

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2019-11331

(P2019-11331A)

(43) 公開日 平成31年1月24日(2019.1.24)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C O 7 K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28 Z N A	4 B O 6 3
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09	4 H O 4 5
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63 Z	
C 1 2 Q 1/6876 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6876 Z	
C 1 2 Q 1/6851 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6851 Z	
審査請求 有 請求項の数 1 O L 外国語出願 (全 183 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2018-158553 (P2018-158553)	(71) 出願人	504389991
(22) 出願日	平成30年8月27日 (2018. 8. 27)		ノバルティス アーゲー
(62) 分割の表示	特願2016-501025 (P2016-501025) の分割		スイス国 バーゼル リヒトシュトラッセル 3 5
原出願日	平成26年3月10日 (2014. 3. 10)	(74) 代理人	100092783
(31) 優先権主張番号	61/781, 421		弁理士 小林 浩
(32) 優先日	平成25年3月14日 (2013. 3. 14)	(74) 代理人	100095360
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 片山 英二
(特許庁注：以下のものは登録商標)		(74) 代理人	100120134
1. T W E E N			弁理士 大森 規雄
		(74) 代理人	100104282
			弁理士 鈴木 康仁

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 N o t c h 3 に対する抗体

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 N o t c h 3 シグナル伝達など、他の N o t c h 受容体によるシグナル伝達を変化させる方法および組成物の提供。

【解決手段】 N o t c h 3 受容体のコンフォメーションエピトープを含む単離ポリペプチドであって、前記コンフォメーションエピトープが、 N o t c h 3 受容体の N R R ドメインの、 L N R (Lin Notch Repeat) 領域内、ヘテロ二量体化 (H D : heterodimerization) ドメイン内、およびリンカー領域内の、連続アミノ酸配列および非連続アミノ酸配列を含み、前記 L N R 領域が、 L N R - A、L N R - B、L N R - C からなる群から選択され、前記 H D ドメインが、 N 末端 H D および C 末端 H D からなる群から選択され、前記リンカー領域が、 L N R - A / B リンカー、L N R - B / C リンカー、L N R - H D リンカーからなる群から選択される、単離ポリペプチド。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

N o t c h 3 受容体のコンフォメーションエピトープを含む単離ポリペプチドであって、前記コンフォメーションエピトープが、N o t c h 3 受容体の N R R ドメインの、L N R (Lin Notch Repeat) 領域内、ヘテロ二量体化 (H D : heterodimerization) ドメイン内、およびリンカー領域内の、連続アミノ酸配列および非連続アミノ酸配列を含み、前記 L N R 領域が、L N R - A、L N R - B、L N R - C からなる群から選択され、前記 H D ドメインが、N 末端 H D および C 末端 H D からなる群から選択され、前記リンカー領域が、L N R - A / B リンカー、L N R - B / C リンカー、L N R - H D リンカーからなる群から選択される、単離ポリペプチド。

10

【請求項 2】

N o t c h 3 受容体のコンフォメーションエピトープを含む単離ポリペプチドであって、前記コンフォメーションエピトープが、N o t c h 3 受容体の N R R ドメインの、L N R (Lin Notch Repeat) 領域内、ヘテロ二量体化 (H D) ドメイン内、およびリンカー領域内の、連続アミノ酸配列および非連続アミノ酸配列を含み、前記 L N R 領域が、L N R - B であり、前記 H D ドメインが、H D α 3 ヘリックスであり、前記リンカー領域が、L N R - A / B リンカー、L N R - B / C リンカー、L N R - H D リンカーからなる群から選択される、単離ポリペプチド。

【請求項 3】

N o t c h 3 受容体のコンフォメーションエピトープを含む単離ポリペプチドであって、前記コンフォメーションエピトープが、N o t c h 3 受容体の N R R ドメインの、L N R (Lin Notch Repeat) 領域内、ヘテロ二量体化 (H D) ドメイン内、およびリンカー領域内の、連続アミノ酸配列および非連続アミノ酸配列を含み、前記 L N R 領域が、L N R - C であり、前記 H D ドメインが、H D α 2 ヘリックスであり、前記リンカー領域が、L N R - A / B リンカー、L N R - B / C リンカー、L N R - H D リンカーからなる群から選択される、単離ポリペプチド。

20

【請求項 4】

N o t c h 3 受容体のコンフォメーションエピトープを認識する単離抗体またはその断片であって、前記コンフォメーションエピトープが、N o t c h 3 受容体の N R R ドメインの、L N R (Lin Notch Repeat) 領域内、ヘテロ二量体化 (H D) ドメイン内、およびリンカー領域内の、連続アミノ酸配列および非連続アミノ酸配列を含み、前記 L N R 領域が、L N R - A、L N R - B、L N R - C からなる群から選択され、前記 H D ドメインが、N 末端 H D および C 末端 H D からなる群から選択され、前記抗体またはその断片が、リガンド依存性シグナル伝達を遮断する、単離抗体またはその断片。

30

【請求項 5】

前記 N o t c h 3 受容体の L N R 領域を、自己阻害状態で安定化させる、請求項 4 に記載の単離抗体またはその断片。

【請求項 6】

前記 N o t c h 3 受容体が、突然変異体の N o t c h 3 受容体であり、前記 L N R 領域または前記 H D ドメインが、少なくとも 1 カ所のアミノ酸残基の突然変異を有する、請求項 4 に記載の単離抗体またはその断片。

40

【請求項 7】

前記 N o t c h 3 の突然変異体が、S 1 5 8 0 L および G 1 4 8 7 D からなる群から選択される突然変異を含む、請求項 6 に記載の単離抗体またはその断片。

【請求項 8】

N o t c h 3 受容体のコンフォメーションエピトープに特異的に結合する単離抗体またはその断片であって、前記コンフォメーションエピトープが、N o t c h 3 受容体の N R R ドメインの、L N R (Lin Notch Repeat) 領域内、ヘテロ二量体化 (H D) ドメイン内、およびリンカー領域内の、連続アミノ酸配列および非連続アミノ酸配列を含み、前記 L N R 領域が、L N R - B であり、前記 H D ドメインが、H D α 3 ヘリックスであり、

50

前記抗体またはその断片が、リガンド依存性シグナル伝達を遮断する、単離抗体またはその断片。

【請求項 9】

前記コンフォメーションナルエピトープが、前記 N R R 領域の L N R - A / B リンカー内のアミノ酸残基をさらに含む、請求項 8 に記載の単離抗体またはその断片。

【請求項 10】

前記コンフォメーションナルエピトープが、前記 N R R 領域の L N R - B / C リンカー内のアミノ酸残基をさらに含む、請求項 8 に記載の単離抗体またはその断片。

【請求項 11】

前記コンフォメーションナルエピトープが、前記 N R R 領域の L N R - H D リンカー内のアミノ酸残基をさらに含む、請求項 8 に記載の単離抗体またはその断片。

10

【請求項 12】

前記コンフォメーションナルエピトープが、H D β 4 - α 3 ループ内のアミノ酸残基をさらに含む、請求項 8 に記載の単離抗体またはその断片。

【請求項 13】

前記コンフォメーションナルエピトープが、L N R - A / B リンカー内、L N R - B / C リンカー内、L N R - H D リンカー内、および H D β 4 - α 3 ループ内のアミノ酸残基をさらに含む、請求項 8 に記載の単離抗体またはその断片。

【請求項 14】

前記 N o t c h 3 受容体の L N R 領域を、自己阻害状態で安定化させる、請求項 8 に記載の単離抗体またはその断片。

20

【請求項 15】

前記 N o t c h 3 受容体が、突然変異体の N o t c h 3 受容体であり、前記 L N R 領域または前記 H D ドメインが、少なくとも 1 カ所のアミノ酸残基の突然変異を有する、請求項 8 に記載の単離抗体またはその断片。

【請求項 16】

前記 N o t c h 3 の突然変異体が、S 1 5 8 0 L、D 1 5 8 7 N、Y 1 6 2 4 H、L 1 5 1 8 M、A 1 5 3 7 T、N 1 5 9 7 K、L 1 5 4 7 V、R 1 5 2 6 C (H D) および G 1 4 8 7 D、(L N R - C)、P 2 0 3 4 f s、P 2 0 6 7 f s、p 2 1 7 7 f s、Q 2 0 7 5 *、W 2 1 7 2 *、G 2 1 1 2 D、L 2 2 1 2 M、F 2 1 2 1 L、G 2 0 3 8 S、G 2 0 5 9 R、R 2 0 2 2 H、Y 2 1 2 7 H、Y 2 2 1 1 C、V 2 2 0 2 I、S 2 0 9 6 L、P 2 0 8 9 L、P 2 2 0 9 L、R 1 9 8 1 C、R 2 1 4 5 Q、P 2 1 7 8 S、またはこれらの組合せからなる群から選択される突然変異を含む、請求項 8 に記載の単離抗体またはその断片。

30

【請求項 17】

前記コンフォメーションナルエピトープが、アミノ酸残基：1 4 2 7 ~ 1 4 2 9 (L N R - A / B リンカーの)、1 4 4 2、1 4 4 4 ~ 1 4 4 5、1 4 4 7 ~ 1 4 5 0、1 4 5 3、1 4 5 8 (L N R - B の)、1 4 6 1 ~ 1 4 6 2、1 4 6 4 (L N R - B / C リンカーの)、1 5 0 7 ~ 1 5 0 8、1 5 1 0 (L N R - H D リンカーの)、1 5 9 2、1 5 9 4 ~ 1 5 9 9、1 6 0 2 (H D β 4 - α 3 ループの)、および 1 6 0 6 (H D α 3 ヘリックスの)、またはこれらのサブセットを含む、請求項 8 に記載の単離抗体またはその断片。

40

【請求項 18】

前記抗体またはその断片の V H が、以下の N o t c h 3 残基：C y s 1 4 4 2、P r o 1 4 4 4、A l a 1 4 4 5、S e r 1 4 4 7、S e r 1 4 4 8、P r o 1 4 4 9、T y r 1 4 5 3、C y s 1 4 5 8、G l y 1 4 6 1、G l y 1 4 6 2、G l y 1 4 6 4、L e u 1 5 9 2、S e r 1 5 9 4、P r o 1 5 9 5、G l u 1 5 9 6、A s n 1 5 9 7、A s p 1 5 9 8、および H i s 1 5 9 9 のうちの少なくとも 1 つに結合する、請求項 8 に記載の単離抗体またはその断片。

【請求項 19】

前記抗体またはその断片の V L が、以下の N o t c h 3 残基：G l n 1 4 2 7、C y s

50

1428、Glu1429、Pro1444、Ser1445、Ser1447、Ser1448、Pro1449、Tyr1453、Leu1507、Leu1508、Arg1510、Leu1592、Asp1598、Pro1602、およびSer1606のうちの少なくとも1つに結合する、請求項8に記載の単離抗体またはその断片。

【請求項20】

前記抗体が、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、および合成抗体からなる群から選択される、請求項8に記載の単離抗体またはその断片。

【請求項21】

Notch3受容体のコンフォメーションナルエピトープに特異的に結合する単離抗体またはその断片であって、前記コンフォメーションナルエピトープが、Notch3受容体のNRドメインの、LNR(Lin Notch Repeat)領域内、ヘテロ二量体化(HD)ドメイン内、およびリンカー領域内の、連続アミノ酸配列および非連続アミノ酸配列を含み、前記LNR領域が、LNR-Cであり、前記HDドメインが、HD α 2ヘリックスであり、前記抗体またはその断片が、リガンド依存性シグナル伝達を遮断する、単離抗体またはその断片。

10

【請求項22】

前記コンフォメーションナルエピトープが、前記NR領域のLNR-B内のアミノ酸残基をさらに含む、請求項21に記載の単離抗体またはその断片。

【請求項23】

前記コンフォメーションナルエピトープが、前記NR領域のLNR-B/Cリンカー内のアミノ酸残基をさらに含む、請求項21に記載の単離抗体またはその断片。

20

【請求項24】

前記コンフォメーションナルエピトープが、HD α 3- β 5ループ内のアミノ酸残基をさらに含む、請求項21に記載の単離抗体またはその断片。

【請求項25】

前記コンフォメーションナルエピトープが、LNR-B内、LNR-B/Cリンカー内、およびHD α 3- β 5ループ内のアミノ酸残基をさらに含む、請求項21に記載の単離抗体またはその断片。

【請求項26】

前記Notch3受容体のLNR領域を、自己阻害状態で安定化させる、請求項21に記載の単離抗体またはその断片。

30

【請求項27】

前記Notch3受容体が、突然変異体のNotch3受容体であり、前記LNR領域または前記HDドメインが、少なくとも1カ所のアミノ酸残基の突然変異を有する、請求項21に記載の単離抗体またはその断片。

【請求項28】

突然変異体のNotch3受容体が、S1580L、D1587N、Y1624H、L1518M、A1537T、N1597K、L1547V、R1526C(HD)およびG1487D、(LNR-C)、P2034fs、P2067fs、p2177fs、Q2075*、W2172*、G2112D、L2212M、F2121L、G2038S、G2059R、R2022H、Y2127H、Y2211C、V2202I、S2096L、P2089L、P2209L、R1981C、R2145Q、P2178S、またはこれらの組合せからなる群から選択される突然変異を含む、請求項21に記載の単離抗体またはその断片。

40

【請求項29】

前記コンフォメーションナルエピトープが、アミノ酸残基：1440(LNR-Bの)、1463、1465~1468(LNR-B/Cリンカーの)、1469~1472、1474、1486~1487、(LNR-Cの)、1534(HD α 3ヘリックスの)、ならびに1618、1619、および1621(α 3- β 5ループの)、またはこれらのサブセットを含む、請求項21に記載の単離抗体またはその断片。

50

【請求項 30】

前記抗体またはその断片のVHが、以下のNotch3残基：Arg1463、Thr1466、Asn1468、Pro1469、Val1470、Tyr1471、Tyr1474、Gln1486、およびGly1487のうちの少なくとも1つに結合する、請求項21に記載の単離抗体またはその断片。

【請求項 31】

前記抗体またはその断片のVLが、以下のNotch3残基：Ser1440、Arg1465、Thr1466、Asn1468、Pro1469、Val1470、Glu1472、Arg1434、Glu1618、Arg1619、およびAsp1621のうちの少なくとも1つに結合する、請求項21に記載の単離抗体またはその断片。

10

【請求項 32】

前記抗体が、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、および合成抗体からなる群から選択される、請求項4から31に記載の単離抗体またはその断片。

【請求項 33】

Notch3リガンド駆動レポーター遺伝子アッセイ、FACSアッセイ、Notch3標的遺伝子mRNAの定量化、TALL-1細胞の*in vitro*における増殖、およびNotch3細胞内ドメイン（ICD：intracellular domain）のガンマセクレターゼ切断形態の検出からなる群から選択されるアッセイにより評価される、Notch3シグナル伝達を阻害する、請求項4から31に記載の単離抗体またはその断片。

20

【請求項 34】

Notch3受容体に対する単離抗体またはその断片であって、解離速度定数（ K_D ）を、少なくとも $1 \times 10^7 M^{-1}$ 、 $10^8 M^{-1}$ 、 $10^9 M^{-1}$ 、 $10^{10} M^{-1}$ 、 $10^{11} M^{-1}$ 、 $10^{12} M^{-1}$ 、 $10^{13} M^{-1}$ とし、前記抗体またはその断片が、Notch3リガンド駆動レポーター遺伝子アッセイ、FACSアッセイ、Notch3標的遺伝子mRNAの定量化、TALL-1細胞の*in vitro*における増殖、およびNotch3細胞内ドメイン（ICD）のガンマセクレターゼ切断形態の検出からなる群から選択されるアッセイにより評価される、Notch3シグナル伝達を阻害する、単離抗体またはその断片。

【請求項 35】

表2に記載された抗体と同じコンフォメーションルエピトープに結合する、請求項34に記載の単離抗体またはその断片。

30

【請求項 36】

表2に記載された抗体と交差競合する、請求項34に記載の単離抗体またはその断片。

【請求項 37】

Notch3受容体に対する単離抗体またはその断片であって、配列番号9、配列番号29、配列番号49、配列番号69、配列番号89、配列番号109、配列番号129、配列番号149、配列番号169、配列番号189、配列番号209、および配列番号229；からなる群から選択されるVH、ならびに配列番号19、配列番号39、配列番号59、配列番号79、配列番号99、配列番号119、配列番号139、配列番号159、配列番号179、配列番号199、配列番号219、および配列番号239からなる群から選択されるVL、またはこれらに対する同一性が97～99%であるアミノ酸配列を含む、単離抗体またはその断片。

40

【請求項 38】

配列番号9を有する可変重鎖および配列番号19を有する可変軽鎖配列、配列番号29を有する可変重鎖配列および配列番号39を有する可変軽鎖配列、配列番号49を有する可変重鎖配列および配列番号59を有する可変軽鎖配列、配列番号69を有する可変重鎖配列および配列番号79を有する可変軽鎖配列、配列番号89を有する可変重鎖配列および配列番号99を有する可変軽鎖配列、配列番号109を有する可変重鎖配列および配列番号119を有する可変軽鎖配列、配列番号129を有する可変重鎖配列および配列番号

50

139を有する可変軽鎖配列、配列番号149を有する可変重鎖配列および配列番号159を有する可変軽鎖配列、配列番号169を有する可変重鎖配列および配列番号179を有する可変軽鎖配列、配列番号189を有する可変重鎖配列および配列番号199を有する可変軽鎖配列、配列番号209を有する可変重鎖配列および配列番号219を有する可変軽鎖配列、ならびに配列番号229を有する可変重鎖配列および配列番号239を有する可変軽鎖配列からなる群から選択される、可変重鎖配列および可変軽鎖配列を含む、単離抗体またはその断片。

【請求項39】

配列番号9を有する可変重鎖および配列番号19を有する可変軽鎖配列、配列番号29を有する可変重鎖配列および配列番号39を有する可変軽鎖配列、配列番号49を有する可変重鎖配列および配列番号59を有する可変軽鎖配列、配列番号69を有する可変重鎖配列および配列番号79を有する可変軽鎖配列、配列番号89を有する可変重鎖配列および配列番号99を有する可変軽鎖配列、配列番号109を有する可変重鎖配列および配列番号119を有する可変軽鎖配列、配列番号129を有する可変重鎖配列および配列番号139を有する可変軽鎖配列、配列番号149を有する可変重鎖配列および配列番号159を有する可変軽鎖配列、配列番号169を有する可変重鎖配列および配列番号179を有する可変軽鎖配列、配列番号189を有する可変重鎖配列および配列番号199を有する可変軽鎖配列、配列番号209を有する可変重鎖配列および配列番号219を有する可変軽鎖配列、ならびに配列番号229を有する可変重鎖配列および配列番号239を有する可変軽鎖配列からなる群から選択される、可変重鎖配列および可変軽鎖配列を含む、単鎖抗体またはその断片。

【請求項40】

Notch3受容体に対する単離抗体またはその断片であって、配列番号5、配列番号25、配列番号45、配列番号65、配列番号85、配列番号105、配列番号125、配列番号145、配列番号165、配列番号185、配列番号205、および配列番号225からなる群から選択される重鎖CDR3を含む、単離抗体またはその断片。

【請求項41】

配列番号3の重鎖可変領域CDR1、配列番号4の重鎖可変領域CDR2、配列番号5の重鎖可変領域CDR3、配列番号13の軽鎖可変領域CDR1、配列番号14の軽鎖可変領域CDR2、および配列番号15の軽鎖可変領域CDR3、配列番号23の重鎖可変領域CDR1、配列番号24の重鎖可変領域CDR2、配列番号25の重鎖可変領域CDR3、配列番号33の軽鎖可変領域CDR1、配列番号34の軽鎖可変領域CDR2、および配列番号35の軽鎖可変領域CDR3、配列番号43の重鎖可変領域CDR1、配列番号44の重鎖可変領域CDR2、配列番号45の重鎖可変領域CDR3、配列番号53の軽鎖可変領域CDR1、配列番号54の軽鎖可変領域CDR2、および配列番号55の軽鎖可変領域CDR3、配列番号63の重鎖可変領域CDR1、配列番号64の重鎖可変領域CDR2、配列番号65の重鎖可変領域CDR3、配列番号73の軽鎖可変領域CDR1、配列番号74の軽鎖可変領域CDR2、および配列番号75の軽鎖可変領域CDR3、配列番号83の重鎖可変領域CDR1、配列番号84の重鎖可変領域CDR2、配列番号85の重鎖可変領域CDR3、配列番号93の軽鎖可変領域CDR1、配列番号94の軽鎖可変領域CDR2、および配列番号95の軽鎖可変領域CDR3、配列番号103の重鎖可変領域CDR1、配列番号104の重鎖可変領域CDR2、配列番号105の重鎖可変領域CDR3、配列番号113の軽鎖可変領域CDR1、配列番号114の軽鎖可変領域CDR2、および配列番号115の軽鎖可変領域CDR3、配列番号123の重鎖可変領域CDR1、配列番号124の重鎖可変領域CDR2、配列番号125の重鎖可変領域CDR3、配列番号133の軽鎖可変領域CDR1、配列番号134の軽鎖可変領域CDR2、および配列番号135の軽鎖可変領域CDR3、配列番号143の重鎖可変領域CDR1、配列番号144の重鎖可変領域CDR2、配列番号145の重鎖可変領域CDR3、配列番号153の軽鎖可変領域CDR1、配列番号154の軽鎖可変領域CDR2、および配列番号155の軽鎖可変領域CDR3、配列番号163の重鎖可変領域CD

R 1、配列番号 1 6 4 の重鎖可変領域 C D R 2、配列番号 1 6 5 の重鎖可変領域 C D R 3、配列番号 1 7 3 の軽鎖可変領域 C D R 1、配列番号 1 7 4 の軽鎖可変領域 C D R 2、および配列番号 1 7 5 の軽鎖可変領域 C D R 3、配列番号 1 8 3 の重鎖可変領域 C D R 1、配列番号 1 8 4 の重鎖可変領域 C D R 2、配列番号 1 8 5 の重鎖可変領域 C D R 3、配列番号 1 9 3 の軽鎖可変領域 C D R 1、配列番号 1 9 4 の軽鎖可変領域 C D R 2、および配列番号 1 9 5 の軽鎖可変領域 C D R 3、配列番号 2 0 3 の重鎖可変領域 C D R 1、配列番号 2 0 4 の重鎖可変領域 C D R 2、配列番号 2 0 5 の重鎖可変領域 C D R 3、配列番号 2 1 3 の軽鎖可変領域 C D R 1、配列番号 2 1 4 の軽鎖可変領域 C D R 2、および配列番号 2 1 5 の軽鎖可変領域 C D R 3、配列番号 2 2 3 の重鎖可変領域 C D R 1、配列番号 2 2 4 の重鎖可変領域 C D R 2、配列番号 2 2 5 の重鎖可変領域 C D R 3、配列番号 2 3 3 の軽鎖可変領域 C D R 1、配列番号 2 3 4 の軽鎖可変領域 C D R 2、および配列番号 2 3 5 の軽鎖可変領域 C D R 3 からなる群から選択される、重鎖可変領域および軽鎖可変領域の C D R 1、C D R 2、および C D R 3 を含む、単離抗体またはその断片。

10

【請求項 4 2】

請求項 4 から 4 1 から選択される抗体またはその断片と、薬学的に許容される担体とを含む、医薬組成物。

【請求項 4 3】

N o t c h 3 シグナル伝達経路により媒介されるがんであって、乳がん、結腸直腸がん、肺がん、多発性骨髄腫、卵巣がん、肝がん、胃がん、膵臓がん、前立腺がん、急性骨髄性白血病、t 細胞性急性リンパ芽球性白血病、マンツル細胞リンパ腫、慢性リンパ球性白血病、ユーイング肉腫、慢性骨髄性白血病、急性リンパ芽球性白血病、リンパ腫、骨肉腫、有棘細胞癌、末梢神経鞘腫瘍、シュワン細胞腫、頭頸部がん、膀胱がん、食道がん、神経膠芽腫、軟組織明細胞肉腫、悪性中皮腫、神経線維腫症、腎がん、および黒色腫からなる群から選択されるがんの処置における使用のための、請求項 4 から 4 1 に記載の抗体またはその断片。

20

【請求項 4 4】

N o t c h 3 シグナル伝達経路により媒介されるがんであって、T 細胞性急性リンパ芽球性白血病 (T A L L : T-cell acute lymphoblastic leukemia) であるがんの処置における使用のための、請求項 4 3 に記載の抗体または断片。

【請求項 4 5】

N o t c h 3 シグナル伝達経路により媒介されるがんであって、乳がん、結腸直腸がん、肺がん、多発性骨髄腫、卵巣がん、肝がん、胃がん、膵臓がん、前立腺がん、急性骨髄性白血病、t 細胞性急性リンパ芽球性白血病、マンツル細胞リンパ腫、慢性リンパ球性白血病、ユーイング肉腫、慢性骨髄性白血病、急性リンパ芽球性白血病、リンパ腫、骨肉腫、有棘細胞癌、末梢神経鞘腫瘍、シュワン細胞腫、頭頸部がん、膀胱がん、食道がん、神経膠芽腫、軟組織明細胞肉腫、悪性中皮腫、神経線維腫症、腎がん、および黒色腫からなる群から選択されるがんを処置するための医薬としての使用のための、請求項 4 から 4 1 に記載の抗体またはその断片。

30

【請求項 4 6】

N o t c h 3 シグナル伝達経路により媒介されるがんであって、T 細胞性急性リンパ芽球性白血病 (T A L L) であるがんを処置するための医薬としての使用のための、請求項 4 5 に記載の抗体または断片。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願

本出願は、それらの内容が参照によりそれらの全体において本明細書に組み込まれる、2 0 1 3 年 3 月 1 4 日に提出された、米国仮出願第 6 1 / 7 8 1 , 4 2 1 号に対する優先権を主張する。

【0 0 0 2】

50

本発明は一般に、N o t c h 3と相互作用する、抗体またはそれらの断片に関する。特に、本発明は、N R Rドメインの、L N R領域およびH Dに由来する、連続アミノ酸残基および非連続アミノ酸残基を含む、N o t c h 3または突然変異N o t c h 3の少なくとも1つのコンフォメーションエピトープを認識する、抗体またはそれらの断片に関する。

【背景技術】

【0003】

N o t c hシグナル伝達とは、胎児の発生および成体組織の両方における、幹細胞の維持、細胞の分化および増殖を含む生物学的機能の多様なセットを調節する、進化において保存的な経路である (Kopan et al., (2009) Cell 137: 216-233; Guruharsha et al., (2012) Nat Rev Genet. 13: 654-66; およびAndersson et al., (2001) Development 138: 3593-3612)。哺乳動物では、4つのN o t c h受容体 (N o t c h 1~4) が記載されており、これらは、保存的なドメインアーキテクチャーを有する。細胞外ドメイン (E C D) は、一連のE G F様リピートに後続する、3つのL N Rリピートとヘテロ二量体化ドメインとを含有するN R R (negative regulatory region) からなる。カノニカルなN o t c hシグナル伝達は、1つの細胞上のN o t c h受容体が、近傍の細胞上のリガンドと相互作用すると、活性化する。哺乳動物には、5つの膜貫通型リガンド、3つのD e l t a様リガンド (D L L 1、D L L 4、およびD L L 3)、および2つのJ a g g e dリガンド (J a g g e d 1、J a g g e d 2) が存在する。リガンドの結合は、N R Rドメイン内のS 2部位における、A D A MプロテアーゼによるN o t c hの切断を結果としてもたらす。この初期の切断により、S 3部位における、 γ -セクレターゼ複合体による、後続のN o t c h受容体の切断のための基質が作り出される。 γ -セクレターゼによる切断の後、N o t c hの細胞内ドメイン (I C D : intracellular domain) は、核へと移行し、そこで、C S L転写因子 (哺乳動物では、C B F - 1 / R B P - J κ) および共活性化因子であるm a s t e r m i n d (M A M L 1) と相互作用して、標的遺伝子の転写を活性化させる。転写因子のH E S / H E Yファミリーは、十分に特徴付けられた、N o t c h標的遺伝子であるが、大多数の転写標的は、細胞型特異的である。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

現在、がんにおけるN o t c h受容体についての証拠は主に、N o t c h 1シグナル伝達における変化に焦点を当てているが、他のN o t c h受容体に対してはほとんど焦点が当てられていない。したがって、N o t c h 3シグナル伝達など、他のN o t c h受容体によるシグナル伝達を変化させる方法および組成物について研究し、これらを同定する必要がある。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本開示は、N o t c h 3内または突然変異N o t c h 3内の、多数の顕著に異なるコンフォメーションエピトープに関する。本開示はまた、N R Rドメインの、L N R領域およびH Dに由来する、連続アミノ酸残基および非連続アミノ酸残基を含む、N o t c h 3または突然変異N o t c h 3の、少なくとも1つのコンフォメーションエピトープを認識する、抗体またはそれらの断片にも関する。

【0006】

したがって、一態様では、本開示は、N o t c h 3受容体のコンフォメーションエピトープを含む単離ポリペプチドであって、コンフォメーションエピトープが、N o t c h 3受容体のN R Rドメインの、L N R (Lin Notch Repeat) 領域内、ヘテロ二量体化 (H D : heterodimerization) ドメイン内、およびリンカー領域内の、連続アミノ酸配列および非連続アミノ酸配列を含み、L N R領域が、L N R - A、L N R - B、L N R - C、およびこれらのL N Rの間の対応するリンカーからなる群から選択され、H Dドメインが、N末端H DおよびC末端H Dからなる群から選択され、リンカー領域が、L N R - A /

Bリンカー、LNR-B/Cリンカー、LNR-HDリンカーからなる群から選択される、単離ポリペプチドに関する。

【0007】

別の態様では、本開示は、Notch3受容体のコンフォメーションルエピトープを含む単離ポリペプチドであって、コンフォメーションルエピトープが、Notch3受容体のNRRドメインの、LNR (Lin Notch Repeat) 領域内、ヘテロ二量体化 (HD) ドメイン内、およびリンカー領域内の、連続アミノ酸配列および非連続アミノ酸配列を含み、LNR領域が、LNR-Bであり、HDドメインが、HD α 3ヘリックスであり、リンカー領域が、LNR-A/Bリンカー、LNR-B/Cリンカー、LNR-HDリンカーからなる群から選択される、単離ポリペプチドに関する。

10

【0008】

別の態様では、本開示は、Notch3受容体のコンフォメーションルエピトープを含む単離ポリペプチドであって、コンフォメーションルエピトープが、Notch3受容体のNRRドメインの、LNR (Lin Notch Repeat) 領域内、ヘテロ二量体化 (HD) ドメイン内、およびリンカー領域内の、連続アミノ酸配列および非連続アミノ酸配列を含み、LNR領域が、LNR-Cであり、HDドメインが、HD α 2ヘリックスであり、リンカー領域が、LNR-A/Bリンカー、LNR-B/Cリンカー、LNR-HDリンカーからなる群から選択される、単離ポリペプチドに関する。

【0009】

別の態様では、本開示は、Notch3受容体のコンフォメーションルエピトープを認識する単離抗体またはその断片であって、コンフォメーションルエピトープが、Notch3受容体のNRRドメインの、LNR (Lin Notch Repeat) 領域内、ヘテロ二量体化 (HD) ドメイン内、およびリンカー領域内の、連続アミノ酸配列および非連続アミノ酸配列を含み、LNR領域が、LNR-A、LNR-B、LNR-Cからなる群から選択され、HDドメインが、N末端HDおよびC末端HDからなる群から選択され、抗体またはその断片が、リガンド依存性シグナル伝達を遮断する、単離抗体またはその断片に関する。

20

【0010】

一実施形態では、抗体またはその断片は、Notch3受容体のLNR領域を、自己阻害状態で安定化させる。一実施形態では、本開示は、LNR領域またはHDドメインが、少なくとも1カ所のアミノ酸残基の突然変異を有する、突然変異Notch3受容体を提示する。一実施形態では、Notch3突然変異体は、S1580L、およびG1487D、またはこれらの組合せからなる群から選択される突然変異を含む。

30

【0011】

別の態様では、本開示は、Notch3受容体のコンフォメーションルエピトープに特異的に結合する単離抗体またはその断片であって、コンフォメーションルエピトープが、Notch3受容体のNRRドメインの、LNR (Lin Notch Repeat) 領域内、ヘテロ二量体化 (HD) ドメイン内、およびリンカー領域内の、連続アミノ酸配列および非連続アミノ酸配列を含み、LNR領域が、LNR-Bであり、HDドメインが、HD α 3ヘリックスであり、抗体またはその断片が、リガンド依存性シグナル伝達を遮断する、単離抗体またはその断片に関する。

40

【0012】

一実施形態では、コンフォメーションルエピトープは、NRR領域のLNR-A/Bリンカー内のアミノ酸残基をさらに含む。一実施形態では、コンフォメーションルエピトープは、NRR領域のLNR-B/Cリンカー内のアミノ酸残基をさらに含む。一実施形態では、コンフォメーションルエピトープは、NRR領域のLNR-HDリンカー内のアミノ酸残基をさらに含む。一実施形態では、コンフォメーションルエピトープは、HD β 4- α 3ループ内のアミノ酸残基をさらに含む。一実施形態では、コンフォメーションルエピトープは、LNR-A/Bリンカー内、LNR-B/Cリンカー内、LNR-HDリンカー内、およびHD β 4- α 3ループ内のアミノ酸残基をさらに含む。一実施形態では、抗体またはその断片は、Notch3受容体のLNR領域を、自己阻害状態で安定化させ

50

る。一実施形態では、N o t c h 3 受容体は、突然変異 N o t c h 3 受容体であり、L N R 領域または H D ドメインは、少なくとも 1 カ所のアミノ酸残基の突然変異を有する。一実施形態では、N o t c h 3 突然変異体は、S 1 5 8 0 L、D 1 5 8 7 N、R 1 5 8 9 Q、Y 1 6 2 4 H、A 1 6 0 8 T、L 1 5 1 8 M、A 1 5 3 7 T、N 1 5 9 7 K、L 1 5 4 7 V、R 1 5 2 6 C (H D) および G 1 4 8 7 D、A 1 4 7 6 T (L N R-C)、またはこれらの組合せからなる群から選択される突然変異を含む。一実施形態では、コンフォメーションナルエピトープは、アミノ酸残基 1 4 2 7 ~ 1 4 2 9 (L N R-A/B リンカーの)、1 4 4 2、1 4 4 4 ~ 1 4 4 5、1 4 4 7 ~ 1 4 5 0、1 4 5 3、1 4 5 8 (L N R-B の)、1 4 6 1 ~ 1 4 6 2、1 4 6 4 (L N R-B/C リンカーの)、1 5 0 7 ~ 1 5 0 8、1 5 1 0 (L N R-H D リンカーの)、1 5 9 2、1 5 9 4 ~ 1 5 9 9、1 6 0 2 (H D β 4- α 3 ループの)、および 1 6 0 6 (H D α 3 ヘリックスの)、またはこれらのサブセットを含む。一実施形態では、抗体またはその断片の V H は、以下の N o t c h 3 残基：C y s 1 4 4 2、P r o 1 4 4 4、A l a 1 4 4 5、S e r 1 4 4 7、S e r 1 4 4 8、P r o 1 4 4 9、T y r 1 4 5 3、C y s 1 4 5 8、G l y 1 4 6 1、G l y 1 4 6 2、G l y 1 4 6 4、L e u 1 5 9 2、S e r 1 5 9 4、P r o 1 5 9 5、G l u 1 5 9 6、A s n 1 5 9 7、A s p 1 5 9 8、および H i s 1 5 9 9 のうちの少なくとも 1 つに結合する。一実施形態では、N o t c h 3 受容体は、突然変異 N o t c h 3 受容体であり、L N R 領域または H D ドメインは、少なくとも 1 カ所のアミノ酸残基の突然変異を有する。一実施形態では、抗体またはその断片の V L は、以下の N o t c h 3 残基：G l n 1 4 2 7、C y s 1 4 2 8、G l u 1 4 2 9、P r o 1 4 4 4、S e r 1 4 4 5、S e r 1 4 4 7、S e r 1 4 4 8、P r o 1 4 4 9、T y r 1 4 5 3、L e u 1 5 0 7、L e u 1 5 0 8、A r g 1 5 1 0、L e u 1 5 9 2、A s p 1 5 9 8、P r o 1 6 0 2、および S e r 1 6 0 6 のうちの少なくとも 1 つに結合する。一実施形態では、抗体は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、および合成抗体からなる群から選択される。

【0013】

別の態様では、本開示は、N o t c h 3 受容体のコンフォメーションナルエピトープに特異的に結合する単離抗体またはその断片であって、コンフォメーションナルエピトープが、N o t c h 3 受容体の N R R ドメインの、L N R (L i n N o t c h R e p e a t) 領域内、ヘテロ二量体化 (H D) ドメイン内、およびリンカー内の、連続アミノ酸配列および非連続アミノ酸配列を含み、L N R 領域が、L N R-C であり、H D ドメインが、H D α 2 ヘリックスであり、抗体またはその断片が、リガンド依存性シグナル伝達を遮断する、単離抗体またはその断片に関する。

【0014】

一実施形態では、コンフォメーションナルエピトープは、N R R 領域の L N R-B 内のアミノ酸残基をさらに含む。一実施形態では、コンフォメーションナルエピトープは、N R R 領域の L N R-B/C リンカー内のアミノ酸残基をさらに含む。一実施形態では、コンフォメーションナルエピトープは、H D α 3- β 5 ループ内のアミノ酸残基をさらに含む。一実施形態では、コンフォメーションナルエピトープは、L N R-B 内、L N R-B/C リンカー内、および H D α 3- β 5 ループ内のアミノ酸残基をさらに含む。一実施形態では、抗体またはその断片は、N o t c h 3 受容体の L N R 領域を、自己阻害状態で安定化させる。一実施形態では、突然変異体の N o t c h 3 受容体は、S 1 5 8 0 L、R 1 5 1 0 H、D 1 5 8 7 N、R 1 5 8 9 Q、Y 1 6 2 4 H、L 1 5 1 8 M、A 1 5 3 7 T、N 1 5 9 7 K、L 1 5 4 7 V、R 1 5 2 6 C (H D)、および A 1 4 7 6 T (L N R-C)、またはこれらの組合せからなる群から選択される突然変異を含む。一実施形態では、コンフォメーションナルエピトープは、アミノ酸残基：1 4 4 0 (L N R-B の)、1 4 6 3、1 4 6 5 ~ 1 4 6 8 (L N R-B/C リンカーの)、1 4 6 9 ~ 1 4 7 2、1 4 7 4、1 4 8 6 ~ 1 4 8 7、(L N R-C の)、1 5 3 4 (H D α 2 ヘリックスの)、ならびに 1 6 1 8、1 6 1 9、および 1 6 2 1 (α 3- β 5 ループの)、またはこれらのサブセットを含む。一実施形態では、抗体またはその断片の V H は、以下の N o t c h 3 残基：A r g 1

463、Thr1466、Asn1468、Pro1469、Val1470、Tyr1471、Tyr1474、Gln1486、およびGly1487のうちの少なくとも1つに結合する。一実施形態では、抗体またはその断片のVLは、以下のNotch3残基：Ser1440、Arg1465、Thr1466、Asn1468、Pro1469、Val1470、Glu1472、Arg1434、Glu1618、Arg1619、およびAsp1621のうちの少なくとも1つに結合する。一実施形態では、抗体は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、および合成抗体からなる群から選択される。一実施形態では、抗体またはその断片は、Notch3リガンド駆動レポーター遺伝子アッセイ、FACSアッセイ、Notch3標的遺伝子mRNAの定量化、TALL-1細胞の*in vitro*における増殖、およびNotch3細胞内ドメイン（ICD）のガンマセクレターゼ切断形態の検出からなる群から選択されるアッセイにより評価される、Notch3シグナル伝達を阻害する。

【0015】

別の態様では、本開示は、Notch3受容体に対する単離抗体またはその断片であって、解離速度定数（ K_D ）を、少なくとも $1 \times 10^7 M^{-1}$ 、 $10^8 M^{-1}$ 、 $10^9 M^{-1}$ 、 $10^{10} M^{-1}$ 、 $10^{11} M^{-1}$ 、 $10^{12} M^{-1}$ 、 $10^{13} M^{-1}$ とし、抗体またはその断片が、Notch3リガンド駆動レポーター遺伝子アッセイ、FACSアッセイ、Notch3標的遺伝子mRNAの定量化、TALL-1細胞の*in vitro*における増殖、およびNotch3細胞内ドメイン（ICD）のガンマセクレターゼ切断形態の検出からなる群から選択されるアッセイにより評価される、Notch3シグナル伝達を阻害する、単離抗体またはその断片に関する。

【0016】

一実施形態では、抗体またはその断片は、表2に記載された抗体と同じコンフォメーションナルエピトープに結合する。一実施形態では、抗体またはその断片は、表2に記載された抗体と交差競合する。

【0017】

別の態様では、本開示は、Notch3受容体に対する単離抗体またはその断片であって、配列番号9、配列番号29、配列番号49、配列番号69、配列番号89、配列番号109、配列番号129、配列番号149、配列番号169、配列番号189、配列番号209、および配列番号229；からなる群から選択されるVH、ならびに配列番号19、配列番号39、配列番号59、配列番号79、配列番号99、配列番号119、配列番号139、配列番号159、配列番号179、配列番号199、配列番号219、および配列番号239からなる群から選択されるVL、またはこれらに対する同一性が97～99%であるアミノ酸配列を含む、単離抗体またはその断片に関する。

【0018】

別の態様では、本開示は、配列番号9を有する可変重鎖および配列番号19を有する可変軽鎖配列、配列番号29を有する可変重鎖配列および配列番号39を有する可変軽鎖配列、配列番号49を有する可変重鎖配列および配列番号59を有する可変軽鎖配列、配列番号69を有する可変重鎖配列および配列番号79を有する可変軽鎖配列、配列番号89を有する可変重鎖配列および配列番号99を有する可変軽鎖配列、配列番号109を有する可変重鎖配列および配列番号119を有する可変軽鎖配列、配列番号129を有する可変重鎖配列および配列番号139を有する可変軽鎖配列、配列番号149を有する可変重鎖配列および配列番号159を有する可変軽鎖配列、配列番号169を有する可変重鎖配列および配列番号179を有する可変軽鎖配列、配列番号189を有する可変重鎖配列および配列番号199を有する可変軽鎖配列、配列番号209を有する可変重鎖配列および配列番号219を有する可変軽鎖配列、ならびに配列番号229を有する可変重鎖配列および配列番号239を有する可変軽鎖配列からなる群から選択される、可変重鎖配列および可変軽鎖配列を含む、単鎖抗体またはその断片に関する。

【0019】

別の態様では、本開示は、配列番号9を有する可変重鎖および配列番号19を有する可

変軽鎖配列、配列番号 29 を有する可変重鎖配列および配列番号 39 を有する可変軽鎖配列、配列番号 49 を有する可変重鎖配列および配列番号 59 を有する可変軽鎖配列、配列番号 69 を有する可変重鎖配列および配列番号 79 を有する可変軽鎖配列、配列番号 89 を有する可変重鎖配列および配列番号 99 を有する可変軽鎖配列、配列番号 109 を有する可変重鎖配列および配列番号 119 を有する可変軽鎖配列、配列番号 129 を有する可変重鎖配列および配列番号 139 を有する可変軽鎖配列、配列番号 149 を有する可変重鎖配列および配列番号 159 を有する可変軽鎖配列、配列番号 169 を有する可変重鎖配列および配列番号 179 を有する可変軽鎖配列、配列番号 189 を有する可変重鎖配列および配列番号 199 を有する可変軽鎖配列、配列番号 209 を有する可変重鎖配列および配列番号 219 を有する可変軽鎖配列、ならびに配列番号 229 を有する可変重鎖配列および配列番号 239 を有する可変軽鎖配列からなる群から選択される、可変重鎖配列および可変軽鎖配列を含む、単離抗体またはその断片に関する。

10

【0020】

別の態様では、本開示は、N o t c h 3 受容体に対する単離抗体またはその断片であって、配列番号 5、配列番号 25、配列番号 45、配列番号 65、配列番号 85、配列番号 105、配列番号 125、配列番号 145、配列番号 165、配列番号 185、配列番号 205、および配列番号 225 からなる群から選択される重鎖 C D R 3 を含む、単離抗体またはその断片に関する。

【0021】

別の態様では、本開示は、配列番号 3 の重鎖可変領域 C D R 1、配列番号 4 の重鎖可変領域 C D R 2、配列番号 5 の重鎖可変領域 C D R 3、配列番号 13 の軽鎖可変領域 C D R 1、配列番号 14 の軽鎖可変領域 C D R 2、および配列番号 15 の軽鎖可変領域 C D R 3、配列番号 23 の重鎖可変領域 C D R 1、配列番号 24 の重鎖可変領域 C D R 2、配列番号 25 の重鎖可変領域 C D R 3、配列番号 33 の軽鎖可変領域 C D R 1、配列番号 34 の軽鎖可変領域 C D R 2、および配列番号 35 の軽鎖可変領域 C D R 3、配列番号 43 の重鎖可変領域 C D R 1、配列番号 44 の重鎖可変領域 C D R 2、配列番号 45 の重鎖可変領域 C D R 3、配列番号 53 の軽鎖可変領域 C D R 1、配列番号 54 の軽鎖可変領域 C D R 2、および配列番号 55 の軽鎖可変領域 C D R 3、配列番号 63 の重鎖可変領域 C D R 1、配列番号 64 の重鎖可変領域 C D R 2、配列番号 65 の重鎖可変領域 C D R 3、配列番号 73 の軽鎖可変領域 C D R 1、配列番号 74 の軽鎖可変領域 C D R 2、および配列番号 75 の軽鎖可変領域 C D R 3、配列番号 83 の重鎖可変領域 C D R 1、配列番号 84 の重鎖可変領域 C D R 2、配列番号 85 の重鎖可変領域 C D R 3、配列番号 93 の軽鎖可変領域 C D R 1、配列番号 94 の軽鎖可変領域 C D R 2、および配列番号 95 の軽鎖可変領域 C D R 3、配列番号 103 の重鎖可変領域 C D R 1、配列番号 104 の重鎖可変領域 C D R 2、配列番号 105 の重鎖可変領域 C D R 3、配列番号 113 の軽鎖可変領域 C D R 1、配列番号 114 の軽鎖可変領域 C D R 2、および配列番号 115 の軽鎖可変領域 C D R 3、配列番号 123 の重鎖可変領域 C D R 1、配列番号 124 の重鎖可変領域 C D R 2、配列番号 125 の重鎖可変領域 C D R 3、配列番号 133 の軽鎖可変領域 C D R 1、配列番号 134 の軽鎖可変領域 C D R 2、および配列番号 135 の軽鎖可変領域 C D R 3、配列番号 143 の重鎖可変領域 C D R 1、配列番号 144 の重鎖可変領域 C D R 2、配列番号 145 の重鎖可変領域 C D R 3、配列番号 153 の軽鎖可変領域 C D R 1、配列番号 154 の軽鎖可変領域 C D R 2、および配列番号 155 の軽鎖可変領域 C D R 3、配列番号 163 の重鎖可変領域 C D R 1、配列番号 164 の重鎖可変領域 C D R 2、配列番号 165 の重鎖可変領域 C D R 3、配列番号 173 の軽鎖可変領域 C D R 1、配列番号 174 の軽鎖可変領域 C D R 2、および配列番号 175 の軽鎖可変領域 C D R 3、配列番号 183 の重鎖可変領域 C D R 1、配列番号 184 の重鎖可変領域 C D R 2、配列番号 185 の重鎖可変領域 C D R 3、配列番号 193 の軽鎖可変領域 C D R 1、配列番号 194 の軽鎖可変領域 C D R 2、および配列番号 195 の軽鎖可変領域 C D R 3、配列番号 203 の重鎖可変領域 C D R 1、配列番号 204 の重鎖可変領域 C D R 2、配列番号 205 の重鎖可変領域 C D R 3、配列番号 213 の軽鎖可変領域 C D R 1、配列番号 214 の軽鎖可変領域

20

30

40

50

C D R 2、および配列番号 2 1 5 の軽鎖可変領域 C D R 3、配列番号 2 2 3 の重鎖可変領域 C D R 1、配列番号 2 2 4 の重鎖可変領域 C D R 2、配列番号 2 2 5 の重鎖可変領域 C D R 3、配列番号 2 3 3 の軽鎖可変領域 C D R 1、配列番号 2 3 4 の軽鎖可変領域 C D R 2、および配列番号 2 3 5 の軽鎖可変領域 C D R 3 からなる群から選択される、重鎖可変領域および軽鎖可変領域の C D R 1、C D R 2、および C D R 3 を含む、単離抗体またはその断片に関する。

【0022】

別の態様では、本開示は、抗体またはその断片と、薬学的に許容される担体とを含む、医薬組成物に関する。

【0023】

別の態様では、本開示は、N o t c h 3 シグナル伝達経路により媒介されるがんであって、乳がん、結腸直腸がん、肺がん、多発性骨髄腫、卵巣がん、肝がん、胃がん、膵臓がん、前立腺がん、急性骨髄性白血病、t 細胞性急性リンパ芽球性白血病、マンツル細胞リンパ腫、慢性リンパ球性白血病、ユーイング肉腫、慢性骨髄性白血病、急性リンパ芽球性白血病、リンパ腫、骨肉腫、有棘細胞癌、末梢神経鞘腫瘍、シュワン細胞腫、頭頸部がん、膀胱がん、食道がん、神経膠芽腫、軟組織明細胞肉腫、悪性中皮腫、神経線維腫症、腎がん、および黒色腫からなる群から選択されるがんの処置における使用のための、抗体またはその断片に関する。

【0024】

一実施形態では、抗体またはその断片を、N o t c h 3 シグナル伝達経路により媒介されるがんであって、T 細胞性急性リンパ芽球性白血病 (T A L L : T-cell acute lymphoblastic leukemia) であるがんの処置のために使用する。

【0025】

別の態様では、本開示は、N o t c h 3 シグナル伝達経路により媒介されるがんであって、乳がん、結腸直腸がん、肺がん、多発性骨髄腫、卵巣がん、肝がん、胃がん、膵臓がん、前立腺がん、急性骨髄性白血病、T 細胞性急性リンパ芽球性白血病、マンツル細胞リンパ腫、慢性リンパ球性白血病、ユーイング肉腫、慢性骨髄性白血病、急性リンパ芽球性白血病、リンパ腫、骨肉腫、有棘細胞癌、末梢神経鞘腫瘍、シュワン細胞腫、頭頸部がん、膀胱がん、食道がん、神経膠芽腫、軟組織明細胞肉腫、悪性中皮腫、神経線維腫症、腎がん、および黒色腫からなる群から選択されるがんを処置するための医薬としての使用のための抗体またはその断片に関する。一実施形態では、抗体またはその断片を、N o t c h 3 シグナル伝達経路により媒介されるがんであって、T 細胞性急性リンパ芽球性白血病 (T A L L) であるがんを処置するための医薬として使用する。

