抗体の結合親和性を測定するために使用することが可能である。例えば、抗体の結合特性は、標的タンパク質への結合が抗体の増加量で評価される飽和ELISAのような飽和結合測定を実施することで評価することができる。このような実験においては、結合が投与量依存性及び/又は飽和性であるかを評価することができる。加えて、結合親和性は50%結合シグナルから推定することができる。典型的に、見かけ上の結合親和性は、結合定数(K_a)又は解離定数(K_d)を単位として計測され、スキヤッチャード分析(Munsion他., Anal. Biochem., 107:220 (1980).)によって測定される。

20

【0227】

例えば、標的タンパク質に対する結合親和性は、濃度を増した非標識タンパク質が追加されている競合結合アッセイ、例えば放射性免疫測定(RIA)又はELISAなどによって評価することができる。結合親和性はまた、例えばBIAcore動態解析を使うなど、表面プラズモン共鳴を使用することでも分析することができる。これには、表面に固定化された標的タンパク質を含むチップに由来する抗体の結合及び解離分析を含んでいる。BIAcoreの評価ソフトは、データを相互作用モデルに適合させることによって、 K_a 及び K_d の数値を算出する。

30

すべての結合親和性測定は大雑把な近似値を提供するものであるが、抗体の結合親和性が用いられる測定と測定条件に左右されることは理解される。様々な条件下で様々な測定を実施することで、抗体の結合親和性を推定することができる。加えて、結合親和性は、標的試料が細胞に発現した標的抗原であるか、又は遺伝子組換えもしくは合成によって生産された抗原であるかによっても変動する。そのため、細胞表面に発現したDLL4のための抗DLL4抗体の結合親和性は、単離した又は精製されたDLL4タンパク質を用いて測定された結合親和性とは異なっている。更に、結合親和性は抗体の構造によっても異なってくる。例えば、一般的に、二価 $F(ab')_2$ フラグメントや完全長IgGのような二価抗体は、一価Fab抗体よりも優れた結合親和性を有している。そのため、Fabフラグメントが特定の標的に対して特異的結合親和性を持っている場合、二価の完全長IgGの結合親和性がより大きくなるよう期待されることが理解される。

40

【0228】

例6では、表面プラズモン共鳴を使用した結合親和性の測定を例示している。

2.

機能活性

本明細書において提供される抗DLL4抗体は、当業者によく知られているインビトロ(試験

50

管内)又はインビボ(生体内)測定をすることで、DLL4の機能活性を調節するためのスクリーニングをすることができる。機能活性の測定には、DLL4によるNotchシグナリングの活性をシグナル伝達及び/又は上述したような下流の機能活性を測定することによって評価するための測定を含んでいる。Notchの活性化は、例えばDLL4を発現した細胞の共インキュベーション及び/又はDLL4の固定化によって達成される。そして、測定は抗体メンバーの存在下で実施される。このような測定においては、例えば、DLL4に誘発された内皮細胞増殖(例えばHUVECs)に対する抗体の効果も測定することができる(例えばRidgway他(2006)

Nature, 444:1083を参照のこと)。いくつかの例においては、Notchを発現した細胞の細胞分化に対する効果を評価するために、抗体が使われている。これらの細胞は、例えばDLL4やJag1のようなNotchリガンドを発現した細胞と共培養することが可能である。分化を促進する抗体を特定するために(即ちNotch活性への干渉)、抗体を分析試料へ添加することができる。

【0229】

細胞に基づいた測定において、測定は一般的に目的となる標的(例えばDLL4のようなNotch又はNotchリガンド)を発現することが知られている細胞系統を使用して実施される。例えば、ATCCカタログ(atcc.org)で細胞系統を確認することができる。また、特定の細胞型が必要な場合、それらの取得方法、及び/又はすぐに入手できるソースについてが当業者に知られている。学術文献を分析することで、必要とする標的を発現する細胞をすぐに選択することができる。加えて、目的標的を発現する細胞系統は、目的とする標的を発現する発現ベクターとの過渡的もしくは安定的なトランスフェクションによって生産することができる。トランスフェクションと発現の方法は、当業者によく知られている(例えばKaufman R.J. (1990) Methods in

Enzymology 185:537-566を参照のこと)。加えて、いかなる一次細胞又は細胞系統も、その特定の標的(例えば細胞表面マーカー)の発現を評価され得る。細胞表面マーカーは、蛍光標識化された抗体とFACSを使用して測定することができる。適合する細胞系統としては、A549(肺), HeLa, Jurkat, BJAB, Colo205, H1299, MCF7, MDA-MB-231, PC3, HUMEC, HUVEC, and PrECがある。機能活性に対する抗DLL4抗体の調節効果を評価する例示的な測定が、例13と例14において記述されている。

【0230】

抗DLL4抗体を評価するその他の測定には、血管新生をモデルとした全ての測定が含まれる。例えば、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVECs)は、芽を発生させるために共培養されたヒト織維芽細胞(SF)の存在下におけるフィブリングルの中で成長することができる(例えば米国特許出願公開第20080175847を参照;又は

Nakatsu他. Microvasc. Res. 66:102-12 (2003)も参照のこと)。このような測定において、CytodexTM 3ビーズ(Amersham Pharmacia

Biotech)はHUVEC細胞でコーティングされている。HUVEC細胞でコーティングされたビーズは、12ウェル培養プレートのひとつのウェルにあるフィブリン凝塊に埋め込まれる。SF細胞(例えば8 x 10⁴)は凝塊の上部に固定される。抗DLL4抗体が加えられ得る。指定された時間(例えば7~9日)が経過した後に測定を終了し、免疫染色、及び/又は、例えば抗CD31抗体(クローンEM59

; eBioscience)を使ったイメージングを使用して芽の長さと数を測定する。

【0231】

本明細書において提供される抗DLL4抗体は、Fc領域に変異を含んでおり、抗体のエフェクター機能を評価することができる。例えば、生産された抗体のFc活性は、目的とする特性のみを保持できるように計測される。CDC及び/又はADCC活性の減少/欠乏を確認するために、インビトロ(試験管内)及び/又はインビボ(生体内)において細胞毒性試験を実施することができる。例えば、Fcレセプター(FcR)結合測定は、抗体がFcR結合を欠くように実施されるが(ゆえに、ADCC活性も欠く可能性が高い)、ただしFcRn結合

10

20

30

40

50

能力は保持している。ADCCを媒介する一次細胞、つまりNK細胞はFc RIIIだけを発現するが、その一方、単球はFc RI, Fc RII 及び Fc RIIIを発現する。造血細胞におけるFcRの発現は、Ravetch と

Kinetによる Annu. Rev. Immunol., 9:457-92 (1991)の464ページの図3において要約されている。

目的の分子のADCC活性を評価するためのインビトロ(試験管内)測定の例は、米国特許第5,500,362 又は 5,821,337において記述されている。これらの測定に有用なエフェクター細胞としては、末梢血単核球(PBMC)とナチュラルキラー(NK)がある。あるいは、又は追加的に、目的の分子のADCC活性は、Clynes 他(

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:652-656 (1998))で発表されているようなインビボ(生体内)動物モデルで評価することができる。C1q 結合測定もまた、抗体がC1qと結合せず、そしてCDC活性を欠くことを確認するために実施される。補体活性化を評価するためには、例えばGazzano-Santoro

他 (J. Immunol. Methods 202:163 (1996))で述べられているように、CDC測定を実施する。FcRn結合とインビボ(生体内)クリアランス/半減期の測定は、当業者に知られている方法を用いて実施することができる。

【0232】

3. 動物モデル

例えば、本明細書において提供される全ての抗DLL4抗体は、DLL 4 の異常活性又はそのレセプターNotchに関する インビボ(生体内)測定を実施することができる。この方法には対象への抗体投与が含まれ、一般的には、疾病や病状のための非ヒト動物モデルであり、モデル動物の疾病や病状に対する抗体の効果を測定する。インビボ(生体内)測定はコントロール(対照)を含み、そこでは適切なコントロール(対照)が、抗体の存在しない試料を含んでいる。

一般的に、動物を用いた測定には、血管新生や腫瘍増殖に対する抗体の効果を評価する測定が含まれている。例示的な測定が、米国特許出願公開第. 20090035308 and 2008 0175847に記述されている。ひとつの例として、インビボ(生体内)血管新生が、マトリゲルプラグ測定を用いて測定されている。例えば、マトリゲルプラグは、抗DLL4抗体及び/又はVEGFの存在下又は非存在下において、マウスの前腹皮下組織に注入することができる。指定時間の経過後(例えば6日)、マトリゲルプラグを回収してから重量を計測し、それからヘモグロビン測定と免疫組織化学的測定を行う。例えば、PECAM免疫染色を用いて浸潤細胞の血管のアイデンティティーを確立することができる。このような例において、VEGF試料には、補充された内皮細胞とプラグから形成された様々なステージの血管構造体が含まれている。血管新生は、抗DLL4抗体の存在下又は非存在下において評価することができる。

【0233】

もうひとつの例では、腫瘍異種移植片モデルが、抗DLL4抗体の腫瘍増殖に対する活性を評価するために用いられる。例えば、HT29(ヒト結腸癌細胞系統)やKS-SLK(ヒトカポジ肉腫細胞系統)のような腫瘍細胞を、マウスの皮下に移植することができる。局所効果の研究が必要な場合は、細胞を事前にマトリゲルと混合し、マウスの皮下に移植する。抗体は腫瘍の発生前、発生時、もしくは発生後に投与することができる。また抗体は、抗VEGF又はその他の複合治療と組み合わせて投与することができる。いくつかの例では、抗体が腫瘍の発生後、数日から数週間後に投与されている。その他の例では、局所効果の研究のために、細胞をマトリゲルを含んだ溶媒コントロール(対照)又は抗DLL4抗体と事前に混合する場合がある。腫瘍のサイズは、動物を犠牲にして腫瘍を分離することにより、数時間、数日間、そして数週間にかけてモニターされる。血管密度、腫瘍の分岐及び血流は、コントロール(対照)を注入したマウスの腫瘍と比較されて評価される。腫瘍異種異色片モデルもまたMDA-MB-435, HM7, Colo205 又は Calu6 細胞(例えば米国特許出願公開第. US 20080175847を参照)を用いることで導入が可能となっている。更に、前臨床腫瘍モデルも

10

20

30

40

50

使用することができ、以下のものを含んでいる（ただしこれらに限定されない）：MV-522, WEHI3, SK-OV-3X1, LL2, EL4, H11299, SKMES-1, MX-1, SW620, 及び LS174T 腫瘍異種異色片モデル（例えば米国特許出願公開第. US20080175847を参照）。

【0234】

更なる例としては、例えば網膜血管系のようなインビボ（生体内）血管系での皮内細胞増殖と動脈の発達を評価することができる。この例においては、抗DLL4抗体又はコントロール（対照）がマウスの皮下に注入される。眼は隨時採取され、4% パラホルムアルデヒドで固定される。網膜は切斷され、様々な抗体と共に培養される。例えば、増殖は抗DLL4抗体の存在下又は非存在下においてKi67（例えば、クローン Sp6; Lab Vision）で標識化することにより評価することができる。また、抗 平滑筋アクチン（ASMA; Sigma-Aldrich）染色（これは網膜動脈と関連している）も動脈の形態を評価するために用いることができる。一般的に、網膜皮下細胞の高増殖表現型は、DLL4の遮断によって観察される。更に、放射状に交代する動脈と静脈の破損を観察することもできる。

10

【0235】

G. 抗体の生産方法

本明細書において提供される抗体は宿主細胞において発現し、そこから生産される。これらの抗体は完全長又は、例えば抗体フラグメントのような完全長以下の抗体として発現する。核酸分子とここで述べる抗体は、当業者に知られているいかなる方法でも生産することができる。これらの手順は常用のもので、当業者によく知られている。これらには、遺伝子人工合成、PCR、核酸連結、クローニング、トランスフェクション、そして精製技術など分子生物学的な常用技術が含まれている。これらの生産方法については以下に記載する。

20

【0236】

例えば、核酸配列は遺伝子人工合成技術を用いて生産される。遺伝子人工合成技術又は常用の分子生物学的な技術が、ヌクレオチドの挿入、除去、添加、又は置換を実施するため用いることができる。例えば、付加的な核酸配列を、核酸配列に添加することができる。ひとつの例ではリンカー配列、つまり合成遺伝子をベクターにクローニングするための制限エンドヌクレアーゼ部位を含んでいる配列が添加され得る。例えば、タンパク質発現ベクター又はDNA配列をコードした抗体定常領域の増幅を目的としたベクターなどである。更に、機能DNA成分を特定する付加ヌクレオチド配列は、核酸配列分子をコードした組替え生殖細胞系統と機能的に連結することができる。そのような配列の例としては（ただしこれらに限定されない）、細胞内のタンパク質発現を促進するためのプロンプター配列や、タンパク質分泌を促進するためのリーダーペプチド配列がある。タンパク質の結合領域を特定する配列のような付加ヌクレオチド配列もまた、核酸配列と連結することができる。そのような領域としては（ただしこれらに制限されることはない）、遺伝子組換え抗体又はそのフラグメントの特定標的細胞への取り込みを促進するような、又は合成遺伝子の薬物動態を高めるような配列がある。

30

抗体ポリペプチドをコードした核酸は、典型的に、原核細胞又は真核細胞に形質転換する前に、ベクターにクローニングされる。目的とする用途に応じてベクターを選択することができる。核酸の挿入の後、ベクターは、例えば抗体遺伝子の複製及び/又は発現を増幅するなど、宿主細胞を形質転換させるために使われる。このような例では、高発現に適したベクターが用いられる。

40

一般的に、重鎖抗体をコードした核酸はベクターにクローニングされ、軽鎖抗体をコードした核酸はベクターにクローニングされる。これらの遺伝子は、二重発現のための単一ベクター又は分離ベクターにクローニングされる。必要であれば、これらのベクターは、その他の抗体を生産するために、追加定常領域又はヒンジ領域をコードした配列を更に含むことができる。

【0237】

50

ひとつの例では、重鎖抗体をコードしている核酸が一次発現ベクターに連結され、軽鎖抗体をコードしている核酸が二次発現ベクターに連結されている。発現ベクターは同一もしくは異なっている場合があるが、一般的にタンパク質の比較発現を許容するに充分な適合性を備えている。一次及び二次発現ベクターは、典型的に、1対1の比率で宿主細胞に同時形質移入される。例示的なベクターとしては（ただしこれらに限定されない）、pg1HC 及び pkLC (Tiller et al.

(2008) J Immunol. Methods, 329:112-24)などがある。その他の発現ベクターとしては、軽鎖発現ベクターpAG4622及び重鎖発現ベクターpAH4604 (Coloma 他 (1992) J Immunol. Methods,

152:89-104)がある。pAG4622ベクターは、ヒト

10

L鎖のC領域及びgpt選択性マーカーをコードしたゲノム配列を含んでいる。pAH4604ベクターは、D選択性マーカー及びヒトH鎖 1C領域をコードした配列を含んでいる。もうひとつの例では、重鎖及び軽鎖が、重鎖と軽鎖の両方の発現カセットを持つ単一ベクターにクローニングされている。その他の例示的な発現ベクターとしては、プラスミドA、C、DそしてEがあり、本明細書において別途記載されている。

【 0 2 3 8 】

発現は、当業者に知られている全ての細胞発現システムに存在し得る。例示的な発現用の細胞には（ただしこれらに限定されるものではない）、293FS 細胞、HEK293-6E 細胞

20

又は CHO 細胞などを服務。その他の発現ベクターと宿主細胞については以下で記載する。

【 0 2 3 9 】

従って、本明細書において提供される抗体は、完全長抗体又は、Fab、Fabヒンジフラグメント、scFvフラグメント、scFv直列型フラグメント、scFvヒンジフラグメント、scFvヒンジ(E)フラグメントなどの（ただしこれらに限定されない）完全長に満たない抗体として生産又は発現され得る。抗体フラグメントの生産のために、様々な技術が開発されている。伝統的に、これらのフラグメントは未処理の抗体（例えば Morimoto 他 (1992) Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 24:107-117; Brennance 他 (1985)

30

Science, 229:81を参照）のタンパク分解を通じて誘導される。またフラグメントは遺伝子を組替えた宿主細胞からも直接生産され得る。Fab, Fv 及び scFv抗体フラグメントはすべて、大腸菌などの宿主細胞において発現し、また宿主細胞から分泌され得る。そのため、これらのフラグメントの容易な大量生産が可能となっている。また、Fab'-SHフラグメントは化学的に結合してF(ab')2フラグメント (Carter et al. (1992) Bio/Technology, 10:163-167). を生成することができる。もうひとつのアプローチによれば、F(ab')2フラグメントは遺伝子組換えをした宿主細胞から直接分離することができる。他の例では、最適な抗体は単鎖Fvフラグメント(scFv)（例えば WO93/16185; 米国特許第 5,571,894 及び 米国特許第 5,587,458を参照）である。Fv及び sFvは、定常領域を持たない未処理の結合部位を持つ唯一の種である。そのため、これらは還元型非特異結合のインビオ（生体内）における使用に適している。sFvのアミノ末端又はカルボキシ末端においてエフェクタータンパク質融合を発生させるために、SFv融合タンパク質が生産され得る。この抗体フラグメントは直鎖抗体の場合もある（米国特許第 5,641,870を参照のこと）。このような直鎖抗体フラグメントは単一特異性又は二重特異性であり得る。その他の抗体フラグメント生産方法も当業者には知られている。

40

【 0 2 4 0 】

例えば、発現における、完全長抗体又はそのフラグメントを生成するジスルフィド結合による抗体の重鎖/軽鎖ペアなどがある。VH-CH1-hinge-CH2- CH3をコードしている完全長Ig配列は、二次発現ベクターにクローニングすることができ、またVL-CL領域をコードしている配列は二次発現ベクターにクローニングすることができる。VL-CL領域をコードしている二次発現ベクターとの共発現に際しては、完全長抗体が発現する。もうひとつの例では、Fab

50

を生成するため、VH-CH1をコードしている配列が一次発現ベクターにクローンされ、またVL-CL領域をコードしている配列は二次発現ベクターにクローンされる。軽鎖とFabモノマーを持つ重鎖ペアが生成される。この例では、例示的なベクターとしてプラスミドA,C,DそしてEがあり、本明細書で別途記載されている。様々なIgGサブタイプのCH1, ヒンジ, CH2 及び/又は CH3配列が、当業者に知られている（例えば米国特許出願公開第. 20080248028; 又は SEQ ID NO: 891を参照）。同様に、CL、ラムダ、カッパ配列が知られている（例えば米国特許出願公開第 20080248028; 又は SEQ ID NOS: 892-893を参照）。

【0241】

1. ベクター

10

本明細書において提供されるベクターは、遺伝子組換え抗体をコードした核酸又はその部分を含んでいる。抗体ポリペプチドをコードした核酸は、典型的に、原核細胞又は真核細胞へ形質転換する前に、中間ベクターにクローンされる。目的とする用途に応じてベクターが選択され得る。例えば、核酸の挿入の後、ベクターは、典型的に、複写及び/又はその発現用の組替え抗体遺伝子を増幅させるなど、宿主細胞を形質転換させるために使われる。このような例においては、高発現に適したベクターが使用される。その他のケースでは、細胞表面の発現ポリペプチドの表示に適したベクターが選択される。

【0242】

遺伝子組替え抗体とその部分の発現に関する数多くの発現ベクターが、当業者に知られている。発現ベクターの選択は、宿主の発現システムに影響される。このような選択は、当業者にとっては技術的に容易なことである。一般的に、発現ベクターとしては、転写プロモーター、光学エンハンサー、翻訳シグナル、転写及び翻訳終結シグナルがある。安定した形質転換のために使用される発現ベクターは、典型的に、形質転換した細胞の選択と維持を可能にする選択性マーカーを有している。いくつかの例において、複製起点が細胞におけるベクターの複製数を増やすために使われている。またベクターには一般的に、結合した核酸分子（例えばHisタグ, Flagタグ）と機能的に連結した付加的なヌクレオチド配列を含んでいる。このために、ベクターは通常、定常領域をコードした配列を含んでいる。そのため、遺伝子組換え抗体又はその部分もまたタンパク質融合として発現することができる。その例として、ポリペプチドに追加機能を付加するために融合を生成することができる。融合タンパク質の例としては（ただしこれらに限定されない）、シグナル配列の融合、his6タグ、myc タグ、精製タグのような、局在化用エピトープタグ、例えばGST融合、そしてタンパク質分泌及び/又は膜結合性を指向するための配列などがある。

20

30

40

【0243】

例えば、タンパク質の発現は、当分野で知られるあらゆるプロモーター/エンハンサーによってコントロールすることができる。適切な細菌性プロモーターが当分野でよく知られており、本明細中以下において記載する。哺乳類の細胞、酵母菌細胞、そして昆虫細胞に適したその他のプロモーターが当分野でよく知られており、いくつかを本明細中以下において例示する。異種核酸の発現を指向するために使用されるプロンプターは、その特定の用途によって選択される。使用されるプロモーターとしては以下のものがあるが、これらに限定されるものではない。初期プロモーターSV40を含む真核発現ベクター(Berkoist 及び Chambon, Nature 290:304-310 (1981)), ラウス肉腫ウィルスの長さ3'末端反復に含まれるプロンプター(Yamamoto 他. Cell 22:787-797 (1980)), ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター

(Wagner 他., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1441-1445

(1981))、メタロチオネイン遺伝子の制御配列 (Brinster他., Nature 296:39-42 (1982))

、 ラクタマーゼプロモーターなどの原核発現ベクター (Jay 他., (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA

78:5543)、 tac プロモーター (DeBoer 他., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:21-25 (1983))、 “遺伝子組換えバクテリアに由来する有用タンパク質”： Scientific American 242

50

:79-94 (1980)も参照のこと。ノパリン型合成酵素を含む植物発現ベクター (Herrara-Estrella 他., *Nature* 303:209-213

(1984))、又はカリフラワーモザイクウィルス 35S RNA プロモーター (Gardner 他., *Nucleic Acids Res.* 9:2871

(1981))、光合成酵素リプロースニリン酸脱炭素酵素のプロモーター (Herrera-Estrella 他., *Nature* 310:115-120 (1984))、酵母菌その他 Gal4 プロモーターなどの菌類に由来するプロモーター成分、アルコール脱水素酵素プロモーター、磷酸グリセロールプロモーター、アルカリホスファターゼプロモーター、及び以下のような、組織特異性を示し形質転換動物で使われてきた動物転写制御領域、膵臓の腺房細胞に活性があるエラスターーゼ I 遺伝子制御領域 (Swift 他.,

10

Cell 38:639-646 (1984); Ornitz 他., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50:399-409 (1986)、MacDonald,

Hepatology 7:425-515 (1987)); 膵臓ベータ細胞に活性があるインスリン遺伝子制御領域 (Hanahan

他., *Nature* 315:115-122 (1985))、リンパ球系細胞に活性がある免疫グロブリン遺伝子制御領域 (Grosschedl 他., *Cell* 38:647-658 (1984));

Adams 他., *Nature* 318:533-538 (1985); Alexander 他., *Mol. Cell Biol.* 7:1436-1444 (1987))、精巣細胞、乳房細胞、リンパ球系細胞、肥満細胞に活性があるマウス乳腺腫瘍ウィルス制御領域 (Leder 他., *Cell* 45:485-495 (1986))、肝臓に活性があるアルブミン遺伝子制御領域 (Pinckert 他., *Genes and Devel.* 1:268-276

20

(1987))、肝臓に活性がある フェトプロテイン遺伝子制御領域 (Krumlauf 他., *Mol. Cell. Biol.* 5:1639-1648 (1985)); Hammer et al., *Science*

235:53-58 (1987))、肝臓に活性がある アンチトリプシン遺伝子制御領域 (Kelsey 他., *Genes and Devel.* 1:161-171 (1987))、骨髄系細胞に活性があるベータグロブリン遺伝子制御領域 (Magram 他., *Nature* 315:338-340 (1985));

Kollias 他., *Cell* 46:89-94 (1986))、脳のオリゴデンドロサイト細胞に活性があるミエリン塩基性タンパク質遺伝子制御領域 (Readhead 他., *Cell* 48:703-712 (1987))、骨格筋に活性があるミオシン軽鎖-2 遺伝子制御領域 (Shani, *Nature* 314:283-286 (1985))、視床下部の性腺刺激ホルモン分泌細胞に活性がある性腺刺激ホルモン放出遺伝子制御領域 (Mason 他., *Science* 234:1372-1378 (1986))。

30

【0244】

プロモーターに加え、発現ベクターは、典型的に、宿主細胞における抗体又はその部分の発現のために必要な全ての追加成分を含む転写ユニット又は発現カセットを含んでいる。典型的な発現カセットは、核酸配列に機能的に連結したプロモーターを含んでおり、またこの核酸には生殖系細胞抗体鎖と転写の効率的なポリアデニル化に必要なシグナル、リボゾーム結合部位、及び翻訳終結がコードされている。カセットの追加成分にはエンハンサーが含まれる。更にカセットには、効率的な終止を実現するために、構造遺伝子の下流に位置する転写終止領域が含まれている。終止領域は、プロモーター配列と同じ遺伝子から得ることができ、また異なった遺伝子からも得ることができる。

40

【0245】

いくつかの発現システムは、チミジンキナーゼやジヒドロ葉酸還元酵素など、遺伝子増幅のためのマーカーを持っている。あるいは、遺伝子増幅マーカーを持たない高発現システムも適しており、それらの例としては、ポリヘドロンプロモーターの支配下にある生殖系細胞抗体鎖をコードした核酸配列を持った昆虫細胞バキュロウィルスベクター、又はその他の強力なバキュロウィルスプロモーターがある。

【0246】

このため、ベクターには、抗体の遺伝子組換え可変領域をコードした核酸配列と機能的に連結した抗体の定常領域をコードしたヌクレオチド配列が含まれている。ベクターは、CH1, CH2, ヒンジ, CH3 又は CH4

及び/又は CL のひとつもしくは全部の配列を含むことができる。一般的に、このような Fab

50

の発現のために、ベクターはCH1 (アミノ酸 1-103 of SEQ ID NO:891) 又は CL (カッパ 軽鎖の場合は SEQ ID NO:892を参照; ラムダ軽鎖の場合はSEQ ID NO:893を参照)のための配列を含んでいる。定常領域又はヒンジ領域の配列が、当業者に知られている(例えば、米国特許出願公開第 20080248028 及び SEQ ID NOS:891-893, 以下を含む: CH1 (アミノ酸 1-103 of SEQ ID NO:891), IgG1 ヒンジ領域 (アミノ酸 104-119 of SEQ ID NO:891), IgG1 CH2 (アミノ酸、120-223

of SEQ ID NO:891), IgG1 CH3 (アミノ酸 224-330 of SEQ ID NO:891), CL カッパ (SEQ ID NO:892) 及び CL ラムダ (SEQ ID NO:893)を参照のこと)。

重鎖定常領域遺伝子(例えばCH1)を含むような例示的なベクターとしては、プラスミド A及びDがあり、本明細書で記載されている。軽鎖定常領域遺伝子を含むような例示的なベクターとしては、プラスミドC及びEがあり、本明細書で記載されている。

10

【0247】

例示的な発現ベクターには、例えばpCMVのような哺乳類発現ベクターが含まれている。細菌ベクターには、pBR322,

pUC, pSKF, pET23DやMBP, GST, LacZなどの融合ベクターが含まれる。例示的な細菌ベクターとしては、例えばプラスミドA、プラスミドC、プラスミドD、プラスミドEなどがあり、本明細書で記載されている。また、例えば真核細菌に由来する調節エレメントを含むいかなる真核ベクターも、真核細胞発現ベクターとして使用することができる。これらには、例えばSV40 ベクター、パピローマウィルス、そしてエプスタインバーウィルス(EBウイルス)などが含まれる。その他の例示的な真核ベクターとしてはpMSG, pAV009/A+, pMT 010/A+, pMAMneo-5, バキュロウイルスpDSCEがあり、更に、CMVプロモーター、SV40初期プロモーター、SV40後期プロモーター、メタロチオネインプロモーター、マウス乳癌ウィルスプロモーター、ラウス肉腫ウィルスプロモーター、ポリヘドロンプロモーター、又は真核生物における発現に効果的なその他のプロモーターの支配下でタンパク質の発現を可能にする全てのベクターがある。大腸菌の形質転換のための例示的なプラスミドベクターとしては、例えば、本明細書で記載されているCoIE1複写ベクターがある。これらのベクターには以下の共通特性がある:(a) pBAD誘導性プロモーター、(b) AraC 遺伝子、これは

pBADプロモーターを制御する; (c) 効率的な翻訳のための合成リボゾーム結合部位(RBS); (d) CoIE1 複写起点、これが高発現を可能とする; (e) STII リーダー配列、これが発現タンパク質のペリプラズムへの移動を可能にする (f) f1 複写起点及び (g) 抗生物質耐性を与える遺伝子。このようなプラスミドには、プラスミド A (SEQ ID NO:84), プラスミド C (SEQ ID NO:86), プラスミド D (SEQ ID NO:85) そしてプラスミド E (SEQ ID NO:87) がある。プラスミドAとプラスミドDは、挿入された重鎖可変領域遺伝子と機能的に結合した重鎖定常領域(CH1)遺伝子を含んでいるため、重鎖抗体遺伝子の発現に活用されている。これらのベクターは、本明細書で記載されている遺伝子組換え抗体遺伝子のクローニングを可能とするNheI 及び NcoI制限部位を具えている。両方のベクターはともに、pUC 複製起点、CoIE1型複製起点、及び カナマイシン耐性を付与するアミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ遺伝子を含んでいる。プラスミドAは、タンパク質精製のための(His)6 タグ及びFlag タグを含んでいる。プラスミド D は、(His)6 タグ及びFlag タグ,

20

及びソルターゼを使って生成タンパク質の共有結合を可能にする追加 LPETG タグを含んでいる。プラスミドCとプラスミドEは、挿入された軽鎖可変領域遺伝子と機能的に結合した軽鎖定常領域(CL)遺伝子を含んでいるため、軽鎖抗体遺伝子の発現に活用されている。プラスミド Cは、カッパ軽鎖に特有で、そして本明細書で記載している遺伝子組換え抗体遺伝子のクローニングを可能とするBseWI 及び NcoI 制限部位を含んでいる。プラスミドEは、ラムダ軽鎖に特有で、本明細書で記載されている遺伝子組換え抗体遺伝子のクローニングを可能とするAcrII 及び NcoI制限部位を含んでいる。両方のベクターとともに、3.3複製起点、AcrII 及び

NcoI型複製起点、そしてクロラムフェニコール耐性を付与する遺伝子をを含んでいる。

40

50

上述のベクターは、軽鎖ベクターと重鎖ベクターが同時形質転換するような二重ベクターシステムにおいて活用されるよう設計されている。そのため、これらは二つの異なった、しかし互換性のあるColE1複製起点を含んでおり、そのうちのひとつは重鎖に、もうひとつは軽鎖のために利用される。これによって、ベクターが同時形質転換して発現する際に、両方の抗体鎖の高い発現が可能となる。

【0248】

当業者に知られている、ベクターにDNAフラグメントを挿入するいかなる方法も、抗体鎖をコードした核酸を含む発現ベクターの生産に利用することができる。これらの方針としては、インビトロ（試験管内）組換え遺伝子DNA合成技術、及び インビボ（生体内）組換え体（遺伝子組換え）がある。クローンベクターへの挿入は、例えば、相補付着末端を持つクローンベクターへDNAフラグメントを連結させることによって達成される。DNAフラグメントに使用される相補制限部位がクローンベクターに存在しない場合、DNA分子の末端を酵素的に改変することができる。あるいは、要求されるいかなる部位も、核酸配列（リンクマーク）をDAN末端に連結することで生産することができる；これらの連結されたリンクマークは、化学的に合成され、制限エンドヌクレアーゼ認識配列をコードした核酸を含んでいる。

10

【0249】

2. 細胞と発現システム

ベクターを含む細胞もまた提供される。一般的に、異種DNAを発現するように操作され、分泌経路を持ついかなる型の細胞も使用することができる。発現宿主としては、バクテリア細胞（例えば大腸菌）、酵母菌細胞、古細菌、植物細胞、昆虫細胞、ヒト細胞を含む動物細胞などの原核生物や真核生物がある。各々の発現宿主のタンパク質生産能力には差があり、また同様に、発現タンパク質における翻訳後修飾の型も異なっている。更に、発現宿主の選択は、しばしばベクター及び使用する転写/翻訳エレメントの選択に左右される。例えば、発現宿主の選択はしばしば（ただし常にとは限らないが）使用される前駆体配列によって決まる。例えば、多くの異種シグナル配列は同種の宿主細胞（即ち、昆虫細胞のシグナル配列は昆虫細胞において最適に発現する）においてのみ発現することができる。これとは対照的に、他のシグナル配列を、例えばヒト血清アルブミン（hHSA）シグナル配列のような異種宿主で使用することが可能である。ヒト血清アルブミンは、酵母菌、昆虫、哺乳類宿主、及び昆虫と哺乳類細胞で機能することが例示されている組織プラスミノーゲン活性化因子pre/pro配列においてよく機能することができる（Tan 他., (2002) *Protein Eng.* 15:337）。発現宿主の選択は、これら以外にも、規制、安全性、生産コスト、需要、精製方法などの要素に基づいて決定される。そのため、ベクターシステムは使用される宿主細胞と適合性を持っていなければならない。

20

真核細胞宿主における発現としては、出芽酵母サッカロマイセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）やピキアパストリス（*Pichia pastoris*）のような酵母菌、ショウジョウバエ（*Drosophila*）や鱗翅目（lepidopteran）細胞などの昆虫細胞、タバコ、コーン、米、藻類、アオウキクサなどの植物及び植物細胞における発現がある。発現用の真核細胞としては、チャイニーズハムスターの卵巣（CHO）細胞や仔ハムスター腎臓（BHK）細胞のような哺乳類細胞系統がある。更に、真核細胞発現宿主は、遺伝子組換え動物における生産、例えば血清、乳、卵の生産を含んでいる。

30

【0250】

数多くの遺伝子配列コピーが生産できるよう、例えば形質転換、トランスフェクション（形質移入）、感染、電気穿孔、超音波穿孔などをを利用して、遺伝子組換え分子が宿主細胞に導入される。一般的に、標準形質移入法が、大量の抗体鎖を発現する細菌、哺乳類、酵母菌及び昆虫細胞系統を生産するために利用され、これらは次に標準的な技術を用いて精製される（例えば Colley 他.

