
	(19) 대한민국특허청(KR)	(11) 공개번호 10-2012-0089659
	(12) 공개특허공보(A)	(43) 공개일자 2012년08월13일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>C07K 16/28</i> (2006.01) <i>C12N 15/13</i> (2006.01) <i>A61K 39/395</i> (2006.01) <i>A61P 35/00</i> (2006.01)	(71) 출원인 아보트 러보러티리즈 미국 일리노이주 60064-6008 아보트 파크 아보트 파크 로드 100 디파트먼트 377 빌딩 에이피6 에이-1	
(21) 출원번호 10-2012-700804	(72) 발명자 베나틀 로렌조 미국 메사추세츠주 01532 노스버러 모호크 드라이 브 33	
(22) 출원일자(국제) 2010년08월27일 심사청구일자 없음	(85) 번역문제출일자 2012년03월29일 보가에르트 어원 알. 미국 위스콘신주 53158 플레전트 프레리 스프링브 룩 로드 4510 (뒷면에 계속)	
(86) 국제출원번호 PCT/US2010/047006	(87) 국제공개번호 WO 2011/025964 국제공개일자 2011년03월03일	
(30) 우선권주장 61/238,152 2009년08월29일 미국(US) 61/261,728 2009년11월16일 미국(US)	(74) 대리인 장준	

전체 청구항 수 : 총 170 항

(54) 발명의 명칭 치료용 DLL4 결합 단백질

(57) 요 약

개량된 DLL4 결합 단백질, 예컨대 항체, CDR-이식 항체, 사람 항체 및 이의 DLL4 결합 단편 및 DLL4와 높은 친화성으로 결합하는 단백질, 및 DLL4 활성을 중화시키는 DLL4 결합 단백질이 기술된다. DLL4 결합 단백질은 암 및 종양의 치료 또는 예방에 유용하며, 특히 종양 혈관신생 및/또는 다른 혈관신생-의존성 질환 (예, 암구내 신생혈관형성) 또는 DLL4 이상 발현 또는 활성을 특징으로 하는 혈관신생-독립성 질환(예, 다발성 경화증을 포함한 자가 면역 장애)의 치료 또는 예방에 유용하다.

(72) 발명자

구 지지에

미국 메사추세츠주 01545 슈로즈버리 크림슨 드라
이브 19

헤리스 마리아

미국 메사추세츠주 01545 슈로즈버리 트로브리지
레인 55

힉슨 조나단 에이.

미국 일리노이주 60046 레이크 빌라 노스와인드 레
인 725

시에 총-밍

미국 메사추세츠주 02459 뉴턴 올데 월드 로드 22

커츠코바 올리야

미국 메사추세츠주 01532 노스버러 휘트니 스트리
트 183

리 잉춘

미국 일리노이주 60089 베팔로 그로브 뉴필드 드라
이브 103

류 즈홍

미국 일리노이주 60031 거니 그레이스톤 애비뉴
1455

모르간-라페 수잔

미국 일리노이주 60656 시카고 노스 챈필드 애비뉴
5419

특허청구의 범위

청구항 1

사람 DLL4와 결합할 수 있고 하기로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 CDR을 포함하는 항원 결합 도메인을 포함하는, 결합 단백질:

CDR-H1: $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7$ (서열번호 99) (여기서,

X_1 은 S 또는 N이고;

X_2 는 S, G 또는 N이며;

X_3 은 S, N, T, G 또는 R이고;

X_4 는 Y이며;

X_5 는 Y 또는 H이고;

X_6 은 W이며;

X_7 은 G이다);

CDR-H2: $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}-X_{13}-X_{14}-X_{15}-X_{16}$ (서열번호 100) (여기서,

X_1 은 D이고;

X_2 는 I이며;

X_3 은 Y, N 또는 S이고;

X_4 는 Y이며;

X_5 는 T, N, A, I, S 또는 R이고;

X_6 은 G이며;

X_7 은 S, N, T 또는 G이고;

X_8 은 T이며;

X_9 는 Y이고;

X_{10} 은 Y이며;

X_{11} 은 N이고;

X_{12} 는 P이며;

X_{13} 은 S이고;

X_{14} 는 L이며;

X_{15} 는 K이고;

X_{16} 은 S, N, D 또는 G이다);

CDR-H3: $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}$ (서열번호 101) (여기서,

X_1 은 E, Y, F, Q, W, L 또는 A이고;

X_2 는 D, A, S, G, V, E 또는 N이며;

X_3 은 V, M, L, P 또는 A이고;

X_4 는 I, A, P, R, S, K, Q, V, G, M 또는 E이며;

X_5 는 L, Y, F 또는 M이고;

X_6 은 R, G, S, Q 또는 A이며;

X_7 은 G이고;

X_8 은 G, A 또는 S이며;

X_9 는 S, A, L, V, R 또는 G이고;

X_{10} 은 D이며;

X_{11} 은 Y, D, S, N, H, E, R, L, P, C, I, M, T, Q 또는 K이다);

CDR-L1: $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}$ (서열번호 102) (여기서,

X_1 은 S이고;

X_2 는 G이며;

X_3 은 Q, E 또는 D이고;

X_4 는 R, S, G, M, K, L 또는 T이며;

X_5 는 L이고;

X_6 은 G이며;

X_7 은 D 또는 E이고;

X_8 은 K이며;

X_9 는 Y이고;

X_{10} 은 A 또는 V이며;

X_{11} 은 S이다);

CDR-L2: $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7$ (서열번호 103) (여기서,

X_1 은 E 또는 Q이고;

X_2 는 D이며;

X_3 은 S, L, T, A, E 또는 F이고;

X_4 는 K, T, E, N, Q, S 또는 M이며;

X_5 는 R이고;

X_6 은 P이며;

X_7 은 S이다); 및

CDR-L3: $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9$ (서열번호 104) (여기서,

X_1 은 Q이고;

X_2 는 A이며;

X_3 은 W이고;

X_4 는 D이며;

X_5 는 R, S, M, E, N, G 또는 K이고;

X_6 은 D 또는 E이며;

X_7 은 T, V, A, S 또는 M이고;

X_8 은 G, A 또는 C이며;

X_9 는 V이다).

청구항 2

제1항에 있어서, 상기된 하나 이상의 CDR이 하기로 이루어진 그룹 중에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는, 결합 단백질:

서열번호 1의 잔기 31-37 (CDR-H1); 서열번호 1의 잔기 52-67 (CDR-H2); 서열번호 1의 잔기 100-110 (CDR-H3);

서열번호 111의 잔기 23-33 (CDR-L1); 서열번호 111의 잔기 49-55 (CDR-L2); 서열번호 111의 잔기 88-96 (CDR-L3);

서열번호 117 (CDR-H1); 서열번호 118 (CDR-H2); 서열번호 119 (CDR-H3);

서열번호 121 (CDR-H1); 서열번호 122 (CDR-H2); 서열번호 123 (CDR-H3);

서열번호 125 (CDR-H1); 서열번호 126 (CDR-H2); 서열번호 127 (CDR-H3);

서열번호 129 (CDR-H1); 서열번호 130 (CDR-H2); 서열번호 131 (CDR-H3);

서열번호 133 (CDR-H1); 서열번호 134 (CDR-H2); 서열번호 135 (CDR-H3);

서열번호 137 (CDR-H1); 서열번호 138 (CDR-H2); 서열번호 139 (CDR-H3);

서열번호 141 (CDR-H1); 서열번호 142 (CDR-H2); 서열번호 143 (CDR-H3);

서열번호 145 (CDR-H1); 서열번호 146 (CDR-H2); 서열번호 147 (CDR-H3);

서열번호 149 (CDR-H1); 서열번호 150 (CDR-H2); 서열번호 151 (CDR-H3);

서열번호 153 (CDR-H1); 서열번호 154 (CDR-H2); 서열번호 155 (CDR-H3);

서열번호 157 (CDR-H1); 서열번호 158 (CDR-H2); 서열번호 159 (CDR-H3);

서열번호 161 (CDR-H1); 서열번호 162 (CDR-H2); 서열번호 163 (CDR-H3);

서열번호 165 (CDR-H1); 서열번호 166 (CDR-H2); 서열번호 167 (CDR-H3);

서열번호 169 (CDR-H1); 서열번호 170 (CDR-H2); 서열번호 171 (CDR-H3);

서열번호 173 (CDR-H1); 서열번호 174 (CDR-H2); 서열번호 175 (CDR-H3);

서열번호 177 (CDR-H1); 서열번호 178 (CDR-H2); 서열번호 179 (CDR-H3);

서열번호 181 (CDR-H1); 서열번호 182 (CDR-H2); 서열번호 183 (CDR-H3);

서열번호 185 (CDR-H1); 서열번호 186 (CDR-H2); 서열번호 187 (CDR-H3);
 서열번호 189 (CDR-H1); 서열번호 190 (CDR-H2); 서열번호 191 (CDR-H3);
 서열번호 193 (CDR-H1); 서열번호 194 (CDR-H2); 서열번호 195 (CDR-H3);
 서열번호 197 (CDR-H1); 서열번호 198 (CDR-H2); 서열번호 199 (CDR-H3);
 서열번호 201 (CDR-H1); 서열번호 202 (CDR-H2); 서열번호 203 (CDR-H3);
 서열번호 205 (CDR-H1); 서열번호 206 (CDR-H2); 서열번호 207 (CDR-H3);
 서열번호 209 (CDR-H1); 서열번호 210 (CDR-H2); 서열번호 211 (CDR-H3);
 서열번호 213 (CDR-H1); 서열번호 214 (CDR-H2); 서열번호 215 (CDR-H3);
 서열번호 217 (CDR-L1); 서열번호 218 (CDR-L2); 서열번호 219 (CDR-L3);
 서열번호 221 (CDR-L1); 서열번호 222 (CDR-L2); 서열번호 223 (CDR-L3);
 서열번호 225 (CDR-L1); 서열번호 226 (CDR-L2); 서열번호 227 (CDR-L3);
 서열번호 229 (CDR-L1); 서열번호 230 (CDR-L2); 서열번호 231 (CDR-L3);
 서열번호 233 (CDR-L1); 서열번호 234 (CDR-L2); 서열번호 235 (CDR-L3);
 서열번호 237 (CDR-L1); 서열번호 238 (CDR-L2); 서열번호 239 (CDR-L3);
 서열번호 241 (CDR-L1); 서열번호 242 (CDR-L2); 서열번호 243 (CDR-L3);
 서열번호 245 (CDR-L1); 서열번호 246 (CDR-L2); 서열번호 247 (CDR-L3);
 서열번호 249 (CDR-L1); 서열번호 250 (CDR-L2); 서열번호 251 (CDR-L3);
 서열번호 253 (CDR-L1); 서열번호 254 (CDR-L2); 서열번호 255 (CDR-L3);
 서열번호 257 (CDR-L1); 서열번호 258 (CDR-L2); 서열번호 259 (CDR-L3);
 서열번호 261 (CDR-L1); 서열번호 262 (CDR-L2); 서열번호 263 (CDR-L3);
 서열번호 265 (CDR-L1); 서열번호 266 (CDR-L2); 서열번호 267 (CDR-L3);
 서열번호 269 (CDR-L1); 서열번호 270 (CDR-L2); 서열번호 271 (CDR-L3);
 서열번호 273 (CDR-L1); 서열번호 274 (CDR-L2); 서열번호 275 (CDR-L3);
 서열번호 277 (CDR-L1); 서열번호 278 (CDR-L2); 서열번호 279 (CDR-L3);
 서열번호 281 (CDR-L1); 서열번호 282 (CDR-L2); 서열번호 283 (CDR-L3);
 서열번호 285 (CDR-L1); 서열번호 286 (CDR-L2); 서열번호 287 (CDR-L3);
 서열번호 289 (CDR-L1); 서열번호 290 (CDR-L2); 서열번호 291 (CDR-L3);
 서열번호 293 (CDR-L1); 서열번호 294 (CDR-L2); 서열번호 295 (CDR-L3);
 서열번호 297 (CDR-L1); 서열번호 298 (CDR-L2); 서열번호 299 (CDR-L3);
 서열번호 301 (CDR-L1); 서열번호 302 (CDR-L2); 서열번호 303 (CDR-L3);
 서열번호 305 (CDR-L1); 서열번호 306 (CDR-L2); 서열번호 307 (CDR-L3);
 서열번호 309 (CDR-L1); 서열번호 310 (CDR-L2); 서열번호 311 (CDR-L3);
 서열번호 313 (CDR-L1); 서열번호 314 (CDR-L2); 서열번호 315 (CDR-L3);
 서열번호 334의 잔기 31-37 (CDR-H1); 서열번호 334의 잔기 52-67 (CDR-H2); 서열번호 334의 잔기 100-110 (CDR-H3);
 서열번호 335의 잔기 23-33 (CDR-L1); 서열번호 335의 잔기 49-55 (CDR-L2); 서열번호 335의 잔기 88-96 (CDR-L3)

L3);

서열번호 336의 잔기 31-37 (CDR-H1); 서열번호 336의 잔기 52-67 (CDR-H2); 서열번호 336의 잔기 100-110 (CDR-H3);

서열번호 337의 잔기 23-33 (CDR-L1); 서열번호 337의 잔기 49-55 (CDR-L2); 서열번호 337의 잔기 88-96 (CDR-L3);

서열번호 338의 잔기 31-37 (CDR-H1); 서열번호 338의 잔기 52-67 (CDR-H2); 서열번호 338의 잔기 100-110 (CDR-H3);

서열번호 339의 잔기 23-33 (CDR-L1); 서열번호 339의 잔기 49-55 (CDR-L2); 서열번호 339의 잔기 88-96 (CDR-L3);

서열번호 340의 잔기 31-37 (CDR-H1); 서열번호 340의 잔기 52-67 (CDR-H2); 서열번호 340의 잔기 100-110 (CDR-H3);

서열번호 341의 잔기 23-33 (CDR-L1); 서열번호 341의 잔기 49-55 (CDR-L2); 서열번호 341의 잔기 88-96 (CDR-L3);

서열번호 342의 잔기 31-37 (CDR-H1); 서열번호 342의 잔기 52-67 (CDR-H2); 서열번호 342의 잔기 100-110 (CDR-H3);

서열번호 343의 잔기 23-33 (CDR-L1); 서열번호 343의 잔기 49-55 (CDR-L2); 서열번호 343의 잔기 88-96 (CDR-L3);

서열번호 344의 잔기 31-37 (CDR-H1); 서열번호 344의 잔기 52-67 (CDR-H2); 서열번호 344의 잔기 100-110 (CDR-H3);

서열번호 345의 잔기 24-34 (CDR-L1); 서열번호 345의 잔기 50-56 (CDR-L2); 서열번호 345의 잔기 89-97 (CDR-L3);

서열번호 346의 잔기 31-37 (CDR-H1); 서열번호 346의 잔기 52-67 (CDR-H2); 서열번호 346의 잔기 100-110 (CDR-H3);

서열번호 347의 잔기 23-33 (CDR-L1); 서열번호 347의 잔기 49-55 (CDR-L2); 서열번호 347의 잔기 88-96 (CDR-L3);

서열번호 348의 잔기 31-37 (CDR-H1); 서열번호 348의 잔기 52-67 (CDR-H2); 서열번호 348의 잔기 100-110 (CDR-H3);

서열번호 349의 잔기 24-34 (CDR-L1); 서열번호 349의 잔기 50-56 (CDR-L2); 서열번호 349의 잔기 89-97 (CDR-L3);

서열번호 350의 잔기 31-37 (CDR-H1); 서열번호 350의 잔기 52-67 (CDR-H2); 서열번호 350의 잔기 100-110 (CDR-H3);

서열번호 351의 잔기 24-34 (CDR-L1); 서열번호 351의 잔기 50-56 (CDR-L2); 서열번호 351의 잔기 89-97 (CDR-L3);

서열번호 352의 잔기 31-37 (CDR-H1); 서열번호 352의 잔기 52-67 (CDR-H2); 서열번호 352의 잔기 100-110 (CDR-H3);

서열번호 353의 잔기 24-34 (CDR-L1); 서열번호 353의 잔기 50-56 (CDR-L2); 서열번호 353의 잔기 89-97 (CDR-L3);

서열번호 354의 잔기 31-37 (CDR-H1); 서열번호 354의 잔기 52-67 (CDR-H2); 서열번호 354의 잔기 100-110 (CDR-H3);

서열번호 355의 잔기 24-34 (CDR-L1); 서열번호 355의 잔기 50-56 (CDR-L2); 서열번호 355의 잔기 89-97 (CDR-L3);

서열번호 356의 잔기 31-37 (CDR-H1); 서열번호 356의 잔기 52-67 (CDR-H2); 서열번호 356의 잔기 100-110

(CDR-H3);

서열번호 357의 잔기 23-33 (CDR-L1); 서열번호 357의 잔기 49-55 (CDR-L2); 서열번호 357의 잔기 88-96 (CDR-L3);

서열번호 358의 잔기 31-37 (CDR-H1); 서열번호 358의 잔기 52-67 (CDR-H2); 서열번호 358의 잔기 100-110 (CDR-H3);

서열번호 359의 잔기 23-33 (CDR-L1); 서열번호 359의 잔기 49-55 (CDR-L2); 서열번호 359의 잔기 88-96 (CDR-L3);

서열번호 360의 잔기 31-37 (CDR-H1); 서열번호 360의 잔기 52-67 (CDR-H2); 서열번호 360의 잔기 100-110 (CDR-H3);

서열번호 361의 잔기 23-33 (CDR-L1); 서열번호 361의 잔기 49-55 (CDR-L2); 서열번호 361의 잔기 88-96 (CDR-L3).

청구항 3

제2항에 있어서, 상기된 결합 단백질이 3개 이상의 CDR을 포함하는, 결합 단백질.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기된 3개 이상의 CDR이 하기로 이루어진 그룹 중에서 선택된 가변 도메인 CDR 세트를 포함하는, 결합 단백질:

VH_E9 CDR 세트

CDR-H1: 서열번호 1의 잔기 31-37

CDR-H2: 서열번호 1의 잔기 52-67

CDR-H3: 서열번호 1의 잔기 100-110

VL_E9 CDR 세트

CDR-L1: 서열번호 111의 잔기 23-33

CDR-L2: 서열번호 111의 잔기 49-55

CDR-L3: 서열번호 111의 잔기 88-96

VH_E9.4 CDR 세트

CDR-H1: 서열번호 117

CDR-H2: 서열번호 118

CDR-H3: 서열번호 119

VL_E9.4 CDR 세트

CDR-L1: 서열번호 229

CDR-L2: 서열번호 230

CDR-L3: 서열번호 231

VH_E9.11 CDR 세트

CDR-H1: 서열번호 121

CDR-H2: 서열번호 122

CDR-H3: 서열번호 123

VL_E9.11 CDR 세트

CDR-L1: 서열번호 233

CDR-L2: 서열번호 234

CDR-L3: 서열번호 235

VH E9.14 CDR 세트

CDR-H1: 서열번호 125

CDR-H2: 서열번호 126

CDR-H3: 서열번호 127

VL E9.14 CDR 세트

CDR-L1: 서열번호 237

CDR-L2: 서열번호 238

CDR-L3: 서열번호 239

VH E9.17 CDR 세트

CDR-H1: 서열번호 129

CDR-H2: 서열번호 130

CDR-H3: 서열번호 131

VL E9.17 CDR 세트

CDR-L1: 서열번호 241

CDR-L2: 서열번호 242

CDR-L3: 서열번호 243

VH E9.18 CDR 세트

CDR-H1: 서열번호 133

CDR-H2: 서열번호 134

CDR-H3: 서열번호 135

VL E9.18 CDR 세트

CDR-L1: 서열번호 245

CDR-L2: 서열번호 246

CDR-L3: 서열번호 247

VH E9.19 CDR 세트

CDR-H1: 서열번호 137

CDR-H2: 서열번호 138

CDR-H3: 서열번호 139

VL E9.19 CDR 세트

CDR-L1: 서열번호 249

CDR-L2: 서열번호 250

CDR-L3: 서열번호 251

VH E9.22 CDR 세트

CDR-H1: 서열번호 141

CDR-H2: 서열번호 142

CDR-H3: 서열번호 143

VL E9.22 CDR 세트

CDR-L1: 서열번호 253

CDR-L2: 서열번호 254

CDR-L3: 서열번호 255

VH E9.48 CDR 세트

CDR-H1: 서열번호 145

CDR-H2: 서열번호 146

CDR-H3: 서열번호 147

VL E9.48 CDR 세트

CDR-L1: 서열번호 257

CDR-L2: 서열번호 258

CDR-L3: 서열번호 259

VH E9.65 CDR 세트

CDR-H1: 서열번호 149

CDR-H2: 서열번호 150

CDR-H3: 서열번호 151

VL E9.65 CDR 세트

CDR-L1: 서열번호 261

CDR-L2: 서열번호 262

CDR-L3: 서열번호 263

VH E9.66 CDR 세트

CDR-H1: 서열번호 153

CDR-H2: 서열번호 154

CDR-H3: 서열번호 155

VL E9.66 CDR 세트

CDR-L1: 서열번호 265

CDR-L2: 서열번호 266

CDR-L3: 서열번호 267

VH E9.71 CDR 세트

CDR-H1: 서열번호 157

CDR-H2: 서열번호 158

CDR-H3: 서열번호 159

VL E9.71 CDR 세트

CDR-L1: 서열번호 269

CDR-L2: 서열번호 270

CDR-L3: 서열번호 271

VH E9.13 CDR 세트

CDR-H1: 서열번호 161

CDR-H2: 서열번호 162

CDR-H3: 서열번호 163

VL E9.13 CDR 세트

CDR-L1: 서열번호 217

CDR-L2: 서열번호 218

CDR-L3: 서열번호 219

VH E9.16 CDR 세트

CDR-H1: 서열번호 165

CDR-H2: 서열번호 166

CDR-H3: 서열번호 167

VL E9.16 CDR 세트

CDR-L1: 서열번호 221

CDR-L2: 서열번호 222

CDR-L3: 서열번호 223

VH E9.38 CDR 세트

CDR-H1: 서열번호 169

CDR-H2: 서열번호 170

CDR-H3: 서열번호 171

VL E9.38 CDR 세트

CDR-L1: 서열번호 225

CDR-L2: 서열번호 226

CDR-L3: 서열번호 227

VH E9.2B CDR 세트

CDR-H1: 서열번호 173

CDR-H2: 서열번호 174

CDR-H3: 서열번호 175

VL E9.2B CDR 세트

CDR-L1: 서열번호 273

CDR-L2: 서열번호 274

CDR-L3: 서열번호 275

VH E9.1F CDR 세트

CDR-H1: 서열번호 177

CDR-H2: 서열번호 178

CDR-H3: 서열번호 179

VL E9.1F CDR 세트

CDR-L1: 서열번호 277

CDR-L2: 서열번호 278

CDR-L3: 서열번호 279

VH E9.10H CDR 세트

CDR-H1: 서열번호 181

CDR-H2: 서열번호 182

CDR-H3: 서열번호 183

VL E9.10H CDR 세트

CDR-L1: 서열번호 301

CDR-L2: 서열번호 302

CDR-L3: 서열번호 303

VH E9.5E CDR 세트

CDR-H1: 서열번호 185

CDR-H2: 서열번호 186

CDR-H3: 서열번호 187

VL E9.5E CDR 세트

CDR-L1: 서열번호 293

CDR-L2: 서열번호 294

CDR-L3: 서열번호 295

VH E9.10C CDR 세트

CDR-H1: 서열번호 189

CDR-H2: 서열번호 190

CDR-H3: 서열번호 191

VL E9.10C CDR 세트

CDR-L1: 서열번호 281

CDR-L2: 서열번호 282

CDR-L3: 서열번호 283

VH E9.7E CDR 세트

CDR-H1: 서열번호 193

CDR-H2: 서열번호 194

CDR-H3: 서열번호 195

VL E9.7E CDR 세트

CDR-L1: 서열번호 289

CDR-L2: 서열번호 290

CDR-L3: 서열번호 291

VH E9.12B CDR 세트

CDR-H1: 서열번호 197

CDR-H2: 서열번호 198

CDR-H3: 서열번호 199

VL E9.12B CDR 세트

CDR-L1: 서열번호 297

CDR-L2: 서열번호 298

CDR-L3: 서열번호 299

VH E9.10E CDR 세트

CDR-H1: 서열번호 201

CDR-H2: 서열번호 202

CDR-H3: 서열번호 203

VL E9.10E CDR 세트

CDR-L1: 서열번호 285

CDR-L2: 서열번호 286

CDR-L3: 서열번호 287

VH E9.6A CDR 세트

CDR-H1: 서열번호 205

CDR-H2: 서열번호 206

CDR-H3: 서열번호 207

VL E9.6A CDR 세트

CDR-L1: 서열번호 305

CDR-L2: 서열번호 306

CDR-L3: 서열번호 307

VH E9.7A CDR 세트

CDR-H1: 서열번호 209

CDR-H2: 서열번호 210

CDR-H3: 서열번호 211

VL E9.7A CDR 세트

CDR-L1: 서열번호 309

CDR-L2: 서열번호 310

CDR-L3: 서열번호 311

VH E9.8H CDR 세트

CDR-H1: 서열번호 213

CDR-H2: 서열번호 214

CDR-H3: 서열번호 215

VL E9.8H CDR 세트

CDR-L1: 서열번호 313

CDR-L2: 서열번호 314

CDR-L3: 서열번호 315

VH E9.1 CDR 세트

CDR-H1: 서열번호 334의 잔기 31-37

CDR-H2: 서열번호 334의 잔기 52-67

CDR-H3: 서열번호 334의 잔기 100-110

VL E9.1 CDR 세트

CDR-L1: 서열번호 335의 잔기 23-33

CDR-L2: 서열번호 335의 잔기 49-55

CDR-L3: 서열번호 335의 잔기 88-96

VH E9-SE1 CDR 세트

CDR-H1: 서열번호 336의 잔기 31-37

CDR-H2: 서열번호 336의 잔기 52-67

CDR-H3: 서열번호 336의 잔기 100-110

VL E9-SE1 CDR 세트

CDR-L1: 서열번호 337의 잔기 23-33

CDR-L2: 서열번호 337의 잔기 49-55

CDR-L3: 서열번호 337의 잔기 88-96

VH E9-SE2 CDR 세트

CDR-H1: 서열번호 338의 잔기 31-37

CDR-H2: 서열번호 338의 잔기 52-67

CDR-H3: 서열번호 338의 잔기 100-110

VL E9-SE2 CDR 세트

CDR-L1: 서열번호 339의 잔기 23-33

CDR-L2: 서열번호 339의 잔기 49-55

CDR-L3: 서열번호 339의 잔기 88-96

VH E9-SE3 CDR 세트

CDR-H1: 서열번호 340의 잔기 31-37

CDR-H2: 서열번호 340의 잔기 52-67

CDR-H3: 서열번호 340의 잔기 100-110

VL E9-SE3 CDR 세트

CDR-L1: 서열번호 341의 잔기 23-33

CDR-L2: 서열번호 341의 잔기 49-55

CDR-L3: 서열번호 341의 잔기 88-96

VH E9-SE4 CDR 세트

CDR-H1: 서열번호 342의 잔기 31-37

CDR-H2: 서열번호 342의 잔기 52-67

CDR-H3: 서열번호 342의 잔기 100-110

VL E9-SE4 CDR 세트

CDR-L1: 서열번호 343의 잔기 23-33

CDR-L2: 서열번호 343의 잔기 49-55

CDR-L3: 서열번호 343의 잔기 88-96

VH E9-SE5 CDR 세트

CDR-H1: 서열번호 344의 잔기 31-37

CDR-H2: 서열번호 344의 잔기 52-67

CDR-H3: 서열번호 344의 잔기 100-110

VL E9-SE5 CDR 세트

CDR-L1: 서열번호 345의 잔기 24-34

CDR-L2: 서열번호 345의 잔기 50-56

CDR-L3: 서열번호 345의 잔기 89-97

VH E9-SE6 CDR 세트

CDR-H1: 서열번호 346의 잔기 31-37

CDR-H2: 서열번호 346의 잔기 52-67

CDR-H3: 서열번호 346의 잔기 100-110

VL E9-SE6 CDR 세트

CDR-L1: 서열번호 347의 잔기 23-33

CDR-L2: 서열번호 347의 잔기 49-55

CDR-L3: 서열번호 347의 잔기 88-96

VH E9-SE7 CDR 세트

CDR-H1: 서열번호 348의 잔기 31-37

CDR-H2: 서열번호 348의 잔기 52-67

CDR-H3: 서열번호 348의 잔기 100-110

VL E9-SE7 CDR 세트

CDR-L1: 서열번호 349의 잔기 24-34

CDR-L2: 서열번호 349의 잔기 50-56

CDR-L3: 서열번호 349의 잔기 89-97

VH E9-SE8 CDR 세트

CDR-H1: 서열번호 350의 잔기 31-37

CDR-H2: 서열번호 350의 잔기 52-67

CDR-H3: 서열번호 350의 잔기 100-110

VL E9-SE8 CDR 세트

CDR-L1: 서열번호 351의 잔기 24-34

CDR-L2: 서열번호 351의 잔기 50-56

CDR-L3: 서열번호 351의 잔기 89-97

VH E9-FR1 CDR 세트

CDR-H1: 서열번호 352의 잔기 31-37

CDR-H2: 서열번호 352의 잔기 52-67

CDR-H3: 서열번호 352의 잔기 100-110

VL E9-FR1 CDR 세트

CDR-L1: 서열번호 353의 잔기 24-34

CDR-L2: 서열번호 353의 잔기 50-56

CDR-L3: 서열번호 353의 잔기 89-97

VH E9-FR2 CDR 세트

CDR-H1: 서열번호 354의 잔기 31-37

CDR-H2: 서열번호 354의 잔기 52-67

CDR-H3: 서열번호 354의 잔기 100-110

VL E9-FR2 CDR 세트

CDR-L1: 서열번호 355의 잔기 24-34

CDR-L2: 서열번호 355의 잔기 50-56

CDR-L3: 서열번호 355의 잔기 89-97

VH E9.71 CDR 세트

CDR-H1: 서열번호 356의 잔기 31-37

CDR-H2: 서열번호 356의 잔기 52-67

CDR-H3: 서열번호 356의 잔기 100-110

VL E9.71 CDR 세트

CDR-L1: 서열번호 357의 잔기 23-33

CDR-L2: 서열번호 357의 잔기 49-55

CDR-L3: 서열번호 357의 잔기 88-96

VH E9.71(M) CDR 세트

CDR-H1: 서열번호 358의 잔기 31-37

CDR-H2: 서열번호 358의 잔기 52-67

CDR-H3: 서열번호 358의 잔기 100-110

VL E9.71(M) CDR 세트

CDR-L1: 서열번호 359의 잔기 23-33

CDR-L2: 서열번호 359의 잔기 49-55

CDR-L3: 서열번호 359의 잔기 88-96

VH E9.71(L) CDR 세트

CDR-H1: 서열번호 360의 잔기 31-37

CDR-H2: 서열번호 360의 잔기 52-67

CDR-H3: 서열번호 360의 잔기 100-110

VL E9.71(L) CDR 세트

CDR-L1: 서열번호 361의 잔기 23-33

CDR-L2: 서열번호 361의 잔기 49-55

CDR-L3: 서열번호 361의 잔기 88-96

청구항 5

제4항에 있어서, 2개 이상의 가변 도메인 CDR 세트를 포함하는, 결합 단백질.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기된 2개 이상의 가변 도메인 CDR 세트가 하기로 이루어진 그룹 중에서 선택되는, 결합 단백질:

VH E9 CDR 세트와 VL E9 CDR 세트;

VH E9.4 CDR 세트와 VL E9.4 CDR 세트;

VH E9.11 CDR 세트와 VL E9.11 CDR 세트;

VH E9.14 CDR 세트와 VL E9.14 CDR 세트;

VH E9.17 CDR 세트와 VL E9.17 CDR 세트;

VH E9.18 CDR 세트와 VL E9.18 CDR 세트;

VH E9.19 CDR 세트와 VL E9.19 CDR 세트;

VH E9.22 CDR 세트와 VL E9.22 CDR 세트;

VH E9.48 CDR 세트와 VL E9.48 CDR 세트;

VH E9.65 CDR 세트와 VL E9.65 CDR 세트;

VH E9.66 CDR 세트와 VL E9.66 CDR 세트;

VH E9.71 CDR 세트와 VL E9.71 CDR 세트;

VH E9.13 CDR 세트와 VL E9.13 CDR 세트;

VH E9.16 CDR 세트와 VL E9.16 CDR 세트;

VH E9.38 CDR 세트와 VL E9.38 CDR 세트;

VH E9.2B CDR 세트와 VL E9.2B CDR 세트;

VH E9.1F CDR 세트와 VL E9.1F CDR 세트;

VH E9.10H CDR 세트와 VL E9.10H CDR 세트;

VH E9.5E CDR 세트와 VL E9.5E CDR 세트;

VH E9.10C CDR 세트와 VL E9.10C CDR 세트;
 VH E9.7E CDR 세트와 VL E9.7E CDR 세트;
 VH E9.12B CDR 세트와 VL E9.12B CDR 세트;
 VH E9.10E CDR 세트와 VL E9.10E CDR 세트;
 VH E9.6A CDR 세트와 VL E9.6A CDR 세트;
 VH E9.7A CDR 세트와 VL E9.7A CDR 세트;
 VH E9.8H CDR 세트와 VL E9.8H CDR 세트;
 VH E9-SE1 CDR 세트와 VL E9-SE1 CDR 세트;
 VH E9-SE2 CDR 세트와 VL E9-SE2 CDR 세트;
 VH E9-SE3 CDR 세트와 VL E9-SE3 CDR 세트;
 VH E9-SE4 CDR 세트와 VL E9-SE4 CDR 세트;
 VH E9-SE5 CDR 세트와 VL E9-SE5 CDR 세트;
 VH E9-SE6 CDR 세트와 VL E9-SE6 CDR 세트;
 VH E9-SE7 CDR 세트와 VL E9-SE7 CDR 세트;
 VH E9-SE8 CDR 세트와 VL E9-SE8 CDR 세트;
 VH E9-FR1 CDR 세트와 VL E9-FR1 CDR 세트;
 VH E9-FR2 CDR 세트와 VL E9-FR2 CDR 세트;
 VH E9.71 CDR 세트와 VL E9.71 CDR 세트;
 VH E9.71(M) CDR 세트와 VL E9.71(M) CDR 세트; 및
 VH E9.71(L) CDR 세트와 VL E9.71(L) CDR 세트.

청구항 7

제1항 내지 6항 중 어느 한 항에 있어서, 추가로 사람 수용체 골격을 포함하는, 결합 단백질.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 사람 수용체 골격이 하기로 이루어진 그룹 중에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는, 결합 단백질:

서열번호 6-22의 중쇄 수용체 골격 서열;
 서열번호 35-62의 중쇄 수용체 서열;
 서열번호 23-34의 경쇄 수용체 서열; 및
 서열번호 63-98의 경쇄 수용체 서열.

청구항 9

제7항 또는 제8항에 있어서, 상기된 사람 수용체 골격이 하나 이상의 골격 영역 아미노산 치환을 포함하고, 상기 여기서 골격의 아미노산 서열은 상기 사람 수용체 골격의 서열과 65% 이상 동일하며 상기 사람 수용체 골격과 동일한 아미노산 잔기를 70개 이상 포함하는, 결합 단백질.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기된 사람 수용체 골격이 핵심 잔기에 하나 이상의 골격 영역 아미노산 치환을 포함하고, 상기된 핵심 잔기는 하기로 이루어진 그룹 중에서 선택되는, 결합 단백질:

CDR에 인접한 잔기;
 당화 부위 잔기;
 희귀 잔기;
 사람 DLL4와 상호작용할 수 있는 잔기;
 정규 잔기;
 중쇄 가변 영역과 경쇄 가변 영역사이의 접점 잔기;
 버니어 구역내의 잔기; 및
 초티아-규정의 가변 중쇄 CDR1과 캐벳-규정의 제1 중쇄 골격 간에 중첩하는 영역내의 잔기.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 핵심 잔기가 하기로 이루어진 그룹 중에서 선택되는, 결합 단백질:

2H, 4H, 24H, 26H, 27H, 29H, 34H, 35H, 37H, 39H, 44H, 45H, 47H, 48H, 49H, 50H, 51H, 58H, 59H, 60H, 63H, 67H, 69H, 71H, 73H, 76H, 78H, 91H, 93H, 94H, 2L, 4L, 25L, 29L, 27bL, 33L, 34L, 36L, 38L, 43L, 44L, 46L, 47L, 48L, 49L, 55L, 58L, 62L, 64L, 71L, 87L, 89L, 90L, 91L, 94L 및 95L.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 결합 단백질이 컨센서스 사람 가변 도메인인, 결합 단백질.

청구항 13

제1항에 있어서, 상기된 결합 단백질이 하기로 이루어진 그룹 중에서 선택된 아미노산 서열을 갖는 가변 도메인 하나 이상을 포함하는, 결합 단백질:

서열번호 1, 111, 116, 228, 120, 232, 124, 236, 128, 240, 132, 244, 136, 248, 140, 252, 144, 256, 148, 260, 152, 264, 156, 268, 160, 216, 164, 220, 168, 224, 172, 272, 176, 276, 180, 300, 184, 292, 188, 280, 192, 288, 196, 296, 200, 284, 204, 304, 208, 308, 212, 312, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360 및 361.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기된 결합 단백질이 2개의 가변 도메인을 포함하고, 상기된 2개의 가변 도메인은 하기로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 아미노산 서열을 갖는, 결합 단백질:

서열번호 1과 111; 서열번호 116과 228; 서열번호 120과 232; 서열번호 124와 236; 서열번호 128과 240; 서열번호 132와 244; 서열번호 136과 248; 서열번호 140과 252; 서열번호 144와 256; 서열번호 148과 260; 서열번호 152와 264; 서열번호 156과 268; 서열번호 160과 216; 서열번호 164와 220; 서열번호 168과 224; 서열번호 172와 272; 서열번호 176과 276; 서열번호 180과 300; 서열번호 184와 292; 서열번호 188과 280; 서열번호 192와 288; 서열번호 196과 296; 서열번호 200과 284; 서열번호 204와 304; 서열번호 208과 308; 서열번호 212와 312; 서열번호 334와 335; 서열번호 336과 337; 서열번호 338과 339; 서열번호 340과 341; 서열번호 342와 343; 서열번호 344와 345; 서열번호 346과 347; 서열번호 348과 349; 서열번호 350과 351; 서열번호 352와 353; 서열번호 354와 355; 서열번호 356과 357; 서열번호 358과 359; 및 서열번호 360과 361.

청구항 15

제11항에 있어서, 상기된 결합 단백질이 하기로 이루어진 그룹 중에서 선택된 아미노산 서열을 갖는 가변 도메인 하나 이상을 포함하는, 결합 단백질:

서열번호 1, 111, 116, 228, 120, 232, 124, 236, 128, 240, 132, 244, 136, 248, 140, 252, 144, 256, 148, 260, 152, 264, 156, 268, 160, 216, 164, 220, 168, 224, 172, 272, 176, 276, 180, 300, 184, 292, 188, 280, 192, 288, 196, 296, 200, 284, 204, 304, 208, 308, 212, 312, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340,

341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360 및 361.

청구항 16

제2항에 있어서, 상기된 항원 결합 도메인이 V_H 를 포함하는, 결합 단백질.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기된 V_H 가 하기로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는, 결합 단백질:

서열번호 1, 116, 120, 124, 128, 132, 136, 140, 144, 148, 152, 156, 160, 164, 168, 172, 176, 180, 184, 188, 192, 196, 200, 204, 208, 212, 334, 336, 338, 340, 342, 344, 346, 348, 350, 352, 354, 356, 358 및 360.

청구항 18

제2항에 있어서, 상기된 항원 결합 도메인이 V_L 을 포함하는, 결합 단백질.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기된 V_L 이 하기로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는, 결합 단백질:

서열번호 111, 228, 232, 236, 240, 244, 248, 252, 256, 260, 264, 268, 216, 220, 224, 272, 276, 300, 292, 280, 288, 296, 284, 304, 308, 312, 335, 337, 339, 341, 343, 345, 347, 349, 351, 353, 355, 357, 359 및 361.

청구항 20

제2항에 있어서, 상기된 항원 결합 도메인이 V_H 및 V_L 을 포함하는, 결합 단백질.

청구항 21

제19항에 있어서, 추가로 V_H 를 포함하고, 상기 V_H 는 하기로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는, 결합 단백질:

서열번호 1, 116, 120, 124, 128, 132, 136, 140, 144, 148, 152, 156, 160, 164, 168, 172, 176, 180, 184, 188, 192, 196, 200, 204, 208, 212, 334, 336, 338, 340, 342, 344, 346, 348, 350, 352, 354, 356, 358 및 360.

청구항 22

제20항에 있어서, 상기 V_L 은 하기로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는, 결합 단백질:

서열번호 111, 228, 232, 236, 240, 244, 248, 252, 256, 260, 264, 268, 216, 220, 224, 272, 276, 300, 292, 280, 288, 296, 284, 304, 308, 312, 335, 337, 339, 341, 343, 345, 347, 349, 351, 353, 355, 357, 359 및 361.

청구항 23

제2항에 있어서, 추가로 사람 IgM 불변 도메인, 사람 IgG1 불변 도메인, 사람 IgG2 불변 도메인, 사람 IgG3 불변 도메인, 사람 IgG4 불변 도메인, 사람 IgE 불변 도메인 및 사람 IgA 불변 도메인으로 이루어진 그룹 중에서 선택된 중쇄 면역글로불린 불변 도메인을 포함하는, 결합 단백질.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기된 중쇄 면역글로불린 불변 영역 도메인이 사람 IgG1 불변 도메인인, 결합 단백질.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기된 사람 IgG1 불변 도메인이 서열번호 2 및 서열번호 3으로 이루어진 그룹 중에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는, 결합 단백질.

청구항 26

제2항에 있어서, 추가로 사람 Ig 카파 불변 도메인 및 사람 Ig 람다 불변 도메인으로 이루어진 그룹 중에서 선택된 경쇄 면역글로불린 불변 도메인을 포함하는, 결합 단백질.

청구항 27

제26항에 있어서, 상기된 경쇄 면역글로불린 불변 영역 도메인이 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 사람 Ig 카파 불변 도메인인, 결합 단백질.

청구항 28

제26항에 있어서, 상기된 경쇄 면역글로불린 불변 영역 도메인이 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 사람 Ig 람다 불변 도메인인, 결합 단백질.

청구항 29

제1항에 있어서, 상기된 결합 단백질이 면역글로불린 분자, scFv, 모노클로날 항체, 사람 항체, 키메라 항체, 인간화 항체, 단일 도메인 항체, Fab 단편, Fab' 단편, F(ab')₂ 단편, Fv, 디설파이드 연결된 Fv, 단일 도메인 항체, 이중항체(diabody), 다중 특이적(multispecific) 항체, 이특이적(bispecific) 항체 및 이원 특이적(dual specific) 항체로 이루어진 그룹 중에서 선택되는, 결합 단백질.

청구항 30

제29항에 있어서, 상기된 결합 단백질이 사람 항체인, 결합 단백질.

청구항 31

사람 DLL4와 결합할 수 있고, 하기를 포함하는, 결합 단백질:

서열번호 2 및 서열번호 3으로 이루어진 그룹 중에서 선택된 아미노산 서열을 갖는 Ig 불변 중쇄 영역;

서열번호 4 및 서열번호 5로 이루어진 그룹 중에서 선택된 아미노산 서열을 갖는 Ig 불변 경쇄 영역;

서열번호 1, 116, 120, 124, 128, 132, 136, 140, 144, 148, 152, 156, 160, 164, 168, 172, 176, 180, 184, 188, 192, 196, 200, 204, 208, 212, 334, 336, 338, 340, 342, 344, 346, 348, 350, 352, 354, 356, 358 및 360으로 이루어진 그룹 중에서 선택된 아미노산 서열을 갖는 Ig 가변 중쇄 영역; 및

서열번호 111, 228, 232, 236, 240, 244, 248, 252, 256, 260, 264, 268, 216, 220, 224, 272, 276, 300, 292, 280, 288, 296, 284, 304, 308, 312, 335, 337, 339, 341, 343, 345, 347, 349, 351, 353, 355, 357, 359 및 361로 이루어진 그룹 중에서 선택된 아미노산 서열을 갖는 Ig 가변 경쇄 영역.

청구항 32

제31항에 있어서, 상기 Ig 불변 경쇄 영역이 서열번호 5인, 결합 단백질.

청구항 33

제1항 내지 32항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 결합 단백질이 노치(Notch)-1, 노치-2, 노치-3, 노치-4 및 이의 조합으로 이루어진 그룹 중에서 선택된 노치 단백질과 DLL4의 상호작용을 차단할 수 있는, 결합 단백질.

청구항 34

제33항에 있어서, 상기 결합 단백질이 노치-1 및 노치-4와 DLL4의 상호작용을 차단할 수 있는, 결합 단백질.

청구항 35

제33항에 있어서, 상기 결합 단백질이 노치-1과 DLL4의 상호작용을 차단할 수 있는, 결합 단백질.

청구항 36

제33항에 있어서, 상기 결합 단백질이 노치-4와 DLL4의 상호작용을 차단할 수 있는, 결합 단백질.

청구항 37

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 결합 단백질이 DLL4의 생물학적 기능을 조절할 수 있는, 결합 단백질.

청구항 38

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 상기된 결합 단백질이 DLL4를 중화시킬 수 있는, 결합 단백질.

청구항 39

제38항에 있어서, 상기된 DLL4가 사람 DLL4, 마우스 DLL4, 사이노몰거스 DLL4 및 랫 DLL4로 이루어진 그룹 중에서 선택되는, 중화 결합 단백질.

청구항 40

제38항에 있어서, 상기된 중화 결합 단백질이 DLL4가 이의 수용체에 결합하는 능력을 감소시키는, 중화 결합 단백질.

청구항 41

제38항에 있어서, 상기된 중화 결합 단백질이 정상적인 혈관신생을 감소시킬 수 있는, 중화 결합 단백질.

청구항 42

제38항에 있어서, 상기 중화 결합 단백질이 최대 약 10^{-7} M; 최대 약 10^{-8} M; 최대 약 10^{-9} M; 최대 약 10^{-10} M; 최대 약 10^{-11} M; 최대 약 10^{-12} M; 및 최대 약 10^{-13} M로 이루어진 그룹 중에서 선택된 해리 상수(K_D)를 갖는, 중화 결합 단백질.

청구항 43

제38항에 있어서, 상기 중화 결합 단백질이 적어도 약 $10^2 M^{-1} s^{-1}$; 적어도 약 $10^3 M^{-1} s^{-1}$; 적어도 약 $10^4 M^{-1} s^{-1}$; 적어도 약 $10^5 M^{-1} s^{-1}$; 및 적어도 약 $10^6 M^{-1} s^{-1}$ 로 이루어진 그룹 중에서 선택된 정반응 속도(on rate)를 갖는, 중화 결합 단백질.

청구항 44

제38항에 있어서, 상기 중화 결합 단백질이 최대 약 $10^{-3} s^{-1}$; 최대 약 $10^{-4} s^{-1}$; 최대 약 $10^{-5} s^{-1}$; 및 최대 약 $10^{-6} s^{-1}$ 로 이루어진 그룹 중에서 선택된 역반응 속도(off rate)를 갖는, 중화 결합 단백질.

청구항 45

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항의 결합 단백질을 포함하는 표지된 결합 단백질로서, 상기 결합 단백질이 검출 가능한 표지에 접합된, 표지된 결합 단백질.

청구항 46

제45항에 있어서, 상기 검출가능한 표지가 방사선 표지, 효소, 형광 표지, 발광 표지, 생발광 표지, 자기 표지 및 비오틴으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는, 표지된 결합 단백질.

청구항 47

제46항에 있어서, 상기된 표지가 3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho , 및 ^{153}Sm 으로 이루어진 그

그룹 중에서 선택되는 방사선 표지인, 표지된 결합 단백질.

청구항 48

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 기술된 결합 단백질을 포함하고, 추가로 링커 폴리펩타이드 또는 면역글로불린 불변 도메인을 포함하는, 항체 작제물.

청구항 49

제48항에 있어서,

면역글로불린 분자,

모노클로날 항체,

키메라 항체,

CDR-이식 항체,

인간화항체,

Fab,

Fab',

F(ab')₂,

Fv,

디설파이드 연결된 Fv,

scFv,

단일 도메인 항체,

이중항체,

다중 특이적 항체,

이원 특이적 항체 및

이특이적 항체로 이루어진 그룹 중에서 선택되는, 항체 작제물.

청구항 50

제48항에 있어서, 상기된 항체 작제물이 하기로 이루어진 그룹 중에서 선택된 중쇄 면역글로불린 불변 도메인을 포함하는, 항체 작제물:

사람 IgM 불변 도메인;

사람 IgG1 불변 도메인;

사람 IgG2 불변 도메인;

사람 IgG3 불변 도메인;

사람 IgG4 불변 도메인;

사람 IgE 불변 도메인;

사람 IgA 불변 도메인; 및

Fc 신생 수용체, Fc 감마 수용체 또는 C1q와의 결합 강도를 변경하는 하나 이상의 변이를 갖는 IgG 불변 도메인 변형체.

청구항 51

제48항에 있어서, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5 및 이의 조합으로 이루어진 그룹 중에서 선

택된 아미노산 서열을 갖는 면역글로불린 불변 도메인을 포함하는, 항체 작제물.

청구항 52

제48항의 항체 작제물을 포함하는 항체 접합체로서, 상기 항체 작제물이 치료제 또는 세포독성제에 접합된, 항체 접합체.

청구항 53

제52항에 있어서, 상기된 치료제 또는 세포독성제가 항-대사제, 알킬화제, 항생제, 성장 인자, 사이토킨, 항-혈관신생제, 항-유사분열제, 안트라사이클린, 독소 및 아폽토시스 유발제로 이루어진 그룹 중에서 선택되는, 항체 접합체.

청구항 54

제1항에 기술된 CDR-H1, CDR-H2 또는 CDR-H3 중 하나 이상을 포함한 중쇄 가변 도메인을 포함하는 폴리펩타이드; 제1항에 기술된 CDR-L1, CDR-L2 또는 CDR-L3 중 하나 이상을 포함한 경쇄 가변 도메인을 포함하는 폴리펩타이드; 또는 이들 두 폴리펩타이드의 조합물로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 폴리펩타이드를 암호화하는, 분리된 핵산.

청구항 55

제54항에 따라 분리된 핵산을 포함하는, 벡터.

청구항 56

제55항에 있어서, 상기된 벡터가 pcDNA, pTT, pTT3, pEFBOS, pBV, pJV, pHybE 및 pBJ로 이루어진 그룹 중에서 선택되는, 벡터.

청구항 57

제55항 또는 56항에 따른 벡터를 포함하는, 숙주 세포.

청구항 58

제57항에 있어서, 상기된 숙주 세포가 원핵 세포인, 숙주 세포.

청구항 59

제58항에 있어서, 상기된 숙주 세포가 에스케리키아 콜라이인, 숙주 세포.

청구항 60

제59항에 있어서, 상기된 숙주 세포가 진핵 세포인, 숙주 세포.

청구항 61

제60항에 있어서, 상기된 진핵 세포가 원생 생물 세포, 동물 세포, 식물 세포 및 진균류 세포로 이루어진 그룹 중에서 선택되는, 숙주 세포.

청구항 62

제61항에 있어서, 상기된 진핵 세포가 포유류 세포, 조류 세포 및 곤충 세포로 이루어진 그룹 중에서 선택된 동물 세포인, 숙주 세포.

청구항 63

제62항에 있어서, 상기된 포유류 세포가 CHO 세포인 숙주 세포.

청구항 64

제62항에 있어서, 상기된 포유류 세포가 COS 세포인, 숙주 세포.

청구항 65

제61항에 있어서, 상기된 진균류 세포가 사카로마이세스 세레비지애인, 숙주 세포.

청구항 66

제62항에 있어서, 상기된 곤충류 세포가 Sf9 세포인, 숙주 세포.

청구항 67

제57항 내지 제66항 중 어느 한 항의 숙주 세포를 사람 DLL4와 결합하는 결합 단백질을 생성하기에 충분한 조건 하에 배양 배지 중에서 배양하는 것을 포함하는, 사람 DLL4와 결합하는 결합 단백질을 제조하는 방법.

청구항 68

제67항의 방법에 따라 제조된, 결합 단백질.

청구항 69

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 따른 결합 단백질을 포함하는 결정화 결합 단백질로서, 상기 결합 단백질이 결정으로 존재하는, 결정화 결합 단백질.

청구항 70

제69항에 있어서, 상기된 결정이 담체-유리된 약제학적 제어방출성 결정인, 결정화 결합 단백질.

청구항 71

제69항에 있어서, 상기된 결합 단백질이 이의 용해성 대응물보다 더 긴 생체내 반감기를 갖는, 결정화 결합 단백질.

청구항 72

제69항에 있어서, 상기된 결합 단백질이 생물학적 활성을 유지하는, 결정화 결합 단백질.

청구항 73

결합 단백질 방출용 조성물로서,

(a) 제69항 내지 제72항 중 어느 한 항에 따른 결정화 결합 단백질과 성분을 포함하는 제형; 및 (b) 하나 이상의 중합체 담체를 포함하는, 조성물.

청구항 74

제73항에 있어서, 상기된 중합체 담체가 폴리(아크릴산), 폴리(시아노아크릴레이트), 폴리(아미노산), 폴리(무수물), 폴리(펩시펩타이드), 폴리(에스테르), 폴리(락트산), 폴리(락트산-코-글리콜산) 또는 PLGA, 폴리(b-하이드록시부티레이트), 폴리(카프로락톤), 폴리(디옥사논), 폴리(에틸렌 글리콜), 폴리(하이드록시프로필)메타크릴아미드, 폴리[(오르가노)포스파젠], 폴리(오르토 에스테르), 폴리(비닐 알콜), 폴리(비닐피롤리돈), 말레산 무수물-알킬 비닐 에테르 공중합체, 폴루론산 폴리올, 알부민, 알기네이트, 셀룰로스 및 셀룰로스 유도체, 콜라겐, 피브린, 젤라틴, 하이알루론산, 올리고사카라이드, 글리카미노글리칸, 황산화 폴리사카라이드, 이의 블렌드 및 공중합체로 이루어진 그룹 중 하나 이상으로부터 선택된 중합체인, 조성물.

청구항 75

제73항에 있어서, 상기된 성분이 알부민, 슈크로스, 트레할로스, 락ти톨, 젤라틴, 하이드록시프로필- β -사이클로덱스트린, 메톡시폴리에틸렌 글리콜 및 폴리에틸렌 글리콜로 이루어진 그룹 중에서 선택되는, 조성물.

청구항 76

제73항에 따른 조성물의 유효량을 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하는, 포유류를 치료하는 방법.

청구항 77

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 따른 결합 단백질 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 78

제77항에 있어서, 추가로 DLL4 활성이 유해한 장애를 치료하기 위한 하나 이상의 추가적인 치료제를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 79

제78항에 있어서, 상기된 추가적인 치료제가 혈관신생 억제제; 키나제 억제제; 동시-자극 분자 차단제; 부착 분자 차단제; 항-사이토킨 항체 또는 이의 기능성 단편; 메토트렉세이트; 코르티코스테로이드; 사이클로스포린; 라파마이신; FK506; 및 비-스테로이드성 소염제로 이루어진 그룹 중에서 선택되는, 약제학적 조성물.

청구항 80

제1항 내지 32항 중 어느 한 항의 결합 단백질과 사람 DLL4를 접촉시켜 사람 DLL4 활성을 감소시키는 것을 포함하는, 사람 DLL4 활성을 감소시키는 방법.

청구항 81

DLL4 활성이 유해한 질환을 앓고 있는 사람 환자의 사람 DLL4 활성을 감소시키는 방법으로서,

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항의 결합 단백질을 DLL4 활성이 유해한 질환을 앓고 있는 상기 사람 환자에게 투여하여 상기 사람 환자의 사람 IL-17 활성을 감소시키는 것을 포함하는, 방법.

청구항 82

DLL4 활성이 유해한 질환 또는 장애를 앓고 있는 사람 환자를 치료하는 방법으로서,

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항의 결합 단백질을 DLL4 활성이 유해한 질환 또는 장애를 앓고 있는 상기 사람 환자에게 투여하여 치료를 달성하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 83

제82항에 있어서, 상기된 장애가 유방암, 결장암, 직장암, 폐암, 구강인두암, 하인두암, 식도암, 위암, 췌장암, 간암, 담낭암, 담관암, 소장암, 요로암, 여성 생식로암, 남성 생식로암, 내분비선암, 피부암, 혈관종, 흑색종, 육종, 뇌종양, 신경암, 안구종양, 수막암, 조혈 악성 종양 유래의 고형 종양, 종양 전이, 안구내 신생혈관형성, 부종, 류마티스성 관절염, 다발성 경화증, 죽상동맥경화성 플라크, 크론병, 염증성 장 질환, 난치성 복수, 건선, 유육종증, 동맥계 동맥경화증, 패혈증, 소화성 궤양, 화상, 췌장염, 다낭성 난소질환 (POD), 자궁내막증, 자궁근종, 양성 전립선 비대증 및 기타 이상 DLL4 활성을 특징으로 하는 혈관신생 독립성 및 의존성 질환으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는, 방법.

청구항 84

제83항에 있어서, 상기 장애가 원발성 및 전이성 암인, 방법.

청구항 85

제83항에 있어서, 상기 요로암이 신장암, 방광암 및 요로상피암으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는, 방법.

청구항 86

제83항에 있어서, 상기 여성 생식로암이 자궁경부암, 자궁암, 난소암, 융모막암 및 임신성 융모성 질환으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는, 방법.

청구항 87

제83항에 있어서, 상기 남성 생식로암이 전립선암, 정낭암, 고환암 및 생식 세포 종양으로 이루어진 그룹 중에

서 선택되는, 방법.

청구항 88

제83항에 있어서, 상기 내분비선암이 갑상선암, 부신암 및 뇌하수체암으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는, 방법.

청구항 89

제83항에 있어서, 상기 육종이 골 육종, 연조직 육종 및 카포시 육종으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는, 방법.

청구항 90

제83항에 있어서, 상기 수막암이 성상세포종, 신경교종, 교모세포종, 망막아세포종, 신경종, 신경아세포종, 신경초종(Schwannoma) 및 수막종으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는, 방법.

청구항 91

제83항에 있어서, 상기 조혈 악성 종양으로부터 유래되는 고형 종양이 백혈병, 호지킨 백혈병, 비호지킨 백혈병, 림프종, 호지킨 림프종 및 비호지킨 림프종으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는, 방법.

청구항 92

제83항에 있어서, 상기 안구내 신생혈관형성이 당뇨성 설명, 망막병증, 노령성 황반변성 및 피부 조홍으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는, 방법.

청구항 93

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항의 결합 단백질을, 사람 VEGFR2와 결합할 수 있는 항체 또는 이의 단편; 메토트렉세이트; 사람 TNF와 결합할 수 있는 항체 또는 이의 단편; 코르티코스테로이드, 사이클로스포린, 라파마이신, FK506 및 비스테로이드성 소염제로 이루어진 그룹 중에서 선택된 제2 제제의 투여 전에, 투여와 동시에 또는 투여 후에 투여하는 단계를 포함하는, DLL4가 유해한 장애를 앓고 있는 환자를 치료하는 방법.

청구항 94

사람 DLL4와 결합할 수 있고 하기로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 CDR을 포함하는 항원 결합 도메인을 포함하는, 결합 단백질.

CDR-H1: $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5$ (서열번호 105) (여기서,

X_1 은 S, N 또는 D이고;

X_2 는 H 또는 Y이며;

X_3 은 W이고;

X_4 는 M이며;

X_5 는 S 또는 H이다);

CDR-H2: $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}-X_{13}-X_{14}-X_{15}-X_{16}-X_{17}$ (서열번호 106) (여기서,

X_1 은 I, D, M 또는 T이고;

X_2 는 I이며;

X_3 은 S이고;

X_4 는 Y, N, S, Q, V, T, H 또는 D이며;

X₅는 D○]고;

X₆은 G○]며;

X₇은 S, R, I, T, G, K, H 또는 N○]고;

X₈은 N, Y, S, I 또는 T○]며;

X₉는 K, M, N, Q, E, T, R, S, A 또는 L○]고;

X₁₀은 Y, D 또는 E○]며;

X₁₁은 S 또는 Y○]고;

X₁₂는 A○]고;

X₁₃은 D○]며;

X₁₄는 S○]고;

X₁₅는 V○]며;

X₁₆은 K○]고;

X₁₇은 G○]다);

CDR-H3: X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀ (서열번호 107) (여기서,

X₁은 A○]고;

X₂는 G, A 또는 R○]며;

X₃은 G○]고;

X₄는 G, S 또는 A○]며;

X₅는 N○]고;

X₆은 V 또는 M○]며;

X₇은 G○]고;

X₈은 F, L, Y 또는 M○]며;

X₉는 D○]고;

X₁₀은 I, S 또는 L○]다);

CDR-L1: X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁ (서열번호 108) (여기서,

X₁은 S○]고;

X₂는 A 또는 G○]며;

X₃은 D○]고;

X₄는 K, N, L, Q, M, E, S, T, G 또는 D○]며;

X₅는 L○]고;

X₆은 G이며;

X₇은 T, S, N, A, G 또는 E이고;

X₈은 K, Q, N 또는 R이며;

X₉는 Y이고;

X₁₀은 V 또는 I이며;

X₁₁은 S이다);

CDR-L2: X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇ (서열번호 109) (여기서,

X₁은 Q이고;

X₂는 D이며;

X₃은 A, G, W, S 또는 D이고;

X₄는 K, M, Q, N, L, T, I 또는 E이며;

X₅는 R이고;

X₆은 P이며;

X₇은 S이다); 및

CDR-L3: X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉ (서열번호 110) (여기서,

X₁은 Q이고;

X₂는 S 또는 A이며;

X₃은 W이고;

X₄는 D이며;

X₅는 R, S, Q, P, A, V, W 또는 M이고;

X₆은 S, G, I, N, R 또는 T이며;

X₇은 D 또는 G이고;

X₈은 V, A, P 또는 E이며;

X₉는 V이다).

청구항 95

제94항에 있어서, 상기된 하나 이상의 CDR이 하기로 이루어진 그룹 중에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는, 결합 단백질:

서열번호 112의 잔기 31-35 (CDR-H1); 서열번호 112의 잔기 50-66 (CDR-H2); 서열번호 112의 잔기 99-108 (CDR-H3);

서열번호 113의 잔기 23-33 (CDR-L1); 서열번호 113의 잔기 49-55 (CDR-L2); 서열번호 113의 잔기 88-96 (CDR-L3);

서열번호 316의 잔기 31-35 (CDR-H1); 서열번호 316의 잔기 50-66 (CDR-H2); 서열번호 316의 잔기 99-108

(CDR-H3);

서열번호 317의 잔기 31-35 (CDR-H1); 서열번호 317의 잔기 50-66 (CDR-H2); 서열번호 317의 잔기 99-108 (CDR-H3);

서열번호 318의 잔기 31-35 (CDR-H1); 서열번호 318의 잔기 50-66 (CDR-H2); 서열번호 318의 잔기 99-108 (CDR-H3);

서열번호 319의 잔기 31-35 (CDR-H1); 서열번호 319의 잔기 50-66 (CDR-H2); 서열번호 319의 잔기 99-108 (CDR-H3);

서열번호 320의 잔기 31-35 (CDR-H1); 서열번호 320의 잔기 50-66 (CDR-H2); 서열번호 320의 잔기 99-108 (CDR-H3);

서열번호 321의 잔기 31-35 (CDR-H1); 서열번호 321의 잔기 50-66 (CDR-H2); 서열번호 321의 잔기 99-108 (CDR-H3);

서열번호 322의 잔기 31-35 (CDR-H1); 서열번호 322의 잔기 50-66 (CDR-H2); 서열번호 322의 잔기 99-108 (CDR-H3);

서열번호 323의 잔기 31-35 (CDR-H1); 서열번호 323의 잔기 50-66 (CDR-H2); 서열번호 323의 잔기 99-108 (CDR-H3);

서열번호 324의 잔기 31-35 (CDR-H1); 서열번호 324의 잔기 50-66 (CDR-H2); 서열번호 324의 잔기 99-108 (CDR-H3);

서열번호 325의 잔기 31-35 (CDR-H1); 서열번호 325의 잔기 50-66 (CDR-H2); 서열번호 325의 잔기 99-108 (CDR-H3);

서열번호 326의 잔기 31-35 (CDR-H1); 서열번호 326의 잔기 50-66 (CDR-H2); 서열번호 326의 잔기 99-108 (CDR-H3);

서열번호 327의 잔기 23-33 (CDR-L1); 서열번호 327의 잔기 49-55 (CDR-L2); 서열번호 327의 잔기 88-96 (CDR-L3);

서열번호 328의 잔기 23-33 (CDR-L1); 서열번호 328의 잔기 49-55 (CDR-L2); 서열번호 328의 잔기 88-96 (CDR-L3);

서열번호 329의 잔기 23-33 (CDR-L1); 서열번호 329의 잔기 49-55 (CDR-L2); 서열번호 329의 잔기 88-96 (CDR-L3);

서열번호 330의 잔기 23-33 (CDR-L1); 서열번호 330의 잔기 49-55 (CDR-L2); 서열번호 330의 잔기 88-96 (CDR-L3);

서열번호 331의 잔기 23-33 (CDR-L1); 서열번호 331의 잔기 49-55 (CDR-L2); 서열번호 331의 잔기 88-96 (CDR-L3);

서열번호 332의 잔기 23-33 (CDR-L1); 서열번호 332의 잔기 49-55 (CDR-L2); 서열번호 332의 잔기 88-96 (CDR-L3);

서열번호 333의 잔기 23-33 (CDR-L1); 서열번호 333의 잔기 49-55 (CDR-L2); 서열번호 333의 잔기 88-96 (CDR-L3).

청구항 96

제95항에 있어서, 상기된 결합 단백질이 3개 이상의 CDR을 포함하는, 결합 단백질.

청구항 97

제96항에 있어서, 상기된 3개 이상의 CDR이 하기로 이루어진 그룹 중에서 선택된 가변 도메인 CDR 세트를 포함하는, 결합 단백질:

VH A10 CDR 세트

CDR-H1: 서열번호 112의 잔기 31-35

CDR-H2: 서열번호 112의 잔기 50-66

CDR-H3: 서열번호 112의 잔기 99-108

VL A10 CDR 세트

CDR-L1: 서열번호 113의 잔기 23-33

CDR-L2: 서열번호 113의 잔기 49-55

CDR-L3: 서열번호 113의 잔기 88-96

VH A10.3 CDR 세트

CDR-H1: 서열번호 316의 잔기 31-35

CDR-H2: 서열번호 316의 잔기 50-66

CDR-H3: 서열번호 316의 잔기 99-108

VL A10.3 CDR 세트

CDR-L1: 서열번호 327의 잔기 23-33

CDR-L2: 서열번호 327의 잔기 49-55

CDR-L3: 서열번호 327의 잔기 88-96

VH A10.K30 CDR 세트

CDR-H1: 서열번호 317의 잔기 31-35

CDR-H2: 서열번호 317의 잔기 50-66

CDR-H3: 서열번호 317의 잔기 99-108

VH A10.K42 CDR 세트

CDR-H1: 서열번호 318의 잔기 31-35

CDR-H2: 서열번호 318의 잔기 50-66

CDR-H3: 서열번호 318의 잔기 99-108

VH A10.9A CDR 세트

CDR-H1: 서열번호 319의 잔기 31-35

CDR-H2: 서열번호 319의 잔기 50-66

CDR-H3: 서열번호 319의 잔기 99-108

VH A10.8A CDR 세트

CDR-H1: 서열번호 320의 잔기 31-35

CDR-H2: 서열번호 320의 잔기 50-66

CDR-H3: 서열번호 320의 잔기 99-108

VH A10.1A CDR 세트

CDR-H1: 서열번호 321의 잔기 31-35

CDR-H2: 서열번호 321의 잔기 50-66

CDR-H3: 서열번호 321의 잔기 99-108

VH A10.5D CDR 세트

CDR-H1: 서열번호 322의 잔기 31-35

CDR-H2: 서열번호 322의 잔기 50-66

CDR-H3: 서열번호 322의 잔기 99-108

VH A10.3A CDR 세트

CDR-H1: 서열번호 323의 잔기 31-35

CDR-H2: 서열번호 323의 잔기 50-66

CDR-H3: 서열번호 323의 잔기 99-108

VL A10.3A CDR 세트

CDR-L1: 서열번호 330의 잔기 23-33

CDR-L2: 서열번호 330의 잔기 49-55

CDR-L3: 서열번호 330의 잔기 88-96

VH A10.6B CDR 세트

CDR-H1: 서열번호 324의 잔기 31-35

CDR-H2: 서열번호 324의 잔기 50-66

CDR-H3: 서열번호 324의 잔기 99-108

VL A10.6B CDR 세트

CDR-L1: 서열번호 331의 잔기 23-33

CDR-L2: 서열번호 331의 잔기 49-55

CDR-L3: 서열번호 331의 잔기 88-96

VH A10.3D CDR 세트

CDR-H1: 서열번호 325의 잔기 31-35

CDR-H2: 서열번호 325의 잔기 50-66

CDR-H3: 서열번호 325의 잔기 99-108

VL A10.3D CDR 세트

CDR-L1: 서열번호 332의 잔기 23-33

CDR-L2: 서열번호 332의 잔기 49-55

CDR-L3: 서열번호 332의 잔기 88-96

VH A10.4C CDR 세트

CDR-H1: 서열번호 326의 잔기 31-35

CDR-H2: 서열번호 326의 잔기 50-66

CDR-H3: 서열번호 326의 잔기 99-108

VL A10.4C CDR 세트

CDR-L1: 서열번호 333의 잔기 23-33

CDR-L2: 서열번호 333의 잔기 49-55

CDR-L3: 서열번호 333의 잔기 88-96

VL A10.L45 CDR 세트

CDR-L1: 서열번호 328의 잔기 23-33

CDR-L2: 서열번호 328의 잔기 49-55

CDR-L3: 서열번호 328의 잔기 88-96

VL A10.L73 CDR 세트

CDR-L1: 서열번호 329의 잔기 23-33

CDR-L2: 서열번호 329의 잔기 49-55

CDR-L3: 서열번호 329의 잔기 88-96.

청구항 98

제97항에 있어서, 2개 이상의 가변 도메인 CDR 세트를 포함하는, 결합 단백질.

청구항 99

제98항에 있어서, 상기된 2개 이상의 가변 도메인 CDR 세트가 하기로 이루어진 그룹 중에서 선택되는, 결합 단백질:

VH A10 CDR 세트와 VL A10 CDR 세트;

VH A10.3 CDR 세트와 VL A10.3 CDR 세트;

VH A10.3A CDR 세트와 VL A10.3A CDR 세트;

VH A10.6B CDR 세트와 VL A10.6B CDR 세트;

VH A10.3D CDR 세트와 VL A10.3D CDR 세트;

VH A10.4C CDR 세트와 VL A10.4C CDR 세트;

VH A10.K30 CDR 세트와 VL A10.3 CDR 세트;

VH A10.K42 CDR 세트와 VL A10.3 CDR 세트;

VH A10.3 CDR 세트와 VL A10.L45 CDR 세트;

VH A10.3 CDR 세트와 VL A10.L73 CDR 세트;

VH A10.9A CDR 세트와 VL A10.3 CDR 세트;

VH A10.8A CDR 세트와 VL A10.3 CDR 세트;

VH A10.1A CDR 세트와 VL A10.3 CDR 세트; 및

VH A10.5D CDR 세트와 VL A10.3 CDR 세트.

청구항 100

제94항 내지 제99항 중 어느 한 항에 있어서, 추가로 사람 수용체 골격을 포함하는, 결합 단백질.

청구항 101

제100항에 있어서, 상기된 사람 수용체 골격이 하기로 이루어진 그룹 중에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는, 결합 단백질:

서열번호 6-22의 중쇄 수용체 골격 서열;

서열번호 35-62의 중쇄 수용체 서열;

서열번호 23-34의 경쇄 수용체 서열; 및

서열번호 63-98의 경쇄 수용체 서열.

청구항 102

제100항 또는 제101항에 있어서, 상기된 사람 수용체 골격이 하나 이상의 골격 영역 아미노산 치환을 포함하고, 여기서 상기 골격의 아미노산 서열은 상기 사람 수용체 골격의 서열과 65% 이상 동일하며 상기 사람 수용체 골격과 동일한 아미노산 잔기를 70개 이상 포함하는, 결합 단백질.

청구항 103

제101항에 있어서, 상기된 사람 수용체 골격이 핵심 잔기에서 하나 이상의 골격 영역 아미노산 치환을 포함하고, 상기된 핵심 잔기는 하기로 이루어진 그룹 중에서 선택되는, 결합 단백질:

CDR에 인접한 잔기;

당화 부위 잔기;

회귀 잔기;

사람 DLL4와 상호작용할 수 있는 잔기;

정규 잔기;

중쇄 가변 영역과 경쇄 가변 영역사이의 접점 잔기;

버니어 구역내의 잔기; 및

초티아-규정의 가변 중쇄 CDR1과 캐벳-규정의 제1 중쇄 골격 간에 중첩하는 영역내의 잔기.

청구항 104

제103항에 있어서, 상기 핵심 잔기가 하기로 이루어진 그룹 중에서 선택되는, 결합 단백질: 2H, 4H, 24H, 26H, 27H, 29H, 34H, 35H, 37H, 39H, 44H, 45H, 47H, 48H, 49H, 50H, 51H, 58H, 59H, 60H, 63H, 67H, 69H, 71H, 73H, 76H, 78H, 91H, 93H, 94H, 2L, 4L, 25L, 29L, 27bL, 33L, 34L, 36L, 38L, 43L, 44L, 46L, 47L, 48L, 49L, 55L, 58L, 62L, 64L, 71L, 87L, 89L, 90L, 91L, 94L 및 95L.

청구항 105

제104항에 있어서, 상기 결합 단백질이 컨센서스 사람 가변 도메인인, 결합 단백질.