【図面の簡単な説明】

【0026】

【図 1】N o t c h 3 のドメイン構造を示す図である。

【図 2】各領域のアミノ酸位置を有する N o t c h 3 N R R のドメイン構造を示す図である。

【図 3 A】ヒト、カニクイザルおよびマウス組換えタンパク質に結合する N o t c h 3 抗体の E L I S A データを示す図である。

【図 3 B】ヒト、カニクイザルおよびマウス組換えタンパク質に結合する N o t c h 3 抗体の E L I S A データを示す図である。

【図 3 C】ヒト、カニクイザルおよびマウス組換えタンパク質に結合する N o t c h 3 抗体の E L I S A データを示す図である。

【図 4】ヒト、カニクイザルおよびマウス組換えタンパク質に結合する N o t c h 3 抗体の B i a c o r e データを示す図である。

【図 5 A】種々の N o t c h 3 抗体の F A C S データを示す図である。

【図 5 B】種々の N o t c h 3 抗体の F A C S データを示す図である。

【図 5 C】種々の N o t c h 3 抗体の F A C S データを示す図である。

【図 6 A】H C C 1 1 4 3 N o t c h 増幅細胞における N o t c h 3 抗体の F A C S デ

10

20

30

40

50

ータを示す図である。

【図 6 B】HCC1143 Notch 増幅細胞における Notch 3 抗体の FACS データを示す図である。

【図 6 C】HCC1143 Notch 増幅細胞における Notch 3 抗体の FACS データを示す図である。

【図 6 D】HCC1143 Notch 増幅細胞における Notch 3 抗体の FACS データを示す図である。

【図 6 E】HCC1143 Notch 増幅細胞における Notch 3 抗体の FACS データを示す図である。

【図 6 F】HCC1143 Notch 増幅細胞における Notch 3 抗体の FACS データを示す図である。 10

【図 7 A】Notch 3 レポーター遺伝子アッセイにおける Notch リガンド (Jagged1 および Delta1) の存在下での Notch 3 抗体の阻害パーセントおよび IC₅₀ 値を示す図である。

【図 7 B】Notch 3 レポーター遺伝子アッセイにおける Notch リガンド (Jagged1 および Delta1) の存在下での Notch 3 抗体の阻害パーセントおよび IC₅₀ 値を示す図である。

【図 7 C】Notch 3 レポーター遺伝子アッセイにおける Notch リガンド (Jagged1 および Delta1) の存在下での Notch 3 抗体の阻害パーセントおよび IC₅₀ 値を示す図である。 20

【図 7 D】Notch 3 レポーター遺伝子アッセイにおける Notch リガンド (Jagged1 および Delta1) の存在下での Notch 3 抗体の阻害パーセントおよび IC₅₀ 値を示す図である。

【図 8】Notch 3 標的遺伝子 mRNA 定量を示す図である。

【図 9 A】Notch 3 NRR (上側) および PEST (下側) 突然変異を示す図である。

【図 9 B】PEST 突然変異を示す図である。

【図 10 A】Notch 3 NRR 突然変異の特性を示すグラフである。

【図 10 B】Notch 3 NRR 突然変異の特性を示すグラフである。

【図 11 A】Notch 3 抗体の存在下での TALL-1 mRNA および増殖の阻害を示すグラフである。 30

【図 11 B】Notch 3 抗体の存在下での TALL-1 mRNA および増殖の阻害を示すグラフである。

【図 12 A】TALL-1 細胞のみにいてネオエピトープ ICD3 抗体の存在を示すウェスタンブロットの写真である。

【図 12 B】TALL-1 細胞のみにいてネオエピトープ ICD3 抗体の存在を示すウェスタンブロットの写真である。

【図 13 A】TALL-1 細胞における Notch 3 抗体処置により減少した Notch 3 シグナル伝達を示すウェスタンブロットの写真である。

【図 13 B】MDA-MB468 細胞における Notch 3 抗体処置により減少した Notch 3 シグナル伝達を示すウェスタンブロットの写真である。 40

【図 14 A】Ishikawaherakli02-ER 細胞における Notch 3 抗体処置による減少した Notch 3 シグナル伝達を示すウェスタンブロットの写真である。

【図 14 B】TE-11 細胞における Notch 3 抗体処置による減少した Notch 3 シグナル伝達を示すウェスタンブロットの写真である。

【図 14 C】A549 細胞における Notch 3 抗体処置による減少した Notch 3 シグナル伝達を示すウェスタンブロットの写真である。

【図 15】Notch 3 増幅細胞株、HCC1143 における Notch 3 抗体処置による減少した Notch 3 シグナル伝達を示すウェスタンブロットの写真である。 50

【図16A】TALL-1異種移植片におけるin vivo PD研究のウェスタンブロットの写真である。

【図16B】TALL-1異種移植片におけるin vivo PD研究のIHCの写真である。

【図17A】MDA-MB468異種移植片におけるin vivo PD研究のウェスタンブロットの写真である。

【図17B】MDA-MB468異種移植片におけるin vivo PD研究のウェスタンブロットの写真である。(図17C)MDA-MB468異種移植片におけるin vivo PD研究のウェスタンブロットの写真である。

【図18】in vivo PD HLUX1823モデル異種移植片におけるウェスタンブロットの写真である。 10

【図19A】in vivo有効性におけるTALL-1を示すマウスの写真である。

【図19B】in vivo有効性におけるTALL-1を示すマウスの写真である。

【図20】NRR-A、NRR-B、NRR-CおよびNRR-Dと指定した、Notch3のNRRドメインにおける4つの異なるエピトープを識別するNotch3抗体のエピトープマッピングを示す図である。

【図21】Notch3 NRR X線結晶構造の表面およびリボンの図；1)タンパク質のNおよびC末端；2)3つのLNRリピートおよび配位 Ca^{2+} イオン；3)L1419、自己阻害栓；4)S1およびS2部位；5)HDドメイン内の二次構造；ならびに6)Notch1およびNotch2とは顕著に異なる立体構造を有するNotch3における2つの領域(LNR-B/CリンカーならびにLNR-Cの前半およびHDドメインにおける $\beta 4-\alpha 3$ ループ)が標識される。 20

【図22】ヒトNotch1、2および3の配列アラインメントを示す図である。破線のボックスにおいて、Notch1またはNotch2と顕著に異なる構造を有するNotch3の領域を示す。

【図23】Notch3 NRRへの20350Fab結合の全体構造(左パネル)および標識されたエピトープ残基を有するNotch3 NRRについての詳細な相互作用(右パネル)を有する、3.2Åにおいて決定したNotch3/20350Fab複合体のX線結晶構造を示す図である。

【図24】Notch3 NRRへの20358Fab結合の全体構造(左パネル)および標識されたエピトープ残基を有するNotch3 NRRについての詳細な相互作用(右パネル)を有する、2.1Åにおいて決定したNotch3/20358Fab複合体のX線結晶構造を示す図である。 30

【図25】Notch3 NRRにおける20350および20358エピトープの比較を示す図である。2つの抗体がNotch3 NRRにおける異なるエピトープに結合することを示すNotch3 NRRに重ね合わせたNotch3/20350Fab複合体およびNotch3/20358Fab複合体のX線結晶構造を示す図である。

【図26】20350、20358、およびA4のコンフォメーションエピトープにおけるアミノ酸残基を示す図である。

【図27】未結合状態におけるNotch3 NRRの平均重水素吸収を示すNotch3 NRR+ Ca^{2+} のHDx-MSエピトープマッピングを示す図である。 40

【図28】Notch3 NRRに結合する20350、20358抗体と共に絶対保護量を示すNotch3 NRR+ Ca^{2+} の差異プロットを示す図である。

【図29】Notch3 NRRに結合する20350および20358における保護される領域(黒色)を示す構造を示す図である。

【図30】HDx-MSにおける検出された保護領域に対する埋もれたX線アミノ酸残基の比較を示す図である。

【図31】20037および20358についての Ca^{2+} を有しないNotch3 NRRについての相違プロットならびにNotch3 NRR構造上にマッピングした保護領域(黒色)を示す図である。 50

【図 3 2】N o t c h 3 N R R 表面上にマッピングした抗体 2 0 3 7 7、2 0 3 5 0、2 0 3 5 8 および A 4 のコンフォメーションナルエピトープを示す図である。

【図 3 3】抗体 2 0 3 3 7、2 0 3 5 0、2 0 3 5 8 および A 4 により覆われていないままの N o t c h 3 N R R 上の表面を示す図である。

【図 3 4】抗体 2 0 3 3 7、2 0 3 5 0、2 0 3 5 8 および A 4 により覆われていないままの N o t c h 3 N R R の表面上の潜在的コンフォメーションナルエピトープを示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0027】

詳細な説明

10

定義

本発明がよりたやすく理解されうるために、ある種の用語についてまず定義する。詳細な説明を通して、さらなる定義も提示する。

【0028】

本明細書で使用される「シグナル伝達」または「シグナル伝達活性」という語句は、細胞の 1 つの部分から、細胞の別の部分への、シグナルの伝送を結果としてもたらず、増殖因子の受容体への結合などのタンパク質間相互作用により一般に誘発される、生化学的因果関係を指す。N o t c h 3 では、リガンドの結合は、N R R ドメイン内の S 2 部位における、A D A M プロテアーゼによる、N o t c h 3 の切断を結果としてもたらず。この初期の切断により、S 3 部位における、 γ -セクレターゼ複合体による、後続の N o t c h 3 受容体の切断のための基質が作り出される。 γ -セクレターゼによる切断の後、N o t c h 3 の細胞内ドメイン (I C D) は、核へと移行し、そこで、C S L 転写因子 (哺乳動物では、C B F-1/R B P-J κ) および共活性化因子である m a s t e r m i n d (M A M L 1) と相互作用して、標的遺伝子の転写を活性化させる。

20

【0029】

本明細書で使用される「N o t c h 3」または「N o t c h 3 受容体」という用語は、哺乳動物ヒト N o t c h 3 タンパク質を指す。N o t c h 3 のドメイン構造を、図 1 に描示するが、これにより、リガンド結合性ドメイン (L B D)、L N R (L i n N o t c h R e p e a t) と N 末端ヘテロ二量体化ドメインおよび C 末端ヘテロ二量体化ドメイン (それぞれ、H D-N および H D-C) とを含む N R R (n e g a t i v e r e g u l a t o r y r e g i o n) のほか、アンキリンドメイン (A N K) および P E S T ドメインが示される。図 2 は、N o t c h 3 N R R の全体構造および対応するアミノ酸残基を示す: L N R-A は、アミノ酸残基 E 1 3 8 3 ~ G 1 4 2 2 を有し、L N R-A/B リンカーは、アミノ酸残基 A s p 1 4 2 3 ~ L e u 1 4 3 1 を有し、L N R-B は、アミノ酸残基 G l n 1 4 3 2 ~ A l a 1 4 6 0 を有し、L N R-B/C リンカーは、アミノ酸残基 G l y 1 4 6 1 ~ A s n 1 4 6 8 を有し、L N R-C は、アミノ酸残基 P r o 1 4 6 9 ~ S e r 1 5 0 2 を有し、L N R-H D リンカーは、アミノ酸残基 G l u 1 5 0 3 ~ A r g 1 5 1 0 を有し、H D-N は、アミノ酸残基 G l y 1 5 1 1 ~ A r g 1 5 7 1 を有し、H D-C は、アミノ酸残基 1 5 7 2 ~ S e r 1 6 4 0 を有する。

30

【0030】

ヒト N o t c h 3 を、下記の配列番号 1 として表す。

40

【化 1 - 1】

MGP GARGRRRRRRRPMSPPPPPPPVRALPLLLLLAGPGAAAPPCLDGSPCANGGRCTQ
 LPSREAAACLCPPGWVGERCQLEDPC HSGPCAGRGVCQSSVVAGTARFSCRCPRGFRG
 PDCSLPDPCLSSPCA HGARCSVGP DGRFLCSCPPGYQGRSCRSDVDECRVGEPCR HGG
 TCLNTPGSFRCQCPAGYTGPLCENPAVPCAPSPCRNGGTCRQSGDLTYDCACLPGFEG
 QNCEVNVD DCPGHRCLNGGTCVDGVNTYNCQCPPEWTGQFCTEDVDECQLQPNAC
 HNGGTCFNTLGGHSCVCVNGWTGESCSQNIDDCATAVCFHGATCHDRVASFYCACP
 MGKTGLLCHLDDACVSNPCHEDAICDTNPVNGRAICTCPPGFTGGACDQDVDECSIG
 ANPCEHLGRCVNTQGSFLCQCGRGYTGPRCETDVNECLSGPCR NQATCLDRIGQFTCI
 CMAGFTGTyceVDIDECQSSPCVNGGVCKDRVNGFSCTCPSGFSGSTCQLDVDECAS
 TPCRNGAKCVDQPDGYECRCAEGFEGTLCDRNVDDCSPDPCHHGRCVDGIAFSFSCAC
 APGYTGTRCESQVDECRSQPCR HGGKCLDLVDKYLRCRPSGTTGVNCEVNIDDCASN
 PCTFGVCRDGINRYDCVCQPGFTGPLCNVEINECASSPCGEGGSCVDGENGFRCLCPP
 GSLPPLCLPPSHPCAHEPCSHGICYDAPGGFRCVCEPGWSGPRCSQSLARDACESQPC
 RAGGTCSSDGMGFHCTCPPGVQGRQCELLSPCTPNPCEHGGRCESAPGQLPVCSCPQ
 GWQGPRCQQDVDECAGAPCGPHGICTNLAGSFSTCHGGYTGPSCDQDINDCDPNP
 CLNGGSCQDGVGSFSCSCLPGFAGPRCARDVDECLSNPCGPGTCTDHVASFTCTCPPG
 YGGFHCEQDL PDCSPSSCFNGGTCVDGVNSFSLCRPGYTGAHCQHEADPCLSRPCL
 HGGVCSAAHPGFRCTCLESFTGPQCQTLVDWCSRQPCQNGGRCVQTGAYCLCPPGW
 SGRLCDIRSLPCREAAAQIGVRLEQLCQAGGQCVD EDDSSHVCVCEGRTGSHCEQEV
 DPCLAQPCQHGGTCRGYMGGYMCECLPGYNGDNCEDDVDECASQPCQHGGSCIDL
 VARYLCSCPPGTGLVLCEINEDDCGPGPPLDSGPRCLHNGTCVDLVGGFRCTCPPGYT

10

20

【化 1 - 2】

GLRCEADINECRSGACHAAHTRDCLQDPGGGFRCLCHAGFSGPRCQTVLSPCESQPC
 QHGGQCRPSPGGGGLTFTCHCAQPFWGP RCERVARSRELQCPVGVP CQQT PRGPR
 CACPPGLSGPSCRSFPGSPPGASNASCAAAPCLHGGSCRPA PLAPFFRCACAQGTGP
 RCEAPAAAPEVSEEP RCPRAACQAKRGDQRC DRECNSPGCGWDGDCSLSVGD PWR
 QCEALQCWRLFNNSRCDPACSSPACLYDNFDCHAGGRERTCNPVYEKYCADHFADG
 RCDQGCNTEECGWDGLDCASEVPALLARGVLVLT VLLPPEELLRSSADFLQRLSAILR
 TSLRFRLDAHGQAMVFPYHRPSPGSEPRARRELAPEVIGSVVMLEIDNRLCLQSPEND
 HCFPDAQSAADYLGALSAVERLDFPYPLRDVRGEPEPPEPSVPLLPLLVAGAVLLL
 ILVLGVMVARRKREHSTLWFPEGFSLHKDVASGHKGRREPVGQDALGMKNMAKGE
 SLMGEVATDWMDETECEAKRLKVEEPMGAEEAVDCRQWTQHHLVAADIRVAPA
 MALTPPQGDADADGMDVNVRGPDGFTPLMLASFCGGALEPMPTEEDEADDT SASIIS
 DLICQGAQLGARTDRTGETALHLAARYARADA AKRLLDAGADTNAQDHSGRTPLHT
 AVTADAQGVFQILIRNRSTDLDARMADGSTALILAAARLAVEGMVEELIASHADVNAV
 DELGKSALHWAAA VNNVEATLALLKNGANKDMQDSKEETPLFLAAREGSYEA AKL
 LLDHFANREITDHLDRLPDVAQERLHQDIVRLDQPSGPRSPPGPHGLGPLLCPPGAF
 LPGLKAAQSGSKSRPPGKAGLGPQGPRGRGKKLTLACPGPLADSSVTLS PVDSLDS
 PRPFGGPPASPGGFLEGPYAAATATAVSLAQ LGPGRAGLGRQPPGGCVLSLGLLNP
 VAVPLDWARLPPPAPGPSFLLPLAPGPQLLNP GTPVSPQERPPPYLAVPGHGEEYPA
 AGAHSSPPKARFLRVPSEHPYLTPSPESPEHWASPPPSLSDWSESTPSPATATGAMAT
 TTGALPAQLPLSVPSSLAQAQTQLGPQPEVTPKRQVLA (配列番号: 1)

30

40

50

【 0 0 3 1 】

カニクイザル N o t c h 3 を、下記の配列番号 2 として表す。

【 化 2 - 1 】

MGPGARGRRRRRRRPMSPPPPPVRALPLLLLLAGPGA AVPPCLDGSPCANGGRCTQLP
SREAACLCPGWVGERCQLEDPC HSGPCAGRGVCQSSVVAGTARFSCRCPRGFRGPD
CSLPDPCLSPPCAHSARCSVGP DGRFLCSCPPGYQGRSCRSDVDECRVGEPCRHHGGTC
LNTPGSFRCQCPAGYTGPLCENPAVPCAPSPCRNGGTCRQSGDLTYDCACLPGFEGQ
NCEVNVD DCPGHRCLNGGTCVDGVNTYNCQCPPEWTGQFCTEDVDECQLQPNACH
NGGTCFNTLG GHSCVCVNGWTGESCSQNIDDCATAVCFHGATCHDRVASFYCACPM
GKTGLLCHLDDACVSNPCHEDAICDTNPVNGRAICTCPPGFTGGACDQDVDECSIGA
NPCEHLGRCVNTQGSFLCQCGRGYTGPRCETDVNECLSGPCR NQATCLDRIGQFTCIC
MAGFTGTyceVDIDECQSSPCVNGGICKDRVNGFSCTCPSGFSGSTCQLDVDECASTP
CRNGAKCVDQPDGYECRCAEGFEGMLCERNVDDCSPDPCHHGRCVDG IASFSCACA
PGYTGTRCESQVDECRSQPCRHHGKCLDLVDKYLRCPSGTTGVNCEVNIDDCASNP
CSFGVCRDGINRYDCVCQPGFTGPLCNVEINECASSPCGEGGSCVDGENGFRLCPPG

【化 2 - 2】

SLPPLCLPPSHPCAHEPCSHGICYDAPGGFRCVCEPGWSGPRCSQSLARDACESQPCR
 AGGTCCSSDGMGFHCTCPPGVQGRQCELLSPCTPNPCEHGGRCESAPGQLPVCSCPQG
 WQGPCRQQDVDECAGPAPCGPHGICTNLGSFSCTCHGGYTGPSCDQDINDCDPNPC
 LGGSCQDGVGSFSCSCLLGAFGPCARDVDECLSNPCGPGTCTDHVASFTCTCPPG
 YGGFHCEQDLDCSPSSCFNGGTCTVDGVNSFSLCRPGYTGAHCQHEADPCLSRPCL
 HGGVCSAAHPGFRCTCPQSFTGPQCQTLVDWCSRQPCQNGGRCVQTGAYCLCPPGW
 SGRLCDIRSLPCREAAAQIGVRLEQLCQAGGQCVDDEDSSHYCVCPEGRTGSHCEQEV
 DPCLAQPCQHGGTCRGMGGYMCECLPGYNGENCEDDVEDECASQPCQHGGSCIDL
 VARYLCSPPGTLGVLCEINEDDCGPGPPLDSGPRCLHNGTCVDLVGGFRCTCPPGYT
 GLRCEADINECRSGACHAAHTRDCLQDPGGGFRCLCHAGFSGPCQTVLSPCESQPC
 QHGGQCRPSGPGGGGLTFTCHCAQPFWGPCRERVARSCRELQCPVGVPCQQTTPRGPR
 CACPPGLSGPSCRSFSGSPPGASNASCAAAPCLHGGSCRPAAPLAPFFRCACAQGTGP
 RCEAPAAAPEVSEEPRCPRACQAKRGDQRCDRECNSPGCGWDGGDCSLSVGDPWR
 QCEALQCWRLFNNRCDPACSSPACLYDNFDCHAGGRERTCNPVYEKYCADHFADG
 RCDQGCNTEECGWDGLDCASEVPALLARGVLVLTVLLPPEELLRSSADFLQRLSAILR
 TSLRFRLDAHGQAMVFPYHRPSPGSEPRARRELAPEVIGSVVMLEIDNRLCLQSPEND
 HCFPDAQSAADYLGALSAVERLDFPYPLRDVVRGEPEPEPSVPLPLLVAGAVLLLV
 ILVLGVMVARRKREHSTLWFPEGFSLHKDVAAGHKGRREPVGQDALGMKNMAKGE
 SLMGEVATDWMDETECPKRLKVEELGMGAEEAVDCRQWTQHHLVAADIRVAPA
 MALTPPQGDADADGMDVNVVRGPDGFTPLMLASFCCGALEPMPTEEDEADDTASIS
 DLICQGAQLGARTDRTGETALHLAARYARADAARKRLLDAGADTNAQDHSGRTPH
 AVTADAQGVFQILIRNRSTDLDARMADGSTALILAAARLAVEGMVEELIASHADVNAV
 DELGKSALHWAAAANNVEATLALLKNGANKDMQDSKEETPLFLAAREGSYEAACL
 LLDHFANREITDHLDRLPDVAQERLHQDIVRLLDQPSGPRSPPGTHGLGPLLCPPGA
 FLPLGLKVTQSGSKSRPPGKAGLGPQGPRGRGKKLTACPGPLADSSVTLSPVDSL
 SPRPFGPPASPGGFPLEGPYAAATATAVSLAQLGGPGRAGLGRQPPGGCVLSLGLL
 PVAVPLDWARLPPAPPGPSFLLPLAPGPQLLNPGTPVSPQERPPPYLAVPGHGEEYPA
 AGAHSSPPKARFLRVPSEHPYLTPSPESPEHWASPPPSLSDWSESTPSPATATGAMAT
 ATGALPAQPLPLSVPSLAQAQTQLGPQPEVTPKRQVLA (配列番号: 2)

10

20

30

【0032】

本明細書で使用される「N o t c h リガンド」という用語は、N o t c h 3 受容体に結合し、これを活性化させるポリペプチドを指す。N o t c h 3 リガンドの例は、D e l t a 様リガンド（例えば、D L L 1、D L L 3、および D L L 4）および J a g g e d リガンド（例えば、J a g g e d 1 および J a g g e d 2）を含むがこれらに限定されない。

40

【0033】

N o t c h 3 の文脈で使用される「安定化」または「安定化させた」という用語は、N o t c h 3 受容体の自己阻害コンフォメーションまたは自己阻害状態を直接維持する（これをロックする、これをつなぎとめる、これを保持する、これに優先的に結合する、これを選好する）抗体またはその断片を指す。実施例で記載されるアッセイ、例えば、本明細書で開示される I C D 3 抗体を使用する i n v i t r o スクリーニングを使用して、安定化させた N o t c h 3 受容体のシグナル伝達を測定することができる。

【0034】

本明細書で使用される「リガンド依存性シグナル伝達」という用語は、リガンド（例え

50

ば、D e l t aリガンドまたはJ a g g e dリガンド)を介するN o t c h 3の活性化を指す。リガンドの結合は、N o t c h 3のタンパク質分解性切断イベントを結果としてもたらし、これにより、N o t c h 3シグナル伝達をもたらされる。抗体またはその断片は、実施例で記載されるアッセイを使用して測定される通り、抗体またはその断片へと曝露された細胞のN o t c h 3シグナル伝達を、非処置(対照)細胞と比べて阻害しうる。N o t c h 3を発現させる細胞は、自然発生の細胞系の場合もあり、N o t c h 3タンパク質をコードする核酸を、宿主細胞へと導入することを介して、組換えにより作製される場合もある。

【0035】

本明細書で使用される「リガンド非依存性シグナル伝達」という用語は、細胞内のN o t c h 3活性(例えば、N R Rドメイン内のS 2で切断され、その後、リガンドの結合に対する要請の非存在下において、S 3部位で切断されるN o t c h 3)を指す。例えば、リガンド非依存性N o t c h 3の活性化は、N o t c h 3の過剰発現/増幅またはN o t c h 3内の突然変異の活性化の結果でありうる。抗体またはその断片は、実施例で記載されるアッセイを使用して測定される通り、抗体またはその断片へと曝露された細胞のN o t c h 3シグナル伝達を、突然変異させていない(対照)細胞と比べて阻害しうる。N o t c h 3を過剰発現させる細胞は、自然発生の細胞系(例えば、H C C 1 1 4 3、T A L L - 1)の場合もあり、N o t c h 3タンパク質をコードする核酸を、宿主細胞へと導入することを介して、組換えにより作製される場合もある。別の例では、細胞は、リガンド依存性N o t c h 3シグナル伝達およびリガンド非依存性N o t c h 3シグナル伝達の両方を示しうる。

【0036】

本明細書で使用される「～を遮断する」という用語は、相互作用または過程を停止させるかまたは防止すること、例えば、リガンド依存性シグナル伝達またはリガンド非依存性シグナル伝達を停止させることを指す。

【0037】

本明細書で使用される「～を認識する」という用語は、そのコンフォメーションエピトープを見出し、これと相互作用する(例えば、これと結合する)、抗体またはその断片を指す。

【0038】

本明細書で使用される「抗体」という用語は、N o t c h 3エピトープと相互作用し(例えば、結合、立体障害、空間的分布の安定化により)、シグナル伝達を阻害する、全抗体を指す。自然発生の「抗体」とは、ジスルフィド結合により相互接続された、少なくとも2つの重(H)鎖および2つの軽(L)鎖を含む糖タンパク質である。各重鎖は、重鎖可変領域(本明細書では、V Hと略記される)と、重鎖定常領域とを含む。重鎖定常領域は、3つのドメインである、C H 1、C H 2、およびC H 3を含む。各軽鎖は、軽鎖可変領域(本明細書では、V Lと略記される)と、軽鎖定常領域とを含む。軽鎖定常領域は、1つのドメインであるC Lを含む。V H領域およびV L領域は、フレームワーク領域(F R : framework region)と称する、より保存的な領域を散在させた、相補性決定領域(C D R : complementarity determining region)と称する、超可変領域へとさらに細分することができる。各V HおよびV Lは、アミノ末端からカルボキシ末端へと、以下の順序: F R 1、C D R 1、F R 2、C D R 2、F R 3、C D R 3、F R 4で配置された、3つのC D Rおよび4つのF Rからなる。重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合性ドメインを含有する。抗体の定常領域は、免疫グロブリンの、免疫系の多様な細胞(例えば、エフェクター細胞)および古典的補体系の第1の成分(C 1 q)を含む、宿主組織または因子への結合を媒介しうる。「抗体」という用語は、例えば、モノクローナル抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、ラクダ化抗体、キメラ抗体、単鎖F v (s c F v : single-chain Fv)、ジスルフィド連結されたF v (s d F v)、F a b断片、F (a b ')断片、および抗イディオタイプ(抗I d)抗体(例えば、本開示の抗体に対する抗I d抗体を含む)、ならびに上記のうちのいずれかのエピトープ結合性断片を含む。抗体は、任意の

アイソタイプ（例えば、I g G、I g E、I g M、I g D、I g A、およびI g Y）、クラス（例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A 1、およびI g A 2）、またはサブクラスの抗体でありうる。

【0039】

軽鎖および重鎖のいずれも、構造的および機能的な相同性の領域へと分けられる。「定常」という用語および「可変」という用語は、機能的に使用される。この点では、軽（V L）鎖部分および重（V H）鎖部分のいずれの可変ドメインも、抗原認識および抗原特異性を決定することが察知されるであろう。逆に、軽鎖の定常ドメイン（C L）および重鎖の定常ドメイン（C H 1、C H 2、またはC H 3）は、分泌、経胎盤移動性、F c 受容体の結合、補体の結合など、重要な生物学的特性を付与する。慣例により、定常領域ドメインの番号付けは、それらが抗体の抗原結合性部位またはアミノ末端から遠位となるにつれて、大きくなる。N末端は、可変領域であり、C末端には、定常領域がある。C H 3 ドメインおよびC L ドメインは実際、重鎖および軽鎖のカルボキシ末端のそれぞれを含む。

【0040】

本明細書で使用される「抗体断片」という語句は、N o t c h 3 エピトープと特異的に相互作用し（例えば、結合、立体障害、空間的分布の安定化により）、シグナル伝達を阻害する能力を保持する、抗体の1または複数の部分を指す。結合性断片の例は、V L ドメイン、V H ドメイン、C L ドメイン、およびC H 1 ドメインからなる一価断片である、F a b 断片；ヒンジ領域におけるジスルフィド架橋により連結された2つのF a b 断片を含む二価断片である、F（a b）₂断片；V H およびC H 1 ドメインからなる、F d 断片；抗体の単一のアームのV L およびV H ドメインからなる、F v 断片；V H ドメインからなる、d A b 断片（Ward et al., (1989) Nature 341:544-546）；ならびに単離相補性決定領域（C D R）を含むがこれらに限定されない。

【0041】

さらに、F v 断片の2つのドメインである、V L とV H とは、個別の遺伝子によりコードされるが、それらが、単一のタンパク質鎖（単鎖F v（s c F v）として公知である；例えば、Bird et al., (1988) Science 242:423-426；およびHuston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:5879-5883を参照されたい）であって、その中でV L 領域とV H 領域とが対合して、一価分子を形成する、単一のタンパク質鎖として作製されることを可能とする、合成リンカーを介する組換え法を使用して、V L とV H とを接合することができる。このような単鎖抗体もまた、「抗体断片」という用語の中に包摂されることを意図する。これらの抗体断片は、当業者に公知の従来の技法を使用して得られ、無傷抗体と同じ様式で、有用性についてスクリーニングされる。

【0042】

抗体断片はまた、単一ドメイン抗体、マキシボディー、ミニボディー、イントラボディー、ダイアボディー、トリアボディー、テトラボディー、v-N A R、およびb i s-s c F v（例えば、Hollinger and Hudson, (2005) Nature Biotechnology 23:1126-1136を参照されたい）へと組み込むこともできる。抗体断片は、I I I 型フィブロネクチン（F n 3 : Fibronectin type III）（フィブロネクチンポリペプチドによるモノボディーについて記載する、米国特許第6,703,199号を参照されたい）などのポリペプチドに基づく足場へとグラフトすることもできる。

【0043】

抗体断片は、相補的な軽鎖ポリペプチドと併せて、抗原結合性領域の対を形成する、タンデムF v セグメント（V H -C H 1 -V H -C H 1）の対を含む単鎖分子へと組み込むことができる（Zapata et al., (1995) Protein Eng. 8:1057-1062；および米国特許第5,641,870号）。

【0044】

本明細書で使用される「モノクローナル抗体」または「モノクローナル抗体組成物」という語句は、実質的に同一なアミノ酸配列を有するか、または同じ遺伝子供給源から導出される、抗体、抗体断片、二特異性抗体などを含むポリペプチドを指す。この用語はまた

、単一の分子組成を有する抗体分子の調製物も含む。モノクローナル抗体組成物は、特定のエピトープに対する単一の結合特異性およびアフィニティーを表示する。

【0045】

本明細書で使用される「ヒト抗体」という語句は、フレームワーク領域およびCDR領域のいずれもが、ヒト由来の配列から導出された、可変領域を有する抗体を含む。さらに、抗体が、定常領域を含有する場合はまた、定常領域も、このようなヒト配列、例えば、ヒト生殖細胞系列配列、もしくはヒト生殖細胞系列配列の突然変異させた変化形、または例えば、Knappik et al., (2000) J Mol Biol 296:57-86において記載されている通り、ヒトフレームワーク配列の解析から導出される、コンセンサスのフレームワーク配列を含有する抗体から導出される。免疫グロブリン可変ドメイン、例えば、CDRの構造および位置は、周知の番号付けスキーム、例えば、Kabatによる番号付けスキーム、Chothiaによる番号付けスキーム、またはKabatとChothiaとの組合せ（例えば、Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services (1991), eds. Kabat et al.; Lazikani et al., (1997) J. Mol. Biol. 273:927-948; Kabat et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th edit., NIH Publication no. 91-3242 U.S. Department of Health and Human Services; Chothia et al., (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia et al., (1989) Nature 342:877-883; およびAl-Lazikani et al., (1997) J. Mol. Biol. 273:927-948を参照されたい）を使用して、定義することができる。

10

【0046】

本明細書で開示されるヒト抗体は、ヒト配列によりコードされないアミノ酸残基（例えば、in vitroにおけるランダム突然変異誘発もしくは部位特異的突然変異誘発により導入される突然変異、またはin vivoにおける体細胞突然変異により導入される突然変異、あるいは安定性または製造を促進する保存的置換）を含みうる。

20

【0047】

本明細書で使用される「ヒトモノクローナル抗体」という語句は、フレームワーク領域およびCDR領域のいずれもが、ヒト配列から導出された可変領域を有する、単一の結合特異性を表示する抗体を指す。一実施形態では、ヒトモノクローナル抗体は、不死化細胞へと融合させた、ヒト重鎖トランス遺伝子および軽鎖トランス遺伝子を含むゲノムを有する、トランスジェニックの非ヒト動物、例えば、トランスジェニックマウスから得られたB細胞を含む、ハイブリドーマにより作製される。

30

【0048】

本明細書で使用される「組換えヒト抗体」という語句は、組換え手段により調製されたか、発現させたか、創出されたか、または単離された全てのヒト抗体であって、ヒト免疫グロブリン遺伝子に対してトランスジェニックであるかもしくはトランスクロモソーマルである動物（例えば、マウス）またはこれから調製されたハイブリドーマから単離された抗体、ヒト抗体を発現させるように形質転換された宿主細胞、例えば、トランスフェクターマから単離された抗体、組換えのコンビナトリアルヒト抗体ライブラリーから単離された抗体などのヒト抗体と、ヒト免疫グロブリン遺伝子、ヒト免疫グロブリン配列の全部または一部の、他のDNA配列へのスプライシングを伴う他の任意の手段により調製されたか、発現させたか、創出されたか、または単離された抗体とを含む。このような組換えヒト抗体は、フレームワーク領域およびCDR領域が、ヒト生殖細胞系列の免疫グロブリン配列から導出された可変領域を有する。しかし、ある種の実施形態では、このような組換えヒト抗体は、in vitroにおける突然変異誘発（または、ヒトIg配列に対してトランスジェニックである動物を使用する場合は、in vivoにおける体細胞突然変異誘発）にかけることができるので、組換え抗体のV_H領域およびV_L領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖細胞系列のV_H配列およびV_L配列から導出され、これらと類縁ではあるが、in vivoのヒト抗体の生殖細胞系列レパートリー内に天然では存在しえない配列である。

40

【0049】

50

2つの実体の間の特異的結合とは、平衡定数 (K_A) (k_{on}/k_{off}) を、少なくとも $10^2 M^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^2 M^{-1}$ 、少なくとも $10^3 M^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^3 M^{-1}$ 、少なくとも $10^4 M^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^4 M^{-1}$ 、少なくとも $10^5 M^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^5 M^{-1}$ 、少なくとも $10^6 M^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^6 M^{-1}$ 、少なくとも $10^7 M^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^7 M^{-1}$ 、少なくとも $10^8 M^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^8 M^{-1}$ 、少なくとも $10^9 M^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^9 M^{-1}$ 、少なくとも $10^{10} M^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{10} M^{-1}$ 、少なくとも $10^{11} M^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{11} M^{-1}$ 、少なくとも $10^{12} M^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{12} M^{-1}$ 、少なくとも $10^{13} M^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{13} M^{-1}$ 、少なくとも $10^{14} M^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{14} M^{-1}$ 、少なくとも $10^{15} M^{-1}$ 、または少なくとも $5 \times 10^{15} M^{-1}$ とする結合を意味する。

【0050】

抗体（例えば、Notch3 結合性抗体）に「特異的に（または選択的に）結合する」という語句は、タンパク質および他の生物学的物質の異種集団内の、コグネイト抗原（例えば、ヒト Notch3）の存在を決定する、結合反応を指す。上記で言及した平衡定数 (K_A) に加え、本明細書で開示される Notch3 結合性抗体はまた、解離速度定数 (K_D) (k_{off}/k_{on}) を、 $5 \times 10^{-2} M$ 未満、 $10^{-2} M$ 未満、 $5 \times 10^{-3} M$ 未満、 $10^{-3} M$ 未満、 $5 \times 10^{-4} M$ 未満、 $10^{-4} M$ 未満、 $5 \times 10^{-5} M$ 未満、 $10^{-5} M$ 未満、 $5 \times 10^{-6} M$ 未満、 $10^{-6} M$ 未満、 $5 \times 10^{-7} M$ 未満、 $10^{-7} M$ 未満、 $5 \times 10^{-8} M$ 未満、 $10^{-8} M$ 未満、 $5 \times 10^{-9} M$ 未満、 $10^{-9} M$ 未満、 $5 \times 10^{-10} M$ 未満、 $10^{-10} M$ 未満、 $5 \times 10^{-11} M$ 未満、 $10^{-11} M$ 未満、 $5 \times 10^{-12} M$ 未満、 $10^{-12} M$ 未満、 $5 \times 10^{-13} M$ 未満、 $10^{-13} M$ 未満、 $5 \times 10^{-14} M$ 未満、 $10^{-14} M$ 未満、 $5 \times 10^{-15} M$ 未満、もしくは $10^{-15} M$ 未満とするか、またはこれを下回り、Notch3 に、非特異的抗原（例えば、HSA）への結合についてのそのアフィニティーの、少なくとも 2 倍のアフィニティーで結合することも典型的である。

【0051】

一実施形態では、抗体またはその断片は、本明細書で記載されるか、または当業者に公知の方法（例えば、Biacore アッセイ、ELISA、FACS、SET）（Biacore International AB、Uppsala、Sweden）を使用して評価される通り、解離定数 (K_d) を、 $3000 pM$ 未満、 $2500 pM$ 未満、 $2000 pM$ 未満、 $1500 pM$ 未満、 $1000 pM$ 未満、 $750 pM$ 未満、 $500 pM$ 未満、 $250 pM$ 未満、 $200 pM$ 未満、 $150 pM$ 未満、 $100 pM$ 未満、 $75 pM$ 未満、 $10 pM$ 未満、 $1 pM$ 未満とする。本明細書で使用される「 K_{assoc} 」または「 K_a 」という用語が、特定の抗体-抗原間相互作用の会合速度を指すのに対し、本明細書で使

用される「 K_{dis} 」または「 K_d 」という用語は、特定の抗体-抗原間相互作用の解離速度を指す。本明細書で使

【0052】

用される「アフィニティー」という用語は、単一の抗原性部位における、抗体と抗原との間の相互作用の強度を指す。各抗原性部位内では、抗体「アーム」の変領域は、弱い非共有結合的な力を介して、多数の部位において、抗原と相互作用するので、相互作用が多いほど、アフィニティーも大きい。

【0053】

本明細書で使

作用する部分の構造的配置により統御されている。最終的に、これらの因子は、抗体の特異性、すなわち、特定の抗体が、正確な抗原エピトープに結合する可能性を規定する。

【0054】

本明細書で使用される「価数」という用語は、ポリペプチド内の、潜在的な標的結合性部位の数を指す。各標的結合性部位は、標的分子上の1つの標的分子または特異的部位（すなわち、エピトープ）に特異的に結合する。ポリペプチドが、複数の標的結合性部位を含む場合、各標的結合性部位は、同じ分子に特異的に結合する場合もあり、異なる分子に特異的に結合する場合もある（例えば、異なる分子、例えば、異なる抗原に結合する場合もあり、同じ分子上の異なるエピトープに結合する場合もある）。

【0055】

本明細書で使用される「アンタゴニスト抗体」という語句は、本明細書で記載されるアッセイ、例えば、ICD3アッセイにより決定される通り、N o t c h 3と結合し、N o t c h 3シグナル伝達を阻害する抗体を指す。したがって、本明細書で記載されるアッセイに従い決定される通り、N o t c h 3の機能的特性（例えば、生化学的特性、免疫化学的特性、細胞内特性、生理学的特性、または他の生物学的活性など）のうちの1または複数を「阻害する」抗体は、特定の活性の、抗体の非存在下（例えば、または非関与的な特異性を有する対照抗体が存在する場合）に認められる活性と比べた、統計学的に有意な減殺にすることが理解されるであろう。N o t c h 3活性を阻害する抗体は、測定されたパラメータの、このような統計学的に有意な減殺を、少なくとも10%、少なくとも50%、80%、または90%でもたらし、ある種の実施形態では、本明細書で開示される抗体は、N o t c h 3の機能的活性のうちの95%、98%、または99%超を阻害しうる。

【0056】

「単離抗体」という語句は、異なる抗原特異性を有する、他の抗体を実質的に含まない抗体を指す（例えば、N o t c h 3に特異的に結合する単離抗体は、N o t c h 3以外の抗原に特異的に結合する抗体を実質的に含まない）。しかし、N o t c h 3に特異的に結合する単離抗体は、他の抗原との交差反応性を有する場合がある。さらに、単離抗体は、他の細胞物質および／または化学物質を実質的に含まない場合がある。

【0057】

「エピトープ」という用語は、免疫グロブリンへの特異的結合または分子との他の形での相互作用が可能な、任意のタンパク質決定基を含む。エピトープ決定基は一般に、アミノ酸または炭水化物または糖側鎖など、化学的に活性の表面分子群からなり、特異的な三次元構造特徴のほか、特異的な電荷特徴も有しうる。エピトープは、「直鎖状」エピトープの場合もあり、「コンフォメーションナル」エピトープの場合もある。

【0058】

「直鎖状エピトープ」という用語は、タンパク質と相互作用分子（抗体またはその断片など）との間の相互作用点であって、タンパク質の一次アミノ酸配列（連続）に沿って直鎖状に生じる、相互作用点の全てを伴うエピトープを指す。抗原上の所望のエピトープを決定したら、例えば、本明細書で記載される技法を使用して、そのエピトープに対する抗体を作り出すことが可能である。代替的に、発見過程において、抗体またはその断片の作製および特徴付けにより、所望のエピトープについての情報が解明される場合もある。次いで、この情報から、同じエピトープへの結合について、抗体を競合的にスクリーニングすることが可能である。これを達成する手法は、交差競合研究を実行して、互いと競合的に結合する抗体、例えば、抗原への結合について競合する抗体を見出すことである。それらの交差競合に基づき、抗体を「ビニングする」ためのハイスループット工程は、国際特許出願第W O 2 0 0 3 / 4 8 7 3号において記載されている。

【0059】

「コンフォメーションナルエピトープ」という用語は、非連続アミノ酸残基が、三次元形状で一体となる、エピトープを指す。コンフォメーションナルエピトープでは、相互作用点は、互いから少なくとも1つのアミノ酸残基隔てられたアミノ酸残基（非連続）にわたり

生じる、すなわち、接触点は、LNR領域、HDのほか、リンカー領域など、NRRの、顕著に異なる個別の領域上で生じる。例示だけを目的として述べると、コンフォメーションナルエピトープはまた、NRRの個別の顕著に異なる領域上の連続的接触、例えば、LNR領域内の少なくとも2つのアミノ酸、HD領域内の少なくとも2つのアミノ酸、およびリンカー領域（例えば、LNR-A/Bリンカー、LNR-B/Cリンカー、LNR-HDリンカー）内の少なくとも1つのアミノ酸残基を伴う連続的接触も含みうる。一実施形態では、コンフォメーションナルエピトープは、本明細書の実施例で記載されるコンフォメーションナルエピトープである。一実施形態では、コンフォメーションナルエピトープは、LNR領域（LNR-A、LNR-B、LNR-C）内、およびHD（例えば、 $\alpha 3$ ヘリックス）内のアミノ酸残基の間の相互作用の非連続点を含む。一実施形態では、コンフォメーションナルエピトープは、LNR領域（LNR-A、LNR-B、LNR-C）内、およびHD内、およびLNR領域（例えば、 $\alpha 3$ ヘリックス）とHDとの間の少なくとも1つのリンカー（例えば、LNR-HDリンカー）内のアミノ酸残基の間の相互作用の非連続点を含む。一実施形態では、コンフォメーションナルエピトープは、LNR領域（LNR-A、LNR-B、LNR-C）内、およびHD（例えば、 $\alpha 3$ ヘリックス）内、およびHD内の少なくとも1つのリンカー（例えば、 $\beta 4-\alpha 3$ ループ）内のアミノ酸残基の間の相互作用の非連続点を含む。一実施形態では、コンフォメーションナルエピトープは、LNR領域（LNR-A、LNR-B、LNR-C）内、およびHD（例えば、 $\alpha 2$ ヘリックス）内、およびHD内の少なくとも1つのリンカー（例えば、 $\alpha 3-\beta 5$ ループ）内のアミノ酸残基の間の相互作用の非連続点を含む。一実施形態では、コンフォメーションナルエピトープは、N o t c h 3のアミノ酸残基：配列番号1の1427～1429（LNR-A/Bリンカーの）、1442、1444～1445、1447～1450、1453、1458（LNR-Bの）、1461～1462、1464（LNR-B/Cリンカーの）、1507～1508、1510（LNR-HDリンカーの）、1592、1594～1599、1602（HD $\beta 4-\alpha 3$ ループの）、および1606（HD $\alpha 3$ ヘリックスの）、またはこれらのサブセットにより規定される。一実施形態では、コンフォメーションナルエピトープは、N o t c h 3のアミノ酸残基：配列番号1の1440（LNR-Bの）、1463、1465～1468（LNR-B/Cリンカーの）、1469～1472、1474、1486～1487（LNR-Cの）、1534（HD $\alpha 2$ ヘリックスの）、ならびに1618、1619、および1621（ $\alpha 3-\beta 5$ ループの）、またはこれらのサブセットにより規定される。一実施形態では、コンフォメーションナルエピトープは、N o t c h 3のアミノ酸残基：1489～1498（LNR-C）、1500～1506（LNR-HDリンカー）、1538～1568（HD）、および1571～1591（HD）により規定される。当業者により察知される通り、分子の形状を創出する残基または側鎖により占有される空間は、エピトープがどのようなものであるのかを決定する一助となる。

【0060】

一般に、特定の標的抗原に特異的な抗体は、タンパク質および／または高分子の複合混合物中の、標的抗原上のエピトープを優先的に認識する。

【0061】

エピトープを含む、所与のポリペプチドの領域は、当技術分野で周知の、任意の数のエピトープマッピング法を使用して同定することができる。例えば、Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Human a Press, Totowa, New Jerseyを参照されたい。例えば、直鎖状エピトープは、例えば、多数のペプチドであって、タンパク質分子の部分に対応するペプチドを、固体支持体上で共時的に合成し、ペプチドを支持体へとやはり接合させながら、ペプチドを抗体と反応させることにより決定することができる。このような技法は、当技術分野で公知であり、例えば、米国特許第4,708,871号；Geysen et al., (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998-4002；Geysen et al., (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:78-182；Geysen et al., (1986) Mol. Immunol. 23:709-715において記載されている。同様に、コ

ンフォメーションナルエピトープは、例えば、水素／重水素交換、X線結晶構造解析、および二次元核磁気共鳴を介するなど、アミノ酸の空間的コンフォメーションを決定することにより、たやすく同定される。例えば、Epitope Mapping Protocols, supraを参照されたい。タンパク質の抗原性領域はまた、例えば、Oxford Molecular Groupから市販されている、Omiga version 1.0ソフトウェアプログラムを使用して計算された抗原性疎水性プロットなど、標準的な抗原性疎水性プロットを使用して同定することもできる。このコンピュータプログラムでは、抗原性プロファイル決定するために、ホップ／ウッズ法 (Hopp et al., (1981) Proc. Natl. Acad. Sci USA 78:3824-3828) を援用し、疎水性プロットのために、Kyte-Doolittle法 (Kyte et al., (1982) J.Mol. Biol. 157:105-132) を援用する。

10

【0062】

本明細書で使用される「パラトープ」という用語は、エピトープへの結合を決定する、結合性領域の一般的構造を指す。この構造は、結合性領域はエピトープに結合しうるのかどうか、および結合性領域はどのような様式でエピトープに結合しうるのかに影響を及ぼす。「パラトープ」という用語は、抗体またはその断片の抗原性決定基への結合の一因となる、抗体またはその断片の抗原性部位を指す場合がある。パラトープはまた、抗体のイディオトープ、およびエピトープに結合する相補性決定領域 (CDR) も指す。

【0063】

一実施形態では、コンフォメーションナルエピトープは、Notch3のアミノ酸残基：配列番号1の1427～1429 (LNR-A/Bリンカーの)、1442、1444～1445、1447～1450、1453、1458 (LNR-Bの)、1461～1462、1464 (LNR-B/Cリンカーの)、1507～1508、1510 (LNR-HDリンカーの)、1592、1594～1599、1602 (HDβ4-α3ループの)、および1606 (HDα3ヘリックスの)、またはこれらのサブセットにより規定される。一実施形態では、パラトープとは、CDR配列を含む抗体の領域である。一実施形態では、パラトープは、表2に列挙された配列を含む。一実施形態では、パラトープは、Notch3残基：Cys1442、Pro1444、Ala1445、Ser1447、Ser1448、Pro1449、Tyr1453、Cys1458、Gly1461、Gly1462、Gly1464、Leu1592、Ser1594、Pro1595、Glu1596、Asn1597、Asp1598、およびHis1599と結合する、少なくとも1つのアミノ酸残基を含む。一実施形態では、パラトープは、Notch3残基：Gln1427、Cys1428、Glu1429、Pro1444、Ser1445、Ser1447、Ser1448、Pro1449、Tyr1453、Leu1507、Leu1508、Arg1510、Leu1592、Asp1598、Pro1602、およびSer1606と結合する、少なくとも1つのアミノ酸残基を含む。

20

30

【0064】

一実施形態では、コンフォメーションナルエピトープは、Notch3のアミノ酸残基：配列番号1の1440 (LNR-Bの)、1463、1465～1468 (LNR-B/Cリンカーの)、1469～1472、1474、1486～1487 (LNR-Cの)、1534 (HDα2ヘリックスの)、ならびに1618、1619、および1621 (α3-β5ループの)、またはこれらのサブセットにより規定される。一実施形態では、パラトープは、Notch3残基：Arg1463、Thr1466、Asn1468、Pro1469、Val1470、Tyr1471、Tyr1474、Gln1486、およびGly1487と結合する、少なくとも1つのアミノ酸残基を含む。一実施形態では、パラトープは、Notch3残基：Ser1440、Arg1465、Thr1466、Asn1468、Pro1469、Val1470、Glu1472、Arg1434、Glu1618、Arg1619、およびAsp1621と結合する、少なくとも1つのアミノ酸残基を含む。

40

【0065】

当業者により察知される通り、任意の抗体またはその変異体のパラトープは、本出願に

50

より示される様式で決定することができる。

【0066】

本明細書では、「交差競合する」という用語および「交差競合すること」という用語を、標準的な競合的結合アッセイにおいて、他の抗体または断片の、N o t c h 3 への結合に干渉する、抗体またはその断片の能力を意味するように互換的に使用する。一実施形態では、「交差競合する」という用語は、他の抗体またはその断片の、N o t c h 3 の少なくとも1つのコンフォメーションエピトープへの結合に干渉する、抗体またはその断片を指す。

【0067】

抗体または他の結合剤が、別の抗体またはその断片の、N o t c h 3 への結合に干渉する能力または干渉することが可能な程度、したがって、本発明に従い、交差競合すると言いうのかどうかは、標準的な競合的結合アッセイを使用して決定することができる。1つの適切なアッセイは、表面プラズモン共鳴技術を使用して、相互作用の程度を測定する、B i a c o r e 技術の使用を伴う（例えば、B I A c o r e 3000測定器（B i a c o r e、U p p s a l a、S w e d e n）の使用を介する）。交差競合を測定するための別のアッセイでは、E L I S A ベースの手法を使用する。

【0068】

本明細書では、「ポリペプチド」という用語および「タンパク質」という用語を、アミノ酸残基のポリマーを指すように互換的に使用する。用語は、1または複数のアミノ酸残基が、対応する自然発生のアミノ酸の人工的な化学的模倣体であるアミノ酸ポリマーのほか、自然発生のアミノ酸ポリマーおよび非自然発生のアミノ酸ポリマーにも適用される。別段に指し示されない限り、特定のポリペプチド配列はまた暗黙に、保存的に修飾されたその変異体も包摂する。