40

（1989） *J. Biol. Chem.*, 264:17619-17622; *Guide to Protein Purification*（タンパク質精製の手引き）, *Methods in Enzymology*, vol. 182 (Deutscher, ed.), 1990を参照）。真核及び原核細胞の形質転換は、標準的な技術によって実施される（例えばMorrison (1

50

977) J. Bact. 132:349-351; Clark-Curtiss 及び Curtiss (1983) Methods in Enzymology, 101, 347-362を参照)。例えば、外部のヌクレオチド配列を宿主細胞に導入するためには、よく知られた方法のいずれをも使うことが可能である。これらには、リン酸カルシウム法、ポリブレン、プロトプラスト融合法、電気穿孔、遺伝子銃、リボゾーム、微量注入法、

10 プラズマベクター、ウィルスベクター、クローンゲノムDNA、cDNA、合成DNAを使用する方法、又はその他の、外部遺伝物質を宿主細胞に導入するためのよく知られた方法がある。一般的に、宿主細胞には、少なくともVH鎖がコードされた一次ベクターと、少なくともVL鎖がコードされた二次ベクターが形質移入される。このように、ある種の遺伝子操作手順を用いるだけで、生殖細胞系統及びその変形タイプ、抗体ポリペプチドを発現することができる宿主細胞に、少なくとも両方の遺伝子を有効に導入することができる。

【0251】

20 分離した遺伝子組換え可変領域遺伝子、cDNA又は合成DNA配列を組み込んだ遺伝子組換えDNA分子を持つ宿主細胞の形質転換が、遺伝子の複数コピーを可能にしている。このように、形質転換細胞を培養し、遺伝子組換えDNAを形質転換細胞から分離し、また必要であれば、分離した遺伝子組換えDNAから挿入した遺伝子を回収することで、大量の遺伝子を獲得することができる。一般的に、発現ベクターが細胞に導入された後、形質移入された細胞は、生殖細胞系列の鎖の発現に適した条件下で培養されるが、これらは以下に述べるような標準的な精製方法によって培地から回収される。

20 抗体とその部分は、インビトロ(試験管内)及びインビボ(生体内)の方法を含む、当分野で知られているハイスループット方式によって生産することができる。これらには例えば、遺伝子組換え抗体又はその部分をコードした核酸分子の宿主細胞もしくは宿主動物への導入、そしてインビトロ(試験管内)で遺伝子組換え抗体をコードした核酸分子の発現がある。原核生物、特に大腸菌(E. coli)は、遺伝子組換え抗体及びその部分の大量生産システムを提供し、特にハイスループット発現とタンパク質精製の適用に際して必要とされる。大腸菌(E. coli)の形質転換は簡易かつ高速の技術であり、当業者にはよく知られている。ハイスループット発現用の大腸菌(E. coli)宿主系統としては、BL21 (EMD Biosciences) とLMG194 (ATCC)があるが、これらに限定されるものではない。例示的な大腸菌(E.

30 coli)宿主系統としてはBL21がある。ハイスループット発現用のベクターとしては、pBR322 及び pUC ベクターがあるが、これらに限定されるものではない。これらベクターの例示的なものとしては、本明細書で記載されているように、プラスミドA、プラスミドC、プラスミドD、プラスミドEがある。発現と精製の自動化によってハイスループットの発現が可能となっている。例えば、PiccoloTM

システム、組織培養と自動化された収穫、溶解、精製ユニットを組み合わせたシステム、又はその他のロボットシステムなどが用いられる。

【0252】

a.

原核細胞発現

原核生物、特に大腸菌(E. coli)は、遺伝子組換え抗体及びその部分の大量生産システムを提供する。大腸菌(E.

coli)の形質転換は簡易かつ高速の技術であり、当業者にはよく知られている。大腸菌(E. coli)用発現ベクターは、高レベルのタンパク質発現の誘導と、宿主細胞に毒性を示すタンパク質の発現に有利な誘導性プロモーターが含まれている。誘導性プロモーターの例としては、ラクトース(lac)プロモーター、トリプトファン(trp)プロモーター、雑種tac プロモーター、T7 及び SP6

RNA プロモーター、温度調節 PL プロモータなどがある。

遺伝子組換え抗体又はその部分は、大腸菌(E. coli)細胞質の環境下において発現する

10

20

30

40

40

50

ことができる。細胞質は還元的な環境であり、いくつかの分子では、不溶性の封入体を生成してしまう。ジチオスレイトール、-メルカプトエタノール、変性剤(例えばグアニジン-HCl及び尿素)などの還元剤が、タンパク質の再可溶化のために使用される。例示的な代替方式としては、バクテリア細胞膜周辺腔における遺伝子組換え抗体又はその抗体フラグメントの発現がある。このバクテリア細胞膜周辺腔では、可溶性タンパク質の生産を誘導するような酸化環境、シャペロニン様分子、ジスルフィド異性化酵素が提供されている。典型的に、リーダー配列はタンパク質に融合されて発現し、タンパク質をペリプラズムへと導く。リーダーは、その後ペリプラズムにあるシグナルペプチダーゼによって取り除かれる。発現タンパク質をペリプラズムへ移動させるためには、主として三つの経路がある。即ち、Sec 経路、SRP経路、そしてTAT経路である。ペリプラズム標的リーダー配列の例としては、ペクチン酸リーザ遺伝子に由来するpeIB リーダー、StIIリーダー配列、そしてDsbAリーダー配列がある。例示的なのは、DsbAリーダー配列である。いくつかのケースでは、ペリプラズム発現が、発現タンパク質を培地へ漏出させてしまうことがある。タンパク質の分泌は、培養上清からの迅速で簡易な精製を可能にする。分泌されないタンパク質は浸透圧溶解によってペリプラズムから得ることができる。細胞質発現と同様に、いくつかのケースでタンパク質が不溶性になり、変性剤と還元剤が、可溶化とリフォールディングを促進するために使用される。誘導と培養の温度もまた発現レベルと可溶性に影響を与える。典型的に、温度は摂氏25度から37度に設定される。変異体も発現タンパク質の可溶性を高めるために使用される。通常、細菌は非グリコシル化タンパク質を生産する。そのため、タンパク質が機能性のための非グリコシル化を必要とする場合、グリコシル化は宿主細胞からの精製の後に

インビトロ(試験管内)で加えることができる。

【0253】

b.

酵母菌

出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*)、ヤロウイア・リポリチカ (*Yarrowia lipolytica*)、クルイベロミセス・ラクチス (*Kluyveromyces lactis*)、及びピキア・パストリス (*Pichia pastoris*)などの酵母菌は、遺伝子組換え抗体又はその部分にとって有用な発現宿主である。酵母菌は、エピゾーム複写ベクター、又は相同遺伝子組み換えによる安定した染色体組み込みによって形質転換させられる。典型的に、誘導性プロンプターが遺伝子発現の制御のために使用される。そのようなプロンプターの例としては、AOX1, GAL1, GAL7, GAL5 及びCUP1のようなメタロチオネイン・プロンプターがある。発現ベクターは、LEU2, TRP1, HIS3、及び形質転換DANの選択と維持のために必要なURA3のような選択性マーカーを含むことがしばしばある。酵母菌で発現したタンパク質は、しばしば可能性である。Bip やタンパク質ジスルフィド異性化酵素のようなシャペロニンとの共発現は、発現レベルと可溶性を改善することができる。

追加的に、酵母において発現されるタンパク質は、サッカロミセス セレビジエ (*Saccharomyces cerevisiae*) に由来する酵母接合型 因子分泌シグナルのような分泌シグナルペプチド融合物、及び、Aga2p接合接着レセプターもしくはArxulaアデニニボラングルコアミラーゼのような酵母細胞表面タンパク質との融合物を用いて分泌を指向され得る。Kex-2プロテアーゼのようなプロテアーゼ切断部位が、これらが分泌経路を出るときに、発現されるポリペプチドから融合配列を除去するように加工され得る。酵母はまた、Asn-X-Ser/Thrモチーフにおいてグリコシル化し得る。

【0254】

c. 昆虫細胞

昆虫細胞は、特に、バキュロウイルスの発現を用いて、ECDポリペプチド融合物を含むECDポリペプチドのようなポリペプチドを発現させるために有用である。昆虫細胞は、高レベルのタンパク質を発現し、そして、より高次の真核生物によって使用されるほとん

10

20

30

40

50

どの翻訳後修飾を行い得る。バキュロウイルスは限定的な宿主範囲を持ち、安全性を改善しそして、真核生物発現に関する調節性の問題を減少させる。代表的な発現ベクターは、バキュロウイルスのポリヘドリン (polyhedrin) プロモーター や p10 プロモーター のような高レベルの発現のためのプロモーターを使用する。一般に使用されるバキュロウイルス系としては、バキュロウイルス (例えば、キンウワバ科 (Autographa californica) 核多角体病ウイルス (AcNPV) 及びカイコ (Bombyx mori) 核多角体ウイルス (BmNPV)) ならびに、昆虫細胞系 (例えば、スロドブテラ・フルギペルダ (Spodoptera frugiperda)) に由来する Sf9 とイラクサギンウワバ (Trichoplusia ni) に由来する TN) が挙げられる。高レベルの発現のために、発現されるべき分子のヌクレオチド配列は、ウィルスのポリヘドリン開始コドンの直ぐ下流に融合される。ヒト抗体を発現することができるバキュロウイルス組合体を生成するためには、pAcUW51 (PharMin gen) のような二重発現導入ベクターが使用される。哺乳動物の分泌シグナルは、昆虫細胞において正確にプロセシングを受け、発現されたタンパク質を培地へと分泌するために使用され得る。

10

【0255】

昆虫細胞における代替的な発現システムは、安定に形質転換された細胞の使用である。例えば、スロドブテラ・フルギペルダ (Spodoptera frugiperda) に由来する Sf9 とイラクサギンウワバ (Trichoplusia ni) に由来する TN のような細胞系が、発現のために使用され得る。バキュロウイルスの最初期遺伝子プロモーター IE1 が、発現の一定したレベルを誘導するために使用される。典型的な発現ベクターには、pIE1-3 及び pI31-4 導入ベクター (Novagen) がある。

20

発現ベクターは、典型的に、ネオマイシンやハイグロマイシンなどの選択性マーカーの使用によって維持される。

20

【0256】

d. 哺乳動物細胞

哺乳類発現は、システムが抗体又はその部分を発現するために使用され得る。発現構築物は、アデノウイルスベクターを用いるなどによるウイルス感染によって、又は、リボゾーム、リン酸カルシウム、DEAE-ストランのような直接的なDNAの移入によって、さらにはエレクトロポレーション (電気穿孔) 及びマイクロインジェクション (微量注入) のような物理的な手段などによって哺乳動物細胞へと移入され得る。哺乳動物細胞のための発現ベクターは、典型的に、mRNAのキャップ部位、TATAボックス、翻訳開始配列 (Kozak コンセンサス配列) 及びポリアデニル化エレメントを含む。このようなベクターは、しばしば、高レベルの発現のための転写プロモーター/エンハンサー、例えば、SV40 プロモーター/エンハンサー、ヒトサイトメガロウイルス (CMV) プロモーター及びラウス肉腫ウイルス (RSV) の長い末端反復を含んでいる。これらのプロモーター/エンハンサーは、多くの細胞型において活性である。組織及び細胞型のプロモーター及びエンハンサーの領域もまた、発現のために使用され得る。例示的なプロモーター/エンハンサー領域としては、エラスターーゼ I、インシュリン、免疫グロブリン、マウス乳腺癌ウイルス、アルブミン、フェトプロテイン、1アンチトリプシン、グロビン、ミエリン塩基性タンパク質、ミオシン軽鎖 2 及びゴナドトロピン放出ホルモン遺伝子制御配列のような遺伝子に由来するものが挙げられるがこれらに限定されない。発現構築物を持つ細胞の選択及び維持のために、選択可能なマーカーが使用され得る。選択可能なマーカー遺伝子の例としては、ハイグロマイシン B ホスホトランスフェラーゼ、アデノシンデアミナーゼ、キサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ、アミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ、ジヒドロ葉酸レダクターゼ、及びチミジンキナーゼが挙げられるがこれらに限定されない。抗体は、典型的に、NEOR/G418システム、ジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR) システム、又はグルタミンシンテターゼ (GS) システムを使用して生産される。GSシステムは、pEE12/pEE6 のような共同発現ベクターを使用し、重鎖と軽鎖の両方を発現させることができる。TC

30

40

50

R- 及び Fc R I- のような細胞表面シグナル伝達分子との融合物は、細胞表面上での活性な状態のタンパク質の発現を指向し得る。

【0257】

多くの細胞系統が哺乳動物の発現に利用可能であり、これらとしては、マウス、ラット、ヒト、サル、トリ及びハムスターの細胞が挙げられる。例示的な細胞系統としては、CHO、Balb/3T3, HeLa, MT2, マウスNS0(非分泌型)、及び他の骨髄腫細胞系統、ハイブリドーマ及びヘテロハイブリドーマ細胞系統、リンパ球、纖維芽細胞、Sp2/0, COS, NIH3T3, HEK293, 293S, 2B8, そして

HKB 細胞が挙げられるが、これらに限定されない。細胞培地から分泌されたタンパク質の精製を容易にする無血清培地に適合させた細胞系統もまた利用可能である。一つのこのような例は、無血清のEBNA-1細胞系統(Pham 他., (2003) Biotechnol. Bioeng. 84:332-42.)である。

10

20

30

40

50

【0258】

e. 植物

トランスジェニック植物細胞及び植物が、本明細書で記載されている抗体及びその部分などのタンパク質を発現させるために使用され得る。発現構築物は、代表的には、微粒子銃(microprojectile bombardment)及びPEG媒介性のプロトプラスト内への移入のような直接的なDNAの移入、ならびに、アグロバクテリウムにより媒介される形質転換を用いて、植物へと移入される。発現ベクターは、プロモーター配列及びエンハンサー配列、転写終止エレメント、ならびに、翻訳制御エレメントを含み得る。発現ベクター及び形質転換技術は、典型的に、双子葉植物宿主(例えば、シロイヌナズナ(Arabidopsis)及びタバコ)と、単子葉植物宿主(例えば、トウモロコシ及びコメ)との間で分けられる。発現に使用される植物プロモーターの例としては、カリフラワーモザイクウイルスCaMV 35Sプロモーター、ノパリンシンターゼプロモーター、リボースビスホスフェートカルボキシレートプロモーター、ならびに、トウモロコシユビキチン-1(ubi-1)プロモーターが挙げられる。ハイグロマイシン、ホスホマンノースイソメラーゼ及びネオマイシンホスホトランスフェラーゼのような選択可能なマーカーが、しばしば形質転換された細胞の選択及び維持を容易にするために使用される。形質転換された植物細胞は、細胞、凝集物(カルス組織)として培養中に維持され得るか、又は、完全な植物へと再生され得る。トランスジェニック植物細胞はまた、プロテアーゼ又は変型プロテアーゼを生成するように加工された藻類を含み得る(例えば、Mayfield 他. (2003) PNAS 100:438-442を参照)。植物は、哺乳動物細胞とは異なるグリコシル化パターンを有するので、このことがこれらの宿主において生成されるタンパク質の選択に影響を及ぼし得る。

【0259】

3.

精製

抗体及びその部分は、当業者に知られている方法で精製することができる。遺伝子組換え生殖細胞抗体は、SDS-PAGE、サイズフラクション及びサイズ排除クロマトグラフィー、硫酸アンモニウム沈降法、キレートクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、又はカラムクロマトグラフィーのような当業者に知られている標準的なタンパク質精製技術によって(ただしこれらに限定されない)相当の純度まで精製することができる。例えば、抗体はカラムクロマトグラフィーで精製することができる。例示的な抗体精製法はカラムクロマトグラフィーであり、この方法においては、固形支持体カラム材料が、高い親和性で免疫グロブリンを結合するGタンパク質、即ち連鎖球菌(*Streptococcus*)に由来する細胞表面付着タンパク質と連結されている。抗体は、60%, 70%, 80%の純度まで、そして典型的には、最低でも90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%又は99%の純度まで精製され得る。純度は、SDS-PAGE及びクーマシ

ー染色によって評価することができる。

遺伝子組換え遺伝子又はその部分の宿主細胞からの精製は、宿主細胞と発現システムに依存する。分泌した分子では、タンパク質は通常、細胞を除去した後の培地から精製される。細胞内発現の場合、細胞は溶解し、タンパク質は抽出物から精製される。トランスジェニック植物やトランスジェニック動物のようなトランスジェニック生物が発現に使用される場合、組織や器官が溶解した細胞抽出液を作るための出発物質として使われる。加えて、トランスジェニック動物の生産には、乳や卵におけるポリペプチドの生産（採集することができる）を含むことができ、もし必要であれば、更にタンパク質を抽出することができ、そして当分野の標準的な方法でこれを精製することができる。

【0260】

10

抗体が大量の形質転換細菌によって発現する場合、典型的に、プロンプターの導入の後に、発現は恒常的であるが、ポリペプチドが不溶性の凝集物を形成する。ポリペプチド封入体の精製に適したいくつかの方法があり、当分野で知られている。当然ながら、これらの技術には数多くの変型法が存在する。

【0261】

20

例えば、ある方法においては、一般的に細胞懸濁液は遠心分離され、そして封入体を含むペレットが、不溶性であるが、しかし封入体を洗い流す緩衝液の中に再懸濁される。このような緩衝液としては、例えば20 mM Tris-HCl (pH 7.2), 1 mM EDTA, 150 mM NaCl 及び 2% Triton-X 100, 非イオン界面活性剤がある。細胞デブリを可能な限り除去するために、洗浄ステップを繰り返す必要があり得る。残った封入体ペレットは適当な緩衝液（例えば、20 mM リン酸ソーダ, pH 6.8, 150 mM NaCl）で再懸濁され得る。その他の適当な緩衝液が、当業者によく知られている。

【0262】

30

あるいは、抗体はバクテリアペリプラズムから精製することができる。ポリペプチドがバクテリアペリプラズムへ運び出された場合、バクテリアペリプラズム画分は、当業者に知られているその他の方法に加え、コールド浸透圧ショック法によって分離することができる。例えば、ひとつ的方法においては、遺伝子組換えポリペプチドをペリプラズムから分離するために、バクテリア細胞はペレットを形成するよう遠心分離される。ペレットは20% スクロース（蔗糖）を含む緩衝液の中に懸濁される。細胞を溶解するために、バクテリアは遠心分離され、そのペレットは、氷冷の5 mM MgSO₄ に再懸濁され、そしてアイスバスで約10分間保持される。細胞懸濁液は遠心分離され、そして上澄みがデカントされてから保存される。上澄みの中にある遺伝子組換えポリペプチドは、当業者に知られている標準的な分離技術によって、宿主タンパク質から分離することができる。これらの方法としては（ただしこれらに限定されない）、以下のようなステップがある：溶解性分画法、サイズ微分フィルタリング、及びカラムクロマトグラフィー。

【0263】

40

H.

製剤、投与及び製造物/キットの発明

1. 製剤

本明細書において提供される抗体は、投与製剤として提供され得る。有効成分を単独で投与することも可能であるが、通常は治療用製剤として提供される。製剤は少なくともひとつの有効成分から構成され、ひとつ若しくはそれ以上の許容可能なキャリアーを含んでいる。各々のキャリアーは、他の成分に適合し、患者に害を与えないという意味において、薬学的及び生理学的に許容可能でなければならない。製剤は、経口、直腸、経鼻、又は非経口（皮下、筋肉内、静脈内及び皮内を含む）投与に適したものを作成している。製剤は、簡便のために単位投薬量形式で提供することが可能であり、当分野でよく知られている方

50

法で調製することができる。例えば以下を参照のこと: Gilman, 他. (1990版) Goodman 及び Gilman's: 治療法の薬理学的基礎, 8th Ed., Pergamon Press; 及び Remington's Pharmaceutical Sciences, 17版. (1990), Mack Publishing Co., Easton, Pa.; Avis, 他. (1993版) 薬剤投与形式: Parenteral Medications Dekker, NY; Lieberman, 他 (1990版) 薬剤投与形式: Tablets Dekker, NY; 及び Lieberman, 他 (1990版) 薬剤投与形式: Disperse Systems Dekker, NY。

【0264】

抗体投与のルートは、既知の方法と一致しており、その例としては以下に述べてあるよう 10 に、静脈内、腹腔内、脳内、皮下、動脈内、髄腔内、吸入又は

病巣内ルートでの注射又は点滴、局所的又は除放的なシステムがある。抗体は、点滴又はボーラス注射によって連続的に投与することができる。局所的又は系統的な方法で抗体を投与することが可能になっている。

本明細書において提供される抗体は、薬学的に許容可能なキャリアとの混合物として調製することができる。化合物の迅速な処方と投与のための技術については、“Remington's Pharmaceutical Sciences,” (Mack

Publishing Co., Easton, Pa., 最新版) で見ることができる。この治療用組成物は、例えば噴霧剤(凍結乾燥した)として、静脈又は鼻、肺を通じて投与することができる。またこの組成物は、必要に応じて非経口で、又は皮下に投与することができる。手順どおりに投与された場合、この治療用組成物は、一般的に無菌、パイロジエン(発熱性物質)フリーであり、またpH、等張性と安定性に充分に配慮した、非経口的に許容可能な溶液に溶かされている。これらの条件は、当業者に知られている。

治療用製剤は、多くの在来の投与製剤によって投与することができる。簡単に言えば、本明細書において提供される抗体の投与製剤は、目的とする純度を具えた化合物を、生理学的に許容可能なキャリア、添加剤、又は安定剤と混合することで、貯蔵と投与に対応できるよう調製されている。そのような材料は、採用させる投薬量と濃度において患者に対し無毒であり、そして以下のような緩衝材を含むことができる: TRIS HCl, リン酸, クエン酸,

酢酸塩及びその他の有機酸性塩; アスコルビン酸などの抗酸化剤; ポリアルギニンなどの低分子ペプチド(約10残基以下), 血清アルブミンなどのタンパク質、ゼラチン、又は免疫グロブリン; ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー; グリシン、グルタミン酸、アスパラ酸などのアミノ酸、又はアルギニン、单糖、

二糖類、及びセルロース又はその誘導体、グルコース、マンノース、又はデキストリン; EDTAなどのキレート化剤; マンニトール、ソルビトールなどの糖アルコール; ソーダなどの対イオン及び/又はTWEEN,

PLURONICSなどの非イオン界面活性剤、又はポリエチレングリコールなどを含むその他の炭水化物。

【0265】

インビボ投与に使用される場合、抗体製剤は無菌状態でなければならず、また在来の薬学的な慣行に従って処方することができる。これは、凍結乾燥と再構成に先立って無菌フィルターメンブレンを通じてフィルタリングすることによって簡単に達成することができる。通常、抗体は凍結乾燥状態又は溶液の中で貯蔵される。その他の溶媒としては、例えば胡麻油、ピーナッツ油、綿実油などの自然発生的な野菜に由来する油、又はオレイン酸エチルなどの合成脂肪溶媒、及びこれらの類似物が望ましい。緩衝材、保存剤、抗酸化剤及びその類似物が、一般に承認された薬学的な慣行に従って導入され得る。

使用に適した医薬組成物は、合理的に設計されたひとつ又はそれ以上の抗体が所期の目的の達成に効果的な量だけ含有している組成物を含んでいる。治療上、効果のある量の決定方法は、当業者が熟知している。治療上、効果のある投薬量は、インビトロ(試験管内)及びインビボ(生体内)の方法によって決定することができる。

10

20

30

40

50

治療的に用いられる抗体の効果的な量は、例えば治療対象、投与経路、そして患者の状態に依存している。例えば、本明細書において提供される抗体は、アゴニスト抗体とアンタゴニスト抗体を含んでいる。加えて、担当医は薬剤の作用を変えることが知られている様々な因子、例えば疾患の程度とタイプ、体重、性別、食事制限、投与の時間と経路、他の薬物治療、そしてその他関連する臨床的因素を考慮することになる。したがって、治療専門家は投与量を調整し、投与経路を変更して最適な治療効果が得られるようにする必要がある。典型的には、臨床医は所期の効果が得られる量になるまで抗体を投与する。この治療法の進捗状況は、従来の評価法で容易にモニターすることができる。

【0266】

ペプチドを含有するいかなる抗体も、治療上、効果的な投与量を、最初は細胞培養から見積もることが可能である。例えば、動物モデルにおいて、細胞培養で決定される50%有効濃度 (EC50) を含む血中濃度域に達するよう決定することができる（例えば、細胞増殖又は細胞分化を、増進又は阻害するテスト分子の濃度）。これらの情報を、人間における更に正確な投与量を決定するために使用することができる。

本明細書において記載している抗体分子の毒性と治療効果、例えばLD50（個体群の50%に対して致命的となる投薬量）やED50（個体群の50%に対して治療効果がある投薬量）が、組織培養又は実験動物における標準的な薬学的手順によって決定することができる。毒性と治療効果の間の用量比が治療指数であり、これはLD50とED50の間の比率によって表される。高い治療指数を示す分子成分が使用され得る。これらの細胞培養測定や動物研究から得られたデータは、人間における投与量の範囲を決めるために用いることができる。これらの分子の投与量は、毒性が微量もしくは皆無であるED50を含む血中濃度範囲内に位置している。投与量は、採用された投与法と投与経路によって決まる範囲内で変化する。正確な製剤、投与経路及び投与量は、患者の状態に鑑みながら個々の医師によって選択され得る。（例えばFingl他., 1975, “治療学の薬理学的基礎 (The Pharmacological Basis of Therapeutics)”, 1章, p.1を参照のこと）

【0267】

細胞増殖、細胞分化を促進又は阻害するに充分な、又は最小有効濃度 (MEC) の達成に充分な抗体の血漿濃度が得られるよう、投与量と投与間隔は個人別に調節することができる。MECは個々の抗体によって異なるが、本明細書において記載した測定を使用して得られたインピトロ（試験管内）データから推測することが可能である。MECを達成するに必要な投薬量は、個々の特性と投薬経路によって決まる。HPLC測定又は生物検定法が、血漿濃度の測定のために使用することができる。投薬間隔はまた、MECの値を用いて決定することができる。抗体分子は血漿レベルを10-90%の間にわたって（一般的には30-90%、例えば50-90%となるように）MECを超過するような投与計画に基づいて投与され得る。局所投与又は選択的摂取の場合、抗体の効果的な局所濃度は血漿濃度とは関連され得ない。

【0268】

この抗体は、一度に、又は数回に分けて適切に患者に投与される。疾患のタイプと程度によって、また例えば、単独又は分割投与によるか連続点滴によるかによって、約0.001mg/kgから約1000mg/kgの範囲（例えば約0.01mgから約100mg/kg、この抗体を0.010から20mg/kgなどのように）、特に1μg/kgから15mg/kg（例えば0.1mg/kg-10mg/kg）が、患者に対する初回投与量の候補となる。ひとつの典型的な一日当たりの投与量は、約1μg/kgから1000mg/kg、もしくはそれ以上であり、例えば、1μg/kgから100mg/kgもしくはそれ以上となるが、前述の因子に左右される。数日間又はそれ以上の反復投与の場合、条件にもよるが、治療は、病徵に対する所期の抑制効果が現れるまで継続される。この抗体のひとつの例示的な投与は、約0.05mg/kgから約10mg/kgである。このように、約0.5mg/kg, 2.0mg/kg, 4.0mg/kg又は10mg/kg（又は、これらの組合せのひとつ）の内のひとつ又はそれ以上の投与量が患者に投与され得る。このような投与量は、例えば毎週、又は三週間毎（例えば、患者は投与約2回～20回の範囲内において、例えばこの抗体を6回投与）のように間欠的に投与することができ

10

20

30

40

50

る。一回又はそれ以上の低用量投与の後に続き、初回の高容量投与が実施され得る。例示的な投与計画は、この抗体約4mg/kgの初回投与と、それに続く、週一回の約2 mg/kgの維持量を含んでいる。その他の投与計画も採用され得る。治療の進捗状況は、従来の技術と測定で容易にモニターすることができる。典型的に、臨床医は投与が所期の効果を達成するまでこの分子成分を投与する。

【0269】

2.

製造物とキットの発明

選抜した抗体の薬剤化合物、選抜した抗体をコードした核酸、又は誘導体もしくは生物活性を持つその部分は、パッケージ材料、疾患又は障害の治療に有効な医薬組成物、及び選抜した抗体又は核酸分子が当該疾患又は障害の治療に利用されることを表示した標識としてパッケージ化され得る。

本明細書において提供される製造物の発明は、パッケージ材料を含む。薬剤化合物をパッケージするパッケージ材料は、当業者によく知られている。例えば、米国特許第 5,323,907, 5,052,558 及び 5,033,252 (これらは全てその全体が本明細書に組み込まれる) を参考のこと。製剤パッケージ材料の例としては(ただしこれらに限定されない)、プリスター包装、瓶、チューブ、吸入器、ポンプ、袋、バイアル、容器、注射器、及び選抜した薬剤と予定される投与、治療方法に適したその他のすべての材料を含む。幅広いEPO-介在型の疾患又は障害、治療上のポリペプチド介在型の疾患又は障害のための多くの治療法として、本明細書において記載している化合物と組成物の幅広い製剤が考慮されている。

抗体とそれをコードした核酸分子は、キットとしても提供することができる。キットには、本明細書において記載されている医薬組成物と投薬のための道具を含んでいる。例えば、選抜した抗体は、注射器、吸入器、投薬用カップ、点滴器、又は塗布器などの投与デバイスとともに提供することができる。このキットは、投与量、投与計画を含む適用のための使用説明書、及び投与方式のための説明書を任意で含み得る。キットはまた、本明細書に記載されている医薬組成物、及び診断用アイテムを含み得る。例えば、このようなキットは、被験者における抗体の濃度、量、活性を測定するアイテムを含み得る。

【0270】

1.