청구항 106

제94항에 있어서, 상기된 결합 단백질이 하기로 이루어진 그룹 중에서 선택된 아미노산 서열을 갖는 하나 이상의 가변 도메인을 포함하는, 결합 단백질:

서열번호 112, 113, 316, 327, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 330, 324, 331, 325, 332, 326, 333, 328 및 329.

청구항 107

제106항에 있어서, 상기된 결합 단백질이 2개의 가변 도메인을 포함하고, 상기된 2개의 가변 도메인은 하기로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 아미노산 서열을 갖는, 결합 단백질:

서열번호 112와 113; 서열번호 316과 327; 서열번호 323과 330; 서열번호 324와 331; 서열번호 325과 332; 및 서열번호 326과 333.

청구항 108

제104항에 있어서, 상기된 결합 단백질이 하기로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 아미노산 서열을 갖는 가변 도메인 하나 이상을 포함하는, 결합 단백질:

서열번호 112, 113, 316, 327, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 330, 324, 331, 325, 332, 326, 333, 328 및 329.

청구항 109

제95항에 있어서, 상기된 항원 결합 도메인이 V_H 를 포함하는, 결합 단백질.

청구항 110

제109항에 있어서, 상기된 V_H 가 하기로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는, 결합 단백질:
서열번호 112, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325 및 326.

청구항 111

제95항에 있어서, 상기된 항원 결합 도메인이 V_L 을 포함하는, 결합 단백질.

청구항 112

제111항에 있어서, 상기된 V_L 이 하기로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는, 결합 단백질:
서열번호 113, 327, 328, 329, 330, 331, 332 및 333.

청구항 113

제95항에 있어서, 상기된 항원 결합 도메인이 V_H 및 V_L 을 포함하는, 결합 단백질.

청구항 114

제112항에 있어서, 추가로 V_H 를 포함하고, 상기 V_H 는 하기로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는, 결합 단백질:

서열번호 112, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325 및 326.

청구항 115

제20항에 있어서, 상기 V_L 은 하기로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는, 결합 단백질:
서열번호 113, 327, 328, 329, 330, 331, 332 및 333.

청구항 116

제95항에 있어서, 추가로 사람 IgM 불변 도메인, 사람 IgG1 불변 도메인, 사람 IgG2 불변 도메인, 사람 IgG3 불변 도메인, 사람 IgG4 불변 도메인, 사람 IgE 불변 도메인 및 사람 IgA 불변 도메인으로 이루어진 그룹 중에서 선택된 중쇄 면역글로불린 불변 도메인을 포함하는, 결합 단백질.

청구항 117

제117항에 있어서, 상기된 중쇄 면역글로불린 불변 영역 도메인이 사람 IgG1 불변 도메인인, 결합 단백질.

청구항 118

제117항에 있어서, 상기된 사람 IgG1 불변 도메인이 서열번호 2 및 서열번호 3으로 이루어진 그룹 중에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는, 결합 단백질.

청구항 119

제95항에 있어서, 추가로 사람 Ig 카파 불변 도메인 및 사람 Ig 랍다 불변 도메인으로 이루어진 그룹 중에서 선택된 경쇄 면역글로불린 불변 도메인을 포함하는, 결합 단백질.

청구항 120

제119항에 있어서, 상기된 경쇄 면역글로불린 불변 영역 도메인이 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 사람 Ig 카파 불변 도메인인, 결합 단백질.

청구항 121

제119항에 있어서, 상기된 경쇄 면역글로불린 불변 영역 도메인이 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 사람 Ig 람다 불변 도메인인, 결합 단백질.

청구항 122

제94항에 있어서, 상기된 결합 단백질이 면역글로불린 분자, scFv, 모노클로날 항체, 사람 항체, 키메라 항체, 인간화 항체, 단일 도메인 항체, Fab 단편, Fab' 단편, F(ab')₂ 단편, Fv, 디설파이드 연결된 Fv, 단일 도메인 항체, 이중항체, 다중 특이적 항체, 이특이적 항체 및 이원 특이적 항체로 이루어진 그룹 중에서 선택되는, 결합 단백질.

청구항 123

제122항에 있어서, 상기된 결합 단백질이 사람 항체인, 결합 단백질.

청구항 124

사람 DLL4와 결합할 수 있고, 하기를 포함하는, 결합 단백질:

서열번호 2 및 서열번호 3으로 이루어진 그룹 중에서 선택된 아미노산 서열을 갖는 Ig 불변 중쇄 영역;

서열번호 4 및 서열번호 5로 이루어진 그룹 중에서 선택된 아미노산 서열을 갖는 Ig 불변 경쇄 영역;

서열번호 112, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325 및 326으로 이루어진 그룹 중에서 선택된 아미노산 서열을 갖는 Ig 가변 중쇄 영역; 및

서열번호 113, 327, 328, 329, 330, 331, 332 및 333으로 이루어진 그룹 중에서 선택된 아미노산 서열을 갖는 Ig 가변 경쇄 영역.

청구항 125

제124항에 있어서, 상기 Ig 불변 경쇄 영역이 서열번호 5인, 결합 단백질.

청구항 126

제94항 내지 제125항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 결합 단백질이 노치-1, 노치-2, 노치-3, 노치-4 및 이의 조합으로 이루어진 그룹 중에서 선택된 노치 단백질과 DLL4의 상호작용을 차단할 수 있는, 결합 단백질.

청구항 127

제126항에 있어서, 상기 결합 단백질이 노치-1 및 노치-4와 DLL4의 상호작용을 차단할 수 있는, 결합 단백질.

청구항 128

제126항에 있어서, 상기 결합 단백질이 노치-1과 DLL4의 상호작용을 차단할 수 있는, 결합 단백질.

청구항 129

제126항에 있어서, 상기 결합 단백질이 노치-4와 DLL4의 상호작용을 차단할 수 있는, 결합 단백질.

청구항 130

제94항 내지 제125항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 결합 단백질이 DLL4의 생물학적 기능을 조절할 수 있는, 결합 단백질.

청구항 131

제94항 내지 125항 중 어느 한 항에 있어서, 상기된 결합 단백질이 DLL4를 중화시킬 수 있는, 결합 단백질.

청구항 132

제131항에 있어서, 상기된 DLL4가 사람 DLL4, 마우스 DLL4, 사이노몰거스 DLL4 및 랫 DLL4로 이루어진 그룹 중에서 선택되는, 중화 결합 단백질.

청구항 133

제131항에 있어서, 상기된 중화 결합 단백질이 DLL4가 이의 수용체에 결합하는 능력을 감소시키는, 중화 결합 단백질.

청구항 134

제131항에 있어서, 상기된 중화 결합 단백질이 정상적인 혈관신생을 감소시킬 수 있는, 중화 결합 단백질.

청구항 135

제131항에 있어서, 상기 중화 결합 단백질이 최대 약 10^{-7} M; 최대 약 10^{-8} M; 최대 약 10^{-9} M; 최대 약 10^{-10} M; 최대 약 10^{-11} M; 최대 약 10^{-12} M; 및 최대 약 10^{-13} M로 이루어진 그룹 중에서 선택된 해리 상수(K_D)를 갖는, 중화 결합 단백질.

청구항 136

제131항에 있어서, 상기 중화 결합 단백질이 적어도 약 $10^2 M^{-1} s^{-1}$; 적어도 약 $10^3 M^{-1} s^{-1}$; 적어도 약 $10^4 M^{-1} s^{-1}$; 적어도 약 $10^5 M^{-1} s^{-1}$; 및 적어도 약 $10^6 M^{-1} s^{-1}$ 로 이루어진 그룹 중에서 선택된 정반응 속도를 갖는, 중화 결합 단백질.

청구항 137

제131항에 있어서, 상기 중화 결합 단백질이 최대 약 $10^{-3} s^{-1}$; 최대 약 $10^{-4} s^{-1}$; 최대 약 $10^{-5} s^{-1}$; 및 최대 약 $10^{-6} s^{-1}$ 로 이루어진 그룹 중에서 선택된 역반응 속도를 갖는, 중화 결합 단백질.

청구항 138

제94항 내지 제137항 중 어느 한 항의 결합 단백질을 포함하는 표지된 결합 단백질로서, 상기 결합 단백질이 검출가능한 표지에 접합된, 표지된 결합 단백질.

청구항 139

제138항에 있어서, 상기 검출가능한 표지가 방사선 표지, 효소, 형광 표지, 발광 표지, 생발광 표지, 자기 표지 및 비오틴으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는, 표지된 결합 단백질.

청구항 140

제139항에 있어서, 상기된 표지가 3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho , 및 ^{153}Sm 으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 방사선 표지인, 표지된 결합 단백질.

청구항 141

제94항 내지 제137항 중 어느 한 항에 기술된 결합 단백질을 포함하고, 추가로 링커 폴리펩타이드 또는 면역글로불린 불변 도메인을 포함하는, 항체 작제물.

청구항 142

제141항에 있어서,

면역글로불린 분자,

모노클로날 항체,

키메라 항체,

CDR-이식 항체,

인간화항체,

Fab,
 Fab',
 F(ab')₂,
 Fv,
 디설파이드 연결된 Fv,
 scFv,
 단일 도메인 항체,
 이중항체,
 다중 특이적 항체,
 이원 특이적 항체 및
 이특이적 항체로 이루어진 그룹 중에서 선택되는, 항체 작제물.

청구항 143

제141항에 있어서, 상기된 항체 작제물이 하기로 이루어진 그룹 중에서 선택된 중쇄 면역글로불린 불변 도메인을 포함하는, 항체 작제물:

사람 IgM 불변 도메인;

사람 IgG1 불변 도메인;

사람 IgG2 불변 도메인;

사람 IgG3 불변 도메인;

사람 IgG4 불변 도메인;

사람 IgE 불변 도메인;

사람 IgA 불변 도메인; 및

Fc 신생 수용체, Fc 감마 수용체 또는 C1q와의 결합 강도를 변경하는 하나 이상의 변이를 갖는 IgG 불변 도메인 변형체.

청구항 144

제141항에 있어서, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5 및 이의 조합으로 이루어진 그룹 중에서 선택된 아미노산 서열을 갖는 면역글로불린 불변 도메인을 포함하는, 항체 작제물.

청구항 145

제141항의 항체 작제물을 포함하는 항체 접합체로서, 상기 항체 작제물이 치료제 또는 세포독성제에 접합된, 항체 접합체.

청구항 146

제145항에 있어서, 상기된 치료제 또는 세포독성제가 항-대사제, 알킬화제, 항생제, 성장 인자, 사이토킨, 항-혈관신생제, 항-유사분열제, 안트라사이클린, 독소 및 아폽토시스 유발제로 이루어진 그룹 중에서 선택되는, 항체 접합체.

청구항 147

제94항에 기술된 CDR-H1, CDR-H2 또는 CDR-H3 중 하나 이상을 포함한 중쇄 가변 도메인을 포함하는 폴리펩타이드; 제94항에 기술된 CDR-L1, CDR-L2 또는 CDR-L3 중 하나 이상을 포함한 경쇄 가변 도메인을 포함하는 폴리펩타이드; 또는 이들 두 폴리펩타이드의 조합물로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 폴리펩타이드를 암호화하는, 분

리된 핵산.

청구항 148

제147항에 따른 분리된 핵산을 포함하는, 벡터.

청구항 149

제148항에 있어서, 상기된 벡터가 pcDNA, pTT, pTT3, pEFBOS, pBV, pJV, pHybE 및 pBJ로 이루어진 그룹 중에서 선택되는, 벡터.

청구항 150

제148항 또는 제149항에 따른 벡터를 포함하는, 숙주 세포.

청구항 151

제150항에 있어서, 상기된 숙주 세포가 원핵 세포인, 숙주 세포.

청구항 152

제151항에 있어서, 상기된 숙주 세포가 에스케리키아 콜라이인, 숙주 세포.

청구항 153

제152항에 있어서, 상기된 숙주 세포가 진핵 세포인, 숙주 세포.

청구항 154

제153항에 있어서, 상기된 진핵 세포가 원생 생물 세포, 동물 세포, 식물 세포 및 진균류 세포로 이루어진 그룹 중에서 선택되는, 숙주 세포.

청구항 155

제154항에 있어서, 상기된 진핵 세포가 포유류 세포, 조류 세포 및 곤충 세포로 이루어진 그룹 중에서 선택된 동물 세포인, 숙주 세포.

청구항 156

제155항에 있어서, 상기된 포유류 세포가 CHO 세포인, 숙주 세포.

청구항 157

제155항에 있어서, 상기된 포유류 세포가 COS 세포인, 숙주 세포.

청구항 158

제154항에 있어서, 상기된 진균류 세포가 사카로마이세스 세레비지애인, 숙주 세포.

청구항 159

제155항에 있어서, 상기된 곤충 세포가 Sf9 세포인, 숙주 세포.

청구항 160

제150항 내지 제159항 중 어느 한 항의 숙주 세포를 사람 DLL4와 결합하는 결합 단백질을 생성하기에 충분한 조건하에 배양 배지 중에서 배양하는 것을 포함하는, 사람 DLL4와 결합하는 결합 단백질을 제조하는 방법.

청구항 161

제160항의 방법에 따라 제조된, 결합 단백질.

청구항 162

제94항 내지 제137항 중 어느 한 항에 따르는 결합 단백질을 포함하는 결정화 결합 단백질로서, 상기 결합 단백질이 결정으로 존재하는, 결정화 결합 단백질.

청구항 163

제162항에 있어서, 상기된 결정이 담체-유리된 약제학적 제어방출성 결정인, 결정화 결합 단백질.

청구항 164

제162항에 있어서, 상기된 결합 단백질이 이의 용해성 대응물보다 더 긴 생체내 반감기를 갖는, 결정화 결합 단백질.

청구항 165

제162항에 있어서, 상기된 결합 단백질이 생물학적 활성을 유지하는, 결정화 결합 단백질.

청구항 166

결합 단백질 방출용 조성물로서,

(a) 제162항 내지 제165항 중 어느 한 항에 따른 결정화 결합 단백질과 성분을 포함하는 제형; 및 (b) 하나 이상의 중합체 담체를 포함하는, 조성물.

청구항 167

제166항에 있어서, 상기된 중합체 담체가 폴리(아크릴산), 폴리(시아노아크릴레이트), 폴리(아미노산), 폴리(무수물), 폴리(헵시펩타이드), 폴리(에스테르), 폴리(락트산), 폴리(락트산-코-글리콜산) 또는 PLGA, 폴리(b-하이드록시부티레이트), 폴리(카프로락톤), 폴리(디옥사논), 폴리(에틸렌 글리콜), 폴리(하이드록시프로필)메타크릴아미드, 폴리[(오르가노)포스파젠], 폴리(오르토 에스테르), 폴리(비닐 알콜), 폴리(비닐파롤리돈), 말레산 무수물-알킬 비닐 에테르 공중합체, 폴루론산 폴리올, 알부민, 알기네이트, 셀룰로스 및 셀룰로스 유도체, 콜라겐, 피브린, 젤라틴, 하이알루론산, 올리고사카라이드, 글리카미노글리칸, 황산화 폴리사카라이드, 이의 블렌드 및 공중합체로 이루어진 그룹 중 하나 이상으로부터 선택된 중합체인, 조성물.

청구항 168

제166항에 있어서, 상기된 성분이 알부민, 슈크로스, 트레할로스, 락ти톨, 젤라틴, 하이드록시프로필- β -사이클로덱스트린, 메톡시폴리에틸렌 글리콜 및 폴리에틸렌 글리콜로 이루어진 그룹 중에서 선택되는, 조성물.

청구항 169

제166항에 따른 조성물의 유효량을 포유동물에 투여하는 단계를 포함하는, 포유류를 치료하는 방법.

청구항 170

제94항 내지 137항 중 어느 한 항에 따른 결합 단백질 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는, 약제학적 조성물.

[청구항 172]

제170항에 있어서, 추가로 DLL4 활성이 유해한 장애를 치료하기 위한 하나 이상의 추가적인 치료제를 포함하는, 약제학적 조성물.

[청구항 173]

제172항에 있어서, 상기된 추가적인 치료제가 혈관신생 억제제, 키나제 억제제, 동시-자극 분자 차단제, 부착분자 차단제, 항-사이토킨 항체 또는 이의 기능성 단편, 메토트렉세이트, 코르티코스테로이드, 사이클로스포린, 라파마이신, FK506 및 비-스테로이드성 소염제로 이루어진 그룹 중에서 선택되는, 약제학적 조성물.

[청구항 174]

제94항 내지 제137항 중 어느 한 항의 결합 단백질과 사람 DLL4를 접촉시켜 사람 DLL4 활성을 감소시키는 것을

포함하는, 사람 DLL4 활성을 감소시키는 방법.

[청구항 175]

DLL4 활성이 유해한 장애를 앓고 있는 사람 환자의 사람 DLL4 활성을 감소시키는 방법으로서,

제94항 내지 제137항 중 어느 한 항의 결합 단백질을 DLL4 활성이 유해한 장애를 앓고 있는 상기 사람 환자에게 투여하여 상기 사람 환자의 사람 IL-17 활성을 감소시키는 것을 포함하는, 방법.

[청구항 176]

DLL4 활성이 유해한 질환 또는 장애를 앓고 있는 사람 환자를 치료하는 방법으로서,

제94항 내지 제137항 중 어느 한 항에 따른 결합 단백질을 DLL4 활성이 유해한 질환 또는 장애를 앓고 있는 상기 사람 환자에게 투여하여 치료를 달성하는 것을 포함하는, 방법.

[청구항 177]

제176항에 있어서, 상기된 장애가 유방암, 결장암, 직장암, 폐암, 구강인두암, 하인두암, 식도암, 위암, 췌장암, 간암, 담낭암, 담관암, 소장암, 요로암, 여성 생식로암, 남성 생식로암, 내분비선암, 피부암, 혈관종, 흑색종, 육종, 뇌종양, 신경암, 안구종양, 수막암, 조혈 악성 종양 유래의 고형 종양, 종양 전이, 안구내 신생 혈관형성, 부종, 류마티스성 관절염, 다발성 경화증, 죽상동맥경화성 플라크, 크론병, 염증성 장 질환, 난치성 복수, 건선, 유육종증, 동맥계 동맥경화증, 패혈증, 소화성 궤양, 화상, 췌장염, 다낭성 난소질환 (POD), 자궁 내막증, 자궁근종, 양성 전립선 비대증 및 기타 이상 DLL4 활성을 특징으로 하는 혈관신생 독립성 및 의존성 질환으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 방법.

[청구항 178]

제177항에 있어서, 상기 장애가 원발성 및 전이성 암인, 방법.

[청구항 179]

제177항에 있어서, 상기 요로암이 신장암, 방광암 및 요로상피암으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는, 방법.

[청구항 180]

제177항에 있어서, 상기 여성 생식로암이 자궁경부암, 자궁암, 난소암, 용모막암 및 임신성 용모성 질환으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는, 방법.

[청구항 181]

제177항에 있어서, 상기 남성 생식로암이 전립선암, 정낭암, 고환암 및 생식 세포 종양으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는, 방법.

[청구항 182]

제177항에 있어서, 상기 내분비선암이 갑상선암, 부신암 및 뇌하수체암으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는, 방법.

[청구항 183]

제177항에 있어서, 상기 육종이 골 육종, 연조직 육종 및 카포시 육종으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는, 방법.

[청구항 184]

제177항에 있어서, 상기 수막암이 성상세포종, 신경교종, 교모세포종, 망막아세포종, 신경종, 신경아세포종, 신경초종 및 수막종으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는, 방법.

[청구항 185]

제177항에 있어서, 상기 조혈 악성 종양으로부터 유래되는 고형 종양이 백혈병, 호지킨 백혈병, 비호지킨 백혈병, 림프종, 호지킨 림프종 및 비호지킨 림프종으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는, 방법.

[청구항 186]

제177항에 있어서, 상기 안구내 신생혈관형성이 당뇨성 실명, 망막병증, 노령성 황반변성 및 피부 조홍으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는, 방법.

[청구항 187]

제94항 내지 제137항 중 어느 한 항의 결합 단백질을 사람 VEGFR2와 결합할 수 있는 항체 또는 이의 단편; 메토트렉세이트; 사람 TNF와 결합할 수 있는 항체 또는 이의 단편; 코르티코스테로이드, 사이클로스포린, 라파마이신, FK506 및 비스테로이드성 소염제로 이루어진 그룹 중에서 선택된 제2 제제의 투여 전에, 투여와 동시에 또는 투여 후에 투여하는 단계를 포함하는, DLL4가 유해한 장애를 앓고 있는 환자를 치료하는 방법.

명세서

기술분야

[0001]

본원은 2009년 8월 29일에 출원된 미국 가특허출원 제61/238,152호 및 2009년 11월 16일에 출원된 미국 가특원 출원 제61/261,728호를 기초로 우선권을 주장한다.

[0002]

본 발명은 개량된 DLL4 결합 단백질의 개발 및 용도, 및 암, 종양 및/또는 다른 혈관신생-의존성 질환 (예, 안구내 신생혈관형성) 또는 DLL4 이상 발현을 특징으로 하는 혈관신생-독립성 질환 (예, 자가 면역 장애)의 억제, 예방 및/또는 치료를 위한 그의 용도에 관한 것이다.

배경기술

[0003]

분화, 증식 및 항상성과 같은 많은 생물학적 과정을 위해 세포 대 세포 교신이 필요하다. 광범위한 진핵세포에 의해 이용되고 있는 한 가지 시스템은 노치 신호전달 경로이다. 이 경로, 특히 노치 수용체는 또한 기능성 종양의 혈관신생을 위해 중요하다. 따라서, 노치 수용체 기능의 억제, 노치 수용체의 차단 및/또는 노치 신호전달 경로의 차단은 항암 조성물 및 치료요법을 위한 잠재적 전략이 된다. 노치 수용체의 소분자 억제제는 체내 전체에서 노치 수용체의 야생형 (정상) 조직 발현을 억제하기 때문에 독성을 나타내는 것으로 입증되어 왔다. 따라서, 노치 신호전달 경로의 다른 일원들은 잠재적 치료제용 표적물로 고려되어야 한다.

[0004]

노치 수용체의 혈관 리간드는 엘타 4 또는 엘타 유사 리간드 4(DLL4)이다. 혈관에서 주로 발현되는 DLL4는 혈관 발달을 위해 중요하다(Yan et al., *Clin. Cancer Res.*, 13(24): 7243-7246 (2007); Shutter et al., *Genes Dev.*, 14(11): 1313-1318 (2000); Gale et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(45): 15949-15954 (2004); Krebs et al., *Genes Dev.*, 14(11): 1343-1352 (2000)). DLL4에 대한 쥐 이형 접합성은 혈관 발달에 있어서의 주요 결합으로 인하여 배아에 치명적이다(Gale et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(45): 15979-15954(2004); Duarte et al., *Genes Dev.*, 18(20): 2474-2478 (2004); Krebs et al., *Genes Dev.*, 18(20): 2468-2473 (2004)). DLL4의 발현은 VEGF에 의해 유도될 수 있다 (Liu et al., *Mol. Cell Biol.*, 23(1): 14-25 (2003); Lobov et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104(9): 3219-3224 (2007)). 차례로, DLL4는 부분적으로 VEGFR2를 억제하고 VEGR1을 유도함으로써 VEGF 신호전달을 음성적으로 조절할 수 있다 (Harrington et al., *Microvasc. Res.*, 75(2): 144-154 (2008); Suchting et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104(9): 3225-3230 (2007)). DLL4와 VEGF사이의 절대적인 조화가 기능성 혈관신생을 위해 필수적이다.

[0005]

이의 생리학적 역할 외에, DLL4는 종양 혈관에서 상향 조절된다 (Gale et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(45): 15949-15954 (2004); Mailhos et al., *Differentiation*, 69(2-3): 135-144 (2001); Patel et al., *Cancer Res.*, 65(19): 8690-8697 (2005); Patel et al., *Clin. Cancer Res.*, 12(16): 4836-4844 (2006); Noguera-Troise et al., *Nature*, 444(7122): 1032-1037 (2006)). DLL4의 차단은 다중 모델에서 원발성 종양의 성장을 강력하게 억제하였다 (Noguera-Troise et al., *Nature*, 444(7122): 1032-1037 (2006); Ridgway et al., *Nature*, 444(7122): 1083-1087 (2006); Scehnet et al., *Blood*, 109(11): 4753-4760 (2007)). DLL4의 억제는 항-VEGF 치료요법에 내성인 종양에 대해서도 유효하였다. DLL4와 VEGF 모두의 병합적 억제는 증강된 항종양 활성을 제공하였다. 흥미롭게도, 종양 혈관 형성을 감소시키는 VEGF 억제와 달리 DLL4 차단은 혈관이 비정상적이고, 효율적인 혈액 수송을 지탱할 수 없으며, 효과적으로 비기능적인 종양 혈관 밀도의 증가를 유도한다. 따라서, DLL4는 암 치료를 위한 잠재적 표적물을 제공한다.

[0006]

본 분야에서는 DLL4-노치 경로를 표적으로 하고 그럼으로써 종양 혈관신생 및 성장을 억제하거나 심지어 예방할 수 있는 치료제가 필요하다.

발명의 내용

[0007] 본 발명은 DLL4와 결합할 수 있는 항체, CDR-이식 항체 및 이의 결합 절편을 포함하는, DLL4와 결합하는 단백질을 제공한다. 바람직하게는, 본원에 기술된 결합 단백질은 고 친화성으로 DLL4와 결합한다. 더욱 바람직하게는, 본 발명의 결합 단백질은 DLL4를 중화시킬 수 있다. 또한, 본 발명은 사람 DLL4 결합 단백질을 포함한 DLL4 결합 단백질을 제조 및 사용하는 방법을 제공한다. 유리하게는, 본 발명은 인간화 DLL4 결합 단백질의 제조 필요성을 배제하며, 그럼으로써 인간화 DLL4 결합 단백질과 연관된 합병증을 막아 준다.

[0008] 본 발명의 한 가지 관점은 사람 DLL4와 결합할 수 있는 항원 결합 도메인을 포함한 결합 단백질에 관한 것으로 상기 항원 결합 도메인은 하기 식의 CDR로 이루 어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 CDR을 포함한다:

[0009] CDR-H1: X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇ (서열번호 99) (여기서,

[0010] X₁은 S 또는 N이고;

[0011] X₂는 S, G 또는 N이며;

[0012] X₃은 S, N, T, G 또는 R이고;

[0013] X₄는 Y이고;

[0014] X₅는 Y 또는 H이고;

[0015] X₆은 W이며;

[0016] X₇은 G이다);

[0017] CDR-H2: X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂-X₁₃-X₁₄-X₁₅-X₁₆ (서열번호 100) (여기서,

[0018] X₁은 D이고;

[0019] X₂는 I이며;

[0020] X₃은 Y, N 또는 S이고;

[0021] X₄는 Y이며,

[0022] X₅는 T, N, A, I, S 또는 R이고;

[0023] X₆은 G이며;

[0024] X₇은 S, N, T 또는 G이고;

[0025] X₈은 T이며;

[0026] X₉는 Y이고;

[0027] X₁₀은 Y이며;

[0028] X₁₁은 N이고;

[0029] X₁₂는 P이며;

[0030] X₁₃은 S이고;

[0031] X₁₄는 L이며;

[0032] X₁₅는 K이고;

[0033] X_{16} 은 S, N, D 또는 G이다);

[0034] CDR-H3: $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}$ (서열번호 101) (여기서,

[0035] X_1 은 E, Y, F, Q, W, L 또는 A이고;

[0036] X_2 는 D, A, S, G, V, E 또는 N이며;

[0037] X_3 은 V, M, L, P 또는 A이고;

[0038] X_4 는 I, A, P, R, S, K, Q, V, G, M 또는 E이며,

[0039] X_5 는 L, Y, F 또는 M이고;

[0040] X_6 은 R, G, S, Q 또는 A이며;

[0041] X_7 은 G이고;

[0042] X_8 은 G, A 또는 S이며;

[0043] X_9 는 S, A, L, V, R 또는 G이고;

[0044] X_{10} 은 D이며;

[0045] X_{11} 은 Y, D, S, N, H, E, R, L, P, C, I, M, T, Q 또는 K이다);

[0046] CDR-L1: $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}$ (서열번호 102) (여기서,

[0047] X_1 은 S이고;

[0048] X_2 는 G이며;

[0049] X_3 은 Q, E 또는 D이고;

[0050] X_4 는 R, S, G, M, K, L 또는 T이며;

[0051] X_5 는 L이고;

[0052] X_6 은 G이며;

[0053] X_7 은 D 또는 E이고;

[0054] X_8 은 K이며;

[0055] X_9 는 Y이고;

[0056] X_{10} 은 A 또는 V이며;

[0057] X_{11} 은 S이다);

[0058] CDR-L2: $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7$ (서열번호 103) (여기서,

[0059] X_1 은 E 또는 Q이고;

[0060] X_2 는 D이며;

[0061] X_3 은 S, L, T, A, E 또는 F이고;

[0062] X_4 는 K, T, E, N, Q, S 또는 M이며;

[0063] X_5 는 R이고;

[0064] X_6 은 P이고;

[0065] X_7 은 S이다); 및

[0066] CDR-L3: $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9$ (서열번호 104) (여기서,

[0067] X_1 은 Q이고;

[0068] X_2 는 A이고;

[0069] X_3 은 W이고;

[0070] X_4 는 D이고;

[0071] X_5 는 R, S, M, E, N, G 또는 K이고;

[0072] X_6 은 D 또는 E이며;

[0073] X_7 은 T, V, A, S 또는 M이고;

[0074] X_8 은 G, A 또는 C이며;

[0075] X_9 는 V이다).

[0076] 바람직하게는, 본 발명에 따른 DLL4 결합 단백질의 항원 결합 도메인은 다음의 아미노산 서열로 이루어진 그룹 중에서 선택된 아미노산 서열을 포함한 하나 이상의 CDR을 포함한다:

[0077] 서열번호 1의 잔기 31-37 (CDR-H1); 서열번호 1의 잔기 52-67 (CDR-H2); 서열번호 1의 잔기 100-110 (CDR-H3);

[0078] 서열번호 111의 잔기 23-33 (CDR-L1); 서열번호 111의 잔기 49-55 (CDR-L2); 서열번호 111의 잔기 88-96 (CDR-L3);

[0079] 서열번호 117 (CDR-H1); 서열번호 118 (CDR-H2); 서열번호 119 (CDR-H3);

[0080] 서열번호 121 (CDR-H1); 서열번호 122 (CDR-H2); 서열번호 123 (CDR-H3);

[0081] 서열번호 125 (CDR-H1); 서열번호 126 (CDR-H2); 서열번호 127 (CDR-H3);

[0082] 서열번호 129 (CDR-H1); 서열번호 130 (CDR-H2); 서열번호 131 (CDR-H3);

[0083] 서열번호 133 (CDR-H1); 서열번호 134 (CDR-H2); 서열번호 135 (CDR-H3);

[0084] 서열번호 137 (CDR-H1); 서열번호 138 (CDR-H2); 서열번호 139 (CDR-H3);

[0085] 서열번호 141 (CDR-H1); 서열번호 142 (CDR-H2); 서열번호 143 (CDR-H3);

[0086] 서열번호 145 (CDR-H1); 서열번호 146 (CDR-H2); 서열번호 147 (CDR-H3);

[0087] 서열번호 149 (CDR-H1); 서열번호 150 (CDR-H2); 서열번호 151 (CDR-H3);

[0088] 서열번호 153 (CDR-H1); 서열번호 154 (CDR-H2); 서열번호 155 (CDR-H3);

[0089] 서열번호 157 (CDR-H1); 서열번호 158 (CDR-H2); 서열번호 159 (CDR-H3);

[0090] 서열번호 161 (CDR-H1); 서열번호 162 (CDR-H2); 서열번호 163 (CDR-H3);

[0091] 서열번호 165 (CDR-H1); 서열번호 166 (CDR-H2); 서열번호 167 (CDR-H3);

[0092] 서열번호 169 (CDR-H1); 서열번호 170 (CDR-H2); 서열번호 171 (CDR-H3);

[0093] 서열번호 173 (CDR-H1); 서열번호 174 (CDR-H2); 서열번호 175 (CDR-H3);

[0094] 서열번호 177 (CDR-H1); 서열번호 178 (CDR-H2); 서열번호 179 (CDR-H3);

[0095] 서열번호 181 (CDR-H1); 서열번호 182 (CDR-H2); 서열번호 183 (CDR-H3);

[0096] 서열번호 185 (CDR-H1); 서열번호 186 (CDR-H2); 서열번호 187 (CDR-H3);

[0097] 서열번호 189 (CDR-H1); 서열번호 190 (CDR-H2); 서열번호 191 (CDR-H3);

[0098] 서열번호 193 (CDR-H1); 서열번호 194 (CDR-H2); 서열번호 195 (CDR-H3);

[0099] 서열번호 197 (CDR-H1); 서열번호 198 (CDR-H2); 서열번호 199 (CDR-H3);

[0100] 서열번호 201 (CDR-H1); 서열번호 202 (CDR-H2); 서열번호 203 (CDR-H3);

[0101] 서열번호 205 (CDR-H1); 서열번호 206 (CDR-H2); 서열번호 207 (CDR-H3);

[0102] 서열번호 209 (CDR-H1); 서열번호 210 (CDR-H2); 서열번호 211 (CDR-H3);

[0103] 서열번호 213 (CDR-H1); 서열번호 214 (CDR-H2); 서열번호 215 (CDR-H3);

[0104] 서열번호 217 (CDR-L1); 서열번호 218 (CDR-L2); 서열번호 219 (CDR-L3);

[0105] 서열번호 221 (CDR-L1); 서열번호 222 (CDR-L2); 서열번호 223 (CDR-L3);

[0106] 서열번호 225 (CDR-L1); 서열번호 226 (CDR-L2); 서열번호 227 (CDR-L3);

[0107] 서열번호 229 (CDR-L1); 서열번호 230 (CDR-L2); 서열번호 231 (CDR-L3);

[0108] 서열번호 233 (CDR-L1); 서열번호 234 (CDR-L2); 서열번호 235 (CDR-L3);

[0109] 서열번호 237 (CDR-L1); 서열번호 238 (CDR-L2); 서열번호 239 (CDR-L3);

[0110] 서열번호 241 (CDR-L1); 서열번호 242 (CDR-L2); 서열번호 243 (CDR-L3);

[0111] 서열번호 245 (CDR-L1); 서열번호 246 (CDR-L2); 서열번호 247 (CDR-L3);

[0112] 서열번호 249 (CDR-L1); 서열번호 250 (CDR-L2); 서열번호 251 (CDR-L3);

[0113] 서열번호 253 (CDR-L1); 서열번호 254 (CDR-L2); 서열번호 255 (CDR-L3);

[0114] 서열번호 257 (CDR-L1); 서열번호 258 (CDR-L2); 서열번호 259 (CDR-L3);

[0115] 서열번호 261 (CDR-L1); 서열번호 262 (CDR-L2); 서열번호 263 (CDR-L3);

[0116] 서열번호 265 (CDR-L1); 서열번호 266 (CDR-L2); 서열번호 267 (CDR-L3);

[0117] 서열번호 269 (CDR-L1); 서열번호 270 (CDR-L2); 서열번호 271 (CDR-L3);

[0118] 서열번호 273 (CDR-L1); 서열번호 274 (CDR-L2); 서열번호 275 (CDR-L3);

[0119] 서열번호 277 (CDR-L1); 서열번호 278 (CDR-L2); 서열번호 279 (CDR-L3);

[0120] 서열번호 281 (CDR-L1); 서열번호 282 (CDR-L2); 서열번호 283 (CDR-L3);

[0121] 서열번호 285 (CDR-L1); 서열번호 286 (CDR-L2); 서열번호 287 (CDR-L3);

[0122] 서열번호 289 (CDR-L1); 서열번호 290 (CDR-L2); 서열번호 291 (CDR-L3);

[0123] 서열번호 293 (CDR-L1); 서열번호 294 (CDR-L2); 서열번호 295 (CDR-L3);

[0124] 서열번호 297 (CDR-L1); 서열번호 298 (CDR-L2); 서열번호 299 (CDR-L3);

[0125] 서열번호 301 (CDR-L1); 서열번호 302 (CDR-L2); 서열번호 303 (CDR-L3);

[0126] 서열번호 305 (CDR-L1); 서열번호 306 (CDR-L2); 서열번호 307 (CDR-L3);

[0127] 서열번호 309 (CDR-L1); 서열번호 310 (CDR-L2); 서열번호 311 (CDR-L3);

[0128] 서열번호 313 (CDR-L1); 서열번호 314 (CDR-L2); 서열번호 315 (CDR-L3);

[0129] 서열번호 334의 잔기 31-37 (CDR-H1); 서열번호 334의 잔기 52-67 (CDR-H2); 서열번호 334의 잔기 100-110 (CDR-H3);

[0130] 서열번호 335의 잔기 23-33 (CDR-L1); 서열번호 335의 잔기 49-55 (CDR-L2); 서열번호 335의 잔기 88-96 (CDR-L3);

[0131] 서열번호 336의 잔기 31-37 (CDR-H1); 서열번호 336의 잔기 52-67 (CDR-H2); 서열번호 336의 잔기 100-110 (CDR-H3);

[0132] 서열번호 337의 잔기 23-33 (CDR-L1); 서열번호 337의 잔기 49-55 (CDR-L2); 서열번호 337의 잔기 88-96 (CDR-L3);

[0133] 서열번호 338의 잔기 31-37 (CDR-H1); 서열번호 338의 잔기 52-67 (CDR-H2); 서열번호 338의 잔기 100-110 (CDR-H3);

[0134] 서열번호 339의 잔기 23-33 (CDR-L1); 서열번호 339의 잔기 49-55 (CDR-L2); 서열번호 339의 잔기 88-96 (CDR-L3);

[0135] 서열번호 340의 잔기 31-37 (CDR-H1); 서열번호 340의 잔기 52-67 (CDR-H2); 서열번호 340의 잔기 100-110 (CDR-H3);

[0136] 서열번호 341의 잔기 23-33 (CDR-L1); 서열번호 341의 잔기 49-55 (CDR-L2); 서열번호 341의 잔기 88-96 (CDR-L3);

[0137] 서열번호 342의 잔기 31-37 (CDR-H1); 서열번호 342의 잔기 52-67 (CDR-H2); 서열번호 342의 잔기 100-110 (CDR-H3);

[0138] 서열번호 343의 잔기 23-33 (CDR-L1); 서열번호 343의 잔기 49-55 (CDR-L2); 서열번호 343의 잔기 88-96 (CDR-L3);

[0139] 서열번호 344의 잔기 31-37 (CDR-H1); 서열번호 344의 잔기 52-67 (CDR-H2); 서열번호 344의 잔기 100-110 (CDR-H3);

[0140] 서열번호 345의 잔기 24-34 (CDR-L1); 서열번호 345의 잔기 50-56 (CDR-L2); 서열번호 345의 잔기 89-97 (CDR-L3);

[0141] 서열번호 346의 잔기 31-37 (CDR-H1); 서열번호 346의 잔기 52-67 (CDR-H2); 서열번호 346의 잔기 100-110 (CDR-H3);

[0142] 서열번호 347의 잔기 23-33 (CDR-L1); 서열번호 347의 잔기 49-55 (CDR-L2); 서열번호 347의 잔기 88-96 (CDR-L3);

[0143] 서열번호 348의 잔기 31-37 (CDR-H1); 서열번호 348의 잔기 52-67 (CDR-H2); 서열번호 348의 잔기 100-110 (CDR-H3);

[0144] 서열번호 349의 잔기 24-34 (CDR-L1); 서열번호 349의 잔기 50-56 (CDR-L2); 서열번호 349의 잔기 89-97 (CDR-L3);

[0145] 서열번호 350의 잔기 31-37 (CDR-H1); 서열번호 350의 잔기 52-67 (CDR-H2); 서열번호 350의 잔기 100-110 (CDR-H3);

[0146] 서열번호 351의 잔기 24-34 (CDR-L1); 서열번호 351의 잔기 50-56 (CDR-L2); 서열번호 351의 잔기 89-97 (CDR-L3);

[0147] 서열번호 352의 잔기 31-37 (CDR-H1); 서열번호 352의 잔기 52-67 (CDR-H2); 서열번호 352의 잔기 100-110 (CDR-H3);

[0148] 서열번호 353의 잔기 24-34 (CDR-L1); 서열번호 353의 잔기 50-56 (CDR-L2); 서열번호 353의 잔기 89-97 (CDR-L3);

[0149] 서열번호 354의 잔기 31-37 (CDR-H1); 서열번호 354의 잔기 52-67 (CDR-H2); 서열번호 354의 잔기 100-110 (CDR-H3);

[0150] 서열번호 355의 잔기 24-34 (CDR-L1); 서열번호 355의 잔기 50-56 (CDR-L2); 서열번호 355의 잔기 89-97 (CDR-L3);

[0151] 서열번호 356의 잔기 31-37 (CDR-H1); 서열번호 356의 잔기 52-67 (CDR-H2); 서열번호 356의 잔기 100-110 (CDR-H3);

[0152] 서열번호 357의 잔기 23-33 (CDR-L1); 서열번호 357의 잔기 49-55 (CDR-L2); 서열번호 357의 잔기 88-96 (CDR-L3);

[0153] 서열번호 358의 잔기 31-37 (CDR-H1); 서열번호 358의 잔기 52-67 (CDR-H2); 서열번호 358의 잔기 100-110 (CDR-H3);

[0154] 서열번호 359의 잔기 23-33 (CDR-L1); 서열번호 359의 잔기 49-55 (CDR-L2); 서열번호 359의 잔기 88-96 (CDR-L3);

[0155] 서열번호 360의 잔기 31-37 (CDR-H1); 서열번호 360의 잔기 52-67 (CDR-H2); 서열번호 360의 잔기 100-110 (CDR-H3);

[0156] 서열번호 361의 잔기 23-33 (CDR-L1); 서열번호 361의 잔기 49-55 (CDR-L2); 서열번호 361의 잔기 88-96 (CDR-L3).

[0157] 다른 양태에 있어서, 결합 단백질은 상술한 바와 같이 적어도 3개의 CDR들을 포함한다.

[0158] 바람직하게는, 본 발명의 DLL4 결합 단백질은 상기된 하나 이상의 CDR을 포함한다. 더욱 바람직하게는, 본 발명의 결합 단백질은 상기된 CDR 3개 이상을 포함한다. 가장 바람직하게는, 본 발명의 DLL4 결합 단백질은 상기된 CDR 6개 (즉, 상기된 CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3)를 포함한다.

[0159] 바람직한 양태로서, 본 발명의 결합 단백질은 상기된 서열로 이루어진 그룹 중에서 선택된 CDR 3개 이상을 포함한다.

[0160] 더욱 바람직하게는, 본 발명의 결합 단백질은 하기 그룹 중에서 선택된 가변 도메인 CDR의 세트중에서 선택된 CDR 3개를 포함한다.

[0161] VH_E9 CDR 세트

[0162] CDR-H1: 서열번호 1의 잔기 31-37

[0163] CDR-H2: 서열번호 1의 잔기 52-67

[0164] CDR-H3: 서열번호 1의 잔기 100-110

[0165] VL_E9 CDR 세트

[0166] CDR-L1: 서열번호 111의 잔기 23-33

[0167] CDR-L2: 서열번호 111의 잔기 49-55

[0168] CDR-L3: 서열번호 111의 잔기 88-96

[0169] VH_E9.4 CDR 세트

[0170] CDR-H1: 서열번호 117

[0171] CDR-H2: 서열번호 118

[0172] CDR-H3: 서열번호 119

[0173] VL_E9.4 CDR 세트

[0174] CDR-L1: 서열번호 229

[0175] CDR-L2: 서열번호 230

[0176] CDR-L3: 서열번호 231

[0177] VH_E9.11 CDR 세트

[0178] CDR-H1: 서열번호 121

[0179] CDR-H2: 서열번호 122

- [0180] CDR-H3: 서열번호 123
- [0181] VL_E9.11 CDR 세트
- [0182] CDR-L1: 서열번호 233
- [0183] CDR-L2: 서열번호 234
- [0184] CDR-L3: 서열번호 235
- [0185] VH_E9.14 CDR 세트
- [0186] CDR-H1: 서열번호 125
- [0187] CDR-H2: 서열번호 126
- [0188] CDR-H3: 서열번호 127
- [0189] VL_E9.14 CDR 세트
- [0190] CDR-L1: 서열번호 237
- [0191] CDR-L2: 서열번호 238
- [0192] CDR-L3: 서열번호 239
- [0193] VH_E9.17 CDR 세트
- [0194] CDR-H1: 서열번호 129
- [0195] CDR-H2: 서열번호 130
- [0196] CDR-H3: 서열번호 131
- [0197] VL_E9.17 CDR 세트
- [0198] CDR-L1: 서열번호 241
- [0199] CDR-L2: 서열번호 242
- [0200] CDR-L3: 서열번호 243
- [0201] VH_E9.18 CDR 세트
- [0202] CDR-H1: 서열번호 133
- [0203] CDR-H2: 서열번호 134
- [0204] CDR-H3: 서열번호 135
- [0205] VL_E9.18 CDR 세트
- [0206] CDR-L1: 서열번호 245
- [0207] CDR-L2: 서열번호 246
- [0208] CDR-L3: 서열번호 247
- [0209] VH_E9.19 CDR 세트
- [0210] CDR-H1: 서열번호 137
- [0211] CDR-H2: 서열번호 138
- [0212] CDR-H3: 서열번호 139
- [0213] VL_E9.19 CDR 세트
- [0214] CDR-L1: 서열번호 249
- [0215] CDR-L2: 서열번호 250

- [0216] CDR-L3: 서열번호 251
- [0217] VH_E9.22 CDR 세트
- [0218] CDR-H1: 서열번호 141
- [0219] CDR-H2: 서열번호 142
- [0220] CDR-H3: 서열번호 143
- [0221] VL_E9.22 CDR 세트
- [0222] CDR-L1: 서열번호 253
- [0223] CDR-L2: 서열번호 254
- [0224] CDR-L3: 서열번호 255
- [0225] VH_E9.48 CDR 세트
- [0226] CDR-H1: 서열번호 145
- [0227] CDR-H2: 서열번호 146
- [0228] CDR-H3: 서열번호 147
- [0229] VL_E9.48 CDR 세트
- [0230] CDR-L1: 서열번호 257
- [0231] CDR-L2: 서열번호 258
- [0232] CDR-L3: 서열번호 259
- [0233] VH_E9.65 CDR 세트
- [0234] CDR-H1: 서열번호 149
- [0235] CDR-H2: 서열번호 150
- [0236] CDR-H3: 서열번호 151
- [0237] VL_E9.65 CDR 세트
- [0238] CDR-L1: 서열번호 261
- [0239] CDR-L2: 서열번호 262
- [0240] CDR-L3: 서열번호 263
- [0241] VH_E9.66 CDR 세트
- [0242] CDR-H1: 서열번호 153
- [0243] CDR-H2: 서열번호 154
- [0244] CDR-H3: 서열번호 155
- [0245] VL_E9.66 CDR 세트
- [0246] CDR-L1: 서열번호 265
- [0247] CDR-L2: 서열번호 266
- [0248] CDR-L3: 서열번호 267
- [0249] VH_E9.71 CDR 세트
- [0250] CDR-H1: 서열번호 157
- [0251] CDR-H2: 서열번호 158

- [0252] CDR-H3: 서열번호 159
- [0253] VL_E9.71 CDR 세트
- [0254] CDR-L1: 서열번호 269
- [0255] CDR-L2: 서열번호 270
- [0256] CDR-L3: 서열번호 271
- [0257] VH_E9.13 CDR 세트
- [0258] CDR-H1: 서열번호 161
- [0259] CDR-H2: 서열번호 162
- [0260] CDR-H3: 서열번호 163
- [0261] VL_E9.13 CDR 세트
- [0262] CDR-L1: 서열번호 217
- [0263] CDR-L2: 서열번호 218
- [0264] CDR-L3: 서열번호 219
- [0265] VH_E9.16 CDR 세트
- [0266] CDR-H1: 서열번호 165
- [0267] CDR-H2: 서열번호 166
- [0268] CDR-H3: 서열번호 167
- [0269] VL_E9.16 CDR 세트
- [0270] CDR-L1: 서열번호 221
- [0271] CDR-L2: 서열번호 222
- [0272] CDR-L3: 서열번호 223
- [0273] VH_E9.38 CDR 세트
- [0274] CDR-H1: 서열번호 169
- [0275] CDR-H2: 서열번호 170
- [0276] CDR-H3: 서열번호 171
- [0277] VL_E9.38 CDR 세트
- [0278] CDR-L1: 서열번호 225
- [0279] CDR-L2: 서열번호 226
- [0280] CDR-L3: 서열번호 227
- [0281] VH_E9.2B CDR 세트
- [0282] CDR-H1: 서열번호 173
- [0283] CDR-H2: 서열번호 174
- [0284] CDR-H3: 서열번호 175
- [0285] VL_E9.2B CDR 세트
- [0286] CDR-L1: 서열번호 273
- [0287] CDR-L2: 서열번호 274

- [0288] CDR-L3: 서열번호 275
- [0289] VH_E9.1F CDR 세트
- [0290] CDR-H1: 서열번호 177
- [0291] CDR-H2: 서열번호 178
- [0292] CDR-H3: 서열번호 179
- [0293] VL_E9.1F CDR 세트
- [0294] CDR-L1: 서열번호 277
- [0295] CDR-L2: 서열번호 278
- [0296] CDR-L3: 서열번호 279
- [0297] VH_E9.10H CDR 세트
- [0298] CDR-H1: 서열번호 181
- [0299] CDR-H2: 서열번호 182
- [0300] CDR-H3: 서열번호 183
- [0301] VL_E9.10H CDR 세트
- [0302] CDR-L1: 서열번호 301
- [0303] CDR-L2: 서열번호 302
- [0304] CDR-L3: 서열번호 303
- [0305] VH_E9.5E CDR 세트
- [0306] CDR-H1: 서열번호 185
- [0307] CDR-H2: 서열번호 186
- [0308] CDR-H3: 서열번호 187
- [0309] VL_E9.5E CDR 세트
- [0310] CDR-L1: 서열번호 293
- [0311] CDR-L2: 서열번호 294
- [0312] CDR-L3: 서열번호 295
- [0313] VH_E9.10C CDR 세트
- [0314] CDR-H1: 서열번호 189
- [0315] CDR-H2: 서열번호 190
- [0316] CDR-H3: 서열번호 191
- [0317] VL_E9.10C CDR 세트
- [0318] CDR-L1: 서열번호 281
- [0319] CDR-L2: 서열번호 282
- [0320] CDR-L3: 서열번호 283
- [0321] VH_E9.7E CDR 세트
- [0322] CDR-H1: 서열번호 193
- [0323] CDR-H2: 서열번호 194

- [0324] CDR-H3: 서열번호 195
- [0325] VL_E9.7E CDR 세트
- [0326] CDR-L1: 서열번호 289
- [0327] CDR-L2: 서열번호 290
- [0328] CDR-L3: 서열번호 291
- [0329] VH_E9.12B CDR 세트
- [0330] CDR-H1: 서열번호 197
- [0331] CDR-H2: 서열번호 198
- [0332] CDR-H3: 서열번호 199
- [0333] VL_E9.12B CDR 세트
- [0334] CDR-L1: 서열번호 297
- [0335] CDR-L2: 서열번호 298
- [0336] CDR-L3: 서열번호 299
- [0337] VH_E9.10E CDR 세트
- [0338] CDR-H1: 서열번호 201
- [0339] CDR-H2: 서열번호 202
- [0340] CDR-H3: 서열번호 203
- [0341] VL_E9.10E CDR 세트
- [0342] CDR-L1: 서열번호 285
- [0343] CDR-L2: 서열번호 286
- [0344] CDR-L3: 서열번호 287
- [0345] VH_E9.6A CDR 세트
- [0346] CDR-H1: 서열번호 205
- [0347] CDR-H2: 서열번호 206
- [0348] CDR-H3: 서열번호 207
- [0349] VL_E9.6A CDR 세트
- [0350] CDR-L1: 서열번호 305
- [0351] CDR-L2: 서열번호 306
- [0352] CDR-L3: 서열번호 307
- [0353] VH_E9.7A CDR 세트
- [0354] CDR-H1: 서열번호 209
- [0355] CDR-H2: 서열번호 210
- [0356] CDR-H3: 서열번호 211
- [0357] VL_E9.7A CDR 세트
- [0358] CDR-L1: 서열번호 309
- [0359] CDR-L2: 서열번호 310

- [0360] CDR-L3: 서열번호 311
- [0361] VH E9.8H CDR 세트
- [0362] CDR-H1: 서열번호 213
- [0363] CDR-H2: 서열번호 214
- [0364] CDR-H3: 서열번호 215
- [0365] VL E9.8H CDR 세트
- [0366] CDR-L1: 서열번호 313
- [0367] CDR-L2: 서열번호 314
- [0368] CDR-L3: 서열번호 315
- [0369] VH E9.1 CDR 세트
- [0370] CDR-H1: 서열번호 334의 잔기 31-37
- [0371] CDR-H2: 서열번호 334의 잔기 52-67
- [0372] CDR-H3: 서열번호 334의 잔기 100-110
- [0373] VL E9.1 CDR 세트
- [0374] CDR-L1: 서열번호 335의 잔기 23-33
- [0375] CDR-L2: 서열번호 335의 잔기 49-55
- [0376] CDR-L3: 서열번호 335의 잔기 88-96
- [0377] VH E9-SE1 CDR 세트
- [0378] CDR-H1: 서열번호 336의 잔기 31-37
- [0379] CDR-H2: 서열번호 336의 잔기 52-67
- [0380] CDR-H3: 서열번호 336의 잔기 100-110
- [0381] VL E9-SE1 CDR 세트
- [0382] CDR-L1: 서열번호 337의 잔기 23-33
- [0383] CDR-L2: 서열번호 337의 잔기 49-55
- [0384] CDR-L3: 서열번호 337의 잔기 88-96
- [0385] VH E9-SE2 CDR 세트
- [0386] CDR-H1: 서열번호 338의 잔기 31-37
- [0387] CDR-H2: 서열번호 338의 잔기 52-67
- [0388] CDR-H3: 서열번호 338의 잔기 100-110
- [0389] VL E9-SE2 CDR 세트
- [0390] CDR-L1: 서열번호 339의 잔기 23-33
- [0391] CDR-L2: 서열번호 339의 잔기 49-55
- [0392] CDR-L3: 서열번호 339의 잔기 88-96
- [0393] VH E9-SE3 CDR 세트
- [0394] CDR-H1: 서열번호 340의 잔기 31-37
- [0395] CDR-H2: 서열번호 340의 잔기 52-67

[0396] CDR-H3: 서열번호 340의 잔기 100-110

[0397] VL_E9-SE3 CDR 세트

[0398] CDR-L1: 서열번호 341의 잔기 23-33

[0399] CDR-L2: 서열번호 341의 잔기 49-55

[0400] CDR-L3: 서열번호 341의 잔기 88-96

[0401] VH_E9-SE4 CDR 세트

[0402] CDR-H1: 서열번호 342의 잔기 31-37

[0403] CDR-H2: 서열번호 342의 잔기 52-67

[0404] CDR-H3: 서열번호 342의 잔기 100-110

[0405] VL_E9-SE4 CDR 세트

[0406] CDR-L1: 서열번호 343의 잔기 23-33

[0407] CDR-L2: 서열번호 343의 잔기 49-55

[0408] CDR-L3: 서열번호 343의 잔기 88-96

[0409] VH_E9-SE5 CDR 세트

[0410] CDR-H1: 서열번호 344의 잔기 31-37

[0411] CDR-H2: 서열번호 344의 잔기 52-67

[0412] CDR-H3: 서열번호 344의 잔기 100-110

[0413] VL_E9-SE5 CDR 세트

[0414] CDR-L1: 서열번호 345의 잔기 24-34

[0415] CDR-L2: 서열번호 345의 잔기 50-56

[0416] CDR-L3: 서열번호 345의 잔기 89-97

[0417] VH_E9-SE6 CDR 세트

[0418] CDR-H1: 서열번호 346의 잔기 31-37

[0419] CDR-H2: 서열번호 346의 잔기 52-67

[0420] CDR-H3: 서열번호 346의 잔기 100-110

[0421] VL_E9-SE6 CDR 세트

[0422] CDR-L1: 서열번호 347의 잔기 23-33

[0423] CDR-L2: 서열번호 347의 잔기 49-55

[0424] CDR-L3: 서열번호 347의 잔기 88-96

[0425] VH_E9-SE7 CDR 세트

[0426] CDR-H1: 서열번호 348의 잔기 31-37

[0427] CDR-H2: 서열번호 348의 잔기 52-67

[0428] CDR-H3: 서열번호 348의 잔기 100-110

[0429] VL_E9-SE7 CDR 세트

[0430] CDR-L1: 서열번호 349의 잔기 24-34

[0431] CDR-L2: 서열번호 349의 잔기 50-56

[0432] CDR-L3: 서열번호 349의 잔기 89-97

[0433] VH_E9-SE8 CDR 세트

[0434] CDR-H1: 서열번호 350의 잔기 31-37

[0435] CDR-H2: 서열번호 350의 잔기 52-67

[0436] CDR-H3: 서열번호 350의 잔기 100-110

[0437] VL_E9-SE8 CDR 세트

[0438] CDR-L1: 서열번호 351의 잔기 24-34

[0439] CDR-L2: 서열번호 351의 잔기 50-56

[0440] CDR-L3: 서열번호 351의 잔기 89-97

[0441] VH_E9-FR1 CDR 세트

[0442] CDR-H1: 서열번호 352의 잔기 31-37

[0443] CDR-H2: 서열번호 352의 잔기 52-67

[0444] CDR-H3: 서열번호 352의 잔기 100-110

[0445] VL_E9-FR1 CDR 세트

[0446] CDR-L1: 서열번호 353의 잔기 24-34

[0447] CDR-L2: 서열번호 353의 잔기 50-56

[0448] CDR-L3: 서열번호 353의 잔기 89-97

[0449] VH_E9-FR2 CDR 세트

[0450] CDR-H1: 서열번호 354의 잔기 31-37

[0451] CDR-H2: 서열번호 354의 잔기 52-67

[0452] CDR-H3: 서열번호 354의 잔기 100-110

[0453] VL_E9-FR2 CDR 세트

[0454] CDR-L1: 서열번호 355의 잔기 24-34

[0455] CDR-L2: 서열번호 355의 잔기 50-56

[0456] CDR-L3: 서열번호 355의 잔기 89-97

[0457] VH_E9.71 CDR 세트

[0458] CDR-H1: 서열번호 356의 잔기 31-37

[0459] CDR-H2: 서열번호 356의 잔기 52-67

[0460] CDR-H3: 서열번호 356의 잔기 100-110

[0461] VL_E9.71 CDR 세트

[0462] CDR-L1: 서열번호 357의 잔기 23-33

[0463] CDR-L2: 서열번호 357의 잔기 49-55

[0464] CDR-L3: 서열번호 357의 잔기 88-96

[0465] VH_E9.71(M) CDR 세트

[0466] CDR-H1: 서열번호 358의 잔기 31-37

[0467] CDR-H2: 서열번호 358의 잔기 52-67

[0468] CDR-H3: 서열번호 358의 잔기 100-110

[0469] VL E9.71(M) CDR 세트

[0470] CDR-L1: 서열번호 359의 잔기 23-33

[0471] CDR-L2: 서열번호 359의 잔기 49-55

[0472] CDR-L3: 서열번호 359의 잔기 88-96

[0473] VH E9.71(L) CDR 세트

[0474] CDR-H1: 서열번호 360의 잔기 31-37

[0475] CDR-H2: 서열번호 360의 잔기 52-67

[0476] CDR-H3: 서열번호 360의 잔기 100-110

[0477] VL E9.71(L) CDR 세트

[0478] CDR-L1: 서열번호 361의 잔기 23-33

[0479] CDR-L2: 서열번호 361의 잔기 49-55

[0480] CDR-L3: 서열번호 361의 잔기 88-96

[0481] 다른 양태로서, 결합 단백질은 상기 그룹의 CDR 3개의 임의의 가변 중쇄(VH) 세트에서 선택된 CDR 3개의 VH 세트, 및 상기 그룹의 CDR 3개의 임의의 가변 경쇄(VL) 세트에서 선택된 CDR 3개의 VL 세트를 포함한다.

[0482] 또 다른 양태로서, 결합 단백질은 하기 그룹 중에서 선택된 CDR 3개의 VH 세트와 상응하여 선택된 CDR 3개의 VL 세트를 포함한다. 바람직하게는, 본 발명에 따른 결합 단백질은 아래의 가변 도메인 CDR 세트로 이루어진 그룹 중에서 선택된 가변 도메인 CDR 세트를 2개 이상 포함한다:

[0483] VH E9 CDR 세트와 VL E9 CDR 세트;

[0484] VH E9.4 CDR 세트와 VL E9.4 CDR 세트;

[0485] VH E9.11 CDR 세트와 VL E9.11 CDR 세트;

[0486] VH E9.14 CDR 세트와 VL E9.14 CDR 세트;

[0487] VH E9.17 CDR 세트와 VL E9.17 CDR 세트;

[0488] VH E9.18 CDR 세트와 VL E9.18 CDR 세트;

[0489] VH E9.19 CDR 세트와 VL E9.19 CDR 세트;

[0490] VH E9.22 CDR 세트와 VL E9.22 CDR 세트;

[0491] VH E9.48 CDR 세트와 VL E9.48 CDR 세트;

[0492] VH E9.65 CDR 세트와 VL E9.65 CDR 세트;

[0493] VH E9.66 CDR 세트와 VL E9.66 CDR 세트;

[0494] VH E9.71 CDR 세트와 VL E9.71 CDR 세트;

[0495] VH E9.13 CDR 세트와 VL E9.13 CDR 세트;

[0496] VH E9.16 CDR 세트와 VL E9.16 CDR 세트;

[0497] VH E9.38 CDR 세트와 VL E9.38 CDR 세트;

[0498] VH E9.2B CDR 세트와 VL E9.2B CDR 세트;

[0499] VH E9.1F CDR 세트와 VL E9.1F CDR 세트;

[0500] VH E9.10H CDR 세트와 VL E9.10H CDR 세트;

[0501] VH E9.5E CDR 세트와 VL E9.5E CDR 세트;

[0502] VH E9.10C CDR 세트와 VL E9.10C CDR 세트;

[0503] VH E9.7E CDR 세트와 VL E9.7E CDR 세트;

[0504] VH E9.12B CDR 세트와 VL E9.12B CDR 세트;

[0505] VH E9.10E CDR 세트와 VL E9.10E CDR 세트;

[0506] VH E9.6A CDR 세트와 VL E9.6A CDR 세트;

[0507] VH E9.7A CDR 세트와 VL E9.7A CDR 세트;

[0508] VH E9.8H CDR 세트와 VL E9.8H CDR 세트;

[0509] VH E9-SE1 CDR 세트와 VL E9-SE1 CDR 세트;

[0510] VH E9-SE2 CDR 세트와 VL E9-SE2 CDR 세트;

[0511] VH E9-SE3 CDR 세트와 VL E9-SE3 CDR 세트;

[0512] VH E9-SE4 CDR 세트와 VL E9-SE4 CDR 세트;

[0513] VH E9-SE5 CDR 세트와 VL E9-SE5 CDR 세트;

[0514] VH E9-SE6 CDR 세트와 VL E9-SE6 CDR 세트;

[0515] VH E9-SE7 CDR 세트와 VL E9-SE7 CDR 세트;

[0516] VH E9-SE8 CDR 세트와 VL E9-SE8 CDR 세트;

[0517] VH E9-FR1 CDR 세트와 VL E9-FR1 CDR 세트;

[0518] VH E9-FR2 CDR 세트와 VL E9-FR2 CDR 세트;

[0519] VH E9.71 CDR 세트와 VL E9.71 CDR 세트;

[0520] VH E9.71(M) CDR 세트와 VL E9.71(M) CDR 세트; 및
VH E9.71(L) CDR 세트와 VL E9.71(L) CDR 세트.

[0521] 또 다른 양태로서, 상기된 결합 단백질은 또한 사람 수용체 골격 영역을 포함한다. 바람직하게는, 사람 수용체 골격 영역은 아래 아미노산 서열로 이루어진 그룹 중에서 선택된 아미노산 서열을 포함한다:

[0523] 서열번호 6-22의 중쇄 수용체 골격 서열;

[0524] 서열번호 35-62의 중쇄 수용체 서열;

[0525] 서열번호 23-34의 경쇄 수용체 서열; 및
서열번호 63-98의 경쇄 수용체 서열.

[0527] 다른 양태로서, 상기된 결합 단백질은 하나 이상의 골격 영역 아미노산 치환을 포함하는, 사람 수용체 골격을 포함하고, 여기에서 상기 골격의 아미노산 서열은 상기 사람 수용체 골격 서열과 65% 이상 동일하고, 상기 사람 수용체 골격과 동일한 아미노산 잔기를 70개 이상 포함한다.

[0528] 다른 양태로서, 본원에 기술된 결합 단백질은 하나 이상의 골격 영역 아미노산 치환을 아래의 핵심 잔기로 이루어진 그룹 중에서 선택된 핵심 잔기에 포함하는 사람 수용체 골격을 포함한다:

[0529] CDR에 인접한 잔기;

[0530] 당화 부위 잔기;

[0531] 희귀 잔기;

[0532] 사람 DLL4와 상호작용할 수 있는 잔기;

[0533] 정규 잔기;

[0534] 중쇄 가변 영역과 경쇄 가변 영역 사이의 접점 잔기;

[0535] 버니어 구역내의 잔기; 및

[0536] 초티아-규정의 가변 중쇄 CDR1과 캐벳-규정의 제1 중쇄 골격 간에 중첩하는 영역내의 잔기.

[0537] 바람직하게는, 핵심 잔기는 2H, 4H, 24H, 26H, 27H, 29H, 34H, 35H, 37H, 39H, 44H, 45H, 47H, 48H, 49H, 50H, 51H, 58H, 59H, 60H, 63H, 67H, 69H, 71H, 73H, 76H, 78H, 91H, 93H, 94H, 2L, 4L, 25L, 29L, 27bL, 33L, 34L, 36L, 38L, 43L, 44L, 46L, 47L, 48L, 49L, 55L, 58L, 62L, 64L, 71L, 87L, 89L, 90L, 91L, 94L 및 95L로 이루어진 그룹 중에서 선택된다.

[0538] 다른 양태로서, 본원에 기술된 결합 단백질은 컨센서스 사람 가변 도메인을 포함한다.

[0539] 바람직한 양태로서, 본원에 기술된 결합 단백질은 아래의 아미노산 서열로 이루어진 그룹 중에서 선택된 아미노산 서열을 갖는 가변 도메인 하나 이상을 포함한다:

[0540] 서열번호 1, 111, 116, 228, 120, 232, 124, 236, 128, 240, 132, 244, 136, 248, 140, 252, 144, 256, 148, 260, 152, 264, 156, 268, 160, 216, 164, 220, 168, 224, 172, 272, 176, 276, 180, 300, 184, 292, 188, 280, 192, 288, 196, 296, 200, 284, 204, 304, 208, 308, 212, 312, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360 및 361.

[0541] 다른 양태로서, 본 발명에 따른 결합 단백질은 2개의 가변 도메인을 포함하며, 여기서 상기 2개의 가변 도메인은 아래와 같은 한 쌍의 아미노산 서열로 이루어진 그룹 중에서 선택된 아미노산 서열을 갖는다:

[0542] 서열번호 1과 111; 서열번호 116과 228; 서열번호 120과 232; 서열번호 124와 236; 서열번호 128과 240; 서열번호 132와 244; 서열번호 136과 248; 서열번호 140과 252; 서열번호 144와 256; 서열번호 148과 260; 서열번호 152와 264; 서열번호 156과 268; 서열번호 160과 216; 서열번호 164와 220; 서열번호 168과 224; 서열번호 172와 272; 서열번호 176과 276; 서열번호 180과 300; 서열번호 184와 292; 서열번호 188과 280; 서열번호 192와 288; 서열번호 196과 296; 서열번호 200과 284; 서열번호 204와 304; 서열번호 208과 308; 서열번호 212와 312; 서열번호 334와 335; 서열번호 336과 337; 서열번호 338과 339; 서열번호 340과 341; 서열번호 342와 343; 서열번호 344와 345; 서열번호 346과 347; 서열번호 348과 349; 서열번호 350과 351; 서열번호 352와 353; 서열번호 354와 355; 서열번호 356과 357; 서열번호 358과 359; 및 서열번호 360과 361.

[0543] 한 양태로서, 본 발명의 결합 단백질은 중쇄 가변 도메인 (V_H)를 포함하며, 바람직하게는 V_H 는 아래의 아미노산 서열로 이루어진 그룹 중에서 선택된 아미노산 서열을 포함한다:

[0544] 서열번호 1, 116, 120, 124, 128, 132, 136, 140, 144, 148, 152, 156, 160, 164, 168, 172, 176, 180, 184, 188, 192, 196, 200, 204, 208, 212, 334, 336, 338, 340, 342, 344, 346, 348, 350, 352, 354, 356, 358 및 360.

[0545] 또 다른 양태로서, 본 발명의 결합 단백질은 경쇄 가변 도메인 (V_L)을 포함하며, 바람직하게는 V_L 은 아래의 아미노산 서열로 이루어진 그룹 중에서 선택된 아미노산 서열을 포함한다:

[0546] 서열번호 111, 228, 232, 236, 240, 244, 248, 252, 256, 260, 264, 268, 216, 220, 224, 272, 276, 300, 292, 280, 288, 296, 284, 304, 308, 312, 335, 337, 339, 341, 343, 345, 347, 349, 351, 353, 355, 357, 359 및 361.

[0547] 바람직한 양태로서, 본 발명의 결합 단백질은 V_H 와 V_L 을 포함하며, 바람직하게는 V_H 및 V_L 은 상기된 서열중 어느 것도 가능하다.

[0548] 다른 양태로서, 본 발명은 사람 DLL-4와 결합할 수 있는 결합 단백질을 제공하며, 여기서 결합 단백질은 다음의 영역을 포함한다:

[0549] 서열번호 2 및 서열번호 3으로 이루어진 그룹 중에서 선택된 아미노산 서열을 갖는 Ig 불변 중쇄 영역;

[0550] 서열번호 4 및 서열번호 5로 이루어진 그룹 중에서 선택된 아미노산 서열을 갖는 Ig 불변 경쇄 영역;

[0551] 서열번호 1, 116, 120, 124, 128, 132, 136, 140, 144, 148, 152, 156, 160, 164, 168, 172, 176, 180, 184, 188, 192, 196, 200, 204, 208, 212, 334, 336, 338, 340, 342, 344, 346, 348, 350, 352, 354, 356, 358 및

360으로 이루어진 그룹 중에서 선택된 아미노산 서열을 갖는 Ig 가변 중쇄 영역; 및

[0552] 서열번호 111, 228, 232, 236, 240, 244, 248, 252, 256, 260, 264, 268, 216, 220, 224, 272, 276, 300, 292, 280, 288, 296, 284, 304, 308, 312, 335, 337, 339, 341, 343, 345, 347, 349, 351, 353, 355, 357, 359 및 361로 이루어진 그룹 중에서 선택된 아미노산 서열을 갖는 Ig 가변 경쇄 영역.

[0553] 본 발명의 다른 관점은 사람 DLL4와 결합할 수 있는 항원 결합 도메인을 포함하는 결합 단백질에 관한 것이며, 여기서 항원 결합 도메인은 아래의 CDR로 이루어진 그룹 중에서 선택된 CDR을 하나 이상 포함한다:

[0554] CDR-H1: $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5$ (서열번호 105) (여기서,

[0555] X_1 은 S, N 또는 D이고;

[0556] X_2 는 H 또는 Y이며;

[0557] X_3 은 W이고;

[0558] X_4 는 M이며;

[0559] X_5 는 S 또는 H이다);

[0560] CDR-H2: $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}-X_{13}-X_{14}-X_{15}-X_{16}-X_{17}$ (서열번호 106) (여기서,

[0561] X_1 은 I, D, M 또는 T이고;

[0562] X_2 는 I이며;

[0563] X_3 은 S이고;

[0564] X_4 는 Y, N, S, Q, V, T, H 또는 D이며;

[0565] X_5 는 D이고;

[0566] X_6 은 G이며;

[0567] X_7 은 S, R, I, T, G, K, H 또는 N이고;

[0568] X_8 은 N, Y, S, I 또는 T이며;

[0569] X_9 는 K, M, N, Q, E, T, R, S, A 또는 L이고;

[0570] X_{10} 은 Y, D 또는 E이며;

[0571] X_{11} 은 S 또는 Y이고;

[0572] X_{12} 는 A이고;

[0573] X_{13} 은 D이며;

[0574] X_{14} 는 S이고;

[0575] X_{15} 는 V이며;

[0576] X_{16} 은 K이고;

[0577] X_{17} 은 G이다);

[0578] CDR-H3: $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}$ (서열번호 107) (여기서,

[0579] X_1 은 A이고;

[0580] X_2 는 G, A 또는 R이며;

[0581] X_3 은 G이고;

[0582] X_4 는 G, S 또는 A이며;

[0583] X_5 는 N이며;

[0584] X_6 은 V 또는 M이며;

[0585] X_7 은 G이며;

[0586] X_8 은 F, L, Y 또는 M이며;

[0587] X_9 는 D이며;

[0588] X_{10} 은 I, S 또는 L이다);

[0589] CDR-L1: $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}$ (서열번호 108) (여기서,

[0590] X_1 은 S이며;

[0591] X_2 는 A 또는 G이며;

[0592] X_3 은 D이며;

[0593] X_4 는 K, N, L, Q, M, E, S, T, G 또는 D이며;

[0594] X_5 는 L이며;

[0595] X_6 은 G이며;

[0596] X_7 은 T, S, N, A, G 또는 E이고;

[0597] X_8 은 K, Q, N 또는 R이며;

[0598] X_9 는 Y이며;

[0599] X_{10} 은 V 또는 I이며;

[0600] X_{11} 은 S이다);

[0601] CDR-L2: $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7$ (서열번호 109) (여기서,

[0602] X_1 은 Q이며;

[0603] X_2 는 D이며;

[0604] X_3 은 A, G, W, S 또는 D이고;

[0605] X_4 는 K, M, Q, N, L, T, I 또는 E이며;

[0606] X_5 는 R이며;

[0607] X_6 은 P이며;

[0608] X_7 은 S이다); 및

[0609] CDR-L3: $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9$ (서열번호 110) (여기서,

[0610] X_1 은 Q이고;

[0611] X_2 는 S 또는 A이며;

[0612] X_3 은 W이고;

[0613] X_4 는 D이며;

[0614] X_5 는 R, S, Q, P, A, V, W 또는 M이고;

[0615] X_6 은 S, G, I, N, R 또는 T이며;

[0616] X_7 은 D 또는 G이고;

[0617] X_8 은 V, A, P 또는 E이며;

[0618] X_9 는 V이다).