【0069】

「保存的に修飾された変異体」という語句は、アミノ酸配列および核酸配列のいずれにも適用される。特定の核酸配列に関して、保存的に修飾された変異体とは、同一であるかもしくは本質的に同一なアミノ酸配列をコードする核酸、または、核酸がアミノ酸配列をコードするのでない場合は、本質的に同一な配列を指す。遺伝子コードの縮重性のために、大多数の機能的に同一な核酸は、任意の所与のタンパク質をコードする。例えば、コドンであるG C A、G C C、G C G、およびG C Uが全て、アミノ酸であるアラニンをコードする。したがって、コドンによりアラニンが指定されるあらゆる位置では、コードされるポリペプチドを変化させずに、コドンを、記載される対応するコドンのうちのいずれかへと変化させることができる。このような核酸の変異は、保存的に修飾された変異の一種である「サイレント変異」である。ポリペプチドをコードする、本明細書のあらゆる核酸配列はまた、核酸のあらゆる可能なサイレント変異についても記載する。当業者は、核酸内の各コドン（通常、メチオニンに対応する唯一のコドンであるA U G、および、通常、トリプトファンに対応する唯一のコドンであるT G Gを除く）を修飾して、機能的に同一な分子をもたらしうることを認識するであろう。したがって、記載される各配列内では、ポリペプチドをコードする核酸の各サイレント変異が含意されている。

【0070】

ポリペプチド配列では、「保存的に修飾された変異体」は、化学的に類似するアミノ酸によるアミノ酸の置換を結果としてもたらず、ポリペプチド配列への個々の置換、欠失、または付加を含む。当技術分野では、機能的に類似するアミノ酸を提示する保存的置換表が周知である。このような保存的に修飾された変異体は、本明細書で開示される、多型変異体、種間相同体、および対立遺伝子に加えた変異体であり、これらを除外しない。以下の8つの群：1）アラニン（A）、グリシン（G）；2）アスパラギン酸（D）、グルタミン酸（E）；3）アスパラギン（N）、グルタミン（Q）；4）アルギニン（R）、リシン（K）；5）イソロイシン（I）、ロイシン（L）、メチオニン（M）、バリン（V）；6）フェニルアラニン（F）、チロシン（Y）、トリプトファン（W）；7）セリン（S）、トレオニン（T）；および8）システイン（C）、メチオニン（M）は、互いに

対して保存的置換であるアミノ酸を含有する（例えば、Creighton, Proteins (1984)を参照されたい）。いくつかの実施形態では、「保存的配列修飾」という用語は、アミノ酸配列を含有する抗体の結合特徴に、著明に影響を及ぼしたり、これを変化させたりしないアミノ酸修飾を指すのに使用する。

【0071】

本明細書で使用される「最適化された」という用語は、産生細胞または産生物、一般に、真核細胞、例えば、ピキア（*Pichia*）属の細胞、トリコデルマ（*Trichoderma*）属の細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）、またはヒト細胞において優先されるコドンを使用するアミノ酸配列をコードするように変化させたヌクレオチド配列を指す。最適化されたヌクレオチド配列は、「親」配列としてもまた公知の、出発ヌクレオチド配列により元来はコードされるアミノ酸配列を、完全にまたは可能な限り多く保持するように操作されている。

10

【0072】

当技術分野では、多様な種のNotch3に対する抗体の結合能を査定する標準的なアッセイであって、例えば、ELISA、ウェスタンブロット、およびRIAを含むアッセイが公知である。適切なアッセイについては、実施例において詳細に記載する。また、抗体の結合反応速度（例えば、結合アフィニティー）も、Biacore解析、またはFACS相対アフィニティー（Scatchard）など、当技術分野で公知の標準的なアッセイにより評価することができる。Notch3の機能的特性に対する抗体の効果を査定するアッセイ（例えば、Notch3シグナル伝達経路のモジュレーティングする受容体結合アッセイ）についても、実施例においてさらに詳細に記載する。

20

【0073】

2つ以上の核酸配列またはポリペプチド配列の文脈における「～パーセント同一な」または「同一性パーセント」という語句は、同じである、2つ以上の配列または部分配列を指す。下記の配列比較アルゴリズムのうちの1つを使用して、または手作業によるアライメントおよび目視を介して測定される通り、比較域または指定された領域にわたる最大の対応について比較および配列決定されるとき、2つの配列の、指定された百分率のアミノ酸残基またはヌクレオチドが同じである（すなわち、指定された領域にわたり、または、指定されない場合、配列全体にわたり、60%の同一性、任意選択で、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または99%の同一性）場合、2つの配列は、「実質的に同一」である。任意選択で、同一性は、少なくとも約50ヌクレオチド（または10アミノ酸）の長さである領域にわたり、またはより好ましくは100～500もしくは1000以上のヌクレオチド（または20、50、200以上のアミノ酸）の長さである領域にわたり存在する。

30

【0074】

配列比較では、1つの配列が、被験配列がそれに照らして比較される基準配列として作用することが典型的である。配列比較アルゴリズムを使用する場合、被験配列および基準配列をコンピュータへと入力し、必要な場合は、部分配列座標を指定し、配列アルゴリズムのプログラムパラメータを指定する。デフォルトのプログラムパラメータを使用することもでき、代替的なパラメータを指定することもできる。次いで、配列比較アルゴリズムにより、プログラムパラメータに基づき、被験配列についての、基準配列に照らした配列同一性パーセントを計算する。

40

【0075】

本明細書で使用される「比較域」は、20～600、通例では約50～約200、より通例では約100～約150からなる群から選択される、連続的な位置の数のうちのいずれか1つによるセグメントであって、配列を、2つの配列を最適に配列決定した後における、同じ連続的な位置の数による基準配列と比較しうるセグメントへの言及を含む。当技術分野では、比較のための配列アライメント法が周知である。比較のための最適な配列アライメントは、例えば、Smith and Waterman, (1970) Adv. Appl. Math. 2:482cによる局所的相同性アルゴリズム、Needleman and Wunsch, (1970) J. Mol. Biol. 48:443による

50

相同性アライメントアルゴリズム、Pearson and Lipman, (1988) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444による類似性検索法、これらのアルゴリズム (Wisconsin Genetics Software Package、Genetics Computer Group、575 Science Dr., Madison, WIによる、GAP、BESTFIT、FASTA、およびTFASTA) のコンピュータ化された実装、または手作業によるアライメントおよび目視 (例えば、Brent et al., (2003) Current Protocols in Molecular Biologyを参照されたい) を介して実行することができる。

【0076】

配列同一性パーセントおよび配列類似性パーセントを決定するのに適する、アルゴリズムの2つの例は、Altschul et al., (1977) Nuc. Acids Res. 25:3389-3402; およびAltschul et al., (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410のそれぞれにおいて記載されている、BLASTアルゴリズムおよびBLAST 2.0アルゴリズムである。BLAST解析を実施するためのソフトウェアは、National Center for Biotechnology Informationにより公開されている。このアルゴリズムはまず、クエリー配列内の長さWの短いワードであって、データベース配列内の同じ長さのワードにより配列決定する場合、何らかの正の値の閾値スコアTにマッチするかまたはこれを満たすワードを同定することにより、高スコア配列対 (HSP: high scoring sequence pair) を同定することを伴う。Tを、近傍ワードスコア閾値 (Altschul et al., supra) と称する。これらの初期の近傍ワードヒットは、それらを含む、より長いHSPを見出す検索を開始するためのシードとして作用する。ワードヒットは、累積アライメントスコアを増大させる限りにおいて、各配列に沿って、いずれの方向にも拡張させる。累積スコアは、ヌクレオチド配列では、パラメータであるM (マッチする残基の対についてのリワードスコア; 常に >0) およびN (ミスマッチする残基についてのペナルティスコア; 常に <0) を使用して計算する。アミノ酸配列では、スコアリングマトリックスを使用して、累積スコアを計算する。累積アライメントスコアが、その最大達成値から量Xだけ降下する場合、1もしくは複数の負のスコアリング残基アライメントの累積に起因して、累積スコアがゼロ以下となる場合、または一方の配列の末端に到達する場合、各方向におけるワードヒットの拡張を中止する。BLASTアルゴリズムのパラメータであるW、T、およびXにより、アライメントの感度および速度が決定される。BLASTNプログラム (ヌクレオチド配列のための) では、デフォルトとして、ワード長 (W) 11、期待値 (E) 10、 $M=5$ 、 $N=-4$ 、および両方の鎖の比較を使用する。アミノ酸配列のためのBLASTPプログラムでは、デフォルトとして、ワード長3、および期待値 (E) 10、およびBLOSUM62スコアリングマトリックス (Henikoff and Henikoff, (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915を参照されたい) アライメント (B) 50、期待値 (E) 10、 $M=5$ 、 $N=-4$ 、ならびに両方の鎖の比較を使用する。

【0077】

BLASTアルゴリズムではまた、2つの配列の間の類似性についての統計学的解析 (例えば、Karlin and Altschul, (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877を参照されたい) も実施する。BLASTアルゴリズムにより提示される類似性の1つの尺度は、2つのヌクレオチドまたはアミノ酸配列の間のマッチが偶然に生じる確率についての指標をもたらす、最小合計確率 ($P(N)$) である。例えば、被験核酸を基準核酸に照らして比較したときの最小合計確率が、約0.2未満、より好ましくは約0.01未満であり、最も好ましくは約0.001未満であれば、核酸は、基準配列と類似すると考えられる。

【0078】

2つのアミノ酸配列の間の同一性パーセントはまた、PAM120重みづけ残基表、ギャップ長ペナルティー12、およびギャップペナルティー4を使用する、ALIGNプログラム (version 2.0) へと組み込まれた、E. Meyers and W. Miller, (1988) Comput. Appl. Biosci. 4:11-17によるアルゴリズムを使用して決定することもできる。加えて、2つのアミノ酸配列の間の同一性パーセントは、Blossom62マトリックス

スまたは P A M 2 5 0 マトリックス、ならびにギャップ重みづけとして 1 6、1 4、1 2、1 0、8、6、または 4、および長さ重みづけとして 1、2、3、4、5、または 6 を使用する、G C G ソフトウェアパッケージ (www. g c g. c o m で入手可能である) 内の、G A P プログラムへと組み込まれた、Needleman and Wunsch ((1970) J. Mol. Biol. 48:444-453)) によるアルゴリズムを使用して決定することができる。

【0079】

上記で言及した配列同一性百分率以外の、2つの核酸配列またはポリペプチドが実質的に同一であることの別の指標は、第1の核酸によりコードされるポリペプチドが、下記で記載される第2の核酸によりコードされるポリペプチドに対する抗体と免疫学的に交差反応性であることである。したがって、例えば、2つのペプチドが、保存的置換だけで異なる場合、ポリペプチドは、第2のポリペプチドと実質的に同一であることが典型的である。2つの核酸配列が実質的に同一であることの別の指標は、2つの分子またはそれらの相補体が、下記で記載される厳密な条件下で、互いとハイブリダイズすることである。2つの核酸配列が実質的に同一であることのさらに別の指標は、同じプライマーを使用して、配列を増幅しうることである。

【0080】

本明細書では、「核酸」という語句を、「ポリヌクレオチド」という用語と互換的に使用し、一本鎖形態または二本鎖形態の、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドおよびこれらのポリマーを指す。用語は、公知のヌクレオチド類似体または修飾された骨格残基もしくは連結を含有する核酸であって、合成であり、自然発生であり、非自然発生であり、基準核酸と類似する結合特性を有し、基準ヌクレオチドと類似する様式で代謝される核酸を包摂する。このような類似体の例は、限定なしに述べると、ホスホロチオエート、ホスホルアミデート、ホスホン酸メチル、キラルホスホン酸メチル、2-オ-メチルリボヌクレオチド、ペプチド核酸 (PNA) を含む。

【0081】

別段に指し示されない限り、特定の核酸配列はまた暗黙に、保存的に修飾されたその変異体 (例えば、縮重コドン置換) および相補的配列のほか、明示的に指し示される配列も包摂する。具体的に、下記で詳述される通り、縮重コドン置換は、1または複数の選択された (または全ての) コドンのうちの第3の位置を、混合ベースの残基および/またはデオキシイノシン残基で置換した配列を作り出すことにより達成することができる (Batzer et al., (1991) Nucleic Acid Res. 19:5081; Ohtsuka et al., (1985) J. Biol. Chem. 260:2605-2608; および Rossolini et al., (1994) Mol. Cell. Probes 8:91-98)。

【0082】

「作動可能に連結した」という語句は、2つ以上のポリヌクレオチド (例えば、DNA) セグメントの間の機能的関係を指す。「作動可能に連結した」という語句は、転写調節配列の、転写される配列に対する機能的関係を指すことが典型的である。例えば、プロモーター配列またはエンハンサー配列は、それが、適切な宿主細胞内または他の発現系内のコード配列の転写を刺激またはモジュレートする場合、コード配列に作動可能に連結する。一般に、転写される配列に作動可能に連結した、プロモーターの転写調節配列は、転写される配列と物理的に連続する、すなわち、それらはシス作用型である。しかし、エンハンサーなど、いくつかの転写調節配列は、それらが転写を増強するコード配列と、物理的に連続するか、またはこれに近接して配置される必要がない。

【0083】

「対象」という用語は、ヒトおよび非ヒト動物を含む。非ヒト動物は、全ての脊椎動物、例えば、非ヒト霊長動物、ヒツジ、イヌ、ウシ、ニワトリ、両生類、および爬虫類などの哺乳動物および非哺乳動物を含む。本明細書では、注記される場合を除き、「患者」または「対象」という用語は、互換的に使用される。

【0084】

以下の節および小節では、本開示の多様な態様について、さらに詳細に記載する。

【0085】

10

20

30

40

50

Notch3受容体

Notchシグナル伝達とは、胎児の発生および成体組織の両方における、幹細胞の維持、細胞の分化および増殖を含む生物学的機能の多様なセットを調節する、進化において保存的な経路である (Kopan et al., (2009) Cell 137: 216-233; Guruharsha et al., (2012) Nat Rev Genet. 13: 654-66; およびAndersson et al., (2001) Development 138: 3593-3612)。哺乳動物では、4つのNotch受容体 (Notch1~4) が記載されており、これらは、保存的なドメインアーキテクチャーを有する。細胞外ドメイン (ECD) は、図1において示される通り、一連のEGF様リピートに後続する、3つのLNRリピートとヘテロ二量体化ドメインとを含有するNRR (negative regulatory region) からなる。

10

【0086】

充実性腫瘍では、腫瘍の誘発および進行におけるNotchシグナル伝達の役割は、十分には理解されていない (Ranganathan et al., (2011) Nat Rev Cancer 11:338-51)。上皮細胞の形質転換におけるNotch受容体についての初期の証拠は、マウス乳がんウイルス (MMTV: mouse mammary tumor virus) による挿入突然変異誘発研究から得られた。例えば、MMTVにより、Notch4 (当初はInt3として公知であった) を活性化させる結果として、乳がん形成がもたらされた (Gallahan et al., (1987) J Virol 61:218-220, Gallahan et al., (1997) Oncogene 14: 1883-1890)。2011年には、エストロゲン受容体 (ER) 陰性乳がんにおいて、Notch1またはNotch2の再配列が同定された (Robinson et al., (2011) Nat Med 17:1646-51)。Notch受容体のこれらの再配列は、無傷のNRRドメインまたはICD様タンパク質を欠く受容体の膜結合型形態の産生を結果としてもたらす。

20

【0087】

Notch3 NRRは、全体的フォールディングが、Notch1 (Gordan et al., (2009) Blood 113:4381-4390; Gordon et al., (2009) 4:e6613; Wu et al., (2010) Nature 464:1052-1057) およびNotch2 (Gordon et al., (2007) Nat Struct Mol Biol 14:295-300) のフォールディングと類似している。Notch3 NRRは、3つのLNR (Lin12/Notch repeat)、すなわち、LNR-A、LNR-B、およびLNR-Cと、S1部位 (R1571とE1572との間の) におけるフリント切断により、N末端部分 (HD-N) およびC末端部分 (HD-C) へと分けられる、ヘテロ二量体化 (HD) ドメインとからなる (図2を参照されたい)。

30

【0088】

NRRドメインは、3つのタンパク質分解ステップを伴う、Notch受容体の活性化を調節する。フリント様コンベルターゼは、Notch前駆体の成熟時に、NRR内のS1部位で切断して、活性化をプライミングする。ADAMプロテアーゼは、これもまたNRR内のS2部位で切断して、S3部位における、ガンマセクレターゼによる膜内タンパク質分解のための基質を創出する。次いで、S3が切断された後、Notchの細胞内部分が核に入って、転写を活性化させる。S2の切断は、この活性化の連鎖の鍵となるステップであり、NRRドメインにより負に調節される。このいわゆる自己阻害の機構は、下記のNRR構造により説明することができる。

40

【0089】

理論を提示することに束縛されるわけではないが、作用機構についての1つの可能なモデルは、Notch3 NRRが典型的に、各々が Ca^{2+} イオンを配位結合させる3つのLNRが、HDを包み込んで、S2部位をADAMプロテアーゼによる接近から保護する、自己阻害コンフォメーションで存在するということである。LNRとHDとの間の相互作用の安定性のほか、これらの領域内の相互作用の安定性も、NRRの自己阻害コンフォメーションを維持するのに極めて重要である。Notch3 NRR内の突然変異は、自己阻害コンフォメーションを変化させ、これにより、S2部位が、プロテアーゼによる切断に供され、その後、S3部位が、プロテアーゼによる切断に供され、これにより、下流のNotch3シグナル伝達を活性化させるように、HDドメインを露出させる。した

50

がって、関与性のがん（本明細書で開示される）において見出される突然変異と同様、NRRを不安定化させる突然変異であれば、N o t c h 3の活性化を増強しうるであろう。他方、LNR-HD間相互作用を安定化させうる抗体またはそれらの断片などの試薬は、N o t c h 3シグナル伝達を潜在的に阻害しうる。20350および20358などの抗体またはそれらの断片は、N o t c h 3の自己阻害コンフォメーションに結合し、自己阻害コンフォメーションを安定化させ（これを直接維持し、保持し、ロックし）、これにより、S2部位のプロテアーゼによる切断への曝露と、その後における下流のN o t c h 3シグナル伝達を防止する。

【0090】

いくつかの実施形態では、抗体またはその断片は、LNR領域（LNR-A、LNR-B、LNR-Cのほか、LNRドメインの間の対応するリンカー）の、HDに照らした可動性を制限し、N o t c h 3 NRRを自己阻害コンフォメーションで安定化させるように、コンフォメーションルエピトープに結合する。活性の（阻害されていない、オープン）コンフォメーションを形成できなければ、その結果として、シグナル伝達は活性化されなくなる。いくつかの実施形態では、抗体またはその断片は、NRR内のHDの露出を防止し、これにより、S2部位および／またはS3部位における、プロテアーゼによる切断に供されなくするように、コンフォメーションルエピトープに結合する。S2部位を切断できなければ、その結果として、シグナル伝達は活性化されなくなる。

【0091】

N o t c h 3突然変異体

一態様では、本開示は、N o t c h 3受容体内の突然変異に関する。TALL患者のうちの>50%において、N o t c h 1内の突然変異の活性化が、受容体の2つの一般的な領域内で同定された（Weng et al., (2004) Science 306:269-71）。突然変異の1つのクラスは、NRRのHDドメインの疎水性コア内でクラスター化していることが見出された。LNRドメイン内ではまた、希少な突然変異も同定されている（Gordon et al., (2009) Blood 113:4381-4390）。NRRの突然変異は、HDドメインのフォールディングを部分的または完全に解除し、S2部位を保護するポケットを変化させ、LNRとの相互作用を破壊することにより作用する可能性が高い。この仮説は、白血病に関連する突然変異を伴うHDドメインの安定性は小さいという生化学データにより裏付けられている（Malecki et al., (2006) Mol. Cell Biol. 26:4642-4651）。

【0092】

突然変異はまた、タンパク質のC末端におけるPEST（proline-glutamate-serine-threonine-rich）ドメイン内でも同定された。ICDレベルは、緊密に調節されており、PESTドメインのリン酸化および後続のユビキチン化は、ICDを、Fbw7など、E3リガーゼによる分解のためにターゲティングする。突然変異は、PESTドメインの欠失を結果としてもたらし、ICDの安定性を結果として増大させ、ICDのタンパク質半減期を結果として延長する、ナンセンス突然変異またはフレームシフト突然変異である。

【0093】

現在、がんにおけるN o t c h受容体についての証拠は主に、N o t c h 1シグナル伝達における変化に焦点を当てている。しかし、漿液性卵巣がんについてのTCGA解析を含む複数の研究では、N o t c h 3が、患者試料のうちの11~25%において増幅されることが示されている（Nakayama et al., (2007) Int J Cancer 120:2613-17, Etemadmoghadam et al., (2009) Clin Can Res 15: 1417-27, Bell et al., (2011) Nature 474:609-615）。CADAASIL（Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy）症候群では、N o t c h 3内の突然変異が報告されているが、これらの突然変異は一般に、天然でもミスセンスであり、N o t c h 3機能の変化および疾患の病理との関連は、明らかでない（Ayata, (2010), Stroke 41:S129-S134を参照されたい）。多様ながん型における遺伝子突然変異についての包括的な解析が、TCGAおよび他の機構により実施されている。使用される標準的な技法は、エクソン捕捉である。これらの研究の一部として、N o t c h 3突然変異は、頭頸部有棘細胞癌、

卵巣がん、および肺腺癌のうちの約1%において報告されている。しかし、Notch3のエクソン25および33に対する十分なエクソンカバレッジの欠如により、当業者がNotch3遺伝子内の突然変異を探索することは困難となっている。さらに、Notch3遺伝子内のGC含量が高いことも、当業者が突然変異を検討することを難しくしている。加えて、有棘細胞肺がんにおいて同定された突然変異は、機能喪失突然変異であることが示唆されている（Egloff & Grandis (2012) Clin Can Res 18:5188-519を参照されたい）。これに対し、先行研究とは対照的に、本明細書の開示は、Notch3シグナル伝達を活性化させ、がんの発症機序に関与する、多数の突然変異（「活性化突然変異」）を示す。

【0094】

Notch3突然変異を同定するために、947例のヒトがん細胞系を特徴付け、>1600の遺伝子について、実施例5で記載される、液相HC（hybrid capture）技術を使用する、MPS（massively parallel sequencing）により、突然変異情報を得た。加えて、原発性腫瘍試料も、RNAseqによりシーケンシングした（Wang et al. (2009) Nature Reviews Genetics 10:57-63）。表1において示される通り、複数の細胞系内および腫瘍試料中のNRRドメインおよびPESTDドメインの両方において、突然変異が同定された。

【0095】

Notch3の機能に干渉する活性化突然変異は、がんの発症機序に関与する。機能を喪失させるか、機能を獲得させるか、または機能を変化させる、Notch3の変化の存在は、がんの危険性を直接的に増大させるので、このような突然変異の検出は、診断法および予後診断法に役立つ。次いで、同定された、このような活性化突然変異を、突然変異Notch3に結合する抗体またはその断片で処置することができる。

【0096】

【表1】

表1: Notch3の活性化突然変異

突然変異	細胞データ	構造ベースの解釈
群1		
S1580L	活性化	ドメイン内水素結合を喪失し、これにより、HDドメインを不安定化させる
R1510H		
D1587N		
R1589Q		
Y1624H		
群2		
G1487D	活性化	構造的完全性に影響を及ぼし、衝突を引き起こす
A1476T		
A1609T		
L1518M		
A1537T		
群3		
N1597K	活性化	明らかな解釈ではないが、NRRの表面上では、タンパク質間相互作用に対する干渉がなされうるであろう
L1547V		
R1526C		

【0097】

異なる細胞系に由来するNRRドメインに由来する2つの突然変異：（i）S1580L突然変異を伴うT細胞性急性リンパ芽球性白血病細胞系であるTALL-1細胞、および（ii）G1487D突然変異を伴う乳がん（X-1004）を、特徴付けのために選択した。実施例は、S1580L突然変異またはG1487D突然変異を、Notch3受容体へと導入する結果として、受容体からの基本的シグナル伝達が、野生型対照と比べて、約10倍増大することを示す。この系では、FACSアッセイにより決定される通り、野生型の受容体および突然変異受容体を、ほぼ同等のレベルで発現させた。このデータは、これらの突然変異が、これらの突然変異および他の類似する突然変異を発現させる細

胞系および腫瘍におけるN o t c h 3シグナル伝達を活性化させることを示す。このN o t c h 3シグナル伝達の活性化は、N o t c h 3抗体またはそれらの断片により阻害される。

【0098】

N o t c h 3突然変異体を検出するために、生体試料を調製し、突然変異N o t c h 3を含有すると考えられる被験試料の配列と、野生型N o t c h 3の配列との間の差違について解析する。突然変異N o t c h 3は、本明細書で記載される技法のうちのいずれかにより同定することができる。突然変異N o t c h 3をシークエンシングして、特異的突然変異（N o t c h 3シグナル伝達を増大させる活性化突然変異）を同定することができる。次いで、突然変異、とりわけ、タンパク質の機能を変化させる突然変異を、本発明の診断法および予後診断法のために使用する。

10

【0099】

さらなる解析のために、N o t c h 3突然変異体のがん突然変異を、N o t c h 3 N R RのX線結晶構造へとマップした。構造解析は、これらの突然変異のうちのいくつかは、ドメイン内相互作用およびドメイン間相互作用を破壊し、N o t c h 3 N R Rの自己阻害コンフォメーションを不安定化させ、N o t c h 3の活性化およびシグナル伝達を引き起こしうることを示す。

【0100】

これらの突然変異の、20350エピトープおよび20358エピトープ（下記で記載される）との比較は、それらの大半がエピトープ内に存在しないことを示し、これにより、20350抗体断片および20358抗体断片は、その自己阻害コンフォメーション内の野生型N o t c h 3 N R Rおよび突然変異体N o t c h 3 N R Rのいずれにも結合し、N o t c h 3シグナル伝達を阻害しうることが指し示される。

20

【0101】

いくつかの実施形態では、突然変異を、野生型N o t c h 3（配列番号1）へと導入して、抗体の結合に対する効果について探索することができる。アラニン走査など、公知の技法を使用する突然変異誘発は、関与性のエピトープを機能的に規定する一助となりうる。また、アルギニン／グルタミン酸走査プロトコルを活用する突然変異誘発も援用することができる（例えば、Nanevycz et al., (1995), J. Biol. Chem. 270(37):21619-21625およびZupnick et al., (2006), J. Biol. Chem. 281(29):20464-20473を参照されたい）。一般に、これらのアミノ酸は、帯電しており、バルクであり、したがって、突然変異を導入する抗原領域内の、抗原結合性タンパク質と抗原との間の結合を破壊する潜在的可能性を有するため、アルギニンおよびグルタミン酸で、野生型ポリペプチド内のアミノ酸を置換する（典型的には個別に）。野生型抗原内に存在するアルギニンは、グルタミン酸で置きかえる。様々な、このような個々の突然変異体を得、集積された結合結果を解析して、どの残基が結合に影響を及ぼすのかを決定することができる。各突然変異体N o t c h 3が、単一の突然変異を有する、一連の突然変異体N o t c h 3を創出することができる。各突然変異体N o t c h 3の、多様なN o t c h 3抗体またはそれらの断片との結合を、測定し、選択された抗体またはその断片の、野生型N o t c h 3（配列番号1）に結合する能力と比較することができる。

30

40

【0102】

本明細書で使用される、抗体またはその断片と、突然変異体または変異体のN o t c h 3との間の結合の変化（例えば、低減または増大）とは、結合アフィニティーの変化（例えば、下記の実施例で記載されるB i a c o r e試験またはビーズベースのアッセイなど、公知の方法により測定される）、E C₅₀の変化、および／または抗原結合性タンパク質の全結合能の変化（例えば、低減）（例えば、抗原結合性タンパク質濃度を抗原濃度と対比させたプロットにおけるB_{m a x}の減殺により証拠立てられる）が認められることを意味する。結合の著名な変化は、突然変異させた残基が、抗体またはその断片への結合に関与することを指し示す。

【0103】

50

いくつかの実施形態では、結合の有意な低減とは、抗体またはその断片と突然変異 N o t c h 3 抗原との間の結合アフィニティー、E C₅₀、および／または結合能が、抗体またはその断片と野生型 N o t c h 3（例えば、配列番号 1）との間の結合と比べて、10%を超えて、20%を超えて、40%を超えて、50%を超えて、55%を超えて、60%を超えて、65%を超えて、70%を超えて、75%を超えて、80%を超えて、85%を超えて、90%を超えて、または95%を超えて低減されることを意味する。

【0104】

いくつかの実施形態では、抗体またはその断片の結合は、1カ所または複数カ所（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10カ所以上）の突然変異を有する突然変異 N o t c h 3 では、野生型 N o t c h 3 タンパク質（例えば、配列番号 1）と比較して、

10

【0105】

変異体形態は、配列番号 1 において示される野生型配列に照らして言及されるが、N o t c h 3 の対立遺伝子変異体またはスプライス変異体では、アミノ酸が異なりうるものが察知されるであろう。また、N o t c h 3 のこのような対立遺伝子形態について、著明な結合の変化（例えば、弱い結合または強い結合）を示す抗体またはそれらの断片も想定される。当業者は、表 1 に記載される突然変異のうちのいずれか 1 つを、表 1 の他の突然変異のうちの、他の任意の 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、8 つ、9 つ、10、11、または 12 と組み合わせて、対象を同定するか、診断するか、またはモニタリングするのに使用しうる、「発現パターン」または「発現署名」をもたらしうることを察知

20

【0106】

いくつかの実施形態では、発現署名は、1カ所または複数カ所の群 1 の突然変異、例えば、S 1 5 8 0 L、R 1 5 1 0 H、D 1 5 8 7 N、R 1 5 8 0 Q、および Y 1 6 2 4 H の組合せを含む。いくつかの実施形態では、発現署名は、1カ所または複数カ所の群 2 の突然変異、例えば、G 1 4 8 7 D、A 1 4 7 6 T、A 1 6 0 9 T、L 1 5 1 8 M、および A 1 5 3 7 T の組合せを含む。いくつかの実施形態では、発現署名は、1カ所または複数カ所の群 3 の突然変異、例えば、N 1 5 9 7 K、L 1 5 4 7 V、および R 1 5 2 6 C の組合せを含む。

【0107】

いくつかの実施形態では、発現署名は、1カ所または複数カ所の群 1 の突然変異、例えば、S 1 5 8 0 L、R 1 5 1 0 H、D 1 5 8 7 N、R 1 5 8 0 Q、および Y 1 6 2 4 H の組合せ；ならびに 1カ所または複数カ所の群 2 の突然変異、例えば、G 1 4 8 7 D、A 1 4 7 6 T、A 1 6 0 9 T、L 1 5 1 8 M、および A 1 5 3 7 T の組合せを含む。いくつかの実施形態では、発現署名は、1カ所または複数カ所の群 1 の突然変異、例えば、S 1 5 8 0 L、R 1 5 1 0 H、D 1 5 8 7 N、R 1 5 8 0 Q、および Y 1 6 2 4 H の組合せ；ならびに 1カ所または複数カ所の群 3 の突然変異、例えば、N 1 5 9 7 K、L 1 5 4 7 V、および R 1 5 2 6 C の組合せを含む。いくつかの実施形態では、発現署名は、1カ所または複数カ所の群 2 の突然変異、例えば、G 1 4 8 7 D、A 1 4 7 6 T、A 1 6 0 9 T、L 1 5 1 8 M、および A 1 5 3 7 T の組合せ；ならびに 1カ所または複数カ所の群 3 の突然

30

40

【0108】

N o t c h 3 の構造およびコンフォメーションエピトープ

一態様では、本開示は、N o t c h 3 内の、多数の顕著に異なるコンフォメーションエピトープの同定に関する。多数の抗体のうちの 1 つの抗体またはその断片と複合体化した、N o t c h 3 の NRR ドメイン（残基 1 3 7 9 ~ 1 6 4 0）の三次元構造が示されたのは、初めてのことである。N o t c h 3 NRR / 2 0 3 5 0 F a b 複合体および N o t c h 3 NRR / 2 0 3 5 8 F a b は、それぞれ、3.2 オングストローム（Å）および 2.1 Å の分解能で決定されており、これらを図 2 3 および 2 4 に示す。本開示はまた、NRR 内には複数のコンフォメーションエピトープが見られ、図 2 5 に示す通り

50

、抗体断片が、互いから隔てられた、固有のコンフォメーションナルエピトープに結合することも初めて示す。抗体またはそれらの断片は、N o t c h 3 の自己阻害状態に結合し、N o t c h 3 を、この自己阻害状態で安定化させる。

【0109】

本明細書の開示は、N R R には、異なるクラスの N o t c h 3 抗体またはそれらの断片が結合する、多数の顕著に異なるコンフォメーションナルエピトープが見られることを示す。一実施形態では、第1のクラスの抗体（例えば、20350）は、N R R ドメイン内の第1のコンフォメーションナルエピトープに結合し、第2のクラスの抗体（例えば、20358）は、N R R ドメイン内の第2のコンフォメーションナルエピトープに結合し、第3のクラスの抗体は、N R R ドメイン内の第3のコンフォメーションナルエピトープに結合する。一実施形態では、N R R の第1のコンフォメーションナルエピトープと、第2のコンフォメーションナルエピトープと、第3のコンフォメーションナルエピトープとは、重複せず、第1のクラスの抗体と、第2のクラスの抗体と、第3のクラスの抗体とは、N R R の顕著に異なる領域に結合する。一実施形態では、N R R の第1のコンフォメーションナルエピトープと、第2のコンフォメーションナルエピトープとは、重複せず、第1のクラスの抗体と、第2のクラスの抗体とは、N R R の顕著に異なる領域に結合する。一実施形態では、N R R の第1のコンフォメーションナルエピトープと、第3のコンフォメーションナルエピトープとは、重複せず、第1のクラスの抗体と、第3のクラスの抗体とは、N R R の顕著に異なる領域に結合する。一実施形態では、N R R の第2のコンフォメーションナルエピトープと、第3のコンフォメーションナルエピトープとは、重複せず、第2のクラスの抗体と、第3のクラスの抗体とは、N R R の顕著に異なる領域に結合する。

【0110】

一実施形態では、N R R の第1のコンフォメーションナルエピトープと、第2のコンフォメーションナルエピトープと、第3のコンフォメーションナルエピトープとは、少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、または10のアミノ酸残基で互いと重複し、第1のクラスの抗体と、第2のクラスの抗体と、第3のクラスの抗体とは、少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、または10の重複するアミノ酸残基に結合する。一実施形態では、N R R の第1のコンフォメーションナルエピトープと、第2のコンフォメーションナルエピトープとは、少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、または10のアミノ酸残基で互いと重複し、第1のクラスの抗体と、第2のクラスの抗体とは、少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、または10の重複するアミノ酸残基に結合する。一実施形態では、N R R の第1のコンフォメーションナルエピトープと、第3のコンフォメーションナルエピトープとは、少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、または10のアミノ酸残基で互いと重複し、第1のクラスの抗体と、第3のクラスの抗体とは、少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、または10の重複するアミノ酸残基に結合する。一実施形態では、N R R の第2のコンフォメーションナルエピトープと、第3のコンフォメーションナルエピトープとは、少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、または10のアミノ酸残基で互いと重複し、第2のクラスの抗体と、第3のクラスの抗体とは、少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、または10の重複するアミノ酸残基に結合する。

【0111】

N R R 内の異なるコンフォメーションナルエピトープを解析するために、実験節において詳細に記載されている通りに、X線結晶構造解析実験および水素-重水素交換実験を実行した。N o t c h 3 の結晶は、N o t c h 3 またはその変異体をコードするヌクレオチド配列を、適切な宿主細胞内で発現させ、次いで、精製されたタンパク質を、関与性の N o t c h 3 をターゲティングする F a b の存在下で結晶化させることにより調製することができる。

【0112】

N o t c h 3 ポリペプチドはまた、例えば、抽出および精製の一助となるように、融合

タンパク質として作製することもできる。融合タンパク質パートナーの例は、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST)、ヒスチジン (HIS: histidine)、ヘキサヒスチジン (6HIS)、GAL4 (DNA結合性ドメインおよび/または転写活性化ドメイン)、およびベクターガラクトシダーゼを含む。また、融合タンパク質配列の除去を可能とするように、融合タンパク質パートナーと、対象のタンパク質配列との間に、タンパク質分解性切断部位を含むことも好都合でありうる。

【0113】

発現させた後、タンパク質は、例えば、固定化金属アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、および/またはゲル濾過により、精製および/または濃縮することができる。

10

【0114】

タンパク質は、本明細書で記載される技法を使用して、結晶化させることができる。一般に、結晶化過程では、タンパク質溶液を含有する液滴を、結晶化緩衝液と混合し、密封容器内で平衡化させる。平衡化は、「ハンギングドロップ」法または「シッティングドロップ」法など、公知の技法により達成することができる。これらの方法では、液滴を、結晶化緩衝液のはるかに大量のレザバーの上方で懸垂させるか、またはこの傍らに静置し、蒸気拡散を介して平衡化に到達する。代替的に、平衡化は、他の方法によって、例えば、油下において、半透膜を介して、または自由界面拡散によっても生じうる (例えば、Chayen et al., (2008) Nature Methods 5, 147-153を参照されたい)。

【0115】

結晶が得られたら、公知のX線回折法により、構造を解くことができる。多くの技法では、重原子誘導体化により修飾された結晶など、化学修飾された結晶を使用して、フェーズを近似する。実際には、結晶中を拡散し、タンパク質の表面に結合しうる、重金属原子塩または有機金属化合物、例えば、塩化鉛、金チオリンゴ酸、チメロサル、または酢酸ウラニルを含有する溶液中に、結晶を浸漬する。次いで、結合した重金属原子の位置を、浸漬された結晶についてのX線回折解析により決定することができる。X線の単色ビームが、結晶の原子 (散乱中心) により回折されるときに得られるパターンを、数学的式で解いて、数学的座標をもたらしすることができる。回折データを使用して、結晶の反復単位についての電子密度マップを算出する。フェーズ情報を得る別の方法は、分子置換として公知の技法を使用することである。この方法では、回転アルゴリズムおよび並進アルゴリズムを、類縁構造から導出された検索モデルへと適用する結果として、対象のタンパク質についての近似的配向性をもたせられる (Rossmann, (1990) Acta Crystals A 46, 73-82を参照されたい)。電子密度マップを使用して、結晶の単位格子内の個々の原子の位置を確立する (Blundel et al., (1976) Protein Crystallography, Academic Press)。

20

30

【0116】

本開示は、Notch3の複数の三次元構造およびNotch3抗体のFabについて初めて記載し、NRR内には、複数のコンフォメーションナルエピトープが認められることを示す。Notch3の細胞外NRRドメインを、図2に示す。近似的なドメイン境界は、以下の通りである: LNR-Aは、アミノ酸残基E1383~G1422を有し、LNR-A/Bリンカーは、アミノ酸残基Asp1423~Leu1431を有し、LNR-Bは、アミノ酸残基Gln1432~Ala1460を有し、LNR-B/Cリンカーは、アミノ酸残基Gly1461~Asn1468を有し、LNR-Cは、アミノ酸残基Pro1469~Ser1502を有し、LNR-HDリンカーは、アミノ酸残基Glu1503~Arg1510を有し、HD-Nは、アミノ酸残基Gly1511~Arg1571を有し、HD-Cは、アミノ酸残基1572~Ser1640を有する。ヒトNotch3は、受託番号: NP_000426 (ヒト) を有し、下記では、配列番号1として表される。

40

【0117】

Notch3および抗体またはその断片の三次元構造は、潜在的なNotch3受容体モジュレーターの標的結合性部位の同定を可能とする。好ましい標的結合性部位は、No

50

t c h 3 の活性化に關与する部位である。一実施形態では、標的結合性部位は、N o t c h 3 の L N R ドメイン内および H D ドメイン内に位置する。したがって、L N R または H D に結合し、好ましくは L N R ドメインおよび H D ドメインの両方に結合する抗体またはその断片は、ドメインが互いから解離し、S 2 切断部位が露出され、その後、S 3 切断部位が露出されるように、H D ドメインを露出させることを防止することにより、N o t c h 3 の活性化をモジュレートしうる。したがって、これらのドメイン内のアミノ酸残基に結合する抗体またはその断片は、N o t c h 3 に、活性化および下流のシグナル伝達を防止する自己阻害コンフォメーションを維持させる。

【0118】

一実施形態では、コンフォメーションルエピトープは、N o t c h 3 のアミノ酸残基：配列番号 1 の 1 4 2 7 ~ 1 4 2 9 (L N R - A / B リンカーの)、1 4 4 2、1 4 4 4 ~ 1 4 4 5、1 4 4 7 ~ 1 4 5 0、1 4 5 3、1 4 5 8 (L N R - B の)、1 4 6 1 ~ 1 4 6 2、1 4 6 4 (L N R - B / C リンカーの)、1 5 0 7 ~ 1 5 0 8、1 5 1 0 (L N R - H D リンカーの)、1 5 9 2、1 5 9 4 ~ 1 5 9 9、1 6 0 2 (H D β 4 - α 3 ループの)、および 1 6 0 6 (H D α 3 ヘリックスの)、またはこれらのサブセットにより規定される。一実施形態では、パラトープとは、C D R 配列を含む抗体の領域である。一実施形態では、パラトープは、表 1 に列挙された配列を含む。一実施形態では、パラトープは、N o t c h 3 残基：C y s 1 4 4 2、P r o 1 4 4 4、A l a 1 4 4 5、S e r 1 4 4 7、S e r 1 4 4 8、P r o 1 4 4 9、T y r 1 4 5 3、C y s 1 4 5 8、G l y 1 4 6 1、G l y 1 4 6 2、G l y 1 4 6 4、L e u 1 5 9 2、S e r 1 5 9 4、P r o 1 5 9 5、G l u 1 5 9 6、A s n 1 5 9 7、A s p 1 5 9 8、および H i s 1 5 9 9 と結合する、少なくとも 1 つのアミノ酸残基を含む。一実施形態では、パラトープは、N o t c h 3 残基：G l n 1 4 2 7、C y s 1 4 2 8、G l u 1 4 2 9、P r o 1 4 4 4、S e r 1 4 4 5、S e r 1 4 4 7、S e r 1 4 4 8、P r o 1 4 4 9、T y r 1 4 5 3、L e u 1 5 0 7、L e u 1 5 0 8、A r g 1 5 1 0、L e u 1 5 9 2、A s p 1 5 9 8、P r o 1 6 0 2、および S e r 1 6 0 6 と結合する、少なくとも 1 つのアミノ酸残基を含む。

【0119】

いくつかの実施形態では、抗体またはその断片は、アミノ酸残基：配列番号 1 の 1 4 2 7 ~ 1 4 2 9 (L N R - A / B リンカーの)、1 4 4 2、1 4 4 4 ~ 1 4 4 5、1 4 4 7 ~ 1 4 5 0、1 4 5 3、1 4 5 8 (L N R - B の)、1 4 6 1 ~ 1 4 6 2、1 4 6 4 (L N R - B / C リンカーの)、1 5 0 7 ~ 1 5 0 8、1 5 1 0 (L N R - H D リンカーの)、1 5 9 2、1 5 9 4 ~ 1 5 9 9、1 6 0 2 (H D β 4 - α 3 ループの)、および 1 6 0 6 (H D α 3 ヘリックスの)、またはこれらのサブセットを含む、コンフォメーションルエピトープを有する、ヒト N o t c h 3 タンパク質に結合する。いくつかの実施形態では、抗体またはその断片は、アミノ酸残基：配列番号 1 の 1 4 2 7 ~ 1 4 2 9 (L N R - A / B リンカーの)、1 4 4 2、1 4 4 4 ~ 1 4 4 5、1 4 4 7 ~ 1 4 5 0、1 4 5 3、1 4 5 8 (L N R - B の)、1 4 6 1 ~ 1 4 6 2、1 4 6 4 (L N R - B / C リンカーの)、1 5 0 7 ~ 1 5 0 8、1 5 1 0 (L N R - H D リンカーの)、1 5 9 2、1 5 9 4 ~ 1 5 9 9、1 6 0 2 (H D β 4 - α 3 ループの)、および 1 6 0 6 (H D α 3 ヘリックスの)、もしくはこれらのサブセット内のアミノ酸またはこれらと重複するアミノ酸に結合する。いくつかの実施形態では、抗体またはその断片は、アミノ酸残基：配列番号 1 の 1 4 2 7 ~ 1 4 2 9 (L N R - A / B リンカーの)、1 4 4 2、1 4 4 4 ~ 1 4 4 5、1 4 4 7 ~ 1 4 5 0、1 4 5 3、1 4 5 8 (L N R - B の)、1 4 6 1 ~ 1 4 6 2、1 4 6 4 (L N R - B / C リンカーの)、1 5 0 7 ~ 1 5 0 8、1 5 1 0 (L N R - H D リンカーの)、1 5 9 2、1 5 9 4 ~ 1 5 9 9、1 6 0 2 (H D β 4 - α 3 ループの)、および 1 6 0 6 (H D α 3 ヘリックスの)、またはこれらのサブセット内のアミノ酸（および／またはこれらからなるアミノ酸配列）に結合する。

【0120】

一実施形態では、コンフォメーションルエピトープは、N o t c h 3 のアミノ酸残基：配列番号 1 の 1 4 4 0 (L N R - B の)、1 4 6 3、1 4 6 5 ~ 1 4 6 8 (L N R - B /

Cリンカーの)、1469~1472、1474、1486~1487 (LNR-Cの)、1534 (HD α 2ヘリックスの)、ならびに1618、1619、および1621 (α 3- β 5ループの)、またはこれらのサブセットにより規定される。一実施形態では、パラトープは、Notch3残基: Arg1463、Thr1466、Asn1468、Pro1469、Val1470、Tyr1471、Tyr1474、Gln1486、およびGly1487と結合する、少なくとも1つのアミノ酸残基を含む。一実施形態では、パラトープは、Notch3残基: Ser1440、Arg1465、Thr1466、Asn1468、Pro1469、Val1470、Glu1472、Arg1434、Glu1618、Arg1619、およびAsp1621と結合する、少なくとも1つのアミノ酸残基を含む。

10

【0121】

いくつかの実施形態では、抗体またはその断片は、アミノ酸残基: 配列番号1の1440 (LNR-Bの)、1463、1465~1468 (LNR-B/Cリンカーの)、1469~1472、1474、1486~1487 (LNR-Cの)、1534 (HD α 2ヘリックスの)、および1618、1619、および1621 (α 3- β 5ループの)、またはこれらのサブセットを含む、コンフォメーションルエピトープを有する、ヒトNotch3タンパク質に結合する。いくつかの実施形態では、抗体またはその断片は、アミノ酸残基: 配列番号1の1440 (LNR-Bの)、1463、1465~1468 (LNR-B/Cリンカーの)、1469~1472、1474、1486~1487 (LNR-Cの)、1534 (HD α 2ヘリックスの)、ならびに1618、1619、および1621 (α 3- β 5ループの)、もしくはこれらのサブセット内のアミノ酸またはこれらと重複するアミノ酸に結合する。いくつかの実施形態では、抗体またはその断片は、アミノ酸残基: 配列番号1の1440 (LNR-Bの)、1463、1465~1468 (LNR-B/Cリンカーの)、1469~1472、1474、1486~1487 (LNR-Cの)、1534 (HD α 2ヘリックスの)、ならびに1618、1619、および1621 (α 3- β 5ループの)、またはこれらのサブセット内のアミノ酸 (および/またはこれらからなるアミノ酸配列) に結合する。いくつかの実施形態では、抗体またはその断片は、LNR領域 (LNR-A、LNR-B、LNR-C) の可動性を制限し、それを自己阻害コンフォメーションで安定化させるように、コンフォメーションルエピトープに結合する。活性の (阻害されていない、オープン) のコンフォメーションを形成できなければ、その結果として、シグナル伝達は活性化されなくなる。いくつかの実施形態では、抗体またはその断片は、NRR内のHDの露出を防止し、これにより、S2部位および/またはS3部位における、プロテアーゼによる切断に供されなくするように、コンフォメーションルエピトープに結合する。HDを切断できなければ、その結果として、シグナル伝達は活性化されなくなる。

20

30

【0122】

描示される構造はまた、抗体またはその断片 (例えば、20350および20358) の、Notch3との相互作用界面に特異的な、コアのNotch3アミノ酸残基を同定することも可能とする。20350では、これらは、20350のVH鎖から5Å以内の残基として定義された。コア残基は、以下: Cys1442、Pro1444、Ala1445、Ser1447、Ser1448、Pro1449、Tyr1453、Cys1458、Gly1461、Gly1462、Gly1464、Leu1592、Ser1594、Pro1595、Glu1596、Asn1597、Asp1598、およびHis1599の通りである。VL鎖では、コア残基は、以下: Gln1427、Cys1428、Glu1429、Pro1444、Ser1445、Ser1447、Ser1448、Pro1449、Tyr1453、Leu1507、Leu1508、Arg1510、Leu1592、Asp1598、Pro1602、およびSer1606の通りである。

40

【0123】

20358では、これらの残基は、20358のVH鎖から5Å以内の残基として定義

50

された。コア残基は、以下：A r g 1 4 6 3、T h r 1 4 6 6、A s n 1 4 6 8、P r o 1 4 6 9、V a l 1 4 7 0、T y r 1 4 7 1、T y r 1 4 7 4、G l n 1 4 8 6、および G l y 1 4 8 7 の通りである。V L 鎖では、コア残基は、以下：S e r 1 4 4 0、A r g 1 4 6 5、T h r 1 4 6 6、A s n 1 4 6 8、P r o 1 4 6 9、V a l 1 4 7 0、G l u 1 4 7 2、A r g 1 4 3 4、G l u 1 6 1 8、A r g 1 6 1 9、および A s p 1 6 2 1 の通りである。

【0124】

図25に示す通り、実験節は、N o t c h 3 N R R / 2 0 3 5 0 複合体および N o t c h 3 N R R / 2 0 3 5 8 複体の結晶構造を、N o t c h 3 N R R 上に重ね合わせるにより決定される、20350のコンフォメーションナルエピトープと、20358のコンフォメーションナルエピトープとが、重複しないことを示す。20350と20358とは、重複しない、顕著に異なる個別のコンフォメーションナルエピトープに結合する。最も近接する領域（E1464-R54間における、20350との水素結合、および R1463-D100間における、20358との塩架橋）であってもなお、完全に隔てられている。これは、2つの抗体が、N o t c h 3 N R R に同時に結合することが可能であり、交差競合しないことを指し示す。この観察は、これらの抗体が、異なるピン内にあり、N o t c h 3 への結合において、互いと競合しないことを示す、ビニング実験とも符合する。

【0125】

本明細書で開示される教示を使用して、当業者は、N o t c h 3 に結合する抗原結合性タンパク質の能力に不適切に干渉することなく、抗原結合性タンパク質のどの残基および領域を変化させうるのかを予測することができる。

【0126】

相互作用界面のアミノ酸は、N o t c h 3 パートナータンパク質から5 Å以内に少なくとも1つの原子を伴う、全てのアミノ酸残基として決定した。5 Åは、水により媒介される可能な水素結合を加えた、ファンデルワールス半径内の原子を許容するカットオフ距離として選択した。