抗体の方法と用途

本明細書において提供される抗体及びその部分は、DLL4と特異的に結合する抗体の能力に基づいて様々な方法又は用途において使用することができる。例えば、本明細書に記載する抗体はDLL4 の活性を調節し、DLL4 の発現及び/又は活性に関連する病態の治療又は予防のために使うことができる。抗体はまた、他の治療薬と組み合わせて提供することも可能である。ゆえに、抗DLL4抗体と他の治療薬の組み合わせが、本明細書において記載する治療法において使用することができる。本明細書に記載する抗体はまた、検出や診断法においても使用することができる。

【0271】

1. 治療方法と用途

本明細書において提供される方法は、例えば、増幅された発現及び/又は活性、又は望まれない発現及び/又は活性(例えば、米国特許出願公開第. US20080175847 及び. 国際公開公報第 WO2008060705, WO2008091222を参照のこと)など、本明細書において記載するDLL4活性を特異的に結合する及び/又は調整する抗DLL4抗体を使った治療法である。治療には、腫瘍性障害及び非腫瘍性障害を含む。例えば、この抗体又はその部分は、腫瘍、癌(例えば結腸癌、肺がん、又は乳癌)及び/又は細胞増殖異常及び/又は血管新生と関連した容態(例えば、眼内血管新生病)を治療するために使用することができる。特に、この抗体又はその部分は、抗VEGF療法との組合せ及び/又は抗VEGF療法に耐性のある治療法において使用することができる。

10

20

30

40

50

【0272】

血管新生は、種々の障害の病因に関与している。そのような障害として、固形腫瘍及び転移、アテローム性動脈硬化、水晶体後線維増殖、血管腫、慢性的炎症、増殖性網膜症などの眼内血管新生病、例えば糖尿病網膜症、加齢性黄斑変性（AMD）、血管新生線内障、移植角膜組織及びその他の移植組織の免疫拒絶反応、慢性関節リューマチ、及び乾癬が挙げられる。Folkman 他., J. Biol. Chem. 267:10931-34 (1992);

Klagsbrun 他., Annu. Rev. Physiol. 53:217-39 (1991); 及びGarner A., “血管系疾患（Vascular diseases）”

眼疾患の病理生物学：大胆なアプローチ（Pathobiology of Ocular Disease. A Dynamic Approach）Garner A., Klintworth G K, 他., 第二版(Marcel Dekker, NY, 1994), pp 1625-1710。 10

【0273】

腫瘍増殖の場合、血管新生は、過形成から新形成への移行、及び、腫瘍の増殖及び転移のための栄養補給のために必須であるようである。Folkman 他., Nature 339:58 (1989)。

血管新生によって、腫瘍細胞は、正常細胞に比べて、成長への有利性及び増殖自律性を獲得することが可能となる。腫瘍は、通常、単一の異常細胞として始まるが、これは、利用可能な毛細血管からの距離のために、たかだか数立方ミリメートルの大きさにしか増殖することができず、それ以上成長、拡散することなく長期間「休眠状態」のまま留まることがあり得る。いくつかの腫瘍細胞は、血管新生表現型にスイッチされて内皮細胞を活性化し、内皮細胞は増殖し、成熟して新規毛細血管となる。これらの新たに形成された血管は、一次腫瘍の継続的成長を可能とするばかりでなく、転移腫瘍細胞の拡散及び転移増殖を可能とする。したがって、乳癌ばかりでなく、他のいくつかの腫瘍においても、腫瘍切片における微小血管密度と、患者の生存率との間には相関が観察されている。Weidner 他., N. Engl. J. Med. 324:1-6 (1991); 20

Horak 他., Lancet 340:1120-24 (1992); Macchiarini 他., Lancet 340:145-46 (1992)。この血管新生スイッチを調節する正確な仕組みは十分には理解されていないが、腫瘍塊の新規血管新生は、多数の、血管新生刺激因子と阻害因子との間のネットバランスから得られると考えられている (Folkman, Nat. Med. 1(1):27-31 (1995))。 30

【0274】

加えて、抗体又はその部分は以下のような非腫瘍性障害の治療に使用することができるが、ただしこれらに限定されるものではない。望まれない、又は異常な過形成、関節炎、慢性関節リューマチ（RA）、乾癬、乾癬プラーク、サルコイドーシス、アテローム性動脈硬化症、アテローム硬化プラーク、心筋梗塞に伴う浮腫、糖尿病性、及びその他の増殖性網膜症で、例えば、未熟兒網膜症などの網膜症、水晶体後線維増殖、血管新生線内障、加齢性黄斑変性、糖尿病性黄斑浮腫、角膜血管新形成、移植角膜組織血管新形成、移植角膜組織の免疫拒絶反応、網膜／脈絡膜血管新形成、隅角血管新形成（ルベオーシス）、眼内血管新生病、血管再狭窄、動静脈変形（AVM）、髄膜腫、血管腫、血管線維腫、甲状腺過形成（グレーブズ病を含む）、角膜及びその他の組織の移植、慢性炎症、肺炎症、急性肺傷害／ARDS、敗血症、一次肺高血圧、悪性肺滲出、脳浮腫（例えば、急性発作／閉塞性頭部傷害／外傷と関連する）、滑膜炎症、RAにおけるパンヌス形成、骨化性筋炎、過栄養骨形成、骨関節炎（OA）、難治性腹水、多のう胞卵巣疾患、子宮内膜炎、流体疾患（すい臓炎、仕切り症候群、火傷、腸疾患）の第3間隔、子宮類線維腫、早産、IBD（クローン病及び潰瘍性結腸炎）などの慢性炎症、腎臓異種移植拒絶反応、炎症性腸疾患、ネフローゼ症候群、不快な、又は異常な組織塊の成長（非癌）、肥満、脂肪組織腫瘍増殖、出血性関節、肥大瘢痕、毛髪成長抑制、オスラー-ウェーバー症候群、膿形成肉芽腫、水晶体後線維増殖、強皮症、トラコーマ、血管接着、滑膜炎、皮膚炎、子癪前症、腹水、心内膜液滲出（心膜炎に関連するものなど）、及び胸水滲出が挙げられる。 40

複合療法

【0275】

上記に示したように、本明細書において提供される抗DLL4抗体は、抗DLL4抗体が他の療法と共に投与される複合療法において投与され得る。US2009F 又は例、抗DLL4抗体が、抗腫瘍治療又は抗血管新生治療と組み合わせて使用され、様々な腫瘍性又は非腫瘍性の病態の治療を行うことができる。ひとつの実施形態では、腫瘍性又は非腫瘍性病態は、異常又は望まれない血管新生と関連する病理学的な障害によって特徴づけられる。例示的な複合療法はまた、米国特許出願公開第 20090246199に記載されているものすべてを含んでいる。この抗DLL4抗体は連続的に、同じ組成物において又は異なって複数の組成物として、これらの目的に適したその他の薬剤と組み合わせて投与することができる。この抗DLL4抗体は、治療薬と共に連続的に、同時に、又は間欠的に投与することができる。あるいは又は追加的に、DLL4の複数の阻害剤が投与され得る。

10

【0276】

この抗DLL4抗体の投与は、例えば、同一の又は異なった投与経路を使い、ひとつの組成物又は二つ若しくはそれ以上の異なった組成物として、同時に実施することができる。あるいは、又は追加的に、投与は、順序を問わず、連続的に実施することができる。ある実施形態では、二つ又はそれ以上の組成物の投与のインターバル範囲は、数分から数日、又は数週間から数ヶ月となっている。例えば、抗癌剤が最初に投与され、続いてDLL4阻害剤が投与され得る。また、同時投与もしくはこの抗DLL4抗体の投与が最初に考慮される。

20

【0277】

抗DLL4抗体と組み合わせて投与される治療薬の効果的な量は、内科医又は獣医の裁量によって決まる。薬剤の投与と調節が、治療すべき病態を最大限管理するために実施される。また、投与量は使用される治療薬のタイプと治療を受ける個々の患者によって決定される。抗癌剤の適切な投与量は現行採用されているものでよいが、抗癌剤と抗DLL4抗体の作用が組み合わされる（シナジー効果）ため、投与量は減少され得る。ある実施形態では、複数の阻害剤を組み合わせた方が、単独阻害剤よりも効果が強くなっている。

30

【0278】

典型的に、抗DLL4抗体と抗癌剤は、同一のまた同様な疾患に対して、腫瘍増殖又は癌細胞増殖のような病理学的な異常を阻止又は減少させることに適している。ひとつの実施形態において、抗癌剤が血管新生阻害剤となっている。癌細胞と関連した血管新生阻害剤療法は、腫瘍増殖を促進する栄養分の供給を担う腫瘍血管の発生を阻止することを目的とした癌治療戦略である。血管新生は一次腫瘍増殖と転移の両方に含まれているため、抗血管新生療法は一般的に、原発巣における腫瘍増殖の阻止及び転移巣における腫瘍転移を予防を行う能力を有している。そのため、その他の治療法による腫瘍への攻撃を可能としている。

40

【0279】

多くの血管新生阻害剤が確認されていて当分野でよく知られており、例えば以下のようないものを含む。例えばCarmeliet 及び Jain, Nature 407:249-257 (2000)による定義 (Definitions) に列挙されているもの; Ferrara 他., Nature Reviews. Drug Discovery, 3:39 1-400 (2004); 及び Sato Int. J. Clin. Oncol., 8:200-206 (2003)によるもの。また米国特許出願US20030055006も参照のこと。ひとつの実施形態においては、抗DLL4抗体が抗VEGF中和抗体（又はフラグメント）及び/又は他のVEGF アンタゴニスト、又はVEGF レセプターアンタゴニストと組み合わせて使われるが、これらには例えば以下のものを含む（ただし、これらに限定されるものではない）：

溶解性 VEGF レセプター（例えば VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, ニューロピリン（例えば NRP1, NRP2））フラグメント、VEGF又はVEGFRの遮断能力があるアプタマー、ニューロピリン抗VEGFR抗体、VEGFR チロシンキナーゼ(RTK)の低分子阻害剤、VEGF用アンチセンス戦略、VEGF 又は VEGF レセプターに対するリボザイム、VEGFのアンタゴニスト変種；及びこれらを組み合わせたもの。あるいは、又は追加的に、二つ又はそれ以上の血管新生阻害剤を、VEGFアンタゴニスト及びその他の薬剤に追加して患者に任意の方法で同時投与するこ

50

とができる。ある実施形態においては、ひとつ又はそれ以上の追加治療薬、例えば抗癌剤が抗DLL4抗体、VEGFアンタゴニスト、そして血管新生阻害剤と組合わせて投与することができる。

ある種の態様では、DLL4抗体を使用した複合腫瘍治療法に有用なその他の治療薬は、その他の癌治療法（例えば、手術、放射線治療（例えば、放射線照射又は放射性物質の投与を含む）、化学療法、ここに列挙され、当分野で知られている抗癌剤治療、又はこれらを組合わせたもの）を含む。あるいは、又は追加的に、ここで開示された、同一の、又は二つ或いはそれ以上の異なった抗原を結合する二つ又はそれ以上の抗体を、患者に同時投与することができる。時には、患者にひとつ又はそれ以上のサイトカインを投与することも有益である。

10

【0280】

例えば、腫瘍の増殖又は癌細胞の増殖を阻害又は減少させる方法としては、効果的な量のDLL4アンタゴニスト及び/又は血管新生阻害剤、及び、ひとつ又は二つ以上の化学療法剤の癌ハイリスク患者又は癌と診断された患者への投与を含む。複合療法においては、様々な化学療法剤を使用することができる。当業者に理解されているように、化学療法剤の適切な投与量は、一般的に、化学療法剤が単独又はその他の化学療法剤と組合されて投与される既存の臨床療法における投与量に近似している。投与量の変更は、治療されるべき病態によって実施される。治療を実施する医師は、個々の患者のために適切な投与量を決定することができる。

20

【0281】

2. 診断と検出

本明細書において提供される抗DLL4抗体は、例えば、特定の細胞又は組織におけるDLL4発現（診断上又は予後の評価）を検知するために有用である。このような例では、抗体は不可溶性の基質に標識化及び/又は固定される。例えば、DLL4発現及び/又は活性に関する異常の診断方法が、本明細書で記載されている。この方法には、異常を持つか又は持っていると疑われる患者の生体試料中のDLL4-抗-DLL4抗体複合体の検出が含まれている。いくつかの実施形態において、このDLL4発現は増強発現又は異常（望まれない）発現である。いくつかの実施形態では、この異常は腫瘍、癌及び/又は細胞増殖異常である。

30

本明細書において提供される検出方法において、抗DLL4抗体は一般的に検出可能な標識（例えば、ビオチン、ルビジウム、蛍光標識又はその他の標識）で標識化されている。抗DLL4抗体は、よく知られている多くの評価方法のいずれにおけるDLL4の検出にも使用することができる。例えば、生体試料を望ましい供給源（例えば、血液又は血清又は細胞製剤）から取得し、その試料を抗DLL4抗体と混合させ、その混合物中のすべてのDLL4と抗体/DLL4複合体を生成させ、そして、混合物中の抗体/DLL4複合体を検出することで、生体試料中のDLL4を評価することができる。この生体試料は、当分野で知られている、特定の試料に適した測定方法で調製される。試料と抗体の混合方法及び抗体/DLL4複合体の検出方法は、使用される測定のタイプにしたがって選択される。このような測定には、免疫組織化学的検査、競合法、サンドイッチ法、そして立体阻害法がある。

【0282】

標識は、DLL4及び抗DLL4抗体の結合を妨げない検出可能な機能性を備えているものである。免疫測定用の数多くの標識が知られている。例示的な標識としては、直接検出され得る成分、例えば蛍光色素、化学発光及び放射性標識や、酵素のような成分があり、これは検出されるために反応又は再誘導化されなければならない。このような標識の例には、ラジオアイソトープ³²P, ¹⁴C, ¹²⁵I, ³H, and ¹³¹I、レアアースなどの蛍光体又はフルオレセインとその誘導体、ローダミンとその誘導体、ダンシル、ウンベリフェロン、ルシフェラーゼ、例えばホタルルシフェラーゼイ及びバクテリアルシフェラーゼ（米国特許No. 4,737,456）、ルシフェリン、2,3-ジヒドロフラジンジオン、ホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)、アルカリホスファターゼ、ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、サッカライドオキシダーゼ、例えばグルコースオキシダーゼ、ガラクトース

40

50

オキシダーゼ、及びグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、ウリカーゼやキサンチンオキシダーゼなどのヘテロ環状オキシダーゼ、過酸化水素を利用してHRPなどの色素前駆体を酸化させる酵素との対、ラクトペルオキシダーゼ又はミクロペルオキシダーゼ、ビオチン/アビシン、スピノ標識、及びフリーラジカル。

【0283】

在来の方法が、これらの標識を共有結合的にタンパク質又はポリペプチドに結合させるために使われている。例えば、ジアルデヒド、カルボジイミド、ジマレイミド、ビスイミド、ビスジアゾ化ベンチジンなどのカップリング剤を、上記の蛍光、化学発光及び酵素標識を用いて抗体にタグをつけるために使用することができる。例えば、以下を参照のこと：米国特許第. 3,940,475 (蛍光定量法) 及び 3,645,090 (酵素)；Hunter 他., *Nature*, 144: 945 (1962); David 他., *Biochemistry*, 13: 1014-1021 (1974); Pain 他., *J. Immunol. Methods*, 40: 219-230 (1981)；及び Nygren, *J. Histochem. Cytochem.*, 30: 407-412 (1982)。標識の例としては、ホースラディッシュペルオキシダーゼ及びアルカリホスファターゼなどの酵素がある。酵素を含むこれらの標識の抗体への結合は、免疫測定技術の分野における標準的な操作手順である。例えば以下を参照のこと：O'Sullivan 他., “酵素免疫測定における使用のための酵素/抗体結合の調製 (Methods for the Preparation of Enzyme-antibody Conjugates for Use in Enzyme Immunoassay)”, *Methods in Enzymology*, ed. J. J. Langone 及び H. Van Yunakis, Vol. 73 (Academic Press, New York, N.Y., 1981), pp. 147-166。

測定によっては、試薬の固定化が必要となる。固定化のためには、溶液中に残っているDL-L4から抗DLL4抗体を分離することが必要である。これは従来、非水溶性基質又は表面 (Bennich 他., 米国特許第 3,720,760) に吸着させるなどして、測定の前に抗DLL4抗体もしくはDLL4類似体を不溶化するか、又は共有結合カップリング(例えば、グルタルアルデヒドクロスリンクを利用する)によるか、又は免疫沈降法などによって、後で抗DLL4抗体又はDLL4類似体を不溶化することで達成される。

【0284】

試料中のタンパク質の発現は、免疫組織化学及び染色プロトコルを使って検査することができる。組織切片の免疫組織化学的染色は、試料中のタンパク質の測定又は検出をする信頼できる方法であることが示されている。免疫組織化学(“IHC”)技術は、抗体を使って細胞抗原をインシツ(*in situ*)でプローブ及び視覚化するが、それは一般的に発色性又は蛍光性の方法による。例えば、試料調製のために、哺乳類(典型的には、人間の患者)に由来する組織又は細胞の試料を使うことができる。試料の例として、結腸、乳房、前立腺、卵巣、肺、胃、脾臓、リンパ腫及び白血病などの癌細胞があるが、これらに限定されるものではない。試料は当分野で知られている様々な方法で入手することができるが、ただし外科的切除、吸引又は生検に限定されるものではない。組織は新鮮であり又冷凍されている。ひとつの実施形態では、試料がパラフィンに固定化され埋め込まれている。組織試料は、従来の方法論で固定(即ち、保存)することができる。当業者は、固定液の選択が、試料が組織学的に染色される又は他の方法で分析される目的に応じて決定されることを認識している。当業者はまた、固定の長さが、組織試料のサイズと使われる固定剤によって決まることを認識している。

【0285】

IHCは、形態学的染色及び/又は蛍光インシツ(*in situ*)ハイブリダイゼーションなどの追加的な技術との組合せによって実施することができる。IHCでは、一般的な方法が二つあり、つまり直接及び間接測定である。前者によれば、標的抗原(例えば、DLL4)への抗体の結合は直接的に測定される。この直接測定は、例えば蛍光タグ又は酵素標識一次抗体などのような、更なる抗体相互作用なしに視覚化することができる酵素標識化された試

10

20

30

40

50

薬を使用する。典型的な間接測定では、非抱合型一次抗体が抗原と結合し、そして標識化された二次抗体が一次抗体と結合する。二次抗体が酵素標識と結合する場合、発色基質又は蛍光基質が抗原の視覚性を提供するために添加される。いくつかの二次抗体が一次抗体の異なったエピトープと反応することができるため、シグナルが増幅する。免疫組織化学的方法で使用される一次抗体及び/又は二次抗体は、典型的に、検出可能な成分で標識化される。多くの標識が入手可能であり、それらは一般的に以下のカテゴリーに分類される。

【0286】

上記で述べた試料調製の方法の他に、IHCの前、途中、後に更なる組織切片の処理が可能である。例えば、組織試料をクエン酸緩衝液の中で加熱するといったエピトープ修復法を実施することができる（例えば、Leong 他 Appl.

10

Immunohistochem. 4(3):201 (1996)を参照のこと）。

任意の阻害ステップの続いて、組織切片は充分な時間、一次抗体が組織試料の中の標的タンパク抗原に結合するような安定した条件下で、一次抗体に曝される。これを達成するための適切な条件は、常用の実験で決定することができる。試料に対する抗体結合の程度は、上述した検出可能標識のいずれを使用しても決定することができる。標識は、3,3'ジアミノベンジンクロモゲンのような、発色基質の化学変性を触媒する酵素標識（例えばHRP）であり得る。酵素標識は、一次抗体（例えば、一次抗体はウサギポリクロナール抗体であり、二次抗体はヤギ抗ウサギ抗体）と特異的に結合するような抗体と結合することができる。このように調製した標本は、マウントしてカバーガラスがかけられる。

20

【0287】

次に、スライドは、例えば顕微鏡を使って評価され、そして当分野で常用されている染色強度診断基準を使用することができる。例えば、スコア2+は細胞の10%以上にweak（弱い）からmoderate（普通）が観察されることを示している。スコア3+は、10%以上の細胞にmoderate（普通）からstrong（強い）が観察される場合に与えられる。更に小さなスコアは、無染色（スコア0）又は微弱かほとんど感知できない染色（1+）のような、更に弱い染色に与えられる。典型的に、IHC測定においてスコアが約2+又はそれ以上の染色パターンが、診断及び/又は予防に供することができる。いくつかの実施形態では、スコア約1+又はそれ以上の染色パターンが、診断及び/又は予防に供するとされている。他の実施形態では、スコア約3+又はそれ以上の染色パターンが、診断及び/又は予防に供するとされている。腫瘍又は結腸線種に由来する細胞及び/又は組織がIHCを使って検査される場合、染色は通常、腫瘍細胞及び/又は組織（試料中の間質又は周辺組織とは対照的に）の中で測定又は評価される。

30

他の測定方法としては、競合法又はサンドイッチ法として知られているものが、商業診断業界でよく確立されており、広く使われている。例えば競合法は、限定された数の抗DLL4抗体抗原結合部位のための試料DLL4に対する、トレーサーDLL4類似体の競合能力に依存している。抗DLL4抗体は一般的に、競合の前又は後に不溶化され、それからトレーサーと抗DLL4抗体に結合したDLL4が、非結合トレーサーとDLL4から分離される。この分離は、上澄みを取り除くことで（結合相手がタンパク質可溶性の場合）、又は遠心分離（結合相手が競合反応の後に沈降された場合）することで達成することができる。DLL4試料の量は、マーカー物質の量によって測られる結合トレーサーの量に対して逆比例する。試料中のDLL4を定量的に測定するために、DLL4量が既知の場合の用量-反応曲線を用意し、これと試験結果を比較する。これらの測定は、検出可能なマーカーとして酵素を用いた場合、ELISAシステムと呼ばれている。

40

【0288】

競合法のその他の例としては、ホモジニアス法と呼ばれるものがあり、投与は相分離を必要としない。ここでは、DLL4と酵素の結合が調製され、抗DLL4抗体がDLL4と結合する時に、抗DLL4抗体の存在が酵素活性を改変するように使用される。この場合、DLL4又はその免疫学的に活性なフラグメントが、ペルオキシダーゼのような酵素に対する二官能性有機ブリッジと結合している。抗DLL4抗体の結合が標識の酵素活性を阻害又は増強するよう、抱

50

合体が抗DLL4抗体の使用のために選択される。この方法自体は、EMITという名称で広く実施されている。

【0289】

立体抱合体は、ホモジニアス法のための立体阻害法において使用される。これらの抱合体は、ハプテンに対する抗体が実質的に抗DLL4抗体と同時に結合できないようにするために、低分子ハプテンを微小なDLL4フラグメントに共有結合的に結合させることで合成される。この測定の手順において、試料中のDLL4は、抗DLL4抗体に結合し、それによって抗ハプテンを抱合体と結合させ、結果として、例えばハプテンが蛍光体である場合に蛍光が変化するなど、抱合型ハプテンの特性を改変することになる。

10

【0290】

サンドイッチ法は、特にDLL4又は抗DLL4抗体の測定に有用である。連続サンドイッチ法においては、固定化された抗DLL4抗体が試料DLL4を吸着するために使われ、試料は洗浄などの方法で除去され、結合DLL4が標識化された二次抗体を吸着するために使われ、そして次に結合した物質が残留したトレーサーから分離される。結合したトレーサーの量は、試料DLL4の量に正比例する。“同時”サンドイッチ法においては、試料は、標識化された抗DLL4を加える前には分離されない。抗DLL4モノクロナール抗体をひとつの抗体として、そして多クローナル性抗DLL4抗体をもう一方の抗体として使った連続サンドイッチ法が、DLL4試料の試験において有用である。

20

【0291】

J. 実施例

以下の実施例は単に例示を目的としたものであり、発明の範囲を限定することは意図されない。

実施例 1

生殖細胞系列Fab抗体のクローニング

この実施例では、重鎖又は軽鎖可変領域DNAをこれらの各プラスミドにクローニングすることで、Fab抗体が作成された。

30

【0292】

A. 重鎖及び軽鎖生殖細胞系列遺伝子組換えDNA配列の作成

生殖細胞系列由来の抗体が、米国仮出願番号第61/198,764及び61/211,204に記載されているように作成され、参照することにより本明細書に組み込まれる。簡潔には、VH鎖をコードしている核酸配列を作成するために、VH, DH 及び JH 生殖細胞系列セグメントがインフレームで翻訳された。以下に記載されているように、生殖細胞系列セグメント配列の翻訳に続いて、適当なベクターへのサブクローニングを可能にするため、制限酵素部位NcoI (SEQ ID NO:108) 及びNheI (SEQ ID NO:109) が、VH鎖をコードしている核酸配列の5' 及び 3' 末端に各々付加された。同様に、V 及び J 又はV and J が、VL鎖をコードしている核酸配列を作成するために、インフレームで翻訳された。V 及び J 生殖細胞系列セグメント配列の翻訳に続いて、適当なベクターへのサブクローニングを可能にするため、制限酵素部位NcoI 及び BsiWI (SEQ ID NO:110)が、VL鎖をコードしている核酸配列の5' 及び 3' 末端に各々付加された。あるいは、V 及び J 生殖細胞系列セグメント配列の翻訳に続いて、適当なベクターへのサブクローニングを可能にするため、制限酵素部位NcoI 及び Avr II (SEQ ID NO:111)が、VL鎖をコードしている核酸配列の5' 及び 3' 末端に各々付加された。翻訳された核酸配列は、合成抗体可変重鎖及び軽鎖配列を作成するため、合成DNAサプライヤー(Genscript Corp.)へ送付された。VH鎖をコードしている例示的な核酸配列が、表9に記載されている。VL鎖をコードしている例示的な核酸配列が、表10に記載されている。

40

【表9】

表9: 例示的な、翻訳された重鎖核酸配列	
重鎖	SEQ ID NO
VH1-46_IGHD6-6*01_IGHJ1*01	88
VH5-51_IGHD5-18*01>3_IGHJ4*01	89
VH6-1_IGHD3-3*01_IGHJ4*01	90
VH1-46_IGHD6-13*01_IGHJ4*01	92
VH4-34_IGHD7-27*01_IGHJ4*01	94
VH1-3_IGHD4-23*01_IGHJ4*01	95
VH1-46_IGHD2-15*01_IGHJ2*01	93
VH1-46_IGHD3-10*01_IGHJ4*01	91
VH1-8_IGHD2-2*01_IGHJ6*01	96
VH4-31_IGHD2-15*01_IGHJ2*01	97

10

【表10】

表10: 例示的な、翻訳された軽鎖核酸配列	
軽鎖	SEQ ID NO
L6_IGKJ1*01	98
V3-4_IGLJ1*01	99
V4-3_IGLJ4*01	100
L2_IGKJ1*01	102
L5_IGKJ1*01	103
A27_IGKJ1*01	101
L12_IGKJ1*01	104
O1_IGKJ1*01	105
V1-4_IGLJ4*01	106
V4-6_IGLJ4*01	107

20

【0293】

30

B. 可変重鎖及び可変軽鎖のクローニング

重鎖又は軽鎖可変領域をコードしているDNAが、コンビナトリアルFabフラグメントの同時形質転換と発現に応じて適切に、定常重鎖又は定常軽鎖を含むプラスミドにクローニングされた。プラスミドA (SEQ ID NO:84) 及びプラスミドD (SEQ ID NO:85) は、重鎖定常領域配列を含む。プラスミドC (SEQ ID NO:86) は、カッパ軽鎖定常領域配列を含み、プラスミドE (SEQ ID NO:87) はラムダ軽鎖定常領域配列を含む。

可変重鎖をコードしているDNAがNhe I 及び Nco Iで消化され、そして標準的な分子技術を用いて、StIIリーダー配列を持つプラスミドAに搭載された。可変カッパ軽鎖をコードしているDNAは、NcoI 及び BsiWIで消化され、可変ラムダ鎖をコードしているDNAはNcoI 及び AvrIIで消化され、標準的な分子技術を用いて、StIIリーダー配列を持つプラスミドC又はプラスミドEに各自搭載された。

40

【0294】

実施例2

抗体Fabフラグメントの発現と精製

A.

同時形質転換

プラスミドAと、プラスミドC又はプラスミドEのどちらかが（いずれも様々な可変重鎖と可変軽鎖の様々な組み合わせを含む）大腸菌 (E. coli) に同時形質転換した。この

50

プロセスは、重鎖と軽鎖の全ての組み合わせで反復された。簡潔には、プラスミドA (Fab重鎖をコードしている) と、プラスミドC又はプラスミドE (Fab軽鎖をコードしている) が、別々にTE緩衝液で最終濃度が1

ng/ μ Lになるまで再懸濁された。ひとつの重鎖プラスミド1 μ Lと軽鎖プラスミド1 μ LがPCRチューブ又はPCRプレートにおいて組み合わされ、そして20 μ Lの氷冷LMG194コンピテント細胞と混合された。この形質転換反応は、氷上に10分間静置され、次に摂氏42度に予熱されたPCRブロックの中で45秒間のヒートショックを施された。このチューブは更に2分間氷上に静置され、次にSOC培地200 μ Lが追加された。これらの細胞は、摂氏37度で1.5時間回収することができた。この形質転換培養物の100 μ Lアリコートが、0.4% (w/v) グルコース、カナマイシン (Sigma Aldrich) 17 μ g/mL及びクロラムフェニコール (Sigma Aldrich) 34 μ g/mLを含むLB培地 (ルリア-ベルターニプロス) 0.9 mLの接種に使われた。この培養物は、摂氏30度で20時間にわたり強く振盪して培養された。この形質転換培養物は、実施例10に記載されているように、PiccoloTM システムを使って培養、精製された。

B. Fab抗体のハイスループット増殖及び精製

形質転換に続き、これらの細胞は、通気性テープで覆われた2mLディープウェル96ウェルプレート (VWR) ブロックの中で一晩増殖された。この一夜培養物は、PiccoloTM (Wollerton 他 (2006)

JALA, 11:291-303.)への接種のために直接使われた。

【0295】

Fab抗体のハイスループット、パラレル発現、及び精製は、タンパク質の発現と精製を自動化しているPiccoloTM (The Automation Partnership (TAP))を使って実施された。PiccoloTM 用の発現及び精製パラメーターは、ランコンポーザーソフト (Run Composer software (TAP))を使って用意した。各クローンの種培養中の位置をマッピングした“系統ファイル”が作成された。これがランコンポーザーソフト (Run Composer software)に投入され、装置の基本設定は以下の通りであった：誘導前インキュベーターを摂氏30度に設定；発現インキュベーター1を摂氏16度に設定；遠心分離機を摂氏6度及び5000 x gに設定；メディアポンプ1 (Media Pump 1) は以下を呼び水とした；TB (Terrific Broth; 1リッター当りトリプシン12 g、酵母菌エキス24 g、リン酸カリウム9.4 g、二塩基、及びリン酸カリウム2.2 g、一塩基を含む) (EMD Biosciences; カタログ No. 71754) 、カナマイシン50 μ g/mL (Sigma Aldrich)、クロラムフェニコール35 μ g/mL (Sigma Aldrich)、0.4% (w/v) グルコース

(Sigma Aldrich) 及び0.015% (v/v) Antifoam 204 (Sigma Aldrich)；インデューサーポンプ1 (Inducer Pump 1) は0.2% (w/v) アラビノース (EMD Biosciences)を呼び水とした；インキュベーターガスレート (Incubator Gassing Rate) は2秒で酸素51%に設定、接種量0.1 mL；誘導統計法 (Induction Statistic Mean) は外れ値除去とした (即ち、ブロック平均値 OD600 が、3個の最高値と3個の最低値を除外して決定される)；培養容器ブロック(CVB) 誘導前遅延は1時間20分に設定、及び発現インキュベーター馴化は30分に設定。

【0296】

種培養物が調製準備され、必要な実験機器と共にPiccoloTM にロードされた：メーカーの指定どおり、24ウェル培養容器ブロック (CVBs; The Automation Partnership), 24ウェルフィルタプレート (The Automation Partnership), 24ウェルアウトプットプレート (Seahorse Bioscience) 及びピペットチップボックス (MBP)。上記のように補充されたTB培地、アラビノース誘導物質及び関連ポンプが殺菌状態で用意され、装置に取り付けられた。遠心分離機カウンターバランスが、遠心分離機の内部に設置された。最後に、精製試薬が調製され、システムポンプに加えられた(以下に記載するよう、溶解バッファ、樹脂、洗浄バッファ及び溶出バッファ)。これが完了次第、装置が始動し処理が開始された。

【0297】

10

20

30

40

50

接種前に、接種材料が24ウェル CVB の特定のウェルに配置され、以下に記載するよう発現と誘導の条件が設定された。種プレートからの接種前に、CVBの各々のウェルが、前述のように補充された10mLのTB培地で満たされた。各CVBの各々のウェルは、0.1 mLの種培養物で接種され、次に保管カルーセルに戻され、予定されている誘導前インキュベーションの許可を待った。CVBは、誘導前インキュベーション開始の準備ができ次第、保管カルーセルから取り出され、エアレーション装置（これは、攪拌、ウェルシーリング及び酸素/空気の制御供給を提供する）に連結され、次に摂氏30度に設定された誘導前インキュベーター内に置かれた。OD600 がインキュベーションの開始と共に読み取られ、その後は約30分毎に読み取られた。Piccolo 操作コントロールソフトが、いつ各CVBが設定値1.0 OD 600に達するかを予測するために、OD600 測定値をモニターする。CVBが設定値1.0 OD600に達する約30分前に、発現温度摂氏20度と平衡させるため、装置が発現インキュベーターに移され、次にCVB中の培養物が0.032% アラビノース誘導物質を加えることで誘導され、その後、45時間発現した。

10

【 0 2 9 8 】

培養接種と培養物の増殖誘導の後、細胞が回収され、Fabフラグメント精製のために溶解された。発現Fabタンパク質を、発現と精製が自動化された全培養精製“Lifecycle”を使って精製するために、PiccoloTM が使用された。制御された発現の後、溶解の前に、CVBsが保管カルーセルの中で摂氏6度で30分間冷却された。このCVBは液体操作ベッドへ移され、そして溶解バッファ(1:1000 Lysonase (EMD Biosciences)を加えた2.5 mL Popculture) が充分に混合され各ウェルに加えられた。

20

溶解は10分間進行し、次にCVBは、細胞デブリをペレット化するために10分間、5000 × g で遠心分離された。遠心分離の間、フィルタプレートはフィルターベッドの中に置かれ、そして、樹脂(2 mL 50% ニッケルチャージ済みHis-Bind 樹脂スラリー (EMD Biosciences))が各ウェルに加えられた。可溶性溶解物が、樹脂を含むフィルタープレートの対応するウェルに加えられ、排水の前に10分間の結合を可能とした。洗浄バッファ(12 mL 洗浄バッファ (リン酸ソーダ50 mM, NaCl 300 mM, イミダゾール30 mM, pH 8.0)) が、各ウェルに二回に分けて加えられ、それから排水された。最後に、アウトプットプレートが、フィルタベッド中のフィルタープレートの下に置かれ、IMAC 溶出バッファ(50 mM リン酸ソーダ, 300 mM NaCl, 500 mM イミダゾール) が、アウトプットプレートに排出させながら二回に分けて加えられた。アウトプットプレートは、その他の実験機器と共に保管カルーセルに戻された。実施計画において各CVBに対する処理が完了次第、装置が取り外された。

30

【 0 2 9 9 】

C.