[0619] 바람직하게는, 본 발명에 따른 DLL4 결합 단백질의 항원 결합 도메인은 아래의 아미노산 서열로 이루어진 그룹 중에서 선택된 아미노산 서열을 포함한 CDR을 한 개 이상 포함한다:

[0620] 서열번호 112의 잔기 31-35 (CDR-H1); 서열번호 112의 잔기 50-66 (CDR-H2); 서열번호 112의 잔기 99-108 (CDR-H3);

[0621] 서열번호 113의 잔기 23-33 (CDR-L1); 서열번호 113의 잔기 49-55 (CDR-L2); 서열번호 113의 잔기 88-96 (CDR-L3);

[0622] 서열번호 316의 잔기 31-35 (CDR-H1); 서열번호 316의 잔기 50-66 (CDR-H2); 서열번호 316의 잔기 99-108 (CDR-H3);

[0623] 서열번호 317의 잔기 31-35 (CDR-H1); 서열번호 317의 잔기 50-66 (CDR-H2); 서열번호 317의 잔기 99-108 (CDR-H3);

[0624] 서열번호 318의 잔기 31-55 (CDR-H1); 서열번호 318의 잔기 50-66 (CDR-H2); 서열번호 318의 잔기 99-108 (CDR-H3);

[0625] 서열번호 319의 잔기 31-35 (CDR-H1); 서열번호 319의 잔기 50-66 (CDR-H2); 서열번호 319의 잔기 99-108 (CDR-H3);

[0626] 서열번호 320의 잔기 31-35 (CDR-H1); 서열번호 320의 잔기 50-66 (CDR-H2); 서열번호 320의 잔기 99-108 (CDR-H3);

[0627] 서열번호 321의 잔기 31-35 (CDR-H1); 서열번호 321의 잔기 50-56 (CDR-H2); 서열번호 321의 잔기 99-108 (CDR-H3);

[0628] 서열번호 322의 잔기 31-35 (CDR-H1); 서열번호 322의 잔기 50-66 (CDR-H2); 서열번호 322의 잔기 99-108 (CDR-H3);

[0629] 서열번호 323의 잔기 31-35 (CDR-H1); 서열번호 323의 잔기 50-66 (CDR-H2); 서열번호 323의 잔기 99-108 (CDR-H3);

[0630] 서열번호 324의 잔기 31-35 (CDR-H1); 서열번호 324의 잔기 50-66 (CDR-H2); 서열번호 324의 잔기 99-108 (CDR-H3);

[0631] 서열번호 325의 잔기 31-35 (CDR-H1); 서열번호 325의 잔기 50-66 (CDR-H2); 서열번호 325의 잔기 99-108 (CDR-H3);

[0632] 서열번호 326의 잔기 31-35 (CDR-H1); 서열번호 326의 잔기 50-66 (CDR-H2); 서열번호 326의 잔기 99-108 (CDR-H3);

[0633] 서열번호 327의 잔기 23-33 (CDR-L1); 서열번호 327의 잔기 49-55 (CDR-L2); 서열번호 327의 잔기 88-96 (CDR-L3);

L3);

[0634] 서열번호 328의 잔기 23-33 (CDR-L1); 서열번호 328의 잔기 49-55 (CDR-L2); 서열번호 328의 잔기 88-96 (CDR-L3);

[0635] 서열번호 329의 잔기 23-33 (CDR-L1); 서열번호 329의 잔기 49-55 (CDR-L2); 서열번호 329의 잔기 88-96 (CDR-L3);

[0636] 서열번호 330의 잔기 23-33 (CDR-L1); 서열번호 330의 잔기 49-55 (CDR-L2); 서열번호 330의 잔기 88-96 (CDR-L3);

[0637] 서열번호 331의 잔기 23-33 (CDR-L1); 서열번호 331의 잔기 49-55 (CDR-L2); 서열번호 331의 잔기 88-96 (CDR-L3);

[0638] 서열번호 332의 잔기 23-33 (CDR-L1); 서열번호 332의 잔기 49-55 (CDR-L2); 서열번호 332의 잔기 88-96 (CDR-L3);

[0639] 서열번호 333의 잔기 23-33 (CDR-L1); 서열번호 333의 잔기 49-55 (CDR-L2); 서열번호 333의 잔기 88-96 (CDR-L3).

[0640] 다른 양태로서, 결합 단백질은 상기 CDR을 3개 이상 포함한다.

[0641] 바람직하게는, 본 발명에 따른 DLL4 결합 단백질은 상기된 CDR을 한 개 이상 포함한다. 더욱 바람직하게는, 결합 단백질은 상기된 CDR을 3개 이상 포함한다. 가장 바람직하게는, 본 발명의 DLL4 결합 단백질은 상기된 CDR 6개 (즉, 상기된 CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3)를 포함한다.

[0642] 바람직한 양태로서, 결합 단백질은 상기된 서열로 이루어진 그룹 중에서 선택된 CDR을 3개 이상 포함한다.

[0643] 다른 바람직한 양태로서, 결합 단백질은 아래의 그룹 중에서 선택된 가변 도메인 CDR의 세트중에서 선택된 3개의 CDR을 포함한다:

[0644] VH A10 CDR 세트

[0645] CDR-H1: 서열번호 112의 잔기 31-35

[0646] CDR-H2: 서열번호 112의 잔기 50-66

[0647] CDR-H3: 서열번호 112의 잔기 99-108

[0648] VL A10 CDR 세트

[0649] CDR-L1: 서열번호 113의 잔기 23-33

[0650] CDR-L2: 서열번호 113의 잔기 49-55

[0651] CDR-L3: 서열번호 113의 잔기 88-96

[0652] VH A10.3 CDR 세트

[0653] CDR-H1: 서열번호 316의 잔기 31-35

[0654] CDR-H2: 서열번호 316의 잔기 50-66

[0655] CDR-H3: 서열번호 316의 잔기 99-108

[0656] VL A10.3 CDR 세트

[0657] CDR-L1: 서열번호 327의 잔기 23-33

[0658] CDR-L2: 서열번호 327의 잔기 49-55

[0659] CDR-L3: 서열번호 327의 잔기 88-96

[0660] VH A10.K30 CDR 세트

[0661] CDR-H1: 서열번호 317의 잔기 31-35

[0662] CDR-H2: 서열번호 317의 잔기 50-66

[0663] CDR-H3: 서열번호 317의 잔기 99-108

[0664] VH A10.K42 CDR 세트

[0665] CDR-H1: 서열번호 318의 잔기 31-35

[0666] CDR-H2: 서열번호 318의 잔기 50-66

[0667] CDR-H3: 서열번호 318의 잔기 99-108

[0668] VH A10.9A CDR 세트

[0669] CDR-H1: 서열번호 319의 잔기 31-35

[0670] CDR-H2: 서열번호 319의 잔기 50-66

[0671] CDR-H3: 서열번호 319의 잔기 99-108

[0672] VH A10.8A CDR 세트

[0673] CDR-H1: 서열번호 320의 잔기 31-35

[0674] CDR-H2: 서열번호 320의 잔기 50-66

[0675] CDR-H3: 서열번호 320의 잔기 99-108

[0676] VH A10.1A CDR 세트

[0677] CDR-H1: 서열번호 321의 잔기 31-35

[0678] CDR-H2: 서열번호 321의 잔기 50-66

[0679] CDR-H3: 서열번호 321의 잔기 99-108

[0680] VH A10.5D CDR 세트

[0681] CDR-H1: 서열번호 322의 잔기 31-35

[0682] CDR-H2: 서열번호 322의 잔기 50-66

[0683] CDR-H3: 서열번호 322의 잔기 99-108

[0684] VH A10.3A CDR 세트

[0685] CDR-H1: 서열번호 323의 잔기 31-35

[0686] CDR-H2: 서열번호 323의 잔기 50-66

[0687] CDR-H3: 서열번호 323의 잔기 99-108

[0688] VL A10.3A CDR 세트

[0689] CDR-L1: 서열번호 330의 잔기 23-33

[0690] CDR-L2: 서열번호 330의 잔기 49-55

[0691] CDR-L3: 서열번호 330의 잔기 88-96

[0692] VH A10.6B CDR 세트

[0693] CDR-H1: 서열번호 324의 잔기 31-35

[0694] CDR-H2: 서열번호 324의 잔기 50-66

[0695] CDR-H3: 서열번호 324의 잔기 99-108

[0696] VL A10.6B CDR 세트

[0697] CDR-L1: 서열번호 331의 잔기 23-33

[0698] CDR-L2: 서열번호 331의 잔기 49-55

[0699] CDR-L3: 서열번호 331의 잔기 88-96

[0700] VH A10.3D CDR 세트

[0701] CDR-H1: 서열번호 325의 잔기 31-35

[0702] CDR-H2: 서열번호 325의 잔기 50-66

[0703] CDR-H3: 서열번호 325의 잔기 99-108

[0704] VL A10.3D CDR 세트

[0705] CDR-L1: 서열번호 332의 잔기 23-33

[0706] CDR-L2: 서열번호 332의 잔기 49-55

[0707] CDR-L3: 서열번호 332의 잔기 88-96

[0708] VH A10.4C CDR 세트

[0709] CDR-H1: 서열번호 326의 잔기 31-35

[0710] CDR-H2: 서열번호 326의 잔기 50-66

[0711] CDR-H3: 서열번호 326의 잔기 99-108

[0712] VL A10.4C CDR 세트

[0713] CDR-L1: 서열번호 333의 잔기 23-33

[0714] CDR-L2: 서열번호 333의 잔기 49-55

[0715] CDR-L3: 서열번호 333의 잔기 88-96

[0716] VL A10.L45 CDR 세트

[0717] CDR-L1: 서열번호 328의 잔기 23-33

[0718] CDR-L2: 서열번호 328의 잔기 49-55

[0719] CDR-L3: 서열번호 328의 잔기 88-96

[0720] VL A10.L73 CDR 세트

[0721] CDR-L1: 서열번호 329의 잔기 23-33

[0722] CDR-L2: 서열번호 329의 잔기 49-55

[0723] CDR-L3: 서열번호 329의 잔기 88-96

[0724] 다른 양태로서, 결합 단백질은 상기 그룹의 CDR 3개의 임의의 가변 중쇄(VH) 세트에서 선택된 CDR 3개의 VH 세트, 및 상기 그룹의 CDR 3개의 임의의 가변 경쇄(VL) 세트에서 선택된 CDR 3개의 VL 세트를 포함한다.

[0725] 또 다른 양태로서, 결합 단백질은 하기로 그룹 중에서 선택된 CDR 3개의 VH 세트 및 상응하여 선택된 CDR 3개의 VL 세트를 포함한다. 바람직하게는, 본 발명에 따른 결합 단백질은 하기로 이루어진 가변 도메인 CDR 세트의 그룹 중에서 선택된 가변 도메인 CDR 세트를 2개 이상 포함한다:

[0726] VH A10 CDR 세트와 VL A10 CDR 세트;

[0727] VH A10.3 CDR 세트와 VL A10.3 CDR 세트;

[0728] VH A10.3A CDR 세트와 VL A10.3A CDR 세트;

[0729] VH A10.6B CDR 세트와 VL A10.6B CDR 세트;

[0730] VH A10.3D CDR 세트와 VL A10.3D CDR 세트;

[0731] VH A10.4C CDR 세트와 VL A10.4C CDR 세트;

[0732] VH A10.K30 CDR 세트와 VL A10.3 CDR 세트;

[0733] VH A10.K42 CDR 세트와 VL A10.3 CDR 세트;

[0734] VH A10.3 CDR 세트와 VL A10.L45 CDR 세트;

[0735] VH A10.3 CDR 세트와 VL A10.L73 CDR 세트;

[0736] VH A10.9A CDR 세트와 VL A10.3 CDR 세트;

[0737] VH A10.8A CDR 세트와 VL A10.3 CDR 세트;

[0738] VH A10.1A CDR 세트와 VL A10.3 CDR 세트; 및

[0739] VH A10.5D CDR 세트와 VL A10.3 CDR 세트.

[0740] 또 다른 양태로서, 상기된 결합 단백질은 추가로 사람 수용체 골격을 포함한다. 바람직하게는, 사람 수용체 골격은 아래의 아미노산 서열로 이루어진 그룹 중에서 선택된 아미노산 서열을 포함한다:

[0741] 서열번호 6-22의 중쇄 수용체 골격 서열;

[0742] 서열번호 35-62의 중쇄 수용체 서열;

[0743] 서열번호 23-34의 경쇄 수용체 서열; 및

[0744] 서열번호 63-98의 경쇄 수용체 서열.

[0745] 다른 양태로서, 상기된 결합 단백질은 하나 이상의 골격 영역 아미노산 치환을 포함하는, 사람 수용체 골격을 포함하고, 여기에서 상기 골격의 아미노산 서열은 상기 사람 수용체 골격의 서열과 65% 이상 동일하고 상기 사람 수용체 골격과 동일한 아미노산 잔기를 70개 이상 포함한다.

[0746] 다른 양태로서, 본원에 기술된 결합 단백질은 하나 이상의 골격 영역 아미노산 치환을 아래의 핵심 잔기로 이루어진 그룹 중에서 선택된 핵심 잔기에 포함하는 사람 수용체 골격을 포함한다:

[0747] CDR에 인접한 잔기;

[0748] 당화 부위 잔기;

[0749] 희귀 잔기;

[0750] 사람 DLL4와 상호작용할 수 있는 잔기;

[0751] 정규 잔기;

[0752] 중쇄 가변 영역과 경쇄 가변 영역사이의 접점 잔기;

[0753] 베니어 구역내의 잔기; 및

[0754] 초티아-규정의 가변 중쇄 CDR1과 캐벳-규정의 제1 중쇄 골격 간에 중첩하는 영역내의 잔기.

[0755] 바람직하게는, 핵심 잔기는 2H, 4H, 24H, 26H, 27H, 29H, 34H, 35H, 37H, 39H, 44H, 45H, 47H, 48H, 49H, 50H, 51H, 58H, 59H, 60H, 63H, 67H, 69H, 71H, 73H, 76H, 78H, 91H, 93H, 94H, 2L, 4L, 25L, 29L, 27bL, 33L, 34L, 36L, 38L, 43L, 44L, 46L, 47L, 48L, 49L, 55L, 58L, 62L, 64L, 71L, 87L, 89L, 90L, 91L, 94L 및 95L로 이루어진 그룹 중에서 선택된다.

[0756] 다른 양태로서, 본원에 기술된 결합 단백질은 컨센서스 사람 가변 도메인을 포함한다.

[0757] 바람직한 양태로서, 본원에 기술된 결합 단백질은 아래의 아미노산 서열로 이루어진 그룹 중에서 선택된 아미노산 서열을 갖는 가변 도메인 하나 이상을 포함한다:

[0758] 서열번호 112, 113, 316, 327, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 330, 324, 331, 325, 332, 326, 333, 328 및 329.

[0759] 다른 양태로서, 상기된 결합 단백질은 2개의 가변 도메인을 포함하며, 여기서 상기 2개의 가변 도메인은 하기로 이루어진 그룹 중에서 선택된 아미노산 서열을 갖는다:

[0760] 서열번호 112과 113; 서열번호 316과 327; 서열번호 323과 330; 서열번호 324와 331; 서열번호 325과 332; 및 서열번호 326과 333.

[0761] 한 양태로서, 본 발명의 결합 단백질은 중쇄 가변 도메인 (V_H)를 포함하며, 바람직하게는 V_H 는 하기로 이루어진 그룹 중에서 선택된 아미노산 서열을 포함한다:

[0762] 서열번호 112, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325 및 326.

[0763] 또 다른 양태로서, 본 발명의 결합 단백질은 경쇄 가변 도메인 (V_L)을 포함하며, 바람직하게는 V_L 은 하기로 이루어진 그룹 중에서 선택된 아미노산 서열을 포함한다:

[0764] 서열번호 113, 327, 328, 329, 330, 331, 332 및 333.

[0765] 다른 양태로서, 본 발명은 사람 DLL-4와 결합할 수 있는 결합 단백질을 제공하며, 상기 결합 단백질은 하기를 포함한다:

[0766] 서열번호 2 및 서열번호 3으로 이루어진 그룹 중에서 선택된 아미노산 서열을 갖는 Ig 불변 중쇄 영역;

[0767] 서열번호 4 및 서열번호 5로 이루어진 그룹 중에서 선택된 아미노산 서열을 갖는 Ig 불변 경쇄 영역;

[0768] 서열번호 112, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325 및 326으로 이루어진 그룹 중에서 선택된 아미노산 서열을 갖는 Ig 가변 중쇄 영역; 및

[0769] 서열번호 113, 327, 328, 329, 330, 331, 332 및 333로 이루어진 그룹 중에서 선택된 아미노산 서열을 갖는 Ig 가변 경쇄 영역.

[0770] 본 발명에 따라, 본원에 기술된 DLL4 결합 단백질의 가변 중쇄 (VH) 도메인 및 가변 경쇄 (VL) 도메인을 본 분야에 이용되고 있는 재조합 기술로 이용하여 본원에 기술된 VH 과 VL 도메인의 다양한 조합을 포함하는 추가적인 DLL4 결합 단백질을 생성하고 선별할 수 있다.

[0771] 바람직한 양태로서, 본 발명의 DLL4 결합 단백질은 사람 DLL4 (hu DLL4)와 적어도 하나의 다른 DLL4 종과 결합한다. 더욱 바람직하게는, 본원에 기술된 DLL4 결합 단백질은 마우스 DLL4 (mu DLL4), 사이노몰거스 원숭이 DLL4 (사이노몰거스 DLL4, cyno DLL4), 랫 DLL4와 이의 조합물로 이루어진 그룹 중에서 선택된 DLL4 및 사람 DLL4와 결합한다.

[0772] 다른 양태로서, DLL4 결합 단백질은 완전 사람 항체 또는 이의 항원 결합 부분이다.

[0773] 또 다른 양태로서, DLL4 결합 단백질은 CDR 이식 항체이다. 더욱 바람직하게는, DLL4 결합 단백질은 본원에 기술된 하나 이상의 CDR을 포함하는 CDR 이식 항체 또는 이의 항원 결합 부분이다.

[0774] 훨씬 더 바람직하게는, CDR 이식 항체 또는 이의 항원 결합 부분은 상기된 가변 도메인을 포함한다. 더욱 바람직하게는, CDR 이식 항체 또는 이의 항원 결합 부분은 상기된 2개의 가변 도메인을 포함한다. 바람직하게는, CDR 이식 항체 또는 이의 항원 결합 부분은 사람 수용체 골격을 포함한다. 더욱 바람직하게는, 사람 수용체 골격 영역은 상기된 사람 수용체 골격 중 어느 하나이다.

[0775] 더욱 바람직하게는, 결합 단백질은 사람 DLL4, 마우스 DLL4, 사이노몰거스 원숭이 DLL4, 랫 DLL4 및 이의 조합물로 이루어진 그룹 중에서 선택된 DLL4의 활성을 중화시킬 수 있다. DLL4 활성의 중화를 평가하는 것은 본 분야에 알려진 수 가지 시험관내 및 생체내 검정을 통해 달성될 수 있다. DLL4 활성의 중화를 평가하기 위한 변수의 예로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 노치 수용체와의 DLL4 상호작용 및/또는 노치-신호전달 경로를 약 적어도 10^{-6} M, 적어도 10^{-7} M 또는 적어도 10^{-8} M의 IC_{50} 값으로 억제하는 항체가 포함된다.

[0776] 한 가지 양태로서, 본 발명의 결합 단백질은 표면 플라스몬 공명으로 측정했을 때 DLL4에 대한 정반응 속도 상수(K_{on})가 적어도 약 $10^2 M^{-1}s^{-1}$, 적어도 약 $10^3 M^{-1}s^{-1}$, 적어도 약 $10^4 M^{-1}s^{-1}$, 적어도 약 $10^5 M^{-1}s^{-1}$ 또는 적어도 약 $10^6 M^{-1}s^{-1}$ 이다. 바람직하게는 본 발명의 결합 단백질은 표면 플라스몬 공명으로 측정했을 때 DLL4에 대한 정반응 속도 상수(K_{on})가 $10^2 M^{-1}s^{-1}$ 내지 $10^3 M^{-1}s^{-1}$; $10^3 M^{-1}s^{-1}$ 내지 $10^4 M^{-1}s^{-1}$; $10^4 M^{-1}s^{-1}$ 내지 $10^5 M^{-1}s^{-1}$; 또는 $10^5 M^{-1}s^{-1}$ 내지 $10^6 M^{-1}s^{-1}$ 이다.

[0777] 다른 양태로서, 본 발명의 결합 단백질은 표면 플라스몬 공명으로 측정했을 때 DLL4에 대한 역반응 속도 상수(K_{off})가 최대 약 10^{-3} s^{-1} , 최대 약 10^{-4} s^{-1} , 최대 약 10^{-5} s^{-1} 또는 최대 약 10^{-6} s^{-1} 이다. 바람직하게는 본 발명의 결합 단백질은 표면 플라스몬 공명으로 측정했을 때 DLL4에 대한 역반응 속도 상수(K_{off})가 10^{-3} s^{-1} 내지 10^{-4} s^{-1} ; 10^{-4} s^{-1} 내지 10^{-5} s^{-1} ; 또는 10^{-5} s^{-1} 내지 10^{-6} s^{-1} 이다.

[0778] 또 다른 양태로서, 본 발명의 결합 단백질은 DLL4에 대한 해리 상수(K_D)가 최대 약 10^{-7} M , 최대 약 10^{-8} M , 최대 약 10^{-9} M , 최대 약 10^{-10} M , 최대 약 10^{-11} M , 최대 약 10^{-12} M , 또는 최대 약 10^{-13} M 이다. 바람직하게는 본 발명의 결합 단백질은 DLL4에 대한 해리 상수(K_D)가 10^{-7} M 내지 10^{-8} M , 10^{-8} M 내지 10^{-9} M , 10^{-9} M 내지 10^{-10} M , 10^{-10} M 내지 10^{-11} M , 10^{-11} M 내지 10^{-12} M 또는 10^{-12} M 내지 10^{-13} M 이다.

[0779] 본 발명의 한 가지 양태는 상기된 DLL4 결합 단백질의 어느 하나와 링커 폴리펩타이드 또는 면역글로불린 불변 도메인을 포함하는 항체 작제물을 제공한다. 바람직한 양태로서, 본 발명의 항체 작제물은 면역글로불린 분자, 모노클로날 항체, 키메라 항체, CDR-이식 항체, 인간화항체, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, 디설파이드 연결된 Fv, scFv, 단일 도메인 항체(single domain antibody), 이중항체(diabody), 다중 특이적 항체(multispecific antibody), 이원 특이적 항체(dual specific antibody) 및 이특이적 항체(bispecific antibody)로 이루어진 그룹 중에서 선택된다.

[0780] 바람직한 양태로서, 본 발명의 항체 작제물은 사람 IgM 불변 도메인, 사람 IgG1 불변 도메인, 사람 IgG2 불변 도메인, 사람 IgG3 불변 도메인, 사람 IgG4 불변 도메인, 사람 IgE 불변 도메인 및 사람 IgA 불변 도메인으로 이루어진 그룹 중에서 선택된 중쇄 면역글로불린 불변 도메인 및 Fc 감마 수용체 결합, FcRn 결합, C1q 결합에 변화를 줄 수 있으며 약동학 특성 및/또는 Fc 작동체 기능에 변화를 줄 수 있는 상기 Ig 동종형의 돌연변이체를 포함한다.

[0781] 다른 양태로서, 항체 작제물은 당화된다. 바람직하게는, 당화는 사람 당화 패턴이다.

[0782] 다른 양태로서, 상기된 DLL4 결합 단백질은 제제에 접합된다. 본 발명의 결합 단백질 접합체는 본원에 기술된 항체 작제물이 제제에 접합되어 있는 항체 접합체를 포함한다. 바람직하게는, 제제는 면역부착 분자, 이미지화제, 치료제 및 세포독성제로 이루어진 그룹 중에서 선택된다. 바람직한 양태에서, 이미지화제는 방사선 표지, 효소, 형광 표지, 발광 표지, 생발광 표지, 자기 표지 및 비오틴으로 이루어진 그룹 중에서 선택된다. 더욱 바람직하게는, 이미지화제는 ³H, ¹⁴C, ³⁵S, ⁹⁰Y, ⁹⁹Tc, ¹¹¹In, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹⁷⁷Lu, ¹⁶⁶Ho, 및 ¹⁵³Sm으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 방사선 표지이다. 바람직한 양태에서, 치료제 또는 세포독성제는 항대사제, 알킬화제, 항생제, 성장 인자, 사이토kin, 항-혈관신생제, 항-유사분열제, 안트라사이클린, 독소 및 아폽토시스 유발제로 이루어진 그룹 중에서 선택된다.

[0783] 다른 양태로서, 상기된 DLL4 결합 단백질, 항체 작제물 또는 결합 단백질 접합체(항체 접합체를 포함)는 결정으로서 존재한다. 바람직하게는, 결정은 담체-유리된 약제학적 방출제어성 결정이다. 바람직한 양태로서, 이러한 결정화 결합 단백질, 결정화 항체 작제물 또는 결정화 항체 접합체는 이의 상응하는 용해성 접합체보다 생체 내 반감기가 더 크다. 다른 바람직한 양태로서, 결정화 결합 단백질, 결정화 항체 작제물 또는 결정화 결합 단백질 접합체(항체 접합체를 포함)는 결정화 후 생물학적 활성을 유지한다.

[0784] 본 발명의 한 가지 관점은 DLL4 결합 단백질, 항체 작제물, DLL4 결합 항체 접합체 또는 이의 DLL 결합 부분을 암호화하는 분리된 핵산에 관한 것이다. 특히 바람직한 것은 상기된 CDR-H1, CDR-H2 또는 CDR-H3을 포함한 중쇄 가변 도메인을 포함하는 폴리펩타이드, 상기된 CDR-L1, CDR-L2 또는 CDR-L3을 포함한 경쇄 가변 도메인을 포함하는 폴리펩타이드 또는 이들 두 폴리펩타이드의 조합물로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 폴리펩타이드를 암호화하는 분리된 핵산이다.

[0785] 추가의 양태는 상기된 분리된 핵산을 포함하는 벡터를 제공한다. 바람직한 양태로서, 벡터는 pcDNA; pTT (Durocher et al., *Nucleic Acids Res.* 30(2e9):1-9 (2002)); pTT3 (추가의 다중 클로닝 부위를 갖는 pTT); pEFBOS (Mizushima et al., *Nucleic Acids Res.* 18(17): 5322 (1990)); pHybE; pBV; pJV; 및 pBJ, 및 원핵 또는 진핵 세포에 적합한 임의의 다른 발현 벡터로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0786] 본 발명의 다른 관점에서, 상기된 벡터로 형질전환된 숙주 세포를 제공한다. 숙주 세포는 원핵 또는 진핵 세포

일 수 있다. 바람직한 원핵 숙주 세포는 에스케리키아 콜라이이다. 바람직하게는, 진핵 세포는 원생 생물 세포, 동물 세포, 식물 세포 및 진균류 세포로 이루어진 그룹 중에서 선택된다. 더욱 바람직하게는, 숙주 세포는 포유류 세포이며, 이들로 한정되는 것은 아니지만 CHO 및 COS 세포가 포함된다. 바람직한 진균 세포는 이로써 한정되는 것은 아니지만 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)가 포함된다. 바람직한 곤충 세포는 Sf9 세포이다.

[0787] 본 발명의 다른 관점은 상기된 숙주 세포중 어떠한 하나를 배양 배지에서 사람 DLL4와 결합하는 결합 단백질을 생성하기에 충분한 조건하에서 배양시키는 단계를 포함하는, 사람 DLL4와 결합하는 결합 단백질을 제조하는 방법을 제공한다. 다른 양태는 상기된 방법에 따라 제조된 결합 단백질을 제공한다.

[0788] 한 가지 양태는 본 발명에 따른 DLL4 결합 단백질의 방출용 조성물을 제공하며, 이때 당해 조성물은 상기된 바와 같은 결정화 DLL4 결합 단백질, 결정화 항체 작제물 또는 결정화 결합 단백질 접합체 (항체 접합체를 포함) 및 성분 및 추가로 하나 이상의 중합 담체를 포함하는 제형을 포함한다. 바람직하게는, 중합 담체는 폴리(아크릴산), 폴리(시아노아크릴레이트), 폴리(아미노산), 폴리(무수물), 폴리(펩시펩타이드), 폴리(에스테르), 폴리(락트산), 폴리(락트산-코-글리콜산) 또는 PLGA, 폴리(b-하이드록시부티레이트), 폴리(카프로락톤), 폴리(디옥사논), 폴리(에틸렌 글리콜), 폴리(하이드록시프로필)메타크릴아미드, 폴리[(오르가노)포스파젠], 폴리(오르토에스테르), 폴리(비닐 알콜), 폴리(비닐피롤리돈), 말레산 무수물-알킬 비닐 에테르 공중합체, 플루론산 폴리올, 알부민, 알기네이트, 셀룰로스 및 셀룰로스 유도체, 콜라겐, 피브린, 젤라틴, 하이알루론산, 올리고사카라이드, 글리카미노글리칸, 황산화 폴리사카라이드, 이의 블렌드 및 공중합체로 이루어진 그룹 중의 하나 이상으로부터 선택된 중합체이다. 바람직하게는, 당해 성분은 알부민, 슈크로스, 트레할로스, 락티톨, 젤라틴, 하이드록시프로필- β -사이클로덱스트린, 메톡시폴리에틸렌 글리콜 및 폴리에틸렌 글리콜로 이루어진 그룹 중에서 선택된다.

[0789] 다른 양태는 상기된 결정화 DLL4 결합 단백질, 결정화 항체 작제물 또는 결정화 단백질 접합체 (항체 접합체를 포함)를 포함하는 조성물의 유효량을 포유류에 투여하는 단계를 포함하는, 포유류를 치료하는 방법을 제공한다.

[0790] 또한, 본 발명은 상기된 바와 같은 DLL4 결합 단백질, 항체 작제물 또는 결합 단백질 접합체 (항체 접합체를 포함) 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 추가의 양태에서, 약제학적 조성물은 하나 이상의 추가의 제제를 포함한다. 추가의 제제는 DLL4가 해로운 장애의 치료를 위한 치료제일 수 있다. 바람직하게는, 약제학적 조성물은 치료제, 이미지화제, 혈관신생 억제제, 화학 치료제 (예, DNA 알킬화제, 시스플라틴, 카르보플라틴, 항튜불린제, 파클리탁셀, 도세탁셀, 독소루비신, 켐시타빈, 켐자르, 안트라사이클린, 아드리아마이신, 토포이소미라제 I형 억제제, 토포이소미라제 II형 억제제, 5-플루오로우라실 (5-FU), 류코보린, 이리노테칸) 및 수용체 티로신 키나제 억제제 (예, 에를로티닙, 게피티닙), COX-2 억제제 (예, 셀레콕십), 키나제 억제제 및 혈관신생 억제제 (항-VEGF 항체 또는 VEGF-트랩을 포함하지만 이에 제한되지 않음); 동시-자극 분자 차단제(항-B7.1 항체, 항-B7.2 항체, CTLA4-Ig, 항-CD20 항체를 포함하지만 이에 제한되지 않음); 부착 분자 차단제 (항-LFA-1 항체, 항-E/L 셀렉틴 항체, 소분자 억제제를 포함하지만 이에 제한되지 않음); 항-사이토킨 항체 또는 이의 기능성 단편(항-IL-18, 항-TNF, 및 항-IL-6/사이토킨 수용체 항체를 포함하지만 이에 제한되지 않음); 메토트렉세이트; 사이클로스포린; 라파마이신; FK506; 검출가능한 표지 또는 리포터 분자; TNF 길항제; 항류마티스제; 근육 이완제, 마약류; 비스테로이드 소염 약물(NSAID); 진통제; 마취제; 진정제; 국소 마취제; 신경근 차단제; 항 미생물성 제제; 건선치료제; 코르티코스테로이드; 동화작용 스테로이드; 에리트로포이에틴; 면역화제; 면역글로불린; 면역억제제; 성장 호르몬; 호르몬 대체 약물; 방사선 약제; 항우울제; 항정신병제; 자극제; 천식 약물; 베타 효능제; 흡입 스테로이드; 에피네프린 또는 이의 유사체; 사이토킨; 및 사이토킨 길항제로 이루어진 그룹으로부터 선택된 추가의 제제를 포함한다.

[0791] 다른 관점으로서, 본 발명은 사람 DLL4를 상기된 결합 단백질과 접촉시켜 사람 DLL4를 억제 또는 중화시키는 것을 포함하는, 사람 DLL4 활성을 억제하는 방법을 제공한다. 연관된 관점으로서, 본 발명은 DLL4가 유해한 장애를 앓고 있는 사람에게 상기된 결합 단백질을 투여하여 그 사람의 DLL4를 억제하고 치료를 달성하는 것을 포함하여, 상기 사람 환자의 DLL4 활성을 억제하는 방법을 제공한다. 바람직하게는, 상기 장애는 원발성 암 및 전이성 암을 포함한 그룹 중에서 선택되며, 유방, 결장, 직장, 폐, 구강인두, 하인두, 식도, 위, 췌장, 간, 비장 및 담관, 소장, 요로 (신장, 방광 및 요로상피를 포함), 여성 생식로 (자궁경부, 자궁 및 난소의 암뿐만 아니라 용모막암 및 임신성 용모성 질환을 포함), 남성 생식로 (전립선, 정낭, 고환 및 생식 세포 종양을 포함), 내분비선 (갑상선, 부신 및 뇌하수체를 포함) 및 피부의 암뿐만 아니라, 혈관종, 흑색종, 육종 (골 기원 암 및 연조직 기원의 암 및 카포시 육종을 포함), 뇌암, 신경암, 안구암, 및 수막암 (성상세포종, 신경교종, 교모세포종, 망막아세포종, 신경종, 신경아세포종, 신경초종, 및 수막종을 포함), 조혈 악성 종양 유래의 고형 종양, 예를

들어, 백혈병 및 림프종(호지킨 및 비호지킨 림프종 둘다), 종양 전이, 안구내 신생혈관형성(당뇨성 실명, 망막병증, 노령성 황반변성 및 피부 조홍을 포함), 부종, 류마티스성 관절염, 다발성 경화증, 죽상동맥경화성 플라크, 크론병, 염증성 장 질환, 난치성 복수, 건선, 유육종증, 동맥계 동맥경화증, 폐혈증, 소화성 궤양, 화상 및 췌장염, 다낭성 난소질환(POD), 자궁내막증, 자궁근종, 양성 전립선 비대증 및 기타 이상DLL4 활성을 특징으로 하는 혈관신생 독립성 및 의존성 질환을 포함한다.

[0792] 다른 관점으로서, 본 발명은 상기된 결합 단백질중 어느 하나를 제2 치료제의 투여 전에, 투여와 동시에 또는 투여 후에 투여하는 단계를 포함하는, 사람 DLL4가 해로운 질환을 앓고 있는 환자를 치료하는 방법을 제공한다. 바람직한 양태로서, 제2 치료제는 방사선치료제; 항신생물제; 화학치료제(예를 들어, DNA 알킬화제, 시스플라틴, 카보플라틴, 항-튜불린제, 파클리타셀, 도세타셀, 탁솔, 독소루비신, 켐시타빈, 켐자르, 안트라사이클린, 아드리아마이신, 토포이소머라제 I형 억제제, 토포이소머라제 II형 억제제, 5-플루오로우라실(5-FU), 류코보린, 이리노테칸), 수용체 티로신 키나제 억제제(예를 들어, 에를로티니브, 게피티니브), COX-2 억제제(예를 들어, 셀레콕시브), 키나제 억제제 및 혈관신생 억제제(항-VEGF 항체 또는 VEGF-트랩을 포함하지만 이에 제한되지 않음); 동시-자극 분자 차단제(항-B7.1, 항-B7.2, CTLA4-Ig, 항-CD20을 포함하지만 이에 제한되지 않음); 부착 분자 차단제(항-LFA-1 항체, 항-E/L 셀렉틴 항체, 소분자 억제제를 포함하지만 이에 제한되지 않음); 항-사이토킨 항체 또는 이의 기능성 단편(항-IL-18, 항-TNF, 항-IL-6/사이토킨 수용체 항체를 포함하지만 이에 제한되지 않음); 메토트렉세이트; 사이클로스포린; 라파마이신; FK506; 검출가능한 표지 또는 리포터; TNF 길항제; 항류마티즘약; 근육 이완제; 마약; 비-스테로이드성 항-염증약(NSAID); 진통제; 마취제; 진정제; 국부마취제; 신경근 차단제; 항미생물제; 항건선약; 코르티코스테로이드; 단백동화 스테로이드; 에리쓰로포이에틴; 면역화제; 면역글로불린; 면역억제제; 성장 호르몬; 호르몬 대체 약물; 방사성약물; 우울증치료제; 항정신병 약물; 각성제; 천식 치료제; 베타 길항제; 스테로이드 흡입제; 에피네프린 또는 이의 동족체; 사이토킨; 및 사이토킨 길항제를 포함한다.

[0793] 바람직한 양태로서, 상기된 약제학적 조성물은 비경구, 피하, 근육내, 정맥내, 동맥내, 기관지내, 복강내, 캡셀내, 연골내, 강내, 세포내, 소뇌내, 소뇌심실내, 결장내, 경부내, 위내, 간내, 심근내, 골내, 골반내, 심장주위내, 복막내, 흉막내, 전립선내, 폐내, 직장내, 신장내, 망막내, 척추내, 활막내, 흉부내, 자궁내, 방광내, 일시주사, 질내, 직장, 협측, 설하, 비내 및 경피투여로부터 선택되는 하나 이상의 방식으로 투여된다.

[0794] 본 발명의 다른 관점은 본 발명의 하나 이상의 DLL4 결합 단백질에 하나 이상의 DLL4 항-이디오타입 항체를 제공한다. 항-이디오타입 항체는 이들로 한정되는 것은 아니지만 예를 들어 중쇄 또는 경쇄 또는 이의 리간드 결합부의 하나 이상의 상보성 결정 영역(CDR), 중쇄 또는 경쇄 가변 영역, 중쇄 또는 경쇄 불변 영역, 골격 영역 또는 본 발명의 결합 단백질에 도입될 수 있는 임의의 일부분과 같은 면역글로불린 분자의 적어도 일부분을 포함하는 분자를 함유한 모든 단백질 또는 웹타이드를 포함한다.

[0795] 본 발명의 DLL4 결합 단백질을 사용하여 혼합물, 용액 또는 생물학적 시료에서 DLL4를 검출하는데 있어 다양한 면역검출 방법이 응용될 수 있다. 이러한 면역검출 방법으로는 이로써 한정되는 것은 아니지만 방사선면역검정(RIA), 면역침강, 효소-결합된 면역흡착 검정(ELISA), 면역블롯(예, 웨스턴), 본 발명의 DLL4 결합 단백질이 기질에 흡착 또는 고정된 면역스트립(예, 면역딥스틱), FACS 등이 포함된다. 본 발명에 따른 DLL4 결합 단백질을 사용한 DLL4의 검출은 혼합물, 용액 또는 생물학적 시료로 시험관내에서 수행할 수 있다. 생물학적 시료에서 DLL4를 검출 또는 측정하기 위해 본 발명의 결합 단백질과 접촉될 수 있는 시료로는 이로써 한정되는 것은 아니지만 뇨, 타액, 구강분비물(구강, 혀 또는 목구멍 면봉채취물), 피부면봉채취물, 직장면봉채취물, 질면봉채취물, 전혈 시료, 혈장 시료, 혈청 시료, 조직 생검 및 기타 모든 본 분야에 알려진 절차에 의해 개인으로부터 채취된 시료가 포함된다. 다른 양태로서, DLL4 결합 단백질은 이로써 한정되는 것은 아니지만 X-선 컴퓨터 보조 단층촬영(CT), 자기공명영상(MRI) 및 양전자 방출 단층 촬영(PET)을 포함하여 다양한 단층촬영 및 스캐닝 방법으로 생체내 DLL4를 검출하는데 사용될 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0796] 본 발명은 DLL4와 결합하는 DLL4 결합 단백질, 특히 항-DLL4 항체 또는 이의 항원-결합 부분에 관한 것이다. 본 발명의 여러 관점은 항체 및 항체 단편 및 이의 약제학적 조성물뿐만 아니라 이와 같은 항체 및 단편을 제조하기 위한 핵산, 재조합 발현 벡터 및 숙주 세포에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 본 발명의 항체를 사용하여 사람 DLL4 또는 쥐 DLL4를 검출하는 방법, 사람 또는 마우스 DLL4 및/또는 사람 또는 마우스 VEGFR2 또는 VEGFR1 활성을 시험관내 또는 생체내에서 억제하는 방법 및 유전자 발현을 조절하는 방법을 포함한다.

[0797] 본 명세서에서 다른 정의가 없는 한, 본 발명과 관련하여 사용된 과학 용어 및 기술 용어들은 당업자가 통상적

으로 알고 있는 의미를 갖는다. 용어의 의미 및 범위는 명백하지만, 잠재적으로 모호한 경우에는 본원에 제시된 정의가 어떠한 사전적 또는 외적인 정의보다 우선한다. 또한, 문맥상 달리 지적되지 않는 한, 용어의 단수적 표현은 복수도 포함하고 복수적 표현은 단수도 포함하는 것이다. 본 명세서에서, "또는"의 사용은 달리 언급하지 않는 한 "및/또는"을 의미한다. 또한, "포함하는" 및 이러한 유형의, 예컨대 "포함한다" 및 "포함한"의 용어의 사용은 제한적 의미가 아니다. 또한, "요소" 또는 "성분" 등의 용어도 다른 구체적 표현이 없는 한, 하나의 단위를 포함하는 요소 및 성분 둘다는 물론 하나 이상의 아단위를 포함하는 요소 및 성분들도 포함한다.

[0798] 일반적으로, 본 명세서에 기술된 세포 및 조직 배양, 분자 생물학, 면역학, 미생물학, 유전학 및 단백질과 핵산화학 및 하이브리드화 등과 관련하여 사용된 용어 및 기술들은 당업계에 공지되어 있고 공통적으로 사용되는 것이다. 일반적으로, 본 발명의 방법 및 기술은 당업계에 공지되어 있는 통상적인 방법에 따라 수행하고, 다른 표시가 없는 한 본 명세서 전체에서 인용되고 논의된 각종 일반 서적 및 구체적인 문헌들에 기술된 바에 따라 수행된다. 효소 반응 및 정제 기술은 당업계에서 공통적으로 수행되거나 본 명세서에 기술된 바와 같이 제조자의 지침에 따라 수행한다. 본 명세서에 기술된 분석 화학, 합성 유기 화학 및 의학 및 약제 화학과 관련하여 사용된 용어 및 그 실험 절차 및 기술은 당업계에 공지되어 일반적으로 사용되는 것이다. 화학 합성, 화학 분석, 약제, 제형, 전달 및 환자 치료에 대해서도 표준 기술을 사용한다.

[0799] 본 발명을 더 용이하게 이해할 수 있도록 용어를 다음과 같이 정의한다.

[0800] 본 명세서에 사용된 "폴리펩타이드"란 용어는 아미노산의 임의의 중합체 쇄을 의미한다. "펩타이드" 및 "단백질"이란 용어는 폴리펩타이드란 용어와 혼용할 수 있는 것으로서, 이 역시 아미노산의 중합체 쇄를 의미한다. "폴리펩타이드"란 용어는 천연 또는 합성 단백질, 단백질 단편 및 단백질 서열의 폴리펩타이드 유사체를 포함한다. 폴리펩타이드는 단량체 또는 중합체일 수 있다. 본원에서 "폴리펩타이드"의 사용은 본문에서 달리 언급되지 않는 한 폴리펩타이드 및 이의 단편 및 변이체(변이체의 단편을 포함하여)를 포함한다. 항원성 폴리펩타이드에 대해, 폴리펩타이드의 단편은 임의로 폴리펩타이드의 하나 이상의 연속 또는 비선형 에피토프를 함유한다. 하나 이상의 에피토프 단편의 정확한 경계는 당업계의 통상의 기술을 사용하여 확인될 수 있다. 에피토프 단편은 약 5개 이상의 연속 아미노산, 예를 들어, 약 10개 이상의 연속 아미노산, 약 15개 이상의 연속 아미노산 또는 약 20개 이상의 연속 아미노산을 포함한다. 폴리펩타이드의 변이체는 본원에 기재된 바와 같다.

[0801] "분리된 단백질" 또는 "분리된 폴리펩타이드"란 용어는 천연적으로 연관된 성분들에 천연 상태로 동반되지만 그 기원이나 파생 급원에 의해 천연적으로 연관된 성분들과 더 이상 연관이 없거나; 동일한 종 유래의 다른 단백질로부터 실질적으로 유리된 상태이거나, 다른 종 유래의 세포에 의해서 발현되거나; 또는 자연계에 존재하지 않는 단백질 또는 폴리펩타이드이다. 따라서, 화학적으로 합성되거나, 천연 공급원 세포와 다른 세포 시스템에서 합성되는 폴리펩타이드는 이의 천연적으로 관련된 성분으로부터 "분리된" 것이다. 또한, 단백질은 당업계에 공지된 단백질 정제 기술을 사용하여 분리를 통해 자연 관련 성분으로부터 실질적으로 유리시킬 수 있다.

[0802] 본 명세서에 사용된 "회수하는"이란 용어는 당업계에 공지된 단백질 정제 기술 등을 사용하여 분리에 의해 자연 관련 성분으로부터 폴리펩타이드와 같은 화학종을 실질적으로 유리시키는 과정을 의미한다.

[0803] 본 명세서에 사용된 "사람 DLL4" (본원에서 "hDLL4" 또는 "huDLL4"로 약칭됨)란 용어는 몇 가지 EGF-유사 도메인 및 수용체 결합을 위해 필요한 DSL 도메인을 포함한다. 이 용어는 약 74 내지 75 kDa의 단백질을 포함한다. 사람 DLL4의 구조, 유추된 DNA 및 단백질 서열은 예를 들어 Shutter et al., *Genes & Dev.*, 4: 1313-1318 (2000)에 기술되어 있다. 용어 "사람 DLL4"는 표준 재조합 발현 방법에 의해 제조될 수 있는 재조합 사람 DLL4 (rh DLL4)를 포함한다.

[0804] DLL4와 관련하여 본원에 사용된 "생물학적 활성"은 DLL4의 모든 고유한 생물학적 성질을 언급한다. DLL4의 생물학적 성질은 이로써 한정되는 것은 아니지만 노치 수용체와의 결합, 노치 수용체의 활성화, VEGF 신호전달의 음성적 조절, VEGFR2의 억제 및 VEGFR1의 유도를 포함한다.

[0805] 항체, 단백질 또는 펩타이드의 제2 화학종과의 상호작용과 관련하여 본 명세서에 사용된 "특이적 결합" 또는 "특이적으로 결합하는"이란 용어는 그 상호작용이 화학종에 특정 구조 (예컨대, 항원 결정소 또는 에피토프)의 존재 여부에 따라 이루어진다는 것을 의미한다. 예컨대, 항체는 일반적으로 단백질보다는 특정 단백질 구조를 인식하여 여기에 결합한다. 항체가 에피토프 "A"에 특이적이라면, 표지된 "A"와 항체를 포함하는 반응에서 에피토프 A(또는 유리된 미표지 A)를 포함하는 분자의 존재는 항체에 결합된 표지된 A의 양을 감소시킬 것이다.

[0806] 본 명세서에 사용된 "항체"란 용어는 4개의 폴리펩타이드 쇄, 즉 2개의 중쇄(H)와 2개의 경쇄(L)로 구성된 임의의 면역글로불린(Ig) 분자 또는 이러한 Ig 분자의 필수적인 에피토프 결합 특징을 갖는 그의 모든 기능성 단편,

돌연변이체, 변형체 또는 유도체를 의미한다. 이러한 돌연변이체, 변형체 또는 유도체 항체형은 당업계에 공지되어 있다. 이의 구체예에 대해서는 이하에 논의되나, 이에 국한되지는 않는다.

[0807] 완전한 항체에서, 각 중쇄는 중쇄 가변 영역(본 명세서에서 약어로 HCVR 또는 VH로 표시됨)과 중쇄 불변 영역으로 구성된다. 중쇄 불변 영역은 3개의 도메인, CH1, CH2 및 CH3으로 구성된다. 각 경쇄는 경쇄 가변 영역(본 명세서에서 약어로 LCVR 또는 VL로 표시됨)과 경쇄 불변 영역으로 구성된다. 경쇄 불변 영역은 1개 도메인, CL로 구성된다. VH 및 VL 영역은 다시 상보성 결정 영역(CDR)이라 불리는 초가변성 영역들로 나눌 수 있고, 이들 사이에 골격 영역(FR)이라는 더 보존적인 영역들이 산재되어 있다. 각 VH 및 VL은 3개의 CDR 및 4개의 FR로 구성되며, 이들은 아미노 말단에서 카복시 말단으로 다음과 같은 순서로 배열되어 있다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 및 FR4. 면역글로불린 분자는 임의의 유형(예를 들어, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 및 IgY), 클래스(예를 들어, IgG 1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2) 또는 서브클래스일 수 있다.

[0808] 용어 "Fc 영역"은 온전한 항체의 파파인 분해에 의해 생성될 수 있는 면역글로불린 중쇄의 C-말단 영역을 정의하는데 사용된다. Fc 영역은 고유 서열 Fc 영역 또는 변이 Fc 영역일 수 있다. 면역글로불린의 Fc 영역은 일반적으로 2개의 불변 도메인, CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함하고 임의로 CH4 도메인을 포함한다. 항체 작용 기능을 변경시키기 위한 Fc 부분 내의 아미노산 잔기의 치환은 당업계에 공지되어 있다(미국 특허 5,648,260 및 5,624,821). 항체의 Fc 부분은 몇 가지 중요한 작동 기능, 예컨대 사이토kin 유도, ADCC, 식세포작용, 보체의 준적 세포독성(CDC) 및 항체와 항원-항체 복합체의 반감기/제거율 등을 매개한다. 몇몇 경우에는 이러한 작동 기능이 치료 항체에 바람직하지만, 어떤 다른 경우에는 치료 목적에 따라서 불필요하거나 심지어 유해할 수도 있다. 특정한 사람 IgG 아이소타입, 구체적으로 IgG1 및 IgG3은 각각 Fc γ R 및 보체 C1q에 대한 결합을 통해 ADCC 및 CDC를 매개한다. 신생 Fc 수용체(FcRn)는 항체의 혈행 반감기를 결정하는 중요한 성분이다. 또 다른 양태로서, 항체의 불변 영역, 예컨대 항체의 Fc 영역에 존재하는 적어도 하나의 아미노산 잔기가 치환되어 항체의 작동 기능이 변경된 항체가 제공된다. 면역글로불린의 2개의 동일한 중쇄의 이량체화는 CH3 도메인의 이량체화에 의해 매개되고 힌지 영역내에서 디설파이드 결합에 의해 안정화된다(Huber et al., *Nature* 264: 415-420 (1976); Thies et al., *J. Mol. Biol.*, 293: 67-79 (1999)). 중쇄-중쇄 디설파이드 결합을 방지하기 위한 힌지 영역내 시스테인 잔기의 돌연변이는 CH3 도메인의 이량체화를 불안정화시킬 것이다. CH3 이량체화에 관여하는 잔기들은 동정되었다(Dall'Acqua *Biochemi.*, 37: 9266-9273 (1998)). 따라서, 1가의 반쪽 Ig를 생성시킬 수 있다. 흥미롭게도, 이를 1가의 반쪽 Ig 분자는 IgG 및 IgA 서브클래스 둘다에 대해 천연에서 발견되었다(Seligman, *Ann Immunol.*, 129: 855-70 (1978); Biewenga et al., *Clin. Exp. Immunol.*, 51: 395-400 (1983)). FcRn:Ig Fc 영역의 화학양론은 2:1인 것으로 측정되었고 (West et al., *Biochemistry* 39: 9698-9708 (2000)), 반쪽 Fc는 FcRn 결합을 매개하기에 충분하다(Kim et al., *Eur. J. Immunol.*, 24: 542-548 (1994)). CH3 이량체화에 중요한 잔기가 CH3 베타 쉬트 구조의 내부 접지면상에 존재하는 반면에, FcRn 결합에 관여하는 영역이 CH2-CH3 도메인의 외부 접지면상에 존재하기 때문에, CH3 도메인의 이량체화를 붕괴시키기 위한 돌연변이는 FcRn 결합에 대해 큰 역효과를 나타내지 않을 수 있다. 그러나, 반쪽 Ig 분자는 통상의 항체 크기 보다 작기 때문에 조직 침투에 있어서 특정 잇점을 가질 수 있다. 하나의 양태에서, 하나 이상의 아미노산 잔기는 본 발명의 결합 단백질의 불변 영역, 예를 들어, Fc 영역에서 치환되어 중쇄의 이량체화가 붕괴되어 반쪽 Ig 분자가 생성된다. IgG의 항-염증 활성은 IgG Fc 단편의 N-연결된 글리칸의 시알화에 완전히 의존한다. 항-염증 활성에 대한 정확한 글리칸 요건이 결정되어 있음에 따라 적당한 IgG1 Fc 단편을 생성할 수 있고 그럼으로서 효능이 크게 개선된 완전한 재조합 시알화된 IgG1 Fc를 제조할 수 있다(Anthony et al., *Science*, 320: 373-376 (2008)).

[0809] 본 명세서에 사용된 항체의 "항원 결합 부분"(또는 간단히 "항체 부분")란 용어는 항원 (즉, DLL4의 에피토프와 같은 항원의 특정 에피토프)에 대한 특이적 결합능을 갖는 하나 이상의 항체 단편을 의미한다. 항체의 항원 결합 기능은 완전한 항체의 단편에 의해 수행될 수 있는 것으로 밝혀져 있다. 이러한 항체 양태들은 또한 이특이적, 이원 특이적 또는 다중 특이적 형일 수 있으며, 즉 2개 이상의 다른 항원 (또는 동일한 항원의 2개 이상의 상이한 에피토프)에 특이적으로 결합할 수 있다. 항체의 "항원 결합 부분"라는 용어에 포함되는 결합 단편의 예에는 (i) VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 이루어진 일가 단편인 Fab 단편; (ii) 2개의 Fab 단편이 힌지 영역에서 디설파이드 브릿지에 의해 결합되어 있는 이가 단편; (iii) VH 및 CH1 도메인으로 이루어진 Fd 단편; (iv) 항체 한쪽 아암의 VL 및 VH 도메인으로 이루어진 Fv 단편; (v) 하나의 가변 도메인을 포함하는 dAb 단편(Ward et al., *Nature*, 341: 544-546 (1989); PCT 공개번호 WO 90/05144 A1); 및 (vi) 분리된 상보성 결정 영역(CDR)을 포함한다. 또한, 비록 Fv 단편의 두 도메인인 VL 및 VH가 별개의 유전자에 의해 암호화되지만, VL과 VH 영역은 이들 영역이 쌍을 이루어 일가 분자(단일체 Fv(scFv)로 알려진 것; 참조예: Bird et al., *Science*, 242: 423-426 (1988); Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 5879-5883 (1988))를 형성하고 있는

단일 단백질 쇄로서 제조될 수 있게 하는 합성 링커를 통해 재조합에 의해 결합될 수 있다. 이러한 단일쇄 항체는 항체의 "항원 결합 부분"이라는 용어에도 포함된다. 단일쇄 항체의 다른 형태, 예컨대 이중항체도 포함된다. 이중항체는 단일쇄 폴리펩타이드에서 VH 및 VL 도메인이 발현되지만, 동일 쇄 상의 두 도메인 사이에 쌍형성을 허용하기에는 너무 짧은 링커를 사용하여 상기 도메인들이 다른 쇄의 상보성 도메인과 쌍을 이루어 2개의 항원 결합 부위를 생성하는 2가의 이특이적 항체이다 (참조예: Holliger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993); Poljak, R.J., *Structure* 2: 1121-1123 (1994)). 이러한 항체 결합 부분은 당업계에 공지되어 있다 (Kontermann and Dubel eds., *Antibody Engineering* (Springer-Verlag, New York, 2001), p.790 (ISBN 3-540-41354-5) 참조). 추가로, 단일쇄 항체는 또한 상보적 경쇄 폴리펩타이드와 함께 한쌍의 항원 결합 영역을 형성하는 한쌍의 텐덤 Fv 절편 (VH-CH1-VH-CH1)을 포함하는 "선형 항체"를 포함한다 (Zapata et al. *Protein Eng.*, 8(10):1057-1062 (1995); 및 미국 특허 제5,641,870호).

[0810]

본 명세서에 사용된 "항체 작제물" (또는 "DLL4 항체 작제물")이라는 용어는 링커 폴리펩타이드 또는 면역글로불린 불변 도메인에 연결된 본 발명의 항원 결합 부분 하나 이상을 포함한 폴리펩타이드를 가리킨다. 링커 폴리펩타이드는 웨პ타이드 결합에 의해 연결된 2개 이상의 아미노산 잔기를 포함하며 하나 이상의 항원 결합 부분을 연결하기 위해 사용된다. 이러한 링커 폴리펩타이드는 본 분야에 잘 알려져 있다 (참조예: Holliger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993); Poljak, R.J., *Structure*, 2: 1121-1123 (1994)). 면역글로불린 불변 도메인은 중쇄 또는 경쇄 불변 도메인을 가리킨다. 사람 IgG 중쇄 및 경쇄 불변 도메인 아미노산 서열은 본 분야에 알려져 있으며 아래 표 1에 기술되어 있다.

표 1

사람 IgG 중쇄 불변 도메인 및 경쇄 불변 도메인의 서열

단백질	서열 등정 번호	서열
		12345678901234567890123456789012
Ig 감마-1 불변 영역	서열번호 :2	ASTKGPSVFLAPSSKSTSQQGTAALGCLVKDY FPEPVTVWSMSGALTSQGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKG
		12345678901234567890123456789012
		QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
Ig 감마-1 불변 영역 불연변이체	서열번호 :3	ASTKGPSVFLAPSSKSTSQQGTAALGCLVKDY FPEPVTVWSMSGALTSQGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
Ig 카파 불변 영역	서열번호 :4	TVAAPSVVFTPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YSLSSSTLTLKSDADYEKKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
Ig 람다 불변 영역	서열번호 :5	QPKAAPSVVFTPPSSEELQANKATLVLISDF YPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNK YAASSYLSLTPEQWKSHRSYSQVTHEGSTVE KTVAPTECS

[0811]

또한, 항체 또는 이의 항원-결합 부분은 항체 또는 이의 항체 부분의 하나 이상의 다른 단백질 또는 웨პ타이드와의 공유 또는 비공유 결합에 의해 형성된 좀 더 큰 면역부착 분자의 일부일 수 있다. 이러한 면역부착 분자의 예는 사량체 scFv 분자의 제조를 위한 스트렙타비딘 코어 영역의 사용 (Kipriyanov et al., *Human Antibodies and Hybridomas*, 6: 93-101 (1995)) 및 이가 및 바이오티닐화 scFv 분자의 제조를 위한 시스테인 잔기, 마커 웨პ타이드 및 C-말단 폴리히스티딘 태그의 사용 (Kipriyanov et al., *Mol. Immunol.*, 31: 1047-1058 (1994))을 포함한다. Fab 및 F(ab')2 단편과 같은 항체 부분은 완전한 항체의 과파인 또는 웨신 분해와 같은 통상적인 각각의 기술을 사용하여 완전한 항체로부터 제조할 수 있다. 게다가, 항체, 항체 부분 및 면역부착 분자는 본 명

세서에 기술되어 있고 본 분야에 공지된 표준 재조합 DNA 기술을 사용하여 수득할 수 있다.

[0813] 본원에 사용된 용어 "분리된 항체"는 상이한 항원 특이성을 갖는 다른 항체로부터 실질적으로 유리되어 있는 항체를 가리킨다 (예를 들어, hDLL4와 특이적으로 결합하는 분리된 항체는 hDLL4가 아닌 다른 항원과 특이적으로 결합하는 항체로부터 실질적으로 유리되어 있다). 그러나, hDLL4와 특이적으로 결합하는 분리된 항체는 다른 종의 DLL4 분자 (예, muDLL4)와 같은 다른 항원과 교차 반응성을 가질 수 있다. 게다가, 분리된 항체는 다른 세포 물질 및/또는 화학물질로부터 실질적으로 유리될 수 있다.

[0814] 본원에 사용된 용어 "모노클로날 항체" 또는 약어 "MAb" 및 "mAb"는 실질적으로 균질의 항체 집단으로부터 수득된 항체를 가리킨다. 즉, 그 집단에 포함된 개개의 항체는 최소량으로 존재할 수 있는 가능한 천연 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 모노클로날 항체는 단일 항원에 대해 고도로 특이적이다. 추가로, 전형적으로 상이한 결정소(에피토프)에 대한 상이한 항체들을 포함하는 폴리클로날 항체 제제와는 대조적으로, 각각의 mAb는 항원의 단일 결정소에 대한 것이다. 수식어 "모노클로날"은 임의의 특정 방법에 의한 항체의 생성을 요구하는 것으로 해석되는 것은 아니다.

[0815] 본원에 사용된 용어 "사람 항체"는 사람의 배선 면역글로불린 서열로부터 유래된 가변 및 불변 영역을 갖는 항체를 포함한다. 본 발명의 사람 항체는 예를 들어, CDR 및 특히 CDR3에서 사람 배선 면역글로불린 서열에 의해 암호화되지 않은 아미노산 잔기 (예를 들어, 시험관내 무작위 또는 부위 특이적 돌연변이유발에 의해 또는 생체내 체세포 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이)를 포함할 수 있다. 그러나, 본원에 사용된 용어 "사람 항체"는 마우스와 같은 다른 포유동물 종의 배선으로부터 유래된 CDR 서열이 사람 골격 서열상으로 이식된 항체를 포함하지 않는다.

[0816] 본원에 사용된 용어 "재조합 사람 항체"는 재조합 수단에 의해 제조되거나, 발현되거나, 생성되거나, 분리된 모든 사람 항체, 예를 들어, 숙주 세포내로 형질감염된 재조합 발현 백터를 사용하여 발현된 항체, 재조합된 사람 항체 라이브러리로부터 분리된 항체 (Hoogenboom, *Trends Biotechnol.*, 15: 62-70 (1997); Azzazy and Highsmith, *Clin. Biochem.* 35: 425-445 (2002); Gavilondo and Lerrick, *BioTechniques*, 29: 128-145 (2000); Hoogenboom and Chames, *Immunology Today*, 21: 371-378 (2000)), 사람 면역글로불린 유전자가 도입된 형질전환 동물 (예를 들어, 마우스)로부터 분리된 항체 (Taylor et al., *NucI. Acids Res.*, 20: 6287-6295 (1992); Kellermann and Green, *Curr. Opin. Biotechnol.* 13: 593-597 (2002); Little et al, *Immunol. Today*, 21: 364-370 (2000)) 또는 사람 면역글로불린 유전자 서열을 기타 DNA 서열로 스플라이싱함을 포함하는 임의의 기타 수단에 의해 제조되거나, 발현되거나, 생성되거나, 분리된 항체를 포함한다. 당해 재조합 사람 항체는 사람 배선 면역글로불린 서열로부터 유래된 가변 및 불변 영역을 갖는다. 그러나 특정 양태에서, 당해 재조합 사람 항체는 시험관내 돌연변이유발(또는 사람 Ig 서열이 도입된 형질전환 동물이 사용되는 경우, 생체내 체세포 돌연변이유발)에 적용되고 따라서 재조합 항체의 VH 및 VL 영역의 아미노산 서열은 사람 배선 VH 및 VL 서열로부터 유래하고 이와 관련된 것이지만 생체내 사람 항체 배선 레퍼토리내에 천연적으로 존재하지 않을 수 있는 서열이다.

[0817] "키메라 항체"란 용어는 한 종 유래의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열과 다른 종 유래의 불변 영역 서열을 포함하는 항체, 예컨대 쥐의 중쇄 및 경쇄 가변 영역이 사람 불변 영역에 결합된 항체를 의미한다.

[0818] 본원에 사용된 용어 "CDR"은 항체 가변 서열내 상보성 결정 영역을 가리킨다. 중쇄 및 경쇄 각각의 가변 영역에는 3개의 CDR이 있고 가변 영역 각각에 대해 CDR1, CDR2 및 CDR3으로서 명명된다. 본원에 사용된 용어 "CDR 세트"는 항원과 결합하는 단일 가변 영역내 존재하는 3개의 CDR 그룹을 언급한다. 이들 CDR의 정확한 경계선은 상이한 시스템에 따라 상이하게 정의되었다. 문헌[Kabat (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) and (1991)))]에 기재된 시스템은 항체의 임의의 가변 영역에 적용될 수 있는 명확한 잔기 번호매김 시스템을 제공할 뿐만 아니라 3개의 CDR을 한정하는 정확한 잔기 경계선을 제공한다. 이들 CDR은 캐벳 CDR로서 언급될 수 있다. 문헌[Chothia and coworkers (Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987); Chothia et al., *Nature* 342: 877-883 (1989))]에서는, 아미노산 서열 수준에서 다양성이 크다 할지라도 캐벳 CDR내에 특정 아부위는 거의 동일한 펩타이드 골격 형태를 취하고 있음을 밝혔다. 이들 아부위는 "L1", "L2" 및 "L3" 또는 "H1", "H2" 및 "H3"으로서 명명되었고 여기서, "L" 및 "H"는 각각 경쇄 및 중쇄 영역을 지칭한다. 이들 영역은 초티아 CDR로서 언급될 수 있고 이는 캐벳 CDR과 중복되는 경계선을 갖는다. 캐벳 CDR과 중복하는 CDR을 규정하는 또 다른 경계선은 문헌 [Padlan, *FASEB J.*, 9:133-139 (1995) 및 MacCallum, *J. Mol. Biol.* 262(5): 732-45 (1996)]에 기재되어 있다. 또 다른 CDR 경계선 규정은 상기 시스템중 하나를 염격하게 따르지는 않지만, 이들이, 특정 잔기 또는

잔기 그룹 또는 심지어 전체 CDR이 항원 결합에 유의적으로 영향을 미치지 않는다는 예측 또는 실험적 발견의 측면에서 단축되거나 연장될 수 있더라도, 캐벳 CDR과 중복된다. 비록 특정 양태는 캐벳 또는 초티아 규정된 CDR을 사용하지만, 본원에 사용된 방법은 당해 시스템중 어느 하나에 따라 정의된 CDR 어떠한 것도 사용할 수 있다.

[0819] 용어 "캐벳 번호", "캐벳 정의" 및 "캐벳 표지"는 상호교환적으로 본원에서 사용된다. 이러한 용어는 당해 분야에서 인지되며 항체 또는 이의 항원 결합 부분의 중쇄 및 경쇄 가변 영역에서 다른 아미노산 잔기 보다 더 가변적인(즉, 초가변성) 아미노산 잔기의 번호를 지정하는 체계를 의미한다[Kabat et al., *Ann. NY Acad. Sci.* 190: 382-391 (1971) 및 Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition*, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 (1991)]. 중쇄 가변 영역 (VH)에 있어서, 초가변 영역은 CDR1의 경우 아미노산 위치 31 내지 35, CDR2의 경우 아미노산 위치 50 내지 65 및 CDR3의 경우 아미노산 위치 95 내지 102의 범위에 해당한다. 경쇄 가변 영역에 있어서, 초가변 영역은 CDR1의 경우 아미노산 위치 24 내지 34, CDR2의 경우 아미노산 위치 50 내지 56 및 CDR3의 경우 아미노산 89 내지 97의 범위이다.

[0820] 지난 20년 동안 가변 중쇄 및 경쇄 영역의 아미노산 서열에 대한 광범위한 공개용 데이터베이스의 성장 및 분석으로 가변 영역 서열내의 골격 영역 (FR)과 CDR 서열사이의 전형적인 경계선이 이해되었고, 이로 인해 본 분야의 전문가들은 캐벳 번호지정, 초티아 번호지정 또는 다른 시스템에 따라 CDR을 결정할 수 있게 되었다 (참조예: Martin, "Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains," In Kontermann and Dubel, eds., *Antibody Engineering* (Springer-Verlag, Berlin, 2001), chapter 31, pages 432-433). 가변 중쇄 (VH) 및 경쇄 (VL) 영역내의 캐벳 CDR의 아미노산 서열을 결정하는 유용한 방법이 아래에 제시된다:

[0821] CDR-L1 아미노산 서열의 동정:

[0822] VL 영역의 아미노 말단으로부터 약 24개 아미노산 잔기로 출발하고;

[0823] CDR-L1 서열 이전의 잔기는 항상 시스테인 (C)이며;

[0824] CDR-L1 서열 이후의 잔기는 항상 트립토판 (W) 잔기이고, 전형적으로는 Trp-Tyr-Gln (W-Y-Q)이며, 추가로 Trp-Leu-Gln (W-L-Q), Trp-Phe-Gln (W-F-Q) 및 Trp-Tyr-Leu (W-Y-L)이며;

[0825] 길이는 전형적으로 10 내지 17개의 아미노산 잔기이다.

[0826] CDR-L2 아미노산 서열의 동정:

[0827] CDR-L1의 말단 이후에 항상 16개 잔기로 출발하고;

[0828] CDR-L2 서열 이전의 잔기는 일반적으로 Ile-Tyr (I-Y)이지만, 추가로 Val-Tyr (V-Y), Ile-Lys (I-K) 및 Ile-Phe (I-F)이며;

[0829] 길이는 항상 7개의 아미노산 잔기이다.

[0830] CDR-L3 아미노산 서열의 동정:

[0831] CDR-L2의 말단 이후에 항상 33개의 아미노산으로 출발하고;

[0832] CDR-L3 아미노산 서열 이전의 잔기는 항상 시스테인 (C)이며;

[0833] 당해 서열 이후의 서열은 항상 Phe-Gly-X-Gly (F-G-X-G) (서열번호 374) (여기서, X는 어떠한 아미노산도 가능하다)이고;

[0834] 길이는 전형적으로 7 내지 11개의 아미노산 잔기이다.

[0835] CDR-H1 아미노산 서열의 동정:

[0836] VH 영역의 아미노 말단으로부터 약 31개 아미노산 잔기로 및 시스테인 (C) 이후에 항상 9개의 잔기로 출발하고;

[0837] 당해 서열 이전의 잔기는 항상 Cys-X-X-X-X-X-X-X-X (서열번호 375) (여기서, X는 어떠한 아미노산도 가능하다)이며;

[0838] 당해 서열 이후의 잔기는 Trp (W)이고, 전형적으로는 Trp-Val (W-V)이며, 추가로 Trp-Ile (W-I) 및 Trp-Ala (W-A)이고;

[0839] 길이는 전형적으로 5 내지 7개의 아미노산 잔기이다.

[0840] CDR-H2 아미노산 서열의 동정:

[0841] CDR-H1의 말단 이후에 항상 15개의 아미노산 잔기로 출발하고;

[0842] 당해 서열 이전에 잔기는 항상 Leu-Glu-Trp-Ile-Gly (L-E-W-I-G) (서열번호 376)이지만 추가로 다른 변이도 가능하며;

[0843] 당해 서열 이후에 잔기는 Lys/Arg-Leu/Ile/Val/Phe/Thr/Ala-Thr/Ser/Ile/Ala (K/R-L/I/V/F/T/A-T/S/I/A)이고;

[0844] 길이는 전형적으로 16 내지 19개의 아미노산 잔기이다.

[0845] CDR-H3 아미노산 서열의 동정:

[0846] CDR-H2의 말단 이후에 항상 33개의 아미노산 잔기로 출발하고;

[0847] 시스테인 (C) 이후에 항상 3개의 잔기가 존재하며;

[0848] 당해 서열 이전의 잔기는 항상 Cys-X-X (C-X-X)이고 (여기서, X는 어떠한 아미노산도 가능하다), 전형적으로는 Cys-Als-Arg (C-A-R)이며;

[0849] 당해 서열 이후의 잔기는 항상 Trp-Gly-X-Gly (W-G-X-G) (서열번호 377)이고 (여기서, X는 어떠한 아미노산도 가능하다);

[0850] 길이는 전형적으로 3 내지 25개의 아미노산 잔기이다.

[0851] "CDR 이식 항체"란 용어는 한 종에서 유래되는 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열을 포함하지만, VH 및/또는 VL의 하나 이상의 CDR 영역의 서열들이 다른 종의 CDR 서열로 교체된 항체를 의미하는 것으로서, 예컨대 쥐의 CDR의 하나 이상 (예컨대, CDR3)이 사람 CDR 서열로 교체된 쥐의 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 보유한 항체가 있다.