【0127】

いくつかの実施形態では、上記の残基のうちのいずれかに結合するか、これを覆うか、または20350が上記の残基のうちのいずれかと相互作用することを防止する、任意の抗原結合性タンパク質を援用して、N o t c h 3 に結合させるかまたはこれを阻害することができる。いくつかの実施形態では、抗体またはそれらの断片は、以下のN o t c h 3 残基：C y s 1 4 4 2、P r o 1 4 4 4、A l a 1 4 4 5、S e r 1 4 4 7、S e r 1 4 4 8、P r o 1 4 4 9、T y r 1 4 5 3、C y s 1 4 5 8、G l y 1 4 6 1、G l y 1 4 6 2、G l y 1 4 6 4、L e u 1 5 9 2、S e r 1 5 9 4、P r o 1 5 9 5、G l u 1 5 9 6、A s n 1 5 9 7、A s p 1 5 9 8、および H i s 1 5 9 9 のうちの少なくとも1つに結合するか、またはこれらと相互作用する。いくつかの実施形態では、抗体およびそれらの断片は、以下のN o t c h 3 残基：G l n 1 4 2 7、C y s 1 4 2 8、G l u 1 4 2 9、P r o 1 4 4 4、S e r 1 4 4 5、S e r 1 4 4 7、S e r 1 4 4 8、P r o 1 4 4 9、T y r 1 4 5 3、L e u 1 5 0 7、L e u 1 5 0 8、A r g 1 5 1 0、L e u 1 5 9 2、A s p 1 5 9 8、P r o 1 6 0 2、および S e r 1 6 0 6 のうちの少なくとも1つに結合するか、またはこれらと相互作用する。いくつかの実施形態では、抗体またはそれらの断片は、以下のN o t c h 3 残基：C y s 1 4 4 2、P r o 1 4 4 4、A l a 1 4 4 5、S e r 1 4 4 7、S e r 1 4 4 8、P r o 1 4 4 9、T y r 1 4 5 3、C y s 1 4 5 8、G l y 1 4 6 1、G l y 1 4 6 2、G l y 1 4 6 4、L e u 1 5 9 2、S e r 1 5 9 4、P r o 1 5 9 5、G l u 1 5 9 6、A s n 1 5 9 7、A s p 1 5 9 8、H i s 1 5 9 9、G l n 1 4 2 7、C y s 1 4 2 8、G l u 1 4 2 9、P r o 1 4 4 4、S e r 1 4 4 5、S e r 1 4 4 7、S e r 1 4 4 8、P r o 1 4 4 9、T y r 1 4 5 3、L e u 1 5 0 7、L e u 1 5 0 8、A r g 1 5 1 0、L e u 1 5 9 2、A s p 1 5 9 8、P r o 1 6 0 2、および S e r 1 6 0 6 のうちの少なくとも1つに結合するか、またはこれらと相互作用

する。いくつかの実施形態では、抗体またはそれらの断片は、以下のNotch3残基：Cys1442、Pro1444、Ala1445、Ser1447、Ser1448、Pro1449、Tyr1453、Cys1458、Gly1461、Gly1462、Gly1464、Leu1592、Ser1594、Pro1595、Glu1596、Asn1597、Asp1598、His1599、Gln1427、Cys1428、Glu1429、Pro1444、Ser1445、Ser1447、Ser1448、Pro1449、Tyr1453、Leu1507、Leu1508、Arg1510、Leu1592、Asp1598、Pro1602、およびSer1606の組合せに結合するか、またはこれらと相互作用する。いくつかの実施形態では、抗体またはそれらの断片は、以下のNotch3残基：Cys1442、Pro1444、Ala1445、Ser1447、Ser1448、Pro1449、Tyr1453、Cys1458、Gly1461、Gly1462、Gly1464、Leu1592、Ser1594、Pro1595、Glu1596、Asn1597、Asp1598、His1599、Gln1427、Cys1428、Glu1429、Pro1444、Ser1445、Ser1447、Ser1448、Pro1449、Tyr1453、Leu1507、Leu1508、Arg1510、Leu1592、Asp1598、Pro1602、およびSer1606の全てに結合するか、またはこれらと相互作用する。

【0128】

いくつかの実施形態では、上記の残基のうちのいずれかに結合するか、これを覆うか、または20358が上記の残基のうちのいずれかと相互作用することを防止する、任意の抗原結合性タンパク質を援用して、Notch3に結合させるかまたはこれを阻害することができる。いくつかの実施形態では、抗体またはそれらの断片は、以下のNotch3残基：Arg1463、Thr1466、Asn1468、Pro1469、Val1470、Tyr1471、Tyr1474、Gln1486、およびGly1487のうちの少なくとも1つに結合するか、またはこれらと相互作用する。いくつかの実施形態では、抗体またはそれらの断片は、以下のNotch3残基：Ser1440、Arg1465、Thr1466、Asn1468、Pro1469、Val1470、Glu1472、Arg1434、Glu1618、Arg1619、およびAsp1621のうちの少なくとも1つに結合するか、またはこれらと相互作用する。いくつかの実施形態では、抗体またはそれらの断片は、以下のNotch3残基：Arg1463、Thr1466、Asn1468、Pro1469、Val1470、Tyr1471、Tyr1474、Gln1486、Gly1487、Ser1440、Arg1465、Thr1466、Asn1468、Pro1469、Val1470、Glu1472、Arg1434、Glu1618、Arg1619、およびAsp1621のうちの少なくとも1つに結合するか、またはこれらと相互作用する。いくつかの実施形態では、抗体またはそれらの断片は、以下のNotch3残基：Arg1463、Thr1466、Asn1468、Pro1469、Val1470、Tyr1471、Tyr1474、Gln1486、Gly1487、Ser1440、Arg1465、Thr1466、Asn1468、Pro1469、Val1470、Glu1472、Arg1434、Glu1618、Arg1619、およびAsp1621の組合せに結合するか、またはこれらと相互作用する。いくつかの実施形態では、抗体またはそれらの断片は、以下のNotch3残基：Arg1463、Thr1466、Asn1468、Pro1469、Val1470、Tyr1471、Tyr1474、Gln1486、Gly1487、Ser1440、Arg1465、Thr1466、Asn1468、Pro1469、Val1470、Glu1472、Arg1434、Glu1618、Arg1619、およびAsp1621の全てに結合するか、またはこれらと相互作用する。

【0129】

一実施形態では、本明細書で開示される抗体は、20350と同じコンフォメーションルエピトープに結合する。一実施形態では、本明細書で開示される抗体は、20358と同じコンフォメーションルエピトープに結合する。いくつかの実施形態では、表1に列挙

した抗体のうちのいずれかが結合するコンフォメーションナルエピトープが、とりわけ、有用である。ある種の実施形態では、N o t c h 3 のコンフォメーションナルエピトープを活用して、N o t c h 3 に結合する抗体またはそれらの断片を単離することができる。ある種の実施形態では、N o t c h 3 のコンフォメーションナルエピトープを活用して、N o t c h 3 に結合する抗体またはそれらの断片を作り出すことができる。ある種の実施形態では、N o t c h 3 のコンフォメーションナルエピトープを、免疫原として活用して、N o t c h 3 のコンフォメーションナルエピトープに結合する抗体またはそれらの断片を作り出すことができる。ある種の実施形態では、N o t c h 3 のコンフォメーションナルエピトープを動物へと投与し、その後、N o t c h 3 に結合する抗体を、動物から得ることができる。

10

【0130】

本明細書で開示され、実施例で開示される方法を使用して、20337、20350、および20358について同定されたコンフォメーションナルエピトープに加え、また、N o t c h 3 NRR上のさらなるコンフォメーションナルエピトープも見出すことができる。特に、LNRとHDとを架橋するコンフォメーションナルエピトープ、およびS2プラグ(L1419)がエピトープの一部をなすコンフォメーションナルエピトープ。

【0131】

本明細書で開示され、実施例で開示される方法を使用して、20337、20350、および20358について同定されたコンフォメーションナルエピトープに加え、また、N o t c h 3 NRR上のさらなるコンフォメーションナルエピトープも見出すことができる。特に、LNRとHDとを架橋するコンフォメーションナルエピトープ、およびS2プラグ(L1419)がエピトープの一部をなすコンフォメーションナルエピトープ。

20

【0132】

N o t c h 3 NRRならびに複合体であるN o t c h 3 NRR/20350およびN o t c h 3 NRR/20358についての3D構造が利用可能であれば、他のN o t c h 3 抗体をより詳細に探索するフレームワークがもたらされる。いくつかのモノクローナル抗体は、細胞成長を阻害し、いくつかのモノクローナル抗体は、細胞成長を刺激し、他のモノクローナル抗体は、細胞成長に対する効果を有さないので、N o t c h 3 の3D構造は、モノクローナル抗体のエピトープをマップし、それらの作用方式を推定することを可能とする。N o t c h 3 のコンフォメーションナルエピトープは、NRRのLNR領域およびHDに由来する非連続アミノ酸残基を含む。N o t c h 3 の3D構造が利用可能であれば、これらの阻害剤の正確な作用機構の決定およびN o t c h 3 の機能に干渉するための新たな手法のデザインが容易となるであろう。

30

【0133】

抗体の一般的構造的側面に加え、パラトープとエピトープとの間のより特異的な相互作用は、構造的手法により検討することができる。一実施形態では、CDRの構造は、それを介して、抗体が、エピトープに結合することが可能な、パラトープに寄与する。このようなパラトープの形状は、多数の様式で決定することができる。NMRまたはx線結晶構造解析など、従来の構造的検討法を使用することができる。これらの手法により、パラトープ単独の形状を検討することもでき、それがエピトープに結合しているときのパラトープ単独の形状を検討することもできる。

40

【0134】

一実施形態では、パラトープとは、CDR配列を含む抗体の領域である。一実施形態では、パラトープは、表1に列挙された配列を含む。一実施形態では、パラトープは、N o t c h 3 残基：C y s 1 4 4 2、P r o 1 4 4 4、A l a 1 4 4 5、S e r 1 4 4 7、S e r 1 4 4 8、P r o 1 4 4 9、T y r 1 4 5 3、C y s 1 4 5 8、G l y 1 4 6 1、G l y 1 4 6 2、G l y 1 4 6 4、L e u 1 5 9 2、S e r 1 5 9 4、P r o 1 5 9 5、G l u 1 5 9 6、A s n 1 5 9 7、A s p 1 5 9 8、およびH i s 1 5 9 9と結合する、少なくとも1つのアミノ酸残基を含む。一実施形態では、パラトープは、N o t c h 3 残基：G l n 1 4 2 7、C y s 1 4 2 8、G l u 1 4 2 9、P r o 1 4 4 4、S e r 1 4 4 5

50

、Ser1447、Ser1448、Pro1449、Tyr1453、Leu1507、Leu1508、Arg1510、Leu1592、Asp1598、Pro1602、およびSer1606と結合する、少なくとも1つのアミノ酸残基を含む。

【0135】

一実施形態では、パラトープは、Notch3残基：Arg1463、Thr1466、Asn1468、Pro1469、Val1470、Tyr1471、Tyr1474、Gln1486、およびGly1487と結合する、少なくとも1つのアミノ酸残基を含む。一実施形態では、パラトープは、Notch3残基：Ser1440、Arg1465、Thr1466、Asn1468、Pro1469、Val1470、Glu1472、Arg1434、Glu1618、Arg1619、およびAsp1621と結合する、少なくとも1つのアミノ酸残基を含む。

10

【0136】

代替的に、分子モデルは、*in silico*で作리出すこともできる。構造は、Accelrys (San Diego, Calif.) 製のInsight IIモデリングパッケージなど、市販のパッケージを一助とするホモロジーモデリングにより作り出すことができる。略述すると、検討される抗体の配列は、Protein Data Bankなど、公知の構造についてのタンパク質データベースに照らして検索するのに使用することができる。公知の構造を伴う相同なタンパク質を同定した後で、これらの相同なタンパク質を、モデリング鑄型として使用する。可能な鑄型の各々を配列決定することができ、したがって、鑄型間の、構造ベースの配列アライメントをもたらしすることができる。次いで、未知の構造を伴う抗体の配列を、これらの鑄型により配列決定して、未知の構造を伴う抗体についての分子モデルを作り出すことができる。当業者により察知される通り、このような構造を*in silico*で作리出すための、多くの代替的な方法であって、それらのうちのいずれかを使用しうる代替的な方法が存在する。例えば、Hardmanらに交付された米国特許第5,958,708号において記載されている工程であって、QUANTA (Polygen Corp., Waltham, Mass.) およびCHARM (Brooks et al., (1983), J. Comp. Chem. 4:187) を援用する工程と類似する工程を使用することができる (参照によりその全体において本明細書に組み込まれる)。

20

【0137】

パラトープの形状は、可能なパラトープがエピトープに結合するのかどうか、および可能なパラトープがエピトープにどのくらい強く結合するのかを決定するのに重要であるだけでなく、エピトープとパラトープとの間の相互作用自体、変異体抗体のデザインにおける貴重な情報の供給源である。当業者により察知される通り、この相互作用は、様々な方途により研究しうる。1つの方途は、おそらく上記で記載した通りに作り出された構造モデルを使用し、次いで、とりわけ、パラトープとそのエピトープとの間のコンフォメーション空間および配向空間についての、モンテカルロ探索を実施することが可能なドッキングモジュールを有する、Insight II (Accelrys, San Diego, Calif.) などのプログラムを使用することである。結果として、エピトープは、パラトープと、どこでどのように相互作用するのかを推定することが可能となる。一実施形態では、エピトープの断片または変異体だけを使用して、関与性の相互作用を決定する一助とする。一実施形態では、エピトープの全体を、パラトープとエピトープとの間の相互作用のモデリングに使用する。

30

40

【0138】

これらのモデリングされた構造を使用することにより、どの残基がエピトープとパラトープとの間の相互作用において最も重要であるのかを予測することが可能である。したがって、一実施形態では、抗体の結合特徴を変化させるために、どの残基を変化させるのかを、たやすく選択することが可能である。例えば、パラトープ内のある種の残基の側鎖が、エピトープの結合に立体障害をもたらすことが可能であり、したがって、これらの残基を、小型の側鎖を伴う残基へと変化させることが有益でありうる。ドッキングモデルから明らかとなりうる。これは、多くの方途により決定することができる。例えば、2

50

つのモデルを単に目視し、官能基および近接性に基づく相互作用を推定することができる。代替的に、より好適なエネルギー相互作用を得るために、上記で記載した通り、エピトープとパラトープとの反復的な対合を実施することもできる。また、これらの相互作用を、抗体の様々な変異体について決定して、抗体がエピトープに結合しうる、代替的な様式を決定することもできる。また、多様なモデルを組み合わせて、抗体の構造をどのように変化させて、所望される特定の特徴を伴う抗体を得るべきなのかを決定することもできる。

【0139】

上記で決定されたモデルは、多様な技法により調べることができる。例えば、どの変異体をさらに検討すべきかを決定するために、相互作用エネルギーを、上記で論じられたプログラムにより決定することができる。また、静電相互作用およびファンデルワールス相互作用を使用して、エピトープと変異体パラトープとの相互作用エネルギーを決定することもできる。また、部位指向突然変異誘発を使用して、予測された抗体構造の変化が、実際に、結合特徴の所望される変化を結果としてもたらすのかどうかを検討することもできる。代替的に、エピトープに変化を施して、モデルが適正であることを検証するか、またはパラトープとエピトープとの間で生じうる一般的な結合テーマを決定することもできる。

【0140】

当業者により察知される通り、これらのモデルは、本実施形態の抗体およびそれらの変異体を作製するのに必要な指針をもたらすが、おそらく *in vitro* 研究を介して、*in silico* のモデルの日常的な試験を実施することがやはり所望されうる。加えて、当業者に明らかな通り、任意の修飾はまた、抗体の活性に対してさらなる副作用も及ぼしうる。例えば、より強力な結合を結果としてもたらすことが予測される任意の変化は、より強力な結合を誘導しうるが、また、抗体の活性を低減するかまたは変化させうる、他の構造的変化も引き起こしうる。当技術分野では、これが当てはまるのかどうかの決定が日常的であり、多くの方途により達成することができる。例えば、活性は、ELISA 試験により調べることができる。代替的に、試料は、表面プラズモン共鳴デバイスを使用することにより調べることができる。

【0141】

Notch3 抗体

本開示は、Notch3 の少なくとも 1 つのコンフォメーションエピトープを認識する抗体を提示する。本開示は、Notch3 に対するあるクラスの抗体が、表 2 に開示される、Notch3 の特定のコンフォメーションエピトープに結合するという知見に基づく。

【0142】

【表 2-1】

表2: Notch3抗体の例

20350		
配列番号 3 (Kabat)	HCDR1	SYTIS
配列番号 4 (Kabat)	HCDR2	WIKPRWGAAHYAQKFQG
配列番号 5 (Kabat)	HCDR3	GSPWFGY
配列番号 6 (Chothia)	HCDR1	GGTFSSY
配列番号 7 (Chothia)	HCDR2	KPRWGA

【表 2 - 2】

配列番号 8 (Chothia)	HCDR3	GSFWFGY
配列番号 9	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYITISWVRQAPGQGLEWMGWIKPRWGAAH YAQKFQGRVTITADESTAYMELSSLRSEDAVYYCARGSFVFGYWGQGLTLTVSS
配列番号 10	DNA VH	CAGGTGCAGCTGGTGCACTCAGGCGCCGAAGTGAAGAAACCGGCTCTAGCGTGAAAG TCAGCTGTAAAGCTAGTGGCGGAACCTTCTAGCTACACTATTAGCTGGGTACAGACAGG CCCCAGGTCAAGGCTGGAGTGGGCTGGATTAAGCCTCGCTGGGGCGCTGCTCAC TACGCTCAGAAATTTACGGGTAGAGTGACTATACCGCCGACGAGTCTACTAGCACCGCC TATATGGAAGTGAAGTTCCTGAGGTGAGGACACCGCCGCTACTACTGCGCTAGAGG CTCCTTTGGTTCGGCTACTGGGTGAGGGCACCTGCTACCGTGTCTAGC
配列番号 11	重鎖	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYITISWVRQAPGQGLEWMGWIKPRWGAAH YAQKFQGRVTITADESTAYMELSSLRSEDAVYYCARGSFVFGYWGQGLTLTVSSASTKG PSVFLPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTQTYICNVNHPKNTKVDKRVKPSKCDKTHCTPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVSVLTVLIHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK
配列番号 12	重鎖DNA	CAGGTGCAGCTGGTGCACTCAGGCGCCGAAGTGAAGAAACCGGCTCTAGCGTGAAAG TCAGCTGTAAAGCTAGTGGCGGAACCTTCTAGCTACACTATTAGCTGGGTACAGACAGG CCCCAGGTCAAGGCTGGAGTGGGCTGGATTAAGCCTCGCTGGGGCGCTGCTCAC TACGCTCAGAAATTTACGGGTAGAGTGACTATACCGCCGACGAGTCTACTAGCACCGCC TATATGGAAGTGAAGTTCCTGAGGTGAGGACACCGCCGCTACTACTGCGCTAGAGG CTCCTTTGGTTCGGCTACTGGGTGAGGGCACCTGCTACCGTGTCTAGCGTACAGC TAAGGGCCCAAGTGTGTTCCCTGGCCCCAGCAGCAAGTCTACTCCGGCGGAAGTGC TGCCCTGGGTGCTGGAAGGACTACTCCCGAGCCCGTGACAGTGTCTGGAAGTCT TGGGGCTCTGACTCCGGCGTGACACCTTCCCGCCGTGCTGACAGCAGCGGCTGT ACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACAGTGCCCTCAGCTCTCTGGGAACCCAGACCTATATCT GCAACGTGAACCAAGCCAGCAACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCCCAAGAG CTGCGACAAGACCCACACTGCCCCCTGCCAGCTCCAGAACTGCTGGGAGGGCCTTC CGTGTCTCTGTTCCCCCAAGCCCAAGGACACCTGATGATCAGCAGGACCCCGAGGT GACCTGCGTGGTGGTGGACGTGCTCCACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCACTGTATC GTGGACGGCGTGGAGTGACACACCAAGCAAGCCAGAGAGGAGCAGTACAACA GCACCTACAGGTGGTGTGCTGCTGACCGTGTGACCAAGGACTGGCTGAACGGCAAA GAATACAAGTGCAAGTCTCCAAAGGCCCTGCCAGCCCAATCGAAAAGACAATCAG CAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCAAGGTGTACACCTGCCCCAGCCGGGAG GAGATGACCAAGAACAGGTGTCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCAACCCAGCGA TATCGCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCGAGAACTACAAGACACCCCCC CAGTGTGACAGCAGCGCAGCTTCTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCC AGGTGGCAGCAGGGCAAGTGTTCAGCTGACGCTGATGACGAGGCCCTGCACAACC ACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCTGAGCCCGGCAAG
配列番号 13 (Kabat)	LCDR1	RASQGINNYLN
配列番号 14 (Kabat)	LCDR2	DASKLQS
配列番号 15 (Kabat)	LCDR3	QQYLQYPMT
配列番号 16 (Chothia)	LCDR1	SQGINNY
配列番号 17 (Chothia)	LCDR2	DAS
配列番号 18 (Chothia)	LCDR3	YLQYPM
配列番号 19	VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGINNYLNWYQKPKAPKLLIYDASKLQSGVPSRFS GSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQYLQYPMITFGQGTKVEIK
配列番号 20	DNA VL	GATATTAGATGACTCAGTACCTAGTAGCTGAGCGCTAGTGTGGGCGATAGAGTAC TATCACCTGTAGAGCCTCTCAGGGGATTAACAACCTGAACCTGGTATCAGCAGAAGCC CGGTAAAGCCCTAAGCTGCTGATCTACGACGCTCTAAGCTCAGTACAGCGTGCCTC TAGGTTTAGCGGTAGCGGTAGTGGCACCGACTTCACTCTGACTATCTAGCTGACGCG

10

20

30

40

【表 2 - 3】

		CGAGGACTTCGCTACCTACTACTGTGACGAGTACCTGCAGTACCTATGACCTTCGGTCA AGGCACTAAGGTCGAGATTAAG
配列番号 21	軽鎖	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGINNYLNWYQKPKAPKLLIYDASKLQSGVPSRFS GSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQYLYPMFTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
配列番号 22	軽鎖DNA	GATATTGAGATGACTCAGTCACCTAGTAGCCTGAGCGCTAGTGTGGCGATAGAGTGAC TATCACCTGTAGAGCCTCTCAGGGGATTAACTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCC CGGTAAAGCCCTAAGCTGCTGATCTACGACGCTCTAAGCTGCAGTCAGGCGTGCCCTC TAGGTTTAGCGGTAGCGGTAGTGGCACCAGCTTACCTGACTATCTCTAGCCTGCAGCC CGAGGACTTCGCTACCTACTACTGTGACGAGTACCTGCAGTACCTATGACCTTCGGTCA AGGCACTAAGTGCAGATTAAGCGTACGGTGGCGCTCCAGCGTGTCTATCTCCCGCC CAGCGCAGGACGCTGAAGAGCGGACCGCCAGCGTGGTGTGCTGCTGAACAACCTTCT ACCCCGGGAGGCCAAGGTGCAAGTGAAGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAG CCAGGAGAGCGTACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACC CTGACCTGAGCAAGCGGCTACGAGAGCATAAGGTGTACGCTGCGAGGTGACCCA CCAGGCGCTGTCCAGCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTGC
20358		
配列番号 23 (Kabat)	HCDR1	TYAMH
配列番号 24 (Kabat)	HCDR2	GIVPYHGITDYAQKFQ
配列番号 25 (Kabat)	HCDR3	DDYSTYAFAY
配列番号 26 (Chothia)	HCDR1	GGTFRIT
配列番号 27 (Chothia)	HCDR2	VPYHGI
配列番号 28 (Chothia)	HCDR3	DDYSTYAFAY
配列番号 29	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFRITYAMHWVRQAPGQGLEWMGGIVPYHGITD YAKFKQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDYSTYAFAYWGQGLTVTVSS
配列番号 30	DNA VH	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGCGCGAAGTGAAGAAACCGGCTCTAGCGTGAAAG TCAGCTGTAAAGCTAGTGGCGGAACCTTTAGAACCTACGCTATGCACTGGGTGAGACAG GCCCCAGGTCAAGGCTGGAGTGGATGGCGGAATCGTGCCCTATCAGGAATCACC ACTACGCTCAGAAATTTAGGGTAGAGTGACTATCAGCGCCGACGAGTCTACTAGCAGCG CCTATATGGAAGTGGTCCCTGAGGTGAGAGGACCGCGCTCTACTACTGCGCTAGG GACGACTACTCTACCTACGCTTCGCTACTGGGGTCAAGGCACCTGGTACCGTGTCT AGC
配列番号 31	重鎖	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFRITYAMHWVRQAPGQGLEWMGGIVPYHGITD YAKFKQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDYSTYAFAYWGQGLTVTVSSAST KGPSVFLAPSSKSTSGGTAAALGLVVDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKTHCTPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPDSIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
配列番号 32	重鎖DNA	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGCGCGAAGTGAAGAAACCGGCTCTAGCGTGAAAG TCAGCTGTAAAGCTAGTGGCGGAACCTTTAGAACCTACGCTATGCACTGGGTGAGACAG GCCCCAGGTCAAGGCTGGAGTGGATGGCGGAATCGTGCCCTATCAGGAATCACC ACTACGCTCAGAAATTTAGGGTAGAGTGACTATCAGCGCCGACGAGTCTACTAGCAGCG CCTATATGGAAGTGGTCCCTGAGGTGAGAGGACCGCGCTCTACTACTGCGTAGG GACGACTACTCTACCTACGCTTCGCTACTGGGGTCAAGGCACCTGGTACCGTGTCT AGCGCTAGCACTAAGGGCCCAAGTGTGTTCCCTGGCCCCAGCAGCAAGTCTACTCC GGCGAACTGCTGCCCTGGGTGCTGTGAGGAGTACTTCCCGAGCCCGTGACAGT GTCTGGAACTCTGGGGCTGTGACTTCCGCGGTGCACACTTCCCGCGGTGCTGCAGAG CAGCGGCTGTACAGCTGAGCAGCGTGGTACAGTGCCTCCAGCTCTCTGGGAACCC

10

20

30

40

【表 2 - 4】

		AGACCTATATCTGCAACGTGAACCAAGCCAGCAACCAAGGTGGACAAGAGAGTG GAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGCCCCCTGCCAGCTCCAGAACTGCT GGGAGGGCCTTCCGTGTTCTCTGTTCCCCCAAGCCCAAGGACACCTGATGATCAGCAG GACCCCGGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGACCCAGAGGTGAAG TTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCAGAGAGG AGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCACAGGACTGG CTGAACGGCAAGAATACAAGTGCAAAGTCTCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCAATCGA AAAGACAATCAGCAAGGCCAAGGCCAGCCACGGGAGGCCAGGTGTACACCTGCC CCAGCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGTGTAAGGGCTT CTACCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCGAGAACAACTAC AAGACCACCCCCAGTGTGGACAGCGACGGCAGCTTCTCTGTACAGCAAGCTGACC GTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAAGTGCAGCGTGTGACACGAGG CCCTGCACAACCACTACCCAGAAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCGGCAAG
配列番号 33 (Kabat)	LCDR1	RASQSIASYLA
配列番号 34 (Kabat)	LCDR2	DASNLQS
配列番号 35 (Kabat)	LCDR3	QQAYKTPYT
配列番号 36 (Chothia)	LCDR1	SQSIASY
配列番号 37 (Chothia)	LCDR2	DAS
配列番号 38 (Chothia)	LCDR3	AYKTPY
配列番号 39	VL	DIQMTQSPSSLASVGDRTITCRASQSIASYLAWYQQKPGKAPKLLIYDASNLQSGVPSRFS GSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQAYKTPYTFGGQTKVEIK
配列番号 40	DNA VL	GATATTAGATGACTCAGTCACCTAGTAGCCTGAGCGCTAGTGTGGCGATAGAGTGAC TATCACCTGTAGAGCCTCTCAGTCTATCGTAGTTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCC CGGTAAAGCCCTAAGCTGCTGATCTACGACGCTCTAACTGCAGTCAGGCGTGCCTC TAGGTTTAGCGGTAGCGGTAGTGGCACCAGCTTACCCTGACTATCTAGCCTGCAGCC CGAGGACTTCGCTACCTACTACTGTACGACGCGCTATAAGACCCCTACACCTTCGGTCA AGGCACTAAGGTCGAGATTAAG
配列番号 41	軽鎖	DIQMTQSPSSLASVGDRTITCRASQSIASYLAWYQQKPGKAPKLLIYDASNLQSGVPSRFS GSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQAYKTPYTFGGQTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTLSLSTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
配列番号 42	軽鎖DNA	GATATTAGATGACTCAGTCACCTAGTAGCCTGAGCGCTAGTGTGGCGATAGAGTGAC TATCACCTGTAGAGCCTCTCAGTCTATCGTAGTTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCC CGGTAAAGCCCTAAGCTGCTGATCTACGACGCTCTAACTGCAGTCAGGCGTGCCTC TAGGTTTAGCGGTAGCGGTAGTGGCACCAGCTTACCCTGACTATCTAGCCTGCAGCC CGAGGACTTCGCTACCTACTACTGTACGACGCGCTATAAGACCCCTACACCTTCGGTCA AGGCACTAAGGTCGAGATTAAGCGTACGGTGGCCGCTCCAGCGTGTTCATCTTCCCCC CAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGACCGCCAGCGTGGTGTGCTGCTGAACAATTCT ACCCCGGGAGGCCAAGGTGCAAGTGAAGGTGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAG CCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACC CTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTAGCCTGCGAGGTGACCCA CCAGGCGCTGTCCAGCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTGC
20802		
配列番号 43 (Kabat)	HCDR1	SYTMN
配列番号 44 (Kabat)	HCDR2	RVKGEQFGGSIHYAASVKG
配列番号 45 (Kabat)	HCDR3	ERSRAGSIFDP
配列番号 46 (Chothia)	HCDR1	GFTFSSY

10

20

30

40

【表 2 - 5】

配列番号 47 (Chothia)	HCDR2	KGEQFGGS
配列番号 48 (Chothia)	HCDR3	ERSRAGSIFDP
配列番号 49	VH	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTSSYTMNWVRQAPGKLEWVGRVKGEQFGGSI HYAASVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDAVVYCARERSRAGSIFDPWGQGLTVTVSS
配列番号 50	DNA VH	CAGGTGCAGCTGGTGAATCAGGCGGCGGACTGGTCAAGCCTGGCGGTAGCCTGAGAC TGAGCTGCGCTGCTAGTGGCTTACCTTCTCTAGCTACACTATGAAGTGGGTGAGACAGG CCCCTGTAAAGGCTGGAGTGGGTGGAAGAGTGAAGGGCGAGCAGTTCGGCGGCTC TATTCACTACGCCGCTAGTGTGAAGGGCGGTTCACTATCTCTAGGACGACTCTAAGAA CACCTGTACCTGCAGATGAATAGCCTGAAACCGAGGACACCGCGTCTACTACTGCGC TAGAGAGCGGTCTAGGGCGGCTCTATCTCGACCTTGGGGTCAAGGCACCTGGTCA CCGTGTCTAGC
配列番号 51	重鎖	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTSSYTMNWVRQAPGKLEWVGRVKGEQFGGSI HYAASVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDAVVYCARERSRAGSIFDPWGQGLTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAAGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEKSCDKHTHTCPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSV LTVLHDDWLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPKQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSLKTVDSRWQQGNVFCVSMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
配列番号 52	重鎖DNA	CAGGTGCAGCTGGTGAATCAGGCGGCGGACTGGTCAAGCCTGGCGGTAGCCTGAGAC TGAGCTGCGCTGCTAGTGGCTTACCTTCTCTAGCTACACTATGAAGTGGGTGAGACAGG CCCCTGTAAAGGCTGGAGTGGGTGGAAGAGTGAAGGGCGAGCAGTTCGGCGGCTC TATTCACTACGCCGCTAGTGTGAAGGGCGGTTCACTATCTCTAGGACGACTCTAAGAA CACCTGTACCTGCAGATGAATAGCCTGAAACCGAGGACACCGCGTCTACTACTGCGC TAGAGAGCGGTCTAGGGCGGCTCTATCTCGACCTTGGGGTCAAGGCACCTGGTCA CCGTGTCTAGCGTAGCACTAAGGGCCCAAGTGTGTTTCCCTGGCCCCAGCAGCAAGT CTACTTCGCGGCAACTGCTGCCCTGGGTTGCTGGTGAAGGACTACTTCCCGAGCCCG TGACAGTGTCTGGAAGTCTGGGCTCTGACTTCCGGCGTGCACACTTCCCGCGGTGC TGACAGGACGCGGCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGCAGTGCCTCCAGCTCTCTG GGAACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAACCAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAA GAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACTGCCCGCTGCCAGCTCCAG AACTGCTGGAGGGCTTCCGTGTTCTGTTCCCCCAAGCCCAAGGACACCTGATGA TCAGCAGGACCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGAGCTGTCCACAGGACCCAGA GGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGCGGTGGAGGTGCACAACGCAAGACCAAGCCC AGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCACCA GGACTGGTGAACGGCAAGAAATACAAGTGCAAGTCTCAACAAGGCCCTGCCAGCCC CAATCGAAAGACAATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCAGGGAGCCCGAGGTACAC CCTGCCCGCCAGCCGGAGGAGATGACCAAGAACAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGA AGGGCTTCTACCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGAGAGCAACGGCCAGCCGAGAA CAACTACAAGACCAACCCCAAGTGTGGACAGCGACGGCAGCTTCTCTGTACAGCAA GCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCACTGACGCGTGATG CACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG
配列番号 53 (Kabat)	LCDR1	SGSSSNIGFNYS
配列番号 54 (Kabat)	LCDR2	YNNQRPS
配列番号 55 (Kabat)	LCDR3	STWTGTSESHV
配列番号 56 (Chothia)	LCDR1	SSSNIGFNY
配列番号 57 (Chothia)	LCDR2	YNN
配列番号 58 (Chothia)	LCDR3	WTGTSESH
配列番号 59	VL	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSSSNIGFNYSWYQQLPGTAPKLLYYNNQRPSGVPDRF SGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCSTWTGTSESHVFGGGTKLTVL

10

20

30

40

【表 2 - 6】

配列番号 60	DNA VL	CAGTCAGTCCTGACTCAGCCCTAGCGTCAGCGGCGCTCCCGGTCAAGAGTGACTATT AGCTGTAGCGGCTCTAGCTCTAATATCGGCTTTAACTACGTGAGTGGTATCAGCAGCTG CCCGGCACCGCCCTAAGCTGCTGATCTACTATAACAATCAGCGGCTAGCGGCGTGCC GATAGGTTTAGCGGATCTAAGTCAGGCACCTCTGCTAGTCTGGCTATCACCAGGACTGCAG GCTGAGGACGAGGCCGACTACTACTGCTCTACCTGGACCGGAAGTACGAGTCTCAGCT GTTCCGGCGGAGGACTAAGCTGACCGTGCTG
配列番号 61	軽鎖	QSVLTQPPSVSAGPQRTVISCSSSSNIGFNYVSWYQQLPGTAPKLLIYNNQRPSPVDRF SGSKSGTSASLAITGLQAEADYYCSTWTGTSESHVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSS EELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNINNYAASSYLSLTPEQ WKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
配列番号 62	軽鎖DNA	CAGTCAGTCCTGACTCAGCCCTAGCGTCAGCGGCGCTCCCGGTCAAGAGTGACTATT AGCTGTAGCGGCTCTAGCTCTAATATCGGCTTTAACTACGTGAGTGGTATCAGCAGCTG CCCGGCACCGCCCTAAGCTGCTGATCTACTATAACAATCAGCGGCTAGCGGCGTGCC GATAGGTTTAGCGGATCTAAGTCAGGCACCTCTGCTAGTCTGGCTATCACCAGGACTGCAG GCTGAGGACGAGGCCGACTACTACTGCTCTACCTGGACCGGAAGTACGAGTCTCAGCT GTTCCGGCGGAGGACTAAGCTGACCGTGCTGGGTCAACCTAAGGCTGCCCCAGCGTGA CCCTGTTCCCCCAGCAGCGAGGAGCTGCAGGCCAACAAAGCCACCTGCTGTGCTG ATCAGCGACTTCTACCGAGCGCCGTGACCGTGGCTGGAAGGCCGACAGCAGCCCGT GAAGGCCGCGTGGAGACCAACCCAGCAAGCAGAGCAACAACAAGTACGCCGCC AGCAGCTACCTGAGCCTGACCCCGAGCAGTGGAAGAGCCACAGTCTACAGCTGCCA GGTGACCCACGAGGGCAGCACCCTGGAAAAGACCGTGCCCAACCGAGTGCAGC
20337		
配列番号 63 (Kabat)	HCDR1	TYVMH
配列番号 64 (Kabat)	HCDR2	RIRANAYGGAADYAAPVKG
配列番号 65 (Kabat)	HCDR3	AEARYRDV
配列番号 66 (Chothia)	HCDR1	GFTFSTY
配列番号 67 (Chothia)	HCDR2	RANAYGGA
配列番号 68 (Chothia)	HCDR3	AEARYRDV
配列番号 69	VH	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSTYVMHWVRQAPGKLEWVGRIRANAYGGA ADYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYQMNSLKTEDTAVYYCARAEARYRDVWGQGLTVTVSS
配列番号 70	DNA VH	CAGGTGCAGCTGGTGAATCAGGCGGCGGACTGGTCAAGCTGGCGGCTCCCTGAGGC TGAGCTGCGCTGCTAGTGGCTTCACTTTAGCACCTACGTGATGCACTGGGTCGCCAGG CCCTGGTAAAGGCTGGAGTGGGTCGACGATTAGAGCTAACGCCTACGCGGAGC GCGCGACTACGCTGCCCTGTGAAGGCGCGTTCACTATCTCTAGGACGACTCTAAGA ACACCCGTACCTGCAGATGAATAGCCTGAAAACCGAGGACACCGCGTCTACTACTGCG CTAGAGCCGAGGCTAGATATAGGGACGTGTGGGTCAAGGCACCTGTCACCGTGTCT AGC
配列番号 71	重鎖	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSTYVMHWVRQAPGKLEWVGRIRANAYGGA ADYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYQMNSLKTEDTAVYYCARAEARYRDVWGQGLTVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEKSCDKTHTCPPCPAPELLGPPSVLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFVSMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
配列番号 72	重鎖DNA	CAGGTGCAGCTGGTGAATCAGGCGGCGGACTGGTCAAGCTGGCGGCTCCCTGAGGC TGAGCTGCGCTGCTAGTGGCTTCACTTTAGCACCTACGTGATGCACTGGGTCGCCAGG CCCTGGTAAAGGCTGGAGTGGGTCGACGATTAGAGCTAACGCCTACGCGGAGC CGCCGACTACGCTGCCCTGTGAAGGCGCGTTCACTATCTCTAGGACGACTCTAAGA ACACCCGTACCTGCAGATGAATAGCCTGAAAACCGAGGACACCGCGTCTACTACTGCG CTAGAGCCGAGGCTAGATATAGGGACGTGTGGGTCAAGGCACCTGTCACCGTGTCT

10

20

30

40

【表 2 - 7】

		AGCGCTAGCACTAAGGGCCCAAGTGTGTTCCCTGGCCCCAGCAGCAAGTCTACTTCC GGCGGAAGTCTGCTGCTGGGTTGCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCGTGACAGT GTCTGGAAGTCTGGGGCTCTGACTTCCGCGGTGCACACTTCCCCGCGTGTGCAGAG CAGCGGCTGTACAGCCTGAGCAGCTGGTGACAGTGCCTCCAGCTCTCTGGGAACCC AGACCTATATCTGCAACGTGAACCAAGCCAGCAACCAAGGTGGACAAGAGAGTG GAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACCTGCCCTCCAGCTCCAGAACTGCT GGGAGGGCTTCCGTGTTCTGTTCCCTCCCAAGCCCAAGGACACCTGATGATCAGCAG GACCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGACCCAGAGGTGAAG TTCAACTGGTACGTGGACGGCTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCAGAGAGG AGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCACAGGACTGG CTGAACGGCAAGAATAACAAGTGCAAAGTCTCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCAATCGA AAAGACAATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCAGGGAGGCCAGGTGTACACCTGCC CCAGCCGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTT CTACCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCGAGAACACTAC AAGACCACCCCGAGTGTGGACAGCGACGGCAGCTTCTCTGTACAGCAAGCTGACC GTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAAGTGCAGCGTATGCACGAGG CCCTGCACAACCACTACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGCAAG
配列番号 73 (Kabat)	LCDR1	RASQSISSLN
配列番号 74 (Kabat)	LCDR2	AASNLQS
配列番号 75 (Kabat)	LCDR3	QQDYHTPFT
配列番号 76 (Chothia)	LCDR1	SQSISSH
配列番号 77 (Chothia)	LCDR2	AAS
配列番号 78 (Chothia)	LCDR3	DYHTPF
配列番号 79	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSLNHWYQQKPGKAPKLLIYAASNLQSGVPSRFS GSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQDYHTPFTFGQGTKEIK
配列番号 80	DNA VL	GATATTCAGATGACTCAGTCACCTAGTAGCCTGAGCGCTAGTGTGGCGATAGAGTGAC TATCACCTGTAGAGCCTCTCAGTCTATTAGCTCTCACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCC GGTAAAGCCCTAAGCTGCTGATCTACGCCGCTCTAACCTGCAGTCAGGCGTGCCTCT AGGTTTAGCGGTAGCGGTAGTGGCACCAGCTTACCTGACTATCTCTAGCCTGCAGCCC GAGGACTTCGCTACCTACTACTGTGACGAGGACTATCACACCCCTTACCTTCGGTCAA GGCACTAAGGTCGAGATTAAAG
配列番号 81	軽鎖	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSLNHWYQQKPGKAPKLLIYAASNLQSGVPSRFS GSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQDYHTPFTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK GTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEK KVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
配列番号 82	軽鎖DNA	GATATTCAGATGACTCAGTCACCTAGTAGCCTGAGCGCTAGTGTGGCGATAGAGTGAC TATCACCTGTAGAGCCTCTCAGTCTATTAGCTCTCACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCC GGTAAAGCCCTAAGCTGCTGATCTACGCCGCTCTAACCTGCAGTCAGGCGTGCCTCT AGGTTTAGCGGTAGCGGTAGTGGCACCAGCTTACCTGACTATCTCTAGCCTGCAGCCC GAGGACTTCGCTACCTACTACTGTGACGAGGACTATCACACCCCTTACCTTCGGTCAA GGCACTAAGGTCGAGATTAAAGCTACGGTGGCCGCTCCAGCGTGTTCATCTTCCCCC AGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCCAGCGTGGTGTGCTGCTGAACAATTCTA CCCCGGGAGGCCAAGGTGACGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGCAACAGC CAGGAGAGCGTCAACGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCT GACCTGAGCAAGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTACGCTGCGAGGTGACCCAC CAGGGCTGTCTACGCCCTGACCAAGAGCTTCAACAGGGCGAGTGC
20345		
配列番号 83 (Kabat)	HCDR1	SYTIS
配列番号 84 (Kabat)	HCDR2	WIKPKLGMHAHYAQKFG

10

20

30

40

【表 2 - 8】

配列番号 85 (Kabat)	HCDR3	GSFWFGY
配列番号 86 (Chothia)	HCDR1	GGTFSSY
配列番号 87 (Chothia)	HCDR2	KPKLGM
配列番号 88 (Chothia)	HCDR3	GSFWFGY
配列番号 89	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV5CKASGGTFSSYISWVRQAPGQGLEWMGWIKPKLGMAH YAQKFQGRVTITADESTAYMELSLRSEDVAVYCARGSFWFGYWGQGLTVTVSS
配列番号 90	DNA VH	CAGGTGCAATTGGTGACAGCGGTGCCAAGTGAACAAACCGGGCAGCAGCGTGAAAG TTAGCTGCAAAGCATCCGGAGGGACGTTTCTTCTTACACTATCTCTTGGGTGCGCCAGG CCCCGGGCCAGGGCCTCAGTGGATGGGCTGGATCAACCGAAACTGGGCATGGCTCA TTACGCCAGAAATTTACAGGCCGGGTGACCATACCGCGATGAAAGCACCAGCACCG CCTATATGGAACAGTACGAGCGCTGCGCAGCAAGATACGGCGGTGATTATTGCGCGCGT GGTCTTTCTGGTTCGTTACTGGGCCAAGGCACCTGGTGACTGTTAGCTCA
配列番号 91	重鎖	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV5CKASGGTFSSYISWVRQAPGQGLEWMGWIKPKLGMAH YAQKFQGRVTITADESTAYMELSLRSEDVAVYCARGSFWFGYWGQGLTVTVSSATKG PSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKRVPEPKSCDKHTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTSKAGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK
配列番号 92	重鎖DNA	CAGGTGCAATTGGTGACAGCGGTGCCAAGTGAACAAACCGGGCAGCAGCGTGAAAG TTAGCTGCAAAGCATCCGGAGGGACGTTTCTTCTTACACTATCTCTTGGGTGCGCCAGG CCCCGGGCCAGGGCCTCAGTGGATGGGCTGGATCAACCGAAACTGGGCATGGCTCA TTACGCCAGAAATTTACAGGCCGGGTGACCATACCGCGATGAAAGCACCAGCACCG CCTATATGGAACAGTACGAGCGCTGCGCAGCAAGATACGGCGGTGATTATTGCGCGCGT GGTCTTTCTGGTTCGTTACTGGGCCAAGGCACCTGGTGACTGTTAGCTCAGCCTCC ACCAAGGGTCCATCGGTCTTCCCTGGCACCTCCTCCAAGACACCTCTGGGGGCACA GCGGCCCTGGGTGCTGTTCAAGGACTACTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAA CTCAGCGCCCTGACCAGCGCGTGACACCTTCCCGCTGTCTACAGTCTCAGGACT CTACTCCCTCAGCAGCGTGTGACCGTGCCCTCCAGCAGTTGGGCACCCAGACCTACAT CTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACCAAGGTGGACAAGAGATTGAGCCCAAT CTTGTGACAAATCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACCTCTGGGGGGACCGT CAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCGGGACCCCTGAGGT CACATCGTGGTGGTGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCACTGGTACG TGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAGCCGCGGAGGAGCAGTACAACA GCACGTACCGGGTGGTACGCTCCTCACCGTCTGCACAGGACTGGCTGAATGGCAAG GAGTACAAGTGCAAGGTCTCAACAAGCCCTCCAGCCCATCGAGAAACCATCTCC AAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCATCCCGGGAGG AGATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGAC ATCGCGGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCGAGGAGAACTACAAGACACGCTC CCGTGCTGGACTCCGACGGTCTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCA GGTGGCAGCAGGGGAACGTCTCTCATGCTCCGTGATGATGAGGCTCTGCACAACCAC TACACGAGAAGAGCTCTCTCTGCTCCGGTAAA
配列番号 93 (Kabat)	LCDR1	RASQGINNYLN
配列番号 94 (Kabat)	LCDR2	DASKLQS
配列番号 95 (Kabat)	LCDR3	QQYLQYPMT
配列番号 96 (Chothia)	LCDR1	SQGINNY
配列番号 97 (Chothia)	LCDR2	DAS
配列番号 98 (Chothia)	LCDR3	YLQYPM

10

20

30

40

【表 2 - 9】

配列番号 99	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGINNYLNWYQKPKAPKLLIYDASKLQSGVPSRFS GSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQYLQYPMTFGQGTKEIK
配列番号 100	DNA VL	GATATCCAGATGACCCAGAGCCGAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGATCGCGTGA CCATTACCTGCAGAGCCAGCCAGGGTATTAACTACTGAACTGGTACCAGCAGAAA CCGGGCAAAGCGCCGAACTATTAACTACGACGCTTCTAACTGCAAAGCGCGTGCC GAGCCGCTTTAGCGGCAGCGGATCCGGCACCGATTTCACCTGACCATTAGCTCTCTGCA ACCGGAAGACTTTGCGACCTATTATTGCCAGCAGTACCTGCAGTACCCGATGACCTTTGG CCAGGGCACGAAAGTTGAAATTA
配列番号 101	軽鎖	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGINNYLNWYQKPKAPKLLIYDASKLQSGVPSRFS GSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQYLQYPMTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
配列番号 102	軽鎖DNA	GATATCCAGATGACCCAGAGCCGAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGATCGCGTGA CCATTACCTGCAGAGCCAGCCAGGGTATTAACTACTGAACTGGTACCAGCAGAAA CCGGGCAAAGCGCCGAACTATTAACTACGACGCTTCTAACTGCAAAGCGCGTGCC GAGCCGCTTTAGCGGCAGCGGATCCGGCACCGATTTCACCTGACCATTAGCTCTCTGCA ACCGGAAGACTTTGCGACCTATTATTGCCAGCAGTACCTGCAGTACCCGATGACCTTTGG CCAGGGCACGAAAGTTGAAATTAACGTACGTTGGCGCTCCAGCGTGTTCATCTTCCC CCCCAGCGACGAGCAGCTAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCTGCTGAACAACT TCTACCCCGGGAGGCGAAGGTGCACTGGAAGGTGGACACGCGCTGCAGAGCGGCAA CAGCCAGGAAAGCGTACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCGTGAAGCAGC ACCTGACCTGAGCAAGCGGACTACGAGAAAGCAAGGTGTACGCTGCGAGGTGA CCCACAGGGCTGTCCAGCGCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGCGAGTGT
20351		
配列番号 103 (Kabat)	HCDR1	SYTIS
配列番号 104 (Kabat)	HCDR2	WIKPRYGAAMYAQKFQG
配列番号 105 (Kabat)	HCDR3	GSFWFGY
配列番号 106 (Chothia)	HCDR1	GGTFSSY
配列番号 107 (Chothia)	HCDR2	KPRYGA
配列番号 108 (Chothia)	HCDR3	GSFWFGY
配列番号 109	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGGTSSYISVVRQAPGQGLEWMGWIKPRYGAAM YAQKFQGRVTITADESTAYMELSSLRSEDAVYYCARGSFYWGQGLTVTVSS
配列番号 110	DNA VH	CAGGTGCAATTGGTGACAGCGGTGCCGAAGTGAAAAACCGGGCAGCAGCGTGAAAG TTAGCTGCAAAGCATCCGAGGGACGTTTCTCTTACACTATCTTTGGGTGCGCCAGG CCCCGGCCAGGGCTCGAGTGGATGGGCTGGATCAAAACCGGTTACGGCGCTGCTATG TACGCCAGAAATTCAGGGCCGGTGACCATACCGCGATGAAAGCACCAGCACCGC CTATATGGAAGTACGAGCGCTCGCAGCGAAGATACGGCGTGTATTATTGCGCGCGTG GTTCTTCTGGTTCTGTTACTGGGGCAAGGCACCTGGTGACTGTTAGCTCA
配列番号 111	重鎖	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGGTSSYISVVRQAPGQGLEWMGWIKPRYGAAM YAQKFQGRVTITADESTAYMELSSLRSEDAVYYCARGSFYWGQGLTVTVSSASTKG PSVFLPAPSSKTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTQTYICNVNHPKSNITKVDKRVPEKSCDKHTCTPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMITKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMIHEALHN HYTQKSLSLSPGK
配列番号 112	重鎖DNA	CAGGTGCAATTGGTGACAGCGGTGCCGAAGTGAAAAACCGGGCAGCAGCGTGAAAG TTAGCTGCAAAGCATCCGAGGGACGTTTCTCTTACACTATCTTTGGGTGCGCCAGG CCCCGGCCAGGGCTCGAGTGGATGGGCTGGATCAAAACCGGTTACGGCGCTGCTATG TACGCCAGAAATTCAGGGCCGGTGACCATACCGCGATGAAAGCACCAGCACCGC