Fab抗体の直交二次精製

PiccoloTM

による処理の後に生成した、ある程度純粋なFabフラグメントを更に高速で精製するため、精製の直交法が開発された。Fabフラグメントが発現し、PiccoloTM の装置を使って上記のように精製された。.

40

二つの異なった親和性樹脂が、軽鎖のクラスに応じて使用された。カッパ軽鎖を持つFabフラグメントがGタンパク質カラム(GE Healthcare)で更に精製され、ラムダ軽鎖を持つFabフラグメントはCaptureSelect Fabラムダ親和性カラム (BAC, Netherlands)で更に精製された。最初に、タンパク質試料がディープウェル96ウェルブロック(VWR)に移された。

Akta

精製器 (GE Healthcare) 及び A-905 オートサンプラー(GE Healthcare) をメーカー指定の手順で使用し、Fabフラグメント試料当り約1.8 mL のIMAC 溶出液が、1 mL のHi-Trap Gタンパク質カラム又は0.5 mL のCaptureSelect

50

Fabラムダ親和性カラムのいずれかにおいて、摂氏4度で精製された。タンパク質濃度は、Molecular

Dynamicプレートリーダーにおいて、A280での吸光度を計測することで測定され、対応するFabフラグメントの吸光係数から計算された。吸光係数は、Fab重鎖及び軽鎖の中の、チロシン+トリプトファン+フェニルアラニンの総数に基づいて計算された。PiccoloTMシステムを使った精製の後、発現したタンパク質は一般的に20%以下の純度だった。Gタンパク質を使った直交精製の後、Fabフラグメントの純度は、SDS-PAGEで示されているように95%以上だった。

【0300】

10

実施例3

生殖細胞系列セグメントから誘導された抗DLL4抗体の同定

生殖細胞系列から誘導された抗体が、実証例1及び2に記載したように作成、精製され、マルチスポット電気化学発光(ECL)結合アッセイを使ってDLL4への結合が検査された。ECL結合アッセイにおいて、生殖細胞系列から誘導されたFab抗体が、9個の異なる抗原への結合についてスクリーニングされ、これらの抗原には、ヒト上皮増殖因子受容体2(ErbB2)、上皮増殖因子受容体(EGF R)、肝細胞増殖因子受容体(HGF R/c-Met)、Notch-1、CD44、インスリン様成長因子-1受容体(IGF-1 sR)、P-カドヘリン、エリスロポエチン受容体(Epo R)及びデルタ様4タンパク質(DLL4)を含む。ECLアッセイにおいて抗原抗体反応が、ルテニウム-トリスビスピリジン-(4-メチルスルホン)(Ru(bpy)22+)で標識化された検出抗体を加えることで検出された。電流を与えると、Ru(bpy)22+-標識が共反応物の存在下で酸化還元サイクルを示して発光する。シグナルは、Ru(bpy)22+-標識が電極に接近し、洗浄の必要性がない時にだけ発生する。検出された光の強度は、捕獲されたタンパク質の量に比例する。タンパク質抗原を含まないプランクウェルに比べて4倍のシグナルを示すような、DLL4のECLシグナルを示す抗体が同定された。

20

【0301】

遺伝子組換えタンパク質が、(60

μg/mL抗原の)各々のタンパク質50ナノリッター(nl)を96-ウェルマルチスポット10ハイバインドプレート(Meso Scale Discovery;

30

Gaithersburg MD)の表面にスポットティングすることで、96-ウェルプレートの各ウェルに固定された。スポット10は、コントロール(対照)のため空のままであった。遺伝子組換えヒトタンパク質はR&D

Systemsから得られ、以下を含む:rHuman ErbB2/Fcキメラ、CF(Cat# 1129-ER); rHuman EGF R/Fcキメラ、CF

(Cat# 344-ER); rHuman HGF R/c-MET/Fcキメラ、CF(Cat#

358-MT/CF); rHuman Notch-1/Fcキメラ、CF(Cat# 3647-TK);

rHuman CD44/Fcキメラ、CF(Cat# 3660-CD); rHuman IGF-1

sR,(IGF-1 sR), CF(Cat# 391-GR); rHuman P-カドヘリン/Fcキメラ、CF(Cat# 861-PC)

; rHuman エリスロポエチンR/Fcキメラ、CF(Cat# 963-ER); 及び 遺伝子組換えヒトDLL4(Cat#

40

1506-D4/CF)。

【0302】

トリス緩衝生理食塩水トウイーン(Tris-buffered Saline Tween (TBST))中の1%ウシ血清アルブミン(Bovine Serum Albumin (BSA))の150μlアリコートが各ウェルに加えられ、次に摂氏20度で30分間インキュベートされた。引き続き、洗浄とタッピング乾燥により残留溶液を完全に除去した。続いて、12.5μlアリコートの1%BSA

TBSTが各ウェルに加えられ、次に12.5μlアリコートの精製Fabフラグメントが加えられた。このプレートはシールされ、振盪しながら摂氏20度で1時間インキュベートされた。

【0303】

50

メーカーの指示に従い、ヤギ抗ヒトカッパ軽鎖ポリクロナール抗体(K3502-1MG, Sigma-Aldrich) 及びヤギ抗ヒトラムダ軽鎖ポリクロナール抗体(L1645-1ML, Sigma-Aldrich)の両方を、ルテニウム(II) トリス-ビピリジン-(4-メチルスルホン)-N-ヒドロキシスクシンイミド(SULFO-TAG NHS-エステル, Meso Scale Discovery)と各々結合させることで、検出抗体が調製された。TAG-検出抗体25 μ l が各ウェルに加えられ、振盪しながら摂氏20度で1時間インキュベートされた。最後に、界面活性剤 (Cat # R92PC-1, Meso Scale Discovery) を加えた読み込みバッファ(Read Buffer P) 15 μ lが各ウェルに加えられた。電気化学発光は、Sector Imager 2400 (Meso Scale Discovery)を使って測定された。データは、抗原のECLシグナルを各プランクウェルと比較することで分析された。プランク値4又はそれ以上のシグナルは、“ヒット”Fabフラグメントと見なされた。 10

【0304】

以下の表11では、最初のECLスクリーンで“ヒット”と見なされたFabフラグメント（重鎖及び軽鎖を含む）

及び同定されたFab “ヒット”の標的を列記している。全てのFabフラグメントはDLL4と結合する。さらに、以下の表11に示されるように、いくつかのFabフラグメントは複数の標的に結合することが確認された。例えば、Fab

VH1-46_IGHD2-15*01_IGHJ2*01 及び L12_IGKJ1*01 はEGF R, Epo R 及び DLL4と結合し、Fab VH1-46_IGHD3-10*01_IGHJ4*01 及び

L12_IGKJ1*01は Notch-1, P-カドヘリン 及び DLL4と結合する。 20

【表11】

表11: 同定されたFAB “ヒット”

標的	重鎖	SEQ ID NO	軽鎖	SEQ ID NO
rHuman DLL4	VH1-46_IGHD6-6*01_IGHJ1*01	131	L6_IGKJ1*01	141
rHuman DLL4	VH5-51_IGHD5-18*01>3_IGHJ4*01	132	V3-4_IGLJ1*01	142
rHuman DLL4	VH6-1_IGHD3-3*01_IGHJ4*01	133	V4-3_IGLJ4*01	143
EGF R/Fc キメラ, Notch-1/Fc キメラ, P-カドヘリン/Fc キメラ, Epo R/Fc キメラ及び rHuman DLL4	VH1-46_IGHD6-13*01_IGHJ4*01	135	L2_IGKJ1*01	145
rHuman DLL4	VH4-34_IGHD7-27*01_IGHJ4*01	137	L5_IGKJ1*01	146
Notch-1/Fc キメラ, P-カドヘリン/Fc キメラ, Epo R/Fc キメラ及び rHuman DLL4	VH1-46_IGHD6-13*01_IGHJ4*01	135	A27_IGKJ1*01	144
rHuman DLL4	VH1-3_IGHD4-23*01_IGHJ4*01	138	L12_IGKJ1*01	147
EGF R/Fc キメラ, Epo R/Fc キメラ及び rHuman DLL4	VH1-46_IGHD2-15*01_IGHJ2*01	136	L12_IGKJ1*01	147
Notch-1/Fc キメラ, P-カドヘリン/Fc キメラ及び rHuman DLL4	VH1-46_IGHD3-10*01_IGHJ4*01	134	L12_IGKJ1*01	147
rHuman DLL4	VH1-8_IGHD2-2*01_IGHJ6*01	139	L12_IGKJ1*01	147
Epo R/Fc キメラ及び rHuman DLL4	VH1-46_IGHD6-13*01_IGHJ4*01	135	O1_IGKJ1*01	148
rHuman DLL4	VH4-34_IGHD7-27*01_IGHJ4*01	137	V1-4_IGLJ4*01	149
rHuman DLL4	VH4-31_IGHD2-15*01_IGHJ2*01	140	V1-4_IGLJ4*01	149
rHuman DLL4	VH4-34_IGHD7-27*01_IGHJ4*01	137	V4-6_IGLJ4*01	150

【0305】

10

20

30

40

50

最初のマルチスポットECLスクリーニングによる“ヒット”を確認するため、Fabフラグメント濃度に依存した滴定が行われ、Fab-抗原結合親和性が測定された。マルチスポットECLアッセイの手順は、以下の諸表で示されるように、Fab抗体の濃度が検査された各々のFab毎にウェル間で0.1 nM から

2.4 μ M の範囲で変更されたこと以外については、前述したものと同じである。このデータは、以下の表12-25に記載されている。

【表12】

表12. Fab VH1-46_IGHD6-6*01_IGHJ1*01 & L6_IGKJ1*01の結合親和性								
Fab[nM]	2383	595.8	148.9	37.2	9.3	2.3	0.6	0.1
ErbB2/Fc	454	321	247	384	354	291	215	306
EGF R/Fc	621	403	290	228	424	289	309	311
HGF R/Fc	762	353	205	207	324	253	256	286
Notch-1/Fc	690	306	375	402	492	333	337	378
CD44/Fc	559	372	348	356	396	317	238	323
IGF-1 sR	527	335	322	295	315	231	313	241
P-Cadherin/Fc	728	617	687	649	452	401	321	235
EPO R/Fc	658	378	373	315	306	429	337	373
DLL4	11794	17203	16253	16717	13210	3055	508	317
Blank	344	285	218	199	287	234	226	201

10

20

【表13】

表13. Fab VH5-51_IGHD5-18*01>3_IGHJ4*01 & V3-4_IGLJ1*01の結合親和性				
Fab[nM]	154	51	17	6
ErbB2/Fc	1593	1248	1033	873
EGF R/Fc	1398	816	805	742
HGF R/Fc	1520	1044	914	831
Notch-1/Fc	929	685	558	464
CD44/Fc	960	651	518	547
IGF-1 sR	1396	1051	872	854
P-Cadherin/Fc	1733	854	542	358
EPO R/Fc	1195	750	620	548
DLL4	40392	17025	7158	1946
Blank	447	335	143	191

30

【表14】

表14. Fab VH6-1_IGHD3-3*01_IGHJ4*01 & V4-3_IGLJ4*01の結合親和性								
Fab[nM]	480	240	120	60	30	15	7.5	3.8
ErbB2/Fc	965	833	822	777	726	713	695	714
EGF R/Fc	877	690	658	679	585	584	582	511
HGF R/Fc	951	834	785	623	640	694	558	519
Notch-1/Fc	545	368	472	415	425	508	392	383
CD44/Fc	541	470	442	434	484	454	444	419
IGF-1 sR	741	625	813	654	697	705	642	463
P-Cadherin/Fc	596	383	450	372	440	351	352	281
EPO R/Fc	621	478	431	423	325	397	443	407
DLL4	1532	1273	938	875	736	690	598	462
Blank	362	316	363	237	213	261	217	198

40

【表15】

表 15. Fab VH1-46_IGHD6-13*01_IGHJ4*01 & L2_IGKJ1*01 の結合親和性				
Fab[μ M]	1.19	0.2975	0.07438	0.01859
ErbB2/Fc	38410	15111	7551	5531
EGF R/Fc	62454	42213	16605	11750
HGF R/Fc	45494	17396	6611	4566
Notch-1/Fc	72018	37503	21990	17565
CD44/Fc	47145	28601	10922	7322
IGF-1 sR	35187	17389	5804	3779
P-Cadherin/Fc	69710	26043	14807	11672
EPO R/Fc	192967	167064	153692	188065
DLL4	74900	34726	20719	18888
Blank	24999	5019	2504	1776

10

【表16】

表 16. Fab VH4-34_IGHD7-27*01_IGHJ4*01 & L5_IGKJ1*01 の結合親和性				
Fab[μ M]	0.51	0.1275	0.03188	0.00797
ErbB2/Fc	1532	857	584	493
EGF R/Fc	2363	1061	694	530
HGF R/Fc	1989	853	693	419
Notch-1/Fc	2773	1497	849	654
CD44/Fc	2012	926	653	490
IGF-1 sR	2236	1045	765	564
P-Cadherin/Fc	2389	957	775	502
EPO R/Fc	2624	1067	789	566
DLL4	5183	2382	1282	872
Blank	1096	530	536	364

20

【表17】

表 17. Fab VH1-46_IGHD6-13*01_IGHJ4*01 & A27_IGKJ1*01 の結合親和性			
Fab[μ M]	0.48	0.096	0.0192
ErbB2/Fc	11287	3365	2313
EGF R/Fc	14638	4509	3115
HGF R/Fc	8002	2328	1582
Notch-1/Fc	15931	4802	3041
CD44/Fc	13445	4320	2915
IGF-1 sR	8927	2449	1826
P-Cadherin/Fc	15595	6654	5040
EPO R/Fc	70938	57356	62037
DLL4	16065	5586	3555
Blank	2945	917	751

30

40

【表18】

表 18. Fab VH1-3_IGHD4-23*01_IGHJ4*01 & L12_IGKJ1*01 の結合親和性				
Fab[nM]	60	15	3.75	0.9375
ErbB2/Fc	2155	740	291	268
EGF R/Fc	2563	842	371	224
HGF R/Fc	2298	743	394	243
Notch-1/Fc	2886	1058	375	348
CD44/Fc	2355	748	307	251
IGF-1 sR	2666	859	314	204
P-Cadherin/Fc	2662	837	331	191
EPO R/Fc	3214	970	358	238
DLL4	17270	7728	1569	453
Blank	1433	536	191	153

10

【表19】

表 19. Fab VH1-46_IGHD2-15*01_IGHJ2*01 & L12_IGKJ1*01 の結合親和性				
Fab[nM]	280	70	17.5	4.375
ErbB2/Fc	3953	1358	541	384
EGF R/Fc	6667	2574	1305	542
HGF R/Fc	3564	1289	565	193
Notch-1/Fc	4382	1492	680	480
CD44/Fc	4069	1370	664	424
IGF-1 sR	3533	1319	626	369
P-Cadherin/Fc	5400	1817	949	469
EPO R/Fc	8496	2485	1262	594
DLL4	8111	2747	1219	558
Blank	1691	635	304	305

20

【表20】

表 20. Fab VH1-46_IGHD3-10*01_IGHJ4*01 & L12_IGKJ1*01 の結合親和性				
Fab[nM]	920	230	57.5	14.375
ErbB2/Fc	10924	4078	2447	1594
EGF R/Fc	13406	5723	3858	2672
HGF R/Fc	10708	3934	2297	1600
Notch-1/Fc	20086	9737	5886	4206
CD44/Fc	9698	3817	2313	1488
IGF-1 sR	10246	4764	2833	1746
P-Cadherin/Fc	16666	6484	4110	2318
EPO R/Fc	16429	6949	4038	2718
DLL4	73638	119436	144126	125422
Blank	4082	1656	954	738

30

40

【表 2 1】

表 21. Fab VH1-8_IGHD2-2*01_IGHJ6*01 & L12_IGKJ1*01 の結合親和性				
Fab[nM]	130	32.5	8.1	2.0
ErbB2/Fc	1533	556	557	382
EGF R/Fc	1746	645	560	424
HGF R/Fc	1882	525	551	356
Notch-1/Fc	1759	706	612	539
CD44/Fc	1754	573	528	447
IGF-1 sR	1973	561	518	367
P-Cadherin/Fc	1845	556	573	250
EPO R/Fc	2151	673	660	433
DLL4	7738	2989	1548	605
Blank	1153	473	435	316

10

【表 2 2】

表 22. Fab VH1-46_IGHD6-13*01_IGHJ4*01 & O1_IGKJ1*01 の結合親和性				
Fab[nM]	930	232.5	58.1	14.5
ErbB2/Fc	2225	779	322	274
EGF R/Fc	3110	803	444	357
HGF R/Fc	2344	790	432	373
Notch-1/Fc	2206	778	388	317
CD44/Fc	1917	607	375	212
IGF-1 sR	1915	569	343	234
P-Cadherin/Fc	2438	655	478	277
EPO R/Fc	3009	1472	829	660
DLL4	8162	3586	1876	1149
Blank	1206	460	225	117

20

【表 2 3】

表 23. Fab VH4-34_IGHD7-27*01_IGHJ4*01 & V1-4_IGLJ4*01 の結合親和性				
Fab[nM]	580	145	36.3	9.1
ErbB2/Fc	1712	1123	1029	987
EGF R/Fc	1631	856	831	800
HGF R/Fc	2341	1173	1065	894
Notch-1/Fc	1585	860	633	754
CD44/Fc	1228	692	629	607
IGF-1 sR	1364	794	799	788
P-Cadherin/Fc	2240	850	684	589
EPO R/Fc	1579	845	722	697
DLL4	4420	2140	1399	1030
Blank	679	357	314	276

30

40

【表24】

表 24. Fab VH4-31_IGHD2-15*01_IGHJ2*01 & V1-4_IGLJ4*01 の結合親和性				
Fab[nM]	210	52.5	13.1	3.3
ErbB2/Fc	1977	1511	930	1031
EGF R/Fc	1617	1109	824	847
HGF R/Fc	2060	1286	981	849
Notch-1/Fc	1972	1323	669	726
CD44/Fc	1395	897	708	621
IGF-1 sR	1431	911	814	743
P-Cadherin/Fc	4410	2161	1062	678
EPO R/Fc	2123	1319	776	695
DLL4	4108	1951	1107	922
Blank	833	467	376	359

10

【表25】

表 25. Fab VH4-34_IGHD7-27*01_IGHJ4*01 & V4-6_IGLJ4*01 の結合親和性				
Fab[nM]	340	170	85.0	42.5
ErbB2/Fc	1226	964	844	866
EGF R/Fc	1208	826	1001	528
HGF R/Fc	1238	757	998	607
Notch-1/Fc	1209	816	780	649
CD44/Fc	959	660	693	522
IGF-1 sR	1042	832	891	646
P-Cadherin/Fc	1160	744	709	421
EPO R/Fc	1255	790	817	494
DLL4	2332	1462	1311	877
Blank	554	262	292	162

20

【0306】

30

実施例4

生殖細胞系列改変型抗DLL4

抗体

生殖細胞系列セグメントに由来する抗DLL4抗体が、生殖細胞系列改変型抗DLL4抗体を作成するために使われた。米国仮出願番号第[ニックネーム3800016-00004/ p702]に記載されているように、改変は生殖細胞系列に由来する抗DLL4抗体のVH鎖及び/又はVL鎖において行われ、本明細書で参照することにより組み込まれている。

A. ヒットなしのアラインメント及びアラニン-スキヤニング突然変異誘発

簡潔には、DLL4との結合によって“ヒット”と見なされた生殖細胞系列由来抗体の重鎖及び/又は軽鎖のアミノ酸配列が、DLL4に関して“ノーヒット”と見なされた生殖細胞系列由来抗体の重鎖及び/又は軽鎖のアミノ酸配列と比較された。“ヒット”と“ノーヒット”で異なるアミノ酸残基を含む抗体の領域が、アラニン-スキヤニング突然変異誘発に付された。アラニン変異体は、親重鎖又は親軽鎖DNAを鑄型として使ってPCRをオーバーラップさせることで生成された。標的コドンにおいて望まれる突然変異を特異的に生成する順方向及び逆方向プライマーが、適合するプラスミド中の親DNAを増幅するために使われた。PCRの初回ラウンドで、異なったプライマー対に対する二つの別個のPCR反応が、遺伝子の二つのセグメントを増幅するために使われた。一番目の反応は、EcoRI

順方向プライマーを持つ特異的逆方向プライマーを使い、遺伝子の前半分を増幅した。二番目の反応は、FLXhol 逆方向プライマーを持つ特異的順方向プライマーを使い、遺伝子の後半分を増幅した。

40

50

遺伝子セグメントがPCRを20サイクル使って生成されたが、条件は以下のとおりである： 摂氏94度で30秒、摂氏50度で30秒、及び摂氏72度で90秒。 PCR生成物は、1% アガロースゲルから分離、精製され、PCRの二回目ラウンド用の鋳型として混合された。PCRの二回目ラウンドにおいて、EcoRI順方向及びFLXhol逆方向プライマーが、完全長遺伝子生成物を増幅するために使われた。この遺伝子生成物は、PCRを20サイクル使って生成されたが、条件は以下のとおりである：摂氏94度で30秒；摂氏55度で30秒；及び摂氏72度で90秒。

【0307】

PCR生成物が分離され、続いてEcoRI 及び Xhol (New England Biolabs)で消化され、同様に消化されたプラスミドに搭載された。大腸菌 (E. coli) DH5 中のライゲーション生成物の形質転換とプレーティングの後、個々のコロニーが選択され、カナマイシン50 μg/ml 及び 0.4 % グルコースが追加されたTerrific Broth (EMD, San Diego, CA) 1.5 ml を含む96ウェルプロック中で一晩、摂氏37度で増殖された。DNAは、ミニプレップキット (Qiagen)を使って分離され、DNA配列シークエンシングによりアラニン突然変異が確認された。

例として、表26に変異体VH5-51_IGHD5-18*01>3_IGHJ4*01

R99A 及び VH1-46_IGHD6-6*01_IGHJ1*01 E100Aを生成するために使ったプライマー対を記載する。プライマーR99A_F 及びR99A_R が、アラニン突然変異に対するR99を特異的に増幅するために利用された。プライマー E100A_F 及び E100A_R が、アラニン突然変異に対するE100を特異的に増幅するために利用された。プライマー EcoRI_F 及び FLXhol_R が遺伝子の残りのセグメントを増幅するために利用された。

【表26】

表 26. アラニンスキャニング突然変異誘発用のプライマー対の例		
プライマー	配列	SEQ ID NO
VH5-51_IGHD5-18*01>3_IGHJ4*01		
R99A_F	GCCATGTATTACTGTGGAGAGCCGGATACAGCTATGGTTACGAC	1
R99A_R	GTCGTAACCATAGCTGTATCCGGTCTCGCACAGTAATAACATGGC	2
VH1-46_IGHD6-6*01_IGHJ1*01		
E100A_F	GTGTATTACTGTGGAGAGAGGCCTATAGCAGCTCGTCGGCTG	3
E100A_R	CAGCGGACCGAGCTGCTATAGGCCCTCTCGCACAGTAATAACAC	4
Plasmid A 及び D		
EcoRI_F	ttgggcgaattccctagataattaattaggagg	5
FLXhol_R	TTAACCTCGAGCCGGTTATCAAAG	6

【0308】

B. オーバーラッピングPCRによるNNK 突然変異誘発

アラニンスキャニング突然変異誘発に続いて、上記の実施例3に記載されているように、発現したFab抗体のDLL4に対する結合がECLアッセイを使って検査された。VH鎖及び/又はVL鎖においてDLL4に対する結合に影響を与えない又は増幅させない改変を含むFab抗体が、更なる突然変異誘発に付された。アラニンスキャニング突然変異誘発で述べたように、目的とするNNK突然変異を生成する初期プライマーを用いて、オーバーラッピングPCRによるNNK 突然変異誘発が実施された。ゆえに、PCRの最初のラウンドにおいて、標的コドンがNNK (順方向) 及び MNN (逆方向)で置換されている特異的なプライマー対が使われた。例えば、以下の表 27 では、変異体VH5-51_IGHD5-18*01>3_IGHJ4*01 G100 NNK 及び変異体VH1-46_IGHD6-6*01_IGHJ1*01 S102 NNK を作成するために使われた順方向及び逆方向プライマーを記載している。

【0309】

アミノ酸置換を同定するために、個々のクローンがDNAシークエンシング(BATJ, Inc., San Diego, CAによる)に付された。NNH突然変異反応毎に選ばれたコロニーの数に応じて突然変異率は変化し、突然変異当り、少ない場合で4から5、多い場合で18から19のアミノ酸

10

20

30

40

50

変化が測定された。

【表27】

表27. NNK 突然変異誘発用プライマー対の例

プライマー	配列	SEQ ID NO
VH5-51_IGHD5-18*01>3_IGHJ4*01		
G100_NNK_F	GTATTACTGTGGAGACGTNNKTACAGCTATGGTTACGAC	7
G100_NNK_R	GTCGTAACCATAGCTGTAMNNACGTCTCCACAGTAATAC	8
VH1-46_IGHD6-6*01_IGHJ1*01		
S102_NNK_F	TGGGAGAGAGGGTATNNKACCGAGCTGGTACGACT	9
S102_NNK_R	AGTCGTACCAAGCTGCTNNATACCCCTCTCGCA	10

10

20

30

40

50

【0310】

C.