[0852] "인간화 항체"란 용어는 사람을 제외한 종(예컨대, 마우스) 유래의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열을 포함하지만 VH 및/또는 VL 서열의 적어도 일부분이 더 "인간 유사성인", 즉 사람 배선 가변 서열과 더 유사한 서열로 변이된 항체를 의미한다. "인간화 항체"는 목적하는 항원과 면역특이적으로 결합하고 실질적으로 인간 항체의 아미노산 서열을 갖는 골격(FR) 영역 및 실질적으로 비-인간 항체의 아미노산 서열을 갖는 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하는 항체 또는 변이 유도체, 유사체 또는 이의 단편이다. CDR과 관련하여 본원에 사용된 용어 "실질적으로"는 비-인간 항체 CDR과 80% 이상, 바람직하게는 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 98% 이상 또는 99% 이상 동일한 아미노산 서열을 갖는 CDR을 가리킨다. 인간화 항체는 실질적으로 하나 이상 및 전형적으로 2개의 가변 도메인(Fab, Fab', F(ab')₂, FabC, Fv)를 포함하고 여기서, CDR 영역 모두 또는 실질적으로 모두는 비-인간 면역글로불린(즉, 공여 항체)의 CDR 영역에 상응하고 골격 영역의 모두 또는 실질적으로 모두는 인간 면역글로불린 공통 서열의 CDR 영역이다. 한 가지 양태에서, 인간화 항체는 또한 인간 면역글로불린의 전형적인 영역인 면역글로불린 불변 영역(Fc)의 일부분 또는 그 이상을 포함한다. 몇몇 양태에서, 인간화 항체는 적어도 중쇄의 가변 도메인 뿐만 아니라 경쇄 둘다를 함유한다. 당해 항체는 또한 중쇄의 CH1, 힌지, CH2, CH3 및 CH4 영역을 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 인간화 항체는 인간화 경쇄만을 함유한다. 몇몇 양태에서, 인간화 항체는 인간화 중쇄만을 함유한다. 특정 양태에서, 인간화 항체는 경쇄 및/또는 인간화 중쇄의 인간화 가변 도메인만을 함유한다.

[0853] 인간화 항체는 IgM, IgG, IgD, IgA 및 IgE를 포함한 면역글로불린의 모든 클래스 및 이로써 한정되는 것은 아니지만 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 포함한 모든 아이소타입중에서 선택될 수 있다. 인간화 항체는 하나 이상의 클래스 또는 아이소타입의 서열을 포함할 수 있으며, 본 분야에 잘 알려진 기술을 사용하여 목적하는 작동 기능을 최적으로 얻기 위해 특정 불변 도메인을 선택할 수 있다.

[0854] 인간화 항체의 골격 영역 및 CDR은 모 서열과 정확하게 일치할 필요는 없고, 예를 들어, 공여 항체 CDR 또는 공통 골격은 하나 이상의 아미노산 잔기의 치환, 삽입 및/또는 결실에 의해 돌연변이될 수 있으며 이에 따라 그 위치의 CDR 또는 골격 잔기는 공여 항체 또는 공통 골격과 일치하지 않는다. 그러나, 바람직한 양태로서, 그와 같은 돌연변이는 흔한 것은 아니다. 보통, 인간화 항체 잔기의 80% 이상, 바람직하게는 85% 이상, 더 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상은 모 FR 및 CDR 서열의 잔기와 일치한다. 본원에 사용된 용어 "공통 골격"은 공통 면역글로불린 서열내의 골격 영역을 가리킨다. 본원에 사용된 용어 "공통 면역글로불린 서열"은 연관된 면역글로불린 서열의 한 계열에서 가장 빈번히 존재하는 아미노산 (또는 뉴클레오타이드)으로부터

형성된 서열을 가리킨다 (참조예: Winnacker, *From Genes to Clones* (Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1987)). 따라서, "공통 면역글로불린 서열"은 "공통 골격 영역(들)" 및/또는 "공통 CDR(들)"을 포함할 수 있다. 면역글로불린의 한 계열에서, 공통 서열의 각 위치는 그 계열의 그 위치에서 가장 빈번히 존재하는 아미노산에 의해 점유된다. 만일 두 아미노산이 동일한 빈도로 존재하는 경우, 어느 하나가 공통 서열에 포함될 수 있다.

[0855] "친화성 성숙된" 항체는 하나 이상의 CDR에서 변이가 한 개 이상 발생하여 변이가 없는 모 항체에 비해 표적 항원에 대한 항체의 친화성이 증강된 항체이다. 예를 들어, 친화성 성숙된 항체는 표적 항원에 대해 나노몰 또는 심지어 피코몰 친화성을 갖는다. 친화성 성숙된 항체를 제조하기 위한 여러 가지 방법이 당업계에 공지되어 있다. 예로써, 문헌[Marks et al., *BioTechnology* 10:779-783 (1992)]은 VH 및 VL 도메인 재편성에 의한 친화성 성숙화를 기재하고 있다. CDR 및/또는 골격 잔기의 무작위 돌연변이유발은 문헌[Barbas et al., *Proc Natl Acad. Sci. USA* 91: 3809-3813 (1994); Schier et al., *Gene*, 169: 147-155 (1995); Yelton et al., *J. Immunol.*, 155: 1994-2004 (1995); Jackson et al., *J. Immunol.* 154(7): 3310-3319 (1995); Hawkins et al., *J. Mol. Biol.*, 226: 889-896 (1992)]에 기재되어 있다. 활성 증강 아미노산 잔기에 의한 특정한 돌연변이유발 위치 및 접점 또는 과돌연변이 위치에서의 선택적 돌연변이가 미국특허 제6,914,128 B1호에 기재되어 있다.

[0856] 용어 "다가 결합 단백질"은 2개 이상의 항원 결합 부위를 포함하는 결합 단백질을 지칭한다 (또한, "항원 결합 도메인"이라고도 한다). 다가 결합 단백질은 바람직하게는 3개 이상의 항원 결합 부위를 갖도록 제작되고, 일반적으로 천연 항체가 아니다. 용어 "다중특이적 결합 단백질"은 동일한 표적 분자의 둘 이상의 에피토프와 결합할 수 있는 결합 단백질을 포함하여 2개 이상의 관련 또는 비관련 표적에 결합할 수 있는 결합 단백질을 가리킨다.

[0857] 본원에 사용된 용어 "이특이적 항체"는 퀴드로마 기술 (Milstein et al., *Nature*, 305(5934): 537-540 (1983)), 2개의 상이한 모노클로날 항체의 화학적 결합 (Staerz et al., *Nature*, 314(6012): 628-631 (1985)) 또는 Fc 영역에 돌연변이를 도입하여 다수의 상이한 면역글로빈 종(이중에 하나만이 작용성 이특이적 항체이다)을 생성하는 크롭-인투-홀 또는 유사 방법 (Holliger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90(14): 6444-6448 (1993))에 의해 생성되는 완전한 길이의 항체를 가리킨다. 분자 기능에 있어서, 이특이적 항체는 이의 2개의 결합 아암중 1개(한 쌍의 HC/LC)에서 항원(또는 에피토프) 1개와 결합하고 그의 두 번째 아암(다른 쌍의 HC/LC)에서 다른 항원(또는 에피토프)과 결합한다. 이와 같은 정의에 따라, 이특이적 항체는 2개의 구분된 항원 결합 아암(특이성 및 CDR 서열 모두에 있어서)을 가지며 결합 대상인 각각의 항원에 대해 1가이다.

[0858] 본원에 사용된 용어 "이원-특이적 항체"는 이의 2개의 결합 아암 각각(한 쌍의 HC/LC)에서 2개의 상이한 항원 (또는 에피토프)와 결합할 수 있는 완전한 길이의 항체를 언급한다 (PCT 공개번호 WO 02/02773). 따라서, 이원-특이적 결합 단백질은 동일한 특이성 및 동일한 CDR 서열을 갖는 2개의 동일한 항원 결합 아암을 가지며, 결합 대상인 각각의 항원에 대해 2가이다.

[0859] 본 발명의 "이원 가변 도메인" ("DVD") 결합 단백질은 2개 이상의 항원 결합 부위를 포함하고 2가 (2개의 항원 결합 부위), 4가 (4개의 항원 결합 부위) 또는 다가의 결합 단백질이다. DVD는 단일특이성 (즉, 1개의 항원 또는 1개의 특이적 에피토프와 결합할 수 있다)이거나 다중특이성 (즉, 2개 이상의 항원-동일한 표적 항원 분자의 에피토프 2개 이상 또는 상이한 표적 항원의 에피토프 2개 이상)일 수 있다. 바람직한 DVD 결합 단백질은 2개의 중쇄 DVD 폴리펩타이드와 2개의 경쇄 DVD 폴리펩타이드를 포함하며, 이것은 "DVD 면역글로불린" 또는 "DVD-Ig"로 언급된다. 따라서, 이와 같은 DVD-Ig 결합 단백질은 사량체이고 IgG 분자를 연상시키지만, IgG 분자보다 더 항원 결합 부위를 제공한다. 따라서, 사량체 DVD-Ig의 각 반쪽은 IgG 분자의 반쪽을 연상시키며 한 쌍의 중쇄 DVD 폴리펩타이드와 경쇄 DVD 폴리펩타이드를 포함하지만, 단일의 항원 결합 도메인을 제공하는 IgG 분자의 한쌍의 중쇄와 경쇄와 다르게 DVD-Ig의 한 쌍의 중쇄와 경쇄는 2개 이상의 항원 결합 부위를 제공한다.

[0860] DVD-Ig 결합 단백질의 각 항원 결합 부위는 공여 ("모") 모노클로날 항체로부터 유래되며, 이에 따라 항원 결합 부위마다 항원 결합에 연루되는 총 6개의 CDR과 함께 중쇄 가변 도메인 (VH)과 경쇄 가변 도메인 (VL)을 포함한다. 따라서, 2개의 상이한 에피토프 (즉, 2개의 상이한 항원 분자의 2개의 상이한 에피토프 또는 동일한 항원 분자의 2개의 상이한 에피토프)와 결합하는 DVD-Ig 결합 단백질은 제1 모 모노클로날 항체로부터 유래된 항원 결합 부위 및 제2 모 모노클로날 항체의 항원 결합 부위를 포함한다.

[0861] DVD-Ig 결합 분자의 디자인, 발현 및 성상확인은 PCT 공개번호 WO 2007/024715, 미국특허 제7,612,181호 및 Wu et al., *Nature Biotech.*, 25: 1290-1297 (2007)에 기술되어 있다. 이와 같은 DVD-Ig 분자의 바람직한 예는 구조식 VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n (여기서, VD1은 제1 중쇄 가변 도메인이고, VD2는 제2 중쇄 가변 도메인이며, C는 중쇄 불변 도메인이고, X1은 링커로서 CH1이 아니며, X2는 Fc 영역이고, n은 0 또는 1이나 바람직하게는 1이

다)을 포함한 중쇄 및 구조식 VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n (여기서, VD1은 제1 경쇄 가변 도메인이고, VD2는 제2 경쇄 가변 도메인이며, C는 경쇄 불변 도메인이고, X1은 링커로서 CH1이 아니며, X2는 Fc 영역을 포함하지 않고, n은 0 또는 1이나 바람직하게는 1이다)을 포함한 경쇄를 포함한다. 이러한 DVD-Ig는 상기된 바와 같은 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄를 포함할 수 있는데, 여기서 각 쇄는 가변 영역사이에 불변 영역이 내재하지 않으면서 텐템으로 연결된 가변 도메인을 포함하고 중쇄와 경쇄는 결합하여 텐템 기능성 항원 결합 부위를 형성하며 중쇄와 경쇄의 한 쌍은 중쇄와 경쇄의 다른 쌍과 결합하여 4개의 기능성 항원 결합 부위를 갖는 사량체 결합 단백질을 형성한다. 다른 예로서, DVD-Ig 분자는 중쇄와 경쇄를 포함할 수 있는데, 여기서 각 쇄는 가변 영역사이에 불변 영역이 내재하지 않으면서 텐템으로 연결된 3개의 가변 도메인(VD1, VD2, VD3)을 포함하고 한 쌍의 중쇄와 경쇄는 결합하여 3개의 항원 결합 부위를 형성하며 중쇄와 경쇄의 한 쌍은 중쇄와 경쇄의 다른 쌍과 결합하여 6개의 항원 결합 부위를 갖는 사량체 결합 단백질을 형성한다.

[0862] 바람직한 양태로서, 본 발명의 DVD-Ig 결합 단백질은 이의 모 모노클로날 항체에 의해 결합된 동일한 표적 분자와 결합할 뿐만 아니라 하나 이상의 그의 모 모노클로날 항체의 목적하는 특성 하나 이상을 갖는다. 바람직하게는, 그러한 추가의 특성은 모 모노클로날 항체의 하나 이상의 항체 변수이다. 하나 이상의 모 모노클로날 항체로부터 유래된 DVD-Ig 결합 단백질에 기여할 수 있는 항체 변수는 이로써 한정되는 것은 아니지만 항원 특이성, 항원 친화성, 효능, 생물학적 기능, 에피토프 인식, 단백질 안정성, 단백질 용해성, 생성 효율, 면역원성, 약동학, 생체이용성, 조직 교차 반응성 및 이종상동성 항원 결합을 포함한다.

[0863] 본 발명의 DVD-Ig 결합 단백질은 사람 DLL4 단백질의 1개 이상의 에피토프와 결합한다. 본 발명의 DVD-Ig 결합 단백질의 예는 이로써 한정되는 것은 아니지만 사람 DLL4의 하나 이상의 에피토프와 결합하는 DVD-Ig 결합 단백질, 사람 DLL4의 에피토프와 다른 종 (예, 마우스)의 DLL4의 에피토프와 결합하는 DVD-Ig 결합 단백질 및 다른 표적 분자 (예, VEGFR2 또는 VEGFR1)의 에피토프와 결합하는 DVD-Ig 결합 단백질을 포함한다.

[0864] 결합 단백질의 "기능성 항원 결합 부위"는 표적 항원과 결합할 수 있는 것이다. 항원 결합 부위의 항원 결합 친화성은 항원 결합 부위의 파생원인 모 항체만큼 반드시 강력하지 않지만 항원 결합 능력은 항체의 항원 결합을 평가하는 것으로 알려진 다양한 방법중 어느 것을 사용해서도 측정가능해야 한다. 게다가, 다가 항체의 각 항원 결합 부위의 항원 결합 친화성은 정량적으로 동일할 필요는 없다.

[0865] 본원에 사용된 용어 "수용체" 및 "수용체 항체"는 하나 이상의 골격 영역 (FR)의 아미노산 서열의 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 98% 이상 또는 100%를 제공 또는 암호화하는 항체 또는 핵산 서열을 가리킨다. 일부 양태에서, 용어 "수용체"는 불변 영역(들)을 제공 또는 암호화하는 항체 아미노산 또는 핵산 서열을 가리킨다. 또 다른 양태에서, 용어 "수용체"는 하나 이상의 골격 영역 및 불변 영역(들)을 제공 또는 암호화하는 항체 아미노산 또는 핵산 서열을 가리킨다. 특정 양태에서, 용어 "수용체"는 하나 이상의 골격 영역의 아미노산 서열의 80% 이상, 바람직하게는 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 98% 이상 또는 100%를 제공 또는 암호화하는 사람 항체 아미노산 또는 핵산 서열을 가리킨다. 이 양태에 따르면, 수용체는 사람 항체의 하나 이상의 특정 위치에 존재하지 않는 아미노산 잔기 1개 이상, 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상 또는 10개 이상을 함유할 수 있다. 수용체 골격 영역 및/또는 수용체 불변 영역(들)은 예를 들면 배선 항체 유전자, 성숙 항체 유전자, 기능성 항체 (예, 본 분야에 잘 알려진 항체, 개발중의 항체 또는 시판중의 항체)로부터 유래되거나 수득될 수 있다.

[0866] 본원에 사용된 용어 "천연" 잔기는 Chothia et al., J. Mol. Biol., 196: 901-917 (1987); Chothia et al., J. Mol. Biol., 227: 799-817 (1992)에서 규정된 바와 같이 특정한 천연 CDR 구조를 정의하는 CDR 또는 골격의 잔기를 가리킨다. 언급된 두 문헌은 본원에 참고로 인용된다. Chothia 등의 저자에 따르면, 많은 항체의 CDR의 중요한 부분은 아미노산 서열의 수준에서 상당한 다양성을 나타내지만 거의 동일한 웹타이드 골격 형태를 갖는다. 각 천연 구조는 루프를 형성하는 아미노산 잔기의 연속 절편에 대해 주로 한 세트의 웹타이드 골격 비틀림각을 지정한다.

[0867] 본원에 사용된 용어 "공여체" 및 "공여 항체"는 하나 이상의 CDR을 제공하는 항체를 가리킨다. 바람직한 양태로서, 공여 항체는 골격 영역의 공급원 또는 파생원인 항체와 상이한 종에서 유래한 항체이다. 인간화 항체와 관련하여, 용어 "공여 항체"는 하나 이상의 CDR을 제공하는 비인간 항체를 가리킨다.

[0868] 본원에 사용된 용어 "골격" 또는 "골격 서열"은 CDR을 제외한 가변 영역의 나머지 서열을 언급한다. CDR 서열의 정확한 정의는 상이한 체계에 의해 결정될 수 있기 때문에, 골격 서열의 의미는 상응하는 다른 해석에 의해 좌우된다. 6개의 CDR (경쇄의 CDR-L1, -L2, 및 -L3 및 중쇄의 CDR-H1, -H2, 및 -H3)은 또한 경쇄 또는 중쇄상의 골격 영역을 각 쇄상에 4개의 서브-영역(FR1, FR2, FR3 및 FR4)으로 나누고 여기서, CDR1은 FR1과 FR2 사이

에 위치하고, CDR2는 FR2와 FR3 사이에 위치하며 CDR3은 FR3과 FR4 사이에 위치한다. 특정 서브-영역을 FR1, FR2, FR3 또는 FR4로서 지정하지 않으면서, 다르게 지정된 골격 영역은 단일의 천연 면역글로불린 쇄의 가변 영역내에 조합된 FR을 나타낸다. 본원에 사용된 FR은 4개의 서브-영역중 하나를 나타내고 FR들은 골격 영역을 구성하는 4개의 서브-영역중 2개 이상을 나타낸다.

[0869] 사람 중쇄 및 경쇄 수용체 서열은 본 분야에 알려져 있다. 본 발명의 한 가지 양태로서 사람 중쇄 및 경쇄 수용체 서열은 아래 표 2 및 표 3에 기술된 서열중에서 선택된다.

표 2

중쇄 수용체 서열

서열번호	단백질 영역/최근접 생식 세포 계열	서열
		12345678901234567890123456789012
6	VH2-70/JH6 FR1	EVTLRESPALVKPTQTLTCTFSGFSLS
7	VH2-70/JH6 FR2	WIRQPPGKALEWLA
8	VH2-70/JH6 FR3	RLTISKDTSKNQVVLMTMTNMDPVDTATYYCAR
9	VH2-70/JH6 FR4	WGQGTTVTVSS
10	VH2-26/JH6 FR1	EVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLS
7	VH2-26/JH6 FR2	WIRQPPGKALEWLA
11	VH2-26/JH6 FR3	RLTISKDTSKSQQVVLMTMTNMDPVDTATYYCAR
9	VH2-26/JH6 FR4	WGQGTTVTVSS
12	VH3-72/JH6 FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
13	VH3-72/JH6 FR2	WVRQAPGKGLEWVG
14	VH3-72/JH6 FR3	RFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCAR
9	VH3-72/JH6 FR4	WGQGTTVTVSS
15	VH3-21/JH6 FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
16	VH3-21/JH6 FR2	WVRQAPGKGLEWVS
17	VH3-21/JH6 FR3	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
9	VH3-21/JH6 FR4	WGQGTTVTVSS
18	VH1-69/JH6 FR1	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFS
19	VH1-69/JH6 FR2	WVRQAPGQGLEWMG
20	VH1-69/JH6 FR3	RVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR
9	VH1-69/JH6 FR4	WGQGTTVTVSS

[0870]

서열번호	단백질 영역/최근접 생식 세포 계열	서열
21	VH1-18/JH6 FR1	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT
19	VH1-18/JH6 FR2	WVRQAPGQGLEWMG
22	VH1-18/JH6 FR3	RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR
9	VH1-18/JH6 FR4	WGQGTTVTVSS
35	IGHV4-59 FR1	EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIS
36	IGHV4-59 FR2	WIRQPPGKGLEWIG
37	IGHV4-59 FR3	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR
38	IGHV4-59/JH FR4	WGQGTLVTVSS
39	IGHV3-66 FW1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGGSIS
40	IGHV3-66 FW2	WIRQAPGKGLEWIG
41	IGHV3-66 FW3	RVTISVDTSKNSFYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
42	IGHV3-66/JH FW4	WGQGTLVTVSS
43	IGHV4-59 FR1	EVQLQESGPGLVKPGETLSLTCTVSGGSIS
44	IGHV4-59 FR2	WIRQAPGKGLEWIG
45	IGHV4-59 FR3	RVTISVDTSKNQFYLKLSSVRAEDTAVYYCAR
46	IGHV4-59/JH FR4	WGQGTLVTVSS
47	IGHV5-51 FR1	EVQLVQSGTEVKKPGESLKISCKVSGGSIS
48	IGHV5-51 FR2	WIRQMPGKGLEWIG
49	IGHV5-51 FR3	QVTISVDTSFNTFFLQWSSLKASDTAMYYCAR
50	IGHV5-51/JH FR4	WGQGTMVTVSS
51	IGHV2-70 FR1	EVTLRESPALVKPTQTLTCTVSGGSIS
52	IGHV2-70 FR2	WIRQPPGKGLEWIG
53	IGHV2-70 FR3	RVTISVDTSKNQFVLTMTNMDPVDTATYYCAR
54	IGHV2-70/JH FR4	WGQGTTVTVSS
55	IGHV3-15 FR1	EVQLLESGGGLVKGSGSLRLSCAASGFTFR
56	IGHV3-15 FR2	WVRQAPGKGLEWVA
57	IGHV3-15 FR3	RFTISRDNSKNTLYLQLNSLRAEDTAVYYCAK
58	IGHV3-15/JH FR4	WGQGTMVTVSS
59	IGHV3-43 FR1	EVQLVESGGGVQPGGSLRLSCAASGFTFG
60	IGHV3-43 FR2	WVRQAPGKGLEWVA
61	IGHV3-43 FR3	RFTISRDNSKNTLYLQLNSLRAEDTAVYYCAK
62	IGHV3-43/JH FR4	WGQGTMVTVSS

[0871]

표 3

경쇄 수용체 서열

서열번호	단백질 영역/최근접 생식 세포 계열	서열
		12345678901234567890123456789012
23	B3/JK4 FR1	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC
24	B3/JK4 FR2	WYQQKPGQPPKLLIY
25	B3/JK4 FR3	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDEVYYC
26	B3/JK4 FR4	FGGGTKEIKR
27	L2/JK4 FR1	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC
28	L2/JK4 FR2	WYQQKPGQAPRLIY
29	L2/JK4 FR3	GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC
26	L2/JK4 FR4	FGGGTKEIKR
30	L15/JK4 FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC

[0872]

서열번호	단백질 영역/최근접 생식 세포 계열	서열
31	L15/JK4 FR2	WYQQKPEKAPKSLIY
32	L15/JK4 FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC
26	L15/JK4 FR4	FGGGTKEIKR
33	L5/JK4 FR1	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITC
34	L5/JK4 FR2	WYQQKPGKAPKLLIY
32	L5/JK4 FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC
26	L5/JK4 FR4	FGGGTKEIKR
63	IGLV3-1 FR1	SYELTQPPSVSVPQQTASITC
64	IGLV3-1 FR2	WYQQKPGQSPVLVIY
65	IGLV3-1 FR3	GIPERFSGNSNGDTATLTISGTQPMDEADYYC
66	IGLV3-1/JL FR4	FGYGTKVTVL
67	IGLV3-1 FR1	SYELTQPPSVSVPQQTASITC
68	IGLV3-1 FR2	WYQQKPGQSPVLVIY
69	IGLV3-1 FR3	GI PERFSGNSNGDTATLTISGTQPMDEADYYC
70	IGLV3-1/JL FR4	GGGTKLTVLG
71	IGLV3-1 FR1	YELTQPPSVSVPQQTASITC
72	IGLV3-1 FR2	WYQQKPGQSPVLVIY
73	IGLV3-1 FR3	GI PERFSGNSNGDTATLTISGTQTMDEADYLC
74	IGLV3-1/JL FR4	GGGTKLTVLG
75	IGLV3-1 FR1	LYVLTQPPSVSVPQQTASITC
76	IGLV3-1 FR2	WYQQKPGQSPVLVIY
77	IGLV3-1 FR3	GI PERFSGNSNGDTATLTISGTQTMDEADYLC
78	IGLV3-1/JL FR4	FGGGTKVTVLG
79	IGKV6D-21 FR1	EYVLTQSPDFQSVTPKEKVTITC
80	IGKV6D-21 FR2	WYQQKPDQSPKLVIY
81	IGKV6D-21 FR3	GVPSRFSGNSNGDDATLTINSLEADAATYYC
82	IGKV6D-21/JK FR4	FGQGTTKEIKR
83	IGKV3D-15 FR1	EYVLTQSPATLSVSPGERATLSC
84	IGKV3D-15 FR2	WYQQKPGQSPRLVIY
85	IGKV3D-15 FR3	DI PARFSGNSNGDEATLTISLQSEDFAVYYC
86	IGKV3D-15/JK FR4	FGQGTRLEIKR
87	IGKV4-1 FR1	DYVLTQSPDSLAVSLGERATINC
88	IGKV4-1 FR2	WYQQKPGQSPKLVIY
89	IGKV4-1 FR3	GI PDRFSGNSNGDDATLTISLQAEDEVYYC
90	IGKV4-1/JK FR4	FGGGTKVEIKR
91	IGLV3-1 FR1	LPVLTQPPSVSVPQQTASITC
92	IGLV3-1 FR2	WYQQKPGQSPVLVIY
93	IGLV3-1 FR3	GI PERFSGNSNGNTATLTISGTQTMDEADYLC
94	IGLV3-1/JL FR4	FGGGTKVTVL
95	IGLV3-1 FR1	SYELTQPPSVSVPQQTASITC
96	IGLV3-1 FR2	WYQQKPGQSPVLVIY
97	IGLV3-1 FR3	GI PERFSGNSNGNTATLTISGTQTMDEADYLC
98	IGLV3-1/JL FR4	FGGGTKLTVL

[0873]

[0874]

본원에 사용된 "배선 항체 유전자" 또는 "유전자 단편"은 특정 면역글로불린의 발현을 위해 유전학적 재배열 및 돌연변이를 유발하는 성숙 과정을 거치지 않는 비-리프팅 세포에 의해 암호화된 면역글로불린 서열을 가리킨다 [Shapiro et al., *Crit. Rev. Immunol.* 22(3): 183-200 (2002); Marchalonis et al., *Adv. Exp. Med. Biol.* 484:13-30 (2001)]. 본 발명의 다양한 양태에 의해 제공되는 잇점중 하나는 배선 항체 유전자가 성숙 항체 유전자 보다 종내의 개체마다 특징이 되는 필수 아미노산 서열 구조를 보존할 가능성이 높음에 따라 당해 종에서

치료학적으로 사용되는 경우 외래 물질로서 인지될 가능성이 낮다는 사실에 기인한다.

[0875] 본원에 사용된 용어 "핵심 잔기"는 항체, 특히 인간화 항체의 결합 특이성 및/또는 친화성에 보다 더 영향을 미치는 가변 영역내의 특정 잔기를 가리킨다. 핵심 잔기는 이로써 한정되는 것은 아니지만 다음의 것 중 하나 이상을 포함한다: CDR에 인접한 잔기, 잠재적 당화 부위 (N- 또는 O-당화 부위), 희귀 잔기, 항원과 상호작용할 수 있는 잔기, CDR과 상호작용할 수 있는 잔기, 정규 잔기, 중쇄 가변 영역과 경쇄 가변 영역사의 접점 잔기, 베니어 구역내의 잔기 및 초티아-규정의 가변 중쇄 CDR1과 캐벳-규정의 제1 중쇄 골격 영역간에 중첩하는 영역내의 잔기.

[0876] 본원에 사용된 "베니어" 구역은 Foote and Winter., *J. Mol. Biol.*, 224: 487-499 (1992)에 기술된 바와 같이 CDR 구조를 조절하고 항원에 맞도록 미세하게 조정할 수 있는 골격 잔기의 아세트를 가리킨다. 베니어 구역 잔기는 CDR의 기초를 이루는 층을 형성하며 CDR의 구조 및 항체의 친화성에 영향을 미칠 수 있다.

[0877] 본원에 사용된 용어 "중화"는 결합 단백질이 항원과 특이적으로 결합할 때 항원의 생물학적 활성을 제거함을 의미한다. 한 양태로서, 중화 결합 단백질은 항원과 결합하여 항원의 생물학적 활성을 적어도 약 20%, 40%, 60%, 80%, 85% 이상까지 감소시킨다.

[0878] 용어 "활성"은 항원에 대한 항체 (예, DLL4 항원과 결합하는 항-hDLL4 항체)의 결합 특이성/친화성 및/또는 항체 (예, hDLL4에 결합하여 hDLL4의 생물학적 활성을 억제하는 항-hDLL4 항체)의 중화 효능과 같은 활성을 포함하며, 예로는 리간드-수용체 결합 검정에서 수용체 결합의 억제 또는 사람 노치 수용체 검정에서 수용체 활성화의 억제 또는 상피 세포 발아 검정에서 상피 세포 증식의 자극을 들 수 있다.

[0879] 용어 "에피토프"는 면역글로불린 또는 T-세포 수용체에 특이적으로 결합하는 임의의 폴리펩타이드 결정소를 포함한다. 특정 양태에서, 에피토프 결정소는 아미노산, 당 측쇄, 포스포릴 또는 설포닐과 같은 분자의 화학적 활성 표면 기를 포함하며, 특정 양태로서 특이적 삼차원 구조 특징, 및/또는 특이적 하전 특징을 가질 수 있다. 에피토프는 항체에 의해 결합되는 항체 영역이다. 따라서, 에피토프는 특정 결합 파트너의 상보 부위에 결합하는 것으로 알려진 항원 (또는 이의 단편)의 영역의 아미노산 잔기로 구성된다. 항원 또는 항원성 단편은 하나 이상의 에피토프를 함유할 수 있다. 따라서, 본 분야의 전문가는 항체 분자의 모든 "항원 결합 부위"가 항원 분자의 에피토프에 결합하며 모든 항원 분자는 1개, 2개 또는 수개 또는 많은 에피토프를 가질 수 있음을 이해한다. 게다가, 본 분야의 전문가는 하나의 항원에 대한 2개의 독립적 분리 항체가 항원 분자의 동일한 에피토프 또는 2개의 상이한 에피토프와 결합할 수 있음을 이해한다.

[0880] 특정 양태에서, 항체는 단백질 및/또는 거대분자의 복잡한 혼합물에서 자신의 표적 항원을 인지할 때 항원에 특이적으로 결합한다고 한다. 항체가 교차 경쟁(하나의 한체가 다른 항체의 결합 또는 조절 효과를 방해한다)하는 경우 항체는 "동일한 에피토프에 결합한다"라고 한다. 추가로, 에피토프의 구조적인 정의(중첩, 유사, 동일)가 설명적이긴 하지만, 기능적 정의는 흔히 이들이 구조적(결합) 및 기능적(조절, 경쟁) 변수를 포괄하기 때문에 보다 더 밀접하다.

[0881] 본 명세서에 사용된 "표면 플라스몬 공명"이란 용어는 예를 들어, BIACore®

시스템(BIACore International AB, a GE Healthcare company, Uppsala, Sweden and Piscataway, New Jersey, US) 등을 이용하여 바이오센서 매트릭스 내의 단백질 농도의 변경을 검출하여 생체특이적 상호작용을 실시간 분석할 수 있는 광학 현상을 의미한다. 이에 대한 상세한 설명은 문헌[Jonsson et al., *Ann. Biol. Clin.* 51: 19-26 (1993); Jonsson et al., *Biotechniques* 11: 620-627 (1991); Johnsson et al., *J. Mol. Recognit.*, 8: 125-131 (1995); 및 Johnnson et al., *Anal. Biochem.*, 198: 268-277 (1991)]을 참고로 할 수 있다.

[0882] 본 명세서에 사용된 " K_{on} "이란 용어는 당업계에 공지된 바와 같이 동족 파트너(예, 항원)에 결합 단백질(예, 항체)이 결합하여 결합 파트너/동족 파트너(예, 항체/항원) 복합체를 형성하는 정반응 속도 상수(on rate constant)를 가리킨다. " K_{on} "은 또한 용어 "결합 속도 상수" 또는 " k_a "로 알려져 있으며 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 이 값은 표적 항원에 대한 항체의 결합 속도 또는 항체와 항원간의 복합체 형성 속도를 가리키며, 하기 등식으로 나타낸다:

[0883] 항체("Ab") + 항원("Ag") → Ab-Ag.

[0884] 본원에 사용된 용어 " K_{off} "는 당업계에 공지되어 있는 바와 같이, 예를 들어, 항체/항원 복합체로부터 결합 단백질(예, 항체)의 해리에 대한 역반응 속도 상수를 가리킨다. 또한, " K_{off} "는 "해리 속도 상수" 또는 " k_d "로 알려

져 있으며 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 이 값은 아래 등식에 나타낸 바와 같이 시간이 경과하면서 항체가 이의 표적 항원으로부터 해리되거나 Ab-Ag 복합체가 유리 항체 및 항원으로 분리되는 속도를 가리킨다:

[0885] $Ab + Ag \leftarrow Ab\text{-}Ag$.

[0886] 본원에서 상호교환적으로 사용된 용어 "평형 해리 상수" 또는 " K_p "는 평형 상태에서 얻은 적정 측정값 또는 해리 속도 상수(K_{off})를 결합 속도 상수(K_{on})로 나눈 값을 가리킨다. 결합 속도 상수, 해리 속도 상수 및 평형 해리 상수는 항원에 대한 항체의 결합 친화성을 나타내는데 사용된다. 결합 및 해리 속도 상수를 결정하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 형광-기초 기술의 사용은 고도의 민감성 및 평형 상태에서 생리학적 완충액중의 시료를 조사하는 능력을 제공한다. 다른 실험 방법 및 장비, 예를 들어, BIAcore®

표면 플라스몬 공명 (생분자 상호작용 분석) 분석을 사용할 수 있다 (예를 들어, 제조사 BIAcore International AB (a GE Healthcare company, Uppsala, Sweden)로부터 구입가능한 장비). 추가로, KinExA®

(동력한 배척 분석) 분석(제조사 Sapidyne Instruments (Boise, Idaho)로부터 구입)을 또한 사용할 수 있다.

[0887] "표지" 및 "검출가능한 표지"는 특이적 결합 파트너, 예를 들어, 항체 또는 항체에 의해 결합된 분석물에 부착된 잔기, 예를 들면, 항체와 분석물과 같은 특이적 결합 쌍의 구성원간의 반응을 검출할 수 있도록 하는 잔기를 가리킨다. 그렇게 표지된 특이적 결합 파트너 (예, 항체 또는 분석물)은 "검출가능하게 표지된" 것이라 한다. 따라서, 본원에 사용된 용어 "표지된 결합 단백질"은 결합 단백질의 동정을 위해 제공된 표지가 혼입되어 있는 단백질을 지칭한다. 한 양태로서, 당해 표지는 가시적 또는 장치적 수단, 예를 들어, 방사선 표지된 아미노산의 삽입 또는 표시된 아비딘(예, 광학적 또는 비색 측정 방법에 의해 검출될 수 있는 형광 마커 또는 효소적 활성을 함유하는 아비딘 또는 스트렙타비딘)에 의해 검출될 수 있는 바이오티닐 잔기의 폴리펩타이드로의 부착에 의해, 검출가능한 신호를 생성할 수 있는 검출가능한 마커이다. 폴리펩타이드에 대한 표지의 예는 이로써 한정되는 것은 아니지만 방사선동위원소 또는 방사선핵종(예, 3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho 또는 ^{153}Sm); 발색체, 형광 표지(예, FITC, 로다민 및 란타니드 인광체), 효소 표지(예, 서양고추냉이 퍼옥시다제, 루시페라제, 알칼리성 포스파타제); 화학발광 마커; 바이오티닐 기; 2차 리포터(예, 류신 지페 쌍 서열, 2차 항체에 대한 결합 부위, 금속 결합 도메인, 에피토프 태그)에 의해 인지되는 예정된 폴리펩타이드 에피토프; 및 자성 물질(예, 가돌리늄 퀄레이트)을 포함한다. 면역분석을 위해 통상적으로 사용되는 표지의 대표적 예는 발광 잔기 (예, 아크리디늄 화합물) 및 형광 생성 잔기(예, 플루오레세인)을 포함한다. 다른 표지들이 본 분야에 알려져 있거나 본원에 기재되어 있다. 이와 관련하여, 잔기 자체는 검출가능하게 표지되는 것이 아니라, 다른 잔기와 반응하였을 때 검출가능하게 될 수 있다. "검출가능하게 표지된"의 사용은 후자 유형의 검출가능한 표지를 포함한다.

[0888] "항체 접합체"란 용어는 제2 화학 잔기(예, 치료 또는 세포독성 물질)에 화학적으로 결합된 항체와 같은 결합 단백질을 가리킨다. 본 명세서에 사용된 "물질"라는 용어는 화학적 화합물, 화학적 화합물의 혼합물, 생물학적 거대분자 또는 생물학적 물질로부터 제조된 추출물을 의미한다. 바람직하게는, 치료 또는 세포독성 물질은 백일해 독소, 턱솔, 시토칼라신 B, 그라미시딘 D, 에티디움 브로마이드, 에메틴, 미토마이신, 에토포사이드, 테노포사이드, 빙크리스틴, 빈블라스틴, 콜히친, 독소루비신, 다우노루비신, 디하이드록시 안트라신 디온, 미토크산트론, 미트라마이신, 액티노마이신 D, 1-데하이드로테스토스테론, 글루코코르티코이드, 프로카인, 테트라카인, 리도카인, 프로프라놀롤 및 퓨로마이신 및 이의 유사체 또는 동족체가 포함되나, 이에 국한되지 않는다.

[0889] 본원에 사용된 용어 "결정" 또는 "결정화"는 결정 형태로 존재하는 결합 단백질(예, 항체) 또는 이의 항원 결합 부분을 의미한다. 결정은 물질의 고체 상태중 한 가지 형태로서, 무정형 고체 상태 또는 액정 상태와 같은 다른 형태와 구분된다. 결정은 원자, 이온, 분자(예, 항체와 같은 단백질) 또는 분자 응집체(예, 항원/항체 복합체)의 규칙적이고 반복적이며 입체적인 배열로 구성된다. 이러한 입체 배열은 본 분야에서 잘 이해되고 있는 특수한 수학 관계에 따라 배열된다. 결정 중에서 반복되는 기본 단위 또는 빌딩 블록은 비대칭 유니트라 한다. 소정의 뚜렷한 결정학적 대칭과 일치하는 배열내 비대칭 단위의 반복은 결정의 "단위 셀"을 제공한다. 모든 3차원에서 규칙적 해독에 의한 단위 셀의 반복은 결정을 제공한다 [Giege et al., *In Crystallization of Nucleic Acids and Proteins. a Practical Approach*, 2nd ed., (Ducruix and Giege, eds.) (Oxford University Press, New York, 1999), chapter 1, pages 1-16].

[0890] "폴리뉴클레오타이드"란 용어는 2개 이상의 뉴클레오타이드의 중합체 형태를 의미하는 것으로서, 리보뉴클레오

타이드이거나 테옥시리보뉴클레오타이드 또는 이를 뉴클레오타이드중 어느 한 유형의 변형 형태이다. 이 용어는 DNA의 단일쇄 및 이본쇄 형태를 포함한다.

[0891] "분리된 폴리뉴클레오타이드"란 용어는 폴리뉴클레오타이드(예, 게놈, cDNA 또는 합성 기원 또는 이의 일부 조합의 폴리뉴클레오타이드)로서 그 기원에 따라서, 자연에서 함께 발견되는 폴리뉴클레오타이드의 전부 또는 일부와 결합되어 있지 않거나, 자연에서 결합하고 있지 않은 폴리뉴클레오타이드에 작동적으로 결합되어 있거나, 더 큰 서열의 일부로서 자연에 존재하지 않는다.

[0892] "벡터"라는 용어는 이에 결합되어 있는 다른 핵산을 수송할 수 있는 핵산 분자를 가리킨다. 벡터의 한가지 유형은 "플라스미드"이며, 이것은 원형의 이본쇄 DNA 루프로서 이의 내부로 추가적인 DNA 절편이 삽입되어 연결될 수 있다. 다른 형태의 벡터는 바이러스 벡터이며, 이 경우는 추가적인 DNA 절편이 바이러스 게놈내로 연결될 수 있다. 특정 벡터는 이들이 도입된 숙주 세포에서 자가 복제할 수 있다(예, 세균 복제원을 보유한 세균 벡터 및 에피솜성 포유동물 벡터). 다른 벡터(예, 비에피솜성 포유동물 벡터)는 숙주 세포에 도입되어 숙주 세포의 게놈으로 통합될 수 있고, 이로써 숙주 게놈과 함께 복제된다. 더욱이, 특정 벡터는 이에 작동적으로 결합된 유전자의 발현을 유도할 수 있다. 이러한 벡터는 본 명세서에서 "재조합 발현 벡터"(또는 간단히 "발현 벡터")라 한다. 일반적으로 재조합 DNA 기술에서 사용되는 발현 벡터는 흔히 플라스미드 형태이다. 본 명세서에 "플라스미드" 및 "벡터"는 플라스미드가 가장 흔하게 사용되는 벡터 형태이기 때문에 상호교환적으로 지칭될 수 있다. 하지만, 본 발명은 대등한 기능을 담당하는 바이러스 벡터(예, 복제 결핍 레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아데노-관련 바이러스)와 같은 다른 형태의 발현 벡터도 포함한다.

[0893] "작동적으로 결합된"이란 용어는 해당 성분들이 의도한 방식대로 기능할 수 있는 관계에 놓여 있는 병렬 배치를 의미한다. 암호 서열에 "작동적으로 결합된" 조절 서열은 암호 서열의 발현이 조절 서열과 양립하는 조건하에서 달성되도록 하는 방식으로 연결되어 있다. "작동적으로 결합된" 서열은 해당 유전자와 인접한 발현 조절 서열, 트랜스로 (즉, 해당 유전자가 아닌 다른 핵산 분자상에 위치하여) 작동하는 발현 조절 서열뿐만 아니라 해당 유전자와 동일한 핵산 분자에 위치하지만 해당 유전자로부터 떨어져 있는 발현 조절 서열을 포함한다. 본 명세서에 사용된 "발현 조절 서열"이란 용어는 이들이 결합되어 있는 암호 서열의 발현과 프로세싱을 수행하는데 필요한 폴리뉴클레오타이드 서열을 의미한다. 발현 조절 서열은 적절한 전사 개시, 종결, 프로모터 및 인핸서 서열; 이식 및 폴리아데닐화 신호와 같은 효율적인 RNA 프로세싱 신호; 세포질 mRNA를 안정화시키는 서열; 해독 효율을 증강시키는 서열(즉, 코작 공통 서열); 단백질 안정성을 증강시키는 서열; 필요한 경우 단백질 분비를 증강시키는 서열을 포함한다. 이러한 조절 서열의 성질은 숙주 유기체에 따라 다르다. 원핵생물인 경우, 그러한 조절 서열은 일반적으로 프로모터, 리보솜 결합 부위 및 전사 종결 서열을 포함하고, 진핵생물인 경우에 그러한 조절 서열은 프로모터 및 전사 종결 서열을 포함한다. "조절 서열"이란 용어는 발현 및 프로세싱에 필수적인 성분을 포함하며, 또한 존재하면 유리할 수 있는 추가의 성분 (예, 리더 서열 및 융합 파트너 서열)을 포함할 수도 있다.

[0894] "형질전환"은 외인성 DNA (예, DNA 분자)가 숙주 세포로 유입되는 임의의 공정을 의미한다. 형질전환은 당업계에 잘 알려진 다양한 방법을 사용하여 천연 또는 인공 조건 하에서 실시될 수 있다. 형질전환은 이종 핵산 서열을 원핵생물 또는 진핵생물 숙주 세포로 삽입하기 위한 임의의 공지된 방법에 따라 달라질 수 있다. 이러한 방법은 형질전환되는 숙주 세포에 따라 선택되는데, 이로써 한정되는 것은 아니지만 세포막을 통과하는 플라스미드 유입, 바이러스 감염, 전기천공, 리포택션 및 유전자총이 포함된다. 이러한 "형질감염" 세포는 숙주 세포내로 삽입된 DNA가 자가 복제성 플라스미드로서 또는 숙주 염색체의 일부로서 복제할 수 있는 안정적으로 형질감염된 세포를 포함한다. 또한, 이를 세포는 삽입된 DNA 또는 RNA를 한정된 시간 동안 일시적으로 발현하는 세포도 포함한다.

[0895] "재조합 숙주 세포"(또는 간단히 "숙주 세포")란 용어는 외인성 DNA가 도입된 세포를 가리킨다. 한 양태로서, 숙주 세포는 항체를 암호화하는 2개 이상 (예, 다중)의 핵산을 포함하며, 이로써 한정되는 것은 아니지만 미국 특허 제7,262,028호에 기재된 숙주 세포를 예로 들 수 있다. 이러한 용어는 특정 해당 세포뿐만 아니라 이 세포의 후손도 의미한다. 후대에 돌연변이 또는 환경적 영향으로 인해 특정 변형이 일어날 수 있기 때문에, 후손은 사실상 모세포와 동일하지 않지만 본원에서 사용된 "숙주 세포"란 용어의 범위에는 포함된다. 한 양태로서, 숙주 세포는 임의의 생물체에서 선택되는 원핵생물 및 진핵생물 세포를 포함한다. 또 다른 양태로서, 진핵생물 세포는 원생생물, 진균, 식물 및 동물 세포를 포함한다. 또 다른 양태로서, 숙주 세포는 이로써 한정되는 것은 아니지만 에스케리키아 콜라이와 같은 원핵생물 종; CHO, HEK 293, COS, NS0, SP2 및 PER.C6과 같은 포유동물 세포주; 곤충 세포주 Sf9; 및 사카로마이세스 세레비지애와 같은 진균 세포 종을 포함한다.

[0896] 재조합 DNA, 올리고뉴클레오타이드 합성, 조직 배양 및 형질전환(예, 전기천공, 리포액션)을 위해 표준 기술이 사용될 수 있다. 효소 반응과 정제 기술은 제조사의 지침에 따라 수행하거나 당업계에서 일반적으로 수행하는 바와 같이 또는 본 명세서에 기술된 바와 같이 수행할 수 있다. 상기 기술 및 절차들은 당업계에 공지된 통상의 방법에 따라 또는 본 명세서에서 인용되고 논의된 각종 일반 문헌 및 특정 문헌들에 기술된 바와 같이 일반적으로 수행할 수 있다[Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, second ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989)].

[0897] 당업계에 알려진 "형질전환 유기체"란 전이유전자를 포함하는 세포를 가진 유기체를 의미하는 것으로서, 유기체(또는 이 유기체의 선조)에 도입된 전이유전자는 그 유기체에서 자연적으로 발현되지 않는 폴리펩타이드를 발현한다. "전이유전자"는 형질전환 유기체가 발생하는 세포의 계놈내로 안정적이고 작동적으로 통합되어, 형질전환 유기체의 하나 이상의 세포 유형 또는 조직에서 암호화된 유전자 산물의 발현을 유도하는 DNA 작제물이다.

[0898] "조절하다"란 용어는 당해 분자의 활성(예, hDLL4의 생물학적 활성)을 변화 또는 변경하는 것을 의미한다. 조절은 당해 분자의 특정 활성 또는 기능의 세기가 증가 또는 감소되는 것일 수 있다. 분자의 활성 및 기능으로는 이로써 한정되는 것은 아니지만 결합 특징, 효소 활성, 세포 수용체 활성화 및 신호 전달을 예로 들 수 있다.

[0899] 이와 마찬가지로, 본원에 사용된 "조절자"란 용어는 당해 분자의 활성 또는 기능(예, hDLL4의 생물학적 활성)을 변화 또는 변경시킬 수 있는 화합물이다. 예를 들어, 조절자는 이 조절자의 부재 시 관찰된 한 분자의 특정 활성 또는 기능의 세기에 비해 그 분자의 상응하는 활성 또는 기능의 세기가 증가 또는 감소되도록 유도할 수 있다. 특정 양태로서, 조절자는 한 분자의 하나 이상의 활성 또는 기능의 세기를 감소시키는 억제제이다. 억제제의 예로는 이로써 한정되는 것은 아니지만 단백질, 펩타이드, 항체, 펫티바디(peptibody), 탄수화물 또는 유기 소분자를 들 수 있다. 펫티바디는 예를 들어 PCT 공개번호 WO 01/83525에 기술되어 있다.

[0900] "효능제(agonist)"란 용어는 목적하는 분자와 접촉했을 때 효능제의 부재 시 관찰된 그 분자의 특정 활성 또는 기능의 세기에 비해 그 분자의 상응하는 활성 또는 기능의 세기가 증가하도록 유도할 수 있는 조절자를 의미한다. 목적하는 특정 효능제의 예로는 이로써 한정되는 것은 아니지만 노치-신호전달 경로의 일원, DLL4 폴리펩타이드 및 DLL4와 결합하는 핵산, 탄수화물 또는 임의의 다른 분자를 들 수 있다.

[0901] 본원에 사용된 "길항제" 또는 "억제제"란 용어는 목적하는 분자와 접촉했을 때, 길항제의 부재 시 관찰된 그 분자의 활성 또는 기능의 세기에 비해 그 분자의 특정 활성 또는 기능의 세기가 감소하도록 유도할 수 있는 조절자를 의미한다. 목적하는 특정 길항제는 DLL4, 특히 사람 DLL4 (hDLL4)의 생물학적 또는 면역학적 활성을 차단 또는 조절하는 물질을 포함한다. hDLL4의 길항제 및 억제제는 이에 국한되는 것은 아니지만 hDLL4 및/또는 설치류 DLL4에 결합하는 단백질, 핵산, 탄수화물 또는 임의의 다른 분자를 포함할 수 있다.

[0902] 본원에 사용된 용어 "유효량"은 질환 또는 이의 하나 이상의 증상에 있어서 중증 및/또는 기간을 경감 또는 완화시키거나, 질환의 진행을 억제 또는 예방하거나, 질환의 퇴행을 유발하거나, 질환과 연관된 하나 이상의 증상의 재발, 발전, 개시 또는 진행을 억제 또는 예방하거나, 다른 요법(예, 예방 물질 또는 치료 물질)의 예방 또는 치료 효과(들)를 증진 또는 개선시키는데 충분한 치료량을 가리킨다.

[0903] "환자" 및 "대상자"는 본원에서 상호교환적으로 사용되는 용어로서 영장류(예, 사람, 원숭이 및 침팬치), 비-영장류(예, 소, 돼지, 낙타, 라마, 말, 염소, 토끼, 양, 햄스터, 기니아 퍼그, 고양이, 개, 랙트, 마우스 및 고래)를 포함하는 포유동물, 조류(예, 오리 또는 거위) 및 상어와 같은 동물을 가리킨다. 바람직하게는, 환자 또는 대상자는 사람으로서 질환, 장애 또는 병태를 진단받는 사람, 질환, 장애 또는 병태의 위험에 처한 사람, 질환, 장애 또는 병태를 앓고 있는 사람 및/또는 질환, 장애 또는 병태를 치료받는 사람을 예로 들 수 있다. 더욱 바람직하게는, 환자 또는 대상자는 이상적인 DLL4 발현이 유발하고 DLL4 활성을 억제 또는 제거함으로써 치료될 수 있는 암 또는 기타 질병을 치료받거나 진단받는 사람이다.

[0904] 본 명세서에 사용된 "치료"란 용어는 가장 광범위한 의미로 사용되고 있다. 본 명세서에 사용된 "생물학적 치료"는 살아있는 생물 또는 죽은 생물에서 유래하는 임의의 양의 물질을 포함하나, 이에 국한되는 것은 아니다. 이러한 생물에는 사람, 마우스, 랙트, 원숭이, 개, 토끼 및 다른 동물이 있으나, 이에 국한되는 것은 아니다. 상기 물질에는 혈액(예, 전혈), 혈장, 혈청, 뇨, 양막액, 활액, 내피 세포, 백혈구, 단핵구, 기타 세포, 기관, 조직, 골수, 림프절 및 비장이 있으나, 이에 국한되지 않는다.

[0905] "성분", "성분들" 및 "하나 이상의 성분"은 일반적으로 본원에 기재된 방법 및 당업계에 공지된 기타 방법에 따라 시험 시료(예, 환자 뇨, 혈청 또는 혈장 시료)의 분석용 키트에 포함될 수 있는 포획 항체, 검출 또는 결합

항체, 대조군, 계측기, 일련의 계측기, 민감성 패널, 컨테이너, 완충액, 희석제, 염, 효소, 효소에 대한 조인자, 검출 시약, 전처리 시약/용액, 기질(예, 용액으로서) 및 정지 용액 등을 가리킨다. 따라서, 본원 발명과 관련하여 "하나 이상의 성분", "성분" 및 "성분들"은 상기한 바와 같은 폴리펩타이드 또는 다른 분석물을 포함할 수 있으며, 예를 들어 항-분석물(예, 항-폴리펩타이드) 항체에 결합함으로써 고형 지지체상에 임의로 고정되는 폴리펩타이드와 같은 분석물을 포함하는 조성물을 포함할 수 있다. 일부 성분들은 용액의 형태이거나 검정에서 사용시 재구성되는 동결건조의 형태일 수 있다.

[0906] "위험"은 특정 사건이 현재 또는 향후 몇몇 시점에서 발생할 수 있는 가능성 또는 가망성을 언급한다. "위험도 충별(Risk stratification)"은 담당의가 환자를 저, 중, 고 또는 최고 위험의 특정 질환, 장애 또는 병태의 발병으로 분류할 수 있게 해주는 일련의 공지된 임상적 위험 요소를 가리킨다.

[0907] 특이적 결합쌍의 구성원(예, 항원 또는 이의 단편과 항체 또는 이의 항원 결합 단편)간의 상호작용과 관련된 용어 "특이적" 및 "특이성"은 상호작용의 선택적 반응성을 가리킨다. 용어 "특이적으로 결합하는" 및 이의 유사용어는 항체 (또는 이의 항원 결합 단편)이 목적하는 분자 (또는 이의 단편)에 특이적으로 결합하지만 다른 물질에는 특이적으로 결합하지 않는 능력을 지칭한다.

[0908] "특이적 결합 파트너"는 특이적 결합쌍의 구성원이다. 특이적 결합쌍은 화학적 또는 물리적 수단을 통해 서로 특이적으로 결합하는 2개의 상이한 분자를 포함한다. 따라서, 항원과 항체의 특이적 결합쌍외에, 다른 특이적 결합쌍은 비오틴과 아비딘(또는 스트렙타비딘), 탄수화물과 랙틴, 상보적 뉴클레오타이드 서열, 작동체와 수용체 분자, 조인자와 효소, 효소 억제제와 효소 등을 포함할 수 있다. 또한, 특이적 결합 쌍은 고유의 특이적 결합 구성원의 유사체인 구성원, 예를 들어, 분석물-유사체를 포함할 수 있다. 면역반응성 특이적 결합 구성원은 분리되거나 재조합에 의해 제조되든 상관없이 항원, 항원 단편 및 항체 (모노클로날 및 폴리클로날 항체뿐만 아니라 이의 복합체, 단편 및 변이체(변이체의 단편을 포함)를 포함)를 포함한다.

[0909] 본원에 사용된 "변이체"는 아미노산의 부가(예, 삽입), 결실 또는 보존적 치환에 의해 아미노산 서열이 해당 폴리펩타이드(예, DLL4 폴리펩타이드 또는 항-DLL4 항체)와 상이하지만 해당 폴리펩타이드의 생물학적 활성을 보유하는 폴리펩타이드를 가리킨다 (예를 들면, 변이체 DLL4는 야생형 DLL4의 고유 항체 결합 부위 (에피토프)를 유지하는 경우 항-DLL4 항체와의 결합에 대해 야생형 DLL4와 경쟁할 수 있다). 아미노산의 보존적 치환, 즉, 한 아미노산을 유사한 성질(예, 소수성 및 하전 영역의 정도 및 분포)의 다른 아미노산으로 대체하는 것은 전형적으로 작은 변화를 제공하는 것으로서 본 분야에서 인식되고 있다. 이들의 작은 변화는 당업계에서 이해되는 바와 같이(참조예: Kyte et al., *J. Mol. Biol.* 157:105-132(1982)) 아미노산의 소수성 지수(hydropathic index)를 고려함으로써 부분적으로 동정될 수 있다. 아미노산의 소수성 지수는 아미노산의 소수성 및 하전을 기초로 하고 있다. 유사한 소수성 지수의 아미노산들은 치환될 수 있으면서 단백질 기능을 계속 보유할 수 있다는 것은 당업계에 알려져 있다. 한 가지 관점에서, ±2의 소수성 지수를 갖는 아미노산이 치환된다. 또한 아미노산의 친수성은 생물학적 기능을 보유하는 단백질을 유도하는 치환을 밝히는데 사용될 수 있다. 펩타이드와 관련하여 아미노산의 친수성을 근거로 그 펩타이드의 최대 평균 국소 친수성을 계산할 수 있고 이는 항원성 및 면역원성과 연관된 것으로 보고된 유용한 측정치이다(문헌참조: 미국 특허 제4,554,101호). 유사한 친수성 값을 갖는 아미노산의 치환은 당업계에서 이해되는 바와 같이 생물학적 활성 (예, 면역원성)을 보유하는 펩타이드를 유도할 수 있다. 한 가지 관점에서, 치환은 서로 ±2 이내의 친수성 값을 갖는 아미노산으로 수행된다. 아미노산의 소수성 지수와 친수성 값 둘다는 그 아미노산의 특정 측쇄에 의해 영향받는다. 이러한 관찰에 부합하는 것으로서, 생물학적 기능과 일치하는 아미노산 치환은 소수성, 친수성, 하전, 크기 및 다른 성질에 의해 나타나는 바와 같이 아미노산 및 특히 아미노산의 측쇄의 상대적 유사성에 좌우되는 것으로 이해된다. 또한 "변이체"는 예를 들어 단백질 용해, 인산화, 또는 기타 해독후 변형에 의해 별도로 프로세싱되었으나 고유의 생물학적 활성 또는 항원 반응성 (예, DLL4와의 결합능)을 보유하는 폴리펩타이드 또는 이의 단편을 기술하는데 사용될 수 있다. 본원에서 "변이체"의 사용은 본원에서 달리 언급되지 않는 한 변이체의 단편을 포괄한다.

[0910] 본 명세서에 사용된 "시료"란 용어는 가장 광범위한 의미로 사용되고 있다. 본 명세서에 사용된 "생물학적 시료"는 살아있는 생물 또는 죽은 생물에서 유래하는 임의의 양의 물질을 포함하나, 이에 국한되는 것은 아니다. 살아있는 생물은 이로써 한정되는 것은 아니지만 사람, 마우스, 랙트, 원숭이, 개, 토끼 및 다른 동물을 포함한다. 상기 물질은 혈액(예, 전혈), 혈장, 혈청, 뇌, 양막액, 활액, 내피 세포, 백혈구, 단핵구, 기타 세포, 기관, 조직, 골수, 림프절 및 비장을 포함한다.

[0911] I. 사람 DLL4와 결합하는 항체

[0912] 본 발명의 한 가지 관점은 DLL4와 고도의 친화성, 느린 역반응 속도 및/또는 고도의 중화능으로 결합하는 분리

된 사람 모노클로날 항체 또는 이의 항원 결합 부분을 제공한다. 유리하게는, DLL4와 결합하는 상기 사람 항체 또는 이의 항원 결합 부분은 사람 치료제로서의 용도를 제공하는데 이를 DLL4 결합 단백질 치료제는 사람 환자의 면역체계가 그 투여된 단백질에 대하여 최소로 반응하거나 무반응으로 투여될 수 있다. 따라서, 환자는 반복된 투여의 과정내내 완전한 사람 DLL4 결합 단백질의 효과를 얻을 수 있다. 본 발명의 다른 관점은 DLL4와 결합하는 키메라 항체 및 DLL4와 결합하는 CDR 이식 항체 또는 이의 항원 결합 부분을 제공한다. 바람직하게는, 항체 또는 이의 부분은 분리된 항체이다. 바람직하게는, 본 발명의 항체는 사람 항-DLL4 항체를 중화한다.

[0913]

A. 항 DLL4 항체의 제조 방법

[0914]

본 발명의 항체는 본 분야에 알려진 많은 기술에 의해 제조될 수 있다. 바람직한 방법은 본 명세서의 실시예에 예시된 바와 같은 PROfusion mRNA 디스플레이 기술이다. 다른 방법은 사람 면역글로불린 유전자의 기능적 상보체를 갖는 형질전환 설치류 (예, 형질전환 마우스)를 사람 DLL4 또는 이의 항원 부분으로 면역화한 후 표준 하이브리도마 기술에 따라 사람 DLL4와 결합하는 완전한 사람 모노클로날 항체를 발현하는 하이브리도마를 생성한다. 이와 같은 방법에 의해 수득된 재조합 사람 항체는 사람 배선 면역글로불린 서열로부터 파생된 가변 및 불변 영역을 갖는다. 그러한 방법은 완전한 사람 DLL4 결합 단백질을 제공하며, 1회 이상의 인간화를 수행해야 하는 필요성을 배제함으로써 모노클로날 DLL4 항체 분자의 비인간 항원성의 원천을 줄일 수 있다. 따라서, 다수 종으로부터 유래한 재료를 이용하는 기술들은 덜 바람직하지만 사용될 수는 있다.

[0915]

또한, 본원에 사용된 용어 "모노클로날 항체"는 하이브리도마 기술을 통해 생성된 항체로 한정되는 것이 아님은 주지되어야 한다. 용어 "모노클로날 항체"는 진핵, 원핵 또는 파지 클론을 포함한 단일 클론으로부터 유도된 항체를 가리키며, 이를 생성하는 방법을 가리키는 것이 아니다.

[0916]

본 발명에 따른 DLL4 모노클로날 항체 분자를 수득하기 위해 사용될 수 있는 여러 기술의 추가적인 관점들은 아래에 기술된다.

[0917]

1. 하이브리도마 기술을 이용한 항-DLL4 모노클로날 항체

[0918]

모노클로날 항체는 하이브리도마, 재조합 및 파지 디스플레이 기술의 사용을 포함하여 본 분야에 알려진 아주 다양한 기술 또는 이의 조합을 이용하여 제조할 수 있다. 예를 들면, 본 분야에 공지된 것을 포함한 하이브리도마 기술, 예를 들면 Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, second edition, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1988); Hammerling, et al., In Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas, pages 563-681 (Elsevier, New York, 1981)에 공지된 기술을 사용하여 모노클로날 항체를 제조할 수 있다(상기 문헌의 전체 내용은 본원에 참고 원용된다). 하이브리도마 기술을 이용한 특이적 항체를 제조하고 스크리닝하는 방법은 당해 분야에서 일상적이고 널리 공지되어 있다. 한 가지 양태로서, 본 발명은 본 발명의 항체를 분비하는 하이브리도마 세포, 바람직하게는 본 발명의 항원으로 면역화된 마우스로부터 분리된 비장세포를 골수종 세포와 융합시켜 생성된 하이브리도마 세포를 배양한 다음 본 발명의 폴리펩타이드와 결합할 수 있는 항체를 분비하는 하이브리도마 클론에 대해 상기 융합으로부터 생성된 하이브리도마를 선별하는 것을 포함한 모노클로날 항체의 제조 방법뿐만 아니라 이 방법에 의해 생성된 항체를 제공한다. 요약하면, 마우스가 DLL4 항원으로 면역화될 수 있다. 바람직한 양태로서, DLL4 항원은 면역 반응을 자극하는 보조제와 함께 투여된다. 이와 같은 보조제는 완전 또는 불완전 프로인트 보조제, RIBI (뮤라밀 디펩타이드) 또는 ISCOM (면역자극 복합체)을 포함한다. 이러한 보조제는 폴리펩타이드를 국소 침전물내로 봉쇄함으로써 폴리펩타이드가 급속하게 분산되는 것을 방지할 수 있거나; 보조제는 숙주가 면역체계의 대식세포 및 기타 구성원에 대해 화학주성인 인자를 분비하도록 자극하는 물질을 함유할 수 있다. 바람직하게는, 폴리펩타이드가 투여되는 경우, 면역화 일정은 폴리펩타이드의 2회 투여 또는 그 이상을 포함하며, 수주에 걸쳐 퍼지지만; 폴리펩타이드의 단회 투여도 사용될 수 있다.

[0919]

동물을 DLL4 항원으로 면역화 후 동물로부터 항체 및/또는 항체-생성 세포를 수득할 수 있다. 동물로부터 채혈하거나 동물을 사멸시킴으로써 항-DLL4 항체-함유 혈청을 수득한다. 혈청은 동물로부터 채취한 그대로 사용하거나, 혈청으로부터 면역글로불린 분획을 수득하거나, 혈청으로부터 항-DLL4 항체를 정제할 수 있다. 이러한 방법으로 수득된 혈청 또는 면역글로불린을 폴리클로날이며, 따라서 이종 배열의 특성을 갖는다.

[0920]

일단 면역 반응이 검출되면, 예를 들어 항원 DLL4에 대해 특이적인 항체가 마우스 혈청에서 검출되면, 마우스 비장을 적출하고 비장세포를 분리한다. 이어서, 잘 알려진 기술에 의해 비장 세포를 적합한 골수종 세포, 예를 들면 아메리칸 타입 컬쳐 콜렉션 (ATCC, Manassas, Virginia, US)으로부터 입수가능한 세포주 SP20의 세포에 융

합시킨다. 하이브리도마는 한계 회석에 의해 선택 및 클로닝한다. 이어서, 본 분야에 알려진 방법에 의해 하이브리도마 클론을 DLL4와 결합할 수 있는 항체를 분비하는 세포에 대해 검정한다. 양성 하이브리도마 클론으로 마우스를 면역화함으로써 일반적으로 고 수준의 항체를 함유하는 복수를 생성할 수 있다.

[0921] 다른 양태로서, 면역화 동물로부터 항체-생성 불멸화 하이브리도마를 제조할 수 있다. 면역화 후 동물을 사멸하고 비장 B 세포를 분 분야에 잘 알려진 바와 같이 불멸화 골수종 세포에 융합시킨다 (상기 Harlow and Lane). 바람직한 양태로서, 골수종 세포는 면역글로불린 폴리펩타이드를 분비하지 않는다 (비분비 세포주). 융합 및 항생제 선택 후, DLL4 또는 이의 부분 또는 DLL4 발현 세포를 사용하여 하이브리도마를 선별한다. 바람직한 양태로서, 초기 선별은 효소-결합된 면역 흡착 검정(ELISA) 또는 방사선면역검정(RIA), 바람직하게는 ELISA를 사용하여 실시한다. ELISA 선별의 예는 PCT 공개번호 WO 00/37504에 기술되어 있다. 이의 내용은 본원에 참조로 원용된다.

[0922] 항-DLL4 항체-생성 하이브리도마는 아래에 논의된 바와 같이 왕성한 하이브리도마 성장, 고도의 항체 생성 및 목적하는 항체 특징을 포함한 목적하는 특징에 대해 선택, 클로닝 및 선별한다. 하이브리도마는 동계 동물, 즉 면역체계가 결핍된 동물 (예, 누드 마우스)에서 생체내 배양 및 증식되거나 시험관내 세포 배양물에서 배양 및 증식될 수 있다. 하이브리도마를 선택, 클로닝 및 증식하는 방법은 본 분야의 전문가에게 잘 알려져 있다.

[0923] 바람직한 양태로서, 하이브리도마는 상기된 바와 같은 마우스 하이브리도마이다. 다른 양태로서, 하이브리도마는 랙트, 양, 돼지, 염소, 소 또는 말과 같은 비-인간, 비-마우스 종에서 생성된다. 또 다른 바람직한 양태로서, 하이브리도마는 사람 비분비 골수종이 항-DLL4 항체를 발현하는 사람 세포와 융합된 사람 하이브리도마이다.

[0924] 특이적 에피토프를 인지하는 항체 단편은 공지된 기술에 의해 생성될 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 Fab 및 F(ab')2 단편은 효소(예, Fab 단편을 생성하는 파파인 또는 F(ab')2 단편을 생성하는 웨신)로 면역글로불린 분자를 분해시켜 생성할 수 있다. F(ab')2 단편은 가변 영역, 경쇄 불변 영역 및 중쇄의 CHI 도메인을 함유한다.

2. SLAM을 사용한 항-DLL4 모노클로날 항체

[0926] 본 발명의 다른 관점으로서, 미국특허 제5,627,052, PCT 공개번호 WO 92/02551 및 Babcock et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 7843-7848 (1996)에 기술되어 있고 선택된 림프구 항체 방법 (SLAM)으로서 당엽계에서 지칭되는 방법을 사용하여 단일의 분리된 림프구로부터 재조합 항체를 생성한다. 이 방법에서, 목적하는 항체를 분비하는 단일 세포, 예를 들어 상기 섹션 I.A.1에 기술된 면역화 동물중 하나로부터 유래된 림프구를 항원-특이적 용혈 플라크 검정에 의해 선별한다. 상기 용혈 플라크 검정에서 항원 DLL4, DLL4의 아단위 또는 이의 단편이 바이오틴과 같은 링커에 의해 양 적혈 세포에 연결되고 DLL4에 대해 특이성을 갖는 항체를 분비하는 단일 세포를 동정하는데 사용된다. 목적하는 항체-분비 세포의 동정 후, 역전사효소-PCR (RT-PCR)에 의해 세포로부터 중쇄 및 경쇄 가변 영역 cDNA를 추출한 다음 이들 가변 영역을 COS 또는 CHO 세포와 같은 포유동물 숙주 세포에서 적절한 면역글로불린 불변 영역 (예, 사람 불변 영역)과 더불어 발현할 수 있다. 이어서, 생체내 선택된 림프구로부터 유래된 증폭된 면역글로불린 서열로 형질감염된 숙주 세포를 예를 들어 패닝하여 DLL4에 대한 항체를 발현하는 세포를 분리함으로써 그들 형질감염 숙주 세포를 추가로 생체내 분석하고 선택할 수 있다. 증폭된 면역글로불린 서열은 추가로 시험관내에서, 예를 들면 시험관내 친화성 성숙 방법에 의해 처리할 수 있다 (참조예: PCR 공개번호 WO 97/29131 및 PCT 공개번호 WO 00/56772).

3. 형질전환 동물을 이용한 항-DLL4 모노클로날 항체

[0928] 본 발명의 다른 양태로서, 사람 면역글로불린 유전자좌의 일부 또는 전부를 포함한 비-인간 동물을 DLL4 항원으로 면역화함으로써 항체를 생성한다. 바람직한 양태로서, 비-인간 동물은 XENOMOUSE®

형질전환 마우스이며, 이 형질전환 마우스는 사람 면역글로불린 유전자좌의 커다란 단편을 포함하고 마우스 항체 생성이 결핍된 조작된 마우스 스트레인이다 (Green et al., *Nature Genetics*, 7:13-21 (1994); 미국특허 제5,916,771호, 제5,939,598호, 제5,985,615호, 제5,998,209호, 제6,075,181호, 제6,091,001호, 제6,114,598호 및 제6,130,364호; PCT 공개번호 WO 91/10741, WO 94/02602, WO 96/34096, WO 96/33735, WO 98/16654, WO 98/24893, WO 98/50433, WO 99/45031, WO 99/53049, WO 00/09560 및 WO 00/037504). XENOMOUSE®

형질전환 마우스는 완전한 사람 항체의 성인-유사 사람 레퍼토리를 생산하고, 항원-특이적 사람 모노클로날 항체를 생성한다. XENOMOUSE®

형질전환 마우스는 사람 중쇄 유전자와 및 x 경쇄 유전자와의 메가염기 크기의 배선 형태 YAC 단편의 도입을 통해 사람 항체 레퍼토리의 약 80%를 함유한다 (Mendez et al., *Nature Genetics* 15: 146-156 (1997), Green and Jakobovits, *J. Exp. Med.* 188: 483-495 (1998)). 이들 문헌의 내용은 본원에 참고로 원용된다.

[0929] 4. 재조합 항체 라이브러리를 이용한 항-DLL4 모노클로날 항체

또한, 본 발명의 항체 제조에는 시험관내 방법도 사용할 수 있는데, 이 경우 항체 라이브러리를 선별하여 목적하는 DLL4-결합 특이성을 갖는 항체를 동정한다. 재조합 항체 라이브러리를 선별하는 방법은 당업계에 공지되어 있고, 예컨대 문Ladner 등의 미국 특허 제5,223,409호, Kang 등의 PCT 공개번호 WO 92/18619, Dower 등의 PCT 공개번호 WO 91/17271, Winter 등의 PCT 공개번호 WO 92/20791, Markland 등의 PCT 공개번호 WO 92/15679, Breitling 등의 PCT 공개번호 WO 93/01288, McCafferty 등의 PCT 공개번호 WO 92/01047, Garrard 등의 PCT 공개번호 WO 92/09690, Fuchs et al., *Bio/Technology* 9: 1370-1372 (1991), Hay et al., *Hum. Antibod. Hybridomas* 3: 81-85 (1992); Huse et al., *Science* 246: 1275-1281 (1989), McCafferty et al., *Nature* (1990) 348:552-554; Griffiths et al. *EMBO J.*, 12: 725-734 (1993); Hawkins et al., *J. Mol.Biol.*, 226: 889-896 (1992); Clackson et al., *Nature* 352: 624-628 (1991); Gram et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 3576-3580 (1992), Garrad et al., *Bio/Technology* 9: 1373-1377 (1991), Hoogenboom et al., *Nucl. Acids Res.*, 19: 4133-4137 (1991); 및 Barbas et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 7978-7982 (1991); 미국 특허원 공개 제2003/0186374; 및 PCT 공개번호 WO 97/29131에 기술된 방법을 포함하고, 상기 문헌의 내용은 본원에 참고로 원용된다.