10

20

30

40

【表 2 - 10】

		CTATATGGAAGTCTGAGCAGCTGCGCAGCGAAGATACGGCCGTGATTATTGCGCGCGTG GTTCTTTCTGGTTCTGGTTACTGGGGCCAAGGCACCTCGTGACTGTTAGCTCAGCCTCCA CCAAGGGTCCATCGGTCTTCCCCTGGCACCCTCTCCAAGAGCAGCTCTGGGGGCACAG CGGCCCTGGGCTGCTGTCAAGGACTACTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGAAC TCAGGCGCCTGACCAAGCGCGCTGCACACCTTCCCGGTGTCTACAGTCTCAGGACTC TACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATC TGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACCAAGGTGACAAGAGATTGAGCCCAATC TTGTGACAAAACCTCACATGCCACCCTGCCAGCAGCTGAACTCTGGGGGGACCGTC AGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGAACCCCTGAGTCTC ACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGT GGACGGCGTGAGGTGCATAATGCCAAGCAAGCCGCGGAGGAGCAGTACAACAG CACGTACCGGGTGGTCAAGCTCTCACCCTCTGACCCAGGACTGGCTGAATGGCAAGG AGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCTCTCCA AAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGAGGA GATGACCAAGAACAGGTGAGCTGACCTGCTGTTCAAGGCTTCTATCCAGCGACAT CGCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGAGCGGAGAACAACTACAAGACCGCTCC GTGCTGGACTCCGACGGCTCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAGAGCAGG TGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGATGAGGCTCTGCACAACCTAC ACGCAAGAGCCTCTCCCTGCTCCGGGTAA
配列番号 113 (Kabat)	LCDR1	RASQGINNYLN
配列番号 114 (Kabat)	LCDR2	DASKLQS
配列番号 115 (Kabat)	LCDR3	QQYLQYPMT
配列番号 116 (Chothia)	LCDR1	SQGINNY
配列番号 117 (Chothia)	LCDR2	DAS
配列番号 118 (Chothia)	LCDR3	YLQYPM
配列番号 119	VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGINNYLNWYQKPKGKAPKLLIYDASKLQSGVPSRFS GSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQYLQYPMITFGQGTKEIK
配列番号 120	DNA VL	GATATCCAGATGACCCAGAGCCGAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGATCGCGTGA CCATTACCTGCAGAGCCAGCCAGGATTAACAACCTGAACTGGTACCAGCAGAAA CCGGGCAAAGCGCCGAACTATTAACTACGACGCTCTAACTGCAAGCGCGTGGC GAGCCGCTTTAGCGGCAGCGGATCCGGCACCGATTTCACCTGACCATAGCTCTCTGCA ACCGGAAGACTTTGCGACCTATTATTGCCAGCAGTACCTGCAGTACCCGATGACCTTTGG CCAGGGCACGAAAGTTGAAATTA
配列番号 121	軽鎖	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGINNYLNWYQKPKGKAPKLLIYDASKLQSGVPSRFS GSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQYLQYPMITFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK GTASVVLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHI KYYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
配列番号 122	軽鎖DNA	GATATCCAGATGACCCAGAGCCGAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGATCGCGTGA CCATTACCTGCAGAGCCAGCCAGGATTAACAACCTGAACTGGTACCAGCAGAAA CCGGGCAAAGCGCCGAACTATTAACTACGACGCTCTAACTGCAAGCGCGTGGC GAGCCGCTTTAGCGGCAGCGGATCCGGCACCGATTTCACCTGACCATAGCTCTCTGCA ACCGGAAGACTTTGCGACCTATTATTGCCAGCAGTACCTGCAGTACCCGATGACCTTTGG CCAGGGCACGAAAGTTGAAATTAACGTACGGTGGCCGCTCCAGCGTGTTCATCTTCCC CCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCTGCTGAACAACT TCTACCCCGGGAGGCCAAGGTGCAAGTGAAGGTGGACAACGCTGCAAGCGGCA CAGCCAGGAAAGCGTCACCGAGCAGGACGCAAGGACTCCACCTACAGCTGAGCAGC ACCTGACCTGAGCAAGCGGACTACGAGAAAGCAAGGTGTACGCTGCGAGGTGA CCCACAGGGCTGTCCAGCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGCGAGTGT
12215		
配列番号 123 (Kabat)	HCDR1	TYVMH

10

20

30

40

【表 2 - 1 1】

配列番号 124 (Kabat)	HCDR2	RIRSNTYGGITDYAAPVKG
配列番号 125 (Kabat)	HCDR3	AEARYRDV
配列番号 126 (Chothia)	HCDR1	GFTFSTY
配列番号 127 (Chothia)	HCDR2	RSNTYGGI
配列番号 128 (Chothia)	HCDR3	AEARYRDV
配列番号 129	VH	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSTYVMHWVRQAPGKLEWVGRIRSNTRYGGITD YAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCARAEARYRDVWGQGTLLVTVSS
配列番号 130	DNA VH	CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGCGGTGGCTGGTGAAACAGGCGGCAGCTGCGCC TGAGCTGCGCGCCTCCGGATTACCTTTTCTACTTACGTTATGATTGGGTGCGCCAGG CCCCGGGCAAAGGTCTCGAGTGGGTGGCCGTATCCGTTCTAACACTTACGGTGGTATC ACTGACTATGCCGCCCCAGTGAAAGGCCGCTTTACCATTAGCCGCGATGATTGAAAAAC ACCCTGTATCTGCAATGAACAGCCTGAAAAACGAAGATACGGCCGTGATTATTGCGCG CGTGCTGAAGCTCGTTACCGTGATGTTGGGGCCAAGGCACCTGGTGACTGTTAGCTCA
配列番号 131	重鎖	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSTYVMHWVRQAPGKLEWVGRIRSNTRYGGITD YAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCARAEARYRDVWGQGTLLVTVSSASTK GPSVFLAPSSKTSGGTAALCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHFFPAVLQSSGLYSLSS VTVPSSSLGTQTYCNVNHKPSNTKVDKRVKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPDSIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
配列番号 132	重鎖DNA	CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGCGGTGGCTGGTGAAACAGGCGGCAGCTGCGCC TGAGCTGCGCGCCTCCGGATTACCTTTTCTACTTACGTTATGATTGGGTGCGCCAGG CCCCGGGCAAAGGTCTCGAGTGGGTGGCCGTATCCGTTCTAACACTTACGGTGGTATC ACTGACTATGCCGCCCCAGTGAAAGGCCGCTTTACCATTAGCCGCGATGATTGAAAAAC ACCCTGTATCTGCAATGAACAGCCTGAAAAACGAAGATACGGCCGTGATTATTGCGCG CGTGCTGAAGCTCGTTACCGTGATGTTGGGGCCAAGGCACCTGGTGACTGTTAGCTCA GCCTCCACCAAGGTCATCGGTCTTCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGG GGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCGGTGACGGTGTC GTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGGTGCACACCTTCCCGCTGTCTACAGTCTC AGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCAGCAGCTTGGGCACCCAGA CCTACTCTGCAACGTGAATCACAAAGCCAGCAACCAAGGTGGACAAGAGATTGAG CCCAATCTTGAGACAACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGG GGACCGTCAGTCTTCTTCCCTCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCC CTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAAC TGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAGCCGCGGAGGAGCAGT ACAACAGCACGTACCGGGTGGTACGCTCTCACCGTCTGCACCAAGGACTGGCTGAAT GGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAAAC CATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAAGGTGTACACCTGCCCCATCCC GGGAGGAGATGACCAAGAACAGGTGACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTCTATCCC AGCGACATCGCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACTACAAGACCA CGCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCTTCTTCTCTACAGCAAGCTACCGTGGACA AGAGCAGGTGGCAGCAGGGAAGCTCTTCTCATGCTCCGTGATGATGAGGCTCTGCAC AACCCTACACGACAAGAGCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
配列番号 133 (Kabat)	LCDR1	RASQSISSHLN
配列番号 134 (Kabat)	LCDR2	AASNLOS
配列番号 135 (Kabat)	LCDR3	QQDYHTPFT
配列番号 136 (Chothia)	LCDR1	SQSISSH
配列番号 137 (Chothia)	LCDR2	AAS

10

20

30

40

【表 2 - 1 2】

配列番号 138 (Chothia)	LCDR3	DYHTPF
配列番号 139	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSLNHWYQQKPKAPKLLIYAASNLQSGVPSRFS GSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQDYHTPTFGQGTKVEIK
配列番号 140	DNA VL	GATATCCAGATGACCCAGAGCCGAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGCGATCGCGTGA CCATTACCTGCAGAGCCAGCCAGTCTATTTCTTCTCATCTGAAGTGTACCAGCAGAAACC GGGCAAAGCGCCGAACTATTAATCTACGCTGCTTCTAACCTGCAAAGCGCGTGGCGA GCCGCTTTAGCGGCAGCGGATCCGGCACCATTTCACCTGACCATTAGCTCTCTGCAAC CGGAAGACTTTGCGACCTATTATGCCAGCAGGACTACCATACTCCGTTCACTTTGGCC AGGGCACGAAAGTTGAAATTA
配列番号 141	軽鎖	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSLNHWYQQKPKAPKLLIYAASNLQSGVPSRFS GSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQDYHTPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVYCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
配列番号 142	軽鎖DNA	GATATCCAGATGACCCAGAGCCGAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGCGATCGCGTGA CCATTACCTGCAGAGCCAGCCAGTCTATTTCTTCTCATCTGAAGTGTACCAGCAGAAACC GGGCAAAGCGCCGAACTATTAATCTACGCTGCTTCTAACCTGCAAAGCGCGTGGCGA GCCGCTTTAGCGGCAGCGGATCCGGCACCATTTCACCTGACCATTAGCTCTCTGCAAC CGGAAGACTTTGCGACCTATTATGCCAGCAGGACTACCATACTCCGTTCACTTTGGCC AGGGCACGAAAGTTGAAATTAACGTACGGTGGCGCTCCAGCGTGTTCATCTTCCCC CCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCTGCTGAACAACTTC TACCCCGGGAGGCCAAGGTGCAAGTGAAGGTGACAAACGCCCTGCAGAGCGGCAACA GCCAGGAAAGCGTACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCTGAGCAGCAC CCTGACCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCAAGGTGTACGCTGCGAGGTGACCC ACCAGGGCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACGGGGCGAGTGT
12225		
配列番号 143 (Kabat)	HCDR1	SYTIS
配列番号 144 (Kabat)	HCDR2	WIKPAFGTANYAQKFQG
配列番号 145 (Kabat)	HCDR3	GSFWFGY
配列番号 146 (Chothia)	HCDR1	GGTFSSY
配列番号 147 (Chothia)	HCDR2	KPAFGT
配列番号 148 (Chothia)	HCDR3	GSFWFGY
配列番号 149	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSYTIISWVRQAPGQGLEWMGWIKPAFGTANY AQKFQGRVTITADESTSTAYMELSLRSEDAVYYCARGSFVFGYWGQGLTLTVSS
配列番号 150	DNA VH	CAGGTGCAATTGGTGAGAGCGGTGCCGAAGTGAAAAACCGGGCAGCAGCGTGAAAG TTAGCTGCAAGCATCCGGAGGGACGTTTCTTCTTACACTATCTTTGGGTGCGCCAGG CCCCGGGCCAGGGCTCGAGTGATGGCTGGATCAAAACCGCTTTCGGCACTGCGAAC TACGCCAGAAATTCAGGGCCGGGTGACCATACCGCCGATGAAAGCACCAGCACCGC CTATATGGAAGTGAAGCAGCTGCGCAGCGAAGATACGGCGTGATTATTGCGCGCGTG GTTCTTCTGGTTCGGTTACTGGGGCAAGGCACCTGGTGACTGTTAGCTCA
配列番号 151	重鎖	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSYTIISWVRQAPGQGLEWMGWIKPAFGTANY AQKFQGRVTITADESTSTAYMELSLRSEDAVYYCARGSFVFGYWGQGLTLTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKTHCTCPPELGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKEYCKVSNKALPAPIETISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEVESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSTMHEALHINH YTQKSLSLSPGK
配列番号 152	重鎖DNA	CAGGTGCAATTGGTGAGAGCGGTGCCGAAGTGAAAAACCGGGCAGCAGCGTGAAAG TTAGCTGCAAGCATCCGGAGGGACGTTTCTTCTTACACTATCTTTGGGTGCGCCAGG

10

20

30

40

【表 2 - 1 3】

		CCCCGGCCAGGGCCTCGAGTGGATGGCTGGATCAACCGGCTTCGGCACTGCGAAC TACGCCAGAAATTCAGGGCGGGTGACCATACCGCCGATGAAAGCACCAGCACCGC CTATATGGAAGTGAAGCAGCTGCGCAGCGAAGATACGCGCTGATTATTGCGCGCGTG GTTCTTTCTGGTTGGTTACTGGGGCCAAAGGACCCCTGGTACTGTTAGCTCAGCCTCCA CCAAGGTCCTATCGGTCTTCCCTGGCACCTCTCTCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAG CGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAC TCAGGCGCCTGACCAAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTC TACTCCCTCAGCAGCGTGGTACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATC TGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAATC TTGTGACAAACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACCTCTGGGGGACCGTC AGTCTTCTCTTCCCGCCAAACCCAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC ACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGT GGACGCGCTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAGCCGCGGAGGAGCAGTACAACAG CACGTACCGGGTGGTCAAGCTCTCACCCTCTGACCAAGGACTGGTGAATGGCAAGG AGTACAAGTGAAGGTCTCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAACCATCTCCA AAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAGAGGTGACACCTTCCCCCATCCCGGGAGGA GATGACCAAGAACAGGTGACCTGACCTGCTGTTCAAGGCTTCTATCCAGCGACAT CGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACTACAAGACCAGCCTCCC GTGCTGGACTCCGACGGCTCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGCAAGAGCAGG TGGCAGCAGGGGAACGCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCTAC ACCGAGAAGGACCTCTCCCTGTCTCCGGTAAA
配列番号 153 (Kabat)	LCDR1	RASQGINNYLN
配列番号 154 (Kabat)	LCDR2	DASKLQS
配列番号 155 (Kabat)	LCDR3	QQYLQYPMT
配列番号 156 (Chothia)	LCDR1	SQGINNY
配列番号 157 (Chothia)	LCDR2	DAS
配列番号 158 (Chothia)	LCDR3	YLQYPM
配列番号 159	VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRASQGINNYLNWYQKPKAPKLIYDASKLQSGVPSRFS GSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQYLQYPMITFGQGTKVEIK
配列番号 160	DNA VL	GATATCCAGATGACCCAGAGCCGAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGATCGCGTGA CCATTACCTGCAGAGCCAGCCAGGGTATTAACAACCTGAACTGGTACCAGCAGAAA CCGGGCAAAGCGCCGAACTATTAATCTACGACGCTTCTAACTGCAAGCGCGGTGCC GAGCCGCTTTAGCGGCAGCGGATCCGACACCGATTTACCCCTGACCATAGCTCTCTGCA ACCGGAAGACTTTGCGACCTATTATTGCCAGCAGTACCTGCAGTACCCGATGACCTTTGG CCAGGGCACGAAAGTTGAAATTAAC
配列番号 161	軽鎖	DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRASQGINNYLNWYQKPKAPKLIYDASKLQSGVPSRFS GSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQYLQYPMITFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
配列番号 162	軽鎖DNA	GATATCCAGATGACCCAGAGCCGAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGATCGCGTGA CCATTACCTGCAGAGCCAGCCAGGGTATTAACAACCTGAACTGGTACCAGCAGAAA CCGGGCAAAGCGCCGAACTATTAATCTACGACGCTTCTAACTGCAAGCGCGGTGCC GAGCCGCTTTAGCGGCAGCGGATCCGACACCGATTTACCCCTGACCATAGCTCTCTGCA ACCGGAAGACTTTGCGACCTATTATTGCCAGCAGTACCTGCAGTACCCGATGACCTTTGG CCAGGGCACGAAAGTTGAAATTAACGTAACGTTGGCGCTCCAGCGTGTTCATCTTCC CCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTCTGTGAACAAC TCTACCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAA CAGCCAGGAAAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGC ACCCGTGACCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCTGCGAGGTGA CCCACAGGGCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGCGAGTGT
12981		

10

20

30

40

【表 2 - 1 4】

配列番号 163 (Kabat)	HCDR1	TYAMH
配列番号 164 (Kabat)	HCDR2	GIPIFGIANYAQKFQG
配列番号 165 (Kabat)	HCDR3	DDYSTYAFAY
配列番号 166 (Chothia)	HCDR1	GGTFRTY
配列番号 167 (Chothia)	HCDR2	IPIFGI
配列番号 168 (Chothia)	HCDR3	DDYSTYAFAY
配列番号 169	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFRITYAMHWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGIANY AQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDAVYYCARDYSTYAFAYWGQGLTVVSS
配列番号 170	DNA VH	CAGGTGCAATTGGTGACAGCGGTGCCGAAGTAAAAACCGGGCAGCAGCGTGAAAG TTAGCTGCAAAGCATCCGGAGGGACGTTTCGTACTTACGCTATGCAATTGGTGCGCCAG GCCCGGGGCGAGGGCTCGAGTGGATGGGCGGTATCATCCGATCTTCGGCATCGCGAA CTACGCCAGAAATTTACGGGCCGGTGACCATACCGCCGATGAAAGCACCAGCACCG CCTATATGGAACAGCAGCGCTGCGCAGCGAAGATACGGCCGTGTATTATGCGCGCGT GACGACTACTCTACTTACGCTTTCGCTTACTGGGGCCAAGGCACCTGCTGACTGTTAGC TCA
配列番号 171	重鎖	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFRITYAMHWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGIANY AQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDAVYYCARDYSTYAFAYWGQGLTVVSSASTK GPSVFLAPSSKSTSGGTAAALCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKCDKTHITCPPCPAPELLGGPSVFLPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSYMHLEAL HNHYTQKSLSPGK
配列番号 172	重鎖DNA	CAGGTGCAATTGGTGACAGCGGTGCCGAAGTAAAAACCGGGCAGCAGCGTGAAAG TTAGCTGCAAAGCATCCGGAGGGACGTTTCGTACTTACGCTATGCAATTGGTGCGCCAG GCCCGGGGCGAGGGCTCGAGTGGATGGGCGGTATCATCCGATCTTCGGCATCGCGAA CTACGCCAGAAATTTACGGGCCGGTGACCATACCGCCGATGAAAGCACCAGCACCG CCTATATGGAACAGCAGCGCTGCGCAGCGAAGATACGGCCGTGTATTATGCGCGCGT GACGACTACTCTACTTACGCTTTCGCTTACTGGGGCCAAGGCACCTGCTGACTGTTAGC TCAGCCTCCACCAAGGGTCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCTCTCCAGAGCACCTCTG GGGGCAGCAGCGCCCTGGGCTGCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCGGTGACGGT GTCGTGGAACCTAGGCGCCCTGACAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGCTCTACAGTC CTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCA GACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTG AGCCCAATCTTGTGACAAAACCTCACATGCCCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGG GGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGA CCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTC AATGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCCGGGAGGAGC AGTACAACAGCAGCTACCGGGTGGTACGCTCCTACCGTCTGCAACAGGACTGGCTG AATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAA AACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCAT CCCGGGAGGAGATGACCAAGAACAGGTGACCTGACCTGGCTCAAAGGCTTCTAT CCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAACAACAACAAGA CCACGCTCCCGTGGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCTCTACAGCAAGCTACCGTGG ACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACTCTTCTCATGCTCCGTGATGATGAGGCTCTG CACAACCACTACACGAGAAGAGCTCTCCCTGCTCCGGGTA
配列番号 173 (Kabat)	LCDR1	RASQSIASYLA
配列番号 174 (Kabat)	LCDR2	DASNLQS
配列番号 175 (Kabat)	LCDR3	QQAYKTPYT
配列番号 176 (Chothia)	LCDR1	SQSIASY

10

20

30

40

【表 2 - 1 5】

配列番号 177 (Chothia)	LCDR2	DAS
配列番号 178 (Chothia)	LCDR3	AYKTPY
配列番号 179	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSIASYLAWYQQKPKGAPKLLIYDASNLQSGVPSRFS GSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQAYKTPYTFGGQTKVEIK
配列番号 180	DNA VL	GATATCCAGATGACCCAGAGCCGAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGATCGCGTGA CCATTACCTGCAGAGCCAGCCAGTCTATTGCTTCTTACCTGGCTTGGTACCAGCAGAAAC CGGGCAAAGCGCCGAAACTATTAATCTACGACGCTTCTAACCTGCAAAGCGGCGTGCCG AGCCGCTTTAGCGGCAGCGGATCCGGCACCGATTACCCCTGACCATTAGCTCTCTGCAA CCGGAAGACTTTGCGACCTATTATTGCCAGCAGGCTTACAAAACCTCCGTACACCTTTGGC CAGGGCACGAAAGTTGAAATTA
配列番号 181	軽鎖	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSIASYLAWYQQKPKGAPKLLIYDASNLQSGVPSRFS GSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQAYKTPYTFGGQTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSTLTLSKADYEKH KVVAACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
配列番号 182	軽鎖DNA	GATATCCAGATGACCCAGAGCCGAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGATCGCGTGA CCATTACCTGCAGAGCCAGCCAGTCTATTGCTTCTTACCTGGCTTGGTACCAGCAGAAAC CGGGCAAAGCGCCGAAACTATTAATCTACGACGCTTCTAACCTGCAAAGCGGCGTGCCG AGCCGCTTTAGCGGCAGCGGATCCGGCACCGATTACCCCTGACCATTAGCTCTCTGCAA CCGGAAGACTTTGCGACCTATTATTGCCAGCAGGCTTACAAAACCTCCGTACACCTTTGGC CAGGGCACGAAAGTTGAAATTAACGTAACGTTGCGGCGCTCCAGCGTGTTCATCTTCCC CCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGACCGCCAGCGTGGTGTGCTGCTGAACAACCTT CTACCCCGGAGGCCAAGGTGCAAGTGAAGGTGGACAAACCCCTGCAAGCGGCAAC AGCCAGGAAAGCTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCTGAGCAGCA CCCTGACCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCTGCGAGGTGACC CACCAGGGCTGTCCAGCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGT
20364		
配列番号 183 (Kabat)	HCDR1	SYTMN
配列番号 184 (Kabat)	HCDR2	RVKGEQFGGSIHYAASVKG
配列番号 185 (Kabat)	HCDR3	ERSRAGSIFDP
配列番号 186 (Chothia)	HCDR1	GFTFSSY
配列番号 187 (Chothia)	HCDR2	KGEQFGGS
配列番号 188 (Chothia)	HCDR3	ERSRAGSIFDP
配列番号 189	VH	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTSSYTMNWVRQAPGKLEWVGRVKGEQFGGSI HYAASVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCARERSRAGSIFDPWGQGLVTVSS
配列番号 190	DNA VH	CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGCGGTGGCTGGTGAAACAGGCGGCAGCCTGCGCC TGAGCTGCGCGCCTCCGGATTACCTTTTCTTACTACTATGAAGTGGTGCGCCAGG CCCGGGCAAAGGTCTCGAGTGGGTGGCCGTGTTAAAGGTGAACAGTTCGCGCGTTCT ATCCATTATGCCGCTCTGTGAAAGGCGCTTTACCATTAGCCGCGATGATTCGAAAAAC ACCCGTGATCTGCAATGAACAGCCTGAAACCGAAGATACGCGCGTGTATTATGCGCG CGTGAAACGTTCTCGTGTGTTCTATCTTCGATCCGTGGGGCCAAGGCACCTGGTGACT GTTAGCTCA
配列番号 191	重鎖	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTSSYTMNWVRQAPGKLEWVGRVKGEQFGGSI HYAASVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCARERSRAGSIFDPWGQGLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAAGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPSCKDTHKTCPPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTSKAGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMH

10

20

30

40

【表 2 - 16】

		EALHNHYTKSLSPGK
配列番号 192	重鎖DNA	CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGCGGTGGCTGGTGAAACAGGCGGCAGCCTGCGCC TGAGCTGCGCCGCTCCGATTACCTTTCTTCTTACACTATGAACGGGTGCGCCAGG CCGCGGCAAGGTCTCGAGTGGTGGCGGTGTTAAAGGTGAACAGTTCGCGGTTCT ATCATTATGCCGCTCTGTGAAAGGCGCTTTACCTAGGCGGATGATCGAAAAAC ACCCTGATCTGCAATGAACAGCCTGAAACCGAAGATACGCGCGTGTATTATTGCGCG CGTGAACGTTCTCGTCTGTTCTATCTCGATCGTGGGGCCAAGGCACCTCGTGACT GTTAGCTCAGCTCCACCAAGGTTCCATCGGTCTTCCCTGGCACCTCTCCAAGAGC ACCTCTGGGGGACAGCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTCCCCGAACCGGT GACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCTGACACGCGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCC TACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCTGCCCTCCAGCAGCTTG GCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACCAAGGTGGACAAG AGAGTTGAGCCAAATCTGTGACAAAACACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAA CTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCT CCGGACCCCTGAGGTGATCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGAACCCCTGAGGT CAAGTTCACTGAGTGGACGCGGTGGAGGTGATAATGCCAAGCAAAAGCGCGG GAGGAGCAGTACAACAGCAGTACCGGGTGGTCAAGGTCTCACCCTCTGCACAGGA CTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCA TCAGAAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGCGAGCCCGAGAACCAAGGTGTACACCTG CCCCCTCCGCGGAGGAGATGACCAAGAACAGGTGACCTGACCTGCTGCTCAAGG CTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGAGCCGAGAACAACT ACAAGACCACGCTCCCGTGTGAGTCCGACGCTCTTCTCTACAGCAAGCTCA CCGTGGAACAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAACGCTTCTCATGCTCGGTGATGATGA GGCTCGACAAACCACTACACGAGAAGACCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
配列番号 193 (Kabat)	LCDR1	SGSSNIGFNYS
配列番号 194 (Kabat)	LCDR2	YNNQRPS
配列番号 195 (Kabat)	LCDR3	STWTGTSESHV
配列番号 196 (Chothia)	LCDR1	SSNIGFNY
配列番号 197 (Chothia)	LCDR2	YNN
配列番号 198 (Chothia)	LCDR3	WTGTSESH
配列番号 199	VL	DIVLTQPPSVSGAPGQVRVTSVSGSSNIGFNYSWYQQLPGTAPKLIYYNNQRPSGVPDRF SGSKSGTSASLAITGLQAEADYYCSTWTGTSESHVFGGGTKLTVL
配列番号 200	DNA VL	GATATCGTGCTGACCCAGCGCCGAGCGTGAGCGGTGCACCGGGCCAGCGCGTGACCA TTAGCTGTAGCGGCAGCAGCAGCAACATTGGTTTCAACTACGTGTCTTGTACCAGCAGC TGCCGGGCACGCGCGGAACTGCTGATCTACTACAACAACAGCGCCGAGCGGCGTG CCGGATCGCTTTAGCGGATCCAAAAGCGGCACGCGCCAGCCTGGCGATTACCGGCCT GCAAGCAGAAGACGAAGCGGATTATTACTGCTCTACTGGACTGGTACTCTGAATCTCA TGTGTTTGGCGCGGCACGAAGTTAACCGTCCTA
配列番号 201	軽鎖	DIVLTQPPSVSGAPGQVRVTSVSGSSNIGFNYSWYQQLPGTAPKLIYYNNQRPSGVPDRF SGSKSGTSASLAITGLQAEADYYCSTWTGTSESHVFGGGTKLTVLQPKAAPSVTLFPPSS EELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPPSKQSNINNYAASSYLSLPEQ WKSHRSYSQVTHEGSTVEKTVAPTECS
配列番号 202	軽鎖DNA	GATATCGTGCTGACCCAGCGCCGAGCGTGAGCGGTGCACCGGGCCAGCGCGTGACCA TTAGCTGTAGCGGCAGCAGCAGCAACATTGGTTTCAACTACGTGTCTTGTACCAGCAGC TGCCGGGCACGCGCGGAACTGCTGATCTACTACAACAACAGCGCCGAGCGGCGTG CCGGATCGCTTTAGCGGATCCAAAAGCGGCACGCGCCAGCCTGGCGATTACCGGCCT GCAAGCAGAAGACGAAGCGGATTATTACTGCTCTACTGGACTGGTACTCTGAATCTCA TGTGTTTGGCGCGGCACGAAGTTAACCGTCCTAGTGCAGCCAAAGGCTGCCCTCGG TCACTCTGTTCCCGCCTCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTC TCATAAGTGACTTCTACCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCC GTCAAGGCGGAGTGAGACCAACCAACCTCCAAACAAGCAACAAGTACGCGG CCAGCAGTATCTGAGCTGACGCTGAGCAGTGGAAAGTCCACAGAAGCTACAGCTGC

10

20

30

40

【表 2 - 17】

		CAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCTACAGAATGTTCA
12229		
配列番号 203 (Kabat)	HCDR1	SYTMN
配列番号 204 (Kabat)	HCDR2	RIKTKTNGGTTDYAAPVKG
配列番号 205 (Kabat)	HCDR3	ERSRAGSIFDP
配列番号 206 (Chothia)	HCDR1	GFTFSSY
配列番号 207 (Chothia)	HCDR2	KTKTNGGT
配列番号 208 (Chothia)	HCDR3	ERSRAGSIFDP
配列番号 209	VH	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYTMNWVRQAPGKLEWVGRITKTNGGTT DYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYQMNSLKTEDTAVYCARERSRAGSIFDPWGQGLTVTVSS
配列番号 210	DNA VH	CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGCGGTGGCTGGTGAAACAGCGCGCAGCCTGCGCC TGAGCTGCGCCGCTCCGGATTACCTTTCTTCTTACACTATGAACTGGGTGCGCCAGG CCCCGGGCAAAGGTCTCGAGTGGGTGGGCGTATCAAACTAAACTAACGGTGGTACT ACTGACTATGCGCCCGCAGTGAAAGGCGCTTACCATTAGCGCGATGATTGAAAAAC ACCGTGATCTGCAATGAACAGCCTGAAACCGAAGATACGGCGGTGATTATTGCGCG CGTGAACGTTCTCGTCTGTTCTATCTTCGATCCGTGGGGCCAAGGCACCTGGTGACT GTTAGCTCA
配列番号 211	重鎖	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYTMNWVRQAPGKLEWVGRITKTNGGTT DYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYQMNSLKTEDTAVYCARERSRAGSIFDPWGQGLTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAAGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEKSCDKHTHTCPPAPELGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
配列番号 212	重鎖DNA	CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGCGGTGGCTGGTGAAACAGCGCGCAGCCTGCGCC TGAGCTGCGCCGCTCCGGATTACCTTTCTTCTTACACTATGAACTGGGTGCGCCAGG CCCCGGGCAAAGGTCTCGAGTGGGTGGGCGTATCAAACTAAACTAACGGTGGTACT ACTGACTATGCGCCCGCAGTGAAAGGCGCTTACCATTAGCGCGATGATTGAAAAAC ACCGTGATCTGCAATGAACAGCCTGAAACCGAAGATACGGCGGTGATTATTGCGCG CGTGAACGTTCTCGTCTGTTCTATCTTCGATCCGTGGGGCCAAGGCACCTGGTGACT GTTAGCTCAGCTCCACCAAGGTCATCGGTCTCCCTGCGCACCTCTCCCAAGAGC ACCTCTGGGGGCACAGCGCCCTGGGCTGCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCAGGT GACGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGTGTCC TACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTCCCTCAGCAGCTTGG GCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAG AGAGTTGAGCCCAATCTTGTGACAAACTCACATGCCCAACGTGCCAGCACCTGAA CTCCTGGGGGACGTCAGTCTTCTTCTCCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCT CCCGGACCCCTGAGGTCAATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGT CAAGTTCAACTGGTACGTGGACGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGG GAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGTGACGCTCTCACCGTCTGCACCAAGGA CTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCA TCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTG CCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACAGGTGACCTGACCTGCTGGTCAAGG CTTCTATCCAGCGACATCGCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAGAACT ACAAGACCACGCTCCCGTGTGACTCCGACGGCTCTTCTCTCTACAGCAAGCTCA CCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTATGCTCCGTGATGCATGA GGCTCTGCACAACCTACACGCAGAAGAGCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
配列番号 213 (Kabat)	LCDR1	SGSSSNIGFNIVYS
配列番号 214 (Kabat)	LCDR2	YNNQRPS

10

20

30

40

【表 2 - 18】

配列番号 215 (Kabat)	LCDR3	STWTGTSESHV
配列番号 216 (Chothia)	LCDR1	SSSNIGFNY
配列番号 217 (Chothia)	LCDR2	YNN
配列番号 218 (Chothia)	LCDR3	WTGTSESH
配列番号 219	VL	DIVLTQPPSVSGAPGQVRVTISCSGSSNIGFNYVSWYQLPGTAPKLLIYYNNQRPSPGVPDRF SGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCSTWTGTSESHVFGGGTKLTVL
配列番号 220	DNA VL	GATATCGTGCTGACCCAGCCGCGAGCGTGAGCGGTGCACCGGGCCAGCGCGTGACCA TTAGCTGTAGCGGCAGCAGCAGCAACATTGGTTTCAACTACGTGCTTGGTACCAGCAGC TGCCGGGCACGGCGCCGAACTGCTGATCTACTACAACAACGCGCCGAGCGCGGTG CCGGATCGCTTTAGCGGATCCAAAAGCGGCACGCGCCAGCTGGCGATTACCGGCCT GCAAGCAGAAGACGAAGCGGATTATTACTGCTCTACTTGGACTGGTACTTCTGAATCTCA TGTGTTTGGCGCGGCACGAAGTTAACCGTCTCA
配列番号 221	軽鎖	DIVLTQPPSVSGAPGQVRVTISCSGSSNIGFNYVSWYQLPGTAPKLLIYYNNQRPSPGVPDRF SGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCSTWTGTSESHVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSS EELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSPVKAGVETTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQ WKSHRSYSQVTHEGSTVEKTVAPTECS
配列番号 222	軽鎖DNA	GATATCGTGCTGACCCAGCCGCGAGCGTGAGCGGTGCACCGGGCCAGCGCGTGACCA TTAGCTGTAGCGGCAGCAGCAGCAACATTGGTTTCAACTACGTGCTTGGTACCAGCAGC TGCCGGGCACGGCGCCGAACTGCTGATCTACTACAACAACGCGCCGAGCGCGGTG CCGGATCGCTTTAGCGGATCCAAAAGCGGCACGCGCCAGCTGGCGATTACCGGCCT GCAAGCAGAAGACGAAGCGGATTATTACTGCTCTACTTGGACTGGTACTTCTGAATCTCA TGTGTTTGGCGCGGCACGAAGTTAACCGTCTAGGTGACCCAAAGCTGCCCCCTCGG TCACTCTGTTCCCGCCCTCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTC TCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCGGTGACAGTGGCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCC GTCAAGCGGGAGTGAGAGCACCAACCCCTCCAAACAAGCAACAACAAGTACGCGG CCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCTGAGCAGTGAAGTCCACAGAAGCTACAGCTGC CAGGTACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCTACAGAATGTTCA
ICD3 Ab		
配列番号 223 (Kabat)	HCDR1	KNAYMC
配列番号 224 (Kabat)	HCDR2	CIETGDGTTYASWAKG
配列番号 225 (Kabat)	HCDR3	ELYDDYGDYFNL
配列番号 226 (Chothia)	HCDR1	GFSTKNA
配列番号 227 (Chothia)	HCDR2	ETGDGT
配列番号 228 (Chothia)	HCDR3	ELYDDYGDYFNL
配列番号 229	VH	QSLSESGDLVKPGASLTLTCTASGFSFTKNAYMCWDRQAPGKRPEWIACIETGDGTTYAS WAKGRFTVSKTSSTTVTLQMTSLTAADTATYFCARELYDDYGDYFNLWGPGLVTVSS
配列番号 230	DNA VH	CAGTCGTTGGAGGAGTCTGGGGGAGACCTGGTCAAGCTGGGGCATCCCTGACACTCAC CTGCACAGCCTCTGGATTCTCTTCACTAAGAACGCTACATGTGCTGGGACGCCAGGC TCCAGGGAAGAGGCTGAGTGATCGATGCATTGAGACTGGTGACGGCACCATATT ATGCGAGCTGGGCGAAAGGCGGATTACCGTCTCCAAACCTCGTCGACCACGGTGA CTGCAAAATGACCACTGACAGCGCGGACACGCCACCTATTCTGTGCGAGGGAATT ATACGATGACTATGGTGATTACTTCAATTTGTGGGGCCAGGCACCTGGTCACCGTCTC CTCA
配列番号 231	重鎖	QSLSESGDLVKPGASLTLTCTASGFSFTKNAYMCWDRQAPGKRPEWIACIETGDGTTYAS WAKGRFTVSKTSSTTVTLQMTSLTAADTATYFCARELYDDYGDYFNLWGPGLVTVSSGQP KAPSVFPLAPCCGDTSPSTVTLGCLVKGYLPEPVTVTVNSGTLTNGVRTFPPSVROSSGLYSLSS VSVTSSSQPVTCNVAHPATNTKVDKTVAPSTCSKPTCPPELLGGPSVFIHPKPKDTLMISR

10

20

30

40

【表 2 - 1 9】

		TPEVTCVVVDVSQDDPEVQFTWYINNEQVTRARPPLEQQFNSTRIVSTLPIAHQDWLRLG KEFKCKVHNKALPAIEKTIKARGQPLEPKVYTMGPPREELSSRSVSLTCMINGFYPSDISVE WEKNGKAEDNYKTTPAVLDSGYSFLYSKLSVPTSEWQRGDVFTCSVMHEALHNHYTQKSI SRSPGK
配列番号 232	重鎖DNA	CAGTCGTTGGAGGAGTCTGGGGGAGACCTGGTCAAGCCTGGGGCATCCCTGACACTCAC CTGCACAGCCTCTGGATTCTCCTTCACTAAGAACGCCTACATGTCTGGGACCGCCAGGC TCCAGGGAAGAGGCTGAGTGGATCGCATGCATTGAGACTGGTGACGGCACCACATATT ATGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTACCGTCTCCAAACCTCGTCGACCCAGGTGACT CTGCAATGACCAGTCTGACAGCGGGACACGGCCACCTATTTCTGTGCGAGGGAATT ATACGATGACTATGGTGATTACTTCAATTTGTGGGGCCAGGCACCTGGTACCGCTCTC CTCAGGGCAACCTAAGGCTCCATCAGTCTTCCACTGGCCCCCTGCTGCGGGGACACACC CAGCTCCAGGTGACCTGGGCTGCTGTGTCAGGGTACCTCCCGGAGCCAGTGACCG TGACCTGGAACCTCGGGCACCCTACCAATGGGGTACGCACCTTCCGTCCTCGGCGAGT CCTCAGGCTCTACTCGTCTGACGAGCGTGTGAGCGTGACCTCAAGCAGCCAGCCGTC ACCTGCAACGTGGCCCCACCCAGCCACCAACACCAAGTGACAAAGACCGTTGCGCCCTC GACATGCAGCAAGCCACGTGCCACCCCTGAACCTCTGGGGGACCGTCTGTCTTCAT CTTCCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCACGACCCCCGAGGTACATGCGT GGTGGTGACGTGAGCCAGGATGACCCGAGGTGACATGATGATACATAAACAC GAGCAGGTGCGCAGCCCGCGCCGCTACGGGAGCAGCAGTTCAACAGCAGCATCC GCGTGTGACGACCTCCCATCGCGCAGCAGGACTGGCTGAGGGGCAAGGAGTTCAA GTGCAAGTCCACAACAGGCACTCCGGCCCCATCGAGAAACCATCTCAAAGCCA GAGGGCAGCCCTGGAGCCGAAGGTCTACCATGGGCCCTCCCGGGAGGAGCTGAG CAGCAGGTGCGTACGCTGACCTGATGATCAAGCGCTTCTACCTTCCGACATCTCGGT GGAGTGGGAGAAGAAGCGGAAGGCAGAGGACAACTACAAGACCAAGCGCGCGTGT GGACAGCGACGGCTCTACTTCTCTACAGCAAGCTCTCAGTGCCACGAGTGAGTGGC AGCGGGGCGACGTCTCACTGCTCGGTGACGAGGCGCTGCACCAACCTACACG CAGAAGTCCATCTCCGCTCTCCGGGTAA
配列番号 233 (Kabat)	LCDR1	QTSNFYSNDILS
配列番号 234 (Kabat)	LCDR2	EASTLAS
配列番号 235 (Kabat)	LCDR3	QGSVLDGWWYDIS
配列番号 236 (Chothia)	LCDR1	SENFYSNDI
配列番号 237 (Chothia)	LCDR2	EAS
配列番号 238 (Chothia)	LCDR3	SVLDGWWYDI
配列番号 239	VL	ALVMTQTPSSVSAVGGTVTINCQTSNFYSNDILSWYQKPGQPPKLLIYEASTLASGVPSR FKGSGSGTQFTLTISDVQCDDAATYYCQGSVLDGWWYDISFGGGTEVVVK
配列番号 240	DNA VL	GCCCTTGATGACCCAGACTCCATCGTCCGTGTCTGCAGCTGTGGGAGGCACAGTCACC ATCAATTGCCAGACAGTGAAGATTTTATAGTAACGACATCTTATCCTGGTATCAGCAG AAGCCAGGGCAGCCTCCCAAGCTCCTGATCTATGAAGCATCCACTCTGGCATCTGGGGTC CCCTCGCGATTCAAAGGCAGTGATCTGGGACACAGTTCACTCTCACCATCAGCGACGTG CAGTGTGACGATGCTGCCACTTACTATTGTCAAGGCAGTGTCTTGATAGTGGTGGTAC GATATTTCTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAA
配列番号 241	軽鎖	ALVMTQTPSSVSAVGGTVTINCQTSNFYSNDILSWYQKPGQPPKLLIYEASTLASGVPSR FKGSGSGTQFTLTISDVQCDDAATYYCQGSVLDGWWYDISFGGGTEVVVKGDPVAPTVLIFP PAADQVATGTVTIVCVANKYFPDVTWVEVDGTTQTGTGINSKTPQNSADCTYNLSSTLTLT STQYNSHKEYTKVTQGTSSVQSFNRGDC
配列番号 242	軽鎖DNA	GCCCTTGATGACCCAGACTCCATCGTCCGTGTCTGCAGCTGTGGGAGGCACAGTCACC ATCAATTGCCAGACAGTGAAGATTTTATAGTAACGACATCTTATCCTGGTATCAGCAG AAGCCAGGGCAGCCTCCCAAGCTCCTGATCTATGAAGCATCCACTCTGGCATCTGGGGTC CCCTCGCGATTCAAAGGCAGTGATCTGGGACACAGTTCACTCTCACCATCAGCGACGTG CAGTGTGACGATGCTGCCACTTACTATTGTCAAGGCAGTGTCTTGATAGTGGTGGTAC GATATTTCTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAAAGGTGATCCAGTTGCACCTAC TGTCTCATCTCCACCAGCTGTGATCAGGTGGCACTGGAACAGTCACCATCGTGTG

10

20

30

40

【表 2 - 2 0】

		TGTGGCGAATAAATACTTCCCGATGCTACTGTACCTGGGAGGTGGATGGACCCACCA AACAACCTGGCATCGAGAACAGTAAACACCGCAGAACTCTGCAGATTGTACCTACAACCT CAGCAGCACTCTGACACTGACCGACACAGTACAACAGCCACAAAGAGTACAACCTGCA AGGTGACCCAGGGCAGCAGCTCAGTCGTCCAGAGCTTCAATAGGGGTGACTGT
--	--	--

【0143】

本開示は、Notch3タンパク質（例えば、ヒトNotch3および／またはカニク

50

イザルN o t c h 3) に特異的に結合する抗体またはそれらの断片であって、抗体が、配列番号9、29、49、69、89、109、129、149、169、189、および209のアミノ酸配列を有するVHドメインを含む、抗体またはそれらの断片を提示する。本開示は、N o t c h 3タンパク質(例えば、ヒトN o t c h 3および/またはカニクイザルN o t c h 3) に特異的に結合する抗体またはそれらの断片であって、前記抗体が、配列番号19、39、59、79、99、119、139、159、179、199、および219のアミノ酸配列を有するVLドメインを含む、抗体またはそれらの断片を提示する。本開示はまた、N o t c h 3に特異的に結合する(例えば、ヒトN o t c h 3および/またはカニクイザルN o t c h 3) 抗体またはそれらの断片であって、前記抗体が、下記の表1に列挙されたCDRのうちのいずれか1つのアミノ酸配列を有するCDRを含む、抗体またはそれらの断片も提示する。特に、本開示は、N o t c h 3タンパク質(例えば、ヒトN o t c h 3および/またはカニクイザルN o t c h 3) に特異的に結合する抗体であって、表2に列挙されたCDRのうちのいずれかのアミノ酸配列を有する、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ以上のCDRを含む(または代替的に、これらからなる)、抗体を提示する。

【0144】

他の抗体またはそれらの断片は、アミノ酸またはアミノ酸をコードする核酸を突然変異させているが、表2に記載される配列に対して、少なくとも60、70、80、90、95、96、97、98、および99パーセントの同一性を有する、抗体またはそれらの断片を含む。いくつかの実施形態では、他の抗体またはそれらの断片は、表2に記載される配列により描示される可変領域と比較して、可変領域内の、1つ、2つ、3つ、4つ、または5つ以下のアミノ酸を突然変異させているが、実質的に同じ治療活性を保持する、突然変異体のアミノ酸配列を含む。

【0145】

これらの抗体またはそれらの断片の各々は、N o t c h 3に結合しうるので、VH、VL、全長軽鎖配列、および全長重鎖配列(アミノ酸配列およびアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列)は、「混合し、マッチさせ」て、他のN o t c h 3結合性抗体を創出することができる。このような「混合し、マッチさせた」N o t c h 3結合性抗体は、当技術分野で公知の結合アッセイ(例えば、ELISA、および実施例節に記載される他のアッセイ)を使用して調べることができる。これらの鎖を混合し、マッチさせると、特定のVH/VL対合に由来するVH配列は、構造的に類似するVH配列で置き換えられることになる。同様に、特定の全長重鎖/全長軽鎖対合に由来する全長重鎖配列は、構造的に類似する全長重鎖配列で置き換えられることになる。同様に、特定のVH/VL対合に由来するVL配列は、構造的に類似するVL配列で置き換えられることになる。同様に、特定の全長重鎖/全長軽鎖対合に由来する全長軽鎖配列は、構造的に類似する全長軽鎖配列で置き換えられることになる。

【0146】

したがって、一態様では、本開示は、配列番号9、29、49、69、89、109、129、149、169、189、および209からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、重鎖可変領域と、配列番号19、39、59、79、99、119、139、159、179、199、および219からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、軽鎖可変領域とを有する、単離モノクローナル抗体またはその断片であって、抗体が、N o t c h 3(例えば、ヒトおよび/またはカニクイザル) に特異的に結合する、単離モノクローナル抗体またはその断片を提示する。

【0147】

別の態様では、本開示は、表2に記載される、重鎖CDR1、重鎖CDR2、および重鎖CDR3と、軽鎖CDR1、軽鎖CDR2、および軽鎖CDR3とを含む、N o t c h 3抗体またはこれらの組合せを提示する。抗体の重鎖可変領域のCDR1のアミノ酸配列を、配列番号3、23、43、63、83、103、123、143、163、183、および203に示す。抗体の重鎖可変領域のCDR2のアミノ酸配列を、配列番号4、2

4、44、64、84、104、124、144、164、184、および204に示す。抗体の重鎖可変領域のCDR3のアミノ酸配列を、配列番号5、25、45、65、85、105、125、145、165、185、および205に示す。抗体の軽鎖可変領域のCDR1のアミノ酸配列を、配列番号13、33、53、73、93、113、133、153、173、193、および213に示す。抗体の軽鎖可変領域のCDR2のアミノ酸配列を、配列番号14、34、54、74、94、114、134、154、174、194、および214に示す。抗体の軽鎖可変領域のCDR3のアミノ酸配列を、配列番号15、35、55、75、95、115、135、155、175、195、および215に示す。CDR領域は、Kabatシステム (Kabat et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Chothia et al., (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia et al., (1989) Nature 342: 877-883; およびAl-Lazikani et al., (1997) J. Mol. Biol. 273, 927-948) を使用して画定する。

10

【0148】

具体的な実施形態では、Notch3に結合する抗体は、重鎖可変領域の配列番号3のCDR1；配列番号4のCDR2；配列番号5のCDR3；軽鎖可変領域の配列番号13のCDR1；配列番号14のCDR2；および配列番号15のCDR3を含む。

【0149】

具体的な実施形態では、Notch3に結合する抗体は、配列番号9のVHと、配列番号19のVLとを含む。

20

【0150】

具体的な実施形態では、Notch3に結合する抗体は、配列番号23の重鎖可変領域CDR1、配列番号24の重鎖可変領域CDR2、配列番号25の重鎖可変領域CDR3、配列番号33の軽鎖可変領域CDR1、配列番号34の軽鎖可変領域CDR2、および配列番号35の軽鎖可変領域CDR3を含む。

【0151】

具体的な実施形態では、Notch3に結合する抗体は、配列番号29のVHと、配列番号39のVLとを含む。

【0152】

具体的な実施形態では、Notch3に結合する抗体は、配列番号43の重鎖可変領域CDR1、配列番号44の重鎖可変領域CDR2、配列番号45の重鎖可変領域CDR3、配列番号53の軽鎖可変領域CDR1、配列番号54の軽鎖可変領域CDR2、および配列番号55の軽鎖可変領域CDR3を含む。

30

【0153】

具体的な実施形態では、Notch3に結合する抗体は、配列番号49のVHと、配列番号59のVLとを含む。

【0154】

具体的な実施形態では、Notch3に結合する抗体は、配列番号63の重鎖可変領域CDR1、配列番号64の重鎖可変領域CDR2、配列番号65の重鎖可変領域CDR3、配列番号73の軽鎖可変領域CDR1、配列番号74の軽鎖可変領域CDR2、および配列番号75の軽鎖可変領域CDR3を含む。

40

【0155】

具体的な実施形態では、Notch3に結合する抗体は、配列番号69のVHと、配列番号79のVLとを含む。

【0156】

具体的な実施形態では、Notch3に結合する抗体は、配列番号83の重鎖可変領域CDR1、配列番号84の重鎖可変領域CDR2、配列番号85の重鎖可変領域CDR3、配列番号93の軽鎖可変領域CDR1、配列番号94の軽鎖可変領域CDR2、および配列番号95の軽鎖可変領域CDR3を含む。

【0157】

50

具体的な実施形態では、N o t c h 3 に結合する抗体は、配列番号 8 9 の V H と、配列番号 9 9 の V L とを含む。

【0158】

具体的な実施形態では、N o t c h 3 に結合する抗体は、配列番号 1 0 3 の重鎖可変領域 C D R 1、配列番号 1 0 4 の重鎖可変領域 C D R 2、配列番号 1 0 5 の重鎖可変領域 C D R 3、配列番号 1 1 3 の軽鎖可変領域 C D R 1、配列番号 1 1 4 の軽鎖可変領域 C D R 2、および配列番号 1 1 5 の軽鎖可変領域 C D R 3 を含む。

【0159】

具体的な実施形態では、N o t c h 3 に結合する抗体は、配列番号 1 0 9 の V H と、配列番号 1 1 9 の V L とを含む。

10

【0160】

具体的な実施形態では、N o t c h 3 に結合する抗体は、配列番号 1 2 3 の重鎖可変領域 C D R 1、配列番号 1 2 4 の重鎖可変領域 C D R 2、配列番号 1 2 5 の重鎖可変領域 C D R 3、配列番号 1 3 3 の軽鎖可変領域 C D R 1、配列番号 1 3 4 の軽鎖可変領域 C D R 2、および配列番号 1 3 5 の軽鎖可変領域 C D R 3 を含む。

【0161】

具体的な実施形態では、N o t c h 3 に結合する抗体は、配列番号 1 2 9 の V H と、配列番号 1 3 9 の V L とを含む。

【0162】

具体的な実施形態では、N o t c h 3 に結合する抗体は、配列番号 1 4 3 の重鎖可変領域 C D R 1、配列番号 1 4 4 の重鎖可変領域 C D R 2、配列番号 1 4 5 の重鎖可変領域 C D R 3、配列番号 1 5 3 の軽鎖可変領域 C D R 1、配列番号 1 5 4 の軽鎖可変領域 C D R 2、および配列番号 1 5 5 の軽鎖可変領域 C D R 3 を含む。