カセット突然変異誘発

VH鎖及び/又はhVL鎖におけるDLL4への結合を最適化する改変の同定に続いて、特定の組合わせの突然変異体を作成するために、カセット突然変異誘発が使われた。簡潔には、クローニング部位を含むよう前もって改変されたプラスミドに、特異的合成CDR1, CDR2及び/又はCDR3

配列をクローニングすることによって、Fab突然変異がハイスループット方式で生成された。詳細には、各重鎖又は軽鎖に対して、各CDR領域の5'及び3'末端の両方にBsaI制限部位が組み込まれたベクターが3個ずつ生成された。Fab突然変異を生成するために、特異的突然変異を持つCDRをコードしている順方向及び逆方向プライマーと、追加的にBsaIオーバーラップ末端が合成され、アニーリングされた。これらのカセット又は突然変異したCDR領域は、次に、対応するBsaI消化済ベクターに組み込まれ、これによって特異的に改変されたCDR領域を含むプラスミドが生成された。

例えば、特異的プライマーが合成され (IDT, 以下の表28を参照)、生殖細胞系列に由来する重鎖VH1-46_IGHD6-6*01_IGHJ1*01 とVH5-51_IGHD5-18*01>3_IGHJ4*01及び、軽鎖 L6_IGKJ1*01 とV3-4_IGLJ1*01の各々に3個のベクターを作成し、1個のBsaI部位をCDR1, CDR2及び CDR3の先頭と末端に組み込むために使われた。これらのベクターは、前述したように、PCRの一回目ラウンドでの特異的順方向及び逆方向プライマーと、鑄型としての親重鎖又は親軽鎖DNAを使って作成された。個々のクローンは、2個のBsaI部位の各CDRへの組み込みを確認するため、DNAスクリーニング(BATJ, Inc., San Diego, CAによる)に付された。

【0311】

続いて、プラスミドを含む各BsaIがBsaI (New England Biolabs) で消化され、DNAがゲル精製された。特異的プライマーが、目的とする突然変異体を作成するために合成された(IDT)。簡潔には、順方向及び逆方向プライマー各々1 μl が、TE で摂氏95度まで二分間加熱することでアニーリングされ、続いて室温まで徐冷された。アニーリングされたプライマー1 μl が、次に2 ng のBsaI消化済ベクターと結合して大腸菌 (E. coli) DH5a 細胞へと形質転換された。突然変異は、DNAシークエンシングによって確認された。

ライゲーション反応は、ハイスループットの突然変異誘発を可能とする96ウェルプレートにおいて実施することができる。

例えば、以下の表 28-29 は、表30の実施例5に記載されている突然変異体VH1-46_IGHD6-6*01_IGHJ1*01_APFF

CDR2 を生成するプライマーを記載している。

【表 28】

表 28. BsaI 制限酵素突然変異誘発プライマー		SEQ ID NO
プライマー	配列	
VH1-46_C_DR1_F	gagacctactatggtcgggtctctgggtgcacaggcc	11
VH1-46_C_DR2_F	gagacctactatggtcgggtctcaagttccaggcagagtac	12
VH1-46_C_DR3_F	gagacctactatggtcgggtctctgggcaggc	13
VH5-51_C_DR1_F	gagacctactatggtcgggtctctgggtgcaggatgc	14
VH5-51_C_DR2_F	gagacctactatggtcgggtctccaggcaccatctcagccg	15
VH5-51_C_DR3_F	gagacctactatggtcgggtctctgggcaggaa	16
L6_CDR1_F	gagacctactatggtcgggtctctgggtaccaacagaaacctggc	17
L6_CDR2_F	gagacctactatggtcgggtctccggatccaggcagg	18
L6_CDR3_F	gagacctactatggtcgggtcttcggcaaggacca	19
V3-4_CDR1_F	gagacctactatggtcgggtctctggtaccacagaccca	20
V3-4_CDR2_F	gagacctactatggtcgggtctcgggtccctgatcgcttc	21
V3-4_CDR3_F	gagacctactatggtcgggtcttcggactggaccaag	22
Lambda_BSA_F	gagtggagacgaccacaccc	23
VH1-46_C_DR1_R	GAGACCGGAACCATAGTAGGTCTCAGATGCCCTGGCAAGAAC	24
VH1-46_C_DR2_R	GAGACCGGAACCATAGTAGGTCTCTCCCATCCACTCAAGGCC	25
VH1-46_C_DR3_R	GAGACCGGAACCATAGTAGGTCTCTCGACAGTAATACACGCC	26
VH5-51_C_DR1_R	GAGACCGGAACCATAGTAGGTCTCAGAACCTTACAGGAGATCTICA	27
VH5-51_C_DR2_R	GAGACCGGAACCATAGTAGGTCTCTCCACACTCCAGC	28
VH5-51_C_DR3_R	GAGACCGGAACCATAGTAGGTCTCTCCACAGTAATACATGGC	29
L6_CDR1_R	GAGACCGGAACCATAGTAGGTCTCTCCAGGAGAGGGTGGCTC	30
L6_CDR2_R	GAGACCGGAACCATAGTAGGTCTCATAGATGAGGAGGCTGGAG	31
L6_CDR3_R	GAGACCGGAACCATAGTAGGTCTCACAGTAATAACTGCAAAATCTCAG	32
V3-4_CDR1_R	GAGACCGGAACCATAGTAGGTCTCACAGTGAGTGTGACTGTCCT	33
V3-4_CDR2_R	GAGACCGGAACCATAGTAGGTCTCTGAGATGAGCTGGTGG	34
V3-4_CDR3_R	GAGACCGGAACCATAGTAGGTCTCACAGTAATAATCAGATTCATCATCTGC	35

10

20

【表 29 - 1】

表 29. VH1-46IGHD6-6*01IGHJ1*01APFF_CDR2 BsaI 突然変異誘発プライマー		
プライマー	配列	SEQ ID NO
A_ILPTH_F	tggaaataattccctactggcatagcacaagctacgcacaga	36
A_VLPTH_F	tggaaatgtctccctactggcatagcacaagctacgcacaga	37
A_ALPTH_F	tggaaatgtctccctactggcatagcacaagctacgcacaga	38
A_GLPPTH_F	tggaaatggccctccctactggcatagcacaagctacgcacaga	39
A_TLPPTH_F	tggaaataaccctccctactggcatagcacaagctacgcacaga	40
A_SLPPTH_F	tggaaatatccctccctactggcatagcacaagctacgcacaga	41
A_YLPPTH_F	tggaaatataccctccctactggcatagcacaagctacgcacaga	42
A_WLPTH_F	tggaaatatggccctccctactggcatagcacaagctacgcacaga	43
A_HLPTH_F	tggaaataccctccctactggcatagcacaagctacgcacaga	44
A_RLPTH_F	tggaaataccctccctactggcatagcacaagctacgcacaga	45
A_ELPPTH_F	tggaaatagaactccctactggcatagcacaagctacgcacaga	46
A_NLPTH_F	tggaaataaccctccctactggcatagcacaagctacgcacaga	47
A_TLVPTH_F	tggaaataaccctcgactgtgtcatagcacaagctacgcacaga	48
A_TLATH_F	tggaaataaccctcgactgtgtcatagcacaagctacgcacaga	49
A_TLGTH_F	tggaaataaccctcgactgtgtcatagcacaagctacgcacaga	50
A_TLTTH_F	tggaaataaccctcaccactgtgtcatagcacaagctacgcacaga	51
A_TLSFH_F	tggaaataaccctcicccactgtgtcatagcacaagctacgcacaga	52
A_TLYTH_F	tggaaataaccctctactgtgtcatagcacaagctacgcacaga	53
A_TLWTH_F	tggaaataaccctctggactgtgtcatagcacaagctacgcacaga	54
A_TLHTH_F	tggaaataaccctccacactgtgtcatagcacaagctacgcacaga	55
A_TLKTH_F	tggaaataaccctccggactgtgtcatagcacaagctacgcacaga	56
A_TLETH_F	tggaaataaccctcgaaactgtgtcatagcacaagctacgcacaga	57
A_TLNTH_F	tggaaataaccctcgccactgtgtcatagcacaagctacgcacaga	58
A_TLMTH_F	tggaaataaccctcatgtgtgtcatagcacaagctacgcacaga	59
A_ILPTH_R	AACTCTGTGGCTAGCTTGTGCTATGACCACTAGGGAGAATTATT	60
A_VLPTH_R	AACTCTGTGGCTAGCTTGTGCTATGACCACTAGGGAGGACTATT	61
A_ALPTH_R	AACTCTGTGGCTAGCTTGTGCTATGACCACTAGGGAGACTATT	62
A_GLPPTH_R	AACTCTGTGCCCTAGCTTGTGCTATGACCACTAGGGAGGCTATT	63
A_TLPPTH_R	AACTCTGTGGCTAGCTTGTGCTATGACCACTAGGGAGGGTATT	64
A_SLPPTH_R	AACTCTGTGGCTAGCTTGTGCTATGACCACTAGGGAGGGTATT	65
A_YLPPTH_R	AACTCTGTGGCTAGCTTGTGCTATGACCACTAGGGAGGGTATT	66
A_WLPTH_R	AACTCTGTGGCTAGCTTGTGCTATGACCACTAGGGAGCCATTATT	67

10

20

30

【表 29 - 2】

A_HLPTH_R	AACTCTGTGGCTAGCTTGTGCTATGACCACTAGGGAGGTATT	68
A_RLPTH_R	AACTCTGTGGCTAGCTTGTGCTATGACCACTAGGGAGGCTATT	69
A_ELPPTH_R	AACTCTGTGGCTAGCTTGTGCTATGACCACTAGGGAGGTCTATT	70
A_NLPTH_R	AACTCTGTGGCTAGCTTGTGCTATGACCACTAGGGAGGTTATT	71
A_TLVPTH_R	AACTCTGTGGCTAGCTTGTGCTATGACCACTAGGGAGGGTTATT	72
A_TLATH_R	AACTCTGTGGCTAGCTTGTGCTATGACCACTAGGGAGGGTTATT	73
A_TLGTH_R	AACTCTGTGGCTAGCTTGTGCTATGACCACTGCCCAGGGTTATT	74
A_TLTTH_R	AACTCTGTGGCTAGCTTGTGCTATGACCACTGGAGGGTTATT	75
A_TLSFH_R	AACTCTGTGCCCTAGCTTGTGCTATGACCACTGGAGGGTTATT	76
A_TLYTH_R	AACTCTGTGGCTAGCTTGTGCTATGACCACTGTAGGGAGGGTTATT	77
A_TLWTH_R	AACTCTGTGGCTAGCTTGTGCTATGACCACTGCCAGAGGGTTATT	78
A_TLHTH_R	AACTCTGTGGCTAGCTTGTGCTATGACCACTGTGGAGGGTTATT	79
A_TLKTH_R	AACTCTGTGGCTAGCTTGTGCTATGACCACTGGGAGGGTTATT	80
A_TLETH_R	AACTCTGTGGCTAGCTTGTGCTATGACCACTTTCGAGGGTTATT	81
A_TLNTH_R	AACTCTGTGGCTAGCTTGTGCTATGACCACTGCCAGAGGGTTATT	82
A_TLMTH_R	AACTCTGTGGCTAGCTTGTGCTATGACCACTCATGAGGGTTATT	83

40

【0312】

実施例 5

生殖細胞系列改变型抗DLL4 抗体

表30は、VH鎖生殖細胞系列セグメントVH1-46_IGHD6-6*01_IGHJ1*01 及び VL鎖生殖細胞系列セグメントL6_IGKJ1*01でコードされた 親抗DLL4 抗体に由来する生殖細胞系列改变型抗DLL4 抗体を記載している。表31は、VH鎖生殖細胞系列セグメントVH5-51_IGHD5-18*

50

01>3_IGHJ4*01

及び VL 鎖生殖細胞系列セグメントV3-4_IGLJ1*01でコードされた 親抗DLL4 抗体に由来する生殖細胞系列改変型抗DLL4 抗体を記載している。アミノ酸突然変異は、野生型親抗体におけるアミノ酸の位置にしたがって番号が付された。各重鎖及び軽鎖のアミノ酸配列に対応する配列 ID NO が提供されている。

【表 30 - 1】

表 30. VH1-46_IGHD6-6*01_IGHJ1*01 及び L6_IGKJ1*01 DLL4 抗体		重鎖	SEQ ID NO	軽鎖 L6_IGKJ1*01	SEQ ID NO
	ニックネーム	VH1-46_IGHD6-6*01_IGHJ1*01			
1		wildtype	131	wildtype	141
2	H:S104F & L:wt	S104F	151	wildtype	141
3	H:S104A & L:wt	S104A	152	wildtype	141
4	H:S103P & L:wt	S103P	153	wildtype	141
5	H:S102A & L:wt	S102A	154	wildtype	141
6	H:APF & L:wt	S102A/S103P/S104F	155	wildtype	141
7	H:APFF & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F	156	wildtype	141
8	H:APFY & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111Y	157	wildtype	141
9	H:APYY & L:wt	S102A/S103P/S104Y/H111Y	158	wildtype	141
10	H:APF & L:wt	S102A/S103P/S104F	155	S28P	264
11	H:APF & L:wt	S102A/S103P/S104F	155	S30N	265
12	H:APF & L:wt	S102A/S103P/S104F	155	S31K	266
13	H:E100A & L:wt	E100A	159	wildtype	141
14	H:Y101A & L:wt	Y101A	160	wildtype	141
15	H:S103A & L:wt	S103A	161	wildtype	141
16	H:S105A & L:wt	S105A	162	wildtype	141
17	H:E107A & L:wt	E107A	163	wildtype	141
18	H:Q110A & L:wt	Q110A	164	wildtype	141
19	H:H111A & L:wt	H111A	165	wildtype	141
20	H:S102Q & L:wt	S102Q	166	wildtype	141
21	H:S102V & L:wt	S102V	167	wildtype	141
22	H:S102I & L:wt	S102I	168	wildtype	141
23	H:S102G & L:wt	S102G	169	wildtype	141
24	H:S103L & L:wt	S103L	170	wildtype	141
25	H:S103W & L:wt	S103W	171	wildtype	141
26	H:S103F & L:wt	S103F	172	wildtype	141
27	H:S103N & L:wt	S103N	173	wildtype	141
28	H:S103H & L:wt	S103H	174	wildtype	141
29	H:S103C & L:wt	S103C	175	wildtype	141
30	H:S103G & L:wt	S103G	176	wildtype	141
31	H:S104G & L:wt	S104G	177	wildtype	141
32	H:S104C & L:wt	S104C	178	wildtype	141
33	H:S104H & L:wt	S104H	179	wildtype	141
34	H:S104L & L:wt	S104L	180	wildtype	141
35	H:S104R & L:wt	S104R	181	wildtype	141
36	H:APF G55W & L:wt	S102A/S103P/S104F G55W	182	wildtype	141
37	H:APF G55D & L:wt	S102A/S103P/S104F G55D	183	wildtype	141
38	H:APF A106E & L:wt	S102A/S103P/S104F A106E	184	wildtype	141
39	H:APF H111S & L:wt	S102A/S103P/S104F H111S	185	wildtype	141

10

20

30

【表 3 0 - 2】

40	H:APFF T28A & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F T28A	186	wildtype	141
41	H:APFF F29A & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F F29A	187	wildtype	141
42	H:APFF T30A & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F T30A	188	wildtype	141
43	H:APFF S31A & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F S31A	189	wildtype	141
44	H:APFF Y33A & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F Y33A	190	wildtype	141
45	H:APFF I50A & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F I50A	191	wildtype	141
46	H:APFF I51A & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F I51A	192	wildtype	141
47	H:APFF N52A & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F N52A	193	wildtype	141
48	H:APFF P53A & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F P53A	194	wildtype	141
49	H:APFF S54A & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F S54A	195	wildtype	141
50	H:APFF G55A & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F G55A	196	wildtype	141
51	H:APFF G56A & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F G56A	197	wildtype	141
52	H:APFF S57A & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F S57A	198	wildtype	141
53	H:APFF T58A & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F T58A	199	wildtype	141
54	H:APFF S59A & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F S59A	200	wildtype	141
55	H:APFF TV & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F I51T/N52V	201	wildtype	141
56	H:APFF N52G & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F N52G	202	wildtype	141
57	H:APFF N52T & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F N52T	203	wildtype	141
58	H:APFF N52P & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F N52P	204	wildtype	141
59	H:APFF N52L & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F N52L	205	wildtype	141
60	H:APFF N52W & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F N52W	206	wildtype	141
61	H:APFF N52Y & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F N52Y	207	wildtype	141

10

20

【表 3 0 - 3】

62	H:APFF N52V & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F N52V	208	wildtype	141
63	H:APFF N52S & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F N52S	209	wildtype	141
64	H:APFF N52Q & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F N52Q	210	wildtype	141
65	H:APFF N52K & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F N52K	211	wildtype	141
66	H:APFF G56V & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F G56V	212	wildtype	141
67	H:APFF G56E & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F G56E	213	wildtype	141
68	H:APFF G56S & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F G56S	214	wildtype	141
69	H:APFF G56K & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F G56K	215	wildtype	141
70	H:APFF G56T & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F G56T	216	wildtype	141
71	H:APFF G56L & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F G56L	217	wildtype	141
72	H:APFF G56R & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F G56R	218	wildtype	141
73	H:APFF G56H & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F G56H	219	wildtype	141
74	H:APFF G56I & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F G56I	220	wildtype	141
75	H:APFF G56W & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F G56W	221	wildtype	141
76	H:APFF S54I & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F S54I	222	wildtype	141
77	H:APFF S54E & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F S54E	223	wildtype	141
78	H:APFF S54R & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F S54R	224	wildtype	141
79	H:APFF S54G & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F S54G	225	wildtype	141
80	H:APFF S54T & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F S54T	226	wildtype	141
81	H:APFF S54L & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F S54L	227	wildtype	141
82	H:APFF S54V & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F S54V	228	wildtype	141
83	H:APFF S54N & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F S54N	229	wildtype	141

10

20

【表 3 0 - 4】

84	H:APFF S54P & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F S54P	230	wildtype	141
85	H:APFF TP & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F I50T/S54P	231	wildtype	141
86	H:APFF AN & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F S54A/S59N	232	wildtype	141
87	H:APFF LTH & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F N52L/S54T/G56H	233	wildtype	141
88	H:APFF ALTH & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F I51A/N52L/S54T/G56H	234	wildtype	141
89	H:APFF TLTH & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F I51T/N52L/S54T/G56H	235	wildtype	141
90	H:APFF YLTH & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F I51Y/N52L/S54T/G56H	236	wildtype	141
91	H:APFF HLTH & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F I51H/N52L/S54T/G56H	237	wildtype	141
92	H:APFF ELTH & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F I51E/N52L/S54T/G56H	238	wildtype	141
93	H:APFF VLTH & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F I51V/N52L/S54T/G56H	239	wildtype	141
94	H:APFF GLTH & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F I51G/N52L/S54T/G56H	240	wildtype	141
95	H:APFF SLTH & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F I51S/N52L/S54T/G56H	241	wildtype	141
96	H:APFF WLTH & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F I51W/N52L/S54T/G56H	242	wildtype	141
97	H:APFF RLTH & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F I51R/N52L/S54T/G56H	243	wildtype	141
98	H:APFF NLTH & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F I51N/N52L/S54T/G56H	244	wildtype	141
99	H:APFF TLVTH & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F I51T/N52L/P53V/S54T/G56H	245	wildtype	141
100	H:APFF TLGTH & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F I51T/N52L/P53G/S54T/G56H	246	wildtype	141
101	H:APFF TLSTH & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F I51T/N52L/P53S/S54T/G56H	247	wildtype	141
102	H:APFF TLWTH & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F I51T/N52L/P53W/S54T/G56H	248	wildtype	141
103	H:APFF TLKTH & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F I51T/N52L/P53R/S54T/G56H	249	wildtype	141
104	H:APFF TLNTH & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F I51T/N52L/P53N/S54T/G56H	250	wildtype	141
105	H:APFF TLATH & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F I51T/N52L/P53A/S54T/G56H	251	wildtype	141

10

20

【表 30 - 5】

106	H:APFF TLTH & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F I51T/N52L/P53I/S54T/G56H	252	wildtype	141
107	H:APFF TLYTH & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F I51T/N52L/P53Y/S54T/G56H	253	wildtype	141
108	H:APFF TLHTH & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F I51T/N52L/P53H/S54T/G56H	254	wildtype	141
109	H:APFF TLETH & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F I51T/N52L/P53E/S54T/G56H	255	wildtype	141
110	H:APFF TLMTH & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F I51T/N52L/P53M/S54T/G56H	256	wildtype	141
111	H:APFF S84G & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F S84G	257	wildtype	141
112	H:APFF S84Q & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F S84Q	258	wildtype	141
113	H:APFF S84N & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F S84N	259	wildtype	141
114	H:APFF S84H & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F S84H	260	wildtype	141
115	H:APFF S84R & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F S84R	261	wildtype	141
116	H:APFF S84K & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F S84K	262	wildtype	141
117	H:APFF S84T & L:wt	S102A/S103P/S104F/H111F S84T	263	wildtype	141
118	H:APF & L:R91P	S102A/S103P/S104F	155	R91P	267
119	H:APF & L:R91L	S102A/S103P/S104F	155	R91L	268
120	H:APF & L: R91G	S102A/S103P/S104F	155	R91G	269
121	H:APF & L: R91Q	S102A/S103P/S104F	155	R91Q	270
122	H:APF & L:S92N	S102A/S103P/S104F	155	S92N	271
123	H:APF & L: S92C	S102A/S103P/S104F	155	S92C	272
124	H:APFF & L: N93Y	S102A/S103P/S104F/H111F	156	N93Y	273
125	H:APFF & L: N93S	S102A/S103P/S104F/H111F	156	N93S	274
126	H:APFF & L: N93H	S102A/S103P/S104F/H111F	156	N93H	275
127	H:APFF & L: N93Q	S102A/S103P/S104F/H111F	156	N93Q	276
128	H:APFF & L: W94R	S102A/S103P/S104F/H111F	156	W94R	277
129	H:APFF & L: W94S	S102A/S103P/S104F/H111F	156	W94S	278
130	H:APFF & L: W94T	S102A/S103P/S104F/H111F	156	W94T	279
131	H:APFF & L: W94L	S102A/S103P/S104F/H111F	156	W94L	280
132	H:APFF & L: W94P	S102A/S103P/S104F/H111F	156	W94P	281
133	H:APFF & L: W94M	S102A/S103P/S104F/H111F	156	W94M	282
134	H:APFF & L:S92P	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S92P	283
135	H:APFF & L:S92A	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S92A	284
136	H:APFF & L:S92Q	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S92Q	285
137	H:APFF & L:S92V	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S92V	286

10

20

【表 3 0 - 6】

138	H:APFF & L:S92T	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S92T	287
139	H:APFF & L:S92C	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S92C	272
140	H:APFF & L:S92R	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S92R	288
141	H:APFF & L:S92G	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S92G	289
142	H:APFF & L:S92V	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S92V	290
143	H:APFF & L:S92M	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S92M	291
144	H:APFF & L:S92N	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S92N	271
145	H:APF & L:S30W	S102A/S103P/S104F	155	S30W	292
146	H:APF & L:S30R	S102A/S103P/S104F	155	S30R	293
147	H:APF & L:S30T	S102A/S103P/S104F	155	S30T	294
148	H:APF & L:S30L	S102A/S103P/S104F	155	S30L	295
149	H:APF & L:GL	S102A/S103P/S104F	155	R24G/Q27L	296
150	H:APF & L:Y32V	S102A/S103P/S104F	155	Y32V	297
151	H:APF & L:Y32S	S102A/S103P/S104F	155	Y32S	298
152	H:APFF & L:S28G	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S28G	299
153	H:APFF & L:S28K	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S28K	300
154	H:APFF & L:S28V	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S28V	301
155	H:APFF & L:S28F	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S28F	302
156	H:APFF & L:S28P	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S28P	264
157	H:APFF & L:S28T	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S28T	303
158	H:APFF & L:S28L	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S28L	304
159	H:APFF & L:S28Q	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S28Q	305
160	H:APFF & L:S28A	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S28A	306
161	H:APFF & L:S28N	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S28N	307
162	H:APFF & L:S28H	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S28H	308
163	H:APFF & L:S28I	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S28I	309
164	H:APFF & L:S28R	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S28R	310
165	H:APFF & L:S28W	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S28W	311
166	H:APFF & L:S28M	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S28M	312
167	H:APFF & L:S28E	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S28E	313
168	H:APFF & L:S30C	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S30C	314
169	H:APFF & L:S30D	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S30D	315
170	H:APFF & L:S30L	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S30L	316
171	H:APFF & L:S30T	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S30T	317
172	H:APFF & L:S30R	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S30R	318
173	H:APFF & L:S30P	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S30P	319
174	H:APFF & L:S30W	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S30W	320
175	H:APFF & L:S30Y	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S30Y	321
176	H:APFF & L:S30Q	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S30Q	322
177	H:APFF & L:S30A	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S30A	323
178	H:APFF & L:S30G	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S30G	324
179	H:APFF & L:S30N	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S30N	265
180	H:APFF & L:S30V	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S30V	325

10

20

【表 30 - 7】

181	H:APFF & L:S31T	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S31T	326
182	H:APFF & L:S31N	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S31N	327
183	H:APFF & L:S31K	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S31K	266
184	H:APFF & L:S31L	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S31L	328
185	H:APFF & L:S31M	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S31M	329
186	H:APFF & L:S31F	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S31F	330
187	H:APFF & L:S31I	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S31I	331
188	H:APFF & L:S31V	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S31V	332
189	H:APFF & L:S31H	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S31H	333
190	H:APFF & L:S31A	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S31A	334
191	H:APFF & L:S31P	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S31P	335
192	H:APFF & L:S31D	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S31D	336
193	H:APFF & L:S31R	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S31R	337
194	H:APFF & L:S31Y	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S31Y	338
195	H:APFF & L:S31Q	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S31Q	339
196	H:APFF & L:S31E	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S31E	340
197	H:APFF & L:S31G	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S31G	341
198	H:APFF & L:PNK	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S28P/S30N/S31K	342
199	H:APFF & L:NDH	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S28N/S30D/S31H	343
200	H:APFF G56A & L:NDH	S102A/S103P/S104F/H111F G56A	197	S28N/S30D/S31H	343
201	H:APFF S54A & L:NDH	S102A/S103P/S104F/H111F S54A	195	S28N/S30D/S31H	343
202	H:APFF & L:	S102A/S103P/S104F/H111F	156	D50A	344
203	H:APFF & L:D50A	S102A/S103P/S104F/H111F	156	A51T	345
204	H:APFF & L:S52A	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S52A	346
205	H:APFF & L:N53A	S102A/S103P/S104F/H111F	156	N53A	347
206	H:APFF & L:R54A	S102A/S103P/S104F/H111F	156	R54A	348
207	H:APFF & L:A55T	S102A/S103P/S104F/H111F	156	A55T	349
208	H:APFF & L:T56A	S102A/S103P/S104F/H111F	156	T56A	350
209	H:APFF & L:NDH S52L	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S28N/S30D/S31H S52L	351
210	H:APFF & L:NDH S52T	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S28N/S30D/S31H S52T	352
211	H:APFF & L:NDH S52R	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S28N/S30D/S31H S52R	353
212	H:APFF & L:NDH S52W	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S28N/S30D/S31H S52W	354
213	H:APFF & L:NDH S52N	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S28N/S30D/S31H S52N	355
214	H:APFF & L:NDH S52P	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S28N/S30D/S31H S52P	356
215	H:APFF & L:NDH S52M	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S28N/S30D/S31H S52M	357

10

20

【表 30 - 8】

216	H:APFF & L:NDH N53E	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S28N/S30D/S31H N53E	358
217	H:APFF & L:NDH N53G	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S28N/S30D/S31H N53G	359
218	H:APFF & L:NDH N53M	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S28N/S30D/S31H N53M	360
219	H:APFF & L:NDH N53C	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S28N/S30D/S31H N53C	361
220	H:APFF & L:NDH N53H	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S28N/S30D/S31H N53H	362
221	H:APFF & L:NDH N53P	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S28N/S30D/S31H N53P	363
222	H:APFF & L:NDH N53A	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S28N/S30D/S31H N53A	364
223	H:APFF & L:NDH A55R	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S28N/S30D/S31H A55R	365
224	H:APFF & L:NDH A55C	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S28N/S30D/S31H A55C	366
225	H:APFF & L:NDH A55S	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S28N/S30D/S31H A55S	367
226	H:APFF & L:NDH A55G	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S28N/S30D/S31H A55G	368
227	H:APFF LTH & L:NDH	S102A/S103P/S104F/H111F N52L/S54T/G56H	156	S28N/S30D/S31H	343
228	H:APFF LTH & L:NDH LG	S102A/S103P/S104F/H111F N52L/S54T/G56H	156	S28N/S30D/S31H S52L/A55G	369
229	H:APFF LTH & L:NDH LS	S102A/S103P/S104F/H111F N52L/S54T/G56H	156	S28N/S30D/S31H S52L/A55S	370
230	H:APFF ALTH & L:NDH	S102A/S103P/S104F/H111F I51A/N52L/S54T/G56H	156	S28N/S30D/S31H	343
231	H:APFF ALTH & L:NDH LG	S102A/S103P/S104F/H111F I51A/N52L/S54T/G56H	156	S28N/S30D/S31H S52L/A55G	369
232	H:APFF ALTH & L:NDH LS	S102A/S103P/S104F/H111F I51A/N52L/S54T/G56H	156	S28N/S30D/S31H S52L/A55S	370
233	H:APFF VLTH & L:NDH	S102A/S103P/S104F/H111F I51V/N52L/S54T/G56H	156	S28N/S30D/S31H	343
234	H:APFF VLTH & L:NDH LG	S102A/S103P/S104F/H111F I51V/N52L/S54T/G56H	156	S28N/S30D/S31H S52L/A55G	369
235	H:APFF VLTH & L:NDH LS	S102A/S103P/S104F/H111F I51V/N52L/S54T/G56H	156	S28N/S30D/S31H S52L/A55S	370
236	H:APFF & L:S76L	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S76L	371
237	H:APFF & L:S76T	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S76T	372
238	H:APFF & L:S76G	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S76G	373
239	H:APFF & L:S76A	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S76A	374

10

20

【表 30 - 9】

30

240	H:APFF & L:S76Y	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S76Y	375
241	H:APFF & L:F62L	S102A/S103P/S104F/H111F	156	F62L	376
242	H:APFF & L:S76E	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S76E	377
243	H:APFF & L:S76Q	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S76Q	378
244	H:APFF & L:S76P	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S76P	379
245	H:APFF & L:S76N	S102A/S103P/S104F/H111F	156	S76N	380

40

【表 3 1 - 1】

表 31. VH5-51IGHD5-18*01>3IGHJ4*01 及 C V3-4 IGLJ1*01 DLL4 抗体					
	ニックネーム	重鎖	SEQ ID NO	軽鎖	SEQ ID NO
1		wildtype	132	wildtype	142
2	H:G100K & L:wt	G100K	381	wildtype	142
3	H:G100R & L:wt	G100R	382	wildtype	142
4	H:G104T & L:wt	G104T	383	wildtype	142
5	H:KT & L:wt	G100K/G104T	384	wildtype	142
6	H:K99A & L:wt	K99A	385	wildtype	142
7	H:G100A & L:wt	G100A	386	wildtype	142
8	H:Y101A & L:wt	Y101A	387	wildtype	142
9	H:S102A & L:wt	S102A	388	wildtype	142
10	H:Y103A & L:wt	Y103A	389	wildtype	142
11	H:G104A & L:wt	G104A	390	wildtype	142
12	H:Y105A & L:wt	Y105A	391	wildtype	142
13	H:D106A & L:wt	D106A	392	wildtype	142
14	H:G100L & L:wt	G100L	393	wildtype	142
15	H:G100D & L:wt	G100D	394	wildtype	142
16	H:G100T & L:wt	G100T	395	wildtype	142
17	H:G104D & L:wt	G104D	396	wildtype	142
18	H:G104L & L:wt	G104L	397	wildtype	142
19	H:G104P & L:wt	G104P	398	wildtype	142
20	H:G104R & L:wt	G104R	399	wildtype	142
21	H:G104M & L:wt	G104M	400	wildtype	142
22	H:G104K & L:wt	G104K	401	wildtype	142
23	H:G104S & L:wt	G104S	402	wildtype	142
24	H:RY & L:wt	G104R/Y101H	403	wildtype	142
25	H:KT G24A & L:wt	G100K/G104T G24A	404	wildtype	142
26	H:KT I34A & L:wt	G100K/G104T I34A	405	wildtype	142
27	H:KT G35A & L:wt	G100K/G104T G35A	406	wildtype	142
28	H:KT S28A & L:wt	G100K/G104T S28A	407	wildtype	142
29	H:KT F29A & L:wt	G100K/G104T F29A	408	wildtype	142
30	H:KT T30A & L:wt	G100K/G104T T30A	409	wildtype	142
31	H:KT W33A & L:wt	G100K/G104T W33A	410	wildtype	142
32	H:KT G24L & L:wt	G100K/G104T G24L	411	wildtype	142
33	H:KT G24S & L:wt	G100K/G104T G24S	412	wildtype	142
34	H:KT G24R & L:wt	G100K/G104T G24R	413	wildtype	142
35	H:KT S28R & L:wt	G100K/G104T S28R	414	wildtype	142
36	H:KT S28K & L:wt	G100K/G104T S28K	415	wildtype	142
37	H:KT S28N & L:wt	G100K/G104T S28N	416	wildtype	142
38	H:KT G35T & L:wt	G100K/G104T G35T	417	wildtype	142
39	H:KT G35A & L:wt	G100K/G104T G35A	418	wildtype	142