[0931] 재조합 항체 라이브러리는 DLL4 또는 이의 부분으로 면역화된 대상자로부터 파생된 것일 수 있다. 대안으로서, 재조합 항체 라이브러리는 선천적 대상자, 즉 DLL4로 면역화되지 않은 대상자로부터 파생된 것일 수 있으며, 예로서 사람 DLL4로 면역화되지 않은 사람 대상자로부터 파생된 사람 항체 라이브러리를 들 수 있다. 본 발명의 항체의 선택은 재조합 항체 라이브러리를 사람 DLL4를 포함한 웹타이드로 선별하여 DLL4를 인지하는 항체를 선택함으로써 달성된다. 그러한 선별 및 선택을 실시하는 방법은 상기 단락에서 언급된 참조문헌에 기술된 바와 같이 본 분야에서 잘 알려져 있다. 특정한 K_{off} 속도 상수로 사람 DLL4로부터 분리되는 항체와 같은 DLL4에 대해 특정 결합 친화성을 갖는 본 발명의 항체를 선택하기 위해, 본 분야에 공지된 표면 플라스몬 공명 방법을 사용하여 목적하는 K_{off} 속도 상수를 갖는 항체를 선택할 수 있다. 특정한 IC_{50} 을 갖는 항체와 같은 hDLL4에 대해 특정 중화 활성을 갖는 본 발명의 항체를 선택하기 위해 DLL4 활성의 억제를 평가하는 것으로 본 분야에 알려져 있는 표준 방법을 사용할 수 있다.

[0932] 한 가지 관점으로서, 본 발명은 사람 DLL4와 결합하는 분리된 항체 또는 이의 항원-결합 부분에 관한 것이다. 바람직하게는, 항체는 중화 항체이다. 여러 가지 양태에서, 항체는 재조합 항체 또는 모노클로날 항체이다. 예를 들면, 본 발명의 항체는 또한 본 분야에 공지된 여러 가지 파지 디스플레이 방법에 의해 생성할 수 있다. 파지 디스플레이 방법에서, 기능성 항체 도메인은 이들을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 갖는 파지 임자의 표면상에 디스플레이된다. 이와 같은 파지는 레퍼토리 또는 조합 항체 라이브러리(예, 사람 또는 쥐)로부터 발현된 항원-결합 도메인을 디스플레이하는데 사용될 수 있다. 목적하는 항원과 결합하는 항원 결합 도메인을 발현하는 파지는 항원, 예를 들어 표지된 항원 또는 고체 표면 또는 비드상에 결합 또는 포획된 항원으로 선택 또는 동정할 수 있다. 이들 방법에서 사용된 파지는 전형적으로 파지 유전자 III 또는 유전자 VIII 단백질에 재조합적으로 융합된 Fab, Fv 또는 디설파이드 안정화된 Fv 항체 도메인과 함께 파지로부터 발현된 fd 및 M13 결합 도메인을 포함한 사상 파지이다. 본 발명의 항체를 제조하기 위해 사용할 수 있는 파지 디스플레이 방법의 예는 Brinkmann et al., *J. Immunol. Methods*, 182: 41-50 (1995); Ames et al., *J. Immunol. Methods*, 184: 177-186 (1995); Kettleborough et al., *Eur. J. Immunol.* 24: 952-958 (1994); Persic et al., *Gene*, 187: 9-18 (1997); Burton et al., *Advances in Immunology*, 57: 191-280 (1994); PCT 공개번호 WO 92/01047; PCT 공개번호 WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; 및 미국특허 제5,698,426호; 제5,223,409호; 제5,403,484호; 제5,580,717호; 제5,427,908호; 제5,750,753호; 제5,821,047호; 제5,571,698호; 제5,427,908호; 제5,516,637호; 제5,780,225호; 제5,658,727호; 제5,733,743호 및 제5,969,108호에 기재된 것들을 포함하고; 이들 문헌의 각 전체 내용은 본원에 참고로 원용된다.

[0933] 상기 문헌에 기재된 바와 같이, 파지 선택 후, 파지로부터 항체 암호화 영역을 분리하고 이들 영역은 사람 항체 또는 임의의 다른 목적하는 항원 결합 단편을 포함하는 전체 항체를 생성하는데 사용할 수 있으며, 아래에 상세히 예시된 바와 같이 포유동물 세포, 곤충 세포, 식물 세포, 효모 및 세균을 포함하는 임의의 바람직한 숙주에

서 발현될 수 있다. 예를 들어, Fab, Fab' 및 F(ab')2 단편을 재조합으로 생성하는 기술은 또한 PCT 공개번호 WO 92/22324; Mullinax et al., *BioTechniques* 12(6):864-869 (1992); Sawai et al., *Am. J. Reprod. Immunol.*, 34: 26-34 (1995); 및 Better et al., *Science*, 240: 1041-1043 (1988)에 기재된 방법과 같이 당업계에 공지된 방법을 사용하여 이용할 수 있다(이들 문헌의 전체 내용은 본원에 참고로 원용된다). 단일쇄 Fv 및 항체를 생성하는데 사용할 수 있는 기술의 예는 미국특허 제4,946,778호 및 제5,258,498호 ; Huston et al., *Methods in Enzymology*, 203: 46-88 (1991); Shu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 7995-7999 (1993); 및 Skerra et al., *Science*, 240: 1038-1040 (1988)에 기재된 방법을 포함한다.

[0934] 과거 디스플레이에 의한 재조합 항체 라이브러리의 선별에 대한 대안으로서, 대규모 조합 라이브러리에 대해 당업계에 공지된 다른 방법을 본 발명의 항체를 동정하는데 응용할 수 있다. 대안으로서의 발현 시스템중 한 가지 유형은 PCT 공개번호 WO 98/31700 (Szostak and Roberts) 및 Roberts and Szostak *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 12297-12302 (1997)에 기재된 바와 같이 재조합 항체 라이브러리가 RNA-단백질 융합체로서 발현되는 것이다. 이 시스템에서, 3' 말단에 푸로마이신(펩티딜 수용체 항생제)을 갖는 합성 mRNA의 시험관내 해독에 의해, mRNA와 이에 의해 암호화된 펩타이드 또는 단백질 사이에서 공유 융합체가 형성된다. 따라서, 암호화된 펩타이드 또는 단백질 (예, 항체 또는 이의 부분)의 특성, 예를 들면 이원 특이성 항원에 항체 또는 이의 부분의 결합을 기초로 하여 mRNA의 복합물 (예, 조합 라이브러리)로부터 특정 mRNA가 증식될 수 있다. 그러한 라이브러리의 선별로부터 회수된 항체 또는 이의 부분을 암호화하는 핵산 서열은 상기된 바와 같은(예를 들어, 포유동물 숙주 세포에서) 재조합 수단에 의해 발현될 수 있고, 게다가, 처음 선택된 서열내로 돌연변이가 도입된 mRNA-펩타이드 융합체를 추가로 여러 회에 걸쳐 선별함으로써 또는 재조합 항체의 친화성 성숙을 위한 상기된 기타 방법을 수행함으로써 친화성 성숙이 추가될 수 있다. 이와 같은 방법의 바람직한 예는 아래 실시예에서 사용된 프로용합 디스플레이 기술이다.

[0935] 또 다른 방법으로서, 본 발명의 항체는 또한 당업계에 공지된 효모 디스플레이 방법을 사용하여 제조할 수 있다. 효모 디스플레이 방법의 경우, 유전학적 방법을 사용하여 항체 도메인을 효모 세포벽에 부착시키고 이를 효모의 표면상에 디스플레이한다. 특히, 그와 같은 효모를 사용하여 레퍼토리 또는 조합 항체 라이브러리 (예, 사람 또는 쥐)로부터 발현된 항원 결합 도메인을 디스플레이 할 수 있다. 본 발명의 항체를 제조하는데 사용될 수 있는 효모 디스플레이 방법의 예는 Wittrup 등의 미국특허 제6,699,658호에 기재된 방법을 포함한다. 이 문헌의 내용은 본원에 참고로 원용된다.

B. 재조합 DLL4 항체의 제조

[0936] 본 발명의 항체는 당업계에 공지된 많은 기술에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 숙주 세포로부터 발현시키는 것인데, 이 경우, 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 발현 벡터를 표준 기술에 의해 숙주 세포로 형질감염시킨다. "형질감염"이란 용어의 다양한 형태는 원핵생물 또는 진핵생물 숙주 세포에 외인성 DNA를 도입시키는데 일반적으로 사용되는 다양한 기술, 예컨대 전기천공, 인산칼슘 침전, DEAE-덱스트란 형질감염 등을 포함한다. 본 발명의 항체를 원핵생물 숙주 세포 또는 진핵생물 숙주 세포에서 발현시킬 수 있지만, 진핵생물 세포에서 항체를 발현시키는 것이 바람직하며, 가장 바람직하게는 포유동물 숙주 세포에서 발현시키는 것이다. 그 이유는 이러한 진핵생물 세포(특히 포유동물 세포)가 원핵생물 세포보다 적절히 풀딩되어 면역학적으로 활성적인 항체를 보다 더 조합하고 분비하기 때문이다.

[0937] 본 발명의 재조합 항체를 발현하기에 바람직한 포유동물 숙주 세포에는 중국 햄스터 난소(CHO 세포)(Kaufman and Sharp, *J. Mol. Biol.*, 159: 601-621 (1982)에 기술된 바와 같은 DHFR 선택성 마커와 함께 사용된, Urlaub and Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216-4220 (1980)에 기술된 dhfr-CHO 세포를 포함), NS0 골수종 세포, COS 세포 및 SP2 세포가 포함된다. 항체 유전자를 암호화하는 재조합 발현 벡터가 포유동물 숙주 세포에 도입되면, 항체는 숙주 세포에서 항체가 발현되기에 또는 바람직하게는 숙주 세포가 증식되는 배양 배지로 항체가 분비되기에 충분한 시간 동안 숙주 세포를 배양하여 생성한다. 항체는 표준 단백질 정제법을 사용하여 배양 배지로부터 회수할 수 있다.

[0938] 또한, 숙주 세포를 사용하여 Fab 단편 또는 scFv 분자와 같은 기능성 항체 단편을 제조할 수 있다. 상기 제조 과정에서의 변형들은 본 발명의 범위에 속한다는 것은 이해되어야 한다. 예를 들면, 본 발명에 따른 항체의 경쇄 및/또는 중쇄의 기능성 단편을 암호화하는 DNA로 숙주 세포를 형질감염시키는 것이 바람직할 수 있다. 또한, 재조합 DNA 기술을 사용하여 목적하는 항원과 결합하는데 필요하지 않은 경쇄와 중쇄중 어느 하나 또는 둘 다를 암호화하는 DNA의 일부 또는 전부를 제거할 수 있다. 이와 같은 절삭된 DNA 분자로부터 발현된 분자들 또한 본 발명의 항체에 포함된다. 추가로, 화학적 가교 표준 방법에 의해 본 발명의 항체를 제2 항체에 1개의

중쇄와 1개의 경쇄가 본 발명의 항체이며 다른 중쇄와 경쇄는 목적하는 항원이 아닌 다른 항원에 대해 특이적인 이중기능성 항체를 제조할 수 있다.

[0940] 본 발명의 항체 또는 이의 항원-결합 부분의 재조합 발현을 위해 바람직한 시스템으로서, 항체 중쇄 및 항체 경쇄 둘 다를 암호화하는 재조합 발현 벡터를 인산칼슘-매개 형질감염에 의해 dhfr-CHO 세포내로 도입한다. 재조합 발현 벡터내에서, 항체 중쇄 및 경쇄 유전자는 각각 CMV 인핸서/AdMLP 프로모터 조절 요소에 작동적으로 결합되어 이들 유전자의 높은 전사 수준을 유도한다. 또한, 재조합 발현 벡터는 DHFR 유전자를 보유하며, 이 유전자는 메토트렉세이트 선택/증폭을 통해 상기 벡터로 형질감염된 CHO 세포를 선택할 수 있게 해준다. 선택된 형질전환 숙주 세포는 항체 중쇄 및 경쇄를 발현할 수 있도록 배양하고, 이러한 배양 배지로부터 완전한 항체를 회수한다. 재조합 발현 벡터 제조, 숙주 세포 형질감염, 형질전환체 선택, 숙주 세포 배양 및 배양 배지로부터 항체의 회수에는 표준 분자 생물학 기술을 사용한다. 또한, 본 발명은 본 발명의 숙주 세포를 본 발명의 재조합 항체가 합성될 때까지 적당한 배양 배지에서 배양함으로써 본 발명의 재조합 항체를 합성하는 방법을 제공한다. 이 방법은 추가로 배양 배지로부터 재조합 항체를 분리하는 단계를 포함할 수 있다.

1. 항-DLL4 항체

[0942] 표 4는 클론 E9 및 A10으로부터 사람 DLL4와 결합하는 분리된 완전한 사람 항체의 VH 및 VL 영역의 아미노산 서열을 보여준다 (아래 실시예 참조). E9 및 A10 항체의 분리된 항-DLL4 항체 CDR 서열은 본 발명에 따라 분리되고 E9 및 이의 친화성 성숙 클론으로부터 유래된 CDR 서열 또는 A10 및 이의 친화성 성숙 클론으로부터 유래된 CDR 서열을 갖는 DLL4 결합 단백질의 새로운 2 가지 계열을 설정한다. E9 모노클로날 항체 및 이의 친화성 성숙 유도체의 가변 영역 및 CDR이 표 4, 8, 14, 18 및 19에 수록되어 있다. A10 모노클로날 항체 및 이의 친화성 성숙 유도체의 가변 영역 및 CDR은 표 4, 9 및 10에 수록되어 있다. 사람 DLL4와 관련하여 바람직한 DLL4 결합 및/또는 중화 활성을 갖는 본 발명의 단백질과 결합하는 CDR을 생성하고 선택하기 위해, 이로써 한정되는 것은 아니지만 본원에 특정적으로 기술된 것을 포함하여, 본 발명의 결합 단백질을 제조하고 이들 결합 단백질의 DLL4 결합 및/또는 중화 특징을 평가하기 위한 본 분야의 공지된 표준 방법을 사용할 수 있다.

[0943] 본원에 기술된 항-DLL4 항체 E9 클론의 중쇄 가변 영역 (VH) 및 경쇄 가변 영역 (VL)의 CDR의 아미노산 서열의 배열을 기초로, 본 발명은 사람 DLL4와 결합할 수 있고 다음의 CDR들로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 CDR을 포함하는 항원 결합 도메인을 포함한 DLL4 결합 단백질을 제공한다:

[0944] CDR-H1: $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7$ (서열번호 99) (여기서,

[0945] X_1 은 S 또는 N이고;

[0946] X_2 는 S, G 또는 N이며;

[0947] X_3 은 S, N, T, G 또는 R이고;

[0948] X_4 는 Y이며;

[0949] X_5 는 Y 또는 H이고;

[0950] X_6 은 W이며;

[0951] X_7 은 G이다);

[0952] CDR-H2: $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}-X_{13}-X_{14}-X_{15}-X_{16}$ (서열번호 100) (여기서,

[0953] X_1 은 D이고;

[0954] X_2 는 I이며;

[0955] X_3 은 Y, N 또는 S이고;

[0956] X_4 는 Y이며;

[0957] X_5 는 T, N, A, I, S 또는 R이고;

[0958] X_6 은 G°]며;

[0959] X_7 은 S, N, T 또는 G 이고;

[0960] X_8 은 T°]며;

[0961] X_9 는 Y°]고;

[0962] X_{10} 은 Y°]며;

[0963] X_{11} 은 N°]고;

[0964] X_{12} 는 P°]며;

[0965] X_{13} 은 S°]고;

[0966] X_{14} 는 L°]며;

[0967] X_{15} 는 K°]고;

[0968] X_{16} 은 S, N, D 또는 G 이다);

[0969] CDR-H3: $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}$ (서열번호 101) (여기서,

[0970] X_1 은 E, Y, F, Q, W, L 또는 A 이고;

[0971] X_2 는 D, A, S, G, V, E 또는 N 이며;

[0972] X_3 은 V, M, L, P 또는 A 고;

[0973] X_4 는 $I, A, P, R, S, K, Q, V, G, M$ 또는 E 이며;

[0974] X_5 는 L, Y, F 또는 M 이고;

[0975] X_6 은 R, G, S, Q 또는 A 이며;

[0976] X_7 은 G°]고;

[0977] X_8 은 G, A 또는 S 이며;

[0978] X_9 는 S, A, L, V, R 또는 G 이고;

[0979] X_{10} 은 D°]며;

[0980] X_{11} 은 $Y, D, S, N, H, E, R, L, P, C, I, M, T, Q$ 또는 K 이다);

[0981] CDR-L1: $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}$ (서열번호 102) (여기서,

[0982] X_1 은 S°]고;

[0983] X_2 는 G°]며;

[0984] X_3 은 Q, E 또는 D°]고;

[0985] X_4 는 R, S, G, M, K, L 또는 T 이며;

[0986] X_5 는 L°]고;

[0987] X_6 은 G°]며;

[0988] X_7 은 D 또는 E이고;

[0989] X_8 은 K이며;

[0990] X_9 는 Y이고;

[0991] X_{10} 은 A 또는 V이며;

[0992] X_{11} 은 S이다);

[0993] CDR-L2: $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7$ (서열번호 103) (여기서,

[0994] X_1 은 E 또는 Q이고;

[0995] X_2 는 D이며;

[0996] X_3 은 S, L, T, A, E 또는 F이고;

[0997] X_4 는 K, T, E, N, Q, S 또는 M이며;

[0998] X_5 는 R이고;

[0999] X_6 은 P이며;

[1000] X_7 은 S이다); 및

[1001] CDR-L3: $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9$ (서열번호 104) (여기서,

[1002] X_1 은 Q이고;

[1003] X_2 는 A이며;

[1004] X_3 은 W이고;

[1005] X_4 는 D이며;

[1006] X_5 는 R, S, M, E, N, G 또는 K이고;

[1007] X_6 은 D 또는 E이며;

[1008] X_7 은 T, V, A, S 또는 M이고;

[1009] X_8 은 G, A 또는 C이며;

[1010] X_9 는 V이다).

[1011] 바람직하게는, 상기된 하나 이상의 CDR을 포함한 DLL4 결합 단백질은 사람 ("hu", "h")와 결합하며, 또한 마우스 ("쥐", "mu") DLL4, 사이노몰거스 원숭이 ("사이노몰거스", "cyno") DLL4 및 랫 DLL4로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 DLL4 단백질과 결합한다.

[1012] 본원에 기술된 항-DLL4 항체 A10 클론의 중쇄 가변 영역 (VH) 및 경쇄 가변 영역 (VL)의 CDR의 아미노산 서열의 배열을 기초로, 본 발명은 사람 DLL4와 결합할 수 있고 다음의 CDR들로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 CDR을 포함하는 항원 결합 도메인을 포함한 DLL4 결합 단백질을 제공한다:

[1013] CDR-H1: $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5$ (서열번호 105) (여기서,

[1014] X_1 은 S, N 또는 D이고;

[1015] X_2 는 H 또는 Y이며;

[1016] X_3 은 W^\diamond 이고;

[1017] X_4 는 M^\diamond 이며;

[1018] X_5 는 S 또는 H^\diamond 이다);

[1019] CDR-H2: $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}-X_{13}-X_{14}-X_{15}-X_{16}-X_{17}$ (서열번호 106) (여기서,

[1020] X_1 은 I , D , M 또는 T^\diamond 이고;

[1021] X_2 는 I^\diamond 이며;

[1022] X_3 은 S^\diamond 이고;

[1023] X_4 는 Y , N , S , Q , V , T , H 또는 D^\diamond 이며;

[1024] X_5 는 D^\diamond 이고;

[1025] X_6 은 G^\diamond 이며;

[1026] X_7 은 S , R , I , T , G , K , H 또는 N^\diamond 이고;

[1027] X_8 은 N , Y , S , I 또는 T^\diamond 이며;

[1028] X_9 는 K , M , N , Q , E , T , R , S , A 또는 L^\diamond 이고;

[1029] X_{10} 은 Y , D 또는 E^\diamond 이며;

[1030] X_{11} 은 S 또는 Y^\diamond 이고;

[1031] X_{12} 는 A^\diamond 이고;

[1032] X_{13} 은 D^\diamond 이며;

[1033] X_{14} 는 S^\diamond 이고;

[1034] X_{15} 는 V^\diamond 이며;

[1035] X_{16} 은 K^\diamond 이고;

[1036] X_{17} 은 G^\diamond 이다);

[1037] CDR-H3: $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}$ (서열번호 107) (여기서,

[1038] X_1 은 A^\diamond 이고;

[1039] X_2 는 G , A 또는 R^\diamond 이며;

[1040] X_3 은 G^\diamond 이고;

[1041] X_4 는 G , S 또는 A^\diamond 이며;

[1042] X_5 는 N^\diamond 이고;

[1043] X_6 은 V 또는 M^\diamond 이며;

[1044] X_7 은 G^\diamond 이고;

[1045] X_8 은 F , L , Y 또는 M^\diamond 이며;

[1046] X_9 는 D \circ 고;

[1047] X_{10} 은 I, S 또는 L \circ 다);

[1048] CDR-L1: $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}$ (서열번호 108) (여기서,

[1049] X_1 은 S \circ 고;

[1050] X_2 는 A 또는 G \circ 며;

[1051] X_3 은 D \circ 고;

[1052] X_4 는 K, N, L, Q, M, E, S, T, G 또는 D \circ 며;

[1053] X_5 는 L \circ 고;

[1054] X_6 은 G \circ 며;

[1055] X_7 은 T, S, N, A, G 또는 E \circ 고;

[1056] X_8 은 K, Q, N 또는 R \circ 며;

[1057] X_9 는 Y \circ 고;

[1058] X_{10} 은 V 또는 I \circ 며;

[1059] X_{11} 은 S \circ 다);

[1060] CDR-L2: $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7$ (서열번호 109) (여기서,

[1061] X_1 은 Q \circ 고;

[1062] X_2 는 D \circ 며;

[1063] X_3 은 A, G, W, S 또는 D \circ 고;

[1064] X_4 는 K, M, Q, N, L, T, I 또는 E \circ 며;

[1065] X_5 는 R \circ 고;

[1066] X_6 은 P \circ 며;

[1067] X_7 은 S \circ 다); 및

[1068] CDR-L3: $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9$ (서열번호 110) (여기서,

[1069] X_1 은 Q \circ 고;

[1070] X_2 는 S 또는 A \circ 며;

[1071] X_3 은 W \circ 고;

[1072] X_4 는 D \circ 며;

[1073] X_5 는 R, S, Q, P, A, V, W 또는 M \circ 고;

[1074] X_6 은 S, G, I, N, R 또는 T \circ 며;

[1075] X_7 은 D 또는 G \circ 고;

[1076] X_8 은 V, A, P 또는 E이며;

[1077] X_9 는 V이다).

[1078] 바람직하게는, 상기된 하나 이상의 CDR을 포함한 DLL4 결합 단백질은 사람 ("hu") DLL4와 결합하고 또한 사이노몰거스 원숭이 ("사이노몰거스", "cyno") DLL4와 결합한다.

[1079] 2. 항-DLL4 키메라 항체

[1080] 키메라 항체는 항체의 상이한 부분이 다른 동물 종으로부터 유래된 분자이며, 예를 들면 쥐 모노클로날 항체로부터 유래된 가변 영역과 사람 면역글로불린 불변 영역을 갖는 항체이다 (Morrison, *Science*, 229: 1202-1207 (1985); Oi et al., *BioTechniques*, 4: 214 (1986); Gillies et al., *J. Immunol. Methods*, 125: 191-202 (1989); 미국특허 제5,807,715호; 제4,816,567호; 및 제4,816,397호). 이들 문헌의 전체 내용은 본원에 참고로 원용된다. 추가로, 적절한 항원 특이성의 마우스 항체 분자의 유전자를 적절한 생물학적 활성의 사람 항체 분자의 유전자와 함께 스플라이싱함으로써 "키메라 항체"를 제조하는 것으로 개발된 기술들이 사용될 수 있다 (Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851-6855 (1984); Neuberger et al., *Nature*, 312: 604-608 (1984); Takeda et al., *Nature*, 314: 452-454 (1985)). 이들 문헌의 전체 내용은 본원에 참고로 원용된다.

[1081] 3. 항-DLL4 CDR 이식 항체

[1082] 본 발명의 분리된 항-DLL4 항체 CDR 서열을 사용하여 고유 항체의 특성이 조절된 CDR-이식 항체를 제조할 수 있다. 언급된 특성은 이로써 한정되는 것은 아니지만 결합 역학, 친화성, 생물학적 활성, 종 교차반응성, 분자 교차반응성, 에피토프, 생리화학적 특성, 약동학 특성, 약력학 특성 또는 약물학 특성을 포함한다. CDR-이식 항체는 VH 및/또는 VL의 CDR 영역 하나 이상이 고유의 항-DLL4 항체의 CDR 서열로 치환된 사람 항체 또는 비인간 영장류 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다. 사람 또는 비인간 영장류 항체의 골격 서열은 CDR 이식을 위한 주형으로 역할을 할 수 있다. 그러나, 그와 같은 골격상에 직접적인 쇄 치환은 흔히 항원에 대한 결합 친화성에서 일부 손실을 초래한다. 사람 또는 다른 종의 항체가 고유의 사람 항체에 더욱 더 상동성을 나타낼 수록, 새로운 사람 골격 또는 비인간 영장류 골격과 CDR의 결합이 친화성 또는 다른 특성의 감소를 유도할 수 있는 CDR의 뒤틀림을 유발할 가능성은 낮아진다. 따라서, CDR을 제외하고 사람 가변 영역 골격을 대체하는 것으로 선택된 가변 골격은 사람 항체 가변 영역 골격과 30% 이상의 서열 동일성을 갖는 것이 바람직하다. 더 바람직하게는, CDR을 제외하고 사람 가변 영역 골격을 대체하는 것으로 선택된 가변 골격이 사람 항체 가변 영역 골격과 40% 이상의 서열 동일성을 갖는 것이다. 보다 더 바람직하게는, CDR을 제외하고 사람 가변 영역 골격을 대체하는 것으로 선택된 가변 골격이 사람 항체 가변 영역 골격과 50% 이상의 서열 동일성을 갖는 것이다. 더 더욱 바람직하게는, CDR을 제외하고 사람 가변 영역 골격을 대체하는 것으로 선택된 가변 골격이 사람 항체 가변 영역 골격과 60% 이상의 서열 동일성을 갖는 것이다. 이 보다 더 바람직하게는, CDR을 제외하고 사람 가변 영역 골격을 대체하는 것으로 선택된 가변 골격이 사람 항체 가변 영역 골격과 70% 이상의 서열 동일성을 갖는 것이다. 훨씬 더 바람직하게는, CDR을 제외하고 사람 가변 영역 골격을 대체하는 것으로 선택된 가변 골격이 사람 항체 가변 영역 골격과 75% 이상의 서열 동일성을 갖는 것이다. 가장 바람직하게는, CDR을 제외하고 사람 가변 영역 골격을 대체하는 것으로 선택된 가변 골격이 사람 항체 가변 영역 골격과 80% 이상의 서열 동일성을 갖는 것이다. 고유의 사람 항-DLL4 항체의 CDR을 이식하기 위해 고도로 상동성인 사람 또는 비인간 영장류 골격을 사용하더라도, 생성된 이식 항체는 항원에 대한 결합 친화성이 어느 정도 손실될 수 있다. 이 경우에, 친화성을 유지하기 위해 고유 항체의 핵심 골격 잔기 치환 하나 이상을 새로 이식된 항체의 상응하는 위치에 포함시키는 것이 필요하다. 이와 같은 핵심 잔기는 아래의 잔기로 이루어진 그룹 중에서 선택될 수 있다:

[1083] CDR에 인접한 잔기;

[1084] 당화 부위 잔기;

[1085] 희귀 잔기;

[1086] 사람 DLL4와 상호작용할 수 있는 잔기;

[1087] 정규 잔기;

[1088] 중쇄 가변 영역과 경쇄 가변 영역사이의 접점 잔기;

[1089] 베니어 구역내의 잔기; 및

[1090] 초티아-규정의 가변 중쇄 CDR1과 캐벳-규정의 제1 중쇄 골격 영역간에 중첩하는 영역내의 잔기.

[1091] 4. 항-DLL4 인간화 항체

[1092] 본 발명의 조성물은 인간화 항체의 제조 요건을 배제하는 한편, 본 발명의 조성물을 사용하여 인간화 DLL4 항체를 제조할 수 있다. 인간화 항체는 비인간 종 기원의 하나 이상의 상보성 결정 영역(CDR) 및 사람 면역글로불린 분자 기원의 골격 영역을 갖는 목적하는 항원과 결합하는 비인간 종 항체 기원의 항체 분자이다. 공지된 사람 Ig 서열은 월드 와이드 웹(www) 기반의 웹주소에 기재되어 있으며, 웹주소의 예는 다음과 같다: ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi; atcc.org/phage/hdb.html; sciquest.com/; abcam.com/; antibodyresource.com/onlinecomp.html; public.iastate.edu/.about.pedro/research_tools.html; mgen.uniheidelberg.de/SD/IT/IT.html; whfreeman.com/immunology-/CH05/kuby05.htm; library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html; hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/; path.cam.ac.uk/.about.mrc7m/ikeimages.html; antibodyresource.com/; mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html; immunologylink.com/; pathbox.wustl.edu/.about.hcenter/index.html; biotech.ufl.edu/.about.hcl/; pebio.com/pa/340913/340913.html; nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/; m.ehimeu.ac.jp/.about.yasuhiro-/Elisa.html; biodesign.com/table.asp; icnet.uk/axp/facs/davies/links.html; biotech.ufl.edu/.about.fccl/protocol.html; isac-net.org/sites_geo.html; aximt1.imt.unimarburg.de/.about.rek/AEP-Start.html; baserv.uci.kun.nl/.about.jraats/links1.html; recab.unihd.de/immuno.bme.nwu.edu/; mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html; www.ibt.unam.mx/vir/V_mice.html; imgt.cnusc.fr:8104/; biochem.ucl.ac.uk/.about.martin/abs/index.html; antibody.bath.ac.uk/; abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html; unizh.ch/.about.honegger/AHOsem_inar/Slide01.html; cryst.bbk.ac.uk/.about.ubcg07s/; nimr.mrc.ac.uk/CC/ccaewg/ccaewg.htm; path.cam.ac.uk/.about.mrc7/humanisation/TAHHP.html; ibt.unam.mx/vir/structure/stat_aim.html; biosci.missouri.edu/smithgp/index.html; cryst.bioc.cam.ac.uk/.abo ut.fmolina/Web-pages/Pept/spottech.html; jerini.de/frproducts.htm; patents.ibm.com/ibm.html.Kabat et al. 또한, Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Dept. Health (1983)에 기재되어 있다. 위의 각 내용은 본원에 참고로 원용된다. 이와 같은 입수된 서열을 사용하여 당업계에 공지된 바와 같이 면역원성을 감소시키거나 결합, 친화성, 결합율, 해리율, 결합활성, 특이성, 반감기 또는 임의의 기타 적합한 특징을 감소, 증진 또는 변형시킬 수 있다.

[1093] 사람 골격 영역내의 골격 잔기는 CDR 공여자 항체 기원의 상응하는 잔기로 대체하여 항원 결합을 변경, 바람직하게는 향상시킬 수 있다. 이들 골격 대체는 분 분야에 잘 알려진 방법에 의해 동정되며, 예를 들어, CDR과 골격 잔기의 상호작용에 대해 모델링하여 항원 결합에 중요한 골격 잔기를 동정하고 서열을 비교하여 특정 위치에서의 특이한 골격 잔기를 동정함으로써 탈성된다 (Queen 등의 미국특허 제5,585,089호; Riechmann et al., *Nature*, 332:323-327 (1988)). 이들 문헌의 전체 내용은 본원에 참고로 원용된다. 입체적 면역글로불린 모델이 흔히 이용되고 있으며 당업자에게 친숙하다. 선택된 후보 면역글로불린 서열의 가능한 3차원 형태 구조를 묘사하고 보여주는 컴퓨터 프로그램이 이용되고 있다. 이들 디스플레이를 검사함으로써 후보 면역글로불린 서열의 기능에 연루된 잔기의 가능한 역할을 분석할 수 있다. 즉, 항원에 결합하는 후보 면역글로불린의 능력에 영향을 주는 잔기의 분석이 가능하다. 이러한 방식으로, 공통 서열 및 유입 서열로부터 FR 잔기를 선택하고 조합하여 표적 항원에 대해 증가된 친화성과 같은 목적하는 항체 특성을 달성할 수 있다. 일반적으로, CDR 잔기는 직접적으로 및 가장 실질적으로 항원 결합에 영향을 주는데 연루되어 있다. 항체는 본 분야에 공지된 여러 기술을 이용하여 인간화할 수 있다. 공지 문헌의 예로는 이로써 한정되는 것은 아니지만 Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Verhoeyen et al., *Science*, 239: 1534-1536 (1988); Sims et al., *J. Immunol.* 151: 2296-2308 (1993); Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987); Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 4285-4289 (1992); Presta et al., *J. Immunol.* 151: 2623-2632 (1993); Padlan, E.A., *Molecular Immunology*, 28(4/5): 489-498 (1991); Studnicka et al., *Protein Engineering*, 7(6): 805-814 (1994); Roguska. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 969-973 (1994); PCT 공개번호 WO 91/09967, WO 99/06834 (PCT/US98/16280), WO 97/20032 (PCT/US96/18978), WO 92/11272 (PCT/US91/09630), WO 92/03461 (PCT/US91/05939), WO 94/18219 (PCT/US94/01234), WO 92/01047 (PCT/GB91/01134), WO 93/06213 (PCT/GB92/01755), WO 90/14443, WO 90/14424 및 WO 90/14430; 유럽특허 공개번호 EP 0 592 106, EP 0 519

596, 및 EP 0 239 400; 미국특허 제5,565,332호, 제5,723,323호, 제5,976,862호, 제5,824,514호, 제5,817,483호, 제5,814,476호, 제5,763,192호, 제5,723,323호, 제5,766,886호, 제5,714,352호, 제6,204,023호, 제6,180,370호, 제5,693,762호, 제5,530,101호, 제5,585,089호, 제5,225,539호 및 제4,816,567호를 포함하고, 각각의 문헌의 전체 내용은 본원에 참조로서 원용된다.

[1094]

C. 항체 및 항체-생성 세포주의 제조

[1095]

바람직하게는, 본 발명의 항-DLL4 항체는 예를 들어 본 분야에 알려진 몇 가지 시험관내 및 생체내 검정중 어느 한 가지에 의해 평가된 것으로 종양 혈관신생 활성을 감소 또는 중화시키는 고도의 능력을 나타낸다. DLL4 활성의 중화는 본 분야에 알려진 몇 가지 시험관내 및 생체내 검정을 통해 평가할 수 있다. DLL4 활성의 중화를 평가하는 변수의 예로는 이로써 한정되는 것은 아니지만 노치 수용체와의 DLL4 상호작용 및/또는 노치-신호전달 경로를 적어도 약 10^{-6} M, 10^{-7} M 또는 10^{-8} M의 IC_{50} 값으로 억제하는 항생제가 포함된다.

[1096]

바람직하게는, 본 발명의 항-DLL4 항체는 또한 DLL4 활성을 감소 또는 중화시키는 고도의 능력을 나타낸다.

[1097]

바람직한 양태로서, 사람 DLL4와 결합하는 분리된 항체 또는 이의 항원-결합 부분은 표면 플라스몬 공명에 의해 결정된 것으로 약 $0.1s^{-1}$ 미만의 K_{off} 속도 상수로 사람 DLL4와 분리되거나 약 1×10^{-6} M 미만의 IC_{50} 으로 DLL4 및/또는 사람 DLL4 활성을 억제한다. 다르게는, 당해 항체 또는 이의 항원-결합 부분은 표면 플라스몬 공명에 의해 결정된 것으로 약 $1 \times 10^{-2}s^{-1}$ 미만의 K_{off} 속도 상수로 사람 DLL4와 분리되거나 약 1×10^{-7} M 미만의 IC_{50} 으로 DLL4 및/또는 사람 DLL4 활성을 억제할 수 있다. 또 다르게는, 당해 항체 또는 이의 항원-결합 부분은 표면 플라스몬 공명에 의해 결정된 것으로 약 $1 \times 10^{-3}s^{-1}$ 미만의 K_{off} 속도 상수로 사람 DLL4와 분리되거나 약 1×10^{-8} M 미만의 IC_{50} 으로 DLL4 및/또는 사람 DLL4 활성을 억제할 수 있다. 또 다르게는, 당해 항체 또는 이의 항원-결합 부분은 표면 플라스몬 공명에 의해 결정된 것으로 약 $1 \times 10^{-4}s^{-1}$ 미만의 K_{off} 속도 상수로 사람 DLL4와 분리되거나 약 1×10^{-9} M 미만의 IC_{50} 으로 DLL4 및/또는 사람 DLL4 활성을 억제할 수 있다. 또 다르게는, 당해 항체 또는 이의 항원-결합 부분은 표면 플라스몬 공명에 의해 결정된 것으로 약 $1 \times 10^{-5}s^{-1}$ 미만의 K_{off} 속도 상수로 사람 DLL4와 분리되거나 약 1×10^{-10} M 미만의 IC_{50} 으로 DLL4 및/또는 사람 DLL4 활성을 억제할 수 있다. 또 다르게는, 당해 항체 또는 이의 항원-결합 부분은 표면 플라스몬 공명에 의해 결정된 것으로 약 $1 \times 10^{-5}s^{-1}$ 미만의 K_{off} 속도 상수로 사람 DLL4와 분리되거나 약 1×10^{-11} M 미만의 IC_{50} 으로 DLL4 및/또는 사람 DLL4 활성을 억제할 수 있다.

[1098]

특정 양태로서, 본 발명의 항체는 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM 또는 IgD 불변 영역과 같은 중쇄 불변 영역을 포함한다. 바람직하게는, 중쇄 불변 영역은 IgG1 중쇄 불변 영역 또는 IgG4 중쇄 불변 영역이다. 게다가, 당해 항체는 경쇄 불변 영역인 카파 경쇄 불변 영역 또는 람다 경쇄 불변 영역을 포함할 수 있다. 바람직하게는 당해 항체는 카파 경쇄 불변 영역을 포함한다. 대안으로서, 당해 항체 부분은 예를 들어 Fab 단편 또는 단일쇄 Fv 단편일 수 있다.

[1099]

항체의 작동 기능을 변경시키기 위해 Fc 부분 내의 아미노산 잔기를 치환시키는 것은 당업계에 공지되어 있다 (Winter 등의 미국 특허 제5,648,260호 및 제5,624,821호). 항체의 Fc 부분은 몇 가지 중요한 작동 기능, 예컨대 사이토킨 유도, ADCC, 식세포작용, 보체 의존적 세포독성(CDC) 및 항체 및 항원-항체 복합체의 반감기/제거율 등을 조정한다. 일부 경우에서 이러한 작동 기능은 치료 항체에 필요하지만, 일부 다른 경우에는 치료 목적에 따라서 불필요하거나 심지어 유해할 수도 있다. 특정한 사람 IgG 아이소타입, 특히 IgG1 및 IgG3은 각각 FcγR 및 보체 Clq와의 결합을 통해 ADCC 및 CDC를 조정한다. 신생 Fc 수용체(FcRn)는 항체의 혈행 반감기를 결정하는 중요한 성분이다. 또 다른 양태로서, 적어도 하나의 아미노산 잔기가 항체의 불변 영역, 예컨대 항체의 Fc 영역에서 치환되어 항체의 작동 기능이 변경된다.

[1100]

한 가지 양태는 본 발명의 항체 또는 항체 일부가 유도체화되거나 다른 기능성 분자(예, 다른 웹타이드 또는 단백질)에 결합된 표지된 결합 단백질을 제공한다. 예를 들어, 본 발명의 표지된 결합 단백질은 본 발명의 항체 또는 항체 부분을 (화학적 결합, 유전자 융합, 비공유 결합 등에 의해) 하나 이상의 다른 분자, 예컨대 다른 항체(예, 이특이적 항체 또는 이중항체), 검출 물질, 세포독성 물질, 약제학적 물질 및/또는 다른 분자와 당해 항

체 또는 항체 부분의 결합을 조정할 수 있는 단백질 또는 웹타이드(예컨대, 스트렙타비딘 코어 영역 또는 폴리히스티딘 태그)에 기능적으로 연결시켜 유도할 수 있다.

[1101] 본 발명의 항체 또는 항체 부분을 유도체화할 수 있는 유용한 검출 물질은 형광 화합물을 포함한다. 형광 검출 물질의 예는 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 5-디메틸아민-1-나프탈렌설포닐 클로라이드, 피코에리트린 등을 포함한다. 또한, 항체는 검출 효소 (예, 알칼리성 포스파타제, 서양고추냉이 페옥시다제, 글루코스 옥시다제 등)에 의해 유도체화될 수 있다. 항체가 검출 효소로 유도체화되는 경우에는, 이 항체는 검출가능한 반응 산물을 생성하기 위해 효소를 사용하는 추가 시약을 첨가함으로써 검출된다. 예를 들어, 검출 물질 서양고추냉이 페옥시다제가 존재하는 경우, 과산화수소 및 디아미노벤지딘의 첨가는 검출가능한 발색 반응 생성물을 유도한다. 항체는 또한 비오틴으로 유도체화될 수 있고, 이 경우 아비딘 또는 스트렙타비딘 결합의 간접 측정을 통해 검출한다.

[1102] 본 발명의 양태는 결정화된 DLL4 결합 단백질을 제공한다. 바람직하게는, 본 발명은 본원에 기술된 완전한 항-DLL4 항체, 이의 단편, 항체 자체물 및 결합 단백질 접합체 (항체 접합체를 포함)를 포함하여 본원에 기술된 DLL4 결합 단백질의 결정 및 이와 같은 결정을 포함한 제형 및 조성물에 관한 것이다. 한 가지 양태로서, 결정화된 결합 단백질은 상응하는 용해성 결합 단백질보다 생체내 반감기가 더 크다. 다른 양태로서, 결합 단백질은 결정화 후 생물학적 활성을 유지한다. 본 발명의 결정화된 결합 단백질은 본 분야에 공지된 방법 및 PCT 공개번호 WO 02/72636에 기술된 방법에 따라 제조할 수 있다. 이 국제특허의 내용은 본원에 참고로 원용된다.

[1103] 본 발명의 다른 양태는 본 발명의 항체 또는 이의 항원-결합 부분이 하나 이상의 탄수화물 잔기를 포함하는 당화 결합 단백질을 제공한다. 초기의 생체내 단백질 생성은 해독 후 변형으로 알려진 후속 프로세싱을 거칠 수 있다. 특히, 당 (글라이코실) 잔기가 효소적으로 첨가될 수 있으며, 이 과정은 당화로 알려져 있다. 공유결합된 올리고사카라이드 측쇄를 갖는 단백질 생성물은 당화 단백질 또는 당단백질로 알려져 있다. 단백질 당화는 해당 단백질의 아미노산 서열뿐만 아니라 해당 단백질을 발현하는 숙주 세포에 의해 좌우된다. 다른 유기체는 다른 당화 효소 (예, 글라이코실트랜스퍼라제 및 글라이코시다제)를 생성할 수 있으며 이용하는 기질 (뉴클레오파우드 당)도 다르다. 이와 같은 요인으로 인해, 단백질 당화 패턴 및 글라이코실 잔기의 조성은 특정 단백질을 발현하는 숙주 시스템에 따라 다를 수 있다. 본 발명에 유용한 글라이코실 잔기는 이로써 한정되는 것은 아니지만 글루코즈, 갈락토즈, 만노즈, 퓨코즈, n-아세틸글루코사민 및 시알산을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 당화 결합 단백질은 당화 패턴이 사람인 글라이코실 잔기를 포함한다.

[1104] 상이한 단백질 당화는 상이한 단백질 특성을 초래할 수 있음은 본 분야의 전문가에게는 잘 알려져 있다. 예를 들면, 효모와 같은 미생물 숙주에서 생성되어 효모 내인성 경로를 통해 당화된 치료 단백질의 효능은 CHO 세포 주와 같은 포유동물 세포에서 발현된 동일한 단백질의 효능에 비해 감소될 수 있다. 또한, 이와 같은 당단백질은 사람에게 면역원성일 수 있으며 투여 후 생체내 반감기의 감소를 나타낼 수 있다. 사람 및 다른 동물에서 특정 수용체들은 특정 글라이코실 잔기를 인식하고 혈류로부터 해당 단백질의 급속한 청소를 촉진할 수 있다. 다른 부작용으로는 단백질의 폴딩, 용해성, 프로테아제에 대한 민감성, 운송 대사, 이송, 구획화, 분비, 다른 단백질 또는 인자에 의한 인지, 항원성 또는 알레르기유발성에서의 변화가 포함될 수 있다. 따라서, 의사는 당화의 특정 조성 및 패턴, 예를 들면 사람 세포에서 또는 대상 동물의 종-특이적 세포에서 생성된 것과 동일하거나 적어도 유사한 당화 조성 및 패턴을 갖는 치료 단백질을 선호할 수 있다.

[1105] 숙주 세포의 것과 다른 당화 단백질의 발현은 숙주 세포를 유전학적으로 변형시켜 이종 당화 효소를 발현시킴으로써 달성될 수 있다. 본 분야에 알려진 기술을 사용하여 의사는 사람 단백질 당화를 나타내는 항체 또는 이의 항원-결합 부분을 생성할 수 있다. 예를 들면, 효모 균주가 비천연 당화 효소를 발현하도록 유전학적으로 변형되어 결과적으로 이를 효모 균주에서 생성된 당화 단백질 (당단백질)이 동물 세포, 특히 사람 세포의 것과 동일한 단백질 당화를 나타낸다 (미국 특허원 공개번호 2004/0018590 및 2002/0137134).

[1106] 또한, 다양한 당화 효소를 발현하도록 유전자 조작되어 숙주 세포 라이브러리의 개개 세포가 변형된 당화 패턴을 갖는 목적하는 단백질을 생성하는 숙주 세포의 라이브러리를 사용하여 목적하는 단백질을 발현할 수 있음은 본 분야의 전문가는 인정할 수 있다. 이어서, 의사는 새로운 특정 당화 패턴을 갖는 목적하는 단백질을 선택하고 분리할 수 있다. 바람직하게는, 특정적으로 선택된 새로운 당화 패턴을 갖는 단백질은 향상된 또는 변화된 생물학적 특성을 나타낸다.

[1107] D. DLL4 결합 단백질의 용도

[1108] 항체 및 이의 부분을 포함하여 본원에 기술된 DLL4 결합 단백질은, 사람 DLL4 및 쥐 DLL4와의 결합 능력으로 인

해, 본 분야에 알려진 통상의 면역검정, 예컨대 효소 결합된 면역흡착 검정(ELISA), 방사선면역검정(RIA) 또는 조직 면역조직화학을 통해 시료(예, 혼합물, 용액 또는 혈액, 혈청 또는 혈장과 같은 생물학적 시료)중의 DLL4를 검출 또는 측정하는데 사용할 수 있다. 본 발명은 시료를 DLL4 결합 단백질과 접촉시키고 사람 DLL4 및/또는 쥐 DLL4에 결합된 DLL4 결합 단백질 또는 미결합된 결합 단백질을 검출하여 결과적으로 시료중의 사람 DLL4 및/또는 쥐 DLL4를 검출하는 것을 포함하여, 시료중의 사람 DLL4 및/또는 쥐 DLL4를 검출하는 방법을 제공한다. 본원에 기술된 DLL4 결합 단백질은 직간접적으로 검출 물질로 표지화하여 결합 또는 미결합된 DLL4 결합 단백질의 검출을 촉진할 수 있다. 적합한 검출 물질은 각종 효소, 보결분자단, 형광 물질, 발광 물질 및 방사선 물질을 포함한다. 적합한 효소의 예로는 양고추냉이 페옥시다제, 알칼리성 포스파타제, β -갈락토시다제 또는 아세틸콜린에스터라제가 포함되고; 적합한 보결분자분 복합체의 예로는 스트렙타비딘/비오틴 및 아비딘/비오틴이 포함되며; 적합한 형광 물질의 예로는 움벨리페론, 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 디클로로트리아지닐아민 플루오레세인, 단실 클로라이드 또는 피코에리트린이 포함되고; 발광 물질의 예로는 루미놀이 포함되며; 적합한 방사선 물질의 예로는 3 H, 14 C, 35 S, 90 Y, 99 Tc, 111 In, 125 I, 131 I, 177 Lu, 166 Ho 또는 153 Sm이 포함된다.

[1109] DLL4에 대해 검정될 수 있는 생물학적 시료는 뇨, 변, 혈액, 혈청, 혈장, 땀, 타액, 구강분비물 (구강, 혀 또는 목구멍 면봉채취물), 질면봉채취물, 직장면봉채취물, 피부면봉채취물, 피부 찰과물, 조직 생검 및 기타 본 분야에서 이용되는 방법에 의해 수득될 수 있는 모든 조직 시료를 포함한다.

[1110] 결합 단백질을 표지하는 것의 대안으로서, 검출 물질로 표지된 재조합 사람 (rh) DLL4 표준물과 본원에 기술된 미표지된 DLL4 결합 단백질을 이용한 경쟁 면역검정에 의해 생물학적 유액중에서 사람 DLL4를 검정할 수 있다. 이 검정에서, 생물학적 시료, 표지된 rhDLL4 표준물 및 DLL4 결합 단백질은 배합하고 미표지된 결합 단백질에 결합된 표지된 rhDLL4 표준물의 양을 결정한다. 생물학적 시료중의 사람 DLL4의 양은 DLL4 결합 단백질에 결합된 표지된 rhDLL4 표준물의 양과 반비례한다. 유사하게, 검출 물질로 표지된 rhDLL4 표준물과 본원에 기술된 미표지된 DLL4 결합 단백질을 이용한 경쟁 면역검정에 의해 생물학적 유액중에서 사람 DLL4를 검정할 수 있다.

[1111] 본 발명의 DLL4 결합 단백질은 바람직하게는 시험관내 및 생체내 모두에서 DLL4 활성, 특히 hDLL4 활성을 중화시킬 수 있다. 따라서, 이와 같은 본 발명의 결합 단백질은 예를 들어 DLL4를 함유한 세포 배양물에서, 사람체내에서 또는 본 발명의 결합 단백질이 교차 반응하는 DLL4를 발현하는 다른 포유동물 체내에서 DLL4 활성을 억제하는데 사용할 수 있다. 한 가지 양태로서, 본 발명은 DLL4를 본 발명의 DLL4 항체 또는 항체 부분과 접촉시켜 DLL4 활성을 억제하는 것을 포함하여, DLL4 활성을 억제하는 방법을 제공한다. 예를 들면, DLL4를 함유하는 또는 함유하는 것으로 의심되는 세포 배양물에서, 배양 배지에 본 발명의 항체 또는 항체 부분을 첨가하여 배양물중의 DLL4 활성을 억제한다.

[1112] 다른 양태로서, 본 발명은 대상자로부터, 유리하게는 DLL4 또는 DLL4 활성이 유해하게 작용하여 발생하는 질환 또는 질병을 앓고 있는 환자로부터 DLL4 활성을 감소시키는 방법을 제공한다. 본 발명은 DLL4 또는 DLL4 활성이 유해하게 작용하여 발생하는 질환 또는 질병을 앓고 있는 환자에게 본 발명의 DLL4 결합 단백질을 투여하여 환자로부터 DLL4 또는 DLL4 활성을 감소시키는 것을 포함하여, 상기 환자로부터 DLL4 또는 DLL4 활성을 감소시키는 방법을 제공한다. 바람직하게는, DLL4는 사람 DLL4이며, 대상자는 사람이다. 다르게는, 대상자는 본 발명의 DLL4 결합 단백질이 결합할 수 있는 DLL4를 발현하는 포유동물일 수 있다. 또한, 대상자는 DLL4가 예를 들어 DLL4의 투여에 의해 또는 DLL4 전이유전자의 발현에 의해 도입된 포유동물일 수 있다. 본 발명의 항체 또는 다른 DLL4 결합 단백질은 치료 목적으로 사람에게 투여될 수 있다. 게다가, 본 발명의 DLL4 결합 단백질은 이 결합 단백질이 결합할 수 있는 DLL4를 발현하는 비인간 포유동물에 수의 목적으로 또는 사람 질병의 동물 모델로서 투여될 수 있다. 후자의 목적과 관련하여, 그러한 동물 모델은 본 발명의 항체 및 다른 DLL4 결합 단백질의 치료 효능을 평가 (예, 투여 용량 및 투여 시간 횟수에 대한 시험)에 유용할 수 있다.

[1113] 본원에 사용된 용어 "DLL4 및/또는 노치 신호전달 활성이 유해하게 작용하여 발생하는 질환"은 암과 같은 질병 및 환자에게 DLL4 및/또는 노치 신호전달 활성의 존재가 그 환자가 앓고 있는 질환의 병태생리의 직접적인 원인이 되거나 원인이 되는 것으로 의심되는 또는 그 질환을 악화시키는 요인하거나 요인인 것으로 의심되는 질환을 포함한다. 따라서, DLL4 및/또는 노치 신호전달 활성이 유해하게 작용하여 발생하는 질환은 DLL4 및/또는 노치 신호전달 활성의 변화가 그 질환 (예, 종양 성장)의 증세 및/또는 발전을 경감시켜 줄 것으로 기대되는 질환이다. 이러한 질환은 예를 들어 그 질환을 앓고 있는 환자에게서 혈관생성이 증가되는 것 (예, 종양 성장 및 형성 과정에서 환자의 혈청, 혈장, 혈액 등에서 본 분야에 알려진 여러 가지 단백질의 농도가 증가되는 것)에 의해 증명될 수 있으며, 그와 같은 단백질의 농도 증가는 예를 들어 상기된 바와 같이 항-DLL4 항체를 사용하여

검출할 수 있다. 본 발명의 항체로 치료될 수 있는 질환의 예로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 본 발명에 따른 항체의 약제학적 조성물과 관련하여 아래의 단락에서 논의된 질환이 포함된다.

[1114] II. 약제학적 조성물

[1115] 또한, 본 발명은 DLL4 결합 단백질과 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한 약제학적 조성물을 제공한다. 본 발명의 DLL4 결합 단백질을 포함한 약제학적 조성물은 이들로 한정되는 것은 아니지만 질환의 진단, 검출 또는 모니터링, 질환 또는 이 질환의 하나 이상의 증세의 예방, 치료, 관리 또는 완화 및/또는 연구에 사용될 수 있다. 특정 양태로서, 조성물은 본 발명의 DLL4 결합 단백질을 하나 이상 포함한다. 다른 양태로서, 약제학적 조성물은 본 발명의 결합 단백질 하나 이상 및 DLL4 및/또는 DLL4 활성이 유해하게 작용하여 발생하는 질환의 치료제로서 본 발명의 결합 단백질이 아닌 다른 예방 물질 또는 치료 물질 하나 이상을 포함한다. 바람직하게는 그러한 예방 물질 또는 치료 물질은 암 또는 종양과 같은 질환 또는 이의 한 가지 이상의 증세를 예방, 치료, 관리 또는 완화시키는데 유용한 것 알려져 있거나 현재 사용되고 있는 것으로 알려져 있는 것들이다. 이들 양태에 따르면 조성물은 추가로 담체, 희석제 또는 부형제를 포함할 수 있다.

[1116] 본 발명의 결합 단백질은 환자에게 투여하기에 적합한 약제학적 조성물내로 혼입될 수 있다. 전형적으로는, 약제학적 조성물은 본 발명의 DLL4 결합 단백질 (또는 이의 DLL4 결합 부분) 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본원에 사용된 "약제학적으로 허용되는 담체"는 생리학적으로 혼화가능한 모든 용매, 분산 매질, 피복제, 항균제, 항진균제, 등장화제 및 흡수지연제 등을 포함한다. 약제학적으로 허용되는 담체의 예로는 물, 염수, 인산염 완충 염수, 텍스트로즈, 글리세롤, 에탄올 등중 하나 이상뿐만 아니라 이들의 배합물이 포함된다. 많은 경우에 있어서 조성물에 당, 폴리알코올 (예, 만니톨), 솔비톨 또는 염화나트륨과 같은 등장화제가 함유되는 것이 바람직하다. 추가로 약제학적으로 허용되는 담체는 본 발명의 항체 또는 이의 항체 부분의 수명 또는 효능을 증가시켜 주는 습윤제, 유화제, 보존제 또는 완충제와 같은 보조 물질을 소량 함유할 수 있다.

[1117] 본 발명의 하나 이상의 DLL4 결합 단백질 또는 본 발명의 하나 이상의 DLL4 결합 단백질의 배합물 및 질병 또는 이의 한 가지 이상의 증세를 예방, 관리, 치료 또는 완화시키는데 유용한, 예를 들어 종양 혈관생성의 감소에 유용한 예방 물질 또는 치료 물질을 투여하기 위한 다양한 전단 시스템들이 알려져 있고 사용될 수 있고, 리포좀내 캡슐화제, 미세캡슐제, 항체 또는 항체 단편을 발현할 수 있는 재조합 세포, 수용체 매개된 세포내이입[Wu and Wu, *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432 (1987)], 레트로바이러스 또는 기타 백터 등의 일부로서 핵산의 작제를 예로 들 수 있다. 본 발명의 예방제 또는 치료제를 투여하는 방법은 비경구 투여(예를 들어, 피부내, 근육내, 복강내, 정맥내 및 피하), 뇌척수 경막외 투여, 종양내 투여 및 점막 투여 (예를 들어, 비내 및 경구 경로)를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 또한, 흡입기 또는 분무기 및 분무제를 갖는 제형을 사용하는 폐 투여가 사용될 수 있다[미국특허 제6,019,968호, 제5,985,320호, 제5,985,309호, 제5,934,272호, 제5,874,064호, 제5,855,913호, 제5,290,540호 및 제4,880,078호; 및 PCT 공개번호 WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346 및 WO 99/66903]. 한 가지 양태에서, 본 발명의 DLL4 결합 단백질, 병용 치료제 또는 본 발명의 조성물은 Alkermes AIR®

폐 약물 전달 기술 (Alkermes, Inc., Cambridge, Massachusetts, US)을 사용하여 투여한다. 특정 양태에서, 본 발명의 예방 또는 치료제는 근육내, 정맥내, 종양내, 경구적으로, 비내, 폐 또는 피하로 투여된다. 예방제 또는 치료제는 임의의 편리한 경로, 예를 들어, 주입 또는 일시 주사, 상피 또는 점막 내충(예를 들어, 경구 점막, 직장 및 장내 점막등)을 통한 흡수에 의해 투여될 수 있고 기타 생물학적 활성제와 함께 투여될 수 있다. 투여는 전신성 또는 국소적일 수 있다.

[1118] 특정 양태에서, 치료를 필요로 하는 영역에 본 발명의 예방제 또는 치료제를 국소적으로 투여하는 것이 요구될 수 있다. 이것은 예를 들어, 비제한적으로, 국소 주입, 주사 또는 임플란트에 의해 달성될 수 있고 당해 임플란트는 막 및 매트릭스, 예를 들어, 시알라스틱 막, 중합체, 섬유성 매트릭스(예를 들어, Tissuel®

) 또는 콜라겐 매트릭스를 포함하는 다공성 또는 비-다공성 물질로 이루어진다. 한 가지 양태에서, 본 발명의 길항제인 유효량의 하나 이상의 DLL4 결합 단백질은 질환 또는 이의 증상을 예방, 치료, 관리 및/또는 완화시키기 위해 환자의 환부에 국소적으로 투여된다. 또 다른 양태에서, 본 발명의 유효량의 하나 이상의 DLL4 결합 단백질은 질환 또는 이의 하나 이상의 증상을 예방, 치료, 관리 및/또는 완화시키기 위해 본 발명의 결합 단백질이 아니 다른 유효량의 하나 이상의 치료제(예, 하나 이상의 예방제 또는 치료제)와 병용하여 환자의 환부에 국소적으로 투여된다.

[1119] 또 다른 양태에서, 예방제 또는 치료제는 제어 방출 또는 지연 방출 시스템으로 전달될 수 있다. 한 양태에서,

펌프를 사용하여 조절된 방출 또는 지연된 방출을 달성할 수 있다(Langer (*Science*, 249: 1527-1533 (1990)); Sefton, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.*, 14:201-240 (1987); Buchwald et al., *Surgery* 88: 507-516 (1980); Saudek et al., *N. Engl. J. Med.* 321: 574-579 (1989)). 또 다른 양태에서, 중합체 물질을 사용하여 본 발명의 치료제의 조절 또는 지연된 방출을 달성할 수 있다[Goodson, J.M., Medical Applications of Controlled Release, Vol. II. Applications and Evaluations (Langer and Wise (eds.), CRC Press. Inc., Boca Raton, (1974), chapter 6, pages 115-138; Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.) (Wiley, New York, 1984); Ranger and Peppas, J., *Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. Phys.*, C23: 61-126(1983); 또한 Levy et al., *Science*, 228: 190-192 (1985); During et al., *Ann. Neurol.*, 25: 351-356 (1989); Howard et al., *J. Neurosurg.*, 71: 105-112 (1989)); 미국특허 제5,679,377호, 제5,916,597호, 제5,912,015호, 제5,989,463호 및 제5,128,326호; 및 PCT 공개번호 WO 99/15154 및 WO 99/20253 참조]. 지연된 방출 제형에 사용되는 중합체의 예는 폴리(2-하이드록시 에틸 메타크릴레이트), 폴리(메틸 메타크릴레이트), 폴리(아크릴산), 폴리(에틸렌-코-비닐 아세테이트), 폴리(메타크릴산), 폴리글리콜리드(PLG), 폴리언하이드라이드, 폴리(N-비닐 피롤리돈), 폴리(비닐 알콜), 폴리아크릴아미드, 폴리(에틸렌 글리콜), 폴리락티드(PLA), 폴리(락티드-코-글리콜리드) (PLGA) 및 폴리오르토에스테르를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 하나의 바람직한 양태에서, 지연된 방출 제형에 사용되는 중합체는 불활성이고, 누출가능한 불순물이 없고, 저장시 안정하고 생체분해성이다. 또 다른 양태에서, 조절 또는 지연된 방출 시스템은 예방제 또는 치료제와 근접하게 위치됨에 따라서 전신 투여량의 일부만을 필요로 한다(Goodson, In Medical Applications of Controlled Release, (1984), pages 115-138).

[1120]

방출조절형 시스템은 문헌[Langer (*Science*, 249: 1527-1533 (1990))]에서 논의되어 있다. 당업자에게 공지된 임의의 기술을 사용하여 본 발명의 하나 이상의 치료제를 포함하는 제어방출성 제형을 제조할 수 있다[미국특허 제4,526,938호, PCT 공개번호 WO 91/05548, PCT 공개번호 WO 96/20698, Ning et al., "Intratumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel," *Radiotherapy Oncol.*, 39: 179-189 (1996), Song et al., "Antibody Mediated Lung Targeting of Long-Circulating Emulsions," *PDA J. Pharm. Sci. Tech.*, 50: 372-377 (1996), Cleek et al., "Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application," *Proceed. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.*, 24: 853-854 (1997) 및 Lam et al., "Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery," *Proceed. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.*: 24: 759- 760 (1997)]. 이들 문헌의 전체 내용은 본원에 참고로 원용된다.

[1121]

본 발명의 조성물이 예방제 또는 치료제를 암호화하는 핵산인 특정 양태에서, 핵산은 생체내 투여되어 암호화된 예방제 또는 치료제의 발현을 촉진시킬 수 있고 당해 핵산은 적당한 핵산 발현 벡터의 일부로서 구성되고 이것이 세포내로 투여되도록 하며, 예를 들어, 레트로바이러스 벡터(미국특허 제4,980,286호) 또는 직접 주사 또는 미세입자 충격(예를 들어, 유전자 총 (듀퐁사의 바이올리스틱)) 또는 지질 또는 세포 표면 수용체 또는 형질감염제로의 피복을 투여에 사용하거나 핵으로 진입하는 것으로 공지된 호메오박스형 웨이브레이드에 연결시켜 투여한다(Joliot et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 88: 1864-1868, (1991)). 또한, 핵산은 세포내로 도입되고 발현을 위해 상동성 재조합에 의해 숙주 세포 DNA 내로 통합된다.

[1122]

본 발명의 약제학적 조성물은 이의 의도된 투여 경로에 부합하도록 제형된다. 투여 경로의 예는 비경구, 예를 들어, 정맥내, 피내, 피하, 경구, 비내(예를 들어, 흡입), 경피(예를 들어, 국소), 경점막 및 직장 투여를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 특정 양태에서, 당해 조성물은 사람에게 정맥내, 피하, 근육내, 경구, 비내 또는 경구 투여용으로 채택된 약제학적 조성물로서 통상적인 과정에 따라 제형된다. 전형적으로, 정맥내 투여용 조성물은 멸균 등장 수성 완충액중의 용액이다. 필요한 경우, 당해 조성물은 또한 가용화제 및 주사 부위에서 통증을 완화하기 위한 리그노캡과 같은 국소 마취제를 함유할 수 있다.

[1123]

본 발명의 조성물이 국소적으로 투여되는 경우, 당해 조성물은 연고, 크림, 경피 패취, 로션, 젤, 샴푸, 분무제, 에어로졸, 용액, 에멀젼 또는 당업자에게 널리 공지된 기타 형태로 제형화될 수 있다[*Remington's Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms*, 19th ed., (Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania, 1995)]. 분무 불가능한 국소 투여 형태를 위해, 통상적으로 국소 적용에 적합할 수 있는 담체 또는 하나 이상의 부형제를 포함하고 바람직하게 물 보다 큰 역학 점도를 갖는 조성물이 사용될 수 있다. 적합한 제형은 제한없이 용제, 혼탁제, 유제, 크림, 연고, 산제, 도찰제, 고약등을 포함하고 경우에 따라 이들은 예를 들어, 삼투암과 같은 다양한 성질에 영향을 미치기 위해 보조제(예를 들어, 방부제, 안정화제, 습윤화제, 완충제 또는 염)과 함께 멸균되거나 혼합된다. 기타 적합한 국소 투여 형태는 바람직하게

고체 또는 액체 불활성 담체와 배합된 활성 성분이 가압된 휘발성 물질(예를 들어, 가스 추진제, 예를 들어, 프레온)과의 혼합물 또는 압착병에 팩키징된 분무 가능한 에어로졸 제제를 포함한다. 수분화제 또는 보습제가 또한 경우에 따라 약제학적 조성물 및 투여 형태에 첨가될 수 있다. 당해 추가의 성분의 예는 당업계에 널리 공지되어 있다.

[1124] 본 발명의 방법이 조성물의 비내 투여를 포함하는 경우, 당해 조성물은 에어로졸 형태, 분무, 연무 또는 적하 형태로 제형될 수 있다. 특히, 본 발명에 따라 사용하기 위한 예방제 또는 치료제는 간편하게 가압된 팩 또는 분무기로부터 에어로졸 분무 제공 형태로 적합한 추진제(예를 들어, 디클로로디플루오로메탄, 트리클로로플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로에탄, 이산화탄소 또는 기타 적합한 가스)의 사용과 함께 전달될 수 있다. 가압된 에어로졸의 경우에, 용량 단위는 계량된 양이 전달되도록 벨브를 설치하여 측정될 수 있다. 흡입기 또는 취입기에 사용하기 위한 캡셀제 및 카트릿지(예를 들어, 젤라틴으로 구성된)는 화합물 및 락토스 또는 전분과 같은 적합한 분말 기체의 분말 혼합물을 함유하도록 제형될 수 있다.

[1125] 본 발명의 방법이 경구 투여를 포함하는 경우, 당해 조성물은 정제, 캡셀제, 카쉐제, 젤캡, 용제, 혼탁제의 형태로 경구적으로 제형될 수 있다. 정제 또는 캡셀제는 결합제(예를 들어, 예비겔화된 옥수수 전분, 폴리비닐피롤리돈 또는 하이드록시프로필 메틸셀룰로스); 충전제(예를 들어, 락토스, 미세결정 셀룰로스 또는 인산수소칼슘); 윤활제(예를 들어, 마그네슘 스테아레이트, 탈크 또는 실리카); 봉해제(예를 들어, 감자 전분 또는 나트륨 전분 글리콜레이트) 또는 습윤화제(예를 들어, 나트륨 라우릴 설레이트)와 같은 약제학적으로 허용되는 부형제와 함께 통상적인 수단으로 제조될 수 있다. 정제는 당업자에게 널리 공지된 방법으로 피복될 수 있다. 경구 투여용 액상 제제는 제한 없이 용제, 시럽 또는 혼탁제 형태를 취할 수 있거나 이들은 사용전에 물 또는 기타 적합한 비허클과의 구성을 위해 무수 생성물로서 제공될 수 있다. 당해 액상 제제는 혼탁화제(예를 들어, 솔비톨 시럽, 셀룰로스 유도체 또는 수소화된 식용 지방); 유화제(예를 들어, 렉시틴 또는 아카시아); 비-수성 비허클(예를 들어, 아몬드유, 오일 에스테르, 에틸 알콜 또는 분획화된 식물성 오일) 및 방부제(예를 들어, 메틸 또는 프로필-p-하이드록시벤조에이트 또는 소르브산)와 같은 약제학적으로 허용되는 첨가제를 사용한 통상적인 수단에 의해 제조될 수 있다. 당해 제제는 또한 적절하게 완충염, 향제, 착색제 및 감미제를 함유할 수 있다. 경구 투여용 제제는 적합하게 예방제 또는 치료제의 저속방출성, 방출조절성 또는 제어방출성으로 제형될 수 있다.

[1126] 본 발명의 방법은 예를 들어, 흡입기 또는 분무기를 사용함에 의해 분무화제로 제형된 조성물을 폐 투여함을 포함할 수 있다[미국특허 제6,019,968호, 제5,985,320호, 제5,985,309호, 제5,934,272호, 제5,874,064호, 제5,855,913호, 제5,290,540호 및 제4,880,078호; 및 PCT 공개번호 WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346 및 WO 99/66903]. 특정 양태에서, 본 발명의 항체, 병용 치료제 및/또는 본 발명의 조성물은 Alkermes AIR®

폐 약물 전달 기술(Alkermes, Inc., Cambridge, Massachusetts, US)을 사용하여 투여된다.

[1127] 본 발명의 방법은 주사(예, 일시 주사 또는 연속 주입)에 의해 비경구 투여용으로 제형된 조성물을 투여함을 포함할 수 있다. 주사용 제형은 방부제 첨가와 함께 단위 용량 형태(예를 들어, 앰플 또는 수회용량 용기)로 제공될 수 있다. 당해 조성물은 혼탁제, 용제 또는 유제와 같은 형태를 취할 수 있고 혼탁화제, 가용화제 및/또는 분산제와 같은 제형화제를 함유할 수 있다. 또는, 활성 성분은 사용시에 적합한 비허클(예를 들어, 발열원-유리된 멸균수)과 재구성되는 분말 형태일 수 있다.

[1128] 본 발명의 방법은 추가로 데포제로서 제형된 조성물의 투여를 포함할 수 있다. 이와 같은 장효성 제제는 이식(예, 피하 또는 근육내)에 의해 또는 근육내 주사에 의해 투여될 수 있다. 따라서, 예를 들어, 당해 조성물은 적합한 중합체 또는 소수성 물질(예, 허용되는 오일중 유제로서) 또는 이온 교환 수지와 함께 제형되거나 난용성 유도체(예, 난용성 염)로서 제형될 수 있다.

[1129] 본 발명의 방법은 중성 또는 염 형태로서 제형된 조성물의 투여를 포함한다. 약제학적으로 허용되는 염은 염산, 인산, 아세트산, 옥살산, 타르타르산 등으로부터 파생된 것들과 같은 음이온과 함께 형성된 것들 및 나트륨, 칼륨, 암모늄, 칼슘, 제2 수산화철, 이소프로필아민, 트리에틸아민, 2-에틸아미노 에탄올, 히스티딘, 프로카인 등으로부터 파생된 것들과 같은 양이온과 함께 형성된 것들을 포함한다.

[1130] 일반적으로, 조성물의 성분은 예를 들어, 활성 물질의 양이 표기된 앰플 또는 봉지와 같은 밀폐 용기에서 무수 동결건조 분말 또는 무수 농축물로서, 개별적으로 공급되거나 단위 용량형으로 함께 혼합되어 공급된다. 투여 방식이 주입인 경우, 조성물은 멸균 약제학적 등급의 물 또는 식염수가 함유된 주입 병에 분배될 수 있다. 투

여 방식이 주사인 경우, 멸균 주사용수 또는 식염수의 앰플을 제공하여 성분들을 투여 전에 혼합할 수 있다.

[1131] 특히, 본 발명은 또한 본 발명의 예방제 또는 치료제 또는 약제학적 조성물중 하나 이상이 제제의 양이 표기된 앰플 또는 봉지와 같은 밀폐 용기에 팩키지된 것을 제공한다. 한 가지 양태에서, 본 발명의 예방제 또는 치료제 또는 약제학적 조성물중 하나 이상이 밀폐 용기에 무수 멸균된 동결건조 분말 또는 무수 농축물로 공급되고 환자에 투여하기에 적당한 농도로 재구성(예, 물 또는 식염수와 함께)될 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 예방제 또는 치료제 또는 약제학적 조성물중 하나 이상은 밀폐 용기에 무수 멸균 동결건조 분말로서 제공되고 단위 용량은 5 mg 이상, 보다 바람직하게는 10 mg 이상, 15 mg 이상, 25 mg 이상, 35 mg 이상, 45 mg 이상, 50 mg 이상, 75 mg 이상 또는 100 mg 이상이다. 본 발명의 동결건조된 예방제 또는 치료제 또는 약제학적 조성물 중 하나 이상은 2°C 내지 8°C하에서 그의 최초 용기중에 저장되어만 하고 본 발명의 예방제 또는 치료제 또는 약제학적 조성물중 하나 이상은 재구성된 후 1주 이내, 바람직하게는 5일 이내, 72시간 이내, 48시간 이내, 24시간 이내, 12시간 이내, 6시간 이내, 5시간 이내, 3시간 이내, 1시간 이내에 투여되어야만 한다. 대안으로서의 양태로서, 본 발명의 예방제 또는 치료제 또는 약제학적 조성물중 하나 이상은 제제의 양 및 농도가 표시된 밀폐 용기에서 액체 형태로 공급된다. 바람직하게는, 투여된 조성물의 액체 형태는 밀폐 용기에 0.25 mg/ml 이상, 보다 바람직하게는 0.5 mg/ml 이상, 1 mg/ml 이상, 2.5 mg/ml 이상, 5 mg/ml 이상, 8 mg/ml 이상, 10 mg/ml 이상, 15 mg/ml 이상, 25 mg/ml 이상, 50 mg/ml 이상, 75 mg/ml 이상 또는 100 mg/ml 이상으로 공급된다. 액체 형태는 2°C 내지 8°C하에서 그의 최초 용기중에 저장되어야만 한다.