20

【0163】

具体的な実施形態では、N o t c h 3 に結合する抗体は、配列番号 1 4 9 の V H と、配列番号 1 5 9 の V L とを含む。

【0164】

具体的な実施形態では、N o t c h 3 に結合する抗体は、配列番号 1 6 3 の重鎖可変領域 C D R 1、配列番号 1 6 4 の重鎖可変領域 C D R 2、配列番号 1 6 5 の重鎖可変領域 C D R 3、配列番号 1 7 3 の軽鎖可変領域 C D R 1、配列番号 1 7 4 の軽鎖可変領域 C D R 2、および配列番号 1 7 5 の軽鎖可変領域 C D R 3 を含む。

30

【0165】

具体的な実施形態では、N o t c h 3 に結合する抗体は、配列番号 1 6 9 の V H と、配列番号 1 7 9 の V L とを含む。

【0166】

具体的な実施形態では、N o t c h 3 に結合する抗体は、配列番号 1 8 3 の重鎖可変領域 C D R 1、配列番号 1 8 4 の重鎖可変領域 C D R 2、配列番号 1 8 5 の重鎖可変領域 C D R 3、配列番号 1 9 3 の軽鎖可変領域 C D R 1、配列番号 1 9 4 の軽鎖可変領域 C D R 2、および配列番号 1 9 5 の軽鎖可変領域 C D R 3 を含む。

【0167】

具体的な実施形態では、N o t c h 3 に結合する抗体は、配列番号 1 8 9 の V H と、配列番号 1 9 9 の V L とを含む。

40

【0168】

具体的な実施形態では、N o t c h 3 に結合する抗体は、配列番号 2 0 3 の重鎖可変領域 C D R 1、配列番号 2 0 4 の重鎖可変領域 C D R 2、配列番号 2 0 5 の重鎖可変領域 C D R 3、配列番号 2 1 3 の軽鎖可変領域 C D R 1、配列番号 2 1 4 の軽鎖可変領域 C D R 2、および配列番号 2 1 5 の軽鎖可変領域 C D R 3 を含む。

【0169】

具体的な実施形態では、N o t c h 3 に結合する抗体は、配列番号 2 0 9 の V H と、配列番号 2 1 9 の V L とを含む。

50

【0170】

具体的な実施形態では、N o t c h 3 に結合する抗体は、配列番号 2 2 3 の重鎖可変領域 C D R 1、配列番号 2 2 4 の重鎖可変領域 C D R 2、配列番号 2 2 5 の重鎖可変領域 C D R 3、配列番号 2 3 3 の軽鎖可変領域 C D R 1、配列番号 2 3 4 の軽鎖可変領域 C D R 2、および配列番号 2 3 5 の軽鎖可変領域 C D R 3 を含む。

【0171】

具体的な実施形態では、N o t c h 3 に結合する抗体は、配列番号 2 2 9 の V H と、配列番号 2 3 9 の V L とを含む。

【0172】

一実施形態では、N o t c h 3 抗体は、アンタゴニスト抗体である。ある種の実施形態では、N o t c h 3 に結合する抗体は、表 2 に記載される抗体である。

10

【0173】

一実施形態では、本発明は、N o t c h 3 受容体のコンフォメーションルエピトープを認識する単離抗体またはその断片であって、コンフォメーションルエピトープが、N o t c h 3 受容体の N R R ドメインの、L N R (Lin Notch Repeat) 領域内、ヘテロ二量体化 (H D) ドメイン内、およびリンカー領域内の、連続アミノ酸配列および非連続アミノ酸配列を含み、L N R 領域が、L N R - A、L N R - B、L N R - C からなる群から選択され、H D ドメインが、N 末端 H D および C 末端 H D からなる群から選択され、抗体またはその断片が、リガンド依存性シグナル伝達を遮断し、抗体またはその断片が、N o t c h 3 受容体の L N R 領域を、自己阻害状態で安定化させる、単離抗体またはその断片に関する。

20

【0174】

一実施形態では、本発明は、N o t c h 3 受容体のコンフォメーションルエピトープを認識する単離抗体またはその断片であって、コンフォメーションルエピトープが、N o t c h 3 受容体の N R R ドメインの、L N R (Lin Notch Repeat) 領域内、ヘテロ二量体化 (H D) ドメイン内、およびリンカー領域内の、連続アミノ酸配列および非連続アミノ酸配列を含み、L N R 領域が、L N R - A、L N R - B、L N R - C からなる群から選択され、H D ドメインが、N 末端 H D および C 末端 H D からなる群から選択され、抗体またはその断片が、リガンド依存性シグナル伝達を遮断し、抗体またはその断片が、N o t c h 3 受容体の L N R 領域を、自己阻害状態で安定化させ、L N R 領域または H D ドメインが、少なくとも 1 カ所のアミノ酸残基の突然変異を有する、単離抗体またはその断片に関する。

30

【0175】

一実施形態では、本発明は、N o t c h 3 受容体のコンフォメーションルエピトープを認識する単離抗体またはその断片であって、コンフォメーションルエピトープが、N o t c h 3 受容体の N R R ドメインの、L N R (Lin Notch Repeat) 領域内、ヘテロ二量体化 (H D) ドメイン内、およびリンカー領域内の、連続アミノ酸配列および非連続アミノ酸配列を含み、L N R 領域が、L N R - A、L N R - B、L N R - C からなる群から選択され、H D ドメインが、N 末端 H D および C 末端 H D からなる群から選択され、抗体またはその断片が、リガンド依存性シグナル伝達を遮断し、抗体またはその断片が、N o t c h 3 受容体の L N R 領域を、自己阻害状態で安定化させ、L N R 領域または H D ドメインが、少なくとも 1 カ所のアミノ酸残基の突然変異を有する、単離抗体またはその断片に関する。

40

【0176】

一実施形態では、本発明は、N o t c h 3 受容体のコンフォメーションルエピトープを認識する単離抗体またはその断片であって、コンフォメーションルエピトープが、N o t c h 3 受容体の N R R ドメインの、L N R (Lin Notch Repeat) 領域内、ヘテロ二量体化 (H D) ドメイン内、およびリンカー領域内の、連続アミノ酸配列および非連続アミノ酸配列を含み、L N R 領域が、L N R - A、L N R - B、L N R - C からなる群から選択され、H D ドメインが、N 末端 H D および C 末端 H D からなる群から選択され、抗体または

50

その断片が、リガンド依存性シグナル伝達を遮断し、抗体またはその断片が、N o t c h 3 受容体の L N R 領域を、自己阻害状態で安定化させ、L N R 領域または H D ドメインが、少なくとも 1 カ所のアミノ酸残基の突然変異を有し、突然変異が、S 1 5 8 0 L および G 1 4 8 7 D からなる群から選択される、単離抗体またはその断片に関する。

【0177】

一実施形態では、本発明は、N o t c h 3 受容体のコンフォメーションナルエピトープに特異的に結合する単離抗体またはその断片であって、コンフォメーションナルエピトープが、N o t c h 3 受容体の N R R ドメインの、L N R (Lin Notch Repeat) 領域内、ヘテロ二量体化 (H D) ドメイン内、およびリンカー領域内の、連続アミノ酸配列および非連続アミノ酸配列を含み、L N R 領域が、L N R - B であり、H D ドメインが、H D α 3 ヘリックスであり、抗体またはその断片が、リガンド依存性シグナル伝達を遮断する、単離抗体またはその断片に関する。

10

【0178】

一実施形態では、本発明は、N o t c h 3 受容体のコンフォメーションナルエピトープに特異的に結合する単離抗体またはその断片であって、コンフォメーションナルエピトープが、N o t c h 3 受容体の N R R ドメインの、L N R (Lin Notch Repeat) 領域内、ヘテロ二量体化 (H D) ドメイン内、およびリンカー領域内の、連続アミノ酸配列および非連続アミノ酸配列を含み、L N R 領域が、L N R - B であり、H D ドメインが、H D α 3 ヘリックスであり、抗体またはその断片が、リガンド依存性シグナル伝達を遮断し、コンフォメーションナルエピトープが、N R R 領域の L N R - A / B リンカー内のアミノ酸残基をさら

20

【0179】

一実施形態では、本発明は、N o t c h 3 受容体のコンフォメーションナルエピトープに特異的に結合する単離抗体またはその断片であって、コンフォメーションナルエピトープが、N o t c h 3 受容体の N R R ドメインの、L N R (Lin Notch Repeat) 領域内、ヘテロ二量体化 (H D) ドメイン内、およびリンカー領域内の、連続アミノ酸配列および非連続アミノ酸配列を含み、L N R 領域が、L N R - B であり、H D ドメインが、H D α 3 ヘリックスであり、抗体またはその断片が、リガンド依存性シグナル伝達を遮断し、コンフォメーションナルエピトープが、N R R 領域の L N R - A / B リンカー内のアミノ酸残基および N R R 領域の L N R - H D リンカー内のアミノ酸残基をさらに含む、単離抗体またはその断片に関する。

30

【0180】

一実施形態では、本発明は、N o t c h 3 受容体のコンフォメーションナルエピトープに特異的に結合する単離抗体またはその断片であって、コンフォメーションナルエピトープが、N o t c h 3 受容体の N R R ドメインの、L N R (Lin Notch Repeat) 領域内、ヘテロ二量体化 (H D) ドメイン内、およびリンカー領域内の、連続アミノ酸配列および非連続アミノ酸配列を含み、L N R 領域が、L N R - B であり、H D ドメインが、H D α 3 ヘリックスであり、コンフォメーションナルエピトープが、N R R 領域の L N R - H D リンカー内のアミノ酸残基をさらに含む、単離抗体またはその断片に関する。

【0181】

一実施形態では、本発明は、N o t c h 3 受容体のコンフォメーションナルエピトープに特異的に結合する単離抗体またはその断片であって、コンフォメーションナルエピトープが、N o t c h 3 受容体の N R R ドメインの、L N R (Lin Notch Repeat) 領域内、ヘテロ二量体化 (H D) ドメイン内、およびリンカー領域内の、連続アミノ酸配列および非連続アミノ酸配列を含み、L N R 領域が、L N R - B であり、H D ドメインが、H D α 3 ヘリックスであり、コンフォメーションナルエピトープが、N R R 領域の L N R - H D リンカー内のアミノ酸残基および H D β 4 - α 3 ループ内のアミノ酸残基をさらに含む、単離抗体またはその断片に関する。

40

【0182】

一実施形態では、本発明は、N o t c h 3 受容体のコンフォメーションナルエピトープに

50

特異的に結合する単離抗体またはその断片であって、コンフォメーションナルエピトープが、N o t c h 3 受容体のN R Rドメインの、L N R (Lin Notch Repeat) 領域内、ヘテロ二量体化 (H D) ドメイン内、およびリンカー領域内の、連続アミノ酸配列および非連続アミノ酸配列を含み、L N R 領域が、L N R - Bであり、H Dドメインが、H D α 3ヘリックスであり、コンフォメーションナルエピトープが、H D β 4 - α 3ループ内のアミノ酸残基をさらに含む、単離抗体またはその断片に関する。

【0183】

一実施形態では、本発明は、N o t c h 3 受容体のコンフォメーションナルエピトープに特異的に結合する単離抗体またはその断片であって、コンフォメーションナルエピトープが、N o t c h 3 受容体のN R Rドメインの、L N R (Lin Notch Repeat) 領域内、ヘテロ二量体化 (H D) ドメイン内、およびリンカー領域内の、連続アミノ酸配列および非連続アミノ酸配列を含み、L N R 領域が、L N R - Bであり、H Dドメインが、H D α 3ヘリックスであり、コンフォメーションナルエピトープが、L N R - A / Bリンカー内、L N R - B / Cリンカー内、L N R - H Dリンカー内、およびH D β 4 - α 3ループ内のアミノ酸残基をさらに含む、単離抗体またはその断片に関する。

【0184】

一実施形態では、本発明は、N o t c h 3 受容体のコンフォメーションナルエピトープに特異的に結合する単離抗体またはその断片であって、コンフォメーションナルエピトープが、N o t c h 3 受容体のN R Rドメインの、L N R (Lin Notch Repeat) 領域内、ヘテロ二量体化 (H D) ドメイン内、およびリンカー領域内の、連続アミノ酸配列および非連続アミノ酸配列を含み、L N R 領域が、L N R - Bであり、H Dドメインが、H D α 3ヘリックスであり、コンフォメーションナルエピトープが、L N R - A / Bリンカー内、L N R - B / Cリンカー内、L N R - H Dリンカー内、およびH D β 4 - α 3ループ内のアミノ酸残基をさらに含む、抗体またはその断片が、N o t c h 3 受容体のL N R 領域を、自己阻害状態で安定化させる、単離抗体またはその断片に関する。

【0185】

一実施形態では、本発明は、N o t c h 3 受容体のコンフォメーションナルエピトープに特異的に結合する単離抗体またはその断片であって、コンフォメーションナルエピトープが、N o t c h 3 受容体のN R Rドメインの、L N R (Lin Notch Repeat) 領域内、ヘテロ二量体化 (H D) ドメイン内、およびリンカー領域内の、連続アミノ酸配列および非連続アミノ酸配列を含み、L N R 領域が、L N R - Bであり、H Dドメインが、H D α 3ヘリックスであり、抗体またはその断片が、N o t c h 3 受容体のL N R 領域を、自己阻害状態で安定化させる、単離抗体またはその断片に関する。

【0186】

一実施形態では、本発明は、N o t c h 3 受容体のコンフォメーションナルエピトープに特異的に結合する単離抗体またはその断片であって、コンフォメーションナルエピトープが、N o t c h 3 受容体のN R Rドメインの、L N R (Lin Notch Repeat) 領域内、ヘテロ二量体化 (H D) ドメイン内、およびリンカー領域内の、連続アミノ酸配列および非連続アミノ酸配列を含み、L N R 領域が、L N R - Bであり、H Dドメインが、H D α 3ヘリックスであり、抗体またはその断片が、N o t c h 3 受容体のL N R 領域を、自己阻害状態で安定化させ、L N R 領域またはH Dドメインが、少なくとも1カ所のアミノ酸残基の突然変異を有する、単離抗体またはその断片に関する。

【0187】

一実施形態では、本発明は、N o t c h 3 受容体のコンフォメーションナルエピトープに特異的に結合する単離抗体またはその断片であって、コンフォメーションナルエピトープが、N o t c h 3 受容体のN R Rドメインの、L N R (Lin Notch Repeat) 領域内、ヘテロ二量体化 (H D) ドメイン内、およびリンカー領域内の、連続アミノ酸配列および非連続アミノ酸配列を含み、L N R 領域が、L N R - Bであり、H Dドメインが、H D α 3ヘリックスであり、L N R 領域またはH Dドメインが、少なくとも1カ所のアミノ酸残基の突然変異を有する、単離抗体またはその断片に関する。

【0188】

一実施形態では、本発明は、N o t c h 3 受容体のコンフォメーションナルエピトープに特異的に結合する単離抗体またはその断片であって、コンフォメーションナルエピトープが、N o t c h 3 受容体のNRRドメインの、LNR (Lin Notch Repeat) 領域内、ヘテロ二量体化 (HD) ドメイン内、およびリンカー領域内の、連続アミノ酸配列および非連続アミノ酸配列を含み、LNR領域が、LNR-Bであり、HDドメインが、HD α 3ヘリックスであり、LNR領域またはHDドメインが、S1580L、D1587N、Y1624H、L1518M、A1537T、N1597K、L1547V、R1526C (HD) およびG1487D (LNR-C)、P2034fs、P2067fs (「fs」とは、フレームシフトを指す)、p2177fs、Q2075* (「*」とは、停止コドン
10
を指す)、W2172*、G2112D、L2212M、F2121L、G2038S、G2059R、R2022H、Y2127H、Y2211C、V2202I、S2096L、P2089L、P2209L、R1981C、R2145Q、P2178S、またはこれらの組合せからなる群から選択される、少なくとも1カ所のアミノ酸残基の突然変異を有する、単離抗体またはその断片に関する。

【0189】

一実施形態では、本発明は、N o t c h 3 受容体のコンフォメーションナルエピトープに特異的に結合する単離抗体またはその断片であって、コンフォメーションナルエピトープが、N o t c h 3 受容体のNRRドメインの、LNR (Lin Notch Repeat) 領域内、ヘテロ二量体化 (HD) ドメイン内、およびリンカー領域内の、連続アミノ酸配列および非連続
20
アミノ酸配列を含み、LNR領域が、LNR-Bであり、HDドメインが、HD α 3ヘリックスであり、コンフォメーションナルエピトープが、アミノ酸残基：1427~1429 (LNR-A/Bリンカーの)、1442、1444~1445、1447~1450、1453、1458 (LNR-Bの)、1461~1462、1464 (LNR-B/Cリンカーの)、1507~1508、1510 (LNR-HDリンカーの)、1592、1594~1599、1602 (HD β 4- α 3ループの)、および1606 (HD α 3ヘリックスの)、またはこれらのサブセットを含む、単離抗体またはその断片に関する。

【0190】

一実施形態では、本発明は、N o t c h 3 受容体のコンフォメーションナルエピトープに特異的に結合する単離抗体またはその断片であって、コンフォメーションナルエピトープが、N o t c h 3 受容体のNRRドメインの、LNR (Lin Notch Repeat) 領域内、ヘテロ二量体化 (HD) ドメイン内、およびリンカー領域内の、連続アミノ酸配列および非連続
30
アミノ酸配列を含み、LNR領域が、LNR-Bであり、HDドメインが、HD α 3ヘリックスであり、抗体またはその断片のVHが、以下のN o t c h 3 残基：Cys1442、Pro1444、Ala1445、Ser1447、Ser1448、Pro1449、Tyr1453、Cys1458、Gly1461、Gly1462、Gly1464、Leu1592、Ser1594、Pro1595、Glu1596、Asn1597、Asp1598、およびHis1599のうちの少なくとも1つに結合する、単離抗体またはその断片に関する。

【0191】

一実施形態では、本発明は、N o t c h 3 受容体のコンフォメーションナルエピトープに特異的に結合する単離抗体またはその断片であって、コンフォメーションナルエピトープが、N o t c h 3 受容体のNRRドメインの、LNR (Lin Notch Repeat) 領域内、ヘテロ二量体化 (HD) ドメイン内、およびリンカー領域内の、連続アミノ酸配列および非連続
40
アミノ酸配列を含み、LNR領域が、LNR-Bであり、HDドメインが、HD α 3ヘリックスであり、抗体またはその断片のVLが、以下のN o t c h 3 残基：Gln1427、Cys1428、Glu1429、Pro1444、Ser1445、Ser1447、Ser1448、Pro1449、Tyr1453、Leu1507、Leu1508、Arg1510、Leu1592、Asp1598、Pro1602、およびSer1606のうちの少なくとも1つに結合する、単離抗体またはその断片に関する。
50

【0192】

一実施形態では、本発明は、N o t c h 3 受容体のコンフォメーションナルエピトープに特異的に結合する単離抗体またはその断片であって、コンフォメーションナルエピトープが、N o t c h 3 受容体のNRRドメインの、LNR (Lin Notch Repeat) 領域内、ヘテロ二量体化 (HD) ドメイン内、およびリンカー領域内の、連続アミノ酸配列および非連続アミノ酸配列を含み、LNR領域が、LNR-Cであり、HDドメインが、HD α 2ヘリックスであり、抗体またはその断片が、リガンド依存性シグナル伝達を遮断する、単離抗体またはその断片に関する。

【0193】

一実施形態では、本発明は、N o t c h 3 受容体のコンフォメーションナルエピトープに特異的に結合する単離抗体またはその断片であって、コンフォメーションナルエピトープが、N o t c h 3 受容体のNRRドメインの、LNR (Lin Notch Repeat) 領域内、ヘテロ二量体化 (HD) ドメイン内、およびリンカー領域内の、連続アミノ酸配列および非連続アミノ酸配列を含み、LNR領域が、LNR-Cであり、HDドメインが、HD α 2ヘリックスであり、抗体またはその断片が、リガンド依存性シグナル伝達を遮断し、コンフォメーションナルエピトープが、NRR領域のLNR-B内のアミノ酸残基をさらに含む、単離抗体またはその断片に関する。

10

【0194】

一実施形態では、本発明は、N o t c h 3 受容体のコンフォメーションナルエピトープに特異的に結合する単離抗体またはその断片であって、コンフォメーションナルエピトープが、N o t c h 3 受容体のNRRドメインの、LNR (Lin Notch Repeat) 領域内、ヘテロ二量体化 (HD) ドメイン内、およびリンカー領域内の、連続アミノ酸配列および非連続アミノ酸配列を含み、LNR領域が、LNR-Cであり、HDドメインが、HD α 2ヘリックスであり、抗体またはその断片が、リガンド依存性シグナル伝達を遮断し、コンフォメーションナルエピトープが、NRR領域のLNR-B内のアミノ酸残基をさらに含む、NRR領域のLNR-B/Cリンカー内のアミノ酸残基をさらに含む、単離抗体またはその断片に関する。

20

【0195】

一実施形態では、本発明は、N o t c h 3 受容体のコンフォメーションナルエピトープに特異的に結合する単離抗体またはその断片であって、コンフォメーションナルエピトープが、N o t c h 3 受容体のNRRドメインの、LNR (Lin Notch Repeat) 領域内、ヘテロ二量体化 (HD) ドメイン内、およびリンカー領域内の、連続アミノ酸配列および非連続アミノ酸配列を含み、LNR領域が、LNR-Cであり、HDドメインが、HD α 2ヘリックスであり、抗体またはその断片が、リガンド依存性シグナル伝達を遮断し、コンフォメーションナルエピトープが、NRR領域のLNR-B/Cリンカー内のアミノ酸残基をさらに含む、単離抗体またはその断片に関する。

30

【0196】

一実施形態では、本発明は、N o t c h 3 受容体のコンフォメーションナルエピトープに特異的に結合する単離抗体またはその断片であって、コンフォメーションナルエピトープが、N o t c h 3 受容体のNRRドメインの、LNR (Lin Notch Repeat) 領域内、ヘテロ二量体化 (HD) ドメイン内、およびリンカー領域内の、連続アミノ酸配列および非連続アミノ酸配列を含み、LNR領域が、LNR-Cであり、HDドメインが、HD α 2ヘリックスであり、抗体またはその断片が、リガンド依存性シグナル伝達を遮断し、コンフォメーションナルエピトープが、NRR領域のLNR-B/Cリンカー内のアミノ酸残基をさらに含む、HD α 3- β 5ループ内のアミノ酸残基をさらに含む、単離抗体またはその断片に関する。

40

【0197】

一実施形態では、本発明は、N o t c h 3 受容体のコンフォメーションナルエピトープに特異的に結合する単離抗体またはその断片であって、コンフォメーションナルエピトープが、N o t c h 3 受容体のNRRドメインの、LNR (Lin Notch Repeat) 領域内、ヘテロ

50

二量体化（HD）ドメイン内、およびリンカー領域内の、連続アミノ酸配列および非連続アミノ酸配列を含み、LNR領域が、LNR-Cであり、HDドメインが、HD α 2ヘリックスであり、抗体またはその断片が、リガンド依存性シグナル伝達を遮断し、コンフォメーションナルエピトープが、HD α 3- β 5ループ内のアミノ酸残基をさらに含む、単離抗体またはその断片に関する。

【0198】

一実施形態では、本発明は、Notch3受容体のコンフォメーションナルエピトープに特異的に結合する単離抗体またはその断片であって、コンフォメーションナルエピトープが、Notch3受容体のNRドメインの、LNR（Lin Notch Repeat）領域内、ヘテロ二量体化（HD）ドメイン内、およびリンカー領域内の、連続アミノ酸配列および非連続アミノ酸配列を含み、LNR領域が、LNR-Cであり、HDドメインが、HD α 2ヘリックスであり、抗体またはその断片が、リガンド依存性シグナル伝達を遮断し、コンフォメーションナルエピトープが、LNR-B内、LNR-B/Cリンカー内、およびHD α 3- β 5ループ内のアミノ酸残基をさらに含む、単離抗体またはその断片に関する。

【0199】

一実施形態では、本発明は、Notch3受容体のコンフォメーションナルエピトープに特異的に結合する単離抗体またはその断片であって、コンフォメーションナルエピトープが、Notch3受容体のNRドメインの、LNR（Lin Notch Repeat）領域内、ヘテロ二量体化（HD）ドメイン内、およびリンカー領域内の、連続アミノ酸配列および非連続アミノ酸配列を含み、LNR領域が、LNR-Cであり、HDドメインが、HD α 2ヘリックスであり、抗体またはその断片が、リガンド依存性シグナル伝達を遮断し、抗体またはその断片が、Notch3受容体のLNR領域を、自己阻害状態で安定化させる、単離抗体またはその断片に関する。

【0200】

一実施形態では、本発明は、Notch3受容体のコンフォメーションナルエピトープに特異的に結合する単離抗体またはその断片であって、コンフォメーションナルエピトープが、Notch3受容体のNRドメインの、LNR（Lin Notch Repeat）領域内、ヘテロ二量体化（HD）ドメイン内、およびリンカー領域内の、連続アミノ酸配列および非連続アミノ酸配列を含み、LNR領域が、LNR-Cであり、HDドメインが、HD α 2ヘリックスであり、抗体またはその断片が、リガンド依存性シグナル伝達を遮断し、Notch3受容体が、突然変異体のNotch3受容体であり、LNR領域またはHDドメインが、少なくとも1カ所のアミノ酸残基の突然変異を有する、単離抗体またはその断片に関する。

【0201】

一実施形態では、本発明は、Notch3受容体のコンフォメーションナルエピトープに特異的に結合する単離抗体またはその断片であって、コンフォメーションナルエピトープが、Notch3受容体のNRドメインの、LNR（Lin Notch Repeat）領域内、ヘテロ二量体化（HD）ドメイン内、およびリンカー領域内の、連続アミノ酸配列および非連続アミノ酸配列を含み、LNR領域が、LNR-Cであり、HDドメインが、HD α 2ヘリックスであり、抗体またはその断片が、リガンド依存性シグナル伝達を遮断し、Notch3受容体が、突然変異Notch3受容体であり、LNR領域またはHDドメインが、S1580L、D1587N、Y1624H、L1518M、A1537T、N1597K、L1547V、R1526C（HD）およびG1487D、（LNR-C）、P2034fs、P2067fs、p2177fs、Q2075*、W2172*、G2112D、L2212M、F2121L、G2038S、G2059R、R2022H、Y2127H、Y2211C、V2202I、S2096L、P2089L、P2209L、R1981C、R2145Q、P2178S、またはこれらの組合せからなる群から選択される、少なくとも1カ所のアミノ酸残基の突然変異を有する、単離抗体またはその断片に関する。

【0202】

一実施形態では、本発明は、N o t c h 3 受容体のコンフォメーションナルエピトープに特異的に結合する単離抗体またはその断片であって、コンフォメーションナルエピトープが、N o t c h 3 受容体のNRRドメインの、LNR (Lin Notch Repeat) 領域内、ヘテロ二量体化 (HD) ドメイン内、およびリンカー領域内の、連続アミノ酸配列および非連続アミノ酸配列を含み、LNR領域が、LNR-Cであり、HDドメインが、HD α 2ヘリックスであり、抗体またはその断片が、リガンド依存性シグナル伝達を遮断し、N o t c h 3 受容体が、突然変異N o t c h 3 受容体であり、LNR領域またはHDドメインが、少なくとも1カ所のアミノ酸残基の突然変異を有し、コンフォメーションナルエピトープが、アミノ酸残基：1440 (LNR-Bの)、1463、1465~1468 (LNR-B/Cリンカーの)、1469~1472、1474、1486~1487、(LNR-Cの)、1534 (HD α 3ヘリックスの)、ならびに1618、1619、および1621 (α 3- β 5ループの)、またはこれらのサブセットを含む、単離抗体またはその断片に関する。

【0203】

一実施形態では、本発明は、N o t c h 3 受容体のコンフォメーションナルエピトープに特異的に結合する単離抗体またはその断片であって、コンフォメーションナルエピトープが、N o t c h 3 受容体のNRRドメインの、LNR (Lin Notch Repeat) 領域内、ヘテロ二量体化 (HD) ドメイン内、およびリンカー領域内の、連続アミノ酸配列および非連続アミノ酸配列を含み、LNR領域が、LNR-Cであり、HDドメインが、HD α 2ヘリックスであり、抗体またはその断片が、リガンド依存性シグナル伝達を遮断し、N o t c h 3 受容体が、突然変異N o t c h 3 受容体であり、LNR領域またはHDドメインが、少なくとも1カ所のアミノ酸残基の突然変異を有し、抗体またはその断片のVHが、以下のN o t c h 3 残基：A r g 1463、T h r 1466、A s n 1468、P r o 1469、V a l 1470、T y r 1471、T y r 1474、G l n 1486、およびG l y 1487のうちの少なくとも1つに結合する、単離抗体またはその断片に関する。

【0204】

一実施形態では、本発明は、N o t c h 3 受容体のコンフォメーションナルエピトープに特異的に結合する単離抗体またはその断片であって、コンフォメーションナルエピトープが、N o t c h 3 受容体のNRRドメインの、LNR (Lin Notch Repeat) 領域内、ヘテロ二量体化 (HD) ドメイン内、およびリンカー領域内の、連続アミノ酸配列および非連続アミノ酸配列を含み、LNR領域が、LNR-Cであり、HDドメインが、HD α 2ヘリックスであり、抗体またはその断片が、リガンド依存性シグナル伝達を遮断し、N o t c h 3 受容体が、突然変異体のN o t c h 3 受容体であり、LNR領域またはHDドメインが、少なくとも1カ所のアミノ酸残基の突然変異を有し、抗体またはその断片のVLが、以下のN o t c h 3 残基：S e r 1440、A r g 1465、T h r 1466、A s n 1468、P r o 1469、V a l 1470、G l u 1472、A r g 1434、G l u 1618、A r g 1619、およびA s p 1621のうちの少なくとも1つに結合する、単離抗体またはその断片に関する。

【0205】

一実施形態では、本発明は、N o t c h 3 受容体のコンフォメーションナルエピトープに特異的に結合する単離抗体またはその断片であって、コンフォメーションナルエピトープが、N o t c h 3 受容体のNRRドメインの、LNR (Lin Notch Repeat) 領域内、ヘテロ二量体化 (HD) ドメイン内、およびリンカー領域内の、連続アミノ酸配列および非連続アミノ酸配列を含み、LNR領域が、LNR-Cであり、HDドメインが、HD α 2ヘリックスであり、抗体またはその断片が、リガンド依存性シグナル伝達を遮断し、N o t c h 3 受容体が、突然変異体のN o t c h 3 受容体であり、LNR領域またはHDドメインが、少なくとも1カ所のアミノ酸残基の突然変異を有する、単離抗体またはその断片に関する。

【0206】

抗体の可変領域または全長鎖が、ヒト生殖細胞系列免疫グロブリン遺伝子を使用する系

10

20

30

40

50

から得られる場合、本明細書で使用されるヒト抗体は、特定の生殖細胞系列配列「の産物」であるか、またはこれ「から導出された」、重鎖可変領域もしくは軽鎖可変領域または全長重鎖もしくは全長軽鎖を含む。このような系は、ヒト免疫グロブリン遺伝子を保有するトランスジェニックマウスを、対象の抗原で免疫化すること、または対象の抗原を伴うファージ上で提示されたヒト免疫グロブリン遺伝子ライブラリーをスクリーニングすることを含む。ヒト生殖細胞系列の免疫グロブリン配列「の産物」であるか、またはこれ「から導出された」ヒト抗体は、ヒト抗体のアミノ酸配列を、ヒト生殖細胞系列免疫グロブリンのアミノ酸配列に照らして比較し、配列がヒト抗体の配列と最も近縁（すなわち、同一性%が最大）である、ヒト生殖細胞系列の免疫グロブリン配列を選択することにより、それ自体として同定することができる。特定のヒト生殖細胞系列の免疫グロブリン配列「の産物」であるか、またはこれ「から導出された」ヒト抗体は、例えば、自然発生の体細胞突然変異または部位指向突然変異の意図的な導入に起因して、生殖細胞系列の配列と比較したアミノ酸の差違を含有しうる。しかし、VHフレームワーク領域内またはVLフレームワーク領域内で、選択されたヒト抗体は、アミノ酸配列が、ヒト生殖細胞系列免疫グロブリン遺伝子によりコードされるアミノ酸配列に対して、少なくとも90%同一であり、ヒト抗体を、他の種の生殖細胞系列免疫グロブリンのアミノ酸配列（例えば、マウス生殖細胞系列の配列）と比較した場合、ヒト抗体として同定する、アミノ酸残基を含有することが典型的である。ある種の場合に、ヒト抗体は、生殖細胞系列免疫グロブリン遺伝子によりコードされるアミノ酸配列に対して、アミノ酸配列が少なくとも60%、70%、80%、90%、または少なくとも95%、なおまたは少なくとも96%、97%、98%、もしくは99%同一でありうる。組換えヒト抗体は、VHフレームワーク領域内またはVLフレームワーク領域内の、ヒト生殖細胞系列免疫グロブリン遺伝子によりコードされるアミノ酸配列との、10アミノ酸以下の差違を提示することが典型的である。ある種の場合に、ヒト抗体は、生殖細胞系列免疫グロブリン遺伝子によりコードされるアミノ酸配列との、5以下、なおまたは4、3、2、もしくは1アミノ酸以下の差違を提示しうる。

【0207】

本明細書で開示される抗体は、単鎖抗体、ダイアボディー、ドメイン抗体、ナノボディー、およびユニボディーの誘導体でありうる。「単鎖抗体」(scFv)は、VHドメインへと連結されたVLドメインを含む単一のポリペプチド鎖であって、VLドメインとVHドメインとが対合して、一価分子を形成する、ポリペプチド鎖からなる。単鎖抗体は、当技術分野で公知の方法に従い調製することができる（例えば、Bird et al., (1988) Science 242:423-426; およびHuston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883を参照されたい）。「ダイアボディー」は、各鎖が、短いペプチドリンカーにより接続される、同じポリペプチド鎖上の軽鎖可変領域へと接続された、重鎖可変領域を含む2つの鎖であって、同じ鎖上の2つの領域は互いに対合しないが、他の鎖上の相補的なドメインとは対合して、二特異性分子を形成する2つの鎖からなる。当技術分野では、ダイアボディーを調製する方法が公知である（例えば、Holliger et al., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; およびPoljak et al., (1994) Structure 2:1121-1123を参照されたい）。ドメイン抗体 (dAb: domain antibody) とは、抗体の重鎖または軽鎖の可変領域に対応する、抗体の小型の機能的な結合性単位である。ドメイン抗体は、細菌細胞系内、酵母細胞系内、および哺乳動物細胞系内で良好に発現する。当技術分野では、ドメイン抗体およびその作製法についてのさらなる詳細が公知である（例えば、米国特許第6,291,158号、同第6,582,915号、同第6,593,081号、同第6,172,197号、同第6,696,245号; 欧州特許第0368684号および同第0616640号; WO05/035572、WO04/101790、WO04/081026、WO04/058821、WO04/003019、およびWO03/002609を参照されたい）。ナノボディーは、抗体の重鎖から導出される。ナノボディーは、単一の可変ドメインと、2つの定常ドメイン (CH2およびCH3) とを含み、元の抗体の抗原結合能を保持することが典型的である。ナノボディーは、当技術分野で公知の方法（例えば、米国特許第6,765,087号; 米国特許第6,838,254

号、W O 0 6 / 0 7 9 3 7 2を参照されたい)により調製することができる。ユニボディーは、I g G 4抗体の1つの軽鎖と1つの重鎖とからなる。ユニボディーは、I g G 4抗体のヒンジ領域を除去することにより作製することができる。ユニボディーおよびこれらを調製する方法のさらなる詳細については、W O 2 0 0 7 / 0 5 9 7 8 2において見出すことができる。

【0208】

相同な抗体

さらに別の実施形態では、本開示は、表2に記載される配列と相同なアミノ酸配列を含む抗体またはその断片を提示し、前記抗体は、N o t c h 3タンパク質(例えば、ヒトN o t c h 3および/またはカニクイザルN o t c h 3)に結合し、表2に記載される抗体の所望の機能的特性を保持する。

10

【0209】

例えば、本開示は、重鎖可変領域と軽鎖可変領域とを含む、単離モノクローナル抗体(または機能的その断片)であって、重鎖可変領域が、配列番号9、29、49、69、89、109、129、149、169、189、209、および229からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも80%、少なくとも90%、または少なくとも95%同一なアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域が、配列番号19、39、59、79、99、119、139、159、179、199、および219からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも80%、少なくとも90%、または少なくとも95%同一なアミノ酸配列を含む、単離モノクローナル抗体を提示する。N o t c h 3(例えば、ヒトN o t c h 3および/またはカニクイザルN o t c h 3)に結合し、例えば、実施例に記載されるI C D 3アッセイにより測定しうる、N o t c h 3のシグナル伝達活性を阻害する。また、可変重鎖および可変軽鎖の親ヌクレオチド配列、ならびに哺乳動物細胞内の発現について最適化された全長重鎖および軽鎖配列も、範囲内に含まれる。他の抗体は、突然変異させているが、上記で記載した配列に対して、少なくとも60、70、80、90、95、または98%の同一性を有する、アミノ酸または核酸を含む。いくつかの実施形態では、他の抗体は、突然変異体のアミノ酸配列であって、上記で記載した配列により提示される可変領域と比較して、可変領域内のアミノ酸の欠失、挿入、または置換により、1つ、2つ、3つ、4つ、または5つ以下のアミノ酸を突然変異させているアミノ酸配列を含む。

20

30

【0210】

他の実施形態では、V Hおよび/またはV Lのアミノ酸配列は、表2に示される配列と、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一でありうる。他の実施形態では、V Hおよび/またはV Lのアミノ酸配列は、1、2、3、4、または5カ所以下のアミノ酸位置におけるアミノ酸置換を除き、同一でありうる。表2に記載される抗体のV H領域およびV L領域に対する同一性が大きな(すなわち、80%以上である)、V H領域およびV L領域を有する抗体は、突然変異誘発(例えば、部位指向突然変異誘発またはP C R媒介型突然変異誘発)の後で、本明細書で記載される機能的アッセイを使用して、コードされる、変化させた抗体の、保持された機能についての試験を行うことにより得ることができる。

40

【0211】

他の実施形態では、重鎖および/または軽鎖の可変領域のヌクレオチド配列は、上記で示した配列と、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一でありうる。

【0212】

本明細書で使用される、2つの配列の間の「同一性パーセント」とは、2つの配列の最適なアライメントのために導入する必要がある、ギャップの数および各ギャップの長さを考慮に入れるときに配列により共有される、同一な位置の数の関数である(すなわち、同一性%は、同一な位置の数/位置の総数×100に等しい)。配列の比較および2つの配列の間の同一性パーセントの決定は、下記の非限定的な例において記載されている、数学

50

的アルゴリズムを使用して達成することができる。

【0213】

加えて、または代替的に、本開示のタンパク質配列はさらに、公開のデータベースに対して検索を実施して、例えば、類縁配列を同定する「クエリー配列」としても使用することができる。例えば、このような検索は、Altschul et al., (1990) J.Mol. Biol. 215:403-10によるBLASTプログラム (version 2.0) を使用して実施することができる。

【0214】

保存的修飾を伴う抗体

他の抗体またはそれらの断片は、突然変異させているが、CDR領域内で、表2に記載される配列により描示されるCDR領域との、少なくとも60、70、80、90、95、または98パーセントの同一性を有するアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、他の抗体またはそれらの断片は、突然変異体のアミノ酸配列を含み、CDR領域内で、表2に記載される配列により描示されるCDR領域と比較して、1つ、2つ、3つ、4つ、または5つ以下のアミノ酸を突然変異させているが、元の抗体のエピトープに対するそれらの特異性をやはり維持している。

【0215】

他の抗体またはそれらの断片は、突然変異させているが、フレームワーク領域内で、表2に記載される配列により描示されるフレームワーク領域との、少なくとも60、70、80、90、95、または98パーセントの同一性を有するアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、他の抗体またはそれらの断片は、突然変異体のアミノ酸配列を含み、フレームワーク領域内で、表2に記載される配列により描示されるフレームワーク領域と比較して、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、または7つ以下のアミノ酸を突然変異させているが、元の抗体のエピトープに対するそれらの特異性をやはり維持している。本開示はまた、N o t c h 3タンパク質 (例えば、ヒトN o t c h 3および／またはカニクイザルN o t c h 3) に特異的に結合する抗体のVH、VL、全長重鎖、および全長軽鎖をコードする核酸配列も提示する。

【0216】

ある種の実施形態では、抗体は、CDR1配列、CDR2配列、およびCDR3配列を含む重鎖可変領域と、CDR1配列、CDR2配列、およびCDR3配列を含む軽鎖可変領域とを有し、これらのCDR配列のうちの1または複数は、本明細書に記載される抗体に基づく指定されたアミノ酸配列、またはそれらの保存的修飾を有し、抗体は、本開示のN o t c h 3結合性抗体の所望の機能的特性を保持する。

【0217】

したがって、本開示は、CDR1配列、CDR2配列、およびCDR3配列を含む重鎖可変領域と、CDR1配列、CDR2配列、およびCDR3配列を含む軽鎖可変領域とからなる、単離N o t c h 3モノクローナル抗体またはその断片であって、重鎖可変領域のCDR1アミノ酸配列が、配列番号3、23、43、63、83、103、123、143、163、183、および203、ならびにこれらの保存的修飾からなる群から選択され；重鎖可変領域のCDR2アミノ酸配列が、配列番号4、24、44、64、84、104、124、144、164、184、および204、ならびにこれらの保存的修飾からなる群から選択され；重鎖可変領域のCDR3アミノ酸配列が、配列番号5、25、45、65、85、105、125、145、165、185、および205、ならびにこれらの保存的修飾からなる群から選択され；軽鎖可変領域のCDR1アミノ酸配列が、配列番号13、33、53、73、93、113、133、153、173、193、および213、ならびにこれらの保存的修飾からなる群から選択され；軽鎖可変領域のCDR2アミノ酸配列が、配列番号14、34、54、74、94、114、134、154、174、194、および214、ならびにこれらの保存的修飾からなる群から選択され；軽鎖可変領域のCDR3アミノ酸配列が、配列番号15、35、55、75、95、115、135、155、175、195、および215、ならびにこれらの保存的修飾から

10

20

30

40

50

なる群から選択され；抗体またはその断片は、N o t c h 3 に特異的に結合し、実施例で記載されるN o t c h 3 アッセイ（例えば、I C D 3 アッセイ）により測定しうる、N o t c h 3 のシグナル伝達経路を阻害することによりN o t c h 3 活性を阻害する、単離N o t c h 3 モノクローナル抗体またはその断片を提示する。

【0218】

同じコンフォメーションナルエピトープに結合する抗体

本開示は、表2に記載されるN o t c h 3 結合性抗体が相互作用するのと同じコンフォメーションナルエピトープと相互作用する（例えば、結合、立体障害、空間的分布の安定化により）抗体を提示する。したがって、N o t c h 3 結合アッセイにおいて、他の抗体と交差競合する（例えば、統計学的に有意な様式で、他の抗体の結合を競合的に阻害する）それらの能力に基づき、さらなる抗体を同定することができる。N o t c h 3 タンパク質（例えば、ヒトN o t c h 3 および／またはカニクイザルN o t c h 3）に対する本開示の抗体の結合を阻害する被験抗体の能力は、被験抗体が、N o t c h 3 への結合について、その抗体と競合しうることを裏付け、非限定的な理論に従い、このような抗体は、N o t c h 3 タンパク質上の、それが競合する抗体と同じであるかまたは類縁の（例えば、構造的に類似するか、または空間的に近接する）コンフォメーションナルエピトープに結合する。ある種の実施形態では、N o t c h 3 上の同じコンフォメーションナルエピトープに結合する抗体は、ヒトモノクローナル抗体である。このようなヒトモノクローナル抗体は、本明細書で記載される通りに、調製および単離することができる。

【0219】

一実施形態では、抗体またはその断片は、N o t c h 3 のL N R 領域内およびH D 内の両方における、非連続アミノ酸残基を含むコンフォメーションナルエピトープに結合して、N o t c h 3 を自己阻害コンフォメーションで保持し、これにより、H D 内のS 2 部位の、プロテアーゼへの曝露と、その後におけるプロテアーゼによるS 3 部位の切断とを防止する。これらの部位における切断の欠如は、下流のN o t c h 3 シグナル伝達を防止する。

【0220】

理論を提示することに束縛されるわけではないが、作用機構についての1つの可能なモデルは、N o t c h 3 N R R が典型的に、各々がC a ²⁺ イオンを配位結合させる3つのL N R が、H D を包み込んで、S 2 部位をA D A M プロテアーゼによる接近から保護する（例えば、L N R - A / B リンカーに由来する保存的なL 1 4 1 9 が、S 2 部位を直接塞ぎ、S 2 部位を、プロテアーゼによる接近から立体的に閉鎖する）、自己阻害コンフォメーションで存在するということである。L N R とH D との間の相互作用の安定性のほか、これらの領域内の相互作用の安定性も、N R R の自己阻害コンフォメーションを維持するのに極めて重要である。N o t c h 3 N R R 内の突然変異は、自己阻害コンフォメーションを開放し、これにより、S 2 部位が、プロテアーゼによる切断に供され、その後、S 3 部位が、プロテアーゼによる切断に供され、これにより、下流のN o t c h 3 シグナル伝達を活性化させるように、H D ドメインを露出させる。したがって、関与性のがん（本明細書で開示される）において見出される突然変異と同様、N R R を不安定化させる突然変異であれば、N o t c h 3 の活性化を増強しうるであろう。他方、L N R - H D 間相互作用を安定化させうる抗体などの試薬は、N o t c h 3 シグナル伝達を潜在的に阻害しうる。2 0 3 5 0、および2 0 3 5 8などの抗体またはそれらの断片は、N o t c h 3 の自己阻害コンフォメーションに結合し、自己阻害コンフォメーションを安定化させ（これを直接維持し、保持し、ロックし）、これにより、H D のプロテアーゼによる切断への曝露と、その後における下流のN o t c h 3 シグナル伝達を防止する。

【0221】

抗体またはそれらの断片は、N o t c h 3 のリガンド依存的活性化；N o t c h 3 のリガンド非依存的活性化；ならびにN o t c h 3 のリガンド依存的活性化およびリガンド非依存的活性化の両方を、リガンドの結合を防止することなく阻害する。各機構により顕著に異なる腫瘍型が駆動されるのであれば、治療用抗体は、N o t c h 3 活性化の単一の機

構（すなわち、リガンド依存的またはリガンド非依存的）をターゲティングする抗体より広範なスペクトルにわたる腫瘍において臨床的有用性を有するので、これは有利であると考えられる。

【0222】

結果として、既存の治療用抗体が臨床的に無効である状態を処置するのに、抗体を使用することができる。

【0223】

操作修飾抗体

本明細書で示されるVH配列および／またはVL配列のうちの1または複数を有する抗体を、出発抗体から変化させた特性を有する修飾抗体を操作する出発材料として使用して、抗体をさらに調製することもできる。抗体は、可変領域（すなわち、VHおよび／またはVL）のうちの一方または両方の中の、例えば、1もしくは複数のCDR領域内、および／または1もしくは複数のフレームワーク領域内の1または複数の残基を修飾することにより操作することができる。加えて、または代替的に、抗体は、定常領域内の残基を修飾することにより操作して、例えば、抗体のエフェクター機能を変化させることもできる。

【0224】

実施する可変領域操作の1つの種類は、CDRグラフトイングである。抗体は、主に6つの重鎖相補性決定領域（CDR）内および軽鎖CDR内に位置するアミノ酸残基を介して、標的抗原と相互作用する。この理由で、CDR内のアミノ酸配列は、CDR外部の配列より、個々の抗体の間で多様である。CDR配列は、大半の抗体-抗原間相互作用の一因となるため、異なる特性を伴う異なる抗体に由来するフレームワーク配列へとグラフトされた、具体的な自然発生抗体に由来するCDR配列を含む発現ベクターを構築することにより、具体的な自然発生抗体の特性を模倣する組換え抗体を発現させることが可能である（例えば、Riechmann et al., (1998) Nature 332:323-327; Jones et al., (1986) Nature 321:522-525; Queen et al., (1989) Proc. Natl. Acad., U.S.A. 86:10029-10033; Winterによる、米国特許第5,225,539号;ならびにQueenらによる、米国特許第5,530,101号、同第5,585,089号、同第5,693,762号、および同第6,180,370号を参照されたい）。

【0225】

したがって、別の実施形態は、単離Notch3抗体またはその断片であって、配列番号3、23、43、63、83、103、123、143、163、183、および203からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するCDR1配列;配列番号4、24、44、64、84、104、124、144、164、184、および204からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するCDR2配列;ならびに配列番号4、10、22、28、40、46、58、64、76、82、94、100、112、118、130、136、148、154、166、172、184、190、202、208、220、226、238、244、256、262、274、280、292、298、310、316、328、334、346、352、364、および370からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するCDR3配列のそれぞれを含む、重鎖可変領域と、配列番号13、33、53、73、93、113、133、153、173、193、および213からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するCDR1配列;配列番号14、34、54、74、94、114、134、154、174、194、および214からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するCDR2配列;ならびに配列番号15、35、55、75、95、115、135、155、175、195、および215からなる群から選択されるアミノ酸配列からなるCDR3配列のそれぞれを有する、軽鎖可変領域とを含む、単離Notch3抗体またはその断片に関する。

【0226】

したがって、このような抗体は、抗体のVH CDR配列およびVL CDR配列を含有するが、これらの抗体に由来する異なるフレームワーク配列を含有する。このような

フレームワーク配列は、生殖細胞系列の抗体遺伝子配列を含む、公開のDNAデータベースまたは刊行された参考文献から得ることができる。例えば、ヒト重鎖可変領域遺伝子およびヒト軽鎖可変領域遺伝子のための生殖細胞系列のDNA配列は、「Vase」ヒト生殖細胞系列配列データベース（インターネット上のwww.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbaseにおいて利用可能である）のほか、それらの各々の内容が参照により明示的に本明細書に組み込まれる、Kabat et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Chothia et al., (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia et al., (1989) Nature 342:877-883; およびAl-Lazikani et al., (1997) J. Mol. Biol. 273:927-948; Tomlinson et al., (1992) J. Mol. Biol. 227:776-798; およびCox et al., (1994) Eur. J Immunol. 24:827-836においても見出すことができる。

10

【0227】

抗体における使用のためのフレームワーク配列の例は、選択された本開示の抗体により使用されるフレームワーク配列、例えば、本開示のモノクローナル抗体により使用されるコンセンサス配列および／またはフレームワーク配列と構造的に類似する配列である。VH CDR1配列、VH CDR2配列、およびVH CDR3配列、ならびにVL CDR1配列、VL CDR2配列、およびVL CDR3配列は、フレームワーク配列が由来する生殖細胞系列免疫グロブリン遺伝子内で見出される配列と同一な配列を有するフレームワーク領域へとグラフトすることもでき、CDR配列は、生殖細胞系列の配列と比較して、1カ所または複数カ所の突然変異を含有するフレームワーク領域へとグラフトすることもできる。例えば、ある種の場合には、フレームワーク領域内の残基を突然変異させて、抗体の抗原結合能を維持または増強することが有益であると見出されている（例えば、Queenらによる、米国特許第5,530,101号、同第5,585,089号、同第5,693,762号、および同第6,180,370号を参照されたい）。