10

20

【表 3 1 - 2】

40	H:KT G35V & L:wt	G100K/G104T G35V	419	wildtype	142
41	H:KT Y27A & L:wt	G100K/G104T Y27A	894	wildtype	142
42	H:KT S31A & L:wt	G100K/G104T S31A	895	wildtype	142
43	H:KT S31A & L:wt	G100K/G104T Y32A	896	wildtype	142
44	H:KT LRV & L:wt	G100K/G104T G24L/S28R/G35V	420	wildtype	142
45	H:KT D57A & L:wt	G100K/G104T D57A	421	wildtype	142
46	H:KT I50A & L:wt	G100K/G104T I50A	422	wildtype	142
47	H:KT I51A & L:wt	G100K/G104T I51A	423	wildtype	142
48	H:KT Y52A & L:wt	G100K/G104T Y52A	424	wildtype	142
49	H:KT P53A & L:wt	G100K/G104T P53A	425	wildtype	142
50	H:KT D55A & L:wt	G100K/G104T D55A	426	wildtype	142
51	H:KT T58D & L:wt	G100K/G104T T58D	427	wildtype	142
52	H:KT T58A & L:wt	G100K/G104T T58A	428	wildtype	142
53	H:KT S56G & L:wt	G100K/G104T S56G	429	wildtype	142
54	H:KT S84V & L:wt	G100K/G104T S84V	430	wildtype	142
55	H:KT G54A & L:wt	G100K/G104T G54A	897	wildtype	142
56	H:KT S56A & L:wt	G100K/G104T S56A	898	wildtype	142
57	H:KT S84L & L:wt	G100K/G104T S84L	431	wildtype	142
58	H:KT D109A & L:wt	G100K/G104T D109A	432	wildtype	142
59	H:KT & L:V91A	G100K/G104T	384	V91A	439
60	H:KT & L:L92A	G100K/G104T	384	L92A	440
61	H:KT & L:Y93A	G100K/G104T	384	Y93A	441
62	H:KT & L:M94A	G100K/G104T	384	M94A	442
63	H:KT & L:G95A	G100K/G104T	384	G95A	443
64	H:KT & L:G97A	G100K/G104T	384	G97A	444
65	H:KT & L:S96A	G100K/G104T	384	S96A	445
66	H:KT & L:I98A	G100K/G104T	384	I98A	446
67	H:KT & L:S99A	G100K/G104T	384	S99A	447
68	H:KT & L:V91P	G100K/G104T	384	V91P	448
69	H:KT & L:V91T	G100K/G104T	384	V91T	449
70	H:KT & L:V91S	G100K/G104T	384	V91S	450
71	H:KT & L:V91L	G100K/G104T	384	V91L	451
72	H:KT & L:V91R	G100K/G104T	384	V91R	452
73	H:KT & L:V91C	G100K/G104T	384	V91C	453
74	H:KT & L:V91E	G100K/G104T	384	V91E	454
75	H:KT & L:V91W	G100K/G104T	384	V91W	455
76	H:KT & L:V91N	G100K/G104T	384	V91N	456
77	H:KT & L:V91I	G100K/G104T	384	V91I	457
78	H:KT & L:V91G	G100K/G104T	384	V91G	458
79	H:KT & L:V91H	G100K/G104T	384	V91H	459
80	H:KT & L:M94E	G100K/G104T	384	M94E	460
81	H:KT & L:M94S	G100K/G104T	384	M94S	461

10

20

【表3 1 - 3】

82	H:KT & L:M94G	G100K/G104T	384	M94G	462
83	H:KT & L:M94L	G100K/G104T	384	M94L	463
84	H:KT & L:M94P	G100K/G104T	384	M94P	464
85	H:KT & L:M94V	G100K/G104T	384	M94V	465
86	H:KT & L:M94D	G100K/G104T	384	M94D	466
87	H:KT & L:M94R	G100K/G104T	384	M94R	467
88	H:KT & L:M94N	G100K/G104T	384	M94N	468
89	H:KT & L:M94T	G100K/G104T	384	M94T	469
90	H:KT & L:M94F	G100K/G104T	384	M94F	470
91	H:KT & L:S96W	G100K/G104T	384	S96W	471
92	H:KT & L:S96G	G100K/G104T	384	S96G	472
93	H:KT & L:S96P	G100K/G104T	384	S96P	473
94	H:KT & L:S96R	G100K/G104T	384	S96R	474
95	H:KT & L:S96L	G100K/G104T	384	S96L	475
96	H:KT & L:S96M	G100K/G104T	384	S96M	476
97	H:KT & L:S96E	G100K/G104T	384	S96E	477
98	H:KT & L:S96V	G100K/G104T	384	S96V	478
99	H:KT & L:RM	G100K/G104T	384	M94R/S96M	479
100	H:KT S28R & L:RM	G100K/G104T S28R	414	M94R/S96M	479
101	H:KT LRV & L:RM	G100K/G104T G24L/S28R/G35V	420	M94R/S96M	479
102	H:KT TRV & L:RM	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	M94R/S96M	479
103	H:KT ARV & L:RM	G100K/G104T G24A/S28R/G35V	434	M94R/S96M	479
104	H:KT TRV & L:wt	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	wildtype	142
105	H:KT ARV & L:wt	G100K/G104T G24A/S28R/G35V	434	wildtype	142
106	H:KT & L:L24A	G100K/G104T	385	L24A	480
107	H:KT & L:S26A	G100K/G104T	385	S26A	481
108	H:KT & L:G27A	G100K/G104T	385	G27A	482
109	H:KT & L:S28A	G100K/G104T	385	S28A	483
110	H:KT & L:V29A	G100K/G104T	385	V29A	484
111	H:KT & L:S30A	G100K/G104T	385	S30A	485
112	H:KT & L:T31A	G100K/G104T	385	T31A	486
113	H:KT & L:S32A	G100K/G104T	385	S32A	487
114	H:KT & L:Y33A	G100K/G104T	385	Y33A	488
115	H:KT & L:Y34A	G100K/G104T	385	Y34A	489
116	H:KT & L:P35A	G100K/G104T	385	P35A	490
117	H:KT & L:S36A	G100K/G104T	385	S36A	491
118	H:KT & L:G23A	G100K/G104T	385	G23A	492
119	H:KT & L:S25A	G100K/G104T	385	S25A	493
120	H:KT & L:G23R	G100K/G104T	385	G23R	494

10

20

【表 3 1 - 4】

121	H:KT & L:G23L	G100K/G104T	385	G23L	495
122	H:KT & L:S52A	G100K/G104T	385	S52A	496
123	H:KT & L:T53A	G100K/G104T	385	T53A	497
124	H:KT & L:N54A	G100K/G104T	385	N54A	498
125	H:KT & L:T55A	G100K/G104T	385	T55A	499
126	H:KT & L:R56A	G100K/G104T	385	R56A	500
127	H:KT & L:S57A	G100K/G104T	385	S57A	501
128	H:KT & L:S58A	G100K/G104T	385	S58A	502
129	H:KT & L:S52G	G100K/G104T	385	S52G	503
130	H:KT & L:S52C	G100K/G104T	385	S52C	504
131	H:KT & L:S52R	G100K/G104T	385	S52R	505
132	H:KT & L:R56I	G100K/G104T	385	R56I	506
133	H:KT & L:R56Y	G100K/G104T	385	R56Y	507
134	H:KT & L:R56D	G100K/G104T	385	R56D	508
135	H:KT & L:R56G	G100K/G104T	385	R56G	509
136	H:KT & L:R56S	G100K/G104T	385	R56S	510
137	H:KT & L:T78S	G100K/G104T	385	T78S	511
138	H:KT & L:T78E	G100K/G104T	385	T78E	512
139	H:KT & L:T78Y	G100K/G104T	385	T78Y	513
140	H:KT & L:T78M	G100K/G104T	385	T78M	514
141	H:KT & L:T78L	G100K/G104T	385	T78L	515
142	H:KT & L:T78K	G100K/G104T	385	T78K	516
143	H:KT & L:T78V	G100K/G104T	385	T78V	517
144	H:KT & L:AK	G100K/G104T	385	G23A/N175K	518
145	H:KT & L:AT	G100K/G104T	385	S25A/A116T	519
146	H:KT TRV & L:V91A	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	V91A	439
147	H:KT TRV & L:L92A	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	L92A	440
148	H:KT TRV & L:Y93A	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	Y93A	441
149	H:KT TRV & L:M94A	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	M94A	442
150	H:KT TRV & L:G95A	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	G95A	443
151	H:KT TRV & L:S96A	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	S96A	444
152	H:KT TRV & L:G67A	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	G97A	445
153	H:KT TRV & L:I98A	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	I98A	446

10

20

【表 3 1 - 5】

154	H:KT TRV & L:S99A	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	S99A	447
155	H:KT TRV & L:T78S	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	T78S	511
156	H:KT TRV & L:T78E	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	T78E	512
157	H:KT TRV & L:T78L	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	T78L	515
158	H:KT TRV & L:T78K	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	T78K	516
159	H:KT TRV & L:T78V	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	T78V	517
160	H:KT TRV & L:G23A	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	G23A	492
161	H:KT TRV & L:L24A	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	L24A	480
162	H:KT TRV & L:S25A	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	S25A	493
163	H:KT TRV & L:S26A	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	S26A	481
164	H:KT TRV & L:G27A	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	G27A	482
165	H:KT TRV & L:S28A	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	S28A	483
166	H:KT TRV & L:V29A	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	V29A	484
167	H:KT TRV & L:S30A	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	S30A	485
168	H:KT TRV & L:T31A	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	T31A	486
169	H:KT TRV & L:S32A	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	S32A	487
170	H:KT TRV & L:Y33A	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	Y33A	488
171	H:KT TRV & L:Y34A	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	Y34A	489
172	H:KT TRV & L:P35A	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	P35A	490
173	H:KT TRV & L:S36A	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	S36A	491
174	H:KT TRV & L:S52A	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	S52A	496
175	H:KT TRV & L:T53A	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	T53A	497

10

20

【表 3 1 - 6】

176	H:KT TRV & L:N54A	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	N54A	498
177	H:KT TRV & L:T55A	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	T55A	499
178	H:KT TRV & L:R56A	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	R56A	500
179	H:KT TRV & L:S57A	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	S57A	501
180	H:KT TRV & L:S58A	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	S58A	502
181	H:KT TRV & L:V91L	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	V91L	451
182	H:KT TRV & L:V91P	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	V91P	447
183	H:KT TRV & L:V91T	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	V91T	449
184	H:KT TRV & L:V91S	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	V91S	450
185	H:KT TRV & L:V91R	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	V91R	452
186	H:KT TRV & L:V91C	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	V91C	453
187	H:KT TRV & L:V91E	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	V91E	454
188	H:KT TRV & L:V91W	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	V91W	455
189	H:KT TRV & L:V91N	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	V91N	456
190	H:KT TRV & L:V91I	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	V91I	457
191	H:KT TRV & L:V91G	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	V91G	458
192	H:KT TRV & L:V91H	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	V91H	459
193	H:KT TRV & L:M94T	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	M94T	469
194	H:KT TRV & L:M94E	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	M94E	460
195	H:KT TRV & L:M94S	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	M94S	461
196	H:KT TRV & L:M94G	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	M94G	462
197	H:KT TRV & L:M94L	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	M94L	463

10

20

【表 3 1 - 7】

198	H:KT TRV & L:M94P	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	M94P	464
199	H:KT TRV & L:M94V	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	M94V	465
200	H:KT TRV & L:M94D	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	M94D	466
201	H:KT TRV & L:M94R	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	M94R	467
202	H:KT TRV & L:M94N	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	M94N	468
203	H:KT TRV & L:M94F	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	M94F	470
204	H:KT TRV & L:S96W	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	S96W	471
205	H:KT TRV & L:S96G	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	S96G	472
206	H:KT TRV & L:S96P	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	S96P	473
207	H:KT TRV & L:S96R	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	S96R	474
208	H:KT TRV & L:S96L	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	S96L	475
209	H:KT TRV & L:S96M	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	S96M	476
210	H:KT TRV & L:S96E	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	S96E	477
211	H:KT TRV & L:S96V	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	S96V	478
212	H:KT TRV & L:LP S52F	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	V91L/S96P S52F	520
213	H:KT TRV & L:LP S52L	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	V91L/S96P S52L	521
214	H:KT TRV & L:LP S52I	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	V91L/S96P S52I	522
215	H:KT TRV & L:LP S52M	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	V91L/S96P S52M	523
216	H:KT TRV & L:LP S52V	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	V91L/S96P S52V	524
217	H:KT TRV & L:LP S52P	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	V91L/S96P S52P	525
218	H:KT TRV & L:LP S52T	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	V91L/S96P S52T	526
219	H:KT TRV & L:LP S52Y	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	V91L/S96P S52Y	527

10

20

【表 3 1 - 8】

220	H:KT TRV & L:LP S52H	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	V91L/S96P S52H	528
221	H:KT TRV & L:LP S52Q	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	V91L/S96P S52Q	529
222	H:KT TRV & L:LP S52N	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	V91L/S96P S52N	530
223	H:KT TRV & L:LP S52K	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	V91L/S96P S52K	531
224	H:KT TRV & L:LP S52D	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	V91L/S96P S52D	532
225	H:KT TRV & L:LP S52E	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	V91L/S96P S52E	533
226	H:KT TRV & L:LP S52W	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	V91L/S96P S52W	534
227	H:KT TRV & L:LP S52R	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	V91L/S96P S52R	535
228	H:KT TRV & L:LP S52G	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	V91L/S96P S52G	536
229	H:KT TRV & L:LP	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	V91L/S96P	537
230	H:KT TRV & L:LP T53F	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	V91L/S96P T53F	538
231	H:KT TRV & L:LP T53L	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	V91L/S96P T53L	539
232	H:KT TRV & L:LP T53I	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	V91L/S96P T53I	540
233	H:KT TRV & L:LP T53M	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	V91L/S96P T53M	541
234	H:KT TRV & L:LP T53V	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	V91L/S96P T53V	542
235	H:KT TRV & L:LP T53S	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	V91L/S96P T53S	543
236	H:KT TRV & L:LP T53P	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	V91L/S96P T53P	544
237	H:KT TRV & L:LP T53Y	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	V91L/S96P T53Y	545
238	H:KT TRV & L:LP T53H	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	V91L/S96P T53H	546
239	H:KT TRV & L:LP T53Q	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	V91L/S96P T53Q	547
240	H:KT TRV & L:LP T53N	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	V91L/S96P T53N	548
241	H:KT TRV & L:LP T53K	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	V91L/S96P T53K	549

10

20

【表 3 1 - 9】

242	H:KT TRV & L:LP T53D	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	V91L/S96P T53D	550
243	H:KT TRV & L:LP T53E	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	V91L/S96P T53E	551
244	H:KT TRV & L:LP T53W	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	V91L/S96P T53W	552
245	H:KT TRV & L:LP T53R	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	V91L/S96P T53R	553
246	H:KT TRV & L:LP T53G	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	V91L/S96P T53G	554
247	H:KT TRV & L:LP S57F	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	V91L/S96P S57F	555
248	H:KT TRV & L:LP S57L	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	V91L/S96P S57L	556
249	H:KT TRV & L:LP S57I	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	V91L/S96P S57I	557
250	H:KT TRV & L:LP S57M	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	V91L/S96P S57M	558
251	H:KT TRV & L:LP S57V	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	V91L/S96P S57V	559
252	H:KT TRV & L:LP S57P	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	V91L/S96P S57P	560
253	H:KT TRV & L:LP S57T	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	V91L/S96P S57T	561
254	H:KT TRV & L:LP S57Y	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	V91L/S96P S57Y	562
255	H:KT TRV & L:LP S57H	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	V91L/S96P S57H	563
256	H:KT TRV & L:LP S57Q	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	V91L/S96P S57Q	564
257	H:KT TRV & L:LP S57N	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	V91L/S96P S57N	565
258	H:KT TRV & L:LP S57K	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	V91L/S96P S57K	566
259	H:KT TRV & L:LP S57D	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	V91L/S96P S57D	567
260	H:KT TRV & L:LP S57E	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	V91L/S96P S57E	568
261	H:KT TRV & L:LP S57W	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	V91L/S96P S57W	569
262	H:KT TRV & L:LP S57R	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	V91L/S96P S57R	570
263	H:KT TRV & L:LP S57G	G100K/G104T G24T/S28R/G35V	433	V91L/S96P S57G	571

10

20

30

【表 3 1 - 1 0】

264	H:KT TRV Y105H & L:wt	G100K/G104T G24T/S28R/G35V Y105H	435	wildtype	142
265	H:KT TRV Y105N & L:wt	G100K/G104T G24T/S28R/G35V Y105N	436	wildtype	142
266	H:KT TRV Y107F & L:wt	G100K/G104T G24T/S28R/G35V Y107F	437	wildtype	142
267	H:KT TRV D109Q & L:wt	G100K/G104T G24T/S28R/G35V D109Q	438	wildtype	142

40

【0 3 1 3】

実施例 6

表面プラズモン共鳴

この実施例では、選択された抗DLL4Fabフラグメントの遺伝子組換えヒトDLL4(hDLL4, Cat # 1506-D4/CF, R&D Systems)への結合親和性が、表面プラズモン共鳴 (SPR) (Biosensor Tools, Salt Lake City, UT)を使って分析された。分析されたFabフラグメントは、生殖

50

細胞系列に由来する抗体と生殖細胞系列改変型DLL4抗体を含む。遺伝子組換えhDLL4は、三つの異なった表面密度におけるアミンカップリングを使ってSPRチップに固定された。Fabフラグメントは、初期濃度1 μMから段階的に3倍に希釈された。結合研究は、10 mM HEPES (pH 7.4, NaCl 150 mM, 0.01%

Tween-20, 及び BSA0.1 mg/ml、摂氏25度)に入れたGLM センサーチップを使い、ProteOnシステムにおいて実施された。各表面からの反応データは、包括的に、結合定数を決定するため適当であった。

以下の表32にその結果が示されている。表 32では、Fabフラグメント, k_a (M-1s-1), k_d (s-1), K_D (nM) 及び標準偏差を記載している。

【表 32 - 1】

10

重鎖	軽鎖	k_a (x105) (M-1s-1)	k_d (s-1)	K_D (nM)
VH5-51_IGHD5-18*01>3_IGHJ4 *01	V3-4_IGLJ1*01	n/a	n/a	4800 (±200)
VH5-51_IGHD5-18*01>3_IGHJ4 *01 G100K/G104T (H:KT)	V3-4_IGLJ1*01	0.645 (±0.92)	0.023 (±0.004)	355 (±7)
VH5-51_IGHD5-18*01>3_IGHJ4 *01 G100K/G104T S28R (H:KT S28R)	V3-4_IGLJ1*01	7.4 (±0.6)	0.0845 (±0.0050)	114 (±6)
VH5-51_IGHD5-18*01>3_IGHJ4 *01 G100K/G104T G24T/S28R/G35V (H:KT TRV)	V3-4_IGLJ1*01	20.90 (±6.24)	0.0717 (±0.0035)	36.2 (±8.5)
VH5-51_IGHD5-18*01>3_IGHJ4 *01 G100K/G104T G24T/S28R/G35V (H:KT TRV)	V3-4_IGLJ1*01 M94R/S96M (L:EM)	25.30 (±4.16)	0.101 (±0.0153)	40.3 (±9.3)
VH5-51_IGHD5-18*01>3_IGHJ4 *01 G100K/G104T G24T/S28R/G35V (KT TRV)	V3-4_IGLJ1*01 V91L/S96P (LP)	110	0.036	3.3
VH5-51_IGHD5-18*01>3_IGHJ4 *01 G100K/G104T G24T/S28R/G35V (KT TRV)	V3-4_IGLJ1*01 V91L/S96P S52G (LP S52G)	29.6	0.0147	5.0
VH1-46_IGHD6-6*01_IGHJ1*01	L6_IGKJ1*01	1.63 (±3)	0.101 (±2)	730 (±130)
VH1-46_IGHD6-6*01_IGHJ1*01 S104F	L6_IGKJ1*01	5.0 (±0.8)	0.19 (±0.01)	380 (±60)
VH1-46_IGHD6-6*01_IGHJ1*01 S102A/S103P/S104F (H:APF)	L6_IGKJ1*01	4.05 (±0.05)	0.0492 (±0.0004)	122 (±1)

20

30

【表 3 2 - 2】

VH1-46_IGHD6-6*01_IGHJ1*01 S102A/S103P/S104F/H111F (H:APFF)	L6_IGKJ1*01	4.25 (± 0.04)	0.0300 (± 0.0002)	70.6 (± 0.7)
VH1-46_IGHD6-6*01_IGHJ1*01 S102A/S103P/S104F/H111Y (H:APFY)	L6_IGKJ1*01	3.40 (± 0.03)	0.0317 (± 0.0002)	93.1 (± 0.9)
VH1-46_IGHD6-6*01_IGHJ1*01 S102A/S103P/S104F (APF)	L6_IGKJ1*01 S31K	3.50 (± 0.05)	0.0392 (± 0.0004)	112 (± 2)
VH1-46_IGHD6-6*01_IGHJ1*01 S102A/S103P/S104F/H111F G56H (H:APFF G56H)	L6_IGKJ1*01	3.51 (± 1.84)	0.0101 (± 0.0007)	32.7 (± 11.6)
VH1-46_IGHD6-6*01_IGHJ1*01 S102A/S103P/S104F/H111F (APFF)	L6_IGKJ1*01 S28N/S30D/S31H (NDH)	4.44	0.0689	*155.2 and 14
VH1-46_IGHD6-6*01_IGHJ1*01 S102A/S103P/S104F/H111F I51V/N52L/S54T/G56H (H:APFF VLTH)	L6_IGKJ1*01 S28N/S30D/S31H (L:NDH)	4.30 (± 1.45)	0.00113 (± 0.0001)	2.7 (± 0.6)
VH1-46_IGHD6-6*01_IGHJ1*01 S102A/S103P/S104F/H111F I51V/N52L/S54T/G56H (H:APFF VLTH)	L6_IGKJ1*01 S28N/S30D/S31H S52L/A55S (L:NDH LS)	6.84 (± 2.51)	0.00109 (± 0.0001)	1.7 (± 0.5)
VH6-1_IGHD3-3*01_IGHJ4*01	V4-3_IGLJ4*01	n/a	n/a	38000 (± 400)
VH1-46_IGHD3- 10*01_IGHJ4*01	L12_IGKJ1*01	5 (± 1)	0.29 (± 2)	500 (± 100)

10

20

30

KD=kd/ka;

*Fab Fab VH1-46_IGHD6-6*01_IGHJ1*01 S102A/S103P/S104F/H111F 及び L6_IGKJ1*01 S28N/S30D/S31H displays 2-部位 結合:

155.2 nMのKdで89% 及び 14 nMのKdで10%

【0 3 1 4】

ヒトDLL4について前述したように、抗DLL4

Fab H:KT TRV& L:RM 及び抗DLL4 Fab H:APFF VLTH &

L:NDH LSの、遺伝子組換えマウス DLL4 (mDLL4, Cat# 1389-D4-050/CF,

R&D Systems)に対する結合親和性が、SPRを使って分析された。その結果 (以下の表33を参照)、抗DLL4 Fab H:KT TRV& L:RMについては、マウス表面で結合が検出されないことを示した。対照的に、抗DLL4 Fab H:APFF VLTH & L:NDH

LSは、マウスDLL4に対し9.7 (± 2.0)の親和性で結合を示した。その一方、Fab H:APFF VLTH &

L:NDH LSは、マウスDLL4と比較して5倍の親和性でhDLL4と結合した (上記の表32を参照)

。

40

【表33】

表 33. Fab VH1-46_IGHD6-6*01_IGHJ1*01 S102A/S103P/S104F/H111F I51V/N52L/S54T/G56H (H:APFF VLTH) & L6_IGKJ1*01 S28N/S30D/S31H S52L/A55S (L:NDH LS) の mDLL4 への結合			
mDLL4	ka (M ⁻¹ s ⁻¹)	kd (s ⁻¹)	KD (nM)
表面 1	2.87E+05	2.10E-03	7.3
表面 1	1.65E+05	0.00178	10.8
表面 1	1.73E+05	1.88E-03	10.9
平均	2.08E+05	1.92E-03	9.7
標準偏差	6.81E+04	1.63E-04	2.0

10

【0315】

実施例 7

ELISA 結合アッセイ

この実施例では、遺伝子組み換えヒトDLL4及び遺伝子組み換えマウスDLL4に対する、Fab抗体の用量依存的な結合を評価するために、ELISA 結合アッセイが使われた。

A.

アッセイ

簡潔には、50 μl のhDLL4溶液0.5 μg/ml、又は100 mM NaHCO₃, (pH 9) 中のmDLL4が、96-ウェルCosterプレート(Cat # 3370, Corning Inc.)の各ウェルに加えられ、室温で1時間インキュベートされた。プレートは、トリス緩衝生理食塩水トウイーン (TBST) に1%BSAを加え、室温で1時間インキュベーションした後に、TBST 150 μlで二回洗浄することで遮断された。Fab抗体は、PBS中の1% BSA中で段階的に希釈された。

各段階の希釈液の50 μl アリコートが各ウェルに3回加えられ、プレートは室温で1時間インキュベートされた後、TBSTで二回洗浄された。

二次抗体に結合したヤギ抗ヒトカッパ HRP (Cat # A7164-1mL, Sigma-Aldrich) 又は二次抗体に結合したヤギ抗ヒトラムダHRP (Cat # L1645-1mL, Sigma-Aldrich)のいずれか50 μlが、PBS中の1% BSA 中で1:1000に希釈されてから各ウェルに加えられ、プレートは室温で30分間インキュベートされた後にTBST 200 μlで三回洗浄された。最後に、50 μl のTMB 一成分試薬(Cat # TMBW-1000-01, BioFax) が加えられ、室温で2分間反応させた。反応は、50 μl の0.5 M H₂SO₄ を加えることすぐに停止され、450 nmにおける吸光度がELISAプレートリーダーを使って測定された。

B.

結果

以下の表 34-43 では、様々なFabフラグメントのDLL4に対する用量依存的な結合を記載している。

表34 は、125 nm ~ 1000 nmのFabフラグメント濃度における、親Fab VH1-46_IGHD6-6*01_IGHJ1*01 & L6_IGKJ1*01 (SEQ ID NOS:131及び141)と比較した、重鎖突然変異体Fab H:AF P & L:wt (SEQ

ID NOS:155及び141)の結合を記載している。検査濃度において、親Fab抗体はDLL4に対する結合の検出可能なシグナルを示さなかった。対照的に、H:APF & L:wt 三重変異体は、濃度依存的な方法において、DLL4結合を証明する検出可能なシグナルを示した。

20

30

40

【表34】

表34. 親 Fab VH1-46IGHD6-6*01_IGHJ1*01 & L6_IGKJ1*01 と比較した、三重変異体 Fab VH1-46IGHD6-6*01_IGHJ1*01 S102A/S103P/S104F (H:APF) & L6_IGKJ1*01 の結合親和性

Fab [nM]	親	ブランク	S102A, S103P, S104F	ブランク
1000	0.071	0.060	0.463	0.080
500	0.070	0.069	0.307	0.074
250	0.069	0.064	0.231	0.071
125	0.070	0.066	0.173	0.075

10

【0316】

表35は、Fabフラグメント濃度0.16 nMから20 nMにおける、軽鎖L6_IGKJ1*01 (SEQ ID NO: 141)と対になった重鎖突然変異体H:APFF

LTH, H:APPF ELTH, H:APFF VLTH, H:APFF NLTH, H:APFF TLATH, 及びH:APFF TVの結合を記載している。重鎖突然変異体H:APFF LTH (SEQ

ID NO:233), H:APFF ELTH (SEQ ID NO: 238), H:APPF VLTH (SEQ ID NO: 239) 及びH:APF F NLTH (SEQ ID NO: 244)を含むFabフラグメントは、約1 nMから10 nMのKdでDLL4 と結合する。重鎖突然変異体H:APFF TLATH (SEQ ID NO:

20

251) 及び H:APFF TV (SEQ ID NO: 201)を含むFabフラグメントは、検査された他のFabフラグメントに比べてDLL4に対し低い親和性を有している。重鎖突然変異体H:APFF TLATH は、約100 nMよりも大きなKdを有し、重鎖突然変異体H:APFF TV は、10から100 nMの間のKdを有している。

【表35】

表35. ELISA法で DLL4 と結合する VH1-46IGHD6-6*01_IGHJ1*01 & L6_IGKJ1*01 (SEQ ID NO: 141) の重鎖 Fab 突然変異体

Fab [nM]	重鎖	APFF	APFF ELTH	APFF VLTH	APFF NLTH	APFF TLATH	APFF I51T/N52V
		L6_IGKJ1*01	L6_IGKJ1*01	L6_IGKJ1*01	L6_IGKJ1*01	L6_IGKJ1*01	L6_IGKJ1*01
20		2.402	2.290	2.052	1.627	1.109	0.648
10		2.345	2.168	1.854	1.362	0.875	0.506
5		2.477	2.333	2.198	1.751	1.272	0.724
2.5		2.151	1.982	1.656	1.165	0.592	0.358
1.3		0.653	0.402	0.252	0.143	0.078	0.055
0.63		1.367	1.010	0.785	0.419	0.227	0.115
0.31		2.402	2.290	2.052	1.627	1.109	0.648
0.16		2.345	2.168	1.854	1.362	0.875	0.506

30

【0317】

表36は、50から100 nM のFabフラグメント濃度における、軽鎖L6_IGKJ1*01 (SEQ ID NO: 41)及び軽鎖突然変異体L:NDH (SEQ ID NO:343)と対になった重鎖突然変異体H:APFF (SEQ ID NO:156), H:APFF G56A (SEQ ID NO:197), H:APFF S54A (SEQ ID NO:195)の結合を記載している。Fab 突然変異体 H:APFF & L:NDH は、Fab 突然変異APFF と比較して4倍に増加した親和性で DLL4 と結合する。抗体Fab H:APFF G56A & L:NDH は、H:APFF & L:wt 抗体突然変異体と比較し、DLL4に対して8倍の結合親和性を示し、その他の検査抗体と比べても増幅された結合親和性を示した。抗体Fab

40

50

H:APFF S54A & L:NDH は、H:APFF & L:NDH 抗体突然変異体と比べて、若干減少した結合親和性を示した。

【表36】

表36. VH1-46_IGHD6-6*01_IGHJ1*01 & L6_IGKJ1*01 Fab 突然変異体の結合親和性						
Fab [nM]	重鎖	APFF	APFF	APFF	APFF	APFF
	軽鎖	親	NDH	親	NDH	NDH
100 nM		0.072	0.259	0.338	0.453	0.213
75 nM		0.072	0.268	0.399	0.543	0.212
50 nM		0.060	0.202	0.301	0.366	0.154
0		0.006	0.002	0.002	0.002	0.000

10

【0318】

表37は、3.125 nMから100 nMのFabフラグメント濃度における、軽鎖突然変異体L:NDH (SEQ ID NO:343), L:NDH

S52L (SEQ ID NO:351), L:NDH S52T (SEQ ID NO:352), L:NDH N53H (SEQ ID NO:363), L:NDH A55S (SEQ ID NO:367)、L:NDH A55G (SEQ ID NO:368)と対になった重鎖突然変異体H:APFF (SEQ ID NO:156)の結合を記載している。Fab

H:APFF & L:NDH S52L, H:APFF & L:NDH A55S 及びH:APFF

& L:NDH A55Gは、Fab H:APFF & L:NDH 突然変異体と比較し、DLL4に対して若干増加した結合親和性を有した。全てのFab 軽鎖突然変異体は、Fab H:APFF & L:NDH 突然変異体と同じ親和性の範囲内で、DLL4と結合した。

【表37】

表37. ELISA 法でDLL4と結合するFab VH1-46_IGHD6-6*01_IGHJ1*01 S102A/S103P/S104F/H111F (APFF) (SEQ ID NO:156) & L6_IGKJ1*01 S28N/S30D/S31H (NDH) 軽鎖S52, N53及びA55 突然変異体							
Fab [nM]	H	APFF	APFF	APFF	APFF	APFF	APFF
	L	NDH S52L	NDH	NDH	NDH	NDH	NDH
100		0.791	0.653	0.608	0.858	0.814	0.686
50		0.546	0.490	0.416	0.588	0.510	0.507
25		0.335	0.323	0.238	0.407	0.316	0.310
12.5		0.215	0.215	0.167	0.258	0.198	0.192
6.25		0.142	0.130	0.109	0.154	0.125	0.125
3.125		0.095	0.099	0.089	0.108	0.093	0.096

30

【0319】

表38 は、0.74 nMから20 nMのFabフラグメント濃度における、軽鎖突然変異体L:NDH (SEQ ID NO:343), L:NDH LG (SEQ ID NO:369), L:NDH LS (SEQ ID

NO:370)と対になった重鎖突然変異体H:APFF LTH (SEQ ID NO:233), H:APFF

ALTH (SEQ ID NO:234), H:APFF VLTH (SEQ ID NO:239)の結合を記載している。H:APFF LTH及びH:APFF VLTH 重鎖突然変異体を含む抗体は、重鎖突然変異体H:APFF ALTHを含む抗体突然変異体と比較し、DLL4に対して約10倍に増幅された結合親和性を有した。