[1132] 본 발명의 결합 단백질은 비경구 투여에 적합한 약제학적 조성물에 혼입될 수 있다. 바람직하게는, 결합 단백질은 항체 0.1 내지 250 mg/ml를 포함하는 주사 용액으로 제조된다. 주사 용액은 플린트 또는 앰버 바이알, 앰플 또는 사전충진 주사기에 액체 또는 동결건조 용량형으로 포함될 수 있다. 완충액은 pH 5.0 내지 7.0 (최적으로는 pH 6.0)으로서 L-히스티딘 (1-50 mM, 최적으로는 5-10 mM)일 수 있다. 다른 적합한 완충액으로는 석신산나트륨, 구연산나트륨, 인산나트륨 또는 인산칼륨이 있으나, 이에 국한되지 않는다. 염화나트륨이 0 내지 300 mM (액체 용량형인 경우 최적으로는 150 mM)의 농도로 용액의 독성을 개질하는데 사용될 수 있다. 동결건조 용량형에는 동결방지제, 주로 0 내지 10% 자당(최적으로는 0.5 내지 1.0%)가 첨가될 수 있다. 다른 적합한 동결방지제에는 트레할로스 및 락토스가 있다. 동결건조 용량형에는 벌크화제(Bulking agent)가 포함될 수 있으며, 주로 1 내지 10% 만니톨(최적으로는 2 내지 4%)이다. 안정화제가 액체 및 동결건조 용량형에 사용될 수 있으며, 주로 1 내지 50 mM L-메티오닌(최적으로는 5 내지 10 mM)이다. 다른 적합한 벌크화제에는 글리신 및 아르기닌이 있으며, 이는 0 내지 0.05% 폴리솔베이트-80(최적으로는 0.005 내지 0.01%)으로서 포함될 수 있다. 추가의 계면활성제로는 이로써 한정되는 것은 아니지만 폴리솔베이트 20 및 BRIJ 계면활성제가 포함된다.

[1133] 본 발명의 조성물은 다양한 형태일 수 있다. 이러한 형태에는 예컨대 액체, 반고체 및 고체 용량형이 포함되며, 예를 들면 액제(예, 주사 용액 및 주입 용액), 분산액, 혼탁액, 정제, 환제, 산제, 리포좀 및 쥐약 등이 있다. 바람직한 형태는 의도하는 투여 방식 및 치료 용도마다 다르다. 전형적으로 바람직한 조성물은 주사 용액 또는 주입 용액 형태, 예컨대 다른 항체로 사람을 수동 면역화하는데 사용되는 조성물과 유사한 조성물이다. 바람직한 투여 방식은 비경구(예, 정맥내, 피하, 복강내, 근육내) 방식이다. 한 가지 바람직한 양태에서, 본원에 기술된 DLL4 결합 단백질은 정맥내 주입 또는 주사로 투여된다. 또 다른 바람직한 양태에서, DLL4 결합 단백질은 근육내 또는 피하 주사로 투여된다.

[1134] 치료학적 조성물은 전형적으로 제조 및 보관 조건 하에서 무균이어야 하고 안정해야 한다. 당해 조성물은 용액, 마이크로에멀젼, 분산액, 리포좀 또는 높은 약물 농도에 적당한 다른 정돈된 구조로 제형될 수 있다. 멸균 주사 용액은 절대량의 활성 화합물(즉, 항체 또는 항체 부분)을, 필요에 따라 앞에서 열거한 성분 중 하나 또는 성분의 조합과 함께 적당한 용매에서 혼합한 다음, 여과 멸균하여 제조할 수 있다. 일반적으로, 분산액은 기본 분산 매질과 필요에 따라 전술한 다른 성분을 포함하는 멸균 매개제에 활성 화합물을 첨가하여 제조한다. 멸균 주사 용액의 제조에 유용한 멸균 동결건조 분말의 경우에, 바람직한 제조방법은 전술한 멸균 여과 용액으로부터 활성 성분과 임의의 바람직한 추가 성분의 분말을 제공하는 진공 건조 및 분무 건조이다. 용액의 적당한 유체성은 예컨대 레시틴과 같은 피복제의 사용, 분산액의 경우에 필요한 입자 크기의 유지 및 계면활성제의 사용을 통해 유지될 수 있다. 주사 조성물의 지속적 흡수는 조성물에 흡수 지연제, 예컨대 모노스테아레이트 염 및 젤라틴을 첨가하여 제공될 수 있다.

[1135] 본 발명의 DLL4 결합 단백질은 당업계에 공지된 다양한 방법으로 투여할 수 있지만, 많은 치료학적 응용에서 바람직한 투여 경로/방식은 피하 주사, 정맥내 주사 또는 주입이다. 당업자라면 잘 알고 있듯이, 투여 경로 및/ 또는 방식은 목적하는 결과에 따라 달라진다. 특정 양태에서, 활성 화합물은 이 화합물이 신속 방출되지 않게 하는 담체와 함께 조제될 수 있으며, 그 예에는 임플란트, 경피 패치 및 마이크로캡슐화된 전달 시스템을 비롯

한 서방성 제형이 있다. 여기에는 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리무수물, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르 및 폴리락트산과 같은 생체분해성, 생체혼화성 중합체가 사용될 수 있다. 이러한 제형을 제조하는 다수의 방법은 특허되어 있거나 당업자에게 일반적으로 공지되어 있다[Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R.Robinson, ed., (Marcel Dekker, Inc., New York, 1978)].

[1136] 특정 양태에서, 본 발명의 결합 단백질은 예컨대 불활성 희석제 또는 동화성 식용 담체와 함께 경구 투여될 수 있다. 이러한 화합물(및 필요한 경우 다른 성분)은 또한 경질 또는 연질 외피의 젤라틴 캡슐에 충진되거나, 정제로 압착되거나 또는 환자의 음식물에 직접 첨가될 수도 있다. 경구 치료 투여용인 경우, 상기 화합물은 부형제와 혼합되어 섭취성 정제, 구강정, 트로키, 캡슐, 엘릭실제, 혼탁액, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 사용될 수 있다. 비경구 투여와 다른 방식으로 본 발명의 화합물을 투여하기 위해서는 화합물을 불활성화 방지용 물질로 피복하거나 또는 상기 방지용 물질과 함께 공동 투여할 필요가 있을 수 있다.

[1137] 또한, 보충적 활성 화합물이 상기 조성물에 첨가될 수도 있다. 특정 양태에서, 본 발명의 결합 단백질은 DLL4 활성이 유해하게 작용하여 발생하는 질환을 치료하는데 유용한 하나 이상의 추가 치료제와 공동제형되고/되거나 동시투여된다. 예를 들어, 본 발명의 항-huDLL4 항체 또는 항체 부분은 다른 표적에 결합하는 하나 이상의 추가 항체(예컨대, 다른 사이토클린에 결합하거나 세포 표면 분자에 결합하는 항체)와 공동제형되고/되거나 공동투여될 수 있다. 또한, 본 발명의 하나 이상의 결합 단백질은 전술한 치료제중 2종 이상과 병용하여 사용될 수 있다. 이러한 병용 치료는 투여되는 치료제를 보다 낮은 투여량으로 사용할 수 있게 하여 각종 단독치료법과 관련된 가능한 독성 또는 합병증을 피할 수 있으므로 바람직하다.

[1138] 특정 양태에서, 본 발명의 DLL4 결합 단백질은 당업계에 공지된 반감기 연장 비히클에 연결되기도 한다. 이러한 비히클에는 Fc 도메인, 폴리에틸렌 글리콜 및 텍스트란이 포함되나, 이에 국한되는 것은 아니다. 이러한 비히클은 미국특허 제6,660,843호 및 PCT 공개번호 WO 99/25044에 기술되어 있다. 이들 문헌의 내용은 본원에 참고로 원용된다.

[1139] 특정 양태에서, 본 발명의 결합 단백질 또는 다른 예방제 또는 치료제를 암호화하는 핵산 서열이 유전자 치료에 의해 질환 또는 이의 하나 이상의 증상을 치료, 예방, 관리 또는 완화시키기 위해 투여된다. 유전자 치료법은 발현되거나 발현 가능한 핵산을 환자에게 투여함에 의해 수행되는 치료법을 가리킨다. 본 발명의 당해 양태에서, 핵산은 이에 암호화되어 있고 예방 또는 치료 효과를 나타내는 본 발명의 결합 단백질 또는 예방제 또는 치료제를 생성한다.

[1140] 당업계에서 유용한 임의의 유전자 치료법이 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 유전자 치료법은 전반적으로 문헌 [Goldspiel et al., *Clin. Pharmacy*, 12: 488-505 (1993); Wu and Wu, *Biotherapy*, 3: 87-95 (1991); Tolstoshev, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 32: 573-596 (1993); Mulligan, *Science*, 260: 926-932 (1993); 및 Morgan and Anderson, *Ann. Rev. Biochem.*, 62: 191-217 (1993); Robinson, C., *Trends Biotechnol.*, 11(5):155 (1993)]에 기재된 내용을 참고로한다. 사용될 수 있는 재조합 DNA 기술에 관해 당업계에 일반적으로 공지된 방법은 문헌[Ausubel et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, 1993; 및 Kriegler, *Gene Transfer and Expression. A Laboratory Manual*, (Stockton Press, New York, 1990)]에 기재되어 있다. 다양한 유전자 치료법에 대한 상세한 설명은 미국특허원 공개번호 20050042664 A1에 기재되어 있다. 이의 내용은 본원에 참고로 원용된다.

[1141] 다른 관점으로서 본 발명은 환자로부터 DLL4-연관된 종양을 치료(예, 치유, 억제, 완화, 지연 또는 발병 차단 또는 재발 억제) 또는 예방하는 방법을 제공한다. 본 발명의 방법은 환자에게 DLL4 결합 단백질(예, 본원에 기술된 항-DLL4 항체 또는 이의 단편)을 DLL4-연관된 종양 또는 암을 치료 또는 예방하는데 충분한 양으로 투여하는 것을 포함한다. DLL4 길항체(즉, 항-DLL4 항체 또는 이의 단편)는 환자에게 단독으로 투여되거나 본원에 기술된 다른 치료 양식과 병용하여 투여될 수 있다.

[1142] DLL4는 면역 및 엔증 요소가 연루된 각 종 질환, 특히 암 및 종양 혈관생성과 연관된 병리에서 중요한 역할을 한다. DLL4-연관된 질환의 예는 이로써 한정되는 것은 아니지만 다음의 생물학적 과정에 해로운 영향을 미치는 질환을 포함한다: 신경 기능 및 발생; 동맥 상피 운명 및 혈관생성의 안정화; 원시판막 및 심실판막의 발생 및 분화 동안에 심장내막과 심근간의 중대한 세포 교신의 조절; 심장판막 형상성 및 사람의 심혈관계통의 기타 질환에 대한 연관성; 내분비 및 외분비 체장의 적시 세포 계통 지정; 위에서 분비와 흡수 계통 사이를 선택해야 하는 세포의 운명에 미치는 영향; 골다공증과 같은 골아세포계통으로의 진행에서 골 발생 및 참여시 조혈모세포 구획의 확장; 몇몇의 뚜렷한 발생기에서 유선에서 세포-운명 결정의 조절; 및 특정 비핵 기전(예, 티로신 키나제 Abl을 통한 액틴 세포골격의 조절). 보다 특정적으로는, DLL4-연관된 질환은 이로써 한정되는 것은 아니지

만 T-ALL (T-세포 급성 림프아구성림프종), CADASIL (피질하경색 및 백질뇌증을 동반하는 대뇌 상염색체 우성 동맥병증), MS (다발성 경화증), 팔로4징증 및 알라질증후군을 포함한다. 바람직하게는, 본원에 기술된 항체 및 항원-결합 부분은 암 및 종양을 치료하는데 사용된다.

[1143] 본 발명에 따른 결합 단백질은 단독으로 되거나 배합적으로 (즉, 본원에 기술된 하나 이상의 DLL4-결합 단백질들로) 사용되어 암 또는 종양을 치료하거나 DLL4와의 결합 또는 DLL4의 억제 및/또는 중화가 개인의 건강에 필요한 것으로 고려되거나 달리 유익한 것으로 고려되는 기타 질환을 치료할 수 있다.

[1144] 또한, 본 발명의 DLL4 결합 단백질은 단독으로 사용하거나 전문의가 의도한 목적에 맞게 선택한 추가의 물질 (예, 치료제)과 배합하여 사용할 수 있음을 이해되어야 한다. 예를 들면, 추가의 물질은 암 또는 종양을 치료하거나 DLL4와의 결합 또는 DLL4의 억제가 암, 종양 또는 기타 질환 또는 증세를 치료하는데 필요하거나 유리한 것으로 판단되는 기타 질환을 치료하는데 유용한 것으로서 본 분야에서 인식되는 치료제일 수 있다. 또한, 추가의 물질은 치료 조성물에 유익한 속성을 제공하는 물질 (예, 조성물의 점도에 영향을 미치는 물질)일 수 있다.

[1145] 추가로, 본 발명에 속하는 배합물은 이들의 목적상 유용한 배합물임을 이해하여야 한다. 하기된 물질들은 목적에 맞게 예시된 것이며 이로써 한정되는 것이 아니다. 본 발명의 일부인 배합물은 본 발명의 항체 및 아래 목록중에서 선택된 하나 이상의 추가 물질일 수 있다. 또한 배합물은 이의 조성물이 의도한 작용을 수행할 수 있는 한 하나 이상의 추가 물질 (예, 두 가지 또는 세 가지의 추가 물질)을 포함할 수 있다.

[1146] 바람직한 배합물은 이부프로펜과 같은 약물을 포함하는 비스테로이드성 소염 약물 (NSAIDS)이다. 다른 바람직한 배합물은 프레드니솔론을 포함한 코르티코스테로이드이고; 스테로이드 사용에 대해 잘 알려진 부작용은 본 발명의 항-DLL4 항체와 배합하여 환자를 치료할 때 필요한 스테로이드 용량을 조금씩 줄임으로써 경감될 수 있거나 심지어 제거될 수 있다. 본 발명의 항체 또는 항체 부분과 배합될 수 있는 것으로 류마티스성 관절염 치료제의 비제한적 예는 다음의 것을 포함한다: 사이토킨 소염 약물 (CSAID); 다른 사람 사이토kin 또는 성장 인자 (예, TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, IL-16, IL-18, IL-21, 인터페론, EMAP-II, GM-CSF, FGF 및 PDGF)에 대한 항체 또는 그들의 길항제. 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 부분은 CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), CD90, CTLA 또는 이들의 리간드 (CD154 (gp39 또는 CD40L)을 포함)와 같은 세포 표면 분자에 대한 항체와 배합될 수 있다.

[1147] 치료제의 바람직한 배합물은 발암유도 또는 혈관신생유도 신호전달 경로를 상이한 지점에서 차단할 수 있다. 본 발명의 방법 및 조성물에 유용한 바람직한 치료제의 예는 항신생물제, 방사선요법제 및 화학요법제 (예, DNA 알킬화제, 시스플라틴, 카보플라틴, 항-튜불린제, 파클리탁셀, 도세탁셀, 탁솔, 독소루비신, 켐시타빈, 켐자르, 안트라사이클린, 아드리아마이신, 토포이소머라제 I 억제제, 토포이소머라제 II 억제제, 5-플루오로우라실(5-FU), 류코보린, 이리노테칸, 수용체 티로신 키나제 억제제(예, 에를로티니브, 게피티니브), COX-2 억제제(예, 셀레콕시브), 및 키나제 억제제를 포함한다.

[1148] 본 발명의 DLL4 결합 단백질은 또한 메토트렉세이트, 6-MP, 아자티오프린, 세파살라진, 메살라진, 올살라진 클로로퀴닌/하이드록시클로로퀸, 펜실라민, 오로티오말레이트(근육내 및 경구), 아자티오프린, 콜히친, 코르티코스테로이드(경구, 흡입 및 국소 주사), 베타-2 아드레날린수용체 효능제(살부타몰, 터부탈린, 살메테랄), 크산틴(테오필린, 아미노필린), 크로모글리케이트, 네도크로밀, 케토티펜, 이프라트로퓸 및 옥시트로퓸, 사이클로스포린, FK506, 라파마이신, 미코페놀레이트 모페틸, 레플루노미드, NSAID, 예컨대 이부프로펜, 코르티코스테로이드, 예컨대 프레드니솔론, 포스포디에스터라제 억제제, 아데노신 효능제, 항혈전제, 보체 억제제, 아드레날린작용제, 전염증성 사이토킨, 예컨대 TNF α 또는 IL-1에 의한 시그널 전달을 방해하는 제제(예, IRAK, NIK, IKK, p38 또는 MAP 키나제 억제제), IL-1 β 전환효소 억제제, TNF α 전환효소(TACE) 억제제, T-세포 시그널 전달 억제제(예: 키나제 억제제), 메탈로프로테이나제 억제제, 세파살라진, 아자티오프린, 6-미캡토퓨린, 안지오텐신 전환 효소 억제제, 용해성 사이토킨 수용체 및 이의 유도체(예, 용해성 p55 또는 p75 TNF 수용체 및 유도체 p75TNFRIG(Enbrel™ 및 p55TNFRIG(Lenercept)), sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R), 소염성 사이토킨(예, IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 및 TGF β), 셀레콕시브, 엽산, 하이드록시클로로퀸 세페이트, 로페콕시브, 에타너셉트, 인플릭시마브, 나프록센, 발데콕시브, 세파살라진, 메틸프레드니솔론, 멜록시캄, 메틸프레드니솔론 아세테이트, 골드 나트륨 티오말레이트, 아스피린, 트리암시놀론 아세토나이드, 프로폭시펜 나프실레이트/apap, 폴레이트, 나부메톤, 디클로페낙, 피록시캄, 에토돌락, 디클로페낙 나트륨, 옥사프로진, 옥시코돈 hcl, 하이드로코돈 비타르트레이트/apap, 디클로페낙 나트륨/미소프로스톨, 펜타닐, 아나킨라, 사람 재조합체, 트라마돌 hcl, 살살레이트, 설린다, 시아노코발라민/fa/파리독신, 아세트아미노펜, 알렌드로네이트 나트륨, 프

레드니솔론, 몰핀 설레이트, 리도카인 하이드로클로라이드, 인도메타신, 글루코사민 설프/콘드로이틴, 아미트립 텔린 hcl, 설파디아진, 옥시코돈 hcl/아세트아미노펜, 올로파타딘 hcl, 미소프로스톨, 나프록센 나트륨, 오메프라졸, 시클로포스파미드, 리툭시마브, IL-1 TRAP, MRA, CTLA4-IG, IL-18BP, 항-IL-18, 항-IL15, BIRB-796, SCIO-469, VX-702, AMG-548, VX-740, 로플루밀라스트, IC-485, CDC-801 및 메소프람 등의 물질과도 배합될 수 있다. 바람직한 배합물은 메토트렉세이트 또는 레플루노마이드를 포함하며, 중간의 또는 중증의 류마티스성 관절염 증례에는 사이클로스포린을 포함한다.

[1149]

본 발명의 DLL4 결합 단백질이 배합될 수 있는 암치료제의 비제한적 예는 다음과 같은 것을 포함한다: 부데노사이드; 상피 성장 인자; 코르티코스테로이드; 사이클로스포린; 설파살라진; 아미노살리실레이트; 6-머캅토퓨린; 아자티오프린; 메트로니다졸; 리폭시게나제 억제제; 메살라민; 올살라진; 발살라지드; 항산화제; 트롬복산 억제제; IL-1 수용체 길항제; 항-IL-1 β 모노클로날 항체; 항-IL-6 모노클로날 항체; 성장 인자; 엘라스타제 억제제; 피리디닐-이미다졸 화합물; 및 다른 사람 사이토킨 또는 성장 인자 (예, TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, EMAP-II, GM-CSF, FGF 및 PDGF)에 대한 항체 또는 그의 길항제. 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 부분은 세포 표면 분자 (예, CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD90 또는 이들의 리간드)에 대한 항체와 배합될 수도 있다. 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 부분은 또한 메토트렉세이트, 사이클로스포린, FK506, 라파마이신, 마이코페놀레이트 모페틸, 레플루노마이드, NSAID(예, 이부프로펜), 코르티코스테로이드(예, 프레드니솔론), 포스포디에스터라제 억제제, 아데노신 효능제, 항혈전제, 보체 억제제, 아드레날린작용제, IL-1을 방해하는 물질(예, TNF α IKK, p38 또는 MAP 키나제 억제제와 같은 염증유도 사이토킨에 의한 신호전달 IRAK, NKI), IL-1 β 전환효소 억제제, TNF α 전환효소 억제제, T-세포 신호전달 억제제(예, 키나제 억제제), 메탈로프로테이나제 억제제, 설파살라진, 아자티오프린, 6-머캅토퓨린, 안지오텐신 전환효소 억제제, 용해성 사이토킨 수용체 및 이의 유도체(예, 용해성 p55 또는 p75 TNF 수용체, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R) 및 소염성 사이토킨(예, IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 및 TGF β)와 같은 물질과 배합될 수 있다.

[1150]

본 발명의 DLL4 결합 단백질이 배합될 수 있는 치료제의 다른 예에는 다음과 같은 것이 포함된다: TNF 길항제 (예, 항-TNF 항체), D2E7(PCT 공개번호 WO 97/29131; HUMIRA[®]

), CA2(REMICADE[®]

), CDP 571, TNFR-IgG 작제물, (p75TNFR IgG (ENBREL[®]

) 및 p55TNFR IgG(LENERCEPT) 및 PDE4 억제제. 본 발명의 결합 단백질은 코르티코스테로이드 (예, 부데노사이드 및 텍사메타손)와 배합될 수 있다. 본 발명의 결합 단백질은 또한 설파살라진, 5-아미노살리실산 및 올살라진과 같은 물질 및 염증유도 사이토킨(예, IL-1)의 합성 또는 작용을 저해하는 물질 (예, IL-1 β 전환효소 억제제 및 IL-1ra)과 배합될 수 있다. 본 발명의 DLL4 결합 단백질은 또한 T 세포 신호전달 억제제 (예, 티로신 키나제 억제제 6-머캅토퓨린)과 함께 사용될 수 있다. 본 발명의 결합 단백질은 IL-11과 배합될 수 있다. 본 발명의 결합 단백질은 메살라민, 프레드니손, 아자티오프린, 머캅토퓨린, 인플릭시마브, 메틸프레드니솔론 나트륨 석시네이트, 디페녹실레이트/아트로프 설레이트, 로페아미드 하이드로클로라이드, 메토트렉세이트, 오메프라졸, 폴레이트, 시프로플록사신/헥스트로스-물, 하이드로코돈 비타르트레이트/아파프, 테트라사이클린 하이드로클로라이드, 플루오시노나이드, 메트로니다졸, 티메로살/봉산, 콜레스티라민/슈크로스, 시프로플록사신 하이드로클로라이드, 하이오시아민 설레이트, 메페리딘 하이드로클로라이드, 미다졸람 하이드로클로라이드, 옥시코돈 hcl/아세트아미노펜, 프로메타진 하이드로클로라이드, 인산나트륨, 설파메톡사졸/트리메토프림, 셀레콕시브, 폴리카르보필, 프로폭시펜 나프실레이트, 하이드로코르티손, 멀티비타민, 발살라지드 이나트륨, 코데인 포스페이트/아파프, 콜레세벨람 hcl, 시아노코발라민, 엽산, 레보플록사신, 메틸프레드니솔론, 나탈리주마브 및 인터페론-감마와 배합될 수 있다.

[1151]

본 발명의 결합 단백질과 배합될 수 있는 치료제의 비제한적 예에는 다음과 같은 것이 포함된다: 아스피린, 니트로글리세린, 이소소르비드 모노니트레이트, 메토프롤롤 석시네이트, 아테놀롤, 메토프롤롤 타르트레이트, 암로디핀 베실레이트, 딜티아젬 하이드로클로라이드, 이소소르비드 디니트레이트, 클로피도그렐 비설레이트, 니페디핀, 이토바스타틴 칼슘, 염화칼륨, 후로세미드, 심바스타틴, 베라파밀 hcl, 디곡신, 프로프라놀롤, 하이드로클로라이드, 카베딜롤, 리시노프릴, 스피로노락톤, 하이드로클로로티아지드, 에나라프릴 말레이트, 나돌로, 라미프릴, 에녹사파린 나트륨, 헤라핀 나트륨, 발사르탄, 소탈롤 하이드로클로라이드, 폐노피브레이트, 에제티미브, 부메타니드, 로사탄 포타슘, 리시노프릴/하이드로클로로티아지드, 펠로디핀, 캡토프릴 및 비소프롤롤 푸마

레이트.

[1152] 본 발명의 약제학적 조성물은 본 발명의 결합 단백질의 "치료학적 유효량" 또는 "예방학적 유효량"을 포함할 수 있다. "치료학적 유효량"이란 용어는 필요 용량에서 및 필요 기간 동안에 목적하는 치료 결과를 달성하기 위해 유효한 양을 의미한다. 결합 단백질의 치료학적 유효량은 당업자라면 결정할 수 있는 것으로서, 환자의 질병 상태, 연령, 성별 및 체중뿐만 아니라 결합 단백질이 환자에게 목적하는 반응을 유도할 수 있는 능력과 같은 요인에 따라 달라질 수 있다. 또한, 치료학적 유효량은 치료학적 유익 효과가 결합 단백질의 임의의 독성 또는 유해 효과를 능가하는 양이다. "예방학적 유효량"은 필요 투여량에서 및 필요 기간 동안에 목적하는 예방학적 결과를 달성하기 위해 유효한 양을 의미한다. 전형적으로는, 예방학적 용량은 질병의 발생전이나 초기 단계에서 대상자에게 사용되기 때문에 예방학적 유효량은 치료학적 유효량보다 적은 양일 것이다.

[1153] 투여용법은 최적의 목적하는 반응(예, 치료학적 또는 예방학적 반응)을 제공하도록 조정될 수 있다. 예를 들어, 1회 일시 주사로 투여할 수도 있고, 여러 분할 용량을 경시적으로 투여할 수도 있으며 또는 치료 상황의 위급성에 따라 비례하여 감소 또는 증가된 용량을 투여할 수도 있다. 특히, 투여 용이성과 용량의 균일성을 위해 비경구 조성물을 단위용량형으로 제형하는 것이 유리하다. 본 명세서에 사용된 단위용량형은 치료받을 포유 동물 대상자에 대하여 일회 투여량이 함유되어 물리적으로 분리된 단위를 의미한다. 따라서, 각 단위는 필요한 약제학적 담체와 관련하여 원하는 치료 효과를 제공하도록 계산된 소정 양의 활성 화합물을 포함한다. 본 발명의 단위용량형에 대한 세부사항은 (a) 활성 화합물의 독특한 특징 및 달성하고자 하는 특정 치료학적 또는 예방학적 효과 및 (b) 대상자들의 민감한 치료로 인해 활성 화합물의 배합에 관한 기술 고유의 제약에 의해 결정되고 직접적으로 좌우된다.

[1154] 본 발명에 따른 DLL4 결합 단백질의 치료학적 또는 예방학적 유효량 범위는 이로써 한정되는 것은 아니지만 예를 들면 0.1 내지 20 mg/kg이며, 더 바람직하게는 1 내지 10 mg/kg이다. 용량 값은 완화시키고자 하는 병태의 유형 및 중증도에 따라 다양할 수 있음을 주지해야 한다. 또한, 특정 대상자의 경우에서, 특정 투여 용법은 각자의 요건 및 조성물의 투여자 또는 관리자의 전문적 판단에 따라 경시적으로 조정되어야 하며, 본 명세서에 제시된 용량 범위는 예시적일 뿐이며 청구된 조성물의 범위 또는 실시를 제한하고자 하는 것이 아님을 명심해야 한다.

[1155] 본원에 기재된 발명의 방법이 기타 적합하게 변형되고 적용될 수 있고 본 발명의 범위 또는 본원에 기재된 양태로부터 벗어나지 않고서도 적합한 등가물을 사용하여 변형되고 적용될 수 있다는 것은 당업자에게 자명하다. 현재 본 발명을 상세하게 설명했고 이와 동일하게 하기의 실시예를 참조로 보다 명백하게 이해될 수 있을 것이고 당해 실시예는 설명을 목적으로 포함된 것이지 본 발명을 제한하고자 한 것은 아니다.

[1156] 실시예

[1157] 실시예 1:

[1158] DLL4 항체의 작용 활성을 결정하기 위해 사용된 시험관내 검정

[1159] 실시예 1.1: BIACORE®

표면 플라스몬 공명 기술을 이용한 친화성 결정

[1160] BIACORE®

표면 플라스몬 공명 검정 (Biacore, Inc., Piscataway, New Jersey, US)은 정반응 속도 상수 및 역반응 속도 상수의 역학적 측정에 의해 항체의 친화성을 결정한다. 정제된 재조합 DLL4 세포와 도메인에 DLL4 항체의 결합은 25°C에서 실행 완충액 HBS-EPB (10 mM HEPES [pH 7.4], 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.1 mg/ml BSA 및 0.005% 계면활성제 P20)을 사용하는 Biacore®

(바이아코어 2000, 바이아코어 3000이거나 바이아코어 T₁₀₀: GE Healthcare: Piscataway, NJ, USA) 장비로 표면 플라스몬 공명-기본 측정에 의해 결정된다. 예를 들면, 10 mM 아세트산나트륨 (pH 4.5)중에 희석된 약 9000 RU의 염소 항-사람 Fc 특이적 폴리클로날 항체 (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, Illinois, US)를 25 µg/ml로 제조사의 지침 및 절차에 따라 표준 아민 커플링 키트를 사용하여 CM5 연구용 바이오센서 칩에 직접적으로 고정시킨다. 바이오센서 표면에서 반응하지 않은 부분을 에탄올아민으로 차단한다. 반응 분석을 위해, 스크리버 2 (BioLogic Software), 바이아코어 바이아이밸루에이션 4.0.1 소프트웨어 또는 바이아코어 T100 이밸

루에이션 소프트웨어를 사용하여 다수의 항원 주사액에 1:1 랭듀어 결합 모델로부터 파생된 속도 등식을 동시에 접합시킨다 (포괄 접합 분석). 정제된 항체는 염소 항-사람 Fc 반응 표면을 따른 포획용 실행 완충액에 희석한다. 리간드로서 포획될 항체 ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$)는 $10 \mu\text{l}/\text{분}$ 의 유속으로 반응 매트릭스상에 주입한다. 검정 동안에, 모든 측정은 포획된 항-DLL4 항체가 없는 포획 표면을 대조군으로 한다. 결합 및 분리 속도 상수 $K_{\text{on}} (\text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$ 및 $K_{\text{off}} (\text{s}^{-1})$ 은 $80 \mu\text{l}/\text{분}$ 의 유속에서 결정한다. 속도 상수는 3배의 희석 시리즈로서 $1.23 - 900 \text{nM}$ 범위의 상이한 항원 농도에서 반응 결합 측정을 실시하고 완충액만 포함된 주사액을 중복 대조군으로 사용함으로써 획득한다. 이어서, 항체와 표적 항원사이의 반응에 대한 평형 해리 상수 $K_D (\text{M})$ 를 반응 속도 상수로부터 다음의 등식에 의해 계산한다: $K_D = K_{\text{off}}/K_{\text{on}}$. 결합은 시간과 반응 속도 상수의 함수를 계산하여 기록한다. 이 검정에서 정반응 속도가 $10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 보다 빠르고 역반응 속도가 10^{-6}s^{-1} 보다 느린 것으로 측정될 수 있다.

[1161] 실시예 1.2: ELISA에 의해 결정된 용해성 DLL4 세포외 도메인에 대한 DLL4 항체의 결합.

[1162] 방법 1 (포획 ELISA)

[1163] 96-웰 Nunc-Immuno 평판 (#439454)을 D-PBS (Gibco #14190)중의 사람 IgG (Fcγ 단편 특이적, Jackson ImmunoResearch, #109-005-098, $100 \mu\text{l}/\text{웰}$)에 대한 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 항체로 피복하고 4°C 에서 밤새 배양하였다. ELISA 평판을 세정 완충액 (PBS, 0.05% Tween-20)으로 3회 세척한 다음, $200 \mu\text{l}/\text{웰}$ 의 차단 완충액 (D-PBS 1% BSA, 1 mM CaCl₂, 0.05% Tween-20)으로 25°C 에서 1시간 동안 차단하였다. 평판을 3회 세척하고 $100 \mu\text{l}/\text{웰}$ 의 DLL4 항체 (0.0001 nM , 차단 완충액에 10배 연속 희석)와 25°C 에서 1시간 동안 배양한 다음 다시 3회 세척하였다. 포획된 DLL4 항체를 함유한 평판을 바이오틴-표지된 사람 DLL4 세포외 도메인 (차단 완충액중의 10nM , $100 \mu\text{l}/\text{ml}$)과 25°C 에서 1시간 동안 배양하고, 3회 세척한 다음, HRP와 결합된 스트렙타비딘 (KPL #474-3000, 차단 완충액중의 1:10,000 희석, $100 \mu\text{l}/\text{웰}$)과 25°C 에서 1시간 동안 배양하였다. 최종 세척 후 평판을 $100 \mu\text{l}/\text{웰}$ 의 ELISA 기질 (1-Step Ultra TMB-ELISA, Pierce #340280)과 배양하였다. 2분 후에 25°C 에서 $100 \mu\text{l}/\text{웰}$ 의 2 N 황산으로 반응을 정지시키고, 450 nm 에서 흡광도를 판독하였다. 그래프패드 프리즘 소프트웨어를 사용하여 데이터를 분석하고 EC₅₀ 값을 결정하였다.

[1164] 방법 2 (구리 피복된 평판)

[1165] 96-웰 구리-피복된 평판 (Thermo Scientific #15143)을 사용전에 세정 완충액 (PBS, 0.05% Tween-20)으로 3회 세척한 다음 $100 \mu\text{l}/\text{웰}$ 의 사람 DLL4-his 또는 마우스 DLL4-his 또는 개 DLL4-his와 함께 PBS중의 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 25°C 에서 1시간 동안 진탕시키면서 배양하였다. 이어서, 평판을 3회 세척하였다. 계속해서, $100 \mu\text{l}/\text{웰}$ 의 재조합 랙트/사람 키메라 또는 재조합 사람 항-DLL4 항체를 평판 ($0.00164-27 \text{nM}$, ELISA 완충액=PBST중의 4배 연속 희석, 10% Superblock (Pierce #37515))에 25°C 에서 1시간 동안 진탕시키면서 첨가한 후 재차 3회 세척하였다. 평판을 염소 항-사람 HRP (Pierce #31412) (ELISA 완충액중에 1:40,000 희석, $100 \mu\text{l}/\text{웰}$)와 함께 25°C 에서 1시간 동안 진탕시키면서 배양한 다음, 3회 세척하였다. 최종 세척 후에 평판을 $100 \mu\text{l}/\text{웰}$ ELISA 기질 (시그마 #T8665)과 배양시켰다. 25°C 에서 8분 후에 $100 \mu\text{l}/\text{웰}$ 의 1N HCl로 반응을 정지시키고 450 nm 에서 흡광도를 판독하였다. 그래프패드 프리즘 소프트웨어를 사용하여 데이터를 분석하고 EC₅₀ 값을 결정하였다.

[1166] 실시예 1.3: 유세포분석 (FACS)에 의해 결정된, 사람 종양 세포주의 표면에 DLL4 모노클로날 항체의 결합.

[1167] 세포-표면 DLL4를 과발현하는 안정한 세포주를 조직 배양 플라스크로부터 수확하고, 4회 세척한 다음, 1% 소혈청 알부민과 1 mM CaCl₂ (FACS 완충액)가 함유된 인산염 완충 염수 (PBS)중에 재현탁시켰다. 1.5×10^5 세포를 FACS 완충액중의 여러 농도로 항체와 냉장에서 60분간 배양하였다. 세포를 2회 세척하고 $50 \mu\text{l}$ 의 R-피코에리트린-결합된 항-랙트 IgG, F(ab')₂ 단편 (FACS 완충액중의 1:200 희석) (Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania, US, Cat.#112-116-072)를 첨가하였다. 냉장에서 배양 후 (4°C , 60분), 세포를 3회 세척하고 FACS 완충액제 재현탁시켰다. Becton Dickinson FACSCalibur-HTS (Becton Dickinson, San Jose, California, US)를 사용하여 형광을 측정하였다. 그래프패드 프리즘 소프트웨어를 사용하여 데이터를 분석하고, DLL4 발현 세포와 결합하는 최대 DLL4 항체의 50%를 달성하는 항체의 농도로서 EC₅₀ 값을 결정하였다.

[1168] 실시예 1.4: DLL4 항체에 의한 용해성 DLL4 세포외 도메인과의 노치-1 상호작용의 억제 (경쟁 ELISA).

[1169] 96-웰 Nunc-Immuno 평판 (huDLL4 ELISA를 위한 #439454) 및 96-웰 Costar 평판 (muDLL4 ELISA를 위한 #9018)을

16 nM 사람 노치-1 (R&D Systems #3647-TK, D-PBS중의 100 μl /웰)로 피복하고 4°C에서 밤새 배양하였다. 이어서, 평판을 세정 완충액 (PBS, 0.05% Tween-20)으로 3회 세척하고 200 μl /웰의 차단 완충액 (D-PBS, 1% BSA, 1 mM CaCl₂, 0.05% Tween-20)으로 25°C에서 1시간 동안 차단시켰다. 차단하는 동안, 바이오틴 표지된 사람 DLL4 세포외 도메인 (14 nM)을 항체 (30 pM-66 nM, 차단 완충액중에 3배 연속 희석)와 25°C에서 진탕시키면서 1시간 동안 혼합하였다. 차단 후 검정 평판을 세척하고 DLL4/항체 혼합물 (100 μl /웰, 진탕하면서 25°C에서 1시간)과 배양하였다. 평판을 재차 세척하고 100 μl /웰의 HRP-결합된 스트렙타비딘 (Fitzgerald #65R-S104PHRpx, 차단 완충액중에 1:5,000 희석)을 진탕시키면서 25°C에서 1시간 동안 첨가하였다. 최종 세척 후, 평판을 100 μl /웰의 기질 (TMB Sigma #T8665)로 전개하고 8분간 25°C에서 배양한 후 (muDLL4 ELISA의 경우) 및 20분간 25°C에서 배양한 후 (huDLL4 ELISA의 경우) 100 μl /웰의 1N HCl을 사용하여 반응을 정지시키고, 450 nm에서 흡광도를 판독하였다. 데이터를 그래프패드 프리즘 소프트웨어를 사용하여 분석하고 노치1에 결합하는 DLL4의 50% 감소를 달성하는 항체의 농도로서 IC₅₀ 값을 결정하였다.

[1170] 실시예 1.5: 유세포분석에 의해 결정된, 항-DLL4 모노클로날 항체에 의한 DLL4-과발현 293G 세포에 용해성 노치의 결합의 차단.

[1171] 노치 차단 검정: 간단히 설명하면, 세포-표면 DLL4를 과발현하는 안정한 세포주를 조직 배양 플라스크로부터 수확하고 1% 소혈청 알부민 및 1 mM CaCl₂ (FACS 완충액)이 함유된 인산염 완충 염수 (PBS)중에 재현탁시켰다.

HEK293-hDLL4 또는 HEK293-mDLL4 세포를 96-웰 평판 (v형 바닥)에 FACS 완충액중의 1.5×10^5 세포/웰로 분배하였다. 세포를 원심분리하여 침전시키고 상청액을 버린 후 적절히 희석된 50 μl 의 정제된 IgG를 각 웰에 첨가하고 4°C에서 60분간 배양한 다음, hDLL4-293G의 경우 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 또는 mDLL4-293G 경우 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 (최종적으로 1.0 또는 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 노치1-바이오틴 50 μl /웰을 첨가하고 추가로 1시간 동안 4°C 하에 빙상에서 배양하였다. 세포를 FACS 완충액으로 2회 세척한 후, 50 μl 의 R-피코에리트린-공액결합된 스트렙타비딘 (FACS 완충액 중에 1:150 희석) (Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania, US, 카탈로그 번호 016-110-084)을 첨가하였다. 빙상에서 배양 후 (4°C, 60분), 세포를 3회 세척하고 FACS 완충액에 재현탁시켰다. Becton Dickinson FACSCalibur-HTS (Becton Dickinson, San Jose, California, US)를 사용하여 형광을 측정하였다. 그래프패드 프리즘 소프트웨어를 사용하여 데이터를 분석하고, DLL4 발현 세포와 결합하는 노치1의 50% 감소를 달성하는 항체의 농도로서 IC₅₀ 값을 결정하였다.

[1172] 실시예 1.6: DLL4 항체에 의한 EA.hy926 세포에서의 sVEGFR1 (sFLT1)의 DLL4-의존 증가의 억제

[1173] 96-웰의 조직 배양 평판을 D-PBS (Gibco #14190)중의 100 μl /웰의 사람 DLL4 세포외 도메인 (1.67 mg/ml)으로 피복하였다. 평판을 D-PBS로 1회 세척하고, 4000 EA.hy926 세포/웰을 항체의 부재 또는 존재하에 식종하였다. 4일 후, CyQUANT 세포 증식 검정 키트 (Invitrogen, #C35007)로 세포 증식을 측정하였다. ELISA 키트 (R&D Systems #DVR100B)를 제조사의 권장사항에 따라 사용하여 조건 배지중의 sVEGFR1 발현을 검출하였다. 세포 증식의 차이를 설명하기 위해 sVEGFR1의 양을 CyQUANT 검정에 의해 결정된 RFU로 정규화하였다.

[1174] 실시예 1.7: 노치 리포터 검정을 이용함으로써 DLL4 항체에 의한 EA.hy926 세포에서의 DLL4-의존 노치 활성화의 억제

[1175] 96-웰 블랙 명지 조직 배양 평판에 밤새 노치-반응성 프로모터에 의해 작동되는 루시퍼라제를 발현하는 EA.hy926 세포를 7000개 세포/웰로 식종하였다. 200 nM로부터 연속 희석된 항체를 완전한 DLL4를 발현하는 HEK293G 세포와 등량의 5000개 세포/웰로 15분간 혼합하였다. 293G/DLL4 세포를 피검 항체의 존재하에서 24시간 동안 EA.hy926 노치 수용체 세포와 공동배양하였다. 루시퍼라제 활성은 프로메가의 기질 (Promega #E2940)로 분석하였다.

[1176] 실시예 1.8: 분자의 동질성 및 물리화학적 특성을 위한 분석 방법 및 기술.

[1177] PEG 침전 방법.

[1178] 용량 배제의 원칙에 따라 고체 단백질의 상 분리를 유도하기 위한 PEG의 사용은 단백질의 용해성을 분석할 수 있는 대표적인 방법이다. PEG는 다른 침전물에 비해 몇 가지 이점을 제공하는데, 예를 들면 주변온도에서의 단백질의 최소 변성 (단백질의 삼차원 구조에 영향을 미치지 않음) 및 4°C 내지 30°C의 범위에서 온도 조절이 필요하지 않다 (즉, 실험실의 주변온도에서 침전 연구를 실시할 수 있다)는 것이다.

[1179] 일반적으로, PEG에 의한 단백질의 침전은 용량 배제 효과에 근거하여 설명된다. 이의 이론에 따르면, 단백질들

은 PEG 선형 쇄에 의해 점유되는 용매의 영역으로부터 입체적으로 배척된다. 결과적으로, 단백질은 이들의 용해성이 초과될 때 농축되고 결국 침전된다. 열역학 관점에서, 입체적 배척은 단백질이 순수한 고체 상태의 화학포텐셜을 초과할 때까지 그 단백질의 화학포텐셜을 증가시켜 주어 결국 단백질이 침전된다. 이것은 주로 PEG와 단백질간의 상호작용의 커다란 초과 자유 에너지로 인해 입체적 배제 효과에 의한 단백질의 우선적 수화가 감소하게 됨으로써 발생한다. 수용액에서, 우선적 수화는 단백질이 고유 구조를 유지하는데 도움을 준다. 일반적으로, 용량 배척은 PEG의 분자량이 증가할수록 더 효과적인 것으로 알려져 있다. 즉, PEG의 분자량이 클수록 단백질을 침전시키는데 필요한 PEG는 더 적다.

[1180] 본 발명에 따른 항체의 용해성을 결정하는데 3000의 PEG 분자량이 선택되었다. PEG를 탈이온수중에 PEG 1 그램 대 물 1 mL의 비율로 용해시켜 50% PEG 용액을 수득하였다. 이어서 이 PEG 용액을 초기 농도가 0.5 mg/ml 이하이고 용량이 0.5 mL인 항체 용액에 첨가한다. 최초 탁도가 지속될때까지 PEG 용액을 계속 첨가하고 혼합한다. 이러한 침전을 유발하는데 필요한 PEG 3000의 퍼센트는 $50 \times (\text{첨가된 PEG 3000 용액의 용량}/\text{PEG 첨가 이전의 항체 용액의 최초 용량})$ 으로 계산한다.

[1181] 침전에 필요한 PEG 3000의 퍼센트는 공지된 수용성을 갖는 단백질의 침전에 필요한 퍼센트와 비교한다. 예를 들어, 아달리무마브의 수용성은 200 mg/mL을 초과한다. 결과적으로, 해당 단백질의 침전을 위해 필요한 PEG 3000의 퍼센트가 아달리무마브의 침전을 위해 필요한 퍼센트와 비슷한 경우 해당 단백질의 추정 용해성은 아달리무마브의 용해성과 유사할 것이다.

1182] 순용해성 방법

[1183] 아미콘 원심분리 필터를 사용하여 단백질이 용액으로부터 침전되는 것이 관찰될때까지 또는 단백질이 필터 유닛 내에 농축될 수 있는 최소 용량이 도달될때까지 용액중의 단백질을 농축시켜 순용해성을 결정한다. 후자의 경우, 15 mL 아미콘 원심분리 필터는 약 50 μl 의 최소 용량을 갖는 한편 4 mL 아미콘 원심분리 필터는 약 15 μl 의 최소 용량을 갖는다.

[1184] 처음에 단백질을 특정 제형내로 투석한다. 이들 연구를 위해, 항체의 양은 10 mg 또는 그 이하이다. 이어서, 단백질 용액을 아미콘 원심분리 필터의 투석유물 챔버내로 투입한다. 원심력의 작용에 의해 10 내지 30 킬로달톤의 분자들이 통과되도록 하는 기공을 갖는 니트로셀룰로즈 막들이 챔버를 따라 늘어서 있다. 전형적으로 140 킬로달톤 이상인 항체들은 걸러지는 한편, 물, 완충 분자, 작은 부형제 및 염들은 통과한다. 그런 다음, 원심분리 필터를 제조사의 설명에 따라 단백질이 용액으로부터 침전하는 것이 관찰될때까지 또는 필터 유닛내에 단백질이 농축될 수 있는 최소 용량이 도달될때까지 원심분리한다.

[1185] 원심분리 후, 투석유물 챔버로부터 단백질 용액을 제거하고 자외선 흡광도에 의해 농축을 측정한다. 그런 다음, 용액을 25°C 및 5°C에서 1 내지 2일간 저장하고 침전 징후를 모니터링한다.

1186] 근자외선(UV)-CD 기술.

[1187] 근 UV-CD 분광기는 단백질의 삼차원 구조에 대해 중요한 정보를 제공하며, 이러한 관점에서 가장 많이 사용되고 있는 기술중 하나이다. CD는 평면 편파 방사의 좌우 원편광 성분들의 차등흡수를 가리킨다. 단백질의 경우, 근 UVCD 영역 (250 - 320 nm)내의 발색단은 방향족 아미노산 (즉, 트립토판, 티로신 및 페닐알라닌) 및 디설파이드 결합이며, 발색단이 비대칭 환경에 존재할때 CD 효과가 발생한다. 250-270 nm 영역의 신호는 페닐알라닌 잔기에 의한 것이고, 270-290 nm의 신호는 티로신에 의한 것이며, 280-300 nm의 신호는 트립토판에 의한 것이다. 디설파이드 결합은 근-UV 스펙트럼에 걸친 광범위하고 약한 신호를 발생한다. 근-UV CD 스펙트럼은 단백질-단백질 상호작용에 의한 것과 같은 삼차원 구조에서의 작은 변화 및/또는 제형 상태에서의 변화에 민감할 수 있다.

[1188] 방향족 아미노산의 CD 스펙트럼에 영향을 미칠 수 있는 다른 요인들이 많이 있다. 이들 가운데는 (1) 단백질의 경직도, (2) 수소 결합의 성질 및 (3) 다양한 방향족 아미노산들간의 상호작용이 포함된다. 추가로, 다수의 그러한 아미노산을 갖는 단백질은 양성 및 음성 밴드의 소멸로 인해 보다 작은 CD 밴드를 가질 수 있다.

[1189] 간단히 설명하면, 단백질을 1 mg/ml의 목적하는 제형으로 투석하여 Jasco 800 CD 분광기로 250-320 nm 또는 240-320 nm에서 스캐닝한다. 단백질이 없는 상응하는 제형 또한 스캐닝하고 이를 판독 결과를 상기 단백질 용액을 스캔하여 얻은 판독 결과에서 차감한다. 근 UV-CD 스펙트럼은 몰 타원율 대 250 또는 240 내지 320 nm 파장의 도표이다.

[1190] 일반적으로 항체의 경우, 반-S자형 프로필을 갖는 근 UV-CD 스펙트럼은 양호한 삼차원 구조 폴딩을 나타내는 한

편, 편평하고 뚜렷지 않은 프로필은 단백질 구조의 폴립 성향이 좀 더 크다는 것을 가리킨다. 조밀한 폴딩은 양호한 안정성과 연관이 있는 한편, 양호하지 않은 폴딩은 소수성 내부를 드러내며 이것은 단백질 분자간의 소수성 상호작용을 유도할 수 있고 결과적으로 원치않는 응집체의 형성을 초래한다.

[1191] DSC 기술.

[1192] 항체의 열 안정성을 DSC 장비로 측정하였다. 사용된 DSC 장비는 Capillary Cell이 장착된 자동 VP-DSC 장비 (Microcal, GE Healthcare Ltd./Microcal, Buckinghamshire, UK)이다. 분자들의 폴립은 1 mg/mL의 시료를 25 °C 내지 95°C 온도 범위에 1°C/분 스캔 속도로 적용시켜 연구하였다. 추가의 측정 변수로 16초의 설정 기간 및 10분의 스캔전 예비 시간이 적용되었고 측정은 비-피드백 모드로 실시하였다. 각각의 측정시마다 420 μl 의 시료/블랭크를, 아래에 제시된 플레이트 충진 계획에 맞춰, DSC 측정 시료 훌더에 충진하였다. 수득한 써모그램을 비이상(non-two-state) 모델에 피팅하여 상이한 전이들의 중간 온도 및 엔탈피를 수득하였다.

[1193] 성공적인 생물학적 개발 후보물질의 추가적인 요건은 단백질이 이의 고유 상태 및 형태를 보존해야 한다는 것이다. 수용액중의 단백질은 고유 (폴딩) 형태와 변형 (폴립) 형태사이에서 평형을 이룬다. 고유 상태의 안정성은 계의 Gibbs 자유 에너지 (DG)의 크기 및 변화하는 에탈피 (DH)와 엔트로피 (DS)사이의 열역학 관계에 기초한다. 양성 DG는 고유 상태가 변형 상태보다 더 안정하다는 것을 가리키며, DG가 더 양성일 수록 안정성을 더 높아진다. 단백질이 폴리는 경우 안정화 힘은 붕괴될 필요가 있다. 형태 엔트로피는 안정화 힘을 능가하여 엔트로피가 우점적인 온도에서 단백질이 폴리도록 한다. DSC는 열 변성으로 인한 단백질 폴립의 DH를 측정한다. 일반적 규칙으로서, 전이 중간점 (T_m)이 높을 수록 단백질은 낮은 온도에서 더 안정적이다. 동일한 실험동안에 DSC는 또한 단백질 변성에 대한 열용량 (DCp)의 변화를 측정한다. 단백질 폴립과 연관된 열용량 변화는 주로 고유 상태에 묻혀있으나 변성 상태에서 용매에 노출되는 측쇄의 수화가 변화하기 때문이다. DSC는 단백질 및 기타 생물학적 거대분자의 액체 제제 안정성에 대한 가치있는 예측기인 것으로 알려져 왔다 (Remmele and Gombotz, *BioPharm.*, 13: 36-46 (2000) 및 Remmele et al., *Pharm. Res.*, 15: 200-208 (1998)).

[1194] SEC 기술.

[1195] 크기별 배제 크로마토그래피를 사용하여 크기에 기초하여 단백질을 분리하였다. 단백질은 수성 이동상에 포함되어 다공성 정지상 수지를 통해 컬럼에 저장된다. 컬럼내에 보존시간은 단백질의 수역학 크기와 보관된 수지 베드의 기공 크기의 함수이다. 보다 작은 분자들은 수지의 보다 작은 기공을 통과할 수 있고 보다 큰 분자보다 보다 오래 보존된다. 컬럼으로부터 용출되는 단백질은 UV 흡광에 의해 검출한다. SEC 방법은 TSK 젤 가드 (TOSOH Biosciences, Montgomeryville, Pennsylvania, US, 카탈로그 번호 08543) 및 TSK 젤 G3000SWxL (TOSOH Biosciences, Montgomeryville, Pennsylvania, US, 카탈로그 번호 08541)을 사용하였다. 이동상은 100 mM Na₂HPO₄, 200 mM Na₂SO₄, pH 6.8이다. 유속은 0.25 mL/분이다. 주입 용량은 20 μl 의 1 mg/mL 시료이다. 컬럼 온도는 실온이다. 자동시료처리기 온도는 2-8°C이다. 총 가동 시간은 55분이다. 검출은 214 nm 파장에서 UV 흡광을 기초로 하였고, 밴드 너비는 8 nm로 설정되었고 대조 파장은 360 nm로 밴드 너비는 100 nm이다.

[1196] 동결-해동 방법.

[1197] 목적하는 제형중에 1 mg/ml의 항체 용액을 -80°C에서 4시간 이상 동안 동결한 다음 30°C의 수욕에서 해동한다. 이어서, 용액을 -80°C에서 재동결시킨다. 이 과정을 5회 반복한다. 특정 동결-해동 주기 (예, 2회 및 4회) 후에, 재동결하기 전에 SEC에 의한 분석을 위해 용액의 일부를 수거할 수 있다. 변성시키는 빙수 계면에 단백질 분자를 상당히 노출시킴으로 인해 발생될 "악화-사례 시나리오"를 얻고자 동결-해동 안정성 시험을 낮은 단백질 농도에서 실시한다. 보다 높은 농도에서, 비율적으로 보다 적은 단백질은 다른 단백질 분자와 상호작용하는 대신에 빙수 계면에 직면한다.

[1198] 가속 안정성 방법.

[1199] 목적하는 제형중의 1 mg/ml의 항체 용액을 무균 조건하에서 0.22 μm PVDF 필터에 통과시키고 40°C 및/또는 50°C에서 적어도 21일간 배양한다. 7일 및 21일째에, 분획을 무균 상태에서 수거하고 SEC에 의해 분석한다. 이어서, 용액을 다시 배양한다.

[1200] 실시예 2: PROFusion mRNA 디스플레이 기술에 의한 항-DLL4 사람 모노클로날 항체 E9 및 A10의 생성 및 분리.

[1201] PROFusion mRNA 디스플레이 기술 (Chung-Ming Hsieh 등의 미국특허원 공개번호 2010/0099103)을 사용하여, 수집한 사람 비장 및 림프절 항체 라이브러리를 DLL4 항원에 대해 7회에 걸쳐 선택하였다: 100 nM 바이오팁-표지된 사람 DLL4 세포와 도메인 (1회차 및 2회차), 50 nM 바이오팁-표지된 사람 DLL4 세포와 도메인과 50 nM 바이

오톤-표지된 마우스 DLL4 세포와 도메인의 혼합물 (3회차), 100 nM 바이오톤-표지된 사람 DLL4 세포와 도메인 (4회차 및 5회차), 사람 DLL4를 안정하게 발현하는 293G 세포와 100 nM 바이오톤-표지된 사람 DLL4 세포와 도메인 (6회차), 사람 및 마우스 DLL4를 안정하게 발현하는 BAF3 세포 (7회차). A10 및 E9 둘 다는 항체 라이브러리의 7회차 선택으로부터 동정되었다 (표 4). 야생형 사람 IgG1에서 작제된 경우 이들은 각각 A10.1 및 E9.1로 명명한다.

표 4

항-DLL4 PROfusion 완전 사람 항체 클론 E9 및 A10 서열 정보
(Kabat 번호에 따른 방식에 따른 CDR은 밀줄쳐서 나타낸다)

클론	출처	동종형	V 영역	생식 세포	서열
E9	사람 림프절	hulgG1: VL(λ), VH(L234, 235A)	VH	VH4-39	12345678901234567890 EVQLQESGGGLVKGPSVTL TCTVSGGSISSSSSYYWGWR QPPGKGLEWIQDIYVTGSTY YNPSLKSRSVTISVDTSKNQF SLKLSLSVTAADTAVYYCARE DVILRGGSQYWQGTLVTVS S (SEQ ID NO:1)
					SYELTQPPSVSPGQQTASI TCSGORLGDKYASWYQOKPG QSPVVLVIYEDSKRPSGIPER FSGSNSGDTATLTISGTQPM DEADYYCQAWDRDTGVFGY TRVTVL (SEQ ID NO:111)
A10	사람 비장	hulgG1: VL(λ), VH(L234, 235A)	VH	VH3-30	EVQLLESGGGLVKGPSLRL SCAASGFTFRSHWMSWVRQA PGKGLEWVAISYDGSNKYS ADSVKGRFTISRDNSKNTLY LQLNLSRAEDTAVYYCAKAG GGNVGFDTIWGQGTMVTVSS (SEQ ID NO:112)
					LPVLTQPPSVSPGQQTASI TCSADKLGTKVSYWQOKPG QSPVVLVIYQDAKRPSSGIPER FSGSNSGNTATLTISGTQTM DEADYLCQSWDRSDVVFGGG TKVTVL (SEQ ID NO:113)

[1202]

실시예 3: PROfusion 항체 E9 및 A10의 시험관내 성상확인

[1204]

E9 및 A10에 대한 DLL4 항원 결합 친화성을 실시예 1.1에 기술된 바와 같이 BIACORE 기술로 결정하였다. 아래 표5에서 보는 바와 같이, E9 및 A10은 사람 DLL4 (각각 3.36 및 6.68 nM의 K_D) 및 사이노몰거스 원숭이 DLL4 (각각 4.2 및 7.8 nM의 K_D)에 대해 비슷한 평형 분리 상수 값을 갖는다. 또한, E9는 마우스 및 랫트 DLL4와 교차반응한다 (각각 16 및 15 nM의 K_D).

표 5

항-DLL4 PROfusion 항체에 대한 바이아코어 역학

MAb	바이아코어 역학											
	huDLL4 ECD			cynoDLL4 ECD			muDLL4 ECD			ratDLL4 ECD		
	K _a	K _d	K _D	K _a	K _d	K _D	K _a	K _d	K _D	K _a	K _d	K _D
E9	2.0 E+04	6.6 E-05	3.36	1.8 E+04	7.4 E-05	4.2	1.8 E+04	2.6 E-04	16	1.9 E+04	2.9 E-04	15
A10	2.2 E+04	1.5 E-04	6.68	1.9 E+04	1.5 E-04	7.8	--	--	NB	--	--	NB

[1205]

MAb = 모노클로날 항체; E = $10 \times$ 표시된 지수; K_a ($M^{-1} s^{-1}$); K_d (s^{-1}); K_D (nM); NB = 무결합 (900 nM DLL4).

[1206]

또한, ELISA 및 FACS를 기초로 한 검정을 사용하여 항체-항원 결합 활성을 측정하였다 (실시예 1.2, 1.3에 기술되어 있으며 EC₅₀ 값은 표 3에 수록되어 있다). 재조합 DLL4 세포와 도메인 (ECD)와의 결합이외에, E9 및 A10

은 모두 세포 표면에 발현된 DLL4와 결합할 수 있다 (표 6).

[1208] DLL4와 이의 수용체 노치1과의 상호작용을 차단하는 항체의 능력을 실시예 1.4 및 1.5에 기술된 바와 같이 ELISA 및 FACS를 기초로 한 경쟁 검정으로 측정하였다. 표 6에서 보는 바와 같이, E9 및 A10은 DLL4 (ECD 및 세포-결합 형태)와 노치1의 상호작용을 효율적으로 차단하였다. 또한, 실시예 1.6 및 1.7에 기술된 바와 같이, 항체가 시험관내에서 DLL4-매개된 세포 활성을 중화하는 능력을 결정하는 세포-기본 기능 검정이 개발되었다. E9 및 A10은 EA.hy926 세포에서 DLL4-유도된 노치 활성화 및 sVEGFR1 발현을 억제하였다 (표 6).

표 6

PROfusion DLL4 항체 시험관내 효능

MAb	직접 결합 검정						기능 차단 검정							
	포획 ELISA (EC ₅₀ , nM)			FACS (EC ₅₀ , nM)			경쟁 ELISA (IC ₅₀ , nM)			경쟁 FACS (IC ₅₀ , nM)			huDLL4를 통한 노치 활성화의 억제 공동 배양 (IC ₅₀ , nM)	
	DLL4 ECD			DLL4 Cells			DLL4 ECD/ huNotch-1			DLL4 ECD/ EaHy 세포				
	hu	mu	cyno	hu	mu	hu	mu	cyno	hu	mu	hu	mu		
E9	0.17	0.18	0.40	7.23	0.32	1.7	2.1	2.1	23.4	3.2	1.0	0.4	6.2	
A10	0.17	-	0.44	0.93	-	2.6	-	5.1	4.4	-	1.5	-	7.3	

[1209]

MAb = 모노클로날 항체; hu = 사람; mu = 쥐; cyno = 사이노몰거스 원숭이

[1210]

실시예4: PROfusion 항체 E9 및 A10의 친화성 성숙

[1211]

항-DLL4 E9 친화성 성숙

[1212]

서열 배열은 DLL4 항체 E9가 사람 배선 VH4-39/JH4 및 V2-1/JL6와 최고의 동일성을 가짐을 보여주었다. DLL4에 대한 E9의 친화성을 개선하기 위해, 배선 VH4-39 및 V2-1과 최고의 동일성을 갖는 IgBLAST 데이터베이스내 다른 사람 항체 서열로부터 초돌연변이된 CDR 잔기를 동정하였다. 이어서, 상응하는 E9 CDR 잔기를 이들 위치에서 낮은 축중을 갖는 프라이머를 이용한 PCR에 의해 한정 돌연변이유도에 적용하여 친화성 성숙 과정에 사용하는데 적합한 scFv 형태에서 3가지 항체 라이브러리를 생성하였다. 제1 라이브러리는 VH CDR1 및 2의 30, 31, 32, 33, 50, 54, 56 및 65번 잔기 (Kabat 방식의 번호매김)에서 돌연변이를 함유하며; 제2 라이브러리는 VH CDR3의 95 내지 100, 100a, 100b, 100c 및 102번 잔기에서 돌연변이를 함유하고; 제3 라이브러리는 세가지 VL CDR의 27, 30, 31, 33, 52, 53, 93 내지 96번 잔기에서 돌연변이를 함유하였다. 사람 배선 골격 서열에 대한 E9의 동일성을 추가로 증가시키기 위해, VL 위치 103의 Arg를 Lys로 돌연변이시키고 VL 위치 80 (A/P) 및 100 (S/Y)의 이원 축중을 제3 라이브러리에 도입하였다 (표 7).

표 7

친화성 성숙을 위한 E9 VH 및 VL 아미노산 서열의 돌연변이.

돌연변이된 E9 VH 서열 (서열번호 114):

EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSSYYWGWI	RQPPGKGLEWIGDIYYTGSTYY	
NNGN	S	N N N
G NT	L	A T
R G		I G
R		S
		R
NPSLKS RVTISV DTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARE	EDVILRGGS DYWGQGTLVTVSS	
N	E	YAMAYGGAA D
D	FSLPFS	SL S
G	QGPRMQ	V N
	WV S A	R H
	LE K	E
	AN Q	R
	V	L
	G	P
	M	C
	E	I
		M

돌연변이된 E9 VL 서열 (서열번호 115):

SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGQRLGDKYASWYQQKPGQSPV	LVIYEDSKRPSGIPER
ES E V	Q LT
DG	TE
M	AN
K	EQ
L	FS
T	M
FSGSNNSGDTATLTISGTQPMDEADYYCQAWDRDTGVFGY	GTRVTVL
A	SEVA S K
M AC	
E S	
N M	
K	

[1214]

[1215] 이들 E9 라이브러리를 세포에 형질도입하고 세포 표면을 마그네틱에 이어 유세포분석기 (FACS)에 의해 디스플레이하여 저농도의 바이오티널화 DLL4 세포와 도메인에 대해 선택하였다. 향상된 정반응 속도, 역반응 속도 또는 둘 다에 대한 선택을 실시하고 친화성-조절된 E9 클론의 항체 단백질 서열 (표 8)을 IgG 형태로 재전환시켜 추가로 성상확인하기 위해 회수하였다.

표 8

항-DLL4 항체 E9에 대한 친화성 성숙 라이브러리로부터 동정된 항체 클론의 단백질 서열.