20

【0228】

可変領域修飾の別の種類は、VH CDR1領域内、VH CDR2領域内、および／もしくはVH CDR3領域内、ならびに／またはVL CDR1領域内、VL CDR2領域内、および／もしくはVL CDR3領域内のアミノ酸残基を突然変異させて、これにより、「アフィニティー成熟」として公知である通り、対象の抗体の1または複数の結合特性（例えば、アフィニティー）を改善することである。部位指向突然変異誘発またはPCRにより媒介される突然変異誘発を実施して、突然変異を導入し、本明細書で記載され、実施例において提示される、in vitroアッセイまたはin vivoアッセイにおいて、抗体の結合に対する効果、または他の対象の機能的特性を査定することができる。保存的修飾（上記で論じた）を導入することができる。突然変異は、アミノ酸置換、アミノ酸付加、またはアミノ酸欠失でありうる。さらに、CDR領域内の1つ、2つ、3つ、4つ、または5つ以下の残基を変化させることが典型的である。

30

【0229】

したがって、別の実施形態では、本開示は、単離Notch3抗体またはそれらの断片であって、配列番号3、23、43、63、83、103、123、143、163、183、および203を有する群から選択されるアミノ酸配列からなるVH CDR1領域、または配列番号3、23、43、63、83、103、123、143、163、183、および203と比較して、1、2、3、4、もしくは5カ所のアミノ酸置換、アミノ酸欠失、もしくはアミノ酸付加を有するアミノ酸配列；配列番号4、24、44、64、84、104、124、144、164、184、および204からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するVH CDR2領域、または配列番号4、24、44、64、84、104、124、144、164、184、および204と比較して、1、2、3、4、もしくは5カ所のアミノ酸置換、アミノ酸欠失、もしくはアミノ酸付加を有するアミノ酸配列；ならびに配列番号5、25、45、65、85、105、125、145、165、185、および205からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するVH CDR

40

50

R 3 領域、または配列番号 5、25、45、65、85、105、125、145、165、185、および 205 と比較して、1、2、3、4、もしくは 5 カ所のアミノ酸置換、アミノ酸欠失、もしくはアミノ酸付加を有するアミノ酸配列を有する、重鎖可変領域と；配列番号 13、33、53、73、93、113、133、153、173、193、および 213 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する V L C D R 1 領域、または配列番号 13、33、53、73、93、113、133、153、173、193、および 213 と比較して、1、2、3、4、もしくは 5 カ所のアミノ酸置換、アミノ酸欠失、もしくはアミノ酸付加を有するアミノ酸配列；配列番号 14、34、54、74、94、114、134、154、174、194、および 214 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する V L C D R 2 領域、または配列番号 14、34、54、74、94、114、134、154、174、194、および 214 と比較して、1、2、3、4、もしくは 5 カ所のアミノ酸置換、アミノ酸欠失、もしくはアミノ酸付加を有するアミノ酸配列；ならびに配列番号 15、35、55、75、95、115、135、155、175、195、および 215 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する V L C D R 3 領域、または配列番号 15、35、55、75、95、115、135、155、175、195、および 215 と比較して、1、2、3、4、もしくは 5 カ所のアミノ酸置換、アミノ酸欠失、もしくはアミノ酸付加を有するアミノ酸配列を有する、軽鎖可変領域とからなる、単離 N o t c h 3 抗体またはそれらの断片を提示する。

【0230】

抗体断片の、代替的なフレームワークまたは足場へのグラフティング

結果として得られるポリペプチドが、N o t c h 3 に特異的に結合する、少なくとも 1 つの結合性領域を含む限りにおいて、多種多様な抗体／免疫グロブリンのフレームワークまたは足場を援用することができる。このようなフレームワークまたは足場は、ヒト免疫グロブリンまたはその断片の 5 つの主要なイデオタイプを含み、好ましくはヒト化の側面を有する、他の動物種の免疫グロブリンを含む。当業者により、新規のフレームワーク、足場、および断片が発見および開発され続けている。

【0231】

一態様では、本開示は、その上に C D R をグラフトしうる、非免疫グロブリン足場を使用して、非免疫グロブリンベースの抗体を作り出すことに関する。それらが、標的の N o t c h 3 タンパク質（例えば、ヒト N o t c h 3 および／またはカニクイザル N o t c h 3）に特異的な結合性領域を含む限りにおいて、公知であるかまたは将来的な、非免疫グロブリンフレームワークおよび非免疫グロブリン足場を援用することができる。公知の非免疫グロブリンフレームワークまたは非免疫グロブリン足場は、フィブロネクチン（C o m p o u n d T h e r a p e u t i c s, I n c.、W a l t h a m, M A）、アンキリン（M o l e c u l a r P a r t n e r s A G、Z u r i c h、S w i t z e r l a n d）、ドメイン抗体（D o m a n t i s, L t d.、C a m b r i d g e, M A、および A b l y n x n v、Z w i j n a a r d e、B e l g i u m）、リポカリン（P i e r i s P r o t e o l a b A G、F r e i s i n g、G e r m a n y）、低分子モジュラー免疫医薬品（T r u b i o n P h a r m a c e u t i c a l s I n c.、S e a t t l e、W A）、マキシボディー（A v i d i a, I n c.、M o u n t a i n V i e w、C A）、プロテイン A（A f f i b o d y A G、S w e d e n）、およびアフリン（ガンマークリスタリンまたはユビキチン）（S c i l P r o t e i n s G m b H、H a l l e、G e r m a n y）を含むがこれらに限定されない。

【0232】

フィブロネクチン足場は、I I I 型フィブロネクチンドメイン（例えば、I I I 型フィブロネクチンの第 10 モジュール（¹⁰ F n 3 ドメイン））に基づく。I I I 型フィブロネクチンドメインは、それら自体が互いに対してパッキングされてタンパク質のコアを形成し、ベータ鎖を互いへと接続し、溶媒へと露出されるループ（C D R と類似する）もさらに含有する、2 つのベータシートの上に分配された、7 つまたは 8 つのベータ鎖を有する。ベータシートサンドイッチの各エッジには、少なくとも 3 つのこのようなループがあ

り、ここで、エッジは、ベータ鎖の方向に対して垂直なタンパク質の境界である（US 6,818,418を参照されたい）。全体的なフォールドは、ラクダIgG内およびラマIgG内の抗原認識単位全体を含む、最小の機能的抗体断片である、重鎖可変領域のフォールドと密接に関連するが、これらのフィブロネクチンベースの足場は、免疫グロブリンではない。この構造のために、非免疫グロブリン抗体は、性質およびアフィニティーが抗体の性質およびアフィニティーと類似する抗原結合特性を模倣する。これらの足場は、*in vivo*における抗体のアフィニティー成熟の工程と類似する、*in vitro*におけるループのランダム化戦略およびシャフリング戦略において使用することができる。これらのフィブロネクチンベースの分子は、標準的なクローニング法を使用して、分子のループ領域をCDRで置きかえうる、足場として使用することができる。

10

【0233】

アンキリン技術は、アンキリンから導出されたりピートモジュールを伴うタンパク質を、異なる標的への結合に使用しうる可変領域を保有する足場として使用することに基づく。アンキリンリピートモジュールとは、2つのアンチパラレルの α -ヘリックスおよび β -ターンからなる、33アミノ酸のポリペプチドである。可変領域の結合は、リボソームディスプレイを使用することにより、最もよく最適化することができる。

【0234】

アビマーは、Notch3など、天然のAドメイン含有タンパク質から導出される。これらのドメインは、天然では、タンパク質間相互作用に使用され、ヒトでは、250を超えるタンパク質が、構造的にAドメインに基づく。アビマーは、アミノ酸リンカーを介して連結された多数の（2つ～10の）異なる「Aドメイン」単量体からなる。標的抗原に結合しうるアビマーは、例えば、米国特許出願公開第20040175756号；同第20050053973号；同第20050048512号；および同第20060008844号において記載されている方法を使用して創出することができる。

20

【0235】

アフィニティーリガンドであるアフィボディーとは、プロテインAのIgG結合性ドメインのうちの1つの足場に基づく3ヘリックスバンドルからなる、低分子の単純なタンパク質である。プロテインAとは、細菌である黄色ブドウ球菌（*Staphylococcus aureus*）に由来する表面タンパク質である。この足場ドメインは、それらのうちの13が、多数のリガンド変異体を伴うアフィボディーライブラリーを作り出すようにランダム化されている、58アミノ酸からなる（例えば、US 5,831,012を参照されたい）。アフィボディー分子は、抗体を模倣し、150kDaである抗体の分子量と比較して、分子量が6kDaである。その小サイズにもかかわらず、アフィボディー分子の結合性部位は、その抗体の結合性部位と類似する。

30

【0236】

アンチカリンとは、Pieris ProteoLab AG社により開発された生成物である。アンチカリンは、通例、化学的に感受性の化合物または不溶性の化合物の生理学的輸送または貯蔵に関与する、広範にわたる低分子の頑健なタンパク質群であるリボカリンから導出される。ヒト組織内またはヒト体液中では、複数の天然リボカリンが生じる。タンパク質のアーキテクチャーは、リジッドフレームワークの上に超可変ループを伴い、免疫グロブリンを連想させる。しかし、抗体またはそれらの組換え断片とは対照的に、リボカリンは、単一の免疫グロブリンドメインよりごくわずかに大きい、160～180アミノ酸残基を伴う単一のポリペプチド鎖からなる。結合性ポケットを構成する4つのループのセットは、顕著な構造可塑性を示し、様々な側鎖を許容する。したがって、異なる形状の規定の標的分子を、高度なアフィニティーおよび特異性で認識するために、結合性部位を特許権のある工程で成形し直すことができる。4つのループのセットを突然変異誘発することによりアンチカリンを開発するのには、リボカリンファミリーの1つのタンパク質である、オオモンシロチョウ（*Pieris brassicae*）のビリン結合性タンパク質（BBP）が使用されている。アンチカリンについて記載する特許出願の1つの例は、PCT公開第WO199916873号における例である。

40

50

【0237】

アフィリン分子とは、タンパク質および低分子に対する特異的なアフィニティーのためにデザインされた低分子非免疫グロブリンタンパク質である。新たなアフィリン分子は、それらの各々が、異なるヒト由来の足場タンパク質に基づく2つのライブラリーから極めて迅速に選択することができる。アフィリン分子は、免疫グロブリンタンパク質に対して、いかなる構造相同性も示さない。現在、2つのアフィリン足場が援用されており、それらのうちの一方は、ヒト水晶体の構造タンパク質であるガンマクリスタリンであり、他方は、「ユビキチン」スーパーファミリータンパク質である。いずれのヒト足場も極めて小型で、高度な温度安定性を示し、pH変化および変性剤に対してほぼ耐性である。この高度な安定性は主に、タンパク質のベータシート構造の展開に起因する。ガンマクリスタリンに由来するタンパク質の例は、WO200104144において記載されており、「ユビキチン様」タンパク質の例は、WO2004106368において記載されている。

10

【0238】

タンパク質エピトープ模倣体（PEM）とは、タンパク質間相互作用に關与する主要な二次構造である、タンパク質のベータヘアピン二次構造を模倣する、中程度のサイズの環状ペプチド様分子（MW：1～2kDa）である。

【0239】

いくつかの実施形態では、Fc領域を変化させることにより、Fabを、サイレントIgG1フォーマットへと転換する。例えば、表2の抗体は、IgGフォーマットへと転換することができる。

20

【0240】

ヒト抗体またはヒト化抗体

本開示は、Notch3タンパク質（例えば、ヒトおよび／またはカニクイザル／マウスNotch3）に特異的に結合する完全ヒト抗体を提示する。キメラ抗体またはヒト化抗体と比較して、ヒトNotch3結合性抗体は、ヒト対象へと投与される場合の抗原性がさらに低減されている。

【0241】

ヒトNotch3結合性抗体は、当技術分野で公知の方法を使用して作り出すことができる。例えば、ヒト化操作技術を使用して、非ヒト抗体を、操作ヒト抗体へと転換する。米国特許公開第20050008625号は、非ヒト抗体の結合特徴に照らして、同じ結合特徴を維持するか、または良好な結合特徴をもたらしながら、非ヒト抗体の可変領域を、抗体内のヒト可変領域で置きかえるためのin vivo法について記載している。方法は、エピトープ誘導型、非ヒト基準抗体の可変領域の、完全ヒト抗体による置きかえに依拠する。結果として得られるヒト抗体は一般に、基準の非ヒト抗体とは構造的に類縁でないが、基準抗体と同じ抗原上の同じエピトープに結合する。略述すると、一連のエピトープにより誘導される相補性置換法は、「コンペティター」と、基準抗体の多様なハイブリッド体（「被験抗体」）のライブラリーとの間の、抗原に対する被験抗体の結合に応答するレポーター系の存在下における限定量の抗原への結合についての、細胞内の競合を準備することにより可能となる。コンペティターは、基準抗体または、単鎖Fv断片など、その誘導体でありうる。コンペティターはまた、抗原の天然または人工のリガンドであって、基準抗体と同じエピトープに結合するリガンドでもありうる。コンペティターの唯一の要件は、基準抗体と同じエピトープに結合し、基準抗体と、抗原への結合について競合することである。被験抗体は、非ヒト基準抗体に由来する1つの抗原結合性V領域を共有し、ヒト抗体のレパートリーライブラリーなど、多様な供給源に由来する、他のV領域は、ランダムに選択される。基準抗体に由来する共通のV領域は、選択に、基準抗体への抗原結合忠実度が最高となる方向へのバイアスがかかるように、被験抗体を抗原上の同じエピトープ上に、同じ配向性で位置決めするガイドとして用いられる。

30

40

【0242】

多くの種類のレポーター系を使用して、被験抗体と抗原との間の所望の相互作用を検出することができる。例えば、レポーターが、被験抗体が抗原に結合する場合に限り、断片

50

の相補により活性化するように、相補的レポーター断片を、抗原および被験抗体のそれぞれへと連結することができる。被験抗体側のレポーター断片と、抗原側のレポーター断片との融合体を、コンペティターと共に共発現させると、レポーターの活性化は、コンペティターと競合する被験抗体の能力であって、被験抗体の抗原に対するアフィニティーに比例する能力に依存するようになる。使用されうる他のレポーター系は米国特許出願第10/208,730号(同公開第20030198971号)で開示されている、自己阻害レポーター再活性化系(RAIR)の再活性化因子、または米国特許出願第10/076,845号(同公開第20030157579号)で開示されている、競合活性化系を含む。

【0243】

一連のエピトープ誘導型相補性置換系により選択を行って、単一の被験抗体を、コンペティター成分、抗原成分、およびレポーター成分と共に発現させる細胞を同定する。これらの細胞では、各被験抗体は、コンペティターと一対一で、限定量の抗原への結合について競合する。レポーターの活性は、被験抗体に結合した抗原の量に比例し、これは、結果として被験抗体の抗原に対するアフィニティーおよび被験抗体の安定性に比例する。まず、被験抗体として発現させた場合の、基準抗体の活性に照らしたそれらの活性に基づき、被験抗体を選択する。第1のラウンドの選択の結果は、それらの各々が、基準抗体に由来する同じ非ヒトV領域と、ライブラリーに由来するヒトV領域とを含み、それらの各々が、基準抗体と同じ、抗原上のエピトープに結合する、「ハイブリッド」抗体のセットである。第1のラウンドで選択されたハイブリッド抗体のうちの1または複数は、抗原に対して、基準抗体のアフィニティーと同等であるかまたはこれより大きなアフィニティーを有するであろう。

【0244】

第2のV領域置換ステップでは、第1のステップで選択されたヒトV領域を、残りの非ヒト基準抗体のV領域のための、コグネイトのヒトV領域の多様なライブラリーによるヒト置換を選択するためのガイドとして使用する。第1のラウンドで選択されたハイブリッド抗体はまた、第2のラウンドの選択のためのコンペティターとして使用することもできる。第2のラウンドの選択の結果は、基準抗体と構造的に異なるが、基準抗体と、同じ抗原への結合について競合する、完全ヒト抗体のセットである。選択されたヒト抗体のうちのいくつかは、基準抗体と同じ抗原上の同じエピトープに結合する。これらの選択されたヒト抗体の中で、1または複数のヒト抗体は、基準抗体のアフィニティーと同等であるかまたはこれより大きなアフィニティーで、同じエピトープに結合する。

【0245】

上記で記載した、マウスN o t c h 3結合性抗体またはキメラN o t c h 3結合性抗体のうちの1つを基準抗体として使用するこの方法は、同じ結合特異性および同じであるかまたは良好な結合アフィニティーでヒトN o t c h 3に結合するヒト抗体を作り出すのにたやすく援用することができる。加えて、このようなヒトN o t c h 3結合性抗体はまた、ヒト抗体を特注で作製する企業、例えば、K a l o B i o s , I n c . (M o u n t a i n V i e w , C A) から市販されている。

【0246】

ラクダ科動物抗体

ラマ種(アルパカ(Lama pacos)、ラマ(Lama glama)、およびビクーニャ(Lama vicugna))などの新世界メンバー含む、ラクダおよびヒトコブラクダ(dromedary)(フタコブラクダ(Camelus bactrianus)およびヒトコブラクダ(Camelus dromaderius))ファミリーのメンバーから得られる抗体タンパク質は、サイズ、構造的複雑性、およびヒト対象に対する抗原性に関して特徴付けられている。天然で見出されるこのファミリーの哺乳動物に由来するある種のIgG抗体は、軽鎖を欠き、したがって、他の動物に由来する抗体の場合の、2つの重鎖および2つの軽鎖を有する、4つの鎖による典型的な四次構造とは構造的に顕著に異なっている。P C T / E P 9 3 / 0 2 2 1 4 (1 9 9 4 年 3 月 3 日 に公表されたW O 9 4 / 0 4 6 7 8) を参照されたい。

【0247】

VHHとして同定される小型の単一の可変ドメインである、ラクダ科動物抗体の領域は、標的に対するアフィニティーが大きな低分子タンパク質をもたらすことから、「ラクダ科動物ナノボディー」として公知の、低分子量抗体から導出されるタンパク質を結果としてもたらす遺伝子操作により得ることができる。1998年6月2日に交付された米国特許第5,759,808号を参照されたい。また、Stijlemans et al., (2004) J Biol Chem 279:1256-1261; Dumoulin et al., (2003) Nature 424:783-788; Pleschberger et al., (2003) Bioconjugate Chem 14:440-448; Cortez-Retamozo et al., (2002) Int J Cancer 89:456-62; およびLauwereys et al., (1998) EMBO J 17:3512-3520も参照されたい。ラクダ科動物抗体および抗体断片の操作ライブラリーは、例えば、Ablynx、Ghent、Belgiumから市販されている（例えば、US20060115470; Domantis (US20080065440、US20090148434)）。非ヒト由来の他の抗体と同様に、ラクダ科動物抗体のアミノ酸配列は、ヒト配列により酷似する配列を得るように、組換えにより変化させることができる、すなわち、ナノボディーは、「ヒト化する」ことができる。したがって、ヒトに対するラクダ科動物抗体の天然の小さな抗原性を、さらに低減することができる。

10

【0248】

ラクダ科動物ナノボディーの分子量は、ヒトIgG分子の分子量の約10分の1で、タンパク質の物理的直径は、数ナノメートルに過ぎない。サイズが小さいことの1つの帰結は、大型の抗体タンパク質には機能的に対象外である抗原性部位に結合するラクダ科動物ナノボディーの能力である、すなわち、ラクダ科動物ナノボディーは、古典的な免疫学的技法を使用するこれ以外の形では隠蔽されたままの抗原を検出する試薬として有用であり、可能な治療剤として有用である。したがって、サイズが小さいことのさらに別の帰結は、ラクダ科動物ナノボディーが、標的タンパク質のグルーブ内または狭小なクレフト内の特異的部位に結合することの結果として、標的タンパク質を阻害することが可能であり、よって、古典的な抗体の機能よりも、古典的な低分子量の薬物の機能により酷似する能力において用いられうることである。

20

【0249】

低分子量およびコンパクトなサイズはさらに、熱安定性が極めて大きく、極端なpHおよびタンパク質分解性消化に対して安定的であり、抗原性が小さいラクダ科動物ナノボディーを結果としてもたらす。別の帰結は、ラクダ科動物ナノボディーが、循環系から組織へとたやすく移動し、血液脳関門もなお越え、神経組織に影響を及ぼす障害も処置しうることである。ナノボディーはさらに、血液脳関門を越える薬物輸送も容易としうる。2004年8月19日に公表された米国特許出願第20040161738号を参照されたい。これらの特色を、ヒトに対する抗原性が小さいことと組み合わせることにより、大きな治療的可能性が指し示される。さらに、これらの分子は、大腸菌(E. coli)などの原核細胞内で十分に発現させることができ、バクテリオファージとの融合タンパク質として発現させることができ、機能的である。

30

【0250】

したがって、本開示の特色は、Notch3に対するアフィニティーが大きなラクダ科動物抗体またはラクダ科動物ナノボディーである。本明細書のある種の実施形態では、ラクダ科動物抗体またはラクダ科動物ナノボディーは、天然ではラクダ科動物において産生される、すなわち、他の抗体について本明細書に記載される技法を使用する、Notch3またはそのペプチド断片による免疫化の後で、ラクダ科動物により産生される。代替的に、Notch3結合性ラクダ科動物ナノボディーは、操作もされる、すなわち、例えば、本明細書の実施例において記載されている、標的としてのNotch3を伴うパニング手順を使用する、適切に突然変異誘発されたラクダ科動物ナノボディータンパク質を提示するファージライブラリーからの選択によっても作製される。操作されたナノボディーはさらに、遺伝子操作により、レシピエント対象における半減期が、45分間～2週間となるようにカスタマイズすることもできる。具体的な実施形態では、ラクダ科動物抗体また

40

50

はラクダ科動物ナノボディーを、例えば、P C T / E P 9 3 / 0 2 2 1 4 において記載されている通り、ヒト抗体の重鎖または軽鎖の C D R 配列を、ナノボディーまたは単ドメイン抗体フレームワーク配列へとグラフトすることにより得る。

【0251】

一実施形態では、ラクダ科動物抗体またはラクダ科動物ナノボディーは、以下の N o t c h 3 残基：C y s 1 4 4 2、P r o 1 4 4 4、A l a 1 4 4 5、S e r 1 4 4 7、S e r 1 4 4 8、P r o 1 4 4 9、T y r 1 4 5 3、C y s 1 4 5 8、G l y 1 4 6 1、G l y 1 4 6 2、G l y 1 4 6 4、L e u 1 5 9 2、S e r 1 5 9 4、P r o 1 5 9 5、G l u 1 5 9 6、A s n 1 5 9 7、A s p 1 5 9 8、および H i s 1 5 9 9 のうちの少なくとも1つに結合する。一実施形態では、ラクダ科動物抗体またはラクダ科動物ナノボディーは、以下の N o t c h 3 残基：G l n 1 4 2 7、C y s 1 4 2 8、G l u 1 4 2 9、P r o 1 4 4 4、S e r 1 4 4 5、S e r 1 4 4 7、S e r 1 4 4 8、P r o 1 4 4 9、T y r 1 4 5 3、L e u 1 5 0 7、L e u 1 5 0 8、A r g 1 5 1 0、L e u 1 5 9 2、A s p 1 5 9 8、P r o 1 6 0 2、および S e r 1 6 0 6 のうちの少なくとも1つに結合する。

10

【0252】

一実施形態では、ラクダ科動物抗体またはラクダ科動物ナノボディーは、以下の N o t c h 3 残基：A r g 1 4 6 3、T h r 1 4 6 6、A s n 1 4 6 8、P r o 1 4 6 9、V a l 1 4 7 0、T y r 1 4 7 1、T y r 1 4 7 4、G l n 1 4 8 6、および G l y 1 4 8 7 のうちの少なくとも1つに結合する。一実施形態では、ラクダ科動物抗体またはラクダ科動物ナノボディーは、以下の N o t c h 3 残基：S e r 1 4 4 0、A r g 1 4 6 5、T h r 1 4 6 6、A s n 1 4 6 8、P r o 1 4 6 9、V a l 1 4 7 0、G l u 1 4 7 2、A r g 1 4 3 4、G l u 1 6 1 8、A r g 1 6 1 9、および A s p 1 6 2 1 のうちの少なくとも1つに結合する。

20

【0253】

二特異性分子および多価抗体

別の態様では、本開示は、本開示の N o t c h 3 抗体またはその断片を含む二パラトープ性分子、二特異性分子、または多特異性分子を特色とする。本開示の抗体またはその断片は、少なくとも2つの異なる結合性部位または標的分子に結合する二特異性分子を作り出すように誘導体化することもでき、別の機能的分子、例えば、別のペプチドまたはタンパク質（例えば、受容体に対する別の抗体またはリガンド）へと連結することもできる。抗体は実際、2つを超える異なる結合性部位および／または標的分子に結合する二パラトープ性分子または多特異性分子を作り出すように誘導体化することもでき、他の複数の機能的分子へと連結することもでき、このような二パラトープ性分子または多特異性分子もまた、本開示に包摂されることを意図する。本開示の二特異性分子を創出するには、抗体を、二特異性分子が結果として得られるように、別の抗体、抗体断片、ペプチド、または結合性模倣体など、1または複数の他の結合分子へと機能的に連結する（例えば、化学的カップリング、遺伝子融合、非共有結合的会合により、またはこれら以外の形で）ことができる。

30

【0254】

1つの抗体内の、2つ以上の抗原への結合により、さらなる臨床的利益がもたらされる (Coloma et al., (1997); Merchant et al., (1998); Alt et al., (1999); Zuo et al., (2000); Lu et al., (2004); Lu et al., (2005); Marvin et al., (2005); Marvin et al., (2006); Shen et al., (2007); Wu et al., (2007); Dimasi et al., (2009); Michaelson et al., (2009); Morrison et al., (1997) Nature Biotech. 15:159-163; Alt et al., (1999) FEBS Letters 454:90-94; Zuo et al., (2000) Protein Engineering 13:361-367; Lu et al., (2004) JBC 279:2856-2865; Lu et al., (2005) JBC 280:19665-19672; Marvin et al., (2005) Acta Pharmacologica Sinica 26:649-658; Marvin et al., (2006) Curr Opin Drug Disc Develop 9:184-193; Shen et al., (2007) J Immun Methods 218:65-74; Wu et al., (2007) Nat Biotechnol. 11:1290-1297; Dimasi et al., (2

40

50

009) J Mol Biol. 393:672-692 ; および Michaelson et al., (2009) mAbs 1:128-141)。

【0255】

本開示の二特異性分子は、当技術分野で公知の方法を使用して、構成要素である結合特異性物質をコンジュゲートさせることにより調製することができる。例えば、二特異性分子の各結合特異性物質は、個別に作り出し、次いで、互いとコンジュゲートさせることができる。結合特異性物質がタンパク質またはペプチドである場合は、様々なカップリング剤または架橋剤を、共有結合的コンジュゲーションに使用することができる。架橋剤の例は、プロテインA、カルボジイミド、N-スクシンイミジル-S-アセチルチオアセテート (S A T A : N-succinimidyl-S-acetyl-thioacetate)、5, 5'-ジチオビス (2-ニトロ安息香酸) (D T N B)、o-フェニレンジマレイミド (o P D M)、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ) プロピオネート (S P D P)、およびスルホスクシンイミジル 4-(N-マレイミドメチル) シクロヘキサン-1-カルボキシレート (s u l f o - S M C C : sulfosuccinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate) を含む (例えば、Karpovsky et al., (1984) J. Exp. Med. 160:1686 ; Liu et al., (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648 を参照されたい)。他の方法は、Paulus (1985) Behring Ins. Mitt. No. 78:118-132 ; Brennan et al., (1985) Science 229:81-83 ; および Glennie et al., (1987) J. Immunol. 139: 2367-2375 において記載されている方法を含む。コンジュゲート剤は、S A T A および s u l f o - S M C C であり、いずれも、Pierce Chemical Co. (Rockford, IL) から市販されている。

【0256】

結合特異性物質が、抗体である場合、それらは、2つの重鎖のC末端ヒンジ領域をスルフヒドリル結合させることによりコンジュゲートさせることができる。特定の実施形態では、コンジュゲーションの前に、奇数のスルフヒドリル残基、例えば、1つのスルフヒドリル残基を含有するように、ヒンジ領域を修飾する。

【0257】

代替的に、いずれの結合特異性物質も、同じベクター内でコードさせ、同じ宿主細胞内で発現およびアセンブルさせることができる。この方法は、二特異性分子が、m A b × m A b 融合タンパク質、m A b × F a b 融合タンパク質、F a b × F (a b ')₂ 融合タンパク質、またはリガンド × F a b 融合タンパク質である場合に、特に有用である。二特異性分子は、1つの単鎖抗体および結合決定基を含む単鎖分子の場合もあり、2つの結合決定基を含む単鎖二特異性分子の場合もある。二特異性分子は、少なくとも2つの単鎖分子を含みうる。二特異性分子を調製する方法については、例えば、米国特許第5, 260, 203号 ; 米国特許第5, 455, 030号 ; 米国特許第4, 881, 175号 ; 米国特許第5, 132, 405号 ; 米国特許第5, 091, 513号 ; 米国特許第5, 476, 786号 ; 米国特許第5, 013, 653号 ; 米国特許第5, 258, 498号 ; および米国特許第5, 482, 858号において記載されている。

【0258】

二特異性分子の、それらの特異的な標的に対する結合は、例えば、酵素免疫測定アッセイ (E L I S A : enzyme-linked immunosorbent assay)、ラジオイムノアッセイ (R E A)、F A C S 解析、バイオアッセイ (例えば、成長阻害)、またはウェスタンブロットアッセイにより確認することができる。これらのアッセイの各々では一般に、対象の複合体に特異的な、標識された試薬 (例えば、抗体) を援用することにより、特に対象となるタンパク質-抗体間複合体の存在が検出される。

【0259】

別の態様では、本開示は、N o t c h 3 に結合する抗体の、少なくとも2つの、同一であるかまたは異なる断片を含む、多価化合物を提示する。抗体断片は、タンパク質の融合または共有結合的連結もしくは非共有結合的連結を介して、併せて連結することができる。四価化合物は、例えば、本開示の抗体を、本開示の抗体の定常領域、例えば、F c 領域またはヒンジ領域に結合する抗体と架橋することにより得ることができる。三量体化ドメ

インについては、例えば、B o r e a nによる特許であるE P 1 0 1 2 2 8 0 B 1において記載されている。五量体化モジュールについては、例えば、P C T / E P 9 7 / 0 5 8 9 7において記載されている。

【0260】

一実施形態では、ニパレート性／ニ特異性分子は、N o t c h 3のL N R内およびH D内のアミノ酸残基に結合する。

【0261】

別の実施形態では、本開示は、単一のモノクローナル抗体を、抗原結合性部位が、N o t c h 3および別の抗原（例えば、N o t c h 1、E G F R）の両方に結合する二官能性抗体など、複数の抗原に結合するように改変した、二官能性抗体に関する。したがって、二官能性抗体は、N o t c h 3およびN o t c h 1またはE G F Rの両方に結合しうる。二官能性抗体による二重の結合特異性は、さらに二重の活性または活性の阻害へも変換されうる（例えば、Jenny Bostrom et al., (2009) Science: 323; 1610-1614を参照されたい）。

【0262】

半減期を延長した抗体

本開示は、i n v i v oにおける半減期を延長した、N o t c h 3タンパク質に特異的に結合する抗体を提示する。

【0263】

多くの因子が、i n v i v oにおけるタンパク質の半減期に影響を及ぼしうる。例えば、腎臓における濾過、肝臓における代謝、タンパク質分解性酵素（プロテアーゼ）による分解、および免疫原性応答（例えば、抗体によるタンパク質の中和、ならびにマクロファージおよび樹状細胞による取込み）。様々な戦略を使用して、本開示の抗体の半減期を延長することができる。例えば、ポリエチレングリコール（P E G : polyethyleneglycol）、r e C O D E P E G、抗体足場、ポリシアル酸（P S A : polysialic acid）、ヒドロキシエチルデンプン（H E S : hydroxyethyl starch）、アルブミン結合性リガンド、および炭水化物シールドとの化学的連結により；アルブミン、I g G、F c R n、およびトランスフェリンなどの血清タンパク質に結合するタンパク質との遺伝子融合により；ナノボディー、F a b、D A R P i n s、アビマー、アフィボディー、およびアンチカリンなど、血清タンパク質に結合する他の結合部分とカップリングする（遺伝子的または化学的に）ことにより；r P E G、アルブミン、アルブミンのドメイン、アルブミン結合性タンパク質、およびF cとの遺伝子融合により；またはナノ担体、徐放処方物、もしくは医療デバイスへの組み込みによる。

【0264】

i n v i v oにおける抗体の血清中循環を延長するため、高分子量のP E Gなど、不活性のポリマー分子を、P E Gの、抗体のN末端もしくはC末端への部位特異的コンジュゲーションを介して、またはリシン残基上に存在するイプシロンーアミノ基を介して、多官能性リンカーを伴うかまたは多官能性リンカーを伴わない、抗体またはそれらの断片へと接合することができる。抗体をP E G化するには、抗体またはその断片を、P E Gの反応性エステルまたはアルデヒド誘導体などのポリエチレングリコール（P E G）と、1または複数のP E G基が抗体または抗体断片へと接合する条件下で反応させることが典型的である。P E G化は、反応性P E G分子（または類似する反応性の水溶性ポリマー）とのアシル化反応またはアルキル化反応により実行することができる。本明細書で使用される「ポリエチレングリコール」という用語は、モノ（C 1 ~ C 1 0）アルコキシーポリエチレングリコールもしくはモノ（C 1 ~ C 1 0）アリーロキシーポリエチレングリコールまたはポリエチレングリコールーマレイミドなど、他のタンパク質を誘導体化するのに使用されているP E Gの形態のうちのいずれかを包摂することを意図する。ある種の実施形態では、P E G化される抗体は、脱グリコシル化抗体である。直鎖状ポリマーまたは分枝状ポリマーの誘導体化であって、生物学的活性の喪失を結果として最小とする誘導体化が、使用されるであろう。コンジュゲーションの程度を、S D S - P A G Eおよび質量分析に

より緊密にモニタリングして、PEG分子の抗体への適正なコンジュゲーションを確認することができる。反応しなかったPEGは、サイズ除外クロマトグラフィーまたはイオン交換クロマトグラフィーにより、抗体-PEGコンジュゲートから分離することができる。PEG誘導体化抗体は、当業者に周知の方法を使用して、例えば、本明細書に記載されるイムノアッセイにより、結合活性のほか、*in vivo*における有効性についても調べることができる。当技術分野では、タンパク質をPEG化するための方法が公知であり、本開示の抗体に適用することができる。例えば、NishimuraらによるEP0154316およびIshikawaraらによるEP0401384を参照されたい。

【0265】

他の改変PEG化技術は、tRNAシンセターゼおよびtRNAを含む再構成系を介して、化学的に性状が明らかな側鎖を、生合成タンパク質へと組み込む、ReCODE PEG (reconstituting chemically orthogonal directed engineering) 技術を含む。この技術は、30を超える新たなアミノ酸の、大腸菌 (*E. coli*) 細胞内、酵母細胞内、および哺乳動物細胞内の生合成タンパク質への組み込みを可能とする。tRNAは、非天然アミノ酸を、アンバーコドンが配置される任意の位置へと組み込み、終止コドンであるアンバーコドンを、化学的に性状が明らかなアミノ酸の組み込みのシグナルを伝達するコドンへと転換する。

【0266】

組換えPEG化 (rPEG: recombinant pegylation) 技術はまた、血清中半減期の延長にも使用することができる。この技術は、300~600アミノ酸の非構造化タンパク質テールを、既存の医薬用タンパク質へと遺伝子融合させることを伴う。このような非構造化タンパク質鎖の見かけの分子量は、その実際の分子量の約15倍であるため、タンパク質の血清中半減期は、大幅に延長される。化学的コンジュゲーションおよび再精製を要請する従来のPEG化とは対照的に、製造工程は大幅に簡略化され、生成物は、均質である。

【0267】

ポリシアル化は、天然のポリマーであるポリシアル酸 (PSA) を使用して、活性寿命を延長し、治療用ペプチドおよび治療用タンパク質の安定性を改善する、別の技術である。PSAとは、シアル酸 (糖) のポリマーである。タンパク質および治療用ペプチドの薬物送達に使用される場合、ポリシアル酸は、コンジュゲーションされると、保護的微小環境をもたらす。これは、循環内の治療用タンパク質の活性寿命を延長し、それが免疫系により認識されることを防止する。PSAポリマーは、天然では、ヒト体内で見出される。PSAポリマーは、数百万年にわたり、それらの細胞壁をPSAポリマーでコーティングするように進化した、ある種の細菌により採用された。次いで、これらの天然でポリシアル化した細菌は、分子的模倣により、体内の防御系を失効化することが可能となった。自然による究極のステルス技術であるPSAは、このような細菌から、大量に、かつ、所定の物理的特徴を伴って、容易に作製することができる。細菌PSAは、ヒト体内ではPSAと化学的に同一であるので、タンパク質へとカップリングさせた場合でもなお、完全に非免疫原性である。

【0268】

別の技術は、抗体へと連結されたヒドロキシエチルデンプン (「HES」) 誘導体の使用を含む。HESとは、蟻状トウモロコシデンプンから導出された、修飾天然ポリマーであり、体内の酵素により代謝されうる。HES溶液は通例、血液量不足を補い、血液のレオロジー特性を改善するために投与される。抗体のHES化は、分子の安定性を増大させることのほか、腎クリアランスを低減することによっても、循環半減期の延長を可能とし、生物学的活性の増大を結果としてもたらす。HESの分子量など、異なるパラメータを変化させることにより、広範にわたるHES抗体コンジュゲートをカスタマイズすることができる。

【0269】

*in vivo*における半減期を延長した抗体はまた、1または複数のアミノ酸修飾 (

10

20

30

40

50

すなわち、置換、挿入、または欠失)を、IgG定常ドメインまたはそのFcRn結合性断片(好ましくはFcドメイン断片またはヒンジFcドメイン断片)へと導入しても作り出すことができる。例えば、国際公開第WO98/23289号、国際公開第WO97/34631号;および米国特許第6,277,375号を参照されたい。

【0270】

さらに、抗体または抗体断片を、*in vivo*においてより安定的とするか、または*in vivo*における半減期を延長するために、抗体を、アルブミンへとコンジュゲートさせることもできる。当技術分野では、技法が周知であり、例えば、国際公開第WO93/15199号、同第WO93/15200号、および同第WO01/77137号;ならびに欧州特許第EP413,622号を参照されたい。

10

【0271】

Notch3抗体またはその断片はまた、1または複数のヒト血清アルブミン(HSA: human serum albumin)ポリペプチドまたはそれら部分へと融合させることもできる。その成熟形態において585アミノ酸のタンパク質であるHSAは、血清の浸透圧のうちのかなりの部分の一因となり、また、内因性リガンドおよび外因性リガンドの担体としても機能する。アルブミンの担体分子としての役割およびその不活性の性質は、*in vivo*におけるポリペプチドの担体および輸送体としての使用に所望される特性である。アルブミンの、多様なタンパク質のための担体としてのアルブミン融合タンパク質の成分としての使用は、WO93/15199、WO93/15200、およびEP413622において示唆されている。また、HSAのN末端断片の、ポリペプチドへと融合させるための使用も提起されている(EP399666)。したがって、抗体またはそれらの断片を、アルブミンへと、遺伝子的または化学的に融合またはコンジュゲートさせることにより、保管寿命を安定化させるかもしくは延長し、かつ/または溶液中、*in vitro*、および/もしくは*in vivo*における分子活性を長期間にわたり保持することができる。

20

【0272】

アルブミンの、別のタンパク質への融合は、HSAまたはその断片をコードするDNAを、タンパク質をコードするDNAへと接合させるような遺伝子操作により達成することができる。次いで、適切な宿主を、融合ポリペプチドを発現させるように、適切なプラスミド上に配置された融合ヌクレオチド配列で、形質転換するかまたは適切な宿主にこれをトランスフェクトする。発現は、*in vitro*において、例えば、原核細胞または真核細胞から行うこともでき、*in vivo*において、例えば、トランスジェニック生物から行うこともできる。HSAの融合に関するさらなる方法は、例えば、参照により本明細書に組み込まれる、WO2001077137およびWO200306007において見出すことができる。具体的な実施形態では、融合タンパク質の発現を、哺乳動物細胞系内、例えば、CHO細胞系内で実施する。また、低pHおよび高pHにおける、示差的な抗体の受容体への結合の変化も、本開示の範囲内にあることが想定されている。例えば、ヒスチジンなどのさらなるアミノ酸を、抗体のCDRに含むように、抗体を改変することにより、低pH、例えば、リソソーム内の低pHで、その受容体への結合を維持するように、抗体のアフィニティーを改変することができる(例えば、Tomoyuki Igawa et al. (2010) Nature Biotechnology; 28, 1203-1207を参照されたい)。

30

40

【0273】

抗体コンジュゲート

本開示は、融合タンパク質を作り出すように、異種タンパク質または異種ポリペプチドへと(もしくはその断片、好ましくは、少なくとも10、少なくとも20、少なくとも30、少なくとも40、少なくとも50、少なくとも60、少なくとも70、少なくとも80、少なくとも90、または少なくとも100アミノ酸のポリペプチドへと)、組換えにより融合させるかまたは化学的にコンジュゲートさせた(共有結合的コンジュゲーションおよび非共有結合的コンジュゲーションの両方を含む)、Notch3タンパク質に特異的に結合する抗体またはそれらの断片を提示する。特に、本開示は、本明細書で記載され

50

る抗体断片（例えば、F a b断片、F d断片、F v断片、F（a b）2断片、V Hドメイン、V H C D R、V Lドメイン、またはV L C D R）と、異種タンパク質、異種ポリペプチド、または異種ペプチドとを含む融合タンパク質を提示する。当技術分野では、タンパク質、ポリペプチド、またはペプチドを、抗体または抗体断片へと融合またはコンジュゲートさせるための方法が公知である。例えば、米国特許第5, 336, 603号、同第5, 622, 929号、同第5, 359, 046号、同第5, 349, 053号、同第5, 447, 851号、および同第5, 112, 946号；欧州特許第E P 307, 434号および同第E P 367, 166号；国際公開第W O 96 / 04388号および同第W O 91 / 06570号；Ashkenazi et al., (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10535-10539；Zheng et al., (1995) J. Immunol. 154:5590-5600；ならびにVil et al., (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:11337- 11341を参照されたい。

【0274】

さらなる融合タンパク質は、遺伝子シャフリング、モチーフシャフリング、エクソンシャフリング、および／またはコドンシャフリング（まとめて、「DNAシャフリング」と称する）の技法を介して作り出すことができる。DNAシャフリングを援用して、抗体またはそれらの断片の活性を変化させる（例えば、アフィニティーが大きく、解離速度が小さい抗体またはそれらの断片）ことができる。一般に、米国特許第5, 605, 793号、同第5, 811, 238号、同第5, 830, 721号、同第5, 834, 252号、および同第5, 837, 458号；Patten et al., (1997) Curr. Opin. Biotechnol. 8:724-33；Harayama, (1998) Trends Biotechnol. 16(2):76-82；Hansson et al., (1999) J. Mol. Biol. 287:265-76；およびLorenzo and Blasco, (1998) Biotechniques 24(2):308- 313（これらの特許および刊行物の各々は、参照によりそれらの全体において本明細書に組み込まれる）を参照されたい。抗体もしくはそれらの断片、またはコードされた抗体もしくはそれらの断片は、組換えの前に、エラーブローンPCRを介するランダム突然変異誘発、ランダムヌクレオチド挿入、または他の方法にかけることにより変化させることができる。N o t c h 3タンパク質に特異的に結合する抗体またはその断片をコードするポリヌクレオチドは、1または複数の異種分子の1または複数の成分、モチーフ、区間、部分、ドメイン、断片などで組み換えることができる。

【0275】

さらに、抗体またはそれらの断片は、精製を容易とするペプチドなどのマーカー配列へと融合させることもできる。好ましい実施形態では、マーカーのアミノ酸配列は、それらのうちの多くが市販されている中でとりわけ、p Q Eベクター（Q I A G E N, I n c., 9259 E t o n A v e n u e, C h a t s w o r t h, C A, 91311）において提供されているタグなどのヘキサヒスチジンペプチドである。Gentz et al., (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824において記載されている通り、例えば、ヘキサヒスチジンは、融合タンパク質の簡便な精製をもたらす。精製に有用な他のペプチドタグは、インフルエンザヘマグルチニンタンパク質から導出されたエプトープ（Wilson et al., (1984) Cell 37:767）に対応するヘマグルチニン（「H A」）タグ、および「フラッグ」タグを含むがこれらに限定されない。

【0276】

他の実施形態では、本開示の抗体またはそれらの断片を、診断剤または検出用薬剤へとコンジュゲートさせる。このような抗体は、疾患または障害の発症（onset、development）、進行、および／または重症度を、特定の治療の有効性を決定することなど、臨床検査手順の一部としてモニタリングまたは予後診断するのに有用でありうる。このような診断および検出は、抗体を、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ペーターガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼなどであるがこれらに限定されない多様な酵素；ストレプトアビジン／ビオチンおよびアビジン／ビオチンなどであるがこれらに限定されない補欠分子族；ウンベリフェロン、フルオレセイン、イソチオシアン酸フルオレセイン、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリド、またはフィコエリトリンなどであるがこれらに限定されない蛍光材料；ルミノ

ールなどであるがこれらに限定されない発光材料；ルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびイクオリンなどであるがこれらに限定されない生物発光材料；ヨウ素（ ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{123}I 、および ^{121}I ）、炭素（ ^{14}C ）、硫黄（ ^{35}S ）、トリチウム（ ^3H ）、インジウム（ ^{115}In 、 ^{113}In 、 ^{112}In 、および ^{111}In ）、テクネシウム（ ^{99}Tc ）、タリウム（ ^{201}Tl ）、ガリウム（ ^{68}Ga 、 ^{67}Ga ）、パラジウム（ ^{103}Pd ）、モリブデン（ ^{99}Mo ）、キセノン（ ^{133}Xe ）、フッ素（ ^{18}F ）、 ^{153}Sm 、 ^{177}Lu 、 ^{159}Gd 、 ^{149}Pm 、 ^{140}La 、 ^{175}Yb 、 ^{166}Ho 、 ^{90}Y 、 ^{47}Sc 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{142}Pr 、 ^{105}Rh 、 ^{7}Ru 、 ^{68}Ge 、 ^{57}Co 、 ^{65}Zn 、 ^{85}Sr 、 ^{32}P 、 ^{153}Gd 、 ^{169}Yb 、 ^{51}Cr 、 ^{54}Mn 、 ^{75}Se 、 ^{113}Sn 、および ^{117}Tin などであるがこれらに限定されない放射性材料；ならびに多様なポジトロン断層法を使用するポジトロン放出金属および非放射性の常磁性金属イオンを含むがこれらに限定されない、検出可能な物質へとカップリングすることにより達成することができる。

10

【0277】

本開示は、治療用部分へとコンジュゲートさせた抗体またはそれらの断片の使用もさらに包摂する。抗体またはその断片は、細胞毒素、例えば、細胞増殖抑制剤もしくは殺細胞剤、治療剤または放射性金属イオン、例えば、アルファ放射体などの治療用部分へとコンジュゲートさせることができる。細胞毒素または細胞傷害剤は、細胞に有害な任意の薬剤を含む。

【0278】

20

さらに、抗体またはその断片は、所与の生物学的応答を修飾する治療用部分または薬物部分へとコンジュゲートさせることもできる。治療用部分または薬物部分は、古典的な化学的治療剤に限定されずとは見なされないものとする。例えば、薬物部分は、所望の生物学的活性を保有するタンパク質、ペプチド、またはポリペプチドでありうる。このようなタンパク質は、例えば、アブリン、リシンA、シュドモナス（*Pseudomonas*）属外毒素、コレラ毒素、もしくはジフテリア毒素などの毒素；腫瘍壊死因子、 α -インターフェロン、 β -インターフェロン、神経増殖因子、血小板由来増殖因子、組織プラスミノゲン活性化因子、アポトーシス剤、抗血管新生剤などのタンパク質；または例えば、リンホカインなどの生体応答修飾剤を含みうる。一実施形態では、抗Nctch3抗体またはその断片を、細胞毒素、薬物（例えば、免疫抑制剤）、または放射性毒素などの治療用部分へとコンジュゲートさせる。本明細書では、このようなコンジュゲートを、「イムノコンジュゲート」と称する。1または複数の細胞毒素を含むイムノコンジュゲートを、「抗毒素」と称する。細胞毒素または細胞傷害剤は、細胞に対して有害な（例えば、細胞を死滅させる）任意の薬剤を含む。例は、タキソン、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、およびピューロマイシン、ならびにこれらの類似体または相同体を含む。治療剤はまた、例えば、代謝拮抗剤（例えば、メトトレキサート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-フルオロウラシル、デカルバジン）、アブレーション剤（例えば、メクロレタミン、チオテパ、クロラムブシル、メルファラン、カルムスチン（BSNU）、およびロムスチン（CCNU）、シクロホスファミド、ブスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンC、ならびにシス-ジクロロジアミン白金（II）（DDP：シスプラチン）、アントラサイクリン（例えば、ダウノルビシン（旧称：ダウノマイシン）およびドキソルビシン）、抗生剤（例えば、ダクチノマイシン（旧称：アクチノマイシン）、ブレオマイシン、ミトラマイシン、およびアントラマイシン（AMC））、ならびに抗有糸分裂剤（例えば、ビンクリスチンおよびビンブラスチン）も含む。例えば、Seattle Geneticsによる、US20090304721を参照されたい。

30

40

50

【0279】

抗体へとコンジュゲートさせうる治療用細胞毒素の他の例は、デュオカルマイシン、カリケアミシン、メイタンシン、およびアウリスタチン、ならびにこれらの誘導体を含む。カリケアミシンによる抗体コンジュゲートの例は、市販されている (My lot arg (商標) ; Wyeth-Ayerst)。

【0280】

細胞毒素は、当技術分野で利用可能なリンカー技術を使用して、抗体へとコンジュゲートさせることができる。細胞毒素を抗体へとコンジュゲートさせるのに使用されているリンカーの種類の例は、ヒドラゾン、チオエーテル、エステル、ジスルフィド、およびペプチド含有リンカーを含むがこれらに限定されない。例えば、リソソーム区画内の低pHによる切断を受けやすいか、またはカテプシン (例えば、カテプシンB、カテプシンC、カテプシンD) など、腫瘍組織内で優先的に発現するプロテアーゼなどのプロテアーゼによる切断を受けやすいリンカーを選択することができる。

【0281】

細胞毒素、リンカーの種類、および治療剤を抗体へとコンジュゲートさせるための方法についてのさらなる議論についてはまた、Saito et al., (2003) Adv. Drug Deliv. Rev. 55:199-215; Trail et al., (2003) Cancer Immunol. Immunother. 52:328-337; Payne, (2003) Cancer Cell 3:207-212; Allen, (2002) Nat. Rev. Cancer 2:750-763; Pastan and Kreitman, (2002) Curr. Opin. Investig. Drugs 3:1089-1091; Senter and Springer, (2001) Adv. Drug Deliv. Rev. 53:247-264も参照されたい。

【0282】

本開示の抗体はまた、ラジオイムノコンジュゲートともまた称する細胞傷害性の放射性医薬品を作り出すのに、放射性同位体へもコンジュゲートさせることができる。診断的使用または治療的使用のために抗体へとコンジュゲートさせうる放射性同位体の例は、ヨウ素131、インジウム111、イットリウム90、およびルテチウム177を含むがこれらに限定されない。当技術分野では、放射性イムノコンジュゲートを調製するための方法が確立されている。Zevalin (商標) (DEC Pharmaceuticals) およびBexxar (商標) (Corixa Pharmaceuticals) を含むラジオイムノコンジュゲートの例が市販されており、本開示の抗体を使用して、ラジオイムノコンジュゲートを調製するのに、同様の方法を使用することができる。ある種の実施形態では、大環状キレート化剤は、リンカー分子を介して抗体へと接合させうる、1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン-N, N', N'', N'''-テトラ酢酸 (DOTA) である。当技術分野では、このようなリンカー分子が一般に公知であり、各々が参照によりそれらの全体において組み込まれる、Denardo et al., (1998) Clin Cancer Res. 4(10):2483-90; Peterson et al., (1999) Bioconjug. Chem. 10(4):553-7; およびZimmerman et al., (1999) Nucl. Med. Biol. 26(8):943-50において記載されている。