40

【表38】

重鎖 VH1-46_IGHD6-6*01_IGHJ1*01 S102A/S103P/S104F/H111F (APFF)		軽鎖 L6_IGKJ1*01 S28N/S30D/S31H (NDH)		Fab [nM]			
				20	6.67	2.22	0.74
N52L/S54T/G56H (LTH)		(NDH)		0.863	0.739	0.463	0.270
N52L/S54T/G56H (LTH)		S52L/A55G (NDH LG)		1.008	0.880	0.594	0.368
N52L/S54T/G56H (LTH)		S52L/A55S (NDH LS)		1.054	0.916	0.557	0.398
I51A/N52L/S54T/G56H (ALTH)		(NDH)		0.391	0.232	0.069	0.024
I51A/N52L/S54T/G56H (ALTH)		S52L/A55G (NDH LG)		0.390	0.212	0.069	0.028
I51A/N52L/S54T/G56H (ALTH)		S52L/A55S (NDH LS)		0.458	0.282	0.040	0.046
I51V/N52L/S54T/G56H (VLTH)		(NDH)		0.979	0.776	0.608	0.288
I51V/N52L/S54T/G56H (VLTH)		S52L/A55G (NDH LG)		1.057	0.916	0.755	0.397
I51V/N52L/S54T/G56H (VLTH)		S52L/A55S (NDH LS)		0.910	0.747	0.523	0.263

10

【0320】

表39は、0.74 nMから20 nMのFabフラグメント濃度における、軽鎖L:wt (SEQ ID NO:142)

及び軽鎖突然変異体L:RM (SEQ ID

NO:479)と対になった重鎖突然変異体H:KT (SEQ ID NO:384), H:KT S28R (SEQ ID NO:414), H:KT LRV (SEQ ID NO:420), H:KT TRV (SEQ ID NO:433)及びH:KT ARV (SEQ ID NO:434)を記載している。Fab KT

20

TRV-V3-4 RMがDLL4に対して最大の結合親和性を有した。

【表39】

重鎖 VH5-51_IGHD5-18*01>3_IGHJ4*01		軽鎖 V3-4_IGLJ*01		Fab [nM]			
				20	6.67	2.22	0.74
G100K/G104T	親			0.018	0.042	0.014	0.019
G100K/G104T S28R	parent			0.009	0.003	0.000	0.000
G100K/G104T G24L/S28R/G35V	parent			0.027	0.005	0.000	0.006
G100K/G104T G24T/S28R/G35V	parent			0.054	0.023	0.000	0.002
G100K/G104T G24A/S28R/G35V	parent			0.054	0.025	0.002	0.008
G100K/G104T	M94R/S96M			0.087	0.023	0.007	0.000
G100K/G104T S28R	M94R/S96M			0.011	0.001	0.003	0.000
G100K/G104T G24L/S28R/G35V	M94R/S96M			0.003	0.000	0.000	0.000
G100K/G104T G24T/S28R/G35V	M94R/S96M			0.122	0.062	0.028	0.006
G100K/G104T G24A/S28R/G35V	M94R/S96M			0.006	0.034	0.000	0.000

30

【0321】

表40は、100 nMから0.05 nMのFabフラグメント濃度における、軽鎖突然変異体L:wt (SEQ ID NO:142), L:LP

(SEQ ID NO:537), L:LP S52M (SEQ ID NO:523)及びL:LP S52G

(SEQ ID NO:536)と対になった重鎖突然変異体H:KT TRV (SEQ ID NO:433)の結合親和性を記載している。Fab H:KT TRV & L:LP S52Gが、DLL4に対する最大の結合親和性を有した。

40

【表40】

表 40: Fab VH5-51IGHD5-18*01>3IGHJ4*01 G100K/G104T/S28R/G35V (KT TRV) & V3-4_IGLJ1*01 軽鎖突然変異体の結合親和性					
Fab [nM]	重鎖	KT TRV	KT TRV	KT TRV	KT TRV
	軽鎖	野生型	V91L/S96P	V91L/S96P S52M	V91L/S96P S52G
100		0.16	0.34	0.24	0.69
33.33		0.08	0.19	0.12	0.35
11.11		0.04	0.07	0.06	0.17
3.70		0.03	0.03	0.03	0.06
1.23		0.01	0.03	0.03	0.03
0.41		0.01	0.02	0.03	0.01
0.14		0.00	0.03	0.02	0.02
0.05		0.01	0.02	0.02	0.02

10

20

【0322】

表41は、100 nMから12.5 nMのFabフラグメント濃度における、重鎖突然変異体 VH5-51_IGHD5-18*01>3_IGHJ4*01の結合親和性を記載しており、これには軽鎖突然変異体L:wt (SEQ ID NO:142), L:LP (SEQ ID NO:537) 及び様々なL:LP S52 突然変異体(SEQ ID NOS:520-531及び536)を持つH:G100K (SEQ ID NO:381), H:G104T (SEQ ID NO:383), H:KT (SEQ ID NO:384), H:KT S28R (SEQ ID NO:414), H:KT TRV (SEQ ID NO:433), H:KT TRV Y105H (SEQ ID NO:435), H:KT TRV Y105N (SEQ ID NO:436), H:KT TRV Y107F (SEQ ID NO:437) 及びH:KT TRV D109Q (SEQ ID NO:438)を含む。FabH:KT TRV & L:LP S52G (SEQ ID NOS:433及び536)が、DLL4に対して最大の結合親和性を有した。

【表41】

重鎖 VH5-51_IGHD5-18*01>3_IGHJ4*01		軽鎖 V3-4_IGLJ*01		Fab [nM]			
				100	50	25	12.5
<i>G100K/G104T G24L/S28R/G35V Y105H</i>	<i>Wildtype</i>			0.23	0.20	0.19	0.21
<i>G100K/G104T G24T/S28R/G35V Y105N</i>	<i>Wildtype</i>			0.25	0.18	0.19	0.21
<i>G100K/G104T G24A/S28R/G35V Y107F</i>	<i>Wildtype</i>			0.28	0.24	0.20	0.21
<i>G100K/G104T G24L/S28R/G35V D109Q</i>	<i>Wildtype</i>			0.30	0.25	0.22	0.24
<i>G100K/G104T G24T/S28R/G35V</i>	<i>V91L/S96P</i>			1.00	0.81	0.58	0.45
<i>G100K</i>	<i>Wildtype</i>			0.20	0.19	0.18	0.19
<i>Wildtype</i>	<i>Wildtype</i>			0.17	0.16	0.18	0.17
<i>G104T</i>	<i>Wildtype</i>			0.17	0.17	0.18	0.19
<i>G100K/G104T</i>	<i>Wildtype</i>			0.18	0.18	0.16	0.18
<i>G100K/G104T G24T/S28R/G35V</i>	<i>Wildtype</i>			0.45	0.32	0.26	0.23
<i>G100K/G104T S28R</i>	<i>Wildtype</i>			0.26	0.23	0.20	0.18
<i>G100K/G104T G24A/S28R/G35V</i>	<i>V91L/S96P S52V</i>			0.95	0.74	0.60	0.43
<i>G100K/G104T G24L/S28R/G35V</i>	<i>V91L/S96P S52F</i>			0.99	0.69	0.49	0.42
<i>G100K/G104T G24T/S28R/G35V</i>	<i>V91L/S96P S52L</i>			1.02	0.78	0.58	0.43
<i>G100K/G104T G24A/S28R/G35V</i>	<i>V91L/S96P S52I</i>			1.04	0.82	0.60	0.40
<i>G100K/G104T G24L/S28R/G35V</i>	<i>V91L/S96P S52M</i>			1.01	0.80	0.59	0.41
<i>G100K/G104T G24T/S28R/G35V</i>	<i>V91L/S96P S52G</i>			1.14	1.02	0.90	0.63
<i>G100K/G104T G24A/S28R/G35V</i>	<i>V91L/S96P S52P</i>			1.00	0.79	0.59	0.43
<i>G100K/G104T G24L/S28R/G35V</i>	<i>V91L/S96P S52T</i>			0.99	0.79	0.62	0.41
<i>G100K/G104T G24T/S28R/G35V</i>	<i>V91L/S96P S52Y</i>			0.90	0.72	0.56	0.41
<i>G100K/G104T G24A/S28R/G35V</i>	<i>V91L/S96P S52H</i>			1.09	0.91	0.73	0.50
<i>G100K/G104T G24L/S28R/G35V</i>	<i>V91L/S96P S52Q</i>			0.96	0.81	0.67	0.47
<i>G100K/G104T G24T/S28R/G35V</i>	<i>V91L/S96P S52N</i>			1.05	0.90	0.86	0.65
<i>G100K/G104T G24T/S28R/G35V</i>	<i>V91L/S96P S52K</i>			1.23	1.03	0.79	0.56

10

20

30

【0323】

表42-43 は、ヒト及びマウス DLL4に対する結合のELISAシグナルを記載している。検査した全てのFabフラグメントは、mDLL4と比較して、DLL4に対する結合の好適性を示した。Fab H:APFF VLTH &

L:NDH LS (SEQ ID NOS:239 及び370) 及びH:APFF VLTH & L:NDH (SEQ ID NOS:239及び343) は、ほぼ同じ結合親和性 (約1 nM) でDLL4と結合する。さらに、Fab H:APFF VLTH & L:NDH LS は、hDLL4への結合と比較して10分の1に減少した親和性でmDLL4と結合する。Fab H:KT TRV & L:wt (SEQ ID NOS:433及び142)

は、約50 nMの親和性でDLL4と結合する。検査されたVH5-51_IGHD5-18*01>3_IGHJ4*01 & V3-4_IGLJ1*01 突然変異体Fabフラグメントのいずれも、検査濃度において、mDLL4に対する検出可能な結合を示さなかった。

40

【表42】

表42 ELISA法でヒト及びマウスDLL4と結合するFab VH1-46IGHD6-6*01IGHJ1*01 & L6_IGKJ1*01 突然変異体							
Fab [nM]	重鎖	0.5 ng/μl h DLL4		0.5 ng/μl mDLL4			10
		APFF G56H	APFF VLTH	APFF G56H	APFF VLTH	APFF VLTH	
Fab [nM]	軽鎖	L6_IGKJ1*01	NDH	NDH LS	L6_IGKJ1*01	NDH	NDH LS
10.00		1.199	2.253	2.246	0.088	1.215	1.555
5.00		0.882	1.918	2.060	0.070	0.833	1.284
2.50		0.535	1.831	1.964	0.061	0.583	0.983
1.25		0.264	1.396	1.651	0.054	0.317	0.604
0.63		0.168	1.089	1.403	0.052	0.206	0.404
0.31		0.103	0.683	0.850	0.049	0.105	0.205
0.16		0.079	0.407	0.593	0.048	0.081	0.142
0.08		0.071	0.189	0.259	0.048	0.063	0.078

【表43】

表43 ELISA法でヒト及びマウスDLL4と結合するFab VH5-51IGHD5-18*01>3IGHJ4*01 & V3-4_IGLJ1*01 突然変異体							
Fab [nM]	重鎖	0.5 ng/μl h DLL4		0.5 ng/μl mDLL4			20
		KT S28R V3-4 _IGLJ1*01	KT TRV V3-4 _IGLJ1*01	KT TRV RM	KT S28R V3-4 _IGLJ1*01	KT TRV V3-4 _IGLJ1*01	
100.00		0.670	1.447	1.067	0.158	0.305	0.457
50.00		0.524	0.976	0.661	0.145	0.234	0.331
25.00		0.333	0.600	0.421	0.138	0.178	0.232
12.50		0.226	0.389	0.294	0.126	0.153	0.186
6.25		0.203	0.310	0.229	0.123	0.133	0.148
3.13		0.164	0.187	0.167	0.117	0.125	0.131
1.56		0.148	0.183	0.148	0.116	0.120	0.131
0.78		0.138	0.143	0.145	0.118	0.115	0.130

【0324】

30

実施例 8

CHO細胞の表面に発現したDLL4に対する結合

この実施例では、CHO細胞の表面に発現したDLL4に対するfabs H:APFF VLTH & L:NDH LS (SEQ

ID NOS:239 and 371) 及びH:KT TRV & L:LP S52G (SEQ ID

NOS:433 及び 536)の結合能力を、フローサイトメトリーによる検出で検査した。.

DLL4 発現構築物を生成するため、グリセロールストックとしてのpCR-BluntII-TOPO (SEQ ID NO:116)中のヒトDLL4

cDNA (SEQ ID NO:113, 登録番号 BC106950; 及びSEQ ID NO:114, 登録番号 AA106951に記載されているコーディングアミノ酸)を、Open Biosystems (クローンID# 40034887)から得た。このストックは、カマナイシン寒天プレートにストリークされ、DNA精製のためにコロニーが採取された。DNAは、PureLinkTM クイックプラスミドミニプレップキット (Quick Plasmid

Miniprep Kit) (Invitrogen, カタログ

K210010)を使って得られた。

完全長DLL4が、OpenBiosystemsのベクターから消化され、NheI と NotI の間のpCDNA5/FRT (SEQ ID NO:117; Invitrogen カタログ # K601001)に組み込まれた。ライゲーションは、Rapid DNA ライゲーションキット (Roche, カタログ # 11 635 379 001)を使って実施され、細胞がヒートショックにより One

40

50

Shot (R) Max Efficiency (R) DH5 TM-T1R コンピテント細胞 (Invitrogen, カタログ # 12297016) へ形質転換された。細胞は、カルベニシリンプレート上で選択された。コロニーが採取され、1:1000に希釀したカルベニシリン100 mg/mLを含むルリア培地 (LB) で一晩植菌した。プラスミドDNAが、ミニプレップ (Invitrogen; カタログ # K210011) を使って抽出された。

【0325】

InvitrogenのLipofectamineTMトランスフェクション試薬を使い、完全長DLL4 及びpOG44リコンビナーゼベクター (SEQ ID NO:118; Invitrogen カタログ # K601001) を含むpcDNA5/FRTが、FIP-InTM Systemの手順に従って、Invitrogen社FIP-InTM-CHO 細胞系列 (Cat. No. R75807) にトランスフェクトされた。細胞は、12ウェルプレートにおいて約90% コンフルエントであった。2~3日経過後に、トランスフェクトされた細胞が、ハイグロマイシン400 µg/mlを使って選択された。約5日後にコロニーが採取され、10 cm² の組織培養皿に移された。これらの細胞系列は、ハイドロマイシン選択によって維持された。

10

【0326】

完全長DLL4 を発現したCHO 細胞及びコントロール (対照) CHO 細胞が、AccutaseTM 酵素細胞剥離培地 (Enzyme Cell Detachment Medium (Cat# 00-4555-56, eBioscience)) を使って組織培養プレート (BD Falcon 10 cm²) から剥離された。これらの細胞を、リン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate Buffered Saline (2% BSA/PBS)) 中の2%ウシ血清アルブミン (Bovine Serum Albumin) 中で洗浄した後、2% BSA/PBS 中のFabフラグメント10 nMが加えられ、氷上で30分間インキュベートされた。これらの細胞は、2% BSA/PBS で一度洗浄され、マウス抗ヒトカッパPE抗体 (1:100に希釀, Cat# MH10514, Invitrogen) 又はマウス抗ヒトラムダPE 抗体 (1:100に希釀, Cat# MH10614, Invitrogen) が加えられ、氷上で10分間インキュベートされた。二次抗体マウス抗ヒトカッパPE (Fabフラグメントなし) が単独で、DLL4発現CHO細胞のコントロール (対照) として使われた。これらの細胞は、次に2% BSA/PBS 中で二回洗浄され、BD FACSaria 上でのフローサイトメトリーによって分析された。その結果、検査FabフラグメントがCHO細胞表面に発現したDLL4と結合したことが示された。

20

20

30

【0327】

実施例 9

DLL4のエピトープマッピング

この実施例では、DLL4のVH1-46_IGHD6-6*01_IGHJ1*01

& L6_IGKJ1*01 及びVH5-51_IGHD5-18*01>3_IGHJ4*01

& V3-4_IGLJ1*01 Fabsの結合エピトープが、二つの異なったアッセイを用いてマッピングされた。第一の実験では、Fabs VH1-46_IGHD6-6*01_IGHJ1*01 H:APFF G56H & L6_IGKJ1*01 (SEQ

40

ID NOS:219 及び141) 及び

VH5-51_IGHD5-18*01>3_IGHJ4*01 H:KT TRV & V3-4_IGLJ1*01 (SEQ ID NOS:433 及び142)

がDLL4上の同じ結合部位で競合するか否かを測定するため、競合アッセイが実施された。第二の実験では、Fabs VH1-46_IGHD6-6*01_IGHJ1*01 H:APFF VLTH & L6_IGKJ1*01 L:NDH LS (SEQ ID NOS:239 及び370) 及び

VH5-51_IGHD5-18*01>3_IGHJ4*01 H:KT TRV & V3-4_IGLJ1*01 L:LP S52G (SEQ ID NOS:433 及び 536) に認識されるDLL4上のエピトープが、様々な切断型DLL4を使いウェスタンプロット法によってマッピングされた。

【0328】

50

A.

DLL4への結合のための競合アッセイ

このアッセイでは、ルテニウム標識Fab H:APF & L:wtを持つDLL4に対する結合を測定するため、異なった重鎖と軽鎖を含むがDLL4 (KDsは各々 32.7 ± 11.6 , 36.2 ± 8.5 nM) に対して似た結合親和性を持つ2個のFabフラグメント (H:APFF G56H & L:wt 及び H:KT TRV & L:wt) が、競合アッセイで使われた。

簡潔には、シングルスポット96ウェル標準プレート(MSD) が、0.03% Triton X-100を加えたPBS中のDLL4 (R&D systems) 10 μ g/mlをウェル当たり5 μ l使って一晩コーティングされた。いくつかのウェルは、ブランク用としてコーティングされなかった。

翌日、TBST中の3% BSAの150 μ l アリコートが各ウェルに加えられ、プレートを遮断するために摂氏20度で60分間インキュベートされた。

TBST 150 μ l で二回洗浄し、タッピング乾燥した後、100

nM ルテニウム標識Fab H:APF & L:wt にFab H:APFF G56H & L:wt 又はFab H:KT TRV & L:wtのいずれかの段階的希釈液を加えた物の50 μ l アリコートが二回加えられた。プレートを振とうしながら1時間、摂氏20度でインキュベーションした後、そのECLシグナルがSector Imager 2400を使って計測された。ブランクウェルからのシグナルを差し引いた後、パーセント(%) ルテニウム標識Fab H:APF & L:wt 結合が、検査Fabフラグメントの平均ECLシグナルを、ルテニウム標識Fab H:APF & L:wt 結合のECLシグナルで割ることで計算された。

【0329】

その結果、平衡状態においてFab H:APFF G56H & L:wt とFab H:APF & L:wt が、約30nMの競合KDで、DLL4上の結合を効果的に競合することが示された。対照的に、Fab H:KT TRV & L:wt は、はるかに弱い競合を示した。

nMの濃度において、Fab H:KT TRV & L:wt は、ルテニウム標識Fab H:APF & L:wtより33%少ない競合を示しただけだった。したがって、Fab H:APFF G56H & L:wt 及び H:KT TRV & L:wt の両方は、最小のオーバーラッピング又はDLL4上に異なったエピトープを持っている。

【0330】

B. エピトープマッピング

この実施例では、ウェスタンプロット法により、DLL4上のFabフラグメントの結合エピトープのマッピングを可能にするため、.一連の遺伝子組換えDLL4 細胞外領域切断型変異体が作成、発現、精製された。

1. DLL4発現構築物の生成とトランスフェクション

DLL4の細胞外領域(ECD)を発現するCHO細胞が、Invitrogen FLP-InTM Systemが提供するpcDNA5/FRTベクターを使って作成された。この実施例では、グリセロールストックとしてのpCR-BluntII-TOPO (SEQ ID NO:116)中のヒトDLL4

cDNA (SEQ ID NO:113, 登録番号BC106950, ヌクレオチド配列位置137におけるDLL4の開始コドン; 及びSEQ ID NO:114, 登録番号AAI06951に記載されているコーディングアミノ酸) が、Open Biosystems (クローニングID# 40034887)から得られた。このストックは、カナマイシン寒天プレートにストリーカーされ、DNA精製のためにコロニーが採取された。. DNAは、PurelinkTM クイックプラスミドミニプレップキット (Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen, カタログ # K210010)) を使って得られた。

【0331】

DLL4のECD(SEQ ID

NO:113のヌクレオチド137-1708に対応、及びSEQ ID NO:14のコーディングアミノ酸1-524)を得るため、表44に記載したように、プライマーがPCR用に作成された。これらのプライマーは、その他のDLL4切断フラグメントを作成するためにも使われた(表45を参照)。余分な8個のヌクレオチドとNheI制限部位

(SEQ ID NO:109)が、DLL4 ECD 順方向プライマーを使ってECDの先頭に付加された。 Myc

10

20

30

40

50

タグ、

hisタグ, Not I 制限部位 (SEQ ID

NO:112) 及び 8 個の余分なヌクレオチドが、 DLL4

ECD 逆方向2プライマーを使ってECDの末端に付加された。PCRは、Pfu UltraTM HF ポリメラーゼ(Stratagene, La Jolla, CA; カタログNo. 600385) を使い、メーカーの指示通りに実施された。7個の異なったDLL4 構築物が、表45に記載されているように、異なった組み合わせのPCRプライマーを使って増幅された。

【表 4 4】

10

表 44: DLL4ECD 用 及び DLL4 切断 PCR 用のプライマー

プライマー名前	プライマー	SEQ ID NO
DLLA ECD 顺方向	tgcacccatggggcagggtccgg	119
DLLA ECD 逆方向	cagatcccttcgtggatgggtttttgttccggcaaggccacgggg	120
DLLA ECD 逆方向 2	ttactgcacggccgcgtcatcaatgtgtatgggtatgtatgcagatcccttctgagatg	121
DLLA プレ DSL 逆 方向 1	ttactgcacggccgcgtcatcacagatcccttctgagatgggtttttgttccggtaagatgtatgcacgc	122
DLLA DSL 逆方向 1	ttactgcacggccgcgtcatcacagatcccttctgagatggatgtttttgttccggtaagatgtatgcacgc	123
DLLA Egf1 逆方向 1	ttactgcacggccgcgtcatcacagatcccttctgagatggatgtttttgttccggtaagatgtatgcacgc	124
DLLA Egf2 逆方向 1	CAGATCCCTCTGAGATGAGTTTGTGAGATCTGGTCACAAAC	901
DLLA Egf4 逆方向 1	ttactgcacggccgcgtcatcacagatcccttctgagatggatgtttttgttccggtaagatgtatgcacgc	125
DLLA Egf7 逆方向 1	ttactgcacggccgcgtcatcacagatcccttctgagatggatgtttttgttccggtaagatgtatgcacgc	126

20

【表 4 5】

表 45: *DLL4* 携带物

構築物	増幅用PCRプライマー
DLL4 ECD (アミノ酸1-524)	プライマー-DLL4 ECD 順方向、及びDLL4 ECD 逆方向1及び逆方向2
DLL4 プレDSL (アミノ酸: 1-172)	プライマー-DLL4 ECD 順方向及び DLL4 プレDSL 逆方向1、次に DLL4 ECD 逆方向2
DLL4 DSL (アミノ酸: 1-217)	プライマー-DLL4 ECD 順方向及び DLL4 DSL 逆方向、次に DLL4 ECD 逆方向2
DLL4 Egf1 (アミノ酸: 1-251)	プライマー-DLL4 ECD 順方向及び DLL4 EGFI 逆方向1、次に DLL4 ECD 逆方向2
DLL4 Egf2 (アミノ酸: 1-282)	プライマー-DLL4 ECD 順方向及び DLL4 EGF2 逆方向1、次に DLL4 ECD 逆方向2
DLL4 Egf4 (アミノ酸: 1-360)	プライマー-DLL4 ECD 順方向及び DLL4 EGF4 逆方向1、次に DLL4 ECD 逆方向2
DLL4 Egf7 (アミノ酸: 1-476)	プライマー-DLL4 ECD 順方向及び DLL4 EGF7 逆方向1、次に DLL4 ECD 逆方向2

30

40

【 0 3 3 2 】

各々のPCR 生成物及びpcDNA5/FRT

(SEQ ID NO:117; Invitrogen, Carlsbad, CA, カタログ #

K601001) が、 NheI と NotI (SEQ ID

NOS:109及び112; New England Biosystem)で消化され、そしてPurelinkTM クイックゲルエクストラクション(Quick Gel

Extraction (Purelink™ Quick Gel Extraction) ）と PCR 精製キット (PCR Purification

50

Kit (Invitrogen, カタログ# K220001)) を使ってゲル精製された。ゲル精製生成物は、ラピッドDNAライゲーションキット (Rapid DNA Ligation Kit (Roche, カタログ# 11 635 379 001)) を使って結合されてから、ヒートショックによりOne Shot (R) Max Efficiency (R) DH5 TM-T1R コンピテント細胞(Invitrogen, カタログ # 12297016)へ形質転換された。細胞は、カルベニシリンプレート上で選択された。コロニーが採取され、1:1000希釀カルベニシリン100 mg/mLを含むルリア培地 (LB) で一晩接種された。プラスミドDNA が、ミニプレップ (Invitrogen; カタログ # K2100 11)を使って抽出された。

【0333】

Invitrogen LipofectamineTMトランスフェクション試薬を使い、DLL4 ECD 又は構築物、及びpOG44 リコンビナーゼベクター (SEQ ID NO:118; Invitrogen カタログ # K601001) を含むpcDNA5/FRTが、Flp-InTM Systemの手順 (Invitrogen; Flp-In System Complete Kit Cat. No. K601001)に従って、InvitrogenのFlp-InTM-CHO細胞系統 (Cat. No. R75807) へトランスフェクトされた。細胞は、12ウェルプレートにおいて約90% コンフルエントであった。トランスフェクトされた細胞は、2~3日後、ハイグロマイシン400 μg/ml を使って選択された。コロニーは約5日後に採取され、10 cm² 細胞培養皿へ移された。これらの細胞系統は、ハイグロマイシン選択で維持された。

【0334】

2. ウエスタンプロット法によるエピトープマッピング

トランスフェクトされたCHO細胞からの培地が、7日後に採取された。DLL4 タンパク質を濃縮するため、各試料の1 mL アリコートが、50 μLのTalon 樹脂でバッヂごとに30分間固められた。タンパク質生成を確認するため、培地試料がマウス抗c-myc mAb (Genescript; カタログ # A00704)で検査された。試料を洗浄し、次にDTTの存在又は非存在下でローディングダイを使って沸騰させた。以下の各々の条件下で、ゲルがこれら二つの試料上で流された：DTTあり及びDTTなし。ゲルはPVDF メンブレンへ移され、抗c-myc 0.5 μg/ml, 20nM Fab VH1-46_IGHD6-6*01_IGHJ1*01

H:APFF VLTH & L6_IGKJ1*01 L:NDH LS (SEQ ID NOS:239 及び370) 又は 20 nM Fab VH5-51_IGHD5-18*01>3_IGHJ4*01 H:KT TRV & V3-4_IGLJ1*01 L:LP S52G (SEQ ID NOS:433及び536)のいずれかでプローブされた。検出には、ヤギ抗マウスHRP、ヤギ抗カラバHRP及びヤギ抗ラムダHRP が各々使われた。

【0335】

その結果、ブレDSL構築物から発現したタンパク質を除き、還元的な条件下で全ての発現タンパク質の検出が、抗myc抗体を使って示された。非還元的な条件下では、切断タンパク質だけがDLL4 ECD から発現し、EGF4構築物が抗myc抗体を使って検出された。非還元的な条件下において、EGF7 構築物から発現した切断タンパク質、EGF4構築物、EGF2構築物及びDLL4 ECD 構築物に対する(その他の検査構築物から発現したタンパク質は除く)Fab H:APFF VLTH & L:NDH LSの結合がウエスタンプロット法によって検出された。非還元的な条件下において、EGF7 構築物から発現した切断タンパク質、EGF4構築物、EGF2構築物及びDLL4 ECD 構築物に対する(その他の検査構築物から発現したタンパク質は除く)Fab H:KT TRV & L:LP S52Gの結合が、ウエスタンプロット法によって検出された。これは、H:APFF VLTH & L:NDH LS 抗体で認識されるDLL4 エピトープが、EGF2領域のDLL4のアミノ酸残基252

から 280の範囲内にあり、その一方、H:KT TRV

& L:LP S52G抗体で認識されるエピトープが、EGF3から EGF4領域のDLL4のアミノ酸残基283

から 360の範囲内にあることを示唆している。両方の抗DLL4フラグメントが、ジスルフィド結合の存在下で形成された立体構造エピトープを認識するように思われるが、その理由はこれらの結合が、DLL4タンパク質が最初に還元剤で処理された時に解除されたからであ

10

20

30

40

50

る。

【 0 3 3 6 】

実施例10

ELISA法によるDLL4-Notch 相互作用の阻害

【 0 3 3 7 】

この実施例では、前もってDLL4への結合が同定されているFabフラグメント4個が、Notch-FcのDLL4に対する結合を遮断する能力について機能的にスクリーニングされた。

このELISA アッセイでは、遺伝子組換えヒトDLL4がプレートに結合され、次にFabフラグメント及びNotch-Fcが加えられた。抗ヒトFC-HRP 結合抗体が検出分子として使われ、そのため、もしNotch-FcがDLL4と結合すれば、A450の強いシグナルが観察されるだろう。あるいは、もしFabフラグメントが、DLL4に対するNotch-Fcの結合を遮断できれば、シグナルは観察されないはずである。測定されたDLL4 フラグメントは、Fab H:APF & L6_IGKJ1*01

10

(SEQ ID NOS:155及び141), Fab H:APFF & L6_IGKJ1*01

(SEQ ID NOS:156及び141), Fab H:KT & V3-4_IGLJ1*01

(SEQ ID NOS:385及び142) 及びFab

VH1-46_IGHD3-10*01_IGHJ4*01 & L12_IGKJ1*01 (SEQ ID NOS:134 及び147)を含む。

【 0 3 3 8 】

つまり、Maxisorp

20

Nunc 96- ウエルプレートが、0.5 μ g/ml の遺伝子組換えヒトDLL4 細胞外領域(Cat# 1506-D4-050/CF, R&D

Systems)で、少なくとも2時間コーティングされた。これらのウェルは洗浄され、次に4% BSAで遮断された。遮断に続き、濃度が0.004 から5 μ M のfabs H:APF & L6_IGKJ1*01, Fab H:APFF & L6_IGKJ1*01, H:KT

& V3-4_IGLJ1*01 及びVH1-46_IGHD3-10*01_IGHJ4*01 &

L12_IGKJ1*01 が、濃度10 nMの遺伝子組換えヒトFc-Notch

細胞外領域 (R&D Systems)と共に加えられた。1~2時間のインキュベーションの後、ウェルが洗浄され、1:1000希釈のマウス抗ヒトFC-HRP結合抗体(Southern Biotech)を使ってNotch結合が測定された。HRP活性が、TMB基質(Pierce)を使って検出され、続いて酸中和が実施された。A450 が、SpectraMax Plus 384で計測された。

30

【 0 3 3 9 】

その結果、fabs H:APF

& L6_IGKJ1*01, Fab H:APFF & L6_IGKJ1*01 又はH:KT

& V3-4_IGLJ1*01 を加えるとシグナルが減少し、ゆえにDLL 4 に対するNotch-Fcの結合を遮断する能力を意味する。Fab

VH1-46_IGHD3-10*01_IGHJ4*01 & L12_IGKJ1*01 を加えても活性は一切減少せず、これはFab VH1-46_IGHD3-10*01_IGHJ4*01 & L12_IGKJ1*01 がNotch-DLL4相互作用を遮断しないことを意味している。この結果はまた、fabs

H:APF & L6_IGKJ1*01, Fab H:APFF & L6_IGKJ1*01 及び H:KT & V3-4_IGLJ1*01が、Fab VH1-46_IGHD3-10*01_IGHJ4*01 & L12_IGKJ1*01の場合と比べ、DLL4の異なったエピトープと結合することを意味する。

40

【 0 3 4 0 】

実施例11

フローサイトメトリーによるDLL4-Notch 相互作用の阻害

この実施例では、3個のDLL4 結合Fabフラグメントが、Notch-FcのDLL4に対する結合を遮断する能力について機能的にスクリーニングされた。このアッセイでは、DLL4発現CHO細胞が、Fab及びビオチン化-Notch-Fcの両方の存在下でインキュベートされた。ストレプトアビジンPE が検出分子として使われた。もしNotch-FcがDLL4発現CHO 細胞に結合すれば、これらの細胞は578 nm のPEシグナルによって観察されるだろう。あるいは、もしこ

50

これらのFabフラグメントがDLL4に対するNotch-Fcの結合を遮断すれば、このDLL4発現CHO細胞は標識化されず、また検出されないだろう。測定されたフラグメントは、H:APFF VLTH & L:NDH LS (SEQ ID NOS:239及び370), H:KT TRV & V3-4_IGLJ1*01 (SEQ ID NOS:433及び142)及び H:KT TRV & L:LP S52G (SEQ ID NOS:433及び536)を含む。

【0341】

つまり、実施例8に記載したように、完全長DLL4 (CHO-DLL4)を発現するCHO細胞が、AccutaseTM 酵素細胞剥離培地 (Enzyme Cell Detachment Medium (Cat# 00-4555-56, eBioscience))を使って組織培養プレートから剥離された。Fabフラグメントは、2% BSA/PBS中で、開始濃度50nMから段階的に5倍に希釈された。Notch-FC

10

(cat# 3647-TK-050, R&D Systems)は、EZリンクNHSビオチン試薬 (cat# 20217, Pierce)を、メーカーの指示通りに使用してビオチン化された。

剥離された細胞は、2% BSA/PBS中のビオチン化Notch-FC 250

nM及びFabフラグメント30 μLで処理され、30分間氷上に静置された。次に、PE標識化ストレプトアビシン(Cat# 21627, Pierce-Thermo

20

Scientific)が最後の1:5 希釈液に加えられた後、室温で10分間インキュベーションされた。これらの細胞は、次に2% BSA/PBS 中で二回洗浄され、BD FACSARiaを使ったフローサイトメトリーで分析された。

【0342】

結果は、以下の表46に記載されている。3個全てのFabフラグメントが、CHO-DLL4に対するNotch-Fcの結合を効果的に遮断している。Fab H:APFF VLTH & L:NDH LSは、Fabフラグメント濃度2 nMで、DLL4に対するNotchの結合を80%まで完全に遮断している。Fab H:KT TRV & V3-4_IGLJ1*01は、Fabフラグメント濃度50 nMで、DLL4に対するNotchの結合を50%まで遮断している。Fab H:KT TRV & L:LP S52Gは、Fabフラグメント濃度50 nMで、DLL4に対するNotchの結合を80%まで遮断している。

【表46】

20

表 46. DLL4-Notch 相互作用の阻害

30

Fab [nM]	H:APFF VLTH &		H:KT TRV & L:wt
	L:NDH LS	L:wt	
50	30	141	105
10	30	244	190
2	117	448	250
0.4	277	未検査	324
0	531	531	531

40

【0343】

実施例 12

IgG クローニングと発現

この実施例では、pFUSEベクターにクローニングすることで、DLL4に結合するFab抗体がIg Gに変換された。簡潔には、重鎖及び軽鎖をコードしている配列が、含まれるIL-2 シグナル配列背後のベクター (pFUSE-hIgG2-Fc2, Cat# pfuse-hfc2, InvivoGen) のpFUSE ファミリーに別個にクローニングされた。これら2個のベクターは、次に293F細胞に同時形質転換し、タンパク質が発現して精製された。

軽鎖: Fab軽鎖 (Met Alaシグナルを選別するNターミナル大腸菌 (E. coli) は除外する) をコードしている配列が、EcoRIとNheI末端を含むプライマーを用いたPCRによって増幅

50

された。増幅されたFab軽鎖は、前もってEcoRIとNheIで消化されたpFUSE-hIgG2-Fc2にサブクローニングされた。Fab軽鎖がすぐにIL-2 シグナル配列を模倣し、pFUSE-hIgG2-Fc2中のFc配列を完全に置換する。.