친화성 성숙된 클론: 중쇄(VH) 영역			
	CDR1	CDR2	CDR3
E9.4	SSYYWG (서열번호 : 117)	DIYYTGSTYYNPSLKS (서열번호 : 118)	YDVSLLGGSSDH (서열번호 : 119)
(SEQ ID NO:120)			
E9.11	CDR1	CDR2	CDR3
	SSYYWG (서열번호 : 121)	DIYYTGSTYYNPSLKS (서열번호 : 122)	EAVPLGGGSDY (서열번호 : 123)
(SEQ ID NO:124)			
E9.14	CDR1	CDR2	CDR3
	NSRYHWG (서열번호 : 125)	DIYYTGSTYYNPSLKS (서열번호 : 126)	EDVILRGGSODY (서열번호 : 127)
(SEQ ID NO:128)			
E9.17	CDR1	CDR2	CDR3
	SSYYWG (서열번호 : 129)	DIYYTGSTYYNPSLKS (서열번호 : 130)	EEA1LGGGSDY (서열번호 : 131)
(SEQ ID NO:132)			
E9.18	CDR1	CDR2	CDR3
	SSGYWG (서열번호 : 133)	DINYAGSTYYNPSLKS (서열번호 : 134)	EDVILRGGSODY (서열번호 : 135)
(SEQ ID NO:136)			
E9.19			

[1216]

	CDR1	CDR2	CDR3
	SSYYWG (서열번호 : 137)	DIYTGSTYYNPSLKS (서열번호 : 138)	FDVSLGGGSDT (서열번호 : 139)
E9.22	EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISNSRYHWGWIROPPGKGLEWIGDIYY TGSTYYNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLSVTAAADTAVYYCAREDVILRGGSYD WGQGTLTVSS (서열번호 : 140)	CDR1	CDR2
	NSRYHWG (서열번호 : 141)	DIYTGSTYYNPSLKG (서열번호 : 142)	EDVILRGGSYD (서열번호 : 143)
E9.48	EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSGGYYWGWIROPPGKGLEWIGDINY RGSTYYNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLSVTAAADTAVYYCAREDVILRGGSYD WGQGTLTVSS (서열번호 : 144)	CDR1	CDR2
	SSGYYWG (서열번호 : 145)	DINYRGSTYYNPSLKS (서열번호 : 146)	EDVILRGGSYD (서열번호 : 147)
E9.65	EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIRNSRYHWGWIROPPGKGLEWIGDIYY TGSTYYNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLSVTAAADTAVYYCAREDVILRGGSYD WGQGTLTVSS (서열번호 : 148)	CDR1	CDR2
	NSRYHWG (서열번호 : 149)	DIYTGSTYYNPSLKG (서열번호 : 150)	EDVILRGGSYD (서열번호 : 151)
E9.66	EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYWGWIROPPGKGLEWIGDIYY TGSTYYNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLSVTAAADTAVYYCAREGVPLGGGADK WGQGTLTVSS (서열번호 : 152)	CDR1	CDR2
	SSYYWG (서열번호 : 153)	DIYTGSTYYNPSLKS (서열번호 : 154)	EGVPLGGGADK (서열번호 : 155)
E9.71	EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYWGWIROPPGKGLEWIGDIYY TGSTYYNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLSVTAAADTAVYYCARQALAMGGGSDK WGQGTLTVSS (SEQ ID NO:156)	CDR1	CDR2
	SSYYWG (서열번호 : 157)	DIYTGSTYYNPSLKS (서열번호 : 158)	QALAMGGGSDK (서열번호 : 159)
E9.13	EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYWGWIROPPGKGLEWIGDIYY TGSTYYNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLSVTAAADTAVYYCAREDVILRGGSYD WGQGTLTVSS (서열번호 : 160)	CDR1	CDR2
	SSYYWG (서열번호 : 161)	DIYTGSTYYNPSLKS (서열번호 : 162)	EDVILRGGSYD (서열번호 : 163)
E9.16	EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYWGWIROPPGKGLEWIGDIYY TGSTYYNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLSVTAAADTAVYYCAREDVILRGGSYD WGQGTLTVSS (서열번호 : 164)	CDR1	CDR2
	SSYYWG (서열번호 : 165)	DIYTGSTYYNPSLKS (서열번호 : 166)	EDVILRGGSYD (서열번호 : 167)
E9.38	EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYWGWIROPPGKGLEWIGDIYY		

	TGSTYYNPSLKS RVTISVDT SKNQFSLK LSSV TAADT AVYY CARE DVILRGGS DY WGQGTLVTVSS (서열번호 : 168)		
CDR1	CDR2	CDR3	
SSYYWG (서열번호 : 169)	DIYYTGSTYYNPSLKS (서열번호 : 170)	EDVILRGGS DY (서열번호 : 171)	
E9.2B EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSNYYWGWIROPPGKGLEWIGDINY NGNTYYNPSLKS RVTISVDT SKNQFSLK LSSV TAADT AVYY CARE AVALGGG ADD WGQGTLVTVSS (서열번호 : 172)			
CDR1	CDR2	CDR3	
SSNYWG (서열번호 : 173)	DINYNGNTYYNPSLKS (서열번호 : 174)	EAVALGGG ADD (서열번호 : 175)	
E9.1F EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSGSYYWGWIROPPGKGLEWIGDINY IGSTYYNPSLKS RVTISVDT SKNQFSLK LSSV TAADT AVYY CARE AVE SFGGG ADDS WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:176)			
CDR1	CDR2	CDR3	
SGSYYWG (서열번호 : 177)	DINYIGSTYYNPSLKS (서열번호 : 178)	EA VSF GGG ADDS (서열번호 : 179)	
E9.10H EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSGYWGWIROPPGKGLEWIGDIYY TGSTYYNPSLKS RVTISVDT SKNQFSLK LSSV TAADT AVYY CARE EEVILGGGADQ WGQGTLVTVSS (서열번호 : 180)			
CDR1	CDR2	CDR3	
SSGYWG (서열번호 : 181)	DIYYTGNTYYNPSLKN (서열번호 : 182)	EEVILGGGADQ (서열번호 : 183)	
E9.5E EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSYYWGWIROPPGKGLEWIGDINY IGSTYYNPSLKS RVTISVDT SKNQFSLK LSSV TAADT AVYY CARE ESVPLGGGADE WGQGTLVTVSS (서열번호 : 184)			
CDR1	CDR2	CDR3	
SSYYWG (서열번호 : 185)	DINYIGSTYYNPSLKS (서열번호 : 186)	ESVPLGGGADE (서열번호 : 187)	
E9.10C EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSGYWGWIROPPGKGLEWIGDIYY TGSTYYNPSLKS RVTISVDT SKNQFSLK LSSV TAADT AVYY CARE QAVMYGGGSDN WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:188)			
CDR1	CDR2	CDR3	
SGSYYWG (서열번호 : 189)	DIYYTGSTYYNPSLKS (서열번호 : 190)	QAVMYGGGSDN (서열번호 : 191)	
E9.7E EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSYYWGWIROPPGKGLEWIGDIYY AGSTYYNPSLKD RVTISVDT SKNQFSLK LSSV TAADT AVYY CARE EDMILGGGADN WGQGTLVTVSS (서열번호 : 192)			
CDR1	CDR2	CDR3	
SSYYWG (서열번호 : 193)	DIYYAGSTYYNPSLKD (서열번호 : 194)	EDMILGGGADN (서열번호 : 195)	
E9.12B EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSNYWGWIROPPGKGLEWIGDIYY TGSTYYNPSLKS RVTISVDT SKNQFSLK LSSV TAADT AVYY CARE EAVSF GGG ADDS WGQGTLVTVSS (서열번호 : 196)			
CDR1	CDR2	CDR3	
SSNYWG (서열번호 : 197)	DIYYTGSTYYNPSLKS (서열번호 : 198)	EA VSF GGG ADDS (서열번호 : 199)	

E9.10E EVQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSINSGNYYWGWIRQPPGKGLEWIGDINY TGSTYYNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAAADTAVYYCAREDVMYGGGDS WQGTLTVSS (서열번호 :200)		
CDR1	CDR2	CDR3
SGNYYWG (서열번호 :201)	DISYTGSTYYNPSLKS (서열번호 :202)	EDVMYGGGDS (서열번호 :203)
E9.6A EVQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSISSSYYWGWIRQPPGKGLEWIGDINY AGSTYYNPSLKN RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAAADTAVYYCAREAVALGGGADS WQGTLTVSS (SEQ ID NO:204)		
CDR1	CDR2	CDR3
SSYYW (서열번호 :205)	DINYAGSTYYNPSLKN (서열번호 :206)	EAVALGGGADS (서열번호 :207)
E9.7A EVQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSISSSYYWGWIRQPPGKGLEWIGDINY AGSTYYNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAAADTAVYYCAREDVKFGGGADL WQGTLTVSS (서열번호 :208)		
CDR1	CDR2	CDR3
SSYYW (서열번호 :209)	DINYAGSTYYNPSLKS (서열번호 :210)	EDVKFGGGADL (서열번호 :211)
E9.8H EVQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSISGSYYWGWIRQPPGKGLEWIGDIYY TGSTYYNPSLKN RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAAADTAVYYCARESVPLGGGADN WQGTLTVSS (서열번호 :212)		
CDR1	CDR2	CDR3
SGSYYW (서열번호 :213)	DIYTGSTYYNPSLKN (서열번호 :214)	ESVPLGGGADN (서열번호 :215)
천화성 성숙된 클론: 경쇄(VL) 영역		
E9.13 SYELTQPPSVSPGQTASITCSGERLGDKYVSWYQQKPGQSPVLVYEDSERPS GIPERFSGNSGDTATLTISGTQPMDEADYYCQAWDSETGVFGSGTKVTVL (서열번호 :216)		
CDR1	CDR2	CDR3
SGDTLGDKYVS (서열번호 :217)	EDSERPS (서열번호 :218)	QAWDSETGV (서열번호 :219)
E9.16 SYELTQPPSVSPGQTASITCSGERLGDKYVSWYQQKPGQSPVLVYEDFKRPS GIPERFSGNSGDTATLTISGTQPMDEADYYCQAWDRDTGVFGYGTKVTVL (서열번호 :220)		
CDR1	CDR2	CDR3
SGERLGDKYVS (서열번호 :221)	EDFKRPS (서열번호 :222)	QAWDRDTGV (서열번호 :223)
E9.38 SYELTQPPSVSPGQTASITCSGQRLGDKYVSWYQQKPGQSPVLVYEDSKRPS GIPERFSGNSGDTATLTISGTQPMDEADYYCQAWDRDVGVFGSTKVTVL (서열번호 :224)		
CDR1	CDR2	CDR3
SGQRLGDKYVS (서열번호 :225)	EDSKRPS (서열번호 :226)	QAWDRDVGV (서열번호 :227)
E9.4	SYELTQPPSVSPGQTASITCSGQRLGDKYASWYQQKPGQSPVLVYEDSKRPS	

[1219]

	GIPERFSGNSGDTATLTISGTQPMDEADYYCQAWDRDTGVFGYGTKVTVL (서열번호 :228)		
CDR1	CDR2	CDR3	
SGQRLGDKYAS (서열번호 :229)	EDSKRPS (서열번호 :230)	QAWDRDTGV (서열번호 :231)	
E9.11	SYELTQPPSVSPGQTASITCSGQRLGDKYASWYQQKPGQSPVLIYEDSKRPS GIPERFSGNSGDTATLTISGTQPMDEADYYCQAWDRDTGVFGYGTKVTVL (SEQ ID NO:232)		
CDR1	CDR2	CDR3	
SGQRLGDKYAS (서열번호 :233)	EDSKRPS (서열번호 :234)	QAWDRDTGV (서열번호 :235)	
E9.14	SYELTQPPSVSPGQTASITCSGQRLGDKYASWYQQKPGQSPVLIYEDSKRPS GIPERFSGNSGDTATLTISGTQPMDEADYYCQAWDRDTGVFGYGTKVTVL (서열번호 :236)		
CDR1	CDR2	CDR3	
SGQRLGDKYAS (서열번호 :237)	EDSKRPS (서열번호 :238)	QAWDRDTGV (서열번호 :239)	
E9.17	SYELTQPPSVSPGQTASITCSGQRLGDKYASWYQQKPGQSPVLIYEDSKRPS GIPERFSGNSGDTATLTISGTQPMDEADYYCQAWDRDTGVFGYGTKVTVL (서열번호 :240)		
CDR1	CDR2	CDR3	
SGQRLGDKYAS (서열번호 :241)	EDSKRPS (서열번호 :242)	QAWDRDTGV (서열번호 :243)	
E9.18	SYELTQPPSVSPGQTASITCSGQRLGDKYASWYQQKPGQSPVLIYEDSKRPS GIPERFSGNSGDTATLTISGTQPMDEADYYCQAWDRDTGVFGYGTKVTVL (서열번호 :244)		
CDR1	CDR2	CDR3	
SGQRLGDKYAS (서열번호 :245)	EDSKRPS (서열번호 :246)	QAWDRDTGV (서열번호 :247)	
E9.19	SYELTQPPSVSPGQTASITCSGQRLGDKYASWYQQKPGQSPVLIYEDSKRPS GIPERFSGNSGDTATLTISGTQPMDEADYYCQAWDRDTGVFGYGTKVTVL (서열번호 :248)		
CDR1	CDR2	CDR3	
SGQRLGDKYAS (서열번호 :249)	EDSKRPS (서열번호 :250)	QAWDRDTGV (서열번호 :251)	
E9.22	SYELTQPPSVSPGQTASITCSGQRLGDKYASWYQQKPGQSPVLIYEDSKRPS GIPERFSGNSGDTATLTISGTQPMDEADYYCQAWDRDTGVFGYGTKVTVL (서열번호 :252)		
CDR1	CDR2	CDR3	
SGQRLGDKYAS (서열번호 :253)	EDSKRPS (서열번호 :254)	QAWDRDTGV (서열번호 :255)	
E9.48	SYELTQPPSVSPGQTASITCSGQRLGDKYASWYQQKPGQSPVLIYEDSKRPS GIPERFSGNSGDTATLTISGTQPMDEADYYCQAWDRDTGVFGYGTKVTVL (서열번호 :256)		
CDR1	CDR2	CDR3	
SGQRLGDKYAS (서열번호 :257)	EDSKRPS (서열번호 :258)	QAWDRDTGV (서열번호 :259)	

[1220]

E9.65	SYELTQPPSVSPGQTASITCSGQRLGDKYASWYQQKPGQSPVLVIYEDSKRPS GIPERFSGNSNGDTATLTISGTQPMDEADYYCQAWDRDTGVFGYGT KVTVL (서열번호 :60)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SGQRLGDKYAS (서열번호 : 261)	EDSKRPS (서열번호 : 262)	QAWDRDTGV (서열번호 : 263)
E9.66	SYELTQPPSVSPGQTASITCSGQRLGDKYASWYQQKPGQSPVLVIYEDSKRPS GIPERFSGNSNGDTATLTISGTQPMDEADYYCQAWDRDTGVFGYGT KVTVL (서열번호 :264)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SGQRLGDKYAS (서열번호 : 265)	EDSKRPS (서열번호 : 266)	QAWDRDTGV (서열번호 : 267)
E9.71	SYELTQPPSVSPGQTASITCSGQRLGDKYASWYQQKPGQSPVLVIYEDSKRPS GIPERFSGNSNGDTATLTISGTQPMDEADYYCQAWDRDTGVFGYGT KVTVL (서열번호 :268)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SGQRLGDKYAS (서열번호 : 269)	EDSKRPS (서열번호 : 270)	QAWDRDTGV (서열번호 : 271)
E9.2B	SYELTQPPSVSPGQTASITCSGEGLGDKYVSWYQQKPGQSPVLVIYEDSTRPS GIPERFSGNSNGDTATLTISGTQPMDEADYYCQAWDSETGVFGSGTKVTVL (서열번호 :272)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SGEGLGDKYVS (서열번호 : 273)	EDSTRPS (서열번호 : 274)	QAWDSETGV (서열번호 : 275)
E9.1F	SYELTQPPSVSPGQTASITCSGDRLGDKYVSWYQQKPGQSPVLVIYEDSQRPS GIPERFSGNSNGDTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDMEAGVFGSGTKVTVL (서열번호 :276)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SGDRLGDKYVS (서열번호 : 277)	EDSQRPS (서열번호 : 278)	QAWDMEAGV (서열번호 : 279)
E9.10 C	SYELTQPPSVSPGQTASITCSGDSLGDKYVSWYQQKPGQSPVLVIYEDSERPS GIPERFSGNSNGDTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSETGVFGSGTKVT (서열번호 :280)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SGDSLGDKYVS (서열번호 : 281)	EDSERPS (서열번호 : 282)	QAWDSETGV (서열번호 : 283)
E9.10 E	SYELTQPPSVSPGQTASITCSGEGLGDKYVSWYQQKPGQSPVLVIYEDSERPS GIPERFSGNSNGDTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSEAGVFGSGTKVT (서열번호 :284)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SGEGLGDKYVS (서열번호 : 285)	EDSERPS (서열번호 : 286)	QAWDSEAGV (서열번호 : 287)
E9.7E	SYELTQPPSVSPGQTASITCSGDRLGDKYVSWYQQKPGQSPVLVIYED SERPSGIPERFSGNSNGDTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSEAGVFGSG TKVT (서열번호 :288)		

	CDR1	CDR2	CDR3
	SGDRLGDKYVS (서열번호 : 289)	EDSERPS (서열번호 : 290)	QAWDSEAGV (서열번호 : 291)
E9.5E	SYELTQPPSVSPGQTASITC SGDMLGDKYVS WYQQKPGQSPVLIY EDSQRPS GIPERFSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADYYC QAWDSETGVFGSGTKVT (서열번호 : 292)	CDR1	CDR2
	SGDMLGDKYVS (서열번호 : 293)	EDSQRPS (서열번호 : 294)	QAWDSETGV (서열번호 : 295)
E9.12 B	SYELTQPPSVSPGQTASITC SGDGLGDKYVS WYQQKPGQSPVLIY EDSTRPS GIPERFSGSNSGDTATLTISGTQAMDEADYYC QAWDSESGVFGSGTKVT (서열번호 : 296)	CDR1	CDR2
	SGDGLGDKYVS (서열번호 : 297)	EDSTRPS (서열번호 : 298)	QAWDSESGV (서열번호 : 299)
E9.10 H	SYELTQPPSVSPGQTASITC SGESLGDKYVS WYQQKPGQSPVLIY EDSKRPS GIPERFSGSNSGDTATLTISGTQAMDEADYYC QAWDGETGVFGSGTKVT (서열번호 : 300)	CDR1	CDR2
	SGESLGDKYVS (서열번호 : 301)	EDSKRPS (서열번호 : 302)	QAWDGETGV (서열번호 : 303)
E9.6A	SYELTQPPSVSPGQTASITC SGDMLGDKYVS WYQQKPGQSPVLIY EDTNRPS GIPERFSGSNSGDTATLTISGTQAMDEADYYC QAWDSETGVFGSGTKVT (서열번호 : 304)	CDR1	CDR2
	SGDMLGDKYVS (서열번호 : 305)	EDTNRPS (서열번호 : 306)	QAWDSETGV (서열번호 : 307)
E9.7A	SYELTQPPSVSPGQTASITC SGESLGDKYVS WYQQKPGQSPVLIY QDAMRPS GIPERFSGSNSGDTATLTISGTQAMDEADYYC QAWDMETGVFGSGTKVT (서열번호 : 308)	CDR1	CDR2
	SGESLGDKYVS (서열번호 : 309)	QDAMRPS (서열번호 : 310)	QAWDMETGV (서열번호 : 311)
E9.8H	SYELTQPPSVSPGQTASITC SGESLGDKYVS WYQQKPGQSPVLIY EDSMRPS GIPERFSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADYYC QAWDSEVGVFGSGTKVT (서열번호 : 312)	CDR1	CDR2
	SGESLGDKYVS (서열번호 : 313)	EDSMRPS (서열번호 : 314)	QAWDSEVGV (서열번호 : 315)

[1222]

항-DLL4 A10 친화성 성숙.

[1224]

상기된 E9 친화성 성숙과 유사한 방식으로, 서열 배열은 DLL4 항체 A10이 사람 배선 VH3-30 및 V2-1과 최고의 동일성을 가짐을 보여주었다. VH3-30 및 V2-1로부터 각각 유래된 사람 VH 및 VL 서열을 NCBI IgBlast 데이터로부터 내려받아 서열 로고를 생성하였다. 이들 서열 로고를 사용하여 친화성 성숙 라이브러리를 생성하는데 어느 위치를 도핑할 것인가를 결정하였다.

[1225]

이들 A10 라이브러리를 세포에 형질도입하고 세포 표면을 마그네틱에 이어 유세포분석기 (FACS)에 의해 디스플레이하여 저농도의 바이오티널화 DLL4 세포와 도메인에 대해 선택하였다. 향상된 정반응 속도, 역반응 속도 또는 둘 다에 대한 선택을 실시하고 친화성-조절된 A10 클론의 항체 단백질 서열을 IgG 형태로 재전환시켜 추가로 성상확인하기 위해 회수하였다. 아래 표 9는 친화성 성숙 클론의 중쇄 (VH) 영역을 보여주며, 아래 표 10은 친화성 성숙 클론의 경쇄 (VL) 영역을 보여준다.

표 9

친화성 성숙 A10 클론의 가변 중쇄 영역 (VH).

단백질 영역		서열	
		123456789012345678901234567890	
A10.3 VH		EVQLVESGGGLVKSGGSLRLSCAASGFTFR SHWMSWVRQAPGKGLEWVAIISYDGSNKVS ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQLNSLRAED TAVYYCAKAGGGNVGFDIWGQGTMVTVSS (서열번호 : 316)	
A10.3 VH	CDR-H1	서열번호 316의 장기 31-35	SHWMS
A10.3 VH	CDR-H2	서열번호 316의 장기 50-66	IISYDGSNKYSADSVKG
A10.3 VH	CDR-H3	서열번호 316의 장기 99-108	AGGGNVGFDI
A10.K30 VH			EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFG NHWMSWVRQAPGKGLEWVADISSDGRYKYY ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQLNSLRAED TAVYYCAKAGGGNVGFDIWGQGTMVTVSS (서열번호 : 317)
A10.K30 VH	CDR-H1	서열번호 317의 장기 31-35	NHWMS
A10.K30 VH	CDR-H2	서열번호 317의 장기 50-66	DISSDGRYKYYADSVKG
A10.K30 VH	CDR-H3	서열번호 317의 장기 99-108	AGGGNVGFDI
A10.K42 VH			EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFO SHWMSWVRQAPGKGLEWVAIISYDGTIKYY ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQLNSLRAED TAVYYCAKAGGGNVGFDIWGQGTMVTVSS (서열번호 : 318)
A10.K42 VH	CDR-H1	서열번호 318의 장기 31-35	SHWMS
A10.K42 VH	CDR-H2	서열번호 318의 장기 50-66	MISYDGTIKYYADSVKG

[1226]

단백질 영역		서열
		123456789012345678901234567890
A10. K42 VH	CDR-H3	서열번호 318의 잔기 99-108 AGGGNVGFDI
A10. 9A VH		EVQLVESGGVVQPGSSLRLSCAASGFTFR SYWMSWVRQAPGKGLEWVATISYDGRNKDY ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQLNSLRAED TAVYYCAK AGGGNVGFDI WGQGTMVTVSS (서열번호 : 319)
A10. 9A VH		서열번호 319의 잔기 31-35 SYWMS
A10. 9A VH		서열번호 319의 잔기 50-66 TISYDGRNKDYADSVKG
A10. 9A VH		서열번호 319의 잔기 99-108 AGGGNVGFDI
A10. 8A VH		EVQLVESGGVVQPGSSLRLSCAASGFTFG NHWMSWVRQAPGKGLEWVADISSDGRYKYY ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQLNSLRAED TAVYYCAK AGGGNVGFDI WGQGTMVTVSS (서열번호 : 320)
A10. 8A VH		서열번호 320의 잔기 31-35 NHWMS
A10. 8A VH		서열번호 320의 잔기 50-66 DISSDGRYKYYADSVKG
A10. 8A VH		서열번호 320의 잔기 99-108 AGGGNVGFDI
A10. 1A VH		EVQLVESGGVVQPGSSLRLSCAASGFTFH SHWMSWVRQAPGKGLEWVAMISDDGRNKDY ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQLNSLRAED TAVYYCAR AAGGNVGLDI WGQGTMVTVSS (서열번호 : 321)
A10. 1A VH		서열번호 321의 잔기 31-35 SHWMS
A10. 1A VH		서열번호 321의 잔기 50-66 MISDDGRNKDYADSVKG
A10. 1A VH		서열번호 321의 잔기 99-108 AAGGNVGLDI
A10. 5D VH		EVQLVESGGVVQSGSSLRLSCAASGFTFG SHWMSWVRQAPGKGLEWVADISVDGSNKYS ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAR AAGGNVGLDS WGQGTMVTVSS (서열번호 : 322)
A10. 5D VH		서열번호 322의 잔기 31-35 SHWMS
A10. 5D VH		서열번호 322의 잔기 50-66 DISVDGSNKYSADSVKG

단백질 영역		서열
		123456789012345678901234567890
A10.5D VH	서열번호 322의 잔기 99-108	AAGGNVGLDS
A10.3A VH		EVQLVESGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFG NHWMSWVRQAPGKGLEWVADISSDGRYKYY ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQLNSLRAED TAVYYCAKAGGGNVGFDIWGQQGTMVTVSS (서열번호 : 323)
A10.3A VH	서열번호 323의 잔기 31-35	NHWMS
A10.3A VH	서열번호 323의 잔기 50-66	DISSDGRYKYYADSVKG
A10.3A VH	서열번호 323의 잔기 99-108	AGGGNVGFDI
A10.6B VH		EVOLVESGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFG NHWMSWVRQAPGKGLEWVADISSDGRYKYY ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQLNSLRAED TAVYYCAKAGGGNVGFDIWGQQGTMVTVSS (서열번호 : 324)
A10.6B VH	서열번호 324의 잔기 31-35	NHWMS
A10.6B VH	서열번호 324의 잔기 50-66	DISSDGRYKYYADSVKG
A10.6B VH	서열번호 324의 잔기 99-108	AGGGNVGFDI
A10.3D VH		EVQLVESGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFR SHWMSWVRQAPGKGLEWVADISQDGSYKYY ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQLNSLRAED TAVYYCARAGGGNVGFDIWGQQGTMVTVSS (서열번호 : 325)
A10.3D VH	서열번호 325의 잔기 31-35	SHWMS
A10.3D VH	서열번호 325의 잔기 50-66	DISQDGSYKYYADSVKG
A10.3D VH	서열번호 325의 잔기 99-108	AGGGNVGFDI
A10.4C VH		EVQLVESGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFG SHWMSWVRQAPGKGLEWVADISNDGRYAYS ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQLNSLRAED TAVYYCAKAGGGNVGFDIWGQQGTMVTVSS (서열번호 : 326)
A10.4C VH	서열번호 326의 잔기 31-35	SHWMS
A10.4C VH	서열번호 326의 잔기 50-66	DISNDGRYAYSADSVKG

[1228]

단백질 영역		서열
		123456789012345678901234567890
A10.4C VH	서열번호 326의 잔기 99-108	AGGGNVGFDI

[1229]

표 10

친화성 성숙 A10 클론의 가변 경쇄 영역 (VL).

단백질 영역		서열	
A10.3 VL		123456789012345678901234567890 SYELTQPPSVSPGQTASITCSADKLGTK YVSWYQQKPGQSPVLIYQDAKRPSGIPER FSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYLCQSW DRSDVVFGGGTKLTVL (서열번호 : 327)	
A10.3 VL	CDR-L1	서열번호 327의 간기 23-33	SADKLGTKYVS
A10.3 VL	CDR-L2	서열번호 327의 간기 49-55	QDAKRPS
A10.3 VL	CDR-L3	서열번호 327의 간기 88-96	QSWDRSDVV
A10.L45 VL		SYELTQPPSVSPGQTASITCSADELGTQ YVSWYQQKPGQSPVLIYQDATRPSGIPER FSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAW DRSGVVFGGGTKLTVL (서열번호 : 328)	
A10.L45 VL	CDR-L1	서열번호 328의 간기 23-33	SADELGTQYVS
A10.L45 VL	CDR-L2	서열번호 328의 간기 49-55	QDATRPS
A10.L45 VL	CDR-L3	서열번호 328의 간기 88-96	QAWDRSGVV
A10.L73 VL		SYELTQPPSVSPGQTASITCSGDNLGSQ YVSWYQQKPGQSPVLIYQDAQRPSGIPER FSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAW DRSGVVFGGGTKLTVL (서열번호 : 329)	
A10.L73 VL	CDR-L1	서열번호 329의 간기 23-33	SGDNLGSQYVS
A10.L73 VL	CDR-L2	서열번호 329의 간기 49-55	QDAQRPS
A10.L73 VL	CDR-L3	서열번호 329의 간기 88-96	QAWDRSGVV
A10.3A VL		SYELTQPPSVSPGQTASITCSADNLGEK YVSWYQQKPGQSPVLIYQDATRPSGIPER FSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQSW DSSGAVVFGGGTKLTVL (서열번호 : 330)	
A10.3A VL	CDR-L1	서열번호 330의 간기 23-33	SADNLGEKYVS

[1230]

단백질 영역		서열
		123456789012345678901234567890
A10.3A VL	CDR-L2	서열번호 330의 잔기 49-55 QDATRPS
A10.3A VL	CDR-L3	서열번호 330의 잔기 88-96 QSWDSSGAV
A10.6B VL		SYELTOPPSVSPGQTASITCSADNLGNQ YVSWYQQKPGQSPVLIYQDGMRPSGIPER FSGSNNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAW DWSGEVFGGGTKLTVL (서열번호 : 331)
A10.6B VL	CDR-L1	서열번호 331의 잔기 23-33 SADNLGNQYVS
A10.6B VL	CDR-L2	서열번호 331의 잔기 49-55 QDGMRPS
A10.6B VL	CDR-L3	서열번호 331의 잔기 88-96 QAWDWSGEV
A10.3D VL		SYELTOPPSVSPGQTASITCSADKLGTK YVSWYQQKPGQSPVLIYQDGMRPSGIPER FSGSNNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQSW DQSGAVEFGGGTKLTVL (서열번호 : 332)
A10.3D VL	CDR-L1	서열번호 332의 잔기 23-33 SADKLGTKYVS
A10.3D VL	CDR-L2	서열번호 332의 잔기 49-55 QDGMRPS
A10.3D VL	CDR-L3	서열번호 332의 잔기 88-96 QSWDQSGAV
A10.4C VL		SYELTOPPSVSPGQTASITCSADNLGNQ YVSWYQQKPGQSPVLIYQDGMRPSGIPER FSGSNNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAW DSSGAVFGGGTKLTVL (서열번호 : 333)
A10.4C VL	CDR-L1	서열번호 333의 잔기 23-33 SADNLGNQYVS
A10.4C VL	CDR-L2	서열번호 333의 잔기 49-55 QDGMRPS
A10.4C VL	CDR-L3	서열번호 333의 잔기 88-96 QAWDSSGAV

[1231]

실시예 5: CDR-이식 E9 항체의 작제.

[1232]

E9 VH의 CDR을 VH3 공통 골격 (이식된 VH = E9vh3g2)에 이식하였고, E9 VL의 CDR을 항-DLL4 A10 항체의 VL2-1 골격 (이식된 VL = E9a10vlg2) 및 A10 배선의 VK 골격 (E9 VL과 상동성에 있어서 최근친 배선)(이식된 VL = E9AVK)에 이식하였다. 다른 방법으로서, 골격 (FW) 복구를 또한 E9 VH로 실시하였다. 즉, FW는 유지되었으나 항체 불안정성을 일으킬 수 있는 아미노산들은 치환되었다 (복구된 VH = E9VH4r2). 골격 복귀돌연변이를 CDR-이식 및 FW-복구 둘 다에 도입하여 항체 구조 및 기능을 유지하였다 (표 11 및 표 14).

[1233]

또한, E9의 CDR을 항-IL-18 및 항-IL-12 항체의 골격에 이식하였다. 특정적으로는, E9 VH의 CDR을 항-IL-18의 VH5-51 (이식된 VH = E9VH325) 및 항-IL-12의 VH2-70 골격 (이식된 VH = E9VH1D4.1)에 이식하였다. E9 VL의 CDR은 항-IL-12의 VK L2/L16 골격 (이식된 VL = E9VL325) 및 항-IL-12의 VK B3 골격 (이식된 VL = E9VL1D4.1)에 이식하였다. 골격 복귀돌연변이를 CDR-이식에 도입하여 항체 구조 및 기능을 유지하였다 (표 15 및 표 18).

[1234]

상기된 인실리코 작제된 CDR 이식 항체를 블루 헤론 바이오텍놀로지에 의해 선정된 플라스미드에서 직접 합성하였다. 야생형 사람 IgG1 불변 영역은 암호화하는 cDNA 단편 및 2개의 헌지-영역 아미노산 돌연변이를 함유한 사람 IgG1 불변 영역과의 프레임에 가변 중쇄 영역을 삽입되었다. 이를 두개의 돌연변이는 234 위치 (EU 방식 번호매김)에서 루이신이 알라닌으로의 치환 및 235 위치에서 루이신이 알라닌으로의 치환이다 (Lund et al., J. Immunol., 147: 2657 (1991)). 가변 경쇄 영역은 사람 람다 불변 영역 및 사람 카파 불변 영역과의 프레임내로 삽입되었다. 블루 헤론으로부터 합성된 작제물을 받았을 때, DNA는 대량 제조되었고 서열은 검증되었다. 각 항에 상응하는 정확한 CDR-이식된 중쇄 및 경쇄 (표 11 및 14) (표 15 및 18)는 HEK-293-6E 세포에 동시형질감염시켜 일시적으로 완전한 CDR-이식된 항-사람 DLL4 항체를 생성하였다. 표 11은 생성된 모든 E9 항체 변이체 및 HEK-293-6e 발현 데이터를 요약한 것이다. 재조합 사람 항체를 함유한 세포 상청액은 프로테인 A 세파로즈 크로마토그래피로 정제하고 결합된 항체는 산 완충액을 가하여 용출하였다. 항체는 PBS로 투석하였다.

[1236]

정제된 CDR 이식된 항체가 DLL4와 결합하거나 DLL4 활성을 억제하는 능력을 ELISA (실시예 1.2, 방법 2), 바이아코어 (실시예 1.2) 및 유세포분석 (FACS) (실시예 1.3)과 같은 여러 가지 다른 검정법으로 결정하였다. 표 12 및 표 16은 사람 DLL4, 쥐 DLL4 및 사이노몰거스 DLL4에 대한 표 11 및 표 15에 각각 기술된 CDR 이식 항체의 ELISA 검정 및 FACS 검정에 의한 EC50 값 및 바이아코어에 의해 결정된 친화성을 보여준다. 표 13 및 표 17은 사람 DLL4 및 쥐 DLL4로의 차단 ELISA (실시예 1.4) 및 차단 FACS (실시예 1.5)에 의한 표 11 및 표 15에 각각 기술된 CDR 이식 항체의 IC50 값을 보여준다.

표 11

생성된 E9 항체 변이체 및 발현 데이터의 요약

항체	VH 명칭	VL 명칭	HEK-293-6e 역가 (mg/L)
E9-SE1	E9vh3g2	E9a10vlg2	104
E9-SE2	E9vh3g2	E9.1	87
E9-SE3	E9vh4r2	E9.1	89
E9-SE4	E9.1	E9a10vlg2	66
E9-SE5	E9.1	E9AVK	79
E9-SE6	E9vh4r2	E9a10vlg2	125
E9-SE7	E9vh3g2	E9AVK	56
E9-SE8	E9vh4r2	E9AVK	85

[1237]

표 12

ELISA, 바이아코어 및 FACS에 의해 측정된 사람, 마우스 및 사이노몰거스 DLL4에 대한 E9 항체 변이체의 결합 친화성

항체	결합 데이터					
	사람 DLL4			마우스 DLL4		사이노몰거스 DLL4
	결합 ELISA (EC50, nM)	바이아코어 (Kd, nM)	결합 FACS (Kd, nM)	결합 ELISA (EC50, nM)	바이아코어 (Kd, nM)	결합 FACS (Kd, nM)
E9-SE1	0.16	15.2*	3.45	0.19	12.83	1.34
E9-SE2	0.18	2.43	5.2	0.20	15.09	0.87
E9-SE3	0.18	2.26	2.29	0.20	12.1	0.74
E9-SE4	0.17	2.38	nc	0.20	10.52	1.15
E9-SE5	0.16	1.57	7.81	0.19	12.77	2.9
E9-SE6	0.17	0.64	4.25	0.19	10.04	1.18
E9-SE7	0.17	1.69	2.28	0.17	16.22	2.24
E9-SE8	0.18	2.00	2.67	0.19	13.03	2.32
E9.1	0.29	2.38	0.35	0.34	12.77	1.6*

[1238]

*수년간의 데이터; nc = 계산되지 않음

표 13

ELISA 및 FACS에 의해 측정된 사람 및 마우스 DLL4에 대한 E9 항체 변이체의 중화 활성.

항체	기능 데이터			
	사람 DLL4		마우스 DLL4	
	차단 ELISA (IC50, nM)	차단 FACS (IC50, nM)	차단 ELISA (IC50, nM)	차단 FACS (IC50, nM)
E9-SE1	2.7	8.51	2.9	1.71
E9-SE2	2.6	5.61	2.2	1.23
E9-SE3	2.5	6.75	2.1	1.25
E9-SE4	2.7	5.82	2.9	1.71
E9-SE5	2.6	6.38	2.4	1.76
E9-SE6	2.5	8.16	2.9	1.53
E9-SE7	2.4	7.81	2.4	1.94
E9-SE8	2.5	9.25	2.6	2.3
E9.1	2.5	4.55	2.5	1.02

[1240]

표 14

사람 CDR-이식 E9 항체의 VH 및 VL 아미노산 서열

서열 번호	단백질 영역		서열
			123456789012345678901234567890
334	VH E9.1		EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIS SSYYWNGWIRQPPCGKLEWIGDIYYTGSTY YNPSLKSRRVTISVDTSKNQFSKLSSVTAA DTAVYYCARE EDVILRGGS DYWGQGTIVTVS S
	VH E9.1 CDR-H1	서열번호 334의 잔기 31-37	SSYYW G
	VH E9.1 CDR-H2	서열번호 334의 잔기 52-67	DIYYTGSTYYNPSLKS
	VH E9.1 CDR-H3	서열번호 334의 잔기 100-110	EDVILRGGS DY
			123456789012345678901234567890
335	VL E9.1		SYELTQPPSVSVSPGQTASITC SGQLGD K YASWYQQKPGQSPV LVI EDSKRPS GIPER FSGNSNSGDTATLTISGTQPMDEADYYC QAW DRDTG VFGYCTRIVTVLGL
	VL E9.1 CDR-L1	서열번호 335의 잔기 23-33	SGQLGD KYAS
	VL E9.1 CDR-L2	서열번호 335의 잔기 49-55	EDSKRPS
	VL E9.1 CDR-L3	서열번호 335의 잔기 88-96	QAWDRDTG V
			123456789012345678901234567890
336	VH E9-SE1		EVOLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGGSIS SSYYWNGWIRQAPGKLEWIGDIYYTGSTY YNPSLKSRRVTISVDTSKNSFYLQMNSLRAE DTAVYYCARE EDVILRGGS DYWGQGTIVTVS S
	VH E9-SE1 CDR-H1	서열번호 336의 잔기 31-37	SSYYW G
	VH E9-SE1 CDR-H2	서열번호 336의 잔기 52-67	DIYYTGSTYYNPSLKS
	VH E9-SE1 CDR-H3	서열번호 336의 잔기 100-110	EDVILRGGS DY
			123456789012345678901234567890
337	VL E9-SE1		LYVLTQPPSVSVSPGQTASITC SGQLGD K YASWYQQKPGQSPV LVI EDSKRPS GIPER FSGNSNSGDTATLTISGTQTMDEADYL CQAW DRDTG VFGGGTKVTVLG

[1241]

서열 번호	단백질 영역		서열
			123456789012345678901234567890
	VL E9-SE1 CDR-L1	서열번호 337의 장기 23-33	SGQRLGDKYAS
	VL E9-SE1 CDR-L2	서열번호 337의 장기 49-55	EDSKRPS
	VL E9-SE1 CDR-L3	서열번호 337의 장기 88-96	QAWDRDTGV
			123456789012345678901234567890
338	VH E9-SE2		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGGSIS SSSYIYGWIRQAPGKGLEWIGDIYYTGSTY YNPSLKSRTVISVDTSKNSFYLQMNSLRAE DTAVYYCARE EDVILRGGS DYWGQGTLVTVS S
	VH E9-SE2 CDR-H1	서열번호 338의 장기 31-37	SSSYIYG
	VH E9-SE2 CDR-H2	서열번호 338의 장기 52-67	DIYYTGSTYYNPSLKS
	VH E9-SE2 CDR-H3	서열번호 338의 장기 100-110	EDVILRGGS DY
			123456789012345678901234567890
339	VL E9-SE2		SYELTQPPSVSPGQTASITC SGQRLGDK YASWYQKPGQSPVLY EDSKRPS GI PER FSGSNNSGTATLTISGTQPMDEADYYC QAW DRDTGV FGYGYTRTVL
	VL E9-SE2 CDR-L1	서열번호 339의 장기 23-33	SGQRLGDKYAS
	VL E9-SE2 CDR-L2	서열번호 339의 장기 49-55	EDSKRPS
	VL E9-SE2 CDR-L3	서열번호 339의 장기 88-96	QAWDRDTGV
			123456789012345678901234567890
340	VH E9-SE3		EVQLQESGFGLVKPGETLSLTCTVSGGSIS SSSYIYGWIRQAPGKGLEWIGDIYYTGSTY YNPSLKSRTVISVDTSKNQFYLKLSVRAE DTAVYYCARE EDVILRGGS DYWGQGTLVTVS S
	VH E9-SE3 CDR-H1	서열번호 340의 장기 31-37	SSSYIYG
	VH E9-SE3 CDR-H2	서열번호 340의 장기 52-67	DIYYTGSTYYNPSLKS

서열 번호	단백질 영역		서열
			123456789012345678901234567890
	VH E9-SE3 CDR-H3	서열번호 340의 잔기 100-110	EDVILRGGS DY
			123456789012345678901234567890
341	VL E9-SE3		SYELTQPPSVSPGQTASITCSGQRLGDK YASWYQOKPGQSPVLVYIEDSKRPSGIPER FSGSNNSGDTATLTISGTQPMDEADYYCQAW DRDTGFGYGTGTRTVLG
	VL E9-SE3 CDR-L1	서열번호 341의 잔기 23-33	SGQRLGDKYAS
	VL E9-SE3 CDR-L2	서열번호 341의 잔기 49-55	EDSKRPS
	VL E9-SE3 CDR-L3	서열번호 341의 잔기 88-96	QAWDRDTGV
			123456789012345678901234567890
342	VH E9-SE4		EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIS SSYYWGIRQPPGKLEWIGDIY YTGSTY YNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAA DTAVYYCARE EDVILRGGS DY WGQGTLVTV S
	VH E9-SE4 CDR-H1	서열번호 342의 잔기 31-37	SSYYWG
	VH E9-SE4 CDR-H2	서열번호 342의 잔기 52-67	DIY YTGSTY YNPSLKS
	VH E9-SE4 CDR-H3	서열번호 342의 잔기 100-110	EDVILRGGS DY
			123456789012345678901234567890
343	VL E9-SE4		LYVLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIS YASWYQOKPGQSPVLVYIEDSKRPSGIPER FSGSNNSGDTATLTISGTQTMDEADYLCQAW DRDTGFGGGTKVTVLG
	VL E9-SE4 CDR-L1	서열번호 343의 잔기 23-33	SGQRLGDKYAS
	VL E9-SE4 CDR-L2	서열번호 343의 잔기 49-55	EDSKRPS
	VL E9-SE4 CDR-L3	서열번호 343의 잔기 88-96	QAWDRDTGV
			123456789012345678901234567890

[1243]

서열 번호	단백질 영역		서열
			123456789012345678901234567890
344	VH E9-SE5		EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIS SSYYWGIRQPPGKGLEWIGDIYTTGSTY YNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLSSVTAA DTAVYYCAR EDVILRGGS DYWGQGTLVTS S
	VH E9-SE5 CDR-H1	서열번호 344의 잔기 31-37	SSYYWG
	VH E9-SE5 CDR-H2	서열번호 344의 잔기 52-67	DIYTGSTYYNPSLKS
	VH E9-SE5 CDR-H3	서열번호 344의 잔기 100-110	EDVILRGGS
			123456789012345678901234567890
345	VL E9-SE5		EYVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCSGQLGD KYASWYQKPDQSPKLVIYEDSKRPSGVES RFSGSNSGDDATLTINSLEAEDAATYYCQA WDRDTGVFGGGTKVEIKR
	VL E9-SE5 CDR-L1	서열번호 345의 잔기 24-34	SGQLGDKYAS
	VL E9-SE5 CDR-L2	서열번호 345의 잔기 50-56	EDSKRPS
	VL E9-SE5 CDR-L3	서열번호 345의 잔기 89-97	QAWDRDTGV
			123456789012345678901234567890
346	VH E9-SE6		EVQLQESGPGLVKPGETLSLTCTVSGGSIS SSYYWGIRQAPGKGLEWIGDIYTTGSTY YNPSLKSRTVISVDTSKNQFYLKLSVRAE DTAVYYCAR EDVILRGGS DYWGQGTLVTS S
	VH E9-SE6 CDR-H1	서열번호 346의 잔기 31-37	SSYYWG
	VH E9-SE6 CDR-H2	서열번호 346의 잔기 52-67	DIYTGSTYYNPSLKS
	VH E9-SE6 CDR-H3	서열번호 346의 잔기 100-110	EDVILRGGS
			123456789012345678901234567890
347	VL E9-SE6		LYVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGQLGDK YASWYQOKPGQSPVLVIYEDSKRPSGIPER FSGSNSGDTATLTISGTOTMDEADYLCQA DRDTGVFGGGTKVTVLG

[1244]

서열 번호	단백질 영역		서열
			123456789012345678901234567890
	VL E9-SE6 CDR-L1	서열번호 347의 잔기 23-33	SGQRLGDKYAS
	VL E9-SE6 CDR-L2	서열번호 347의 잔기 49-55	EDSKRPS
	VL E9-SE6 CDR-L3	서열번호 347의 잔기 88-96	QAWDRDTGV
348	VH E9-SE7		EVOLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGGSISSYYWGIRQAPGKLEWIGDIYYTGSTY YNPSLKS RVVTISVDTSKNSFYLQMNSLRAEDTAVYYCARE EDVILRGGS DY WGQGTLVTVSS
	VH E9-SE7 CDR-H1	서열번호 348의 잔기 31-37	SSYYWG
	VH E9-SE7 CDR-H2	서열번호 348의 잔기 52-67	DIYYTGSTYYNPSLKS
	VH E9-SE7 CDR-H3	서열번호 348의 잔기 100-110	EDVILRGGS DY
			123456789012345678901234567890
349	VL E9-SE7		EYVLTQSPDFQSVPKEKVTITC SGQRLGD KYAS WYQQKPDQSPKLV Y EDSKRPSGVPS RFGSGNSGDDATLTINSLEAEDAATYYCQA WDRDTGVFGQG T KVEIKR
	VL E9-SE7 CDR-L1	서열번호 349의 잔기 24-34	SGQRLGDKYAS
	VL E9-SE7 CDR-L2	서열번호 349의 잔기 50-56	EDSKRPS
	VL E9-SE7 CDR-L3	서열번호 349의 잔기 89-97	QAWDRDTGV
			123456789012345678901234567890
350	VH E9-SE8		EVOLQESGPLVKPGETSLTCTVSGGSISSYYWGIRQAPGKLEWIGDIYYTGSTY YNPSLKS RVVTISVDTSKNQFY Y KLSSVRAEDTAVYYCARE EDVILRGGS DY WGQGTLVTVSS
	VH E9-SE8 CDR-H1	서열번호 350의 잔기 31-37	SSYYWG
	VH E9-SE8 CDR-H2	서열번호 350의 잔기 52-67	DIYYTGSTYYNPSLKS

[1245]

서열 번호	단백질 영역		서열
			123456789012345678901234567890
	VH E9-SE8 CDR-H3	서열번호 350의 잔기 100-110	EDVILRGGS DY
			123456789012345678901234567890
351	VL E9-SE8		EYVLTQSPDFQSVPKEKVTITC SGQRLGD KYAS WYQQKPDQSPKLV Y EDSKRPSGVPS RFGSGNSGDDATLTINSLEAEDAATYYCQA WDRDTGVFGQG T KVEIKR
	VL E9-SE8 CDR-L1	서열번호 351의 잔기 24-34	SGQRLGDKYAS
	VL E9-SE8 CDR-L2	서열번호 351의 잔기 50-56	EDSKRPS
	VL E9-SE8 CDR-L3	서열번호 351의 잔기 89-97	QAWDRDTGV

[1246]

표 15

생성된 E9 항체 변이체 및 발현 데이터의 요약.

항체	VH 명칭	VL 명칭	HEK-293-6c 역가 (mg/L)
E9-FR1	E9VH325	E9VL325	29
E9-FR2	E9VH1D4.1	E9VL1D4.1	44

[1247]

표 16

ELISA, 바이아코어 및 FACS에 의해 측정된 사람, 마우스 및 사이노풀거스 DLL4에 대한 E9 CDR-이식 항체의 결합 친화성

MAb	결합 데이터				사이노풀거스 DLL4			
	사람 DLL4		마우스 DLL4		사이노풀거스 DLL4			
결합 ELISA (EC50, nM)	바이아코어 (Kd, nM)	결합 FACS (Kd, nM)	결합 ELISA (EC50, nM)	바이아코어 (Kd, nM)	결합 FACS (Kd, nM)	결합 ELISA (EC50, nM)	바이아코어 (Kd, nM)	
E9-FR1	0.11	0.72	4	0.13	1.6	2.51	0.12	0.74
E9-FR2	0.105	0.31	6.2	0.125	0.69	3.57	0.12	0.3
E9.1	0.03	0.52	3.62	0.04	1.1	1.66	0.035	0.47

[1248]

표 17

ELISA 및 FACS에 의해 측정된 사람 및 마우스 DLL4에 대한 E9 CDR-이식 항체의 중화 활성.

MAb	결합 데이터			
	사람 DLL4		마우스 DLL4	
차단 ELISA (IC50, nM)	차단 FACS (IC50, nM)	차단 ELISA (IC50, nM)	차단 FACS (IC50, nM)	
E9-FR1	1.54	1.57	3.35	0.98
E9-FR2	1.52	3.03	4.35	1.07
E9.1	2.2	1.62	5.85	1.06

[1249]

표 18

사람 CDR-이식 E9 항체의 VH 및 VL 아미노산 서열.

서열 번호	단백질 영역		서열
			123456789012345678901234567890
352	VH E9-FR1		EVQLVQSGTEVKPGESLKISCKVSGGSIS SSSYWGWIRQMPGKLEWIGDIYTGSTY YNPSLKSQVTISVDTSFNTFFLQWSSLKAS DTATYYCAREDVILRGGSDYWGQGTMVTVS S
	VH E9-FR1 CDR-H1	서열번호 352의 잔기 31-37	SSSYWGW
	VH E9-FR1 CDR-H2	서열번호 352의 잔기 52-67	DIYTGSTYYNPSLKS
	VH E9-FR1 CDR-H3	서열번호 352의 잔기 100-110	EDVILRGGSDY
			123456789012345678901234567890
353	VL E9-FR1		EYVLTQSPATLSVSPGERATLSCSGQLGD KYASWYQQKPGQSPRLVIYEDSKRPSDIPA RFSGNSNGDEATLTISSLQSEDFAVYYCQA WDRDTGVFGQGTRLEIKR
	VL E9-FR1 CDR-L1	서열번호 353의 잔기 24-34	SGQLGDKYAS
	VL E9-FR1 CDR-L2	서열번호 353의 잔기 50-56	EDSKRPS
	VL E9-FR1 CDR-L3	서열번호 353의 잔기 88-97	QAWDRDTGV
			123456789012345678901234567890
354	VH E9-FR2		EVTLRESGPALVKPTQTLTLCVSGGSIS SSSYWGWIRQPPGKLEWIGDIYTGSTY YNPSLKSRTVTISVDTSKNQFVLTMTNMDPV DTATYYCAREDVILRGGSDYWGQGTTVTVS S
	VH E9-FR2 CDR-H1	서열번호 354의 잔기 31-37	SSSYWGW
	VH E9-FR2 CDR-H2	서열번호 354의 잔기 52-67	DIYTGSTYYNPSLKS
	VH E9-FR2 CDR-H3	서열번호 354의 잔기 100-110	EDVILRGGSDY
			123456789012345678901234567890
355	VL E9-FR2		DYVLTQSPDSLAVSLGERATINC SGQLGD KYASWYQQKPGQSPKLVIYEDSKRPSGIPD RFSGNSNGDDATLTISSLQAEDEVAVYYCQA WDRDTGVFGGGTKVEIKR

[1250]

서열 번호	단백질 영역		서열
			123456789012345678901234567890
	VL E9-FR2 CDR-L1	서열번호 355의 잔기 24-34	SGQLGDKYAS
	VL E9-FR2 CDR-L2	서열번호 355의 잔기 50-56	EDSKRPS
	VL E9-FR2 CDR-L3	서열번호 355의 잔기 88-97	QAWDRDTGV

[1251]

[1252] 실시예 6: 친화성-성숙 항체 E9-71의 추가 조작

[1253] E9-71(M) 및 E9-71(L).

[1254] 친화성-성숙 항-DLL4 항체 E9-71의 중쇄 및 경쇄 둘 다를 추가로 조작하였다. 돌연변이된 뉴클레오타이드를 함유한 정방향 및 역방향 중첩 프라이머를 설계하여 E9-71 중쇄의 CDR-H3내 메티오닌(M)을 루이신(L)으로 돌연변이시켰다. 돌연변이된 뉴클레오타이드를 갖는 2개의 프라이머 및 수용 벡터에 상보적인 돌출 서열을 함유한 2개의 최외부 프라이머를 사용하여 중합효소 연쇄 반응 (PCR)을 연속 2 단계로 실시하여 완전한 가변 영역 유전

자를 증폭시켰다.

[1255] E9-71(M) 및 E9-71(L)의 경쇄를 위해 사용된 신호 펩타이드는 람다 1a 신호 펩타이드라고 칭한다. E9-71 경쇄의 골격 4 (FW4) 영역 hJL-1을 항체의 huCL2 불변 영역과 더 양립가능하도록 hJ2로 치환시켰다. 돌연변이된 뉴클레오파이드를 함유하는 정방향 및 역방향 프라이머를 설계하였다. 돌연변이된 뉴클레오파이드를 갖는 2개의 프라이머 및 수용 벡터에 상보적인 돌출 서열을 함유한 2개의 최외부 프라이머를 사용하여 중합효소 연쇄 반응 (PCR)을 연속 2 단계로 실시하여 완전한 가변 영역 유전자를 증폭시켰다.

[1256] 각 cDNA 조립체로부터 유도된 PCR 생성물을 아가로즈 겔에서 분리하고 추정된 가변 영역 cDNA 크기에 상응하는 밴드를 절단하여 정제하였다. 세균에서의 상동재조합에 의해 2개의 헌지-영역 아미노산 돌연변이를 함유한 사람 IgG1 불변 영역을 암호화하는 cDNA 단편의 프레임내에 가변 중쇄 영역을 삽입시켰다. 이들 돌연변이는 234 위치 (EU 방식의 번호매김)에서 루이신이 알라닌으로의 치환 및 235 위치에서 루이신이 알라닌으로 치환이다 (Lund et al., J. Immunol., 147: 2657 (1991). 상동 재조합에 의해 사람 람다 1a 신호 펩타이드와 사람 람다 불변 영역사이의 프레임에 가변 경쇄 영역을 삽입하였다. 세균 군락을 분리하고 플라스미드 DNA를 추출하였다. cDNA 삽입체의 전체 서열을 분석하였다. 각 항체에 상응하는 정확한 중쇄 및 경쇄 (표 19)로 HEK-293-6E 세포를 형질감염시켜 완전한 E9-71(M) 또는 E9-71(L) 항-사람 DLL4 항체를 일시적으로 생성하였다. E9-71(M)과 E9-71(L) 둘 다는 동일한 경쇄를 갖는다. 재조합 사람 항체를 함유하는 세포 상청액을 프로테인 A 세파로즈 크로마토그래피에 의해 정제하고 산 완충액을 가하여 결합된 항체를 용출시킬 수 있다. 항체를 중화시키고 PBS로 투석하였다.

표 19

사람 E9.71 조작된 항체의 VH 및 VL 아미노산 서열

서열 번호	단백질 영역	서열
356	VH E9.71	123456789012345678901234567890 EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIS SSYYWGWIRQPPGKGLEWIGDIYYTGSTY YNPSLKS RVVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAA DTAVYYCAR QALAMGGGSDKWQGTLVTVS S
		VH E9.71 CDR-H1 서열번호 356의 장기 31-37 SSYYWG
		VH E9.71 CDR-H2 서열번호 356의 장기 52-67 DIYYTGSTYYNPSLKS
357	VL E9.71	VH E9.71 CDR-H3 서열번호 356의 장기 100-110 QALAMGGGSDK
		123456789012345678901234567890 SYELTQPPSVSVSPGQTASITC SGQR LGDK YASWYQQKPGQSPVILVIYEDSKRPSGIPER FSGNSNGDTATLTISGTQPMDEADYYC QAW DRDTGVFGYGTKVTVLG
		VL E9.71 CDR-L1 서열번호 357의 장기 23-33 SGQR LGDKYAS
358	VH E9.71 (M)	VL E9.71 CDR-L2 서열번호 357의 장기 49-55 EDSKRPS
		VL E9.71 CDR-L3 서열번호 357의 장기 88-96 QAWDRDTGV
		123456789012345678901234567890 EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIS SSYYWGWIRQPPGKGLEWIGDIYYTGSTY YNPSLKS RVVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAA DTAVYYCAR QALAMGGGSDKWQGTLVTVS S
	VH E9.71 (M)	VH E9.71 (M) CDR-H1 서열번호 358의 장기 31-37 SSYYWG
		VH E9.71 (M) CDR-H2 서열번호 358의 장기 52-67 DIYYTGSTYYNPSLKS
		VH E9.71 (M) CDR-H3 서열번호 358의 장기 100-110 QALAMGGGSDK

[1257]

서열 번호	단백질 영역		서열
359	VL E9.71 (M)		123456789012345678901234567890 SYELTQPPSVSPGOTASITCSGQRIGDK YASWYQQKPGQSPVLIYEDSKRPSGIPER FSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADYYCQAW DRDTGFGGGTKLTVLG
	VL E9.71 (M) CDR-L1	서열번호 359의 장기 23-33	SGQRIGDKYAS
	VL E9.71 (M) CDR-L2	서열번호 359의 장기 49-55	EDSKRPS
	VL E9.71 (M) CDR-L3	서열번호 359의 장기 88-96	QAWDRDTGV
360	VH E9.71 (L)		123456789012345678901234567890 EVQLOQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIS SSSYWGWIRQPPGKGLEWIGDIYTGSTY YNPSLKSRTVTISVDTSKNQFSKLSSVTA DTAVYYCARQALALGGGSDKWGGTQLTVVS S
	VH E9.71 (L) CDR-H1	서열번호 360의 장기 31-37	SSSYWGW
	VH E9.71 (L) CDR-H2	서열번호 360의 장기 52-67	DIYTGSTYYNPSLKS
	VH E9.71 (L) CDR-H3	서열번호 360의 장기 100-110	QALALGGGSDK
361	VL E9.71 (L)		123456789012345678901234567890 SYELTQPPSVSPGOTASITCSGQRIGDK YASWYQQKPGQSPVLIYEDSKRPSGIPER FSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADYYCQAW DRDTGFGGGTKLTVLG
	VL E9.71 (L) CDR-L1	서열번호 361의 장기 23-33	SGQRIGDKYAS
	VL E9.71 (L) CDR-L2	서열번호 361의 장기 49-55	EDSKRPS
	VL E9.71 (L) CDR-L3	서열번호 361의 장기 88-96	QAWDRDTGV

[1258]

[1259] 실시예 7: E9-71(M) 신호 펩타이드 조작

항-DLL4 항체 E9-71(M)을 생성하기 위해 신호 펩타이드 람다 1a를 사용하였다. 또한, 다른 신호 펩타이드를 연구하였다. 람다 및 카파 신호 펩타이드 계열과 다른 신호 펩타이드를 갖는 E9-71(M) N-말단 가변 영역의 인실리코 작제된 아미노산 서열의 포유동물 발현동안에 정확한 항체 절단율에 대한 예측은 인터넷을 통해 접속 가능한 Signal IP 3.0 서버 (예, 월드 와이드 웹사이트 cbs.dtu.dk/services/SignalIP/) 또는 많은 다른 대중한 소프트웨어를 사용함으로써 본 분야에 잘 알려져 있다. 각 계열로부터 하나씩 정확한 절단율이 가장 높은 신호 펩타이드를 선정하였다: 람다 계열의 람다 3p 및 카파 계열의 L23. 또한, 2개의 아미노산이 치환된 (글라이신이 아르기닌으로 치환 및 세린이 발린으로 치환) 최초 람다 1a 신호 펩타이드의 돌연변이 유형을 선택하였다. 람다 1a 신호 펩타이드를 함유하는 경쇄의 작제를 위해, 수용 벡터에 상보적인 돌출 서열을 함유한 2개의 최외부 프라이머 (이들중 하나는 돌연변이 뉴클레오타이드 서열을 함유함)를 이용한 중합효소 연쇄 반응 (PCR)을 일단계로 실시하여 완전한 가변 영역 유전자를 증폭하였다. 람다 3p 신호 펩타이드와 카파 L23 신호 펩타이드를 함유하는 경쇄의 작제를 위해, 2개의 돌출 프라이머를 설계하여 신호 펩타이드 영역을 작제한 다음, 수용 벡터에 상보적인 돌출 서열을 함유한 2개의 최외부 프라이머를 이용한 중합효소 연쇄 반응 (PCR)을 실시하여 완전한 가변 영역 유전자를 증폭하였다. 람파 3p 및 카파 L23 신호 펩타이드를 사용하여 2가지 유형의 E9-71 가변 영역을 생성하였다. 한 가지 유형은 완전한 가변 영역을 함유하고, 다른 한 가지 유형은 가변 영역 N-말단에 첫 번째 세린 (S)가 결실되어 있다. 람다 1a 신호 펩타이드로 완전한 가변 영역만을 생성하였다. 각 cDNA 조립체로부터 유도된 PCR 생성물을 아가로즈 젤에서 분리하고 추정된 가변 영역 cDNA 크기에 상응하는 밴드를 절개하고 정제하였다. 세균에서의 상동 재조합에 의해 2개의 힌지-영역 아미노산 돌연변이를 함유한 사람 IgG1 불변 영역을 암호화하는 cDNA 단편의 프레임내에 가변 중쇄 영역을 삽입시켰다. 이들 돌연변이는 234 위치 (EU 방식의 번호매김)에서 루이신이 알라닌으로의 치환 및 235 위치에서 루이신이 알라닌으로 치환이다 (Lund et al., J. Immunol., 147: 2657 (1991). 상동 재조합에 의해 사람 람다 불변 영역의 프레임에 가변 경쇄 영역을 삽입

하였다. 세균 군락을 분리하고 플라스미드 DNA를 추출하였다. cDNA 삽입체의 전체 서열을 분석하였다. 각 항체에 상응하는 정확한 중쇄 및 경쇄로 HEK-293-6E 세포를 형질감염시켜 완전한 E9-71(M) 항-사람 DLL4 항체를 일시적으로 생성하였다. 재조합 사람 항체를 함유하는 세포 상청액을 프로테인 A 세파로즈 크로마토그래피에 의해 정제하고 산 완충액을 가하여 결합된 항체를 용출시킬 수 있다. 항체를 PBS로 투석하였다. 완전한 항체 서열의 검증을 위해 정제된 E9.71(M) 항체를 질량분석법(MS)으로 분석하였다. 아래 표 20은 E9.71(M)의 생성을 위해 사용된 상이한 신호 웨بت아이드의 아미노산 서열을 보여준다. 아래 표 21은 질량분석법에 의해 분석된 E9.71(M) 절단 부위를 보여준다.

표 20

E9.71(M)의 생성을 위해 사용된 신호 웨بت아이드의 아미노산 서열

항체	신호 웨بت아이드	신호 웨بت아이드 서열	VL 영역
E9.71(M)	λ 1a	MAWSPLFLTLITHCAGSWA (서열번호 :362)	전장
E9.71(M)-1	λ 1a (GS 내지 RV)	MAWSPLFLTLITHCARVWA (서열번호 :363)	전장
E9.71(M)-2	λ 3p	MAWTPLLLPLLTFCVSEA (서열번호 :364)	전장
E9.71(M)-3	λ 3p	MAWTPLLLPLLTFCVSEA (서열번호 :365)	N-말단 S 결실
E9.71(M)-4	카파 L23	MDMRVPAQRLGLLLLWFPGARC (서열번호 :366)	전장
E9.71(M)-5	카파 L23	MDMRVPAQRLGLLLLWFPGARC (서열번호 :367)	N-말단 S 결실

[1261]

표 21

질량 분광분석법(MS)에 의해 분석된 E9.71(M) 항체 절단 부위

항체	항체 주요 절단 부위	주요 피크 % (↓)
E9.71(M)	MAWSPLFLTLITHCAG↓SWA↓SYELTQPPSVS (서열번호 :368)	95
E9.71(M)-1	MAWSPLFLTLITHCARVWA↓SYELTQPPSVS (서열번호 :369)	96
E9.71(M)-2	MAWTPLLLPLLTFCVSEA↓SYELTQPPSVS (서열번호 :370)	96
E9.71(M)-3	MAWTPLLLPLLTFCVSEA↓YELTQPPSVS (서열번호 :371)	97
E9.71(M)-4	MDMRVPAQRLGLLLLWFPGARC↓SYELTQPPSVS (서열번호 :372)	미결정
E9.71(M)-5	MDMRVPAQRLGLLLLWFPGARC↓YELTQPPSVS (서열번호 :373)	미결정

[1262]

[1263] 실시예 8. 조작된 PROfusion 항체의 시험관내 성상확인

[1264] 조작된 이들 PROfusion 항체의 항원 결합 친화성을 실시예 1.1에 기술된 바와 같이 바이아코어 기술에 의해 결정하였고 표 22에 제시되어 있다. 추가로 대표적인 항체의 시험관내 활성을 실시예 1에 기술된 방법을 사용하여 결정하였고 그 결과는 표 23에 제시되어 있다.

표 22

조작된 항-DLL4 PROfusion 항체의 바이아코어 역학

항체	결합 역학								
	사람 DLL4 ECD			마우스 DLL4 ECD			사이노몰러스 DLL4 ECD		
	K _a (M ⁻¹ S ⁻¹) E+04	K _d (S ⁻¹) E-05	K _D (nM)	K _a (M ⁻¹ S ⁻¹) E+04	K _d (S ⁻¹) E-05	K _D (nM)	K _a (M ⁻¹ S ⁻¹) E+04	K _d (S ⁻¹) E-05	K _D (nM)
E9.4	5.67	3.31	0.58	5.38	6.01	1.12	1.37	3.44	0.25
E9.11	3.63	1.74	0.48	2.77	1.39	0.5	5.31	0.89	0.17
E9.14	3.99	36.5	9.14	3.89	13.6	3.49	5.72	38.6	6.75
E9.17	4.39	0.44	0.1	3.7	1.41	0.38	7.51	1.23	0.16
E9.18	1.57	1.84	1.18	2.32	1.68	0.73	2.63	2.63	1

[1265]

E9.19	7.49	5.17	0.69	6.7	20.6	3.07	1.92	4.86	0.25
E9.22	3.91	33.1	8.46	3.78	13.3	3.5	5.62	35.2	6.26
E9.48	1.1	7.59	6.92	1.65	4.17	2.53	1.68	7.91	4.71
E9.65	2.59	36.3	14	2.57	13.6	5.27	3.21	41.4	12.9
E9.66	3.26	0.25	0.078	2.89	1.44	0.50	6.55	0.91	0.14
E9.71	3.88	3.51	0.91	3.55	21.6	6.08	7.75	3.79	0.49
E9.13	3.74	4.97	1.33	4.34	21.2	4.89	7.92	4.95	0.63
E9.16	1.29	3.15	2.45	1.83	14.8	8.1	2.49	3.79	1.52
E9-38	1.27	3.48	2.75	1.84	17.1	9.27	2.42	3.47	1.44
E9.2B	35.6	0.79	0.02	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
E9.1F	21.8	1.16	0.05	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
E9-12B	15.1	0.31	0.02	8.35	1.47	0.18	N/D	N/D	N/D
E9-10H	10.4	5.9	0.57	6.53	2.23	0.34	N/D	N/D	N/D
E9-5E	15	0.6	0.04	8.9	0.2	0.02	N/D	N/D	N/D
E9-10C	12	4.59	0.38	7.37	12.1	1.6	N/D	N/D	N/D
E9-10E	21.8	4.62	0.21	15.1	9.41	0.62	N/D	N/D	N/D
E9-7E	15.2	4.12	0.27	9.53	22.1	2.3	N/D	N/D	N/D
A10.K30	3.57	27.4	7.69	NB	NB	NB	N/D	N/D	N/D
A10.K42	10	40.6	4.06	NB	NB	NB	N/D	N/D	N/D
A10.L45	4.4	3.16	0.72	NB	NB	NB	N/D	N/D	N/D
A10.L73	5.07	0.95	0.19	NB	NB	NB	N/D	N/D	N/D

[1266]

MAb = 모노클로날 항체; N/D = 결정되지 않음, NB = 결합이 없음

표 23

선택된 조작된 PROfusion DLL4 항체의 성상확인

항체	직접 결합 검정						기능 차단 검정					
	포획 ELISA (EC ₅₀ , nM)			FACS (EC ₅₀ , nM)			경쟁 ELISA (IC ₅₀ , nM)			경쟁 FACS (IC ₅₀ nM)		
	DLL4 ECD		DLL4 세포		DLL4 ECD/ huNotch-1		huNotch-1/ DLL4 세포					
	hu	mu	cyno	hu	mu	hu	mu	cyno	hu	mu	hu	mu
E9-2B	0.16	0.16	0.45	1.78	0.35	2.3	2.8	2.2	2.63	0.34	2.1	
E9-71	0.16	0.17	0.44	1.82	0.32	2.0	1.3	2.0	3.22	0.24	2.1	
E9-19	0.17	0.17	0.46	2.79	0.54	1.8	1.3	1.5	4.90	0.44	4.4	
E9-4	N/D	N/D	N/D	1.63	0.63	N/D	N/D	N/D	4.3	0.3	N/D	
E9-11	N/D	N/D	N/D	4.46	1.45	N/D	N/D	N/D	14.75	2.06	N/D	
E9-16	N/D	N/D	N/D	1.7	>50	N/D	N/D	N/D	12.6	1.1	N/D	
E9-17	N/D	N/D	N/D	8	2.57	N/D	N/D	N/D	19.79	N/D	1	
E9-22	N/D	N/D	N/D	34.34	37.35	N/D	N/D	N/D	21.05	2.63	N/D	
E9-38	N/D	N/D	N/D	1.66	0.13	N/D	N/D	N/D	7.76	1.2	N/D	
E9-48	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	9.12	1.3	N/D	
E9-66	N/D	N/D	N/D	2.02	0.7	N/D	N/D	N/D	5.03	0.99	N/D	
E9-1F	N/D	N/D	N/D	2.65	0.37	N/D	N/D	N/D	6.55	0.65	N/D	
E9-5E	N/D	N/D	N/D	2.7	0.89	N/D	N/D	N/D	3.76	0.34	N/D	
E9-7E	N/D	N/D	N/D	4.46	1.94	N/D	N/D	N/D	4	0.33	0.41	
E9-10C	N/D	N/D	N/D	3.15	0.88	N/D	N/D	N/D	3.03	0.26	0.85	
E9-10E	N/D	N/D	N/D	5.1	1.19	N/D	N/D	N/D	3.83	0.36	N/D	
E9-10H	N/D	N/D	N/D	3.52	0.82	N/D	N/D	N/D	5.65	0.6	N/D	
E9-12B	N/D	N/D	N/D	3.34	0.71	N/D	N/D	N/D	4.44	0.37	N/D	
E9-71(M)	N/D	N/D	N/D	0.27	0.29	N/D	N/D	N/D	2.12	0.18	N/D	
E9-71(L)	N/D	N/D	N/D	0.22	0.47	N/D	N/D	N/D	1.82	0.21	2.4	
E9-71(M)-3	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	0.65	

[1268]

[1269] hu = 사람; mu = 쥐; cyno = 사이노몰거스 원숭이; N/D = 결정되지 않음.

[1270] 실시예 8: 선택된 PROfusion 항체의 물리화학적 특성

[1271] DLL4에 특이적인 모노클로날 항체의 특성을 아래와 같이 질량분석법으로 결정하였다.

[1272] E9-71의 질량분석

[1273] 경쇄 및 중쇄 분자량: E9-71 시료를 Milli-Q 물로 1 mg/mL로 희석하였다. 20 μ l의 희석 시료에 1 μ l의 1 M DTT를 첨가하였다. 시료를 37°C에서 30분간 배양하였다. 1 μ l의 환원 시료를 Varian 디페닐 컬럼이 장착된 Agilent 6510 Q-TOF LC/MS 시스템에 주입하였다. 완충액 A는 물중의 0.02% 트리플루오로아세트산 (TFA), 0.08% 포름산 (FA)이다. 완충액 B는 아세토니트릴중의 0.02% TFA, 0.08% FA이다. 구배는 5%B에서 시작하여 5분안에 35%B로 증가시키고, 이어서 15분안에 38%B로 증가시켰다. 그런 다음, 구배를 1분안에 95%B로 증가시키고 이어서 4분 동안 95%B를 유지한 다음, 1분안에 5%B로 감소시켰다. 유속은 50 μ l/분이다. 질량분석기는 5 kvolt 분무 전압에서 작동하였고 스캔 범위는 600 내지 3200의 질량대전하비였다. 22649 달톤의 경쇄 분자량은 아미노산 Y가 N-말단인 이론값과 잘 일치하였다. 3개의 작은 피크가 분자량 22014 달톤, 22737 달톤 및 22937 달톤에서 관찰되었다. 22014 달톤에서의 피크는 N-말단 -6 아미노산 단편과 일치하였다. 이 피크는 십중팔구 완전한 경쇄로부터의 내부근원(in-source) 단편화에 의해 발생되었다. 그 이유는 질량분석기의 "단편화기 값"을 낮출때 그 피크가 사라질 수 있기 때문이다. 22737 달톤은 아미노산 S가 N-말단인 이론값과 일치하였다. 22937 달톤은 N-말단에 아미노산 "LS"의 신호 웹타이드 연장을 가진 경쇄와 일치하였다. 중쇄 분자량은 이론값과 잘 일치하였다. 관찰된 분자량은 50263 달톤, 50426 달톤 및 50588 달톤이었고 이 차이는 상이한 당화의 결

과로서 162 달톤에 상응한다.

[1274] E9-71(M)의 질량분석.

[1275] "E9-71의 질량분석"에 기술된 바와 동일한 방법을 사용하여 E9-71(M) 시료를 분석하였다. 22645 달톤의 경쇄 분자량은 아미노산 S가 N-말단인 이론값과 잘 일치하였다. 분자량 22989 달톤의 작은 피크가 관찰되었고, 이것은 N-말단에 아미노산 "SWA"의 신호 웨بت아이드 연장을 가진 경쇄에 상응한다. 분자량 21923 달톤의 아주 작은 피크가 또한 관찰되었다. 이 피크는 십중팔구 내부근원 단편화에 의해 발생되었다. 그 이유는 질량분석기의 "단편화기 값"을 낮출때 그 피크가 사라질 수 있기 때문이다. 중쇄 분자량은 이론값과 잘 일치하였다. 관찰된 분자량은 50263 달톤, 50426 달톤 및 50588 달톤이었고 이 차이는 상이한 당화의 결과로서 162 달톤에 상응한다.

[1276] E9-71(L)의 질량분석.

[1277] "E9-71의 질량분석"에 기술된 바와 동일한 방법을 사용하여 E9-71(L) 시료를 분석하였다. 22645 달톤의 경쇄 분자량은 아미노산 S가 N-말단인 이론값과 잘 일치하였다. 분자량 22989 달톤의 작은 피크가 관찰되었고, 이것은 N-말단에 아미노산 "SWA"의 신호 웨بت아이드 연장을 가진 경쇄에 상응한다. 분자량 21923 달톤의 아주 작은 피크가 또한 관찰되었다. 이 피크는 십중팔구 내부근원 단편화에 의해 발생되었다. 그 이유는 질량분석기의 "단편화기 값"을 낮출때 그 피크가 사라질 수 있기 때문이다. 중쇄 분자량은 이론값과 잘 일치하였다. 관찰된 분자량은 50245 달톤, 50407 달톤 및 50569 달톤이었고 이 차이는 상이한 당화의 결과로서 162 달톤에 상응한다.

[1278] E9-71(M)-3의 질량분석.

[1279] "E9-71의 질량분석"에 기술된 바와 동일한 방법을 사용하여 E9-71(M)-3 시료를 분석하였다. 분자량 22558 달톤의 경쇄 분자량은 이론값과 잘 일치하였다. 분자량 21923 달톤의 아주 작은 피크가 또한 관찰되었다. 이 피크는 십중팔구 내부근원 단편화에 의해 발생되었다. 그 이유는 질량분석기의 "단편화기 값"을 낮출때 그 피크가 사라질 수 있기 때문이다. 중쇄 분자량은 이론값과 잘 일치하였다. 관찰된 분자량은 50263 달톤, 50426 달톤 및 50588 달톤이었고 이 차이는 상이한 당화의 결과로서 162 달톤에 상응한다.

[1280] 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 3000 침전에 의해 항체의 용해성을 측정하였다. 또한, 아미콘 원심분리 필터로 특정 용액 및/또는 완충액중에 항체를 농축시킴으로써 항체의 용해성, 즉 순용해성을 결정한 다음, 25°C 및 5°C에서 침전을 관찰하였다. 안정성은 근자외선 원편광 이색성 분광법 (UV-CD) 및 시차주사 열량측정 (DSC)에 의해 추정되었다. 크기별 배제 크로마토그래피 (SEC)에 의해 동결과 해동 및 승온에 대한 안정성 (가속 안정성)이 평가되었다. 상세한 기술은 실시예 1.8에 기술되어 있으며 이의 결과는 아래에 기재되어 있다.

[1281] PEG 침전 결과에 의해 용해성 결정

[1282] 표 24 및 26은 E9 클론 시리즈의 침전을 유도하는데 필요한 PEG 3000의 비율(%)을 보여준다. 클론 및 아달리무마브 대조군은 0.2 mg/ml으로 제형되었다. 이 결과에 따르면, E9-4, E9-14, E9-22 및 E9-19와 같은 클론은 아달리무마브의 용해성 (약 200 mg/ml)과 유사한 용해성을 갖는 것으로 측정된 한편 E9-11 및 E9-17과 같은 클론은 훨씬 더 낮은 용해성을 갖는 것으로 측정되었다.

[1283] 표 25는 안정성이 조작된 E9 클론 시리즈의 침전을 유도하는데 필요한 PEG 3000의 비율(%)을 보여준다. 클론 및 아달리무마브 대조군은 0.2 mg/ml으로 제형되었다. 이 결과에 따르면, E9-SE1과 같은 클론은 시리즈에서 최고의 용해성을 갖지만 아달리무마브의 용해성 (약 200 mg/ml)과 유사한 용해성을 갖는 것으로 예상되지 않는 한편 E9-SE5와 같은 클론은 훨씬 더 낮은 용해성을 갖는 것으로 측정되었다.

표 24

E9 항체 시리즈의 침전을 유도하는데 필요한 PEG 3000의 비율(%).
(항체는 0.2 mg/ml으로 제형화되었다).

A-번호	로트 #	항체	% PEG 3000
A-1242367.0	1718299	DLL4-E9-11 hIgG1/L	3.00
A-1242368.0	1718300	DLL4-E9-17 hIgG1/L	3.00
		E9.1 IgG2	3.00
A-1242369.0	1718301	DLL4-E9-18 hIgG1/L	4.00
A-1242370.0	1718302	DLL4-E9-48 hIgG1/L	4.00
		E9.1 IgG4	5.00
		DLL4-E9-3 hIgG/L	6.00
A-1242371.0	1718303	DLL4-E9-66 hIgG1/L	8.00
A-1241120.0	1716682	DLL4-E9-16 hIgG1/L	10.00
A-1242795.0	1718785	DLL4-E9-13 hIgG1/L	10.00
A-1241121.0	1716683	DLL4-E9-38 hIgG1/L	11.00
A-1242800.0	1718790	DLL4-E9-71 hIgG1/L	11.00
A-1242794.0	1718784	DLL4-E9-4 hIgG1/L	12.00
A-1242796.0	1718786	DLL4-E9-14 hIgG1/L	12.00
A-1242798.0	1718788	DLL4-E9-22 hIgG1/L	12.00
A-1242797.0	1718787	DLL4-E9-19 hIgG1/L	14.00
		아달리무마브	14.00

[1284]

표 25

E9 안정성 조작된 항체 시리즈의 침전을 유도하는데 필요한 PEG 3000의 비율(%).
(항체는 0.2 mg/ml으로 제형화되었다).

항체	% PEG 3000
E9-SE5	6.00
E9-SE7	7.00
E9-SE4	7.50
E9-SE8	7.50
E9-SE2	9.00
E9-SE3	9.00
E9-SE6	9.50
E9-SE1	10.00
(+) E9.1	9.00
(+) E9	10.50
아달리무마브	13.00

[1285]

표 26

E9 항체 시리즈의 침전을 유도하는데 필요한 PEG 3000의 비율(%).
(항체는 0.2 mg/ml으로 제형화되었다).

항체	% PEG 3000
E9-2B	8.00
E9-1F	8.00
E9	10
아달리무마브	14

[1286]

[1287] 순용해성 선별 결과: E9, E9-19, E9-71, E9-2B, E9-1F.

[1288] 12 mg의 E9, E9-71, E9-1F 및 E9-19 및 5.5 mg의 E9-2B를 함유한 용액을 수득하였다. E9는 IgG1 돌연변이 동종형이다. 모든 용액의 용량은 아미콘 30K 15 ml 투브를 이용한 한외원심분리에 의해 1 ml 이하로 줄였다.

[1289] 이 단계 후 다음과 같이 관찰되었다: E9-2B 및 E9-19는 등명하였다. E9, E9-71 및 E9-1F는 약간 혼탁하였다.

[1290] 각 투브에 10 ml의 15 mM 히스티딘 완충액 (pH 5.03)을 첨가하고 용액을 1 ml로 재농축시켰다. 이어서, 용액을 아미콘 30K 4 ml 투브에 옮기고 가능한 적은 용량으로 농축시켰다.

[1291] 이 단계 후 다음과 같이 실온에서 관찰되었다:

[1292] E9: 163 mg/ml; 용량=0.05 ml; pH = 5.12

[1293] E9-19: 132 mg/ml; 용량=0.05 ml; pH = 5.06

[1294] E9-71: 193 mg/ml; 용량=0.05 ml; pH = 5.32

[1295] E9-2B: 64 mg/ml; 용량=0.1 ml; pH = 5.29

[1296] E9-1F: 100 mg/ml; 용량=0.1 ml; pH = 5.31

[1297] E9-2B 및 E9-1F 둘 다는 나머지 3개보다 농축시키는데 월씬 더 오래 걸렸다. 이것은 E9-2B 및 E9-1F의 점도가 제형 조건하에서 높다는 것을 의미할 수 있다.

[1298] 그런 다음, 용액을 5°C에 2일간 넣고서 같은 온도에서 용해성을 측정하였다. 다음의 결과가 관찰되었다:

[1299] E9: 5°C에서 및 실온으로 환원되었을 때 등명하게 나타났다.

[1300] E9-71: 5°C에서 및 실온으로 환원되었을 때 등명하게 나타났다.

[1301] E9-1F: 5°C에서 극미량의 혼탁성을 보였고 20분 후 실온으로 환원되었을 때 등명하게 나타났다.

[1302] E9-2B: 5°C에서 극미량의 혼탁성을 보였고 20분 후 실온으로 환원되었을 때 등명하게 나타났다.

[1303] E9-19: 5°C에서 극미량의 혼탁성을 보였고 20분 후 실온으로 환원되었을 때 등명하게 나타났다.

[1304] E9-71에 대한 순용해성 선별 결과

[1305] E9-71의 경우, 용액중의 4 mg을 아미콘 원심분리 필터로 60 mg/ml로 농축시켰다. 침전 또는 혼탁은 25°C에서 관찰되지 않았고 5°C에서 1일간 저장한 후에도 관찰되지 않았다.

[1306] 근 UV-CD 결과에 의한 삼차원 구조 성상확인.

[1307] 근 UV-CD를 1 mg/ml의 E9, E9-19, E9-71, E9-2B 및 E9-1F에 대해 실시하였다. 스펙트럼의 프로필은 적절하게 폴딩된 항체에서 전형적으로 관찰되는 S자형 패턴을 보여준다. 이 기술로부터, 이들 항체의 폴딩오류는 관찰되지 않았다.

[1308] 시사주차 열량법 (DSC)에 의한 고유 안정성 성상확인.

[1309] DSC를 1 mg/ml의 E9, E9-19, E9-71, E9-2B 및 E9-1F에 대해 실시하였다. 이 결과는 표 27에 기술되어 있다. 개시온도는 풀림이 시작되는 온도이다. 또한, IgG 항체는 전형적으로 3개의 풀림 전이온도 (T_m)를 보여준다. 완전한 항체의 풀림은 Fc 단편내 CH₂ 도메인의 융점, Fc 단편내 CH₃ 도메인의 융점 및 Fab 단편의 융점과 연관이 있다. 개시온도 값은 E9, E9-19 및 E9-71이 가장 안정적임을 의미한다. 전형적으로, 보다 높은 T_m 값을 갖는 클론이 보다 낮은 T_m 값을 갖는 클론에 비해 바람직하다.

표 27

1 mg/ml에서 DSC를 통한 항-DLL4 E9 클론의 고유 안정성.

항체	T _{m1} (°C)	T _{m2} (°C)	T _{m3} (°C)	개시 (°C)
E9	64.45	72.12	80.04	54
E9-19	65.66	77	---	56
E9-71	65.65	75.36	81.24	54
E9-2B	64.74	80.58	83.27	52.5
E9-1F	63.84	80.51	83.26	51.3

[1310]

[1311] 동결-해동 스트레스에 대한 안정성의 평가

[1312] 동결-해동 스트레스에 대한 안정성을 E9, E9-19, E9-71, E9-2B 및 E9-1F 시료에 대해 1 mg/ml에서 평가하였다. 표 28은 5회차 동결-해동 후 시료의 SEC 분석 결과를 보여준다. 모든 피검 항체들은 동결-해동 스트레스에 안정하였다. 5회의 동결-해동 후 조차 단량체의 뚜렷한 손실이 관찰되지 않았다.

표 28

항-DLL4 클론을 -80°C 에서 동결하기 전 및 -80°C 에서의 동결 및 30°C 수육에서의 해동 사이클 5회 후 SEC에 의해 정량화된 단량체 종의 비율(%).

항체	동결 전의 단량체 비율(%)	5회 동결-해동 사이클 후 단량체 비율(%)
E9	99.2	99.3
E9-19	99.3	99.1
E9-71	96.9	96.8
E9-2B	99.0	98.9
E9-1F	98.6	98.5

[1313]

[1314] 승온에서의 안정성 평가 (가속 안정성).

[1315] 승온에서의 안정성을 1 mg/ml 의 E9, E9-19, E9-71, E9-2B 및 E9-1F 시료에 대해 측정하였다. 표 29는 40°C 및 50°C 하에 0 시, 7일 후 및 21일 후에서의 SEC 분석 결과를 보여준다. 모든 항체에 대한 분해 역학은 50°C 하에 21일 후에서의 단량체의 감소율이 약 8%인 것으로 나타났다.

표 29

시간 0 및 40°C 및 50°C 에서의 7일 및 21일 후에 항-DLL4 클론을 SEC하여 정량화한 다른 종들의 비율(%). (시료는 1 mg/ml 로 제형화되었다).

항체	시간 0에서의 단량체 비율(%)	40°C 하에 7일째의 단량체 비율(%)	50°C 하에 7일째의 단량체 비율(%)	40°C 하에 21일째의 단량체 비율(%)	50°C 하에 21일째의 단량체 비율(%)
E9	99.2	98.6	86.8	90.9	88.1
E9-19	99.3	98.7	96.8	97.4	91.9
E9-71	96.9	96.4	95.4	95.0	91.0
E9-2B	99.0	98.6	97.0	97.1	92.4
E9-1F	98.6	98.2	96.5	96.8	91.9

항체	시간 0에서의 용질체 비율(%)	40°C 하에 7일째의 용질체 비율(%)	50°C 하에 7일째의 용질체 비율(%)	40°C 하에 21일째의 용질체 비율(%)	50°C 하에 21일째의 용질체 비율(%)
E9	0.3	0.3	0.3	0.5	0.6
E9-19	0.3	0.3	0.4	0.7	1.4
E9-71	2.4	2.3	1.8	2.9	2.8
E9-2B	0.5	0.4	0.5	0.9	1.7
E9-1F	0.3	0.3	0.3	0.6	1.6

항체	시간 0에서의 단편 비율(%)	40°C 하에 7일째의 단편 비율(%)	50°C 하에 7일째의 단편 비율(%)	40°C 하에 21일째의 단편 비율(%)	50°C 하에 21일째의 단편 비율(%)
E9	0.5	1.2	12.9	8.7	11.3
E9-19	0.4	1.0	2.8	1.9	6.7
E9-71	0.7	1.3	2.8	2.1	6.2
E9-2B	0.6	1.0	2.5	2.0	5.9
E9-1F	1.1	1.5	3.2	2.5	6.5

[1316]

[1317] 실시예 9: 항-DLL4 항체의 설치류 PK 평가

[1318] 항-DLL4 항체의 약력학 특성을 평가하기 위해 SCID-베이지 마우스 (항체당 $n = 3$)에 항체의 일회 복강(IP) 용량을, 주 DLL4에 대한 항체의 교차반응성에 따라, 5 또는 30 mg/kg 농도로 투여하였다. 각 동물로부터 21일에 걸쳐 혈청 시료 (시점 당 HBS-EP + 완충액중에 1:50으로 희석된 전혈 $5\text{ }\mu\text{l}$)를 채집하였다. DLL4-특이적 바이아코어 플랫폼을 사용하여 혈청 농도를 결정하였다. 간단히 설명하면, 사람 DLL4를 센서칩에 고정하고 시료를 유동셀에 5분간 분당 $5\text{ }\mu\text{l}$ 로 주입하면서 생성된 결합 수준을 측정하고 표준물과 비교하였다. 혈청 농도 시간 프로파일을 사용하여 C_{max} (최대 혈청 농도), CL (청소율) 및 $t_{1/2}$ (항체 반감기)의 약력학 변수를 측정하였다. 이의 결과는 표 30에 요약되어 있다. E9 및 A10 PROfusion 항체의 경우, 약력학 특성은 친화성 성숙의 과정 동안에 CDR-조작을 통해 향상되었다.

표 30

SCID-베이지 마우스에서 항-DLL4 항체의 약동학 변수.

항체	용량 (mg/kg)	C _{max} (μ g/mL)	CL (mL/hr/kg)	t _{1/2} (d)
E9	30	201	3.10	1.3
E9-10C	30	165	0.82	5.2
E9-10E	30	263	0.97	3.8
E9-10H	30	235	1.49	3.1
E9-12B	30	146	1.32	3.8
E9-19	30	179	1.08	4.4
E9-1F	30	269	0.89	4.2
E9-2B	30	165	0.65	5.5
E9-5E	30	234	0.95	3.0
E9-66	30	114	2.90	1.9
E9-71	30	102	1.10	4.2
E9-71(L)	30	145	0.83	4.1
E9-71(M)	30	113	1.07	4.3
E9-7E	30	130	1.23	5.8
A10	5	10.5	5.80	3.1
A10.K30	5	15.6	0.69	17.7
A10.K42	5	12.5	0.93	13.8
A10.L45	5	18.6	0.65	13.4

[1319]

[1320] 실시예 10: 시험관내에서 항-DLL4 항체 처리에 의한 상피 세포 발아의 증가.

[1321] 문현 (Nakatsu et al., *Microvasc. Res.*, 66: 102-112 (2003))에 기술된 바와 같이 피브린 젤 비드 발아 검정을 실시하여 HUVEC (계대 2-3, Lonza)의 시험관내 혈관신생 활성을 검사하였다. 간단히 설명하면, 피브리노겐 용액을 아프로티닌 (4 U/ml) 및 트롬빈 (50 U/ml)로 재구성하였다. 사이토텍스 3 비드 (Amersham Pharmacia Biotech)를 비드 당 350 내지 400개 HUVEC로 밤새 피복시켰다. 약 20개 HUVEC-피복된 비드가 96-웰 조직 배양 평판의 웰 당 피브린 응괴에 험입되었다. 80% 단층으로 성장된 정상적인 사람 섬유아세포 (NHLF, Lonza)로부터 유래된 조건 배지를 젤 위에 플레이팅하였다. 이 웰에 DLL4 항체 및 대조 항체 KLH를 15 μ g/ml로 첨가하였다. 10일째 및 12일째에 도립 현미경 및 니콘 CCD 카메라로 촬영하였다. E9 및 A10 항체에 의한 DLL4 억제는 시험관내에서 상피 세포 발아를 증가시켰다 (데이터 제시되지 않음).

[1322] 실시예 11: DLL4 항체 처리에 의한 생체내 종양 성장 억제.

[1323] 종양 성장에 미치는 항-DLL4 항체의 효과를 SCID-베이지 마우스에 이식된 피하 Calu-6 이종이식 종양에 대해 평가하였다. 간단히 설명하면, 2×10^6 세포를 암컷 SCID-베이지 마우스의 우측 후위 측복부에 피하 접종하였다. 종양이 14-18일간 성장하도록 둔 후 이 시점에서 전자 캘리퍼스로 종양 체적을 측정하였다. $L \times W^2/2$ 의 식으로 종양 크기를 계산하였다. 치료 시작전에 평균 종양 체적이 균등한 것(전형적으로 180 내지 250 mm^3)끼리 마우스를 처리군 (군 당 n=10)으로 분류하였다. 그런 다음 동물에 항-DLL4 항체를 2주 동안 주 2회씩 복강 투여하였다 (총 4회 투여). 각 동물군의 평균 종양 체적이 $\geq 2,000 \text{ mm}^3$ 의 종점에 도달하기까지 실험 기간동안 주 2회씩 평균 종양 체적을 측정하였다. 표 31은 그 결과를 보여준다. PROfusion 항체의 E9 시리즈의 경우, 실시예 9에서 보는 바와 같이 약력학이 향상된 항체는 생체내 항-종양 활성이 좀더 강력한 것으로 나타난다.

표 31

Calu-6 사람 비-소세포 폐암 이종이식편 모델에서의 항-DLL4 항체의 효능.

처리 항체	용량 경로, 요법	%T/C a	%ILSb
E9	10 mg/kg IP, 2X/week X2	43**	52**
E9-10C	10 mg/kg IP, 2X/week X2	26**	81**
E9-2B	10 mg/kg IP, 2X/week X2	28**	76**
E9-10E	10 mg/kg IP, 2X/week X2	30**	70**
E9-19	10 mg/kg IP, 2X/week X2	31**	64**
E9-5E	10 mg/kg IP, 2X/week X2	30**	57**
E9-71	10 mg/kg IP, 2X/week X2	34**	63**
E9-1F	10 mg/kg IP, 2X/week X2	34**	57**
E9-12B	10 mg/kg IP, 2X/week X2	38**	52**
E9-7E	10 mg/kg IP, 2X/week X2	38**	44**
E9-10H	10 mg/kg IP, 2X/week X2	41**	52**
E9-66	10 mg/kg IP, 2X/week X2	43**	32*

[1324]

[1325] a. %T/C = 처리군의 평균 종양 체적/처리 대조군의 종양 체적 x 100. P 값(별표)은 처리군 대 처리 대조군의 스튜던츠 T 시험 비교로부터 유도된 것이다. 25일째/26일째/27일째의 측정을 근거로 한 것이다.

[1326]

b. %ILS = (T-C)/C x 100 (여기서, T = 처리군의 중간점 내지 종점, C = 처리 대조군의 중간점 내지 종점). P 값(별표)은 처리군 대 처리 대조군의 Kaplan Meier 로그-순위 비교로부터 유도된 것이다. 2000 mm^3 의 종점을 근거로 한 것이다.

[1327]

* p < 0.05 ; ** p < 0.01

[1328]

본원 전반에 걸쳐 인용된 모든 참조 문헌 (논문, 특허, 특허원 및 웹사이트를 포함)의 내용은 본원에 인용된 문헌 그 자체로 전체 내용이 본원에 참고로 분명하게 포함된다.

[1329]

균등 범위

[1330]

본 발명은 발명의 본질 또는 필수적인 특징을 벗어나지 않으면서 다른 특정 형태로 구현될 수 있다. 따라서 모든 관점에서 상기된 양태들은 본원에 기재된 발명을 한정하기 보다는 예시하기 위해 제공된 것으로 간주되어야 한다. 그러므로, 상기된 설명이 본 발명의 범위를 정하는 것이 아니라 첨부된 특허청구범위가 본 발명의 범위를 정하는 것이며, 이에 따라 특허청구범위와 균등한 의미 및 범위에 속하는 모든 변형은 본원에 포함되는 것이다.

서 열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Abbott Laboratories, Inc.

<120> THERAPEUTIC DLL4 BINDING PROTEINS

<130> 10289.W0.01

<150> US 61/238,152

<151> 2009-08-29

<150> US 61/261,728

<151> 2009-11-16

<160> 377

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 121

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser

20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu

35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe

65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ala Arg Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 2

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Phe Leu Ala Pro Ser Ser Lys

1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35	40	45	
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser			
50	55	60	
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr			
65	70	75	80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys			
85	90	95	
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys			
100	105	110	
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro			
115	120	125	
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys			
130	135	140	
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp			
145	150	155	160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu			
165	170	175	
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu			
180	185	190	
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn			
195	200	205	
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly			
210	215	220	
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu			
225	230	235	240
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr			
245	250	255	
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn			
260	265	270	
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe			
275	280	285	

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325 330

<210> 3

<211> 330

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IgG1 constant region mutant

<400> 3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu

225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325 330

<210> 4

<211> 106

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln

1 5 10 15

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr

20 25 30

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser

35 40 45

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr

50 55 60

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys

65 70 75 80

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro

85 90 95

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

100 105

<210> 5

<211> 105

<212>

PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu

1 5 10 15

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe

20 25 30

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val

35 40 45

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys

50 55 60

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser

65 70 75 80

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu

85 90 95

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser

100 105

<210> 6

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH2-70/JH6 FR1 heavy chain acceptor sequence

<400> 6

Glu Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln

1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser

20 25 30

<210> 7

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH2-70/JH6 FR2 heavy chain acceptor sequence

<400> 7

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala

1 5 10

<210> 8

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH2-70/JH6 FR3 heavy chain acceptor sequence

<400> 8

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr

1 5 10 15

Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg

20 25 30

<210> 9

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH2-70/JH6 FR4 heavy chain acceptor sequence

<400> 9

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 10

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH2-26/JH6 FR1 heavy chain acceptor sequence

<400> 10

Glu Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Thr Glu

1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser

20 25 30

<210> 11

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH2-26/JH6 FR3 heavy chain acceptor sequence

<400> 11

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val Val Leu Thr

1 5 10 15

Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg

20 25 30

<210> 12

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH3-72/JH6 FR1 heavy chain acceptor sequence

<400> 12

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser

20 25 30

<210> 13

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH3-72/JH6 FR2 heavy chain acceptor sequence

<400> 13

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly

1 5 10

<210> 14

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH3-72/JH6 FR3 heavy chain acceptor sequence

<400> 14

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln

1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

20 25 30

<210> 15

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH3-21/JH6 FR1 heavy chain acceptor sequence

<400> 15

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser

20 25 30

<210> 16

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH3-21/JH6 FR2 heavy chain acceptor sequence

<400> 16

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser

1 5 10
 <210> 17
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VH3-21/JH6 FR3 heavy chain acceptor sequence
 <400> 17
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln

1 5 10 15
 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 18
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VH1-69/JH6 FR1 heavy chain acceptor sequence
 <400> 18
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser

20 25 30
 <210> 19
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VH1-69/JH6 FR2 heavy chain acceptor sequence
 <400> 19

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly

1 5 10
 <210> 20
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> VH1-69/JH6 FR3 heavy chain acceptor sequence

<400> 20

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu

1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

20 25 30

<210> 21

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH1-18/JH6 FR1 heavy chain acceptor sequence

<400> 21

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr

20 25 30

<210> 22

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH1-18/JH6 FR3 heavy chain acceptor sequence

<400> 22

Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu

1 5 10 15

Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

20 25 30

<210> 23

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> B3/JK4 FR1 light chain acceptor sequence

<400> 23

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys

20

<210> 24

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> B3/JK4 FR2 light chain acceptor sequence

<400> 24

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr

1 5 10 15

<210> 25

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> B3/JK4 FR3 light chain acceptor sequence

<400> 25

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 26

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> B3/JK4 FR4 light chain acceptor sequence

<400> 26

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

1 5 10

<210> 27

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> L2/JK4 FR1 light chain acceptor sequence

<400> 27

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys

20

<210> 28

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> L2/JK4 FR2 light chain acceptor sequence

<400> 28

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr

1 5 10 15

<210> 29

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> L2/JK4 FR3 light chain acceptor sequence

<400> 29

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 30

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> L15/JK4 FR1 light chain acceptor sequence

<400> 30

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys

20

<210> 31

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> L15/JK4 FR2 light chain acceptor sequence

<400> 31

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr

1 5 10 15

<210> 32

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> L15/JK4 FR3 light chain acceptor sequence

<400> 32

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 33

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> L5/JK4 FR1 light chain acceptor sequence

<400> 33

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys

20

<210> 34

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> L5/JK4 FR2 light chain acceptor sequence

<400> 34

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr

1 5 10 15

<210> 35

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IGHV4-59 FR1 heavy chain acceptor sequence

<400> 35

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser

20 25 30

<210> 36

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IGHV4-59 FR2 heavy chain acceptor sequence

<400>

36

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly

1 5 10

<210> 37

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IGHV4-59 FR3 heavy chain acceptor sequence

<400> 37

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys

1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

20	25	30
----	----	----

<210> 38
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IGHV4-59/JH FR4 heavy chain acceptor sequence
 <400> 38

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1	5	10
---	---	----

<210> 39
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IGHV3-66 FW1 heavy chain acceptor sequence
 <400> 39

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1	5	10	15
---	---	----	----

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser

20	25	30
----	----	----

<210> 40
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IGHV3-66 FW2 heavy chain acceptor sequence
 <400> 40

Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly

1	5	10
---	---	----

<210> 41
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IGHV3-66 FW3 heavy chain acceptor sequence
 <400> 41

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Ser Phe Tyr Leu Gln

1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

20 25 30

<210> 42

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IGHV3-66/JH FW4 heavy chain acceptor sequence

<400> 42

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 43

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IGHV4-59 FR1 heavy chain acceptor sequence

<400> 43

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Gly Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser

20 25 30

<210> 44

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IGHV4-59 FR2 heavy chain acceptor sequence

<400> 44

Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly

1 5 10

<210> 45

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IGHV4-59 FR3 heavy chain acceptor sequence

<400> 45

Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Tyr	Leu	Lys
1															
	5						10							15	
Leu	Ser	Ser	Val	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg
														20	
														25	
														30	

<210> 46

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IGHV4-59/JH FR4 heavy chain acceptor sequence

<400> 46

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1		5		10											
---	--	---	--	----	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

<210

> 47

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IGHV5-51 FR1 heavy chain acceptor sequence

<400> 47

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Thr Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu

1		5		10		15									
---	--	---	--	----	--	----	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser

		20		25		30									
--	--	----	--	----	--	----	--	--	--	--	--	--	--	--	--

<210> 48

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IGHV5-51 FR2 heavy chain acceptor sequence

<400> 48

Trp Ile Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly

1 5 10
 <210> 49
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IGHV5-51 FR3 heavy chain acceptor sequence
 <400> 49
 Gln Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Phe Asn Thr Phe Phe Leu Gln
 1 5 10 15
 Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

 <210> 50
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IGHV5-51/JH FR4 heavy chain acceptor sequence
 <400> 50
 Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10
 <210> 51
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IGHV2-70 FR1 heavy chain acceptor sequence
 <400> 51
 Glu Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser

 20 25 30
 <210> 52
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> IGHV2-70 FR2 heavy chain acceptor sequence

<400> 52

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly

1 5 10

<210> 53

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IGHV2-70 FR3 heavy chain acceptor sequence

<400> 53

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Val Leu Thr

1 5 10 15

Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg

20 25 30

<210> 54

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IGHV2-70/JH FR4 heavy chain acceptor sequence

<400> 54

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 55

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IGHV3-15 FR1 heavy chain acceptor sequence

<400> 55

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Lys Ser Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg

20 25 30

<210> 56

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IGHV3-15 FR2 heavy chain acceptor sequence

<400> 56

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala

1 5 10

<210> 57

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IGHV3-15 FR3 heavy chain acceptor sequence

<400> 57

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln

1 5 10 15

Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys

20 25 30

<210> 58

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IGHV3-15/JH FR4 heavy chain acceptor sequence

<400> 58

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210

> 59

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IGHV3-43 FR1 heavy chain acceptor sequence

<400> 59

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Gly

20 25 30

<210> 60

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IGHV3-43 FR2 heavy chain acceptor sequence

<400> 60

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala

1 5 10

<210> 61

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IGHV3-43 FR3 heavy chain acceptor sequence

<400> 61

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln

1 5 10 15

Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys

20 25 30

<210> 62

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IGHV3-43/JH FR4 heavy chain acceptor sequence

<400> 62

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 63

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IGLV3-1 FR1 light chain acceptor sequence

<400> 63

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys

20

<210> 64

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IGLV3-1 FR2 light chain acceptor sequence

<400> 64

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr

1 5 10 15

<210> 65

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IGLV3-1 FR3 light chain acceptor sequence

<400> 65

Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 66

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IGLV3-1/JL FR4 light chain acceptor sequence

<400> 66

Phe Gly Tyr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu

1 5 10

<210> 67

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IGLV3-1 FR1 light chain acceptor sequence

<400> 67

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys

20

<210> 68

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IGLV3-1 FR2 light chain acceptor sequence

<400> 68

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr

1 5 10 15

<210> 69

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IGLV3-1 FR3 light chain acceptor sequence

<400> 69

Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys

20

25

30

<210> 70

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IGLV3-1/JL FR4 light chain acceptor sequence

<400> 70

Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly

1 5 10

<210> 71

<211> 21

<

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IGLV3-1 FR1 light chain acceptor sequence

<400> 71

Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln Thr

1 5 10 15

Ala Ser Ile Thr Cys

20

<210> 72

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IGLV3-1 FR2 light chain acceptor sequence

<400> 72

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr

1 5 10 15

<210> 73

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IGLV3-1 FR3 light chain acceptor sequence

<400> 73

Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 74

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IGLV3-1/JL FR4 light chain acceptor sequence

<400> 74

Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly

1 5 10

<210> 75

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IGLV3-1 FR1 light chain acceptor sequence

<400> 75

Leu Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys

20

<210> 76

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IGLV3-1 FR2 light chain acceptor sequence

<400> 76

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr

1 5 10 15

<210> 77

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IGLV3-1 FR3 light chain acceptor sequence

<400> 77

Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Thr Met Asp Glu Ala Asp Tyr Leu Cys

20

25

30

<210> 78

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IGLV3-1/JL FR4 light chain acceptor sequence

<400> 78

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly

1 5 10

<210> 79

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IGKV6D-21 FR1 light chain acceptor sequence

<400> 79

Glu Tyr Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys

20

<210> 80

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IGKV6D-21 FR2 light chain acceptor sequence

<400> 80

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Val Ile Tyr

1 5 10 15

<210> 81

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IGKV6D-21 FR3 light chain acceptor sequence

<400> 81

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asp Asp Ala Thr

1 5 10 15

Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 82

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IGKV6D-21/JK FR4 light chain acceptor sequence

<400> 82

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

1 5 10

<210> 83

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IGKV3D-15 FR1 light chain acceptor sequence

<400> 83

Glu Tyr Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys

20

<210> 84

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IGKV3D-15 FR2 light chain acceptor sequence

<400> 84

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Val Ile Tyr

1 5 10 15

<210> 85

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IGKV3D-15 FR3 light chain acceptor sequence

<400> 85

Asp Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asp Glu Ala Thr

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 86

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IGKV3D-15/JK FR4 light chain acceptor sequence

<400> 86

Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg

1 5 10

<210

> 87

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IGKV4-1 FR1 light chain acceptor sequence

<400> 87

Asp Tyr Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys

20

<210> 88

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IGKV4-1 FR2 light chain acceptor sequence

<400> 88

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Val Ile Tyr

1 5 10 15

<210> 89

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IGKV4-1 FR3 light chain acceptor sequence

<400> 89

Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asp Asp Ala Thr

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 90

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IGKV4-1/JK FR4 light chain acceptor sequence

<400> 90

Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

1 5 10

<210> 91

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IGLV3-1 FR1 light chain acceptor sequence

<400> 91

Leu Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Pro Gly Gln

1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys

20

<210> 92

<211> 15

<212>

PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IGLV3-1 FR2 light chain acceptor sequence

<400> 92

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr

1 5 10 15

<210> 93

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IGLV3-1 FR3 light chain acceptor sequence

<400> 93

Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Thr Met Asp Glu Ala Asp Tyr Leu Cys

20 25 30

<210> 94

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IGLV3-1/JL FR4 light chain acceptor sequence

<400> 94

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu

1 5 10

<210> 95

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IGLV3-1 FR1 light chain acceptor sequence

<400> 95

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys

20

<210> 96

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IGLV3-1 FR2 light chain acceptor sequence

<400> 96

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr

1 5 10 15

<210> 97

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IGLV3-1 FR3 light chain acceptor sequence

<400> 97

Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Thr Met Asp Glu Ala Asp Tyr Leu Cys

20 25 30

<210> 98

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IGLV3-1/JL FR4 light chain acceptor sequence

<400> 98

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

1 5 10

<210> 99

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody CDR-H1 consensus sequence

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> X is S or N

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> X is S, G or N

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> X is S, N, T, G or R

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> X is Y or H

<400> 99

Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Trp Gly

1 5

<210> 100

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody CDR-H2 consensus sequence

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> X is Y, N or S

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> X is T, N, A, I, S or R

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> X is S, N, T or G

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(16)

<223> X is S, N, D or G

<400> 100

Asp Ile Xaa Tyr Xaa Gly Xaa Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Xaa

1 5 10 15

<210> 101

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody CDR-H3 consensus sequence

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223

> X is E, Y, F, Q, W, L or A

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> X is D, A, S, G, V, E or N

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> X is V, M, L, P or A

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> X is I, A, P, R, S, K, Q, V, G, M, or E

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> X is L, Y, F or M

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> X is R, G, S, Q or A

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> X is G, A or S

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> X is S, A, L, V, R or G

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (11)..(11)

<223> X is Y, D, S, N, H, E, R, L, P, C, I, M, T, Q or K

<400> 101

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Asp Xaa

1

5

10

<210> 102

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody CDR-L1 consensus sequence

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> X is Q, E or D

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> X is R, S, G, M, K, L or T

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> X is D or E

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> X is A or V

<400> 102

Ser Gly Xaa Xaa Leu Gly Xaa Lys Tyr Xaa Ser

1	5	10
---	---	----

<210> 103

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody CDR-L2 consensus sequence

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> X is E or Q

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> X is S, L, T, A, E or F

<220><221>

> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> X is K, T, E, N, Q, S, or M

<400> 103

Xaa Asp Xaa Xaa Arg Pro Ser

1 5

<210> 104

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody CDR-L3 consensus sequence

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> X is R, S, M, E, N, G or K

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> X is D or E

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> X is T, V, A, S or M

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> X is G, A or C

<400> 104

Gln Ala Trp Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Val

1 5

<210> 105

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody CDR-H1 consensus sequence

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> X is S, N or D

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> X is H or Y

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> X is S or H

<400> 105

Xaa Xaa Trp Met Xaa

1 5

<210

> 106

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody CDR-H2 consensus sequence

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> X is I, D, M or T

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> X is Y, N, S, Q, V, T, H or D

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> X is S, R, I, T, G, K, H or N

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> X is N, Y, S, I or T

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> X is K, M, N, Q, E, T, R, S, A or L

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> X is Y, D or E

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (11)..(11)

<223> X is S or Y

<400> 106

Xaa Ile Ser Xaa Asp Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 107

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody CDR-H3 consensus sequence

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> X is G, A or R

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> X is G, S or A

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> X is V or M

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> X is F, L, Y or M

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> X is I, S or L

<400> 107

Ala Xaa Gly Xaa Asn Xaa Gly Xaa Asp Xaa

1 5 10

<210> 108

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody CDR-L1 consensus sequence

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> X is A or G

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> X is K, N, L, Q, M, E, S, T, G or D

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> X is T, S, N, A, G or E

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> X is K, Q, N or R

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> X is V or I

<400> 108

Ser Xaa Asp Xaa Leu Gly Xaa Xaa Tyr Xaa Ser

1	5	10
---	---	----

<210> 109

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody CDR-L2 consensus sequence

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> X is A, G, W, S or D

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> X is K, M, Q, N, L, T, I or E

<400> 109

Gln Asp Xaa Xaa Arg Pro Ser

1	5
---	---

<210> 110

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody CDR-L3 consensus sequence

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> X is S or A

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> X is R, S, Q, P, A, V, W or M

<220><221>

MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> X is S, G, I, N, R or T

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> X is D or G

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> X is V, A, P or E

<400> 110

Gln Ser Trp Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Val

1 5

<210> 111

<211> 106

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 111

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala

20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr

35 40 45

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

50	55	60	
Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met			
65	70	75	80
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val			

85	90	95	
Phe Gly Tyr Gly Thr Arg Val Thr Val Leu			

100	105		
-----	-----	--	--

<210> 112

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 112

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Lys Ser Gly Gly			
---	--	--	--

1	5	10	15
---	---	----	----

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser His			
---	--	--	--

20	25	30	
----	----	----	--

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
---	--	--	--

35	40	45	
----	----	----	--

Ala Ile Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Ser Ala Asp Ser Val			
---	--	--	--

50	55	60	
----	----	----	--

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr			
---	--	--	--

65	70	75	80
----	----	----	----

Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
---	--	--	--

85	90	95	
----	----	----	--

Ala Lys Ala Gly Gly Asn Val Gly Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly			
---	--	--	--

100	105	110	
-----	-----	-----	--

Thr Met Val Thr Val Ser Ser			
-----------------------------	--	--	--

115			
-----	--	--	--

<210> 113

<211> 106

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 113

Leu Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Ala Asp Lys Leu Gly Thr Lys Tyr Val
 20 25 30
 Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 Gln Asp Ala Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Thr Met
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Leu Cys Gln Ser Trp Asp Arg Ser Asp Val Val
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105

<210> 114

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> mutations of antibody E9 VH sequence

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (30)..(30)

<223> X is S, N, G or R

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (31)..(31)

<223> X is S or N

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (32)..(32)

<223> X is S, G or N

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (33)..(33)

<223> X is S, N, T, G or R

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (42)..(42)

<223> X is P, S or L

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (54)..(54)

<223> X is Y or N

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (56)..(56)

<223> X is T, N, A, I, S or R

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (58)..(58)

<223> X is S, N, T or G

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (67)..(67)

<223> X is S, N, D or G

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (90)..(90)

<223> X is A or E

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (100)..(100)

<223> X is E, Y, F, Q, W, L or A

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (101)..(101)

<223> X is D, A, S, G, V, E or N

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (102)..(102)

<223> X is V, M, L or P

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (103)..(103)

<223> X is I, A, P, R, S, K, Q, V, G, M or E

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (104)..(104)

<223> X is L, Y, F or M

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (105)..(105)

<223> X is R, G, S, Q or A

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (107)..(107)

<223> X is G, S or A

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (108)..(108)

<223> X is S, A, L, V or R

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (110)..(110)

<223> X is Y, D, S, N, H, E, R, L, P, C, I or M

<400> 114

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Xaa Xaa Xaa

20 25 30

Xaa Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Xaa Pro Gly Lys Leu Glu

35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Xaa Tyr Xaa Gly Xaa Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

Leu Lys Xaa Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe

65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Xaa Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Asp Xaa Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 115

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> mutations of antibody E9 VL sequence

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (25)..(25)

<223> X is Q, E or D

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (26)..(26)

<223> X is R, S, G, M, K, L or T

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (29)..(29)

<223> X is D or E

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (32)..(32)

<223> X is A or V

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (49)..(49)

<223> X is E or Q

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (51)..(51)

<223> X is S, L, T, A, E or F

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (52)..(52)

<223> X is K, T, E, N, Q, S or M

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (79)..(79)

<223> X is P or A

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (92)..(92)

<223> X is R, S, M, E, N or K

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (93)..(93)

<223> X is D or E

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (94)..(94)

<223> X is T, V, A, S or M

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (95)..(95)

<223> X is G, A or C

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (99)..(99)

<223> X is Y or S

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (102)..(102)

<223> X is R or K

<400> 115

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Xaa Xaa Leu Gly Xaa Lys Tyr Xaa

20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr

35 40 45

Xaa Asp Xaa Xaa Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Xaa Met

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Val

85 90 95

Phe Gly Xaa Gly Thr Xaa Val Thr Val Leu

100 105

<210> 116

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> affinity matured DLL4 antibody E9.4 VH region

<400> 116

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
 20 25 30
 Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

 Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Tyr Asp Val Ser Leu Gly Gly Ser Ser Asp His Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
<210> 117
<211> 7
<212> PRT

<213> Artificial Sequence
<220><223> DLL4 antibody E9.4 CDR-H1
<400> 117
 Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly
 1 5
<210> 118
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> DLL4 antibody E9.4 CDR-H2
<400> 118
 Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15
<210> 119
<211> 11
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.4 CDR-H3

<400> 119

Tyr Asp Val Ser Leu Gly Gly Ser Ser Asp His

1 5 10

<210> 120

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.11 VH region

<400> 120

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser

20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Leu Glu

35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe

65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ala Arg Glu Ala Val Pro Leu Gly Gly Ser Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 121

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.11 CDR-H1

<400> 121

Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly

1 5

<210> 122

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.11 CDR-H2

<400> 122

Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 123

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.11 CDR-H3

<400> 123

Glu Ala Val Pro Leu Gly Gly Ser Asp Tyr

1 5 10

<210> 124

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.14 VH region

<400> 124

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Asn Ser

20 25 30

Arg Tyr His Trp Gly Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu

35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

85 90 95
 Cys Ala Arg Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120
 <210> 125
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DLL4 antibody E9.14 CDR-H1
 <400> 125
 Asn Ser Arg Tyr His Trp Gly

1 5
 <210> 126
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.14 CDR-H2
 <400> 126

Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15
 <210> 127
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.14 CDR-H3
 <400> 127

Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr
 1 5 10
 <210> 128

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.17 VH region

<400> 128

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser

20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu

35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe

65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ala Arg Glu Glu Ala Ile Leu Gly Gly Ser Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 129

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.17 CDR-H1

<400> 129

Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly

1 5

<210> 130

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.17 CDR-H2

<400> 130

Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 131

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.17 CDR-H3

<400> 131

Glu Glu Ala Ile Leu Gly Gly Ser Asp Tyr

1 5 10

<210> 132

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.18 VH region

<400> 132

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser

20 25 30

Gly Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Leu Glu

35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Asn Tyr Ala Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe

65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ala Arg Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 133

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.18 CDR-H1

<400> 133

Ser Ser Gly Tyr Tyr Trp Gly

1 5

<210> 134

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.18 CDR-H2

<400> 134

Asp Ile Asn Tyr Ala Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 135

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.18 CDR-H3

<400> 135

Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr

1 5 10

<210> 136

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.19 VH region

<400> 136

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser

20 25 30
 Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

85 90 95
 Cys Ala Arg Phe Asp Val Ser Leu Gly Gly Ser Asp Thr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 137
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DLL4 antibody E9.19 CDR-H1
 <400> 137
 Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly

1 5

<210> 138
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.19 CDR-H2

<400> 138
 Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15
 <210> 139

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.19 CDR-H3

<400> 139

Phe Asp Val Ser Leu Gly Gly Ser Asp Thr

1 5 10

<210> 140

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.22 VH region

<400> 140

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Asn Ser

20 25 30

Arg Tyr His Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Leu Glu

35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

Leu Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe

65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ala Arg Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 141

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.22 CDR-H1

<400> 141

Asn Ser Arg Tyr His Trp Gly

1 5

<210> 142

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.22 CDR-H2

<400> 142

Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Gly

1 5 10 15

<210> 143

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.22 CDR-H3

<400> 143

Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr

1 5 10

<210> 144

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.48 VH region

<400> 144

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser

20 25 30

Gly Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu

35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Asn Tyr Arg Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 145

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.48 CDR-H1

<400> 145

Ser Ser Gly Tyr Tyr Trp Gly

1 5

<210> 146

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.48 CDR-H2

<400> 146

Asp Ile Asn Tyr Arg Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 147

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.48 CDR-H3

<400> 147

Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr

1 5 10

<210> 148

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.65 VH region

<400> 148

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Arg Asn Ser

20 25 30

Arg Tyr His Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Leu Glu

35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

Leu Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe

65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ala Arg Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Ser Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 149

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.65 CDR-H1

<400> 149

Asn Ser Arg Tyr His Trp Gly

1 5

<210> 150

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.65 CDR-H2

<400> 150

Asp I1e Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Gly

1 5 10 15

<210> 151

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.65 CDR-H3

<400> 151

Glu Asp Val I1e Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr

1 5 10

<210> 152

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.66 VH region

<400> 152

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser I1e Ser Ser Ser

20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp I1e Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu

35 40 45

Trp I1e Gly Asp I1e Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr I1e Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe

65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ala Arg Glu Gly Val Pro Leu Gly Gly Ala Asp Lys Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 153

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.66 CDR-H1

<400> 153

Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly

1 5

<210> 154

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.66 CDR-H2

<400> 154

Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 155

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.66 CDR-H3

<400> 155

Glu Gly Val Pro Leu Gly Gly Ala Asp Lys

1 5 10

<210> 156

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.71 VH region

<400> 156

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser

20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Leu Glu

35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe

65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ala Arg Gln Ala Leu Ala Met Gly Gly Ser Asp Lys Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 157

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.71 CDR-H1

<400> 157

Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly

1 5

<210> 158

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.71 CDR-H2

<400> 158

Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 159

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.71 CDR-H3

<400> 159

Gln Ala Leu Ala Met Gly Gly Gly Ser Asp Lys

1 5 10

<210> 160

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.13 VH region

<400> 160

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ser Ile Ser Ser Ser

20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Leu Glu

35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe

65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ala Arg Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Ser Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 161

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.13 CDR-H1

<400> 161

Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly

1 5

<210> 162

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.13 CDR-H2

<400> 162

Asp I1e Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 163

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.13 CDR-H3

<400> 163

Glu Asp Val I1e Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr

1 5 10

<210> 164

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.16 VH region

<400> 164

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser I1e Ser Ser Ser

20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 165
 <211> 7
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence
 <220><223> DLL4 antibody E9.16 CDR-H1
 <400> 165
 Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly
 1 5
 <210> 166
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DLL4 antibody E9.16 CDR-H2
 <400> 166

Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15
 <210> 167
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DLL4 antibody E9.16 CDR-H3

<400> 167

Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr

1 5 10

<210> 168

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.38 VH region

<400> 168

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser

20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu

35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe

65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ala Arg Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 169

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.38 CDR-H1

<400> 169

Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly

1 5
 <210> 170
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DLL4 antibody E9.38 CDR-H2
 <400> 170
 Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 171
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DLL4 antibody E9.38 CDR-H3
 <400> 171
 Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr
 1 5 10

<210> 172
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DLL4 antibody E9.2B VH region
 <400> 172
 Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser

20 25 30
 Asn Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Leu Glu
 35 40 45
 Trp Ile Gly Asp Ile Asn Tyr Asn Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ala Arg Glu Ala Val Ala Leu Gly Gly Gly Ala Asp Asp Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 173

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.2B CDR-H1

<400> 173

Ser Ser Asn Tyr Tyr Trp Gly

1 5

<210> 174

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.2B CDR-H2

<400> 174

Asp Ile Asn Tyr Asn Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 175

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.2B CDR-H3

<400> 175

Glu Ala Val Ala Leu Gly Gly Ala Asp Asp

1 5 10

<210> 176

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.1F VH region

<400> 176

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ser Ile Ser Ser Gly

20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Leu Glu

35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Asn Tyr Ile Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe

65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ala Arg Glu Ala Val Ser Phe Gly Gly Ala Asp Ser Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 177

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.1F CDR-H1

<400> 177

Ser Gly Ser Tyr Tyr Trp Gly

1 5

<210> 178

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.1F CDR-H2

<400> 178

Asp Ile Asn Tyr Ile Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 179

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.1F CDR-H3

<400> 179

Glu Ala Val Ser Phe Gly Gly Ala Asp Ser

1 5 10

<210> 180

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.10H VH region

<400> 180

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser

20 25 30

Gly Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Leu Glu

35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

Leu Lys Asn Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe

65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ala Arg Glu Glu Val Ile Leu Gly Gly Ala Asp Gln Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 181

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.10H CDR-H1

<400> 181

Ser Ser Gly Tyr Tyr Trp Gly

1 5

<210> 182

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.10H CDR-H2

<400> 182

Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asn

1 5 10 15

<210> 183

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.10H CDR-H3

<400> 183

Glu Glu Val Ile Leu Gly Gly Gly Ala Asp Gln

1 5 10

<210> 184

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.5E VH region

<400> 184

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
 20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Asn Tyr Ile Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Glu Ser Val Pro Leu Gly Gly Ala Asp Glu Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 185

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.5E CDR-H1

<400> 185

Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly

1 5

<210> 186

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.5E CDR-H2

<400> 186

Asp Ile Asn Tyr Ile Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 187

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.5E CDR-H3

<400> 187

Glu Ser Val Pro Leu Gly Gly Gly Ala Asp Glu

1 5 10

<210> 188

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.10C VH region

<400> 188

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly

20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu

35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe

65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ala Arg Gln Ala Val Met Tyr Gly Gly Ser Asp Asn Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 189

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.10C CDR-H1

<400> 189

Ser Gly Ser Tyr Tyr Trp Gly

1 5

<210> 190

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.10C CDR-H2

<400> 190

Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 191

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

> DLL4 antibody E9.10C CDR-H3

<400> 191

Gln Ala Val Met Tyr Gly Gly Ser Asp Asn

1 5 10

<210> 192

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.7E VH region

<400> 192

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser

20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu

35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Ala Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

Leu Lys Asp Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Glu Asp Met Ile Leu Gly Gly Gly Ala Asp Asn Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 193

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.7E CDR-H1

<400> 193

Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly

1 5

<210> 194

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.7E CDR-H2

<400> 194

Asp Ile Tyr Tyr Ala Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asp

1 5 10 15

<210> 195

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.7E CDR-H3

<400> 195

Glu Asp Met Ile Leu Gly Gly Ala Asp Asn

1 5 10

<210> 196

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.12B VH region

<400> 196

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser

20 25 30

Asn Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu

35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe

65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ala Arg Glu Ala Val Ser Phe Gly Gly Ala Asp Ser Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 197

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.12B CDR-H1

<400> 197

Ser Ser Asn Tyr Tyr Trp Gly

1 5

<210> 198

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.12B CDR-H2

<400> 198

Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 199

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.12B CDR-H3

<400> 199

Glu Ala Val Ser Phe Gly Gly Ala Asp Ser

1 5 10

<210> 200

<211> 121

<212> PRT

<213>

> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.10E VH region

<400> 200

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Asn Ser Gly

20 25 30

Asn Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Leu Glu

35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Ser Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe

65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ala Arg Glu Asp Val Met Tyr Gly Gly Gly Asp Ser Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 201

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.10E CDR-H1

<400> 201

Ser Gly Asn Tyr Tyr Trp Gly

1 5

<210> 202

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.10E CDR-H2

<400> 202

Asp Ile Ser Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 203

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

> DLL4 antibody E9.10E CDR-H3

<400> 203

Glu Asp Val Met Tyr Gly Gly Gly Asp Ser

1 5 10

<210> 204

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.6A VH region

<400> 204

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser

20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu

35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Asn Tyr Ala Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

Leu Lys Asn Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe

65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ala Arg Glu Ala Val Ala Leu Gly Gly Ala Asp Ser Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 205

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.6A CDR-H1

<400> 205

Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly

1 5

<210> 206

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.6A CDR-H2

<400> 206

Asp Ile Asn Tyr Ala Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asn

1 5 10 15

<210> 207

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.6A CDR-H3

<400> 207

Glu Ala Val Ala Leu Gly Gly Ala Asp Ser

1 5 10

<210> 208

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.7A VH region

<400> 208

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser

20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu

35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Asn Tyr Ala Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe

65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ala Arg Glu Asp Val Lys Phe Gly Gly Ala Asp Leu Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 209

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.7A CDR-H1

<400> 209

Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly

1 5

<210> 210

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.7A CDR-H2

<400> 210

Asp Ile Asn Tyr Ala Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 211

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.7A CDR-H3

<400> 211

Glu Asp Val Lys Phe Gly Gly Ala Asp Leu

1 5 10

<210> 212

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.8H VH region

<400> 212

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly

20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu

35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

50	55	60
Leu Lys Asn Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe		
65	70	75
Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr		
85	90	95
Cys Ala Arg Glu Ser Val Pro Leu Gly Gly Ala Asp Asn Trp Gly		
100	105	110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
115	120	

<210> 213

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.8H CDR-H1

<400> 213

Ser Gly Ser Tyr Tyr Trp Gly

1	5
---	---

<210> 214

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.8H CDR-H2

<400> 214

Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asn

1	5	10	15
---	---	----	----

<210> 215

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.8H CDR-H3

<400> 215

Glu Ser Val Pro Leu Gly Gly Gly Ala Asp Asn

1 5 10

<210> 216

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.13 VL region

<400> 216

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Thr Leu Gly Asp Lys Tyr Val

20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr

35 40 45

Glu Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Glu Thr Gly Val

85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Thr Val Leu

100 105

<210> 217

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.13 CDR-L1

<400> 217

Ser Gly Asp Thr Leu Gly Asp Lys Tyr Val Ser

1 5 10

<210> 218

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.13 CDR-L2

<400> 218

Glu Asp Ser Glu Arg Pro Ser

1 5

<210> 219

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.13 CDR-L3

<400> 219

Gln Ala Trp Asp Ser Glu Thr Gly Val

1 5

<210> 220

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.16 VL region

<400> 220

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Glu Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Val

20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr

35 40 45

Glu Asp Phe Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val

85 90 95

Phe Gly Tyr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu

100 105

<210> 221

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.16 CDR-L1

<400> 221

Ser Gly Glu Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Val Ser

1 5 10

<210> 222

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.16 CDR-L2

<400> 222

Glu Asp Phe Lys Arg Pro Ser

1 5

<210> 223

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.16 CDR-L3

<400> 223

Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val

1 5

<210> 224

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.38 VL region

<400> 224

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Val
 20 25 30
 Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Val Gly Val
 85 90 95
 Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105

<210> 225
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DLL4 antibody E9.38 CDR-L1
 <400> 225
 Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Val Ser
 1 5 10
 <210> 226
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DLL4 antibody E9.38 CDR-L2
 <400> 226
 Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser
 1 5

<210> 227
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DLL4 antibody E9.38 CDR-L3

<400> 227

Gln Ala Trp Asp Arg Asp Val Gly Val

1 5

<210> 228

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.4 VL region

<400> 228

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala

20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr

35 40 45

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val

85 90 95

Phe Gly Tyr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu

100 105

<210> 229

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.4 CDR-L1

<400> 229

Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala Ser

1 5 10

<210> 230

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.4 CDR-L2

<400> 230

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser

1 5

<210> 231

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.4 CDR-L3

<400> 231

Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val

1 5

<210> 232

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.11 VL region

<400> 232

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala

20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr

35 40 45

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val

85 90 95

Phe Gly Tyr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu

100 105

<210> 233

<211> 11

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.11 CDR-L1

<400> 233

Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala Ser

1 5 10

<210> 234

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.11 CDR-L2

<400> 234

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser

1 5

<210> 235

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.11 CDR-L3

<400> 235

Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val

1 5

<210> 236

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.14 VL region

<400> 236

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln

1	5	10	15
Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala			
20	25	30	
Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr			
35	40	45	

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser			
50	55	60	
Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met			
65	70	75	80
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val			
85	90	95	
Phe Gly Tyr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu			
100	105		

<210> 237

<211> 11

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.14 CDR-L1

<400> 237

Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala Ser

1	5	10
---	---	----

<210> 238

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.14 CDR-L2

<400> 238

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser

1	5
---	---

<210> 239

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.14 CDR-L3

<400> 239

Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val

1 5

<210> 240

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.17 VL region

<400> 240

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala

20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr

35 40 45

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val

85 90 95

Phe Gly Tyr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu

100 105

<210> 241

<211> 11

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.17 CDR-L1

<400> 241

Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala Ser

1 5 10

<210> 242

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.17 CDR-L2

<400> 242

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser

1 5

<210> 243

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.17 CDR-L3

<400> 243

Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val

1 5

<210> 244

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.18 VL region

<400> 244

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala

20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr

35 40 45

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val

85	90	95
----	----	----

Phe Gly Tyr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu

100	105
-----	-----

<210> 245

<211> 11

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.18 CDR-L1

<400> 245

Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala Ser

1	5	10
---	---	----

<210> 246

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.18 CDR-L2

<400> 246

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser

1	5
---	---

<210> 247

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.18 CDR-L3

<400> 247

Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val

1	5
---	---

<210> 248

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.19 VL region

<400> 248

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala
 20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val
 85 90 95

Phe Gly Tyr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105

<210> 249

<211> 11

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.19 CDR-L1

<400> 249

Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala Ser

1 5 10

<210> 250

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.19 CDR-L2

<400> 250

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser

1 5

<210> 251

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.19 CDR-L3

<400> 251

Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val

1 5

<210> 252

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.22 VL region

<400> 252

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Pro Gly Gln

1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala

20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr

35 40 45

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val

85 90 95

Phe Gly Tyr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu

100 105

<210> 253

<211> 11

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.22 CDR-L1

<400> 253

Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala Ser

1 5 10

<210> 254

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.22 CDR-L2

<400> 254

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser

1 5

<210> 255

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.22 CDR-L3

<400> 255

Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val

1 5

<210> 256

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.48 VL region

<400> 256

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala

20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr

35 40 45

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val

85 90 95

Phe Gly Tyr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu

100 105

<210> 257

<211> 11

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.48 CDR-L1

<400> 257

Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala Ser

1 5 10

<210> 258

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.48 CDR-L2

<400> 258

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser

1 5

<210> 259

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.48 CDR-L3

<400> 259

Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val

1 5

<210> 260

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.65 VL region

<400> 260

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala

20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr

35 40 45

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val

85 90 95

Phe Gly Tyr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu

100 105

<210> 261

<211> 11

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.65 CDR-L1

<400> 261

Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala Ser

1 5 10

<210> 262

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.65 CDR-L2

<400> 262

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser

1 5

<210> 263

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.65 CDR-L3

<400> 263

Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val

1 5

<210> 264

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.66 VL region

<400> 264

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala

20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr

35 40 45

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val

85 90 95

Phe Gly Tyr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu

100 105

<210> 265

<211> 11

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.66 CDR-L1

<400> 265

Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala Ser

1 5 10

<210> 266

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.66 CDR-L2

<400> 266

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser

1 5

<210> 267

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.66 CDR-L3

<400> 267

Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val

1 5

<210> 268

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.71 VL region

<400> 268

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala

20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr

35 40 45

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val

85 90 95

Phe Gly Tyr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu

100 105

<210> 269

<211> 11

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.71 CDR-L1

<400> 269

Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala Ser

1 5 10

<210> 270

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.71 CDR-L2

<400> 270

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser

1 5

<210> 271

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.71 CDR-L3

<400> 271

Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val

1 5

<210> 272

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.2B VL region

<400> 272

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Glu Gly Leu Gly Asp Lys Tyr Val

20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr

35 40 45

Glu Asp Ser Thr Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Glu Thr Gly Val

85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Thr Val Leu

100 105

<210> 273

<211> 11

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.2B CDR-L1

<400> 273

Ser Gly Glu Gly Leu Gly Asp Lys Tyr Val Ser

1 5 10

<210> 274

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.2B CDR-L2

<400> 274

Glu Asp Ser Thr Arg Pro Ser

1 5

<210> 275

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.2B CDR-L3

<400> 275

Gln Ala Trp Asp Ser Glu Thr Gly Val

1 5

<210> 276

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.1F VL region

<400> 276

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Val

20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr

35 40 45

Glu Asp Ser Gln Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Met Glu Ala Gly Val

85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Thr Val Leu

100 105

<210> 277

<211> 11

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.1F CDR-L1

<400> 277

Ser Gly Asp Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Val Ser

1 5 10

<210> 278

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.1F CDR-L2

<400> 278

Glu Asp Ser Gln Arg Pro Ser

1 5

<210> 279

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.1F CDR-L3

<400> 279

Gln Ala Trp Asp Met Glu Ala Gly Val

1 5

<210> 280

<211> 104

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.10C VL region

<400> 280

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ser Leu Gly Asp Lys Tyr Val

20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr

35 40 45

Glu Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Glu Thr Gly Val
 85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Thr

100

<210> 281

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.10C CDR-L1

<400> 281

Ser Gly Asp Ser Leu Gly Asp Lys Tyr Val Ser

1 5 10

<210> 282

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.10C CDR-L2

<400> 282

Glu Asp Ser Glu Arg Pro Ser

1 5

<210> 283

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.10C CDR-L3

<400> 283

Gln Ala Trp Asp Ser Glu Thr Gly Val

1 5

<210> 284

<211> 104

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.10E VL region

<400> 284

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Pro Gly Gln

1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Glu Gly Leu Gly Asp Lys Tyr Val

20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr

35 40 45

Glu Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Glu Ala Gly Val

85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Thr

100

<210> 285

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.10E CDR-L1

<400> 285

Ser Gly Glu Gly Leu Gly Asp Lys Tyr Val Ser

1 5 10

<210> 286

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.10E CDR-L2

<400> 286

Glu Asp Ser Glu Arg Pro Ser

1 5

<210> 287

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.10E CDR-L3

<400> 287

Gln Ala Trp Asp Ser Glu Ala Gly Val

1 5

<210> 288

<211> 104

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.7E VL region

<400> 288

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Val

20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr

35 40 45

Glu Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Glu Ala Gly Val

85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Thr

100

<210> 289

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.7E CDR-L1

<400> 289

Ser Gly Asp Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Val Ser

1 5 10

<210> 290

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.7E CDR-L2

<400> 290

Glu Asp Ser Glu Arg Pro Ser

1 5

<210> 291

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.7E CDR-L3

<400> 291

Gln Ala Trp Asp Ser Glu Ala Gly Val

1 5

<210> 292

<211> 104

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.5E VL region

<400> 292

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Met Leu Gly Asp Lys Tyr Val

20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr

35 40 45

Glu Asp Ser Gln Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60
 Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Glu Thr Gly Val
 85 90 95
 Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Thr
 100

<210> 293
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.5E CDR-L1
<400> 293
 Ser Gly Asp Met Leu Gly Asp Lys Tyr Val Ser

1 5 10

<210> 294
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.5E CDR-L2
<400> 294

Glu Asp Ser Gln Arg Pro Ser

1 5

<210> 295
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.5E CDR-L3
<400> 295

Gln Ala Trp Asp Ser Glu Thr Gly Val

1 5

<210> 296
<211> 104

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.12B VL region

<400> 296

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Gly Leu Gly Asp Lys Tyr Val

20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr

35 40 45

Glu Asp Ser Thr Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Glu Ser Gly Val

85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Thr

100

<210> 297

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.12B CDR-L1

<400> 297

Ser Gly Asp Gly Leu Gly Asp Lys Tyr Val Ser

1 5 10

<210> 298

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.12B CDR-L2

<400> 298

Glu Asp Ser Thr Arg Pro Ser

1 5
 <210> 299
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DLL4 antibody E9.12B CDR-L3
 <400> 299
 Gln Ala Trp Asp Ser Glu Ser Gly Val
 1 5

 <210> 300
 <211> 104
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DLL4 antibody E9.10H VL region
 <400> 300
 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Glu Ser Leu Gly Asp Lys Tyr Val
 20 25 30
 Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45

 Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Gly Glu Thr Gly Val
 85 90 95
 Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Thr
 100
 <210> 301
 <211> 11
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.10H CDR-L1

<400> 301

Ser Gly Glu Ser Leu Gly Asp Lys Tyr Val Ser

1 5 10

<210> 302

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.10H CDR-L2

<400> 302

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser

1 5

<210> 303

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.10H CDR-L3

<400> 303

Gln Ala Trp Asp Gly Glu Thr Gly Val

1 5

<210> 304

<211> 104

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.6A VL region

<400> 304

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Pro Gly Gln

1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Met Leu Gly Asp Lys Tyr Val

20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr

35 40 45

Glu Asp Thr Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60 Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met

65 70 75 80 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Glu Thr Gly Val

85 90 95 Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Thr

100

<210> 305

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.6A CDR-L1

<400> 305

Ser Gly Asp Met Leu Gly Asp Lys Tyr Val Ser

1 5 10

<210> 306

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.6A CDR-L2

<400> 306

Glu Asp Thr Asn Arg Pro Ser

1 5

<210> 307

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.6A CDR-L3

<400> 307

Gln Ala Trp Asp Ser Glu Thr Gly Val

1 5

<210> 308

<211> 104

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.7A VL region

<400> 308

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Glu Ser Leu Gly Asp Lys Tyr Val

20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr

35 40 45

Gln Asp Ala Met Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Met Glu Thr Gly Val

85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Thr

100

<210> 309

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.7A CDR-L1

<400> 309

Ser Gly Glu Ser Leu Gly Asp Lys Tyr Val Ser

1 5 10

<210> 310

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.7A CDR-L2

<400> 310

Gln Asp Ala Met Arg Pro Ser

1 5

<210> 311

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.7A CDR-L3

<400> 311

Gln Ala Trp Asp Met Glu Thr Gly Val

1 5

<210> 312

<211> 104

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.8H VL region

<400> 312

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Glu Ser Leu Gly Asp Lys Tyr Val

20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr

35 40 45

Glu Asp Ser Met Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Glu Val Gly Val

85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Thr

100

<210> 313

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.8H CDR-L1

<400> 313

Ser Gly Glu Ser Leu Gly Asp Lys Tyr Val Ser

1 5 10

<210> 314

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.8H CDR-L2

<400> 314

Glu Asp Ser Met Arg Pro Ser

1 5

<210> 315

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.8H CDR-L3

<400> 315

Gln Ala Trp Asp Ser Glu Val Gly Val

1 5

<210> 316

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody A10.3 VH region

<400> 316

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Ser Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser His

20	25	30
Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Leu Glu Trp Val		
35	40	45
Ala Ile Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Ser Ala Asp Ser Val		
50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
65	70	75
Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Lys Ala Gly Gly Asn Val Gly Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly		
100	105	110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 317

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody A10.K30 VH region

<400> 317

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly

1	5	10	15
---	---	----	----

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Gly Asn His

20	25	30
----	----	----

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Leu Glu Trp Val

35	40	45
----	----	----

Ala Asp Ile Ser Ser Asp Gly Arg Tyr Lys Tyr Ala Asp Ser Val

50	55	60
----	----	----

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65	70	75	80
----	----	----	----

Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85	90	95
----	----	----

Ala Lys Ala Gly Gly Asn Val Gly Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 318

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody A10.K42 VH region

<400> 318

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Gln Ser His

20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Met Ile Ser Tyr Asp Gly Thr Ile Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Lys Ala Gly Gly Asn Val Gly Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 319

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody A10.9A VH region

<400> 319

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Tyr

20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Thr Ile Ser Tyr Asp Gly Arg Asn Lys Asp Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Lys Ala Gly Gly Asn Val Gly Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 320

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody A10.8A VH region

<400> 320

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Gly Asn His

20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Asp Ile Ser Ser Asp Gly Arg Tyr Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Lys Ala Gly Gly Asn Val Gly Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 321

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody A10.1A VH region

<400> 321

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe His Ser His

20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Met Ile Ser Asp Asp Gly Arg Asn Lys Asp Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Ala Ala Gly Gly Asn Val Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 322

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody A10.5D VH region

<400> 322

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Ser Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Gly Ser His

20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Asp Ile Ser Val Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Ser Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Ala Ala Gly Gly Asn Val Gly Leu Asp Ser Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 323

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody A10.3A VH region

<400> 323

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Gly Asn His

20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Asp Ile Ser Ser Asp Gly Arg Tyr Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
65	70	75
Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Lys Ala Gly Gly Gly Asn Val Gly Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly		
100	105	110
Thr Met Val Thr Val Ser Ser		
115		

<210> 324

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody A10.6B VH region

<400> 324

1	5	10
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly		
15		
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Gly Asn His		
20	25	30
Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
35	40	45

Ala Asp Ile Ser Ser Asp Gly Arg Tyr Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
65	70	75
Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Lys Ala Gly Gly Gly Asn Val Gly Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly		
100	105	110
Thr Met Val Thr Val Ser Ser		

115

<210> 325

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody A10.3D VH region

<400> 325

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser His

20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Asp Ile Ser Gln Asp Gly Ser Tyr Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Ala Ala Gly Asn Val Gly Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 326

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody A10.4C VH region

<400> 326

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Gly Ser His

20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Asp Ile Ser Asn Asp Gly Arg Tyr Ala Tyr Ser Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Lys Ala Gly Gly Gly Asn Val Gly Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 327

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody A10.3 VL region

<400> 327

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Ala Asp Lys Leu Gly Thr Lys Tyr Val

20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr

35 40 45

Gln Asp Ala Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Thr Met

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Leu Cys Gln Ser Trp Asp Arg Ser Asp Val Val

85 90 95

Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105

<210> 328
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DLL4 antibody A10.L45 VL region
 <400> 328

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Ala Asp Glu Leu Gly Thr Gln Tyr Val
 20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45

Gln Asp Ala Thr Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Arg Ser Gly Val Val
 85 90 95

Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105

<210> 329
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DLL4 antibody A10.L73 VL region
 <400> 329

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Asn Leu Gly Ser Gln Tyr Val
 20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr

35 40 45

Gln Asp Ala Gln Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Arg Ser Gly Val Val

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105

<210> 330

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody A10.3A VL region

<400> 330

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Ala Asp Asn Leu Gly Glu Lys Tyr Val

20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr

35 40 45

Gln Asp Ala Thr Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Trp Asp Ser Ser Gly Ala Val

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105

<210> 331

<211> 106

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody A10.6B VL region

<400> 331

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Ala Asp Asn Leu Gly Asn Gln Tyr Val

20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr

35 40 45

Gln Asp Gly Met Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Trp Ser Gly Glu Val

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105

<210> 332

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody A10.3D VL region

<400> 332

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Ala Asp Lys Leu Gly Thr Lys Tyr Val

20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr

35 40 45

Gln Asp Gly Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

50	55	60	
Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met			
65	70	75	80
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Trp Asp Gln Ser Gly Ala Val			
85	90	95	
Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu			
100	105		
<210> 333			
<211> 106			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> DLL4 antibody A10.4C VL region			
<400> 333			
Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln			

1	5	10	15
Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Ala Asp Asn Leu Gly Asn Gln Tyr Val			
20	25	30	
Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr			
35	40	45	
Gln Asp Gly Met Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser			
50	55	60	
Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met			

65	70	75	80
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Ser Gly Ala Val			
85	90	95	
Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu			
100	105		
<210> 334			
<211> 121			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> DLL4 antibody E9.1 VH region			

<400> 334

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser

20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu

35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe

65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ala Arg Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 335

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.1 VL region

<400> 335

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Pro Gly Gln

1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala

20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr

35 40 45

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val

85 90 95

Phe Gly Tyr Gly Thr Arg Val Thr Val Leu Gly

100 105

<210> 336

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9-SE1 VH region

<400> 336

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser

20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Leu Glu

35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Ser Phe

65 70 75 80

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ala Arg Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Ser Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 337

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9-SE1 VL region

<400> 337

Leu Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Pro Gly Gln

1	5	10	15
Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala			
20	25	30	
Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr			
35	40	45	
Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser			
50	55	60	
Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Thr Met			
65	70	75	80
Asp Glu Ala Asp Tyr Leu Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val			
85	90	95	
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly			
100	105		

<210> 338

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9-SE2 VH region

<400> 338

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1	5	10	15
---	---	----	----

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser

20	25	30
----	----	----

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu

35	40	45
----	----	----

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

50	55	60
----	----	----

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Ser Phe

65 70 75 80

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ala Arg Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 339

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9-SE2 VL region

<400> 339

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala

20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr

35 40 45

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val

85 90 95

Phe Gly Tyr Gly Thr Arg Val Thr Val Leu Gly

100 105

<210> 340

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9-SE3 VH region

<400> 340

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Gly Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser

20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu

35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe

65 70 75 80

Tyr Leu Lys Leu Ser Ser Val Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ala Arg Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 341

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9-SE3 VL region

<400> 341

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Pro Gly Gln

1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala

20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr

35 40 45

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val

85 90 95

Phe Gly Tyr Gly Thr Arg Val Thr Val Leu Gly

100 105

<210> 342

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9-SE4 VH region

<400> 342

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser

20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu

35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe

65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ala Arg Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Ser Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 343

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9-SE4 VL region

<400> 343

Leu Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Pro Gly Gln

1	5	10	15
Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala			
20	25	30	
Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr			
35	40	45	
Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser			
50	55	60	
Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Thr Met			
65	70	75	80
Asp Glu Ala Asp Tyr Leu Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val			
85	90	95	
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly			
100	105		

<210> 344

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9-SE5 VH region

<400> 344

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1	5	10	15
---	---	----	----

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser

20	25	30
----	----	----

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Leu Glu

35	40	45
----	----	----

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

50	55	60
----	----	----

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe

65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ala Arg Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 345

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9-SE5 VL region

<400> 345

Glu Tyr Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr

20 25 30

Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Val Ile

35 40 45

Tyr Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Asn Ser Gly Asp Asp Ala Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala

65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly

85 90 95

Val Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 346

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9-SE6 VH region

<400> 346

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Gly Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser

20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu

35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe

65 70 75 80

Tyr Leu Lys Leu Ser Ser Val Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ala Arg Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 347

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9-SE6 VL region

<400> 347

Leu Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Pro Gly Gln

1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala

20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr

35 40 45

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Thr Met

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Leu Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val

85 90 95

Phe Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly

100 105

<210> 348

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9-SE7 VH region

<400> 348

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser

20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Leu Glu

35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Ser Phe

65 70 75 80

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ala Arg Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Ser Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 349

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9-SE7 VL region

<400> 349

Glu Tyr Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys

1	5	10	15
Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr			
20	25	30	
Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Val Ile			
35	40	45	
Tyr Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
50	55	60	
Ser Asn Ser Gly Asp Asp Ala Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala			
65	70	75	80
Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly			
85	90	95	
Val Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg			
100	105		

<210> 350

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9-SE8 VH region

<400> 350

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Gly Glu

1	5	10	15
---	---	----	----

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser

20	25	30
----	----	----

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Leu Glu

35	40	45
----	----	----

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

50	55	60
----	----	----

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe

65 70 75 80

Tyr Leu Lys Leu Ser Ser Val Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ala Arg Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 351

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9-SE8 VL region

<400> 351

Glu Tyr Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr

20 25 30

Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Val Ile

35 40 45

Tyr Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Asn Ser Gly Asp Asp Ala Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala

65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly

85 90 95

Val Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 352

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9-FR1 VH region

<400> 352

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Thr Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu

1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser

20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu

35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

Leu Lys Ser Gln Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Phe Asn Thr Phe

65 70 75 80

Phe Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ala Arg Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 353

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9-FR1 VL region

<400> 353

Glu Tyr Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr

20 25 30

Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Val Ile

35 40 45

Tyr Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Asp Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Asn Ser Gly Asp Glu Ala Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly

85 90 95

Val Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 354

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9-FR2 VH region

<400> 354

Glu Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln

1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser

20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Leu Glu

35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe

65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ala Arg Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Ser Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 355

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9-FR2 VL region

<400> 355

Asp Tyr Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

1	5	10	15
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr			
20	25	30	
Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Val Ile			
35	40	45	
Tyr Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly			
50	55	60	
Ser Asn Ser Gly Asp Asp Ala Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala			
65	70	75	80
Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly			
85	90	95	
Val Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg			
100	105		

<210> 356

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.71 VH region

<400> 356

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1	5	10	15
---	---	----	----

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser

20	25	30
----	----	----

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Leu Glu

35	40	45
----	----	----

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

50	55	60
----	----	----

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe

65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ala Arg Gln Ala Leu Ala Met Gly Gly Gly Ser Asp Lys Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 357

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.71 VL region

<400> 357

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala

20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr

35 40 45

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val

85 90 95

Phe Gly Tyr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly

100 105

<210> 358

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.71(M) VH region

<400> 358

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser

20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu

35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe

65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ala Arg Gln Ala Leu Ala Met Gly Gly Ser Asp Lys Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 359

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.71(M) VL region

<400> 359

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Pro Gly Gln

1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala

20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr

35 40 45

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val

85 90 95

Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly

100 105

<210> 360

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.71(L) VH region

<400> 360

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser

20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu

35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe

65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ala Arg Gln Ala Leu Ala Leu Gly Gly Ser Asp Lys Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 361

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL4 antibody E9.71(L) VL region

<400> 361

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala

20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr

35 40 45

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly

100 105

<210> 362

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 362

Met Ala Trp Ser Pro Leu Phe Leu Thr Leu Ile Thr His Cys Ala Gly

1 5 10 15

Ser Trp Ala

<210> 363

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 363

Met Ala Trp Ser Pro Leu Phe Leu Thr Leu Ile Thr His Cys Ala Arg

1 5 10 15

Val Trp Ala

<210> 364

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 364

Met Ala Trp Thr Pro Leu Leu Leu Pro Leu Leu Thr Phe Cys Thr Val

1 5 10 15

Ser Glu Ala

<210> 365

<211> 19

<212>

> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 365

Met Ala Trp Thr Pro Leu Leu Leu Pro Leu Leu Thr Phe Cys Thr Val

1 5 10 15

Ser Glu Ala

<210> 366

<211> 22

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 366

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Arg Leu Gly Leu Leu Leu Trp

1 5 10 15

Phe Pro Gly Ala Arg Cys

20

<210> 367

<211> 22

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 367

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Arg Leu Leu Leu Leu Trp

1 5 10 15

Phe Pro Gly Ala Arg Cys

20

<210> 368

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> E9.71(M) antibody cleavage site

<400> 368

Met Ala Trp Ser Pro Leu Phe Leu Thr Leu Ile Thr His Cys Ala Gly

1 5 10 15

Ser Trp Ala Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser

20 25 30

<210> 369

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> E9.71(M)-1 antibody cleavage site

<400> 369

Met Ala Trp Ser Pro Leu Phe Leu Thr Leu Ile Thr His Cys Ala Arg

1 5 10 15

Val Trp Ala Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser

20 25 30

<210> 370

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

> E9.71(M)-2 antibody cleavage site

<400> 370

Met Ala Trp Thr Pro Leu Leu Leu Pro Leu Leu Thr Phe Cys Thr Val

1 5 10 15

Ser Glu Ala Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser

20 25 30

<210> 371

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> E9.71(M)-3 antibody cleavage site

<400> 371

Met Ala Trp Thr Pro Leu Leu Leu Pro Leu Leu Thr Phe Cys Thr Val

1 5 10 15

Ser Glu Ala Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser

20 25

<210> 372

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> E9.71(M)-4 antibody cleavage site

<400> 372

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Arg Leu Gly Leu Leu Leu Trp

1 5 10 15

Phe Pro Gly Ala Arg Cys Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val

20 25 30

Ser

<210> 373

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> E9.71(M)-5 antibody cleavage site

<400> 373

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Arg Leu Gly Leu Leu Leu Trp

1 5 10 15

Phe Pro Gly Ala Arg Cys Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser

20	25	30
----	----	----

<210> 374

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR localization peptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> X can be any amino acid

<400> 374

Phe Gly Xaa Gly

1

<210> 375

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR localization peptide

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(9)

<223> X can be any amino acid, positions 2-9

<400> 375

Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5

<210> 376

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR localization peptide

<400> 376

Leu Glu Trp Ile Gly

1 5

<210> 377

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR localization peptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> X can be any amino acid

<400> 377

Trp Gly Xaa Gly

1