【0344】

重鎖: VHとCH1-CH2-CH3の間にNheI部位を持つ完全長IgG1 重鎖配列がGenscriptで合成され、EcoRI及びXbaI末端を含むプライマーを使ったPCRで増幅されて、前もってEcoRIとNheIで消化された pFUSE-hIgG2-Fc2へサブクローニングされた。XbaI及びNheI適合性付着末端のライゲーションがこの位置の両部位を除去し、この事がIgG1重鎖配列のVH とCH1-CH2-CH3の間にあるNheI部位を独特なものにしている。Fab重鎖 (Met Alaシグナルを選別するNターミナル大腸菌 (E. coli) は除外する) をコードしている配列が、EcoRI及びNheI末端を用いたPCRによって増幅された。完全長IgG1重鎖を含むベクターが次にEcoRIとNheIで消化され、これがVH配列を取り除き、増幅されたFab重鎖が消化済ベクターにサブクローニングされた。このように、Fab重鎖がIL-2 及びIgG1 重鎖の間へサブクローニングされた。

タンパク質の発現と精製: IgGを生成するため、重鎖及び軽鎖プラスミドが、メーカーの指示通りに293フェクチン(fectin)(Cat# 12347, Invitrogen) を使って293F細胞 (Cat# R790-07, Invitrogen) に形質転換された。無血清293

Freestyle 培地 (Cat# 12338026, Invitrogen) で増殖された細胞が、50 mlスピナーフラスコの中で、 1×10^6

cells/mlでトランスフェクトされた。細胞培地はトランスフェクションの3日後と6日後に回収され、Gタンパク質セファロース(GE Healthcare)を使ったカラムクロマトグラフィーでの精製のため、一緒に貯蔵された。IgG 溶出フラクションが貯蔵され、PBSに透析された。

【0345】

実施例13

レポーター・アッセイによるDLL4-Notch相互作用の阻害

この実施例では、ルシフェラーゼレポーター・アッセイを使い、2個のDLL4結合抗体がDLL4依存性Notch1シグナリングを阻害する能力が測定された。ヒトグリオーマT98G 細胞 (これは表面にNotch1があることで知られている(Purow 他. (2005) Cancer Res., 65:23 53-63を参照)) を、6個のC プロモーター結合因子1

(CBF-1) 応答配列 (SEQ ID NO:129に記載; Nefedova他. (2004), Blood. 103(9):3503-10を参照) を含むNotch レポーター・プラスミド(p6xCBF)で安定的にトランスフェクトすることで、レポーター細胞が作成された。引き続き、レポーターT98G 細胞へDLL4-CHO 細胞 (上記の実施例8を参照) を加えると、Notch1-DLL4

相互作用によってホタルルシフェラーゼが発現がした。ゆえに、DLL4結合抗体によるNotch1-DLL4 の阻害が、ルシフェラーゼ発現の減少を引き起こす。

A. Notchレポーター・プラスミド

【0346】

6個のC プロモーター結合因子-1 (CBF-1) 応答配列 (SEQ ID NO:129に記載; CBF Notch 応答配列はボールド体で示されている;

gg tacctgagctcgctagcgatctgggtaaacacgcccgtggaaaaaaatttatggatctgggttaaacacgcccgtggaa
aaaaatttatggagctcgctagcgatctgggttaaacacgcccgtggaaaaaaatttatggatctgggttaaacacgcccgtgg
ggaaaaaaatttatgctcgaggatctgggtaaacacgcccgtggaaaaaaatttatggatctgggttaaacacgcccgtgg
gaaaaaaatttatgaagctt;)を含むレポーター構築物が、KpnI 及び HindIIIで消化された。この消化生成物は、次に2個の異なったルシフェラーゼレポーター・ベクター (pGL4.23 (SEQ ID NO:128; Promega, カタログ# E8411) 及びpGL4.26

(SEQ ID NO:902; Promega, カタログ# E8441)) のKpnI 及びHindIII部位でクローニングされた。pGL4.23ベクターは、標準化のためにウミシイタケルシフェラーゼの同時形質転換を必要とする(以下のセクションB.1を参照)。pGL4.26 ベクターはハイグロマイシン選択

10

20

30

40

50

が可能で、このことが、安定に組み込まれたレポーターのコピーを持つ細胞系列の作成を促進する（以下のセクションB.2を参照）。

両方のレポーターベクターがこのアッセイに適している。以下のセクションB.1.に記載されているように、pGL4.26を使うことで、レポーターを一過性トランスフェクトしたり、各種トランスフェクション効率のための標準化をする必要がなくなる。

【0347】

B. アッセイ

10%ウシ胎児血清（BSA, Invitrogen）と1Xペニシリン/ストレプトマイシン/グルタミン（P/S/G,

Invitrogen）が追加されたイーグルスミニマムエッセンシャル培地（Eagle's Minimum Essential Media (EMEM, Invitrogen)）中のT98G細胞（ATCC (No. CRL-1690TM) の提供による）が、ウェル当たり20,000個の割合で、96ウェル組織培養プレートにプレーティングされた。

【0348】

1.

pGL4.23 p6xCBF レポータープラスミド

翌日、T98G細胞が、ホタルルシフェラーゼ(p6xCBF)を発現したNotch レポーター構築物と、ウミシイタケルシフェラーゼ(pGL4.75, SEQ ID NO:130; Promega, カタログ# E6931)を発現した内部コントロール構築物によってトランスフェクトされた。メーカーの指示に従って、0.04 μgのpGL4.75と0.5 μlのリポフェクタミン2000 (Lipofectamine 2000 (Invitrogen; カタログ # 11668-027)) を添加したp6xCBFをウェル当たり0.16 μg使って、トランスフェクションが実施された。

【0349】

トランスフェクションの24時間後、Notch発現T98G細胞が、DLL4発現CHO細胞（実施例8に記載してあるように）又はコントロールCHO細胞によって刺激された。簡潔には、T98G細胞上の培地が、各々のCHO細胞1

x 106 cells/mlを含むP/S/Gを追加した無血清F12培地100 μlで置き換えられた。インヒビターFab: H:APFF VLTH & L:NDH LS (SEQ ID NOS:239及び370) 及びH:KT TRV & L:LP S52 G (SEQ ID NOS:433及び536) 及びコントロールFab

VH1-69_IGHD1-1*01_IGHJ6*01 & A17_IGKJ1*01 (SEQ ID NOS:572 及び573) が、100, 20, 4 及び0.8

nMの濃度で細胞に付加された。

【0350】

24時間後、レポーターの読み出し値が、Dual-Glo (カタログ# E2920; Promega, Madison WI)を使って評価された。このアッセイシステムは、両方のレポーター（ホタルルシフェラーゼ及びウミシイタケルシフェラーゼ）の定量化を可能にしており、これによって、実験で得られたレポーターの発現の、コントロールレポーターの発現への標準化が、特異的細胞応答と非特異的細胞応答を識別することができる。簡潔には、培地がウェル毎にDual-Glo ルシフェラーゼバッファ75 μlとPBS 25 μlの混合物で置き換えられた。15分のインキュベーションの後、培養プレートのホタル発光がWallac Victor II モデル1420で読み出された。次に、1:100に希釀したDual-Glo Stop & Glo基質を含むDual-Glo Stop & Glo バッファ25 μl が各ウェルに加えられた。このプレートは15分間インキュベートされ、次にウミシイタケルシフェラーゼがWallac Victor II モデル1420 プレートリーダーで読み出された。各々の条件で4回実施され、データは、ホタル発光のカウント毎秒(CPS)をウミシイタケ発光のCPSで除して正規化された。

【0351】

その結果、CHO細胞のみで刺激された細胞は、検査されたFab抗体の全ての投与量においてベースライン発光シグナルを示した。CHO-DLL4発現細胞で刺激された場合は高い発光シグ

10

20

30

40

40

50

ナルが観察され、VH1-69_IGHD1-1*01_IGHJ6*01 & A17_IGKJ1*01 Fab抗体の存在下で、全ての検査濃度において一定の高いレベルを保持した。H:APFF VLTH & L:NDH LS Fabフラグメントの存在下では、Fabフラグメント濃度4 nM及び0.8 nMにおける発光シグナルのレベルが、VH1-69_IGHD1-1*01_IGHJ6*01 & A17_IGKJ1*01 Fab抗体の存在下で観察されたものと類似した。対照的に、より高いFabフラグメント濃度20 nM 及び100 nMにおける H:APFF VLTH & L:NDH LS 抗体の存在下では、CHO-DLL4細胞に刺激されて観察される発光シグナルは減少し、Fabフラグメント濃度100 nMにおいてはベースラインシグナルに接近した。

【0352】

2.

10

pGL4.26 p6xCBF レポータープラスミド

翌日、T98G細胞が、ホタルルシフェラーゼ(p6xCBF)を発現したNotch レポーター構築物でトランスフェクトされ、安定した組込み体が200ug/mlのハイグロマイシンB (Invitrogen)で選択された。 DLL4を発現したCHO細胞又はコントロールCHO細胞が、10% FBS 及びP/S/Gを追加したF12 培地 (Invitrogen)中で増殖された。これとは別に、10% FBS及びP/S/Gを含むEMEM中のT98G Notch レポーター細胞 (2 × 105 cells/well) が、96ウェル組織培養プレートへプレーティングされた。Notch発現T98G細胞が、CHO-DLL4又はコントロールCHO細胞(1 × 105 cells/well)で刺激された。T98G 細胞上の培地は、P/S/Gを追加した無血清F12 培地100 μlで置き換えられた。Fabs H:APFF VLTH

20

& L:NDH LS及びH:KT TRV & L:LP S52Gとこれらに対応するIgGs, 及びコントロールFab フラグメント(DLL4と結合しない)が、100, 20, 4 及び0.8 nMの濃度で加えられた。24時間後、ルシフェラーゼレポーター発現が、Bright-Gloルシフェラーゼアッセイ試薬(Cat# E2620, Promega)で測定された。発光は、Wallac Victor II モデル1420 プレートリーダーで読み出された。各条件において4回実施された。

【0353】

その結果、CHO細胞 (DLL4を発現していない) は、単独又はいかなる抗体との組合せにおいてもNotch レポーターを活性化しないことが示された。CHO-DLL4を使ったT98Gレポーター細胞のインキュベーションは、CHO細胞単独でインキュベートされたもの比べて、Notchレポーターのレベルが8~9倍に増強される結果になった。Notch活性化は、DLL4と結合しないコントロールFabフラグメントの存在下では一定のままであった。活性化は、抗DLL4 Fabs

30

H:APFF VLTH & L:NDH LS 及び H:KT TRV & L:LP S52Gの濃度増大の存在下で減少した。IgG H:APFF VLTH & L:NDH LS (IC50 ~ 6 nM)は、Fab H:APFF VLTH & L:NDH LSと比較し、NotchのDLL4に対する結合を30倍効果的に阻害した。Fab H:KT TRV & L:LP S52Gと比較し、IgG H:KT

TRV & L:LP S52Gもまた、Notch1のDLL4に対する結合をより効果的に阻害し、0.8 nMの濃度においてNotch活性が約30%減少することを示している。より高い濃度において、IgG H:KT TRV

40

& L:LP S52GはNotch活性の完全な抑制を示さなかった。.

【0354】

実施例14

DLL4/Jag1の阻害

この実施例では、Notch経路の活性化がC2C12 筋芽細胞の分化を妨げるような細胞アッセイについて記載する(例えば Jarriault 他., 1998 Molecular and Cellular Biology, 18:7423-7431を参照)。Notch経路を活性化させるために、DLL4又はJag1のようなNotchリガンドが、細胞表面に完全長タンパク質として発現されなければならない。このNotch活性化を実現するため、NotchリガンドDLL4又はJa

50

g1を異所的又は自然に発現する非付着細胞がC2C12細胞と共に培養され、Fabフラグメントが選択される。DLL4又はJag1の機能阻害は、Fabフラグメントが分化を促進する能力によって評価され、これはNotch経路の不活性化を意味している。チューブ状構造体への分化は、形態的に簡単に識別可能であり、さらに、トロポニンt (Sigma-Aldrich)に対する抗体を使って検出することができる。

つまり、C2C12マウス筋芽細胞が、Jag1発現IM9細胞（ヒトリンパ芽球細胞系統）とFabフラグメントの存在及び非存在下で培養される。これらの細胞は、10% FBS（ウシ胎児血清）を含むDMEM中の12 ウェルディッシュのカバーガラスにプレーティングされる。翌日、付着C2C12 細胞が、分化を誘発するために1% FBS を含むDMEM へ移される。インキュベーションに続いて、これらの細胞は、筋管への分化が発生したかどうかを観察するために可視化される。低血清条件は筋管の分化を誘発する一方、Jag1発現IM9細胞は低血清条件においてC2C12細胞を未分化状態のまま維持する。

10

【0355】

変更形態は当業者にとって明らかであるため、この発明は添付された特許請求の範囲によってのみ限定されることが意図されている。

【図1-A】

Heavy Chain VH1-46_IGHD6-6*01_IGHJ1*01																																
FW1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25							
	Q	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S							
Kabat	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25							
Chothia	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25							
	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35																						
CDRH1	G	Y	T	F	T	S	Y	Y	M	H																						
Kabat	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35																						
Chothia	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35																						
	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49																		
FW2	W	V	R	Q	A	P	G	Q	G	L	E	W	M	G																		
Kabat	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49																		
Chothia	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49																		
	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66															
CDRH2	I	I	N	P	S	G	G	S	T	S	Y	A	Q	K	F	Q	G															
Kabat	50	51	52	a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65															
Chothia	50	51	52	a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65															
	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94				
FW3	R	V	T	M	T	R	D	T	S	T	S	T	V	Y	M	E	L	S	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	C	A		
Kabat	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	a	b	c	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	'94
Chothia	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	a	b	c	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94
	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111																			
CDRH3	E	E	Y	S	S	S	S	A	E	Y	F	Q	H																			
Kabat	95	96	97	98	99	100	a	b	c	d	e	101	102																			
Chothia	95	96	97	98	99	100	a	b	c	d	e	101	102																			
	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124																			
FW4	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	A	S																			
Kabat	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113																					
Chothia	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113																					

FIGURE 1A

【図1-B】

Light Chain L6_IGKJ1*01

FW1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23									
	E	I	V	L	T	Q	S	P	A	E	V	K	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C										
Kabat	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23									
Chothia	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23									
CDRL1	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34																					
Kabat	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34																					
Chothia	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34																					
FW2	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49																	
	W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	I	Y																	
Kabat	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49																	
Chothia	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49																	
CDRL2	50	51	52	53	54	55	56																									
Kabat	50	51	52	53	54	55	56																									
Chothia	50	51	52	53	54	55	56																									
FW3	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88
	G	I	P	A	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	E	P	E	D	F	A	V	Y	Y	C		
Kabat	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88
Chothia	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88
CDRL3	89	90	91	92	93	94	95	96	97																							
Kabat	89	90	91	92	93	94	95	a	96	97																						
Chothia	89	90	91	92	93	94	95	a	96	97																						
FW4	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110																				
	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	T																				
Kabat	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109																				
Chothia	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109																				

FIGURE 1B

【図2-A】

Heavy Chain VH5-51_IGHD5-18*01>3_IGHJ4*01

FW1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25							
	E	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	E	S	L	K	I	S	C	K	G	S							
Kabat	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25							
Chothia	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25							
CDRH1	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35																						
	G	Y	S	F	T	S	Y	W	I	G																						
Kabat	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35																						
Chothia	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35																						
FW2	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49																		
	W	V	R	Q	M	P	G	K	G	L	E	W	M	G																		
Kabat	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49																		
Chothia	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49																		
CDRH2	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65																
	I	I	Y	P	G	D	S	D	T	R	Y	S	P	S	F	Q	G															
Kabat	50	51	52	a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65															
Chothia	50	51	52	a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65															
FW3	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98
	Q	V	T	I	S	A	D	K	S	I	S	T	A	Y	L	Q	W	S	S	L	K	A	S	D	T	A	M	Y	Y	C	A	R
Kabat	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	a	b	c	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94
Chothia	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	a	b	c	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94
CDRH3	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110																				
	R	G	Y	S	Y	G	Y	D	Y	F	D	Y																				
Kabat	95	96	97	98	99	100	a	b	c	d	101	102																				
Chothia	95	96	97	98	99	100	a	b	c	d	101	102																				
FW4	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123																			
	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	A	S																			
Kabat	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113																					
Chothia	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113																					

FIGURE 2A

【図2-B】

Light Chain V3-4_IGLJ1*01

FW1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22		
	Q	T	V	V	T	Q	E	P	S	-	F	S	V	S	P	G	G	T	V	T	L	T	C	
Kabat	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
Chothia	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35											
CDRL1	G	L	S	S	G	S	V	S	T	S	Y	Y	P											
Kabat	24	25	26	27	a	b	c	28	29	30	31	32	33											
Chothia	24	25	26	27	28	29	30	a	b	c	31	32	33											
	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51								
FW2	S	W	Y	Q	Q	T	P	G	Q	A	P	R	T	L	I	Y								
Kabat	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49								
Chothia	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49								
	52	53	54	55	56	57	58																	
CDRL2	S	T	N	T	R	S	S																	
Kabat	50	51	52	53	54	55	56																	
Chothia	50	51	52	53	54	55	56																	
	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	
FW3	G	V	P	D	R	F	S	G	S	I	L	G	N	K	A	A	L	T	I	T	G	A	Q	
Kabat	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
Chothia	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101													
CDRL3	V	L	Y	M	G	S	G	I	S	Y	V													
Kabat	89	90	91	92	93	94	95	a	b	96	97													
Chothia	89	90	91	92	93	94	95	a	b	96	97													
	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110														
FW4	F	G	T	G	T	K	V	T	V	L														
Kabat	98	99	100	101	102	103	104	105	106	a														
Chothia	98	99	100	101	102	103	104	105	106	a														

FIGURE 2B

【配列表】

2012508017000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International application No PCT/US2009/063303
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/22 C12N15/13		
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) C07K A61P A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2008/042236 A2 (ONCOMED PHARMACEUTICALS INC [US]; GURNEY AUSTIN [US]; HOEY TIMOTHY [US] 10 April 2008 (2008-04-10) claims 32-63; examples 1,3,4	1-135
X	WO 2007/143689 A2 (BABAEV EILAZ [US]) 13 December 2007 (2007-12-13) page 00, line 22 - line 27; examples 3-5,7	1-135
X	WO 2008/076379 A2 (REGENERON PHARMA [US]; PAPADOPOULOS NICHOLAS J [US]; MARTIN JOEL H [US] 26 June 2008 (2008-06-26) paragraph [0095]; examples 1-3	1-135
X	WO 2008/060705 A2 (GENENTECH INC [US]; YAN MINHONG [US]; WU YAN [US]) 22 May 2008 (2008-05-22) claims; examples 2-6,10	1-135
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of Box C.	<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		
E earlier document but published on or after the International filing date		
L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
P document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed		
T later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention		
X document of particular relevance; the claimed Invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone		
Y document of particular relevance; the claimed Invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.		
Z document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the International search	Date of mailing of the International search report	
22 January 2010	08/04/2010	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-2016	Authorized officer Siaterli, Maria	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2009/063303

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, P	WO 2008/139202 A1 (SMART TARGETING LTD [GB]; SUNAMURA MAKOTO [JP]; YAGITA HIDEO [JP]) 20 November 2008 (2008-11-20) claims 1-12,21-22,24,25,28-29	1-135
X, P	HOEY TIMOTHY ET AL: "DLL4 blockade inhibits tumor growth and reduces tumor-initiating cell frequency." CELL STEM CELL 7 AUG 2009, vol. 5, no. 2, 7 August 2009 (2009-08-07), pages 168-177, XP002564818 ISSN: 1875-9777 page 168, right-hand column, last paragraph - page 169, left-hand column, paragraph 1; figures 3-5	1-135
X	RIDGWAY JOHN ET AL: "Inhibition of Dll4 signalling inhibits tumour growth by deregulating angiogenesis" NATURE, NATURE PUBLISHING GROUP, LONDON, UK, vol. 444, no. 7122, 21 December 2006 (2006-12-21), pages 1083-1087, XP002489428 ISSN: 0028-0836 page 1083, left-hand column, paragraph 1; figure 3	1-135

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2009/063303

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:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box 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:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional 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.:

60-67(partially)

Remark on Protest

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

International Application No. PCT/US2009 /063303

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/SA/ 210

Continuation of Box II.2

Claims Nos.:

Present claims 1-59,68-135 relate to an extremely large number of possible anti human DLL4 antibodies . Support and disclosure in the sense of Article 6 and 5 PCT is to be found however for only a very small proportion of the antibodies claimed, see tables 11,30-31 and examples .The non-compliance with the substantive provisions is to such an extent, that the search was performed taking into consideration the non-compliance in determining the extent of the search of said claims (PCT Guidelines 9.19 and 9.23).

The search of claims 1-59,68-135 was restricted to those claimed antibodies which appear to be supported and/or disclosed and a generalisation thereof i.e definition by a specific combination of the 6 CDR's.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.2), should the problems which led to the Article 17(2)PCT declaration be overcome.

International Application No. PCT/US2009/063303

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-135(partially)

an anti DLL4 antibody comprising a VH chain comprising a sequence of amino acids set forth in SEQ ID NO: 131 and a VL chain comprising a sequence of amino acids set forth in SEQ ID NO: 141 and variants thereof shown in table 30

2. claims: 1-135(partially)

an anti DLL4 antibody comprising a VH chain comprising a sequence of amino acids set forth in SEQ ID NO: 132 and a VL chain comprising a sequence of amino acids set forth in SEQ ID NO: 142 and variants thereof shown in table 31

3. claims: 1-135(partially)

an anti DLL4 antibody comprising a VH chain comprising a sequence of amino acids set forth in SEQ ID NO: 133 and a VL chain comprising a sequence of amino acids set forth in SEQ ID NO: 143

4. claims: 1-135(partially)

an anti DLL4 antibody comprising a VH chain comprising a sequence of amino acids set forth in SEQ ID NO: 135 and a VL chain comprising a sequence of amino acids set forth in SEQ ID NO: 145

5. claims: 1-135(partially)

an anti DLL4 antibody comprising a VH chain comprising a sequence of amino acids set forth in SEQ ID NO: 137 and a VL chain comprising a sequence of amino acids set forth in SEQ ID NO: 146

6. claims: 1-135(partially)

an anti DLL4 antibody comprising a VH chain comprising a sequence of amino acids set forth in SEQ ID NO: 135 and a VL chain comprising a sequence of amino acids set forth in SEQ ID NO: 144

7. claims: 1-135(partially)

International Application No. PCT/US2009/063303

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

an anti DLL4 antibody comprising a VH chain comprising a sequence of amino acids set forth in SEQ ID NO: 138 and a VL chain comprising a sequence of amino acids set forth in SEQ ID NO: 147

8. claims: 1-135(partially)

an anti DLL4 antibody comprising an anti DLL4 antibody comprising a VH chain comprising a sequence of amino acids set forth in SEQ ID NO: 136 and a VL chain comprising a sequence of amino acids set forth in SEQ ID NO:147

9. claims: 1-135(partially)

an anti DLL4 antibody comprising a VH chain comprising a sequence of amino acids set forth in SEQ ID NO: 134 and a VL chain comprising a sequence of amino acids set forth in SEQ ID NO:147

10. claims: 1-135(partially)

an anti DLL4 antibody comprising a VH chain comprising a sequence of amino acids set forth in SEQ ID NO: 5 139 and a VL chain comprising a sequence of amino acids set forth in SEQ ID NO: 147

11. claims: 1-135(partially)

an anti DLL4 antibody comprising a VH chain comprising a sequence of amino acids set forth in SEQ ID NO: 135 and a VL chain comprising a sequence of amino acids set forth in SEQ ID NO:148

12. claims: 1-135(partially)

an anti DLL4 antibody comprising a VH chain comprising a sequence of amino acids set forth in SEQ ID NO: 137 and a VL chain comprising a sequence of amino acids set forth in SEQ ID NO: 149

13. claims: 1-135(partially)

an anti DLL4 antibody comprising a VH chain comprising a sequence of amino acids set forth in SEQ ID NO: 140 and a VL chain comprising a sequence of amino acids set forth in SEQ ID NO:149

14. claims: 1-135(partially)

International Application No. PCT/US2009/063303

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

an anti DLL4 antibody comprising a VH chain comprising a sequence of amino acids set forth in SEQ ID NO: 137 and a VL chain comprising a sequence of amino acids set forth in SEQ ID NO: 150

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2009/063303

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 2008042236	A2 10-04-2008	AU 2007305443 A1 CA 2664738 A1 CR 10667 A EA 200970335 A1 EP 2066694 A2 JP 2010504755 T KR 20090078334 A US 2008187532 A1		10-04-2008 10-04-2008 25-05-2009 30-10-2009 10-06-2009 18-02-2010 17-07-2009 07-08-2008
WO 2007143689	A2 13-12-2007	AR 061245 A1 AU 2007256617 A1 CA 2654304 A1 CR 10529 A EC SP099032 A EP 2029159 A2 JP 2009539870 T KR 20090016762 A US 2008014196 A1		13-08-2008 13-12-2007 13-12-2007 02-03-2009 27-02-2009 04-03-2009 19-11-2009 17-02-2009 17-01-2008
WO 2008076379	A2 26-06-2008	AU 2007334366 A1 CA 2672622 A1 CR 10863 A EC SP099404 A EP 2115003 A2 KR 20090088936 A SV 2009003296 A US 2008181899 A1 US 2009017035 A1 US 7534868 B1		26-06-2008 26-06-2008 23-07-2009 31-07-2009 11-11-2009 20-08-2009 27-10-2009 31-07-2008 15-01-2009 19-05-2009
WO 2008060705	A2 22-05-2008	AR 061246 A1 AU 2007319672 A1 CA 2654000 A1 EC SP099027 A EP 2032604 A2 JP 2009539384 T KR 20090027227 A US 2008175847 A1		13-08-2008 22-05-2008 22-05-2008 27-02-2009 11-03-2009 19-11-2009 16-03-2009 24-07-2008
WO 2008139202	A1 20-11-2008	EP 2167542 A1 GB 2449354 A		31-03-2010 19-11-2008

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 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 C 0 8 5	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	1 0 1	4 H 0 4 5
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08		
C 1 2 N 15/02 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	C	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00		
A 6 1 K 9/06 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1	
A 6 1 K 9/02 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N	
A 6 1 K 9/08 (2006.01)	A 6 1 K 9/06		
A 6 1 K 9/10 (2006.01)	A 6 1 K 9/02		
A 6 1 K 9/12 (2006.01)	A 6 1 K 9/08		
A 6 1 K 9/20 (2006.01)	A 6 1 K 9/10		
A 6 1 K 9/14 (2006.01)	A 6 1 K 9/12		
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 9/20		
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 K 9/14		
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/00		
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	1 0 1	
A 6 1 P 15/00 (2006.01)	A 6 1 P 19/02		
G 0 1 N 33/543 (2006.01)	A 6 1 P 27/02		
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 P 15/00		
G 0 1 N 33/531 (2006.01)	G 0 1 N 33/543	5 9 5	
	G 0 1 N 33/53	D	
	G 0 1 N 33/531	A	

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

(72)発明者 コーネリア エイ. ベントレイ

アメリカ合衆国、カリフォルニア州 92122、サンディエゴ市、ロビンス ストリート 43
59

(72)発明者 タイソン チェイス

アメリカ合衆国、カリフォルニア州 92126、サンディエゴ市、カプリコーン ウェイ 84
30 3号

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA45 CA04 DA02 DA06 EA02 EA04 GA11

4B064 AG27 BJ12 CA10 CA19 DA01

4B065 AA90Y AA93X AB01 BA02 CA25 CA44

4C076 AA01 AA09 AA11 AA22 AA24 AA29 AA36 BB01 BB13 BB16

BB21 BB25 BB27 BB30 CC29

4C084 AA19 MA02 MA13 MA17 MA23 MA28 MA31 MA52 MA55 MA59

NA05 NA12 NA14 ZA33 ZA45 ZA81 ZA96 ZB11 ZB26 ZC41

ZC75

4C085 AA13 AA14 EE01 EE03 GG02 GG04 GG08 GG10

4H045 AA11 AA20 AA30 BA41 CA40 DA76 EA28 FA74