【0283】

治療用部分を、抗体へとコンジュゲートさせるための技法は周知であり、例えば、Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies 84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985); およびThorpe et al., (1982) Immunol. Rev. 62:119-58を参照されたい。

【0284】

10

20

30

40

50

抗体はまた、特に、イムノアッセイまたは標的抗原の精製に有用な固体支持体へと接合させることもできる。このような固体支持体は、ガラス、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、またはポリプロピレンを含むがこれらに限定されない。

【0285】

別の態様では、本開示は、別の抗体、低分子阻害剤、ならびにEGFRおよび白金化学療法など、標準治療による療法など、他の治療剤と組み合わせて使用される、Notch3抗体またはそれらの断片に関する。

【0286】

抗体を作製する方法

(i) 抗体をコードする核酸

本開示は、上記で記載したNotch3抗体鎖のセグメントまたはドメインを含むポリペプチドをコードする、実質的に精製された核酸分子を提示する。核酸のいくつかは、Notch3抗体の重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列、および／または軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む。具体的な実施形態では、核酸分子は、表2で同定した核酸分子である。他のいくつかの核酸分子は、表2で同定した核酸分子のヌクレオチド配列と実質的に（例えば、少なくとも65、80%、95%、または99%）同一なヌクレオチド配列を含む。適切な発現ベクターから発現させる場合、これらのポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドは、Notch3抗原結合能を呈示することが可能である。

【0287】

本開示ではまた、上記で示したNotch3抗体の重鎖または軽鎖に由来する少なくとも1つのCDR領域、および、通例、3つ全てのCDR領域をコードするポリヌクレオチドも提示される。他のいくつかのポリヌクレオチドは、上記で示したNotch3抗体の重鎖および／または軽鎖の可変領域配列の全てまたは実質的に全てをコードする。コードの縮重性のために、様々な核酸配列が、免疫グロブリンアミノ酸配列の各々をコードすることになる。

【0288】

核酸分子は、抗体の可変領域および定常領域の両方をコードしうる。核酸配列のうちのいくつかは、表2で示した、Notch3抗体の成熟重鎖可変領域配列と実質的に（例えば、少なくとも80%、90%、または99%）同一な成熟重鎖可変領域配列をコードするヌクレオチドを含む。他のいくつかの核酸配列は、表2で示した、Notch3抗体の成熟軽鎖可変領域配列と実質的に（例えば、少なくとも80%、90%、または99%）同一な成熟軽鎖可変領域配列をコードするヌクレオチドを含む。

【0289】

ポリヌクレオチド配列は、デノボの固相DNA合成により作製することもでき、Notch3抗体またはその結合性断片をコードする既存の配列（例えば、下記の実施例で記載される配列）に対するPCR突然変異誘発により作製することもできる。核酸の直接的な化学合成は、Narang et al., (1979) Meth. Enzymol. 68:90によるホスホトリエステル法；Brown et al., (1979) Meth. Enzymol. 68:109によるホスホジエステル法；Beaucage et al., (1981) Tetra. Lett., 22:1859によるジエチルホスホルアミダイト法；および米国特許第4,458,066号による固体支持体法など、当技術分野で公知の方法により達成することができる。PCRによる、突然変異の、ポリヌクレオチド配列への導入は、例えば、PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, H.A. Erlich (Ed.), Freeman Press, NY, NY, 1992；PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis et al. (Ed.), Academic Press, San Diego, CA, 1990；Mattila et al., (1991) Nucleic Acids Res. 19:967；およびEckert et al., (1991) PCR Methods and Applications 1:17において記載されている通りに実施することができる。

【0290】

本開示ではまた、上記で記載したNotch3結合性抗体を作製するための発現ベクタ

ーおよび宿主細胞も提示される。多様な発現ベクターを援用して、N o t c h 3 抗体鎖またはN o t c h 3 結合性断片をコードするポリヌクレオチドを発現させることができる。ウイルスベースの発現ベクターおよび非ウイルス発現ベクターのいずれを使用しても、哺乳動物宿主細胞内で抗体を作製することができる。非ウイルスベクターおよび非ウイルス系は、プラスミド、典型的に、タンパク質またはRNAを発現させるための発現カセットを伴うエピソームベクター、およびヒト人工染色体を含む（例えば、Harrington et al., (1997) Nat Genet 15:345を参照されたい）。例えば、哺乳動物（例えば、ヒト）細胞内のN o t c h 3 結合性ポリヌクレオチドおよびN o t c h 3 結合性ポリペプチドの発現に有用な非ウイルスベクターは、p T h i o H i s A、p T h i o H i s B、およびp T h i o H i s C、p c D N A 3. 1 / H i s、p E B V H i s A、p E B V H i s B、およびp E B V H i s C（I n v i t r o g e n、S a n D i e g o、C A）、M P S Vベクター、ならびに他のタンパク質を発現させるための、当技術分野で公知の他の多数のベクターを含む。有用なウイルスベクターは、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルスに基づくベクター、S V 4 0に基づくベクター、パピローマウイルス、エプスタインバーウイルス、ワクシニアウイルスベクター、およびセムリキ森林熱ウイルス（S F V）を含む。Brent et al., (1995) supra; Smith, Annu. Rev. Microbiol. 49:807; およびRosenfeld et al., (1992) Cell 68:143を参照されたい。

【0291】

発現ベクターの選択は、その中でベクターを発現させる、意図される宿主細胞に依存する。発現ベクターは、N o t c h 3 抗体鎖または断片をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結したプロモーターおよび他の調節的配列（例えば、エンハンサー）を含有することが典型的である。いくつかの実施形態では、誘導的プロモーターを援用して、誘導条件下を除く、挿入された配列の発現を防止する。誘導的プロモーターは、例えば、アラビノース、l a c Z、メタロチオネインプロモーター、または熱ショックプロモーターを含む。形質転換された生物の培養物は、それらの発現産物が宿主細胞により良好に許容されるコード配列の集団にバイアスをかけずに、非誘導条件下で増殖させることができる。プロモーターに加えて、他の調節エレメントもまた、N o t c h 3 抗体鎖または断片の効率的な発現に要請または所望される可能性がある。これらのエレメントは、A T G開始コドンおよび隣接するリボソーム結合性部位または他の配列を含むことが典型的である。加えて、発現の効率は、使用される細胞系に適するエンハンサーを組み入れることにより増強することもできる（例えば、Scharf et al., (1994) Results Probl. Cell Differ. 20:125; およびBittner et al., (1987) Meth. Enzymol., 153:516を参照されたい）。例えば、S V 4 0 エンハンサーまたはC M Vエンハンサーを使用して、哺乳動物宿主細胞内の発現を増大させることができる。

【0292】

発現ベクターはまた、挿入されたN o t c h 3 抗体配列によりコードされるポリペプチドとの融合タンパク質を形成するように、分泌シグナル配列の位置も備える場合がある。挿入されたN o t c h 3 抗体配列は、ベクター内に組み入れる前に、シグナル配列へと連結することが多い。N o t c h 3 抗体の軽鎖可変ドメインおよび重鎖可変ドメインをコードする配列を受容するのに使用されるベクターは、場合によってまた、定常領域またはそれらの部分もコードする。このようなベクターは、定常領域との融合タンパク質としての可変領域の発現を可能とし、これにより、無傷抗体またはそれらの断片の産生をもたらす。このような定常領域は、ヒト定常領域であることが典型的である。

【0293】

N o t c h 3 抗体鎖を保有し、これが発現させるための宿主細胞は、原核細胞の場合もあり、真核細胞の場合もある。大腸菌（E. coli）は、本開示のポリヌクレオチドをクローニングし、発現させるのに有用な1つの原核細胞宿主である。使用に適する他の微生物宿主は、枯草菌（Bacillus subtilis）などの桿菌、ならびにサルモネラ（Salmonella）属種、セラチア（Serratia）属種、および多様なシュードモナス（Pseudomonas）属種など、他の腸内細菌科（Enterobacteriaceae）を含む。これらの原核細胞宿主内ではまた、

典型的に、宿主細胞と適合性の発現制御配列（例えば、複製起点）を含有する発現ベクターも作製することができる。加えて、ラクトースプロモーター系、トリプトファン（trp）プロモーター系、ペーターラクタマーゼプロモーター系、またはファージラムダに由来するプロモーター系など、任意の数の、様々な周知のプロモーターも存在させることができる。プロモーターは、任意選択で、オペレーター配列により発現を制御することが典型的であるが、転写および翻訳を開始して終結させるためのリボソーム結合性部位配列なども有する。本開示のN o t c h 3 結合性ポリペプチドを発現させるのに、酵母など、他の微生物もまた援用することができる。また、バキュロウイルスベクターと組み合わせた昆虫細胞も使用することができる。

【0294】

いくつかの実施形態では、本開示のN o t c h 3 結合性ポリペプチドを発現させ、作製するのに、哺乳動物宿主細胞を使用する。例えば、哺乳動物宿主細胞は、内因性免疫グロブリン遺伝子を発現させるハイブリドーマ細胞系（例えば、実施例で記載される、1 D 6 . C 9 骨髓腫ハイブリドーマクローン）の場合もあり、外因性発現ベクターを保有する哺乳動物細胞系（例えば、下記で例示されるS P 2 / 0 骨髓腫細胞）の場合もある。哺乳動物宿主細胞は、任意の正常非不死化動物細胞または正常不死化動物細胞もしくは非正常不死化動物細胞またはヒト細胞を含む。例えば、無傷免疫グロブリンを分泌することが可能な多数の適切な宿主細胞系であって、C H O 細胞系、多様なC o s 細胞系、H e L a 細胞、骨髓腫細胞系、形質転換B細胞、およびハイブリドーマを含む宿主細胞系が開発されている。ポリペプチドを発現させるための、哺乳動物組織による細胞培養物の使用については、例えば、Winnacker, FROM GENES TO CLONES, VCH Publishers, N.Y., N.Y., 1987において一般に論じられている。哺乳動物宿主細胞のための発現ベクターは、複製起点、プロモーター、およびエンハンサーなどの発現制御配列（例えば、Queen et al., (1986) Immunol. Rev. 89:49-68を参照されたい）、ならびにリボソーム結合性部位、R N A スプライス部位、ポリアデニル化部位、および転写ターミネーター配列など、必要なプロセシング情報部位を含みうる。これらの発現ベクターは通例、哺乳動物遺伝子に由来するプロモーターまたは哺乳動物ウイルスに由来するプロモーターを含有する。適切なプロモーターは、構成的プロモーター、細胞型特異的プロモーター、細胞周期段階特異的プロモーター、および／またはモジュレート性プロモーターもしくは調節性プロモーターでありうる。有用なプロモーターは、メタロチオネインプロモーター、構成的アデノウイルス主要後期プロモーター、デキサメタゾン誘導性M M T V プロモーター、S V 4 0 プロモーター、M R P p o l I I I プロモーター、構成的M P S V プロモーター、テトラサイクリン誘導性C M V プロモーター（ヒト即初期C M V プロモーターなど）、構成的C M V プロモーター、および当技術分野で公知のプロモーター-エンハンサーの組合せを含むがこれらに限定されない。

【0295】

対象のポリヌクレオチド配列を含有する発現ベクターを導入するための方法は、細胞宿主の種類に応じて変化する。例えば、塩化カルシウムトランスフェクションが一般に原核細胞に活用されるのに対し、リン酸カルシウム処理または電気穿孔は、他の細胞宿主に使用することができる。一般に、Sambrook, et al., supraを参照されたい。他の方法は、例えば、電気穿孔、リン酸カルシウム処理、リボソーム媒介型形質転換、注入およびマイクロインジェクション、遺伝子銃による方法（ballistic method）、ウィロソーム、イムノリボソーム、ポリカチオン：核酸コンジュゲート、ネイキッドD N A、人工ビリオン、ヘルペスウイルス構造タンパク質であるV P 2 2 との融合体（Elliot and O'Hare, (1997) Cell 88:223）、D N A の薬剤増強型取込み、ならびにe x v i v o における形質導入を含む。組換えタンパク質の長期にわたる高収率作製のためには、安定的発現が所望されることが多かる。例えば、N o t c h 3 抗体鎖またはN o t c h 3 結合性断片を安定的に発現させる細胞系は、ウイルス複製起点または内因性発現エレメント、および選択マーカー遺伝子を含有する、発現ベクターを使用して調製することができる。ベクターを導入した後、細胞は、強化培地中で1～2日間にわたり成長させてから、選択培地へと切り

替えることができる。選択マーカーの目的は、選択に対する耐性を付与し、その存在により細胞の成長を可能とし、これにより、導入された配列を選択培地中で発現させることに成功することである。耐性で安定的にトランスフェクトされた細胞は、細胞型に適する組織培養法を使用して増殖させることができる。

【0296】

(i i) モノクローナル抗体の作製

モノクローナル抗体 (mAb) は、従来のモノクローナル抗体法、例えば、Kohler and Milstein, (1975) Nature 256:495による標準的な体細胞ハイブリダイゼーション法を含む様々な技法により作製することができる。例えば、Bリンパ球のウイルス性形質転換または発がん性形質転換など、モノクローナル抗体を調製するための多くの技法を援用することができる。

10

【0297】

ハイブリドーマを調製するための動物系は、マウス系である。マウスにおけるハイブリドーマの作製は、十分に確立された手順である。当技術分野では、融合体のために、免疫化された脾臓細胞を単離するための免疫化プロトコールおよび免疫化法が公知である。融合パートナー (例えば、マウス骨髄腫細胞) および融合手順もまた公知である。

【0298】

本開示のキメラ抗体またはヒト化抗体は、上記で記載した通りに調製されるマウスモノクローナル抗体の配列に基づき調製することができる。重鎖免疫グロブリンおよび軽鎖免疫グロブリンをコードするDNAは、対象のマウスハイブリドーマから得、標準的な分子生物学法を使用して、非マウス (例えば、ヒト) 免疫グロブリン配列を含有するように操作することができる。例えば、キメラ抗体を創出するには、当技術分野で公知の方法 (例えば、Cabillyらによる米国特許第4, 816, 567号を参照されたい) を使用して、マウス可変領域を、ヒト定常領域へと連結することができる。ヒト化抗体を創出するには、当技術分野で公知の方法を使用して、マウスCDR領域を、ヒトフレームワークへと挿入することができる。例えば、Winterによる米国特許第5225539号; ならびにQueenらによる米国特許第5530101号; 同第5585089号; 同第5693762号; および同第6180370号を参照されたい。

20

【0299】

ある種の実施形態では、抗体は、ヒトモノクローナル抗体である。Notch3を指向するこのようなヒトモノクローナル抗体は、マウス免疫系ではなく、ヒト免疫系の部分を保有する、トランスジェニックマウスまたはトランスクロモソーマルマウスを使用して作り出すことができる。これらのトランスジェニックマウスおよびトランスクロモソーマルマウスは、本明細書で、それぞれ、HuMAbマウスおよびKMマウスと称するマウスを含み、本明細書ではまとめて、「ヒトIgマウス」と称する。

30

【0300】

HuMAbマウス (登録商標) (Medarex, Inc.) は、内因性 μ 鎖遺伝子座および内因性 κ 鎖遺伝子座を不活化する、ターゲティングされた突然変異と併せて、再配列されていないヒト重 (μ および γ) 鎖免疫グロブリン配列およびヒト κ 軽鎖免疫グロブリン配列をコードする、ヒト免疫グロブリン遺伝子のミニ遺伝子座を含有する (例えば、Lonberg et al., (1994) Nature 368(6474): 856-859)。したがって、マウスは、マウスIgMまたはマウスIg κ の発現の低減を呈示し、免疫化に応答して、導入されたヒト重鎖トランス遺伝子およびヒト軽鎖トランス遺伝子は、クラススイッチングおよび体細胞突然変異を経て、高アフィニティーのヒトIgG κ モノクローナル抗体を作り出す (Lonberg et al., (1994) supra; reviewed in Lonberg, (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101; Lonberg and Huszar, (1995) Intern. Rev. Immunol.13:65-93; およびHarding and Lonberg, (1995) Ann. N. Y. Acad. Sci. 764:536-546)。HuMAbマウスの調製および使用、ならびにこのようなマウスにより保有されるゲノムの改変は、それらの全ての内容が、参照によりそれらの全体において本明細書に具体的に組み込まれる、Taylor et al., (1992) Nucleic Acids Research 20:6287-6295; Chen et al., (1

40

50

993) International Immunology 5:647-656; Tuaillon et al., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:3720-3724; Choi et al., (1993) Nature Genetics 4:117-123; Chen et al., (1993) EMBO J. 12:821-830; Tuaillon et al., (1994) J. Immunol. 152:2912-2920; Taylor et al., (1994) International Immunology 579-591; および Fishwild et al., (1996) Nature Biotechnology 14:845-851においてさらに記載されている。さらに、全てが L o n b e r g および K a y による、米国特許第 5, 545, 806 号; 同第 5, 569, 825 号; 同第 5, 625, 126 号; 同第 5, 633, 425 号; 同第 5, 789, 650 号; 同第 5, 877, 397 号; 同第 5, 661, 016 号; 同第 5, 814, 318 号; 同第 5, 874, 299 号; および同第 5, 770, 429 号; S u r a n i らによる、米国特許第 5, 545, 807 号; 全てが L o n b e r g および K a y による、P C T 公開第 W O 9 2 1 0 3 9 1 8 号、同第 W O 9 3 / 1 2 2 2 7 号、同第 W O 9 4 / 2 5 5 8 5 号、同第 W O 9 7 1 1 3 8 5 2 号、同第 W O 9 8 / 2 4 8 8 4 号、および同第 W O 9 9 / 4 5 9 6 2 号; ならびに K o r m a n らによる P C T 公開第 W O 0 1 / 1 4 4 2 4 号も参照されたい。

【0301】

別の実施形態では、ヒト抗体は、ヒト重鎖トランス遺伝子およびヒト軽鎖トランスクロモソームを保有するマウスなど、トランス遺伝子上およびトランスクロモソーム上にヒト免疫グロブリン配列を保有するマウスを使用してもたらしすることができる。本明細書で「K M マウス」と称するこのようなマウスは、I s h i d a らによる P C T 公開第 W O 0 2 / 4 3 4 7 8 号において詳細に記載されている。

【0302】

当技術分野ではなおさらに、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現させる代替的なトランスジェニック動物系も利用可能であり、本開示の N o t c h 3 結合性抗体をもたらしのに使用することができる。例えば、X e n o m o u s e (A b g e n i x , I n c .) と称する代替的なトランスジェニック系を使用することができる。このようなマウスは、例えば、K u c h e r l a p a t i らによる米国特許第 5, 939, 598 号; 同第 6, 075, 181 号; 同第 6, 114, 598 号; 同第 6, 150, 584 号; および同第 6, 162, 963 号において記載されている。

【0303】

当技術分野ではさらに、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現させる代替的なトランスクロモソーマル動物系も利用可能であり、本開示の N o t c h 3 結合性抗体をもたらしのに使用することができる。例えば、「T C マウス」と称する、ヒト重鎖トランスクロモソームおよびヒト軽鎖トランスクロモソームの両方を保有するマウスを使用することができるが、このようなマウスは、Tomizuka et al., (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727において記載されている。当技術分野ではさらに、ヒト重鎖トランスクロモソームおよびヒト軽鎖トランスクロモソームを保有するウシも記載されており (Kuroiwa et al., (2002) Nature Biotechnology 20:889-894)、本開示の N o t c h 3 結合性抗体をもたらしのに使用することができる。

【0304】

ヒトモノクローナル抗体はまた、ヒト免疫グロブリン遺伝子のライブラリーをスクリーニングするためのファージディスプレイ法を使用して調製することもできる。当技術分野では、ヒト抗体を単離するためのこのようなファージディスプレイ法が確立されているか、または下記の実施例で記載される。例えば、L a d n e r らによる米国特許第 5, 223, 409 号; 同第 5, 403, 484 号; および同第 5, 571, 698 号; D o w e r らによる米国特許第 5, 427, 908 号; および同第 5, 580, 717 号; M c C a f f e r t y らによる米国特許第 5, 969, 108 号; および同第 6, 172, 197 号; ならびに G r i f f i t h s らによる米国特許第 5, 885, 793 号; 同第 6, 521, 404 号; 同第 6, 544, 731 号; 同第 6, 555, 313 号; 同第 6, 582, 915 号; および同第 6, 593, 081 号を参照されたい。

【0305】

ヒトモノクローナル抗体はまた、免疫化されると、ヒト抗体応答を作り出しうるようにヒト免疫細胞を再構成した、S C I Dマウスを使用して調製することもできる。このようなマウスは、例えば、W i l s o nらによる米国特許第5, 476, 996号；および同第5, 698, 767号において記載されている。

【0306】

(i i i) フレームワークまたはF cの操作

操作抗体は、例えば、抗体の特性を改善するように、V H内および／またはV L内のフレームワーク残基へと修飾を施した、操作抗体を含む。このようなフレームワーク修飾は、抗体の免疫原性を減殺するように施すことが典型的である。例えば、1つの手法は、1または複数のフレームワーク残基を、対応する生殖細胞系列配列へと「復帰突然変異させる」ことである。より具体的には、体細胞突然変異を経た抗体は、抗体が導出された生殖細胞系列配列と異なるフレームワーク残基を含有しうる。このような残基は、抗体フレームワーク配列を、抗体が導出された生殖細胞系列配列と比較することにより同定することができる。フレームワーク領域配列を、それらの生殖細胞系列の立体配置へと戻すには、例えば、部位指向突然変異誘発により、体細胞突然変異を、生殖細胞系列配列へと「復帰突然変異させる」ことができる。このような「復帰突然変異させた」抗体もまた、本開示に包摂されることを意図する。

10

【0307】

フレームワーク修飾の別の種類は、フレームワーク領域内の1もしくは複数の残基、なおまたは、1もしくは複数のC D R領域内の残基を突然変異させて、T細胞エピトープを除去して、これにより、抗体の潜在的な免疫原性を低減することを伴う。この手法はまた、「脱免疫化」とも称し、C a r rらによる米国特許公開第20030153043号においてさらに詳細に記載されている。

20

【0308】

フレームワーク内またはC D R領域内に施された修飾に加えて、またはこれと代替的に、抗体を、F c領域内に修飾を含むように操作して、典型的に、血清中半減期、補体の結合、F c受容体の結合、および／または抗体依存性細胞介在性細胞傷害作用など、抗体の1または複数の機能的特性を変化させることもできる。さらに、抗体は、化学的に修飾することもでき（例えば、1または複数の化学的部分を抗体へと接合することができる）、そのグリコシル化を変化させるように修飾して、ここでもまた、抗体の1または複数の機能的特性を変化させることもできる。これらの実施形態の各々については、下記で詳細に記載する。F c領域内の残基の番号付けは、K a b a tによるE Uインデックスによる番号付けである。

30

【0309】

一実施形態では、ヒンジ領域内のシステイン残基の数を変化させる、例えば、増大または減少させるように、C H 1のヒンジ領域を修飾する。この手法は、B o d m e rらによる米国特許第5, 677, 425号においてさらに記載されている。C H 1のヒンジ領域内のシステイン残基の数は、例えば、抗体の軽鎖および重鎖のアセンブリーを容易とするか、または抗体の安定性を増大もしくは減少させるように変化させる。

【0310】

別の実施形態では、抗体のF cヒンジ領域を突然変異させて、抗体の生物学的半減期を短縮する。より具体的には、抗体のブドウ球菌（Staphylococcus）属プロテインA（S p A : Staphylococcus protein A）への結合が、天然F cーヒンジドメインのS p Aへの結合と比べて損なわれるように、1または複数のアミノ酸突然変異を、F cーヒンジ断片のC H 2ドメインーC H 3ドメイン間界面領域へと導入する。この手法は、W a r dらによる米国特許第6, 165, 745号においてさらに詳細に記載されている。

40

【0311】

さらに他の実施形態では、少なくとも1つのアミノ酸残基を、異なるアミノ酸残基で置きかえることにより、F c領域を変化させて、抗体のエフェクター機能を変化させる。例えば、抗体が、エフェクターリガンドに対するアフィニティーを変化させているが、親抗

50

体の抗原結合能は保持するように、1または複数のアミノ酸を、異なるアミノ酸残基で置きかえることができる。それに対するアフィニティーを変化させるエフェクターリガンドは、例えば、Fc受容体または補体のC1成分でありうる。この手法は、いずれもWinterらによる米国特許第5,624,821号；および同第5,648,260号においてさらに詳細に記載されている。

【0312】

別の実施形態では、抗体が、C1qへの結合を変化させ、かつ／または補体依存性細胞傷害作用(CDC)を低減もしくは消失させるように、アミノ酸残基から選択される1または複数のアミノ酸を、異なるアミノ酸残基で置きかえることもできる。この手法は、Idusogieらによる米国特許第6,194,551号においてさらに詳細に記載されている。

10

【0313】

別の実施形態では、1または複数のアミノ酸残基を変化させて、これにより、補体に結合する抗体の能力を変化させる。この手法は、BodmerらによるPCT公開第WO94/29351号においてさらに記載されている。

【0314】

さらに別の実施形態では、1または複数のアミノ酸を修飾することにより、Fc領域を修飾して、抗体依存性細胞介在性細胞傷害作用(ADCC:antibody dependent cellular cytotoxicity)を媒介する抗体の能力を増大させ、かつ／またはFcγ受容体に対する抗体のアフィニティーを増大させる。この手法は、PrestaによるPCT公開第WO00/42072号においてさらに記載されている。さらに、ヒトIgG1上の、FcγRI、FcγRII、FcγRIII、およびFcRnに対する結合性部位もマップされており、結合を改善させた変異体も記載されている(Shields et al., (2001) J. Biol. Chem. 276:6591-6604を参照されたい)。

20

【0315】

さらに別の実施形態では、抗体のグリコシル化を改変する。例えば、脱グリコシル化抗体(すなわち、抗体は、グリコシル化を欠く)を作製することができる。グリコシル化を変化させて、例えば、「抗原」に対する抗体のアフィニティーを増大させることができる。このような炭水化物修飾は、例えば、抗体配列内の1または複数のグリコシル化部位を変化させることにより達成することができる。例えば、1または複数の可変領域フレームワークのグリコシル化部位の消失を結果としてもたらす、1または複数のアミノ酸置換を施して、これにより、その部位におけるグリコシル化を消失させることができる。このような脱グリコシル化により、抗原に対する抗体のアフィニティーを増大させることができる。このような手法は、Coらによる米国特許第5,714,350号；および同第6,350,861号においてさらに詳細に記載されている。

30

【0316】

加えて、または代替的に、フコシル残基の量を低減した低フコシル化抗体または二分枝型GlcNAc構造を増大させた抗体など、グリコシル化の種類を変化させた抗体を作製することもできる。このようなグリコシル化パターンの変化は、抗体のADCC能を増大させることが裏付けられている。このような炭水化物修飾は、例えば、グリコシル化機構を変化させた宿主細胞内で抗体を発現させることにより達成することができる。当技術分野では、グリコシル化機構を変化させた細胞が記載されており、組換え抗体を発現させ、これにより、グリコシル化を変化させた抗体を産生するための宿主細胞として使用することができる。例えば、HangらによるEP1,176,195は、このような細胞系内で発現させた抗体が、低フコシル化を呈示するように、フコシルトランスフェラーゼをコードするFUT8遺伝子を機能的に破壊した細胞系について記載している。PrestaによるPCT公開第WO03/035835号は、変異体のCHO細胞系である、Lec13細胞であって、フコースをAsn(297)連結された炭水化物へと接合する能力を低減し、また、その宿主細胞内で発現させた抗体の低フコシル化も結果としてもたらす、Lec13細胞について記載している(また、Shields et al., (2002) J. Biol. Chem.

40

50

277:26733-26740も参照されたい)。UmanaらによるPCT公開第WO99/54342号は、操作細胞系内で発現させた抗体が、抗体のADCC活性の増大を結果としてもたらす、二分枝型GlcNac構造の増大を呈示するよう、糖タンパク質を改変する、グリコシルトランスフェラーゼ（例えば、ベータ（1，4）-NアセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII（GnTIII））を発現させるように操作された細胞系について記載している（また、Umana et al., (1999) Nat. Biotech. 17:176-180も参照されたい）。

【0317】

別の実施形態では、抗体を改変して、その生物学的半減期を延長する。多様な手法が可能である。例えば、Wardによる、米国特許第6,277,375号において記載されている、以下の突然変異：T252L、T254S、T256Fのうちの1または複数を導入することができる。代替的に、生物学的半減期を延長するために、Prestaらによる、米国特許第5,869,046号、および同第6,121,022号において記載されている通り、IgGのFc領域のCH2ドメインの2つのループから採取された、サルベージ受容体結合性エпитープを含有するように、抗体をCH1領域内またはCL領域内で変化させることもできる。

【0318】

(iv) 変化させた抗体を操作する方法

上記で論じた通り、本明細書で示されるVH配列およびVL配列または全長重鎖配列および全長軽鎖配列を有するNotch3結合性抗体は、全長重鎖配列および／もしくは全長軽鎖配列、VH配列および／もしくはVL配列、またはこれらへと接合された定常領域を修飾することにより、新たなNotch3結合性抗体を創出するのに使用することができる。したがって、本開示の別の態様では、Notch3抗体の構造特色を使用して、構造的に類縁のNotch3結合性抗体であって、ヒトNotch3に結合し、また、Notch3の1または複数の機能的特性も阻害することなど、本開示の抗体の少なくとも1つの機能的特性を保持する、Notch3結合性抗体を創出する。例えば、本開示の抗体の1もしくは複数のCDR領域またはそれらの突然変異は、組換えにより、公知のフレームワーク領域および／または他のCDRと組み合わせ、上記で論じた通り、組換えにより操作された、本開示のさらなるNotch3結合性抗体を創出することができる。他の種類の改変は、前出の節で記載した改変を含む。操作法のための出発材料は、本明細書で提示されるVH配列および／もしくはVL配列のうちの1もしくは複数、またはそれらの1もしくは複数のCDR領域である。操作抗体を創出するのに、本明細書で提示されるVH配列および／もしくはVL配列のうちの1もしくは複数、またはそれらの1もしくは複数のCDR領域を有する抗体を実際に調製する（すなわち、タンパク質として発現させる）ことは必要ではない。そうではなくて、配列内に含有される情報を、出発材料として使用して、元の配列から導出される「第2世代」の配列を創出し、次いで、「第2世代」の配列を、タンパク質として調製し、発現させる。

【0319】

したがって、別の実施形態では、本開示は、配列番号3、23、43、63、83、103、123、143、163、183、および203からなる群から選択されるCDR1配列；配列番号4、24、44、64、84、104、124、144、164、184、および204からなる群から選択されるCDR2配列；ならびに／または配列番号5、25、45、65、85、105、125、145、165、185、および205からなる群から選択されるCDR3配列を有する、重鎖可変領域の抗体配列と、配列番号13、33、53、73、93、113、133、153、173、193、および213からなる群から選択されるCDR1配列；配列番号14、34、54、74、94、114、134、154、174、194、および214からなる群から選択されるCDR2配列；ならびに／または配列番号15、35、55、75、95、115、135、155、175、195、および215からなる群から選択されるCDR3配列を有する、軽鎖可変領域の抗体配列とからなる、Notch3抗体を調製し、重鎖可変領域の抗体配列

内および／または軽鎖可変領域の抗体配列内の少なくとも1つのアミノ酸残基を変化させて、少なくとも1つの変化させた抗体配列を創出し、変化させた抗体配列をタンパク質として発現させるための方法を提示する。変化させた抗体配列はまた、C D R 3 配列、または、U S 2 0 0 5 0 2 5 5 5 2 において記載されている、最小限の不可欠な結合決定基は一定とし、かつ、C D R 1 配列およびC D R 2 配列には多様性を有する、抗体ライブラリーをスクリーニングすることによっても調製することができる。スクリーニングは、ファージディスプレイ技術など、抗体を抗体ライブラリーからスクリーニングするのに適切な、任意のスクリーニング技術に従い実施することができる。

【0320】

標準的な分子生物学法を使用して、変化させた抗体配列を調製し、発現させることができる。変化させた抗体配列によりコードされる抗体は、本明細書で記載されるN o t c h 3 結合性抗体の機能的特性であり、ヒトN o t c h 3 および／またはカニクイザルN o t c h 3 に特異的に結合することを含むがこれらに限定されない機能的特性のうちの1つ、一部、または全部を保持する抗体であって、本明細書で記載されるレポーターアッセイにおいて、N o t c h 3 に結合し、N o t c h 3 シグナル伝達活性を阻害することにより、N o t c h 3 の生物学的活性を中和する抗体である。

【0321】

変化させた抗体の機能的特性は、実施例で示されるアッセイ（例えば、E L I S A ）など、当技術分野で利用可能であり、かつ／または本明細書で記載される標準的なアッセイを使用して評価することができる。

【0322】

本開示の抗体を操作する方法のある種の実施形態では、N o t c h 3 結合性抗体コード配列の全部または一部に沿って、ランダムに、または選択的に、突然変異を導入することができ、結果として得られる改変N o t c h 3 結合性抗体を、本明細書で記載される結合活性および／または他の機能的特性についてスクリーニングすることができる。当技術分野では、突然変異法が記載されている。例えば、S h o r t によるP C T 公開第W O 0 2 / 0 9 2 7 8 0 号は、飽和突然変異誘発、合成ライゲーションアセンブリー、またはこれらの組合せを使用して、抗体の突然変異を創出し、スクリーニングするための方法について記載している。代替的に、L a z a r らによるP C T 公開第W O 0 3 / 0 7 4 6 7 9 号は、コンピュータによるスクリーニング法を使用して、抗体の生理化学的特性を最適化する方法について記載している。

【0323】

抗体の特徴付け

抗体は、多様な機能アッセイにより特徴付けることができる。例えば、抗体は、本明細書で記載される遺伝子レポーターアッセイを使用して、N o t c h 3 シグナル伝達を阻害することにより生物学的活性を中和するそれらの能力、N o t c h 3 タンパク質（例えば、ヒトN o t c h 3 および／またはカニクイザルN o t c h 3 ）に対するそれらのアフィニティー、エピトープマッピング、タンパク質分解に対するそれらの耐性、およびN o t c h 3 による下流のシグナル伝達を遮断するそれらの能力により特徴付けることができる。多様な方法を使用して、N o t c h 3 により媒介されるシグナル伝達を測定することができる。例えば、N o t c h 3 シグナル伝達経路は、I C D 3 を測定することによりモニタリングすることができる。

【0324】

N o t c h 3 に結合する抗体の能力は、対象の抗体を標識することにより直接的に検出することもでき、抗体を標識せずにおき、当技術分野で公知の、多様なサンドイッチアッセイフォーマットを使用して、結合を間接的に検出することもできる。

【0325】

いくつかの実施形態では、N o t c h 3 抗体は、基準N o t c h 3 抗体の、N o t c h 3 ポリペプチドまたはタンパク質への結合を遮断するか、またはこれと競合する。N o t c h 3 抗体は、上記で記載した完全ヒトN o t c h 3 抗体でありうる。N o t c h 3 抗体

はまた、基準抗体と同じエピトープに結合する、他のマウス N o t c h 3 抗体、キメラ N o t c h 3 抗体、またはヒト化 N o t c h 3 抗体でもありうる。基準抗体の結合を遮断するか、またはこれと競合する能力は、被験 N o t c h 3 抗体が、基準抗体により規定されるエピトープと同じであるかもしくは類似するエピトープ、または基準 N o t c h 3 抗体が結合するエピトープに十分に近接するエピトープに結合することを指し示す。このような抗体は、とりわけ、基準抗体について同定される有利な特性を共有する可能性が高い。基準抗体を遮断するか、またはこれと競合する能力は、例えば、競合的結合アッセイにより決定することができる。競合的結合アッセイでは、被験抗体を、N o t c h 3 ポリペプチドまたはタンパク質などの一般的抗原への基準抗体の特異的結合を阻害する能力について検討する。過剰な被験抗体が、基準抗体の結合を実質的に阻害する場合、被験抗体は、基準抗体と、抗原への特異的結合について競合する。実質的な阻害とは、被験抗体が、基準抗体の特異的結合を、通例少なくとも 10 %、25 %、50 %、75 %、または 90 % 低減することを意味する。

10

【0326】

N o t c h 3 抗体の、基準 N o t c h 3 抗体との、N o t c h 3 タンパク質への結合についての競合を評価するのに使用しうる、多数の競合的結合アッセイが公知である。競合的結合アッセイは、例えば、固相直接ラジオイムノアッセイ (R I A : radioimmunoassay) または固相間接 R I A、固相直接酵素イムノアッセイ (E I A : enzyme immunoassay) または固相間接酵素 E I A、サンドイッチ競合アッセイ (Stahli et al., (1983) *Methods in Enzymology* 9:242-253を参照されたい) ; 固相直接ビオチン-アビジン E I A (Kirkland et al., (1986) *J. Immunol.* 137:3614-3619を参照されたい) ; 固相直接標識アッセイ、固相直接標識サンドイッチアッセイ (Harlow & Lane, *supra*を参照されたい) ; I - 1 2 5 標識を使用する固相直接標識 R I A (Morel et al., (1988) *Molec. Immunol.* 25:7-15を参照されたい) ; 固相直接ビオチン-アビジン E I A (Cheung et al., (1990) *Virology* 176:546-552) ; および直接標識 R I A (Moldenhauer et al., (1990) *Scand. J. Immunol.* 32:77-82) を含む。このようなアッセイは、標識されていない被験 N o t c h 3 抗体または標識された基準抗体のうちの一方を保有する固体表面または細胞に結合させた、精製抗原の使用を伴うことが典型的である。競合的阻害は、被験抗体の存在下で、固体表面または細胞に結合した標識の量を決定することにより測定する。通例、被験抗体を過剰に存在させる。競合アッセイにより同定される抗体 (競合抗体) は、基準抗体と同じエピトープに結合する抗体、および基準抗体が結合するエピトープに、立体障害が生じる程度に十分に近接する、隣接エピトープに結合する抗体を含む。

20

30

【0327】

選択された N o t c h 3 モノクローナル抗体が、固有のエピトープに結合するののかどうかを決定するには、市販の試薬 (例えば、P i e r c e、R o c k f o r d、I L 製の試薬) を使用して、各抗体をビオチニル化することができる。標識されていないモノクローナル抗体およびビオチニル化されたモノクローナル抗体を使用する競合研究は、N o t c h 3 ポリペプチドでコーティングした E L I S A プレートを使用して実施することができる。ビオチニル化 m A b の結合は、ストレプトアビジン-アルカリホスファターゼプローブにより検出することができる。精製 N o t c h 3 抗体のアイソタイプを決定するには、アイソタイプ E L I S A を実施することができる。例えば、マイクロ滴定プレートのウェルを、4 °C で一晩にわたり、1 μg / ml の抗ヒト I g G によりコーティングすることができる。1 % の B S A によるブロッキングの後、プレートを、1 μg / ml 以下の N o t c h 3 モノクローナル抗体または精製アイソタイプ対照と、周囲温度で 1 ~ 2 時間にわたり反応させる。次いで、ウェルを、ヒト I g G 1 またはヒト I g M に特異的なアルカリホスファターゼコンジュゲートプローブと反応させることができる。次いで、精製抗体のアイソタイプを決定しうるように、プレートを現像および解析する。

40

【0328】

N o t c h 3 モノクローナル抗体の、N o t c h 3 ポリペプチドを発現させる生細胞への結合を裏付けるには、フローサイトメトリーを使用することができる。略述すると、N

50

o t c h 3を発現させる細胞系（標準的な成長条件下で成長させた）を、0.1%のBSAおよび10%のウシ胎仔血清を含有するPBS中に多様な濃度のN o t c h 3抗体と混合し、4℃で1時間にわたりインキュベートすることができる。洗浄の後、細胞を、一次抗体による染色と同じ条件下で、フルオレセイン標識抗ヒトIgG抗体と反応させる。試料は、光および側方散乱特性を使用して、単一の細胞にゲートをかける、FACSscan測定器により解析することができる。フローサイトメトリーアッセイに加え、またはフローサイトメトリーアッセイの代わりに、蛍光顕微鏡法を使用する代替的なアッセイを使用することもできる。細胞は、まさに上記で記載した通りに染色し、蛍光顕微鏡法により検討することができる。この方法は、個々の細胞の視覚化を可能とするが、抗原の密度に応じて、感度を減衰させる場合がある。

10

【0329】

N o t c h 3抗体は、N o t c h 3ポリペプチドまたは抗原性断片との反応性について、ウェスタンブロット法によりさらに調べることができる。略述すると、精製N o t c h 3ポリペプチドもしくは融合タンパク質、またはN o t c h 3を発現させる細胞からの細胞抽出物を調製し、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけることができる。電気泳動の後、分離された抗原を、ニトロセルロース膜へと移し、10%のウシ胎仔血清でブロッキングし、被験モノクローナル抗体でプローブする。ヒトIgGの結合は、抗ヒトIgGアルカリホスファターゼを使用して検出し、BCIP/NBT基質タブレット（Sigma Chem. Co.、St. Louis、MO）により現像することができる。

20

【0330】

本明細書で記載されるアッセイ（例えば、ICD3アッセイ）など、細胞ベースのアッセイにおける多数のリードアウトを使用して、N o t c h 3抗体の有効性および特異性を評価することができる。下記の実施例節ではまた、機能アッセイの例も記載される。

【0331】

その腫瘍形成性表現型が本明細書に示される、ヒト腫瘍細胞系の腫瘍異種移植片のi n v i v oにおける成長を遮断する抗体またはそれらの断片の能力は、N o t c h 3による細胞内シグナル伝達に少なくとも部分的に依存し、免疫不全マウスにおいて、単独で評価することもでき、問題の細胞系に適切な細胞傷害剤と組み合わせて評価することもできる。

30

【0332】

予防的使用および治療的使用

本開示は、それを必要とする対象へと、有効量の、本開示の抗体を投与することにより、N o t c h 3シグナル伝達経路と関連する疾患または障害を処置する方法を提示する。具体的な実施形態では、本開示は、それを必要とする対象へと、有効量の、本開示の抗体を投与することにより、がん（例えば、乳がん、結腸直腸がん、肺がん、多発性骨髄腫、卵巣がん、肝がん、胃がん、膵臓がん、前立腺がん、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、t細胞性急性リンパ芽球性白血病、マンツル細胞リンパ腫、慢性リンパ球性白血病、ユーイング肉腫、骨肉腫、有棘細胞癌、末梢神経鞘腫瘍、シュワン細胞腫、頭頸部がん、膀胱がん、食道がん、神経膠芽腫、軟組織明細胞肉腫、悪性中皮腫、神経線維腫症、腎がん、および黒色腫）を処置または防止する方法を提示する。いくつかの実施形態では、本開示は、それを必要とする対象へと、有効量の、本開示の抗体を投与することにより、N o t c h 3シグナル伝達経路と関連するがんを処置または防止する方法を提示する。

40

【0333】

具体的な実施形態では、本開示は、乳がん、肺がん、およびT細胞性急性リンパ芽球性白血病（TALL）を含むがこれらに限定されない、N o t c h 3シグナル伝達経路と関連するがんを処置する方法を提示する。

【0334】

N o t c h 3抗体はまた、呼吸器疾患、骨粗鬆症、骨関節炎、多発性嚢胞腎、糖尿病、統合失調症、血管疾患、心疾患、非発がん性増殖性疾患、線維症、およびアルツハイマー

50

病などの神経変性疾患を含むがこれらに限定されない、N o t c h 3 シグナル伝達の異常または不全性と関連する他の障害を処置または防止するのに使用することもできる。

【0335】

N o t c h 3 抗体との組合せ処置に適する薬剤は、N o t c h シグナル伝達経路をモジュレートすることが可能な、当技術分野で公知の標準治療剤を含む。N o t c h 3 に適する標準治療剤の例は、E G F R 阻害剤または白金ベースの化学療法を含むがこれらに限定されない。N o t c h 3 抗体との組合せ処置に適する他の薬剤は、受容体チロシンキナーゼ、G タンパク質共役受容体、成長／生存シグナル伝達経路、核内ホルモン受容体、アポトーシス経路、細胞周期、および血管新生をモジュレートする薬剤を含むがこれらに限定されない。

10

【0336】

診断的使用

一態様では、本開示は、がんに罹患しているか、またはがんを発症する危険性がある個体に由来する生体試料（例えば、血液、血清、細胞、組織）の文脈において、N o t c h 3 タンパク質および／またはN o t c h 3 核酸の発現のほか、N o t c h 3 タンパク質の機能も決定するための診断アッセイを包摂する。

【0337】

本開示は、それを必要とする対象へと、有効量の、本開示の抗体を投与することにより、N o t c h 3 シグナル伝達経路と関連する疾患または障害を同定するための方法を提示する。具体的な実施形態では、本開示は、それを必要とする対象へと、有効量の、本開示の抗体を投与することにより、がん（例えば、乳がん、結腸直腸がん、肺がん、多発性骨髄腫、卵巣がん、肝がん、胃がん、膵臓がん、前立腺がん、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、t 細胞性急性リンパ芽球性白血病、マンタル細胞リンパ腫、慢性リンパ球性白血病、ユーイング肉腫、骨肉腫、有棘細胞癌、末梢神経鞘腫瘍、シュワン細胞腫、頭頸部がん、膀胱がん、食道がん、神経膠芽腫、軟組織明細胞肉腫、悪性中皮腫、神経線維腫症、腎がん、および黒色腫）を処置または防止する方法を提示する。いくつかの実施形態では、本開示は、それを必要とする対象へと、有効量の、本開示の抗体を投与することにより、N o t c h 3 シグナル伝達経路と関連するがんを処置または防止する方法を提示する。

20

【0338】

具体的な実施形態では、本開示は、乳がん、肺がん、およびT細胞性急性リンパ芽球性白血病（TALL）を含むがこれらに限定されない、N o t c h 3 シグナル伝達経路と関連するがんを同定するための方法を提示する。

30

【0339】

N o t c h 3 突然変異の検出は、任意の数の方途、例えば、DNAシーケンシング、RT-PCRを含むPCRベースの方法、マイクロアレイ解析、サザンブロット法、ノーザンブロット法、およびディップスティック解析により行うことができる。

【0340】

ポリメラーゼ連鎖反応（PCR：polymerase chain reaction）を使用して、腫瘍組織から抽出されたゲノムDNAまたはRNAに由来する、N o t c h 4 突然変異を増幅および同定することができる。当技術分野では、PCRが周知であり、Saiki et al., Science 1988, 239:487；ならびに米国特許第4,683,195号および米国特許第4,683,203号において詳細に記載されている。

40

【0341】

遺伝子発現の検出は、例えば、遺伝子から転写されたmRNAの量、または遺伝子から転写されたmRNAの逆転写から作製されたcDNAの量、または遺伝子によりコードされるポリペプチドもしくはタンパク質の量を検出するステップを含む、任意の適切な方法を介することが可能である。これらの方法は、試料に対して、試料ベースで実施することもでき、ハイスループット解析のために改変して実施することもできる。例えば、Affymetrix（商標）マイクロアレイチップを使用することによる。

50

【0342】

一態様では、遺伝子発現を、そのバイオマーカーについての適切なプローブと特異的にハイブリダイズするプローブとのハイブリダイゼーションにより検出および定量化する。プローブはまた、当技術分野で公知の方法を使用するハイスループットスクリーニングアッセイにおける使用のための固体支持体へと接合させることもできる。WO 97/10365ならびに米国特許第5,405,783号、同第5,412,087号、および同第5,445,934号は、例えば、本明細書で開示される配列のうちの1または複数を含む、高密度オリゴヌクレオチドチップの構築について開示している。米国特許第5,405,783号、同第5,412,087号、および同第5,445,934号で開示される方法を使用して、誘導体化されたガラス表面上で本発明のプローブを合成する。光保護されたヌクレオシドホスホルアミダイトを、ガラス表面へとカップリングさせ、フォトリソグラフィーマスクを介する光分解により選択的に脱保護し、保護された第2のヌクレオシドホスホルアミダイトと反応させる。所望のプローブが完成するまで、カップリング／脱保護工程を繰り返す。

10

【0343】

代替的に、公知の技法を使用して、遺伝子コピー数、転写、または翻訳のうちのいずれか1つを決定することもできる。例えば、PCRなどの増幅法が有用でありうる。PCRのための全般的な手順は、MacPherson et al., PCR: A Practical Approach, (IRL Press at Oxford University Press (1991))において教示されている。しかし、各適用における反応のために使用されるPCR条件は、経験的に決定される。多数のパラメータが、反応の成功に影響を及ぼす。それらの中には、アニーリングの温度および時間、伸長時間、Mg²⁺および／またはATPの濃度、pH、ならびにプライマー、鋳型、およびデオキシリボヌクレオチドの相対濃度がある。増幅の後、結果として得られたDNA断片は、アガロースゲル電気泳動に続く、臭化エチジウム染色および紫外線照射による視覚化を介して検出することができる。

20

【0344】

一実施形態では、ハイブリダイズさせた核酸は、試料核酸へと接合させた1または複数の標識を検出することにより検出する。標識は、当業者に周知の多数の手段のうちのいずれかにより組み込むことができる。しかし、一態様では、試料核酸を調製するときの増幅ステップにおいて、標識を同時に組み込む。したがって、例えば、標識されたプライマーまたは標識されたヌクレオチドを伴うポリメラーゼ連鎖反応(PCR)は、標識された増幅産物をもたらすであろう。個別の実施形態では、上記で記載した通り、標識されたヌクレオチド(例えば、フルオレセイン標識UTPおよび／またはCTP)を使用する転写増幅により、標識を、転写される核酸へと組み込む。

30

【0345】

代替的に、標識は、元の核酸試料(例えば、mRNA、ポリA、mRNA、cDNAなど)へと直接付加することもでき、増幅が完了した後で、増幅産物へと付加することもできる。当業者には、標識を核酸へと接合させる手段が周知であり、例えば、核酸のキナーゼ処理の後における、試料核酸を標識(例えば、フルオロフォア)へと接合する核酸リンカーの接合(ライゲーション)を介する、ニック翻訳または末端標識づけ(例えば、標識されたRNAによる)を含む。

40

【0346】

本開示における使用に適する、検出可能な標識は、分光学的手段、光化学的手段、生化学的手段、免疫化学的手段、電気的手段、光学的手段、または化学的手段により検出可能な任意の組成物を含む。本発明において有用な標識は、標識ストレプトアビジンコンジュゲートによる染色のためのビオチン、磁気ビーズ(例えば、Dynabeads(商標))、蛍光色素(例えば、フルオレセイン、テキサスレッド、ローダミン、緑色蛍光タンパク質など)、放射性標識(例えば、³H、¹²⁵I、³⁵S、¹⁴C、または³²P)、酵素(例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、およびELISAにおいて一般に使用される他の酵素)、および金コロイドまたは有色ガラスもしくは有

50

色プラスチック（例えば、ポリスチレン、ポリプロピレン、ラテックスなど）によるビーズなどの比色標識を含む。このような標識の使用について教示する特許は、米国特許第3,817,837号、同第3,850,752号、同第3,939,350号、同第3,996,345号、同第4,277,437号、同第4,275,149号；および同第4,366,241号を含む。

【0347】

標識の検出は、当業者に周知である。したがって、例えば、放射性標識は、写真用フィルムまたはシンチレーションカウンターを使用して検出することができ、蛍光マーカーは、発光した光を検出する光検出器を使用して検出することができる。酵素標識は、酵素に基質を与え、酵素の基質に対する作用により生成する反応生成物を検出することにより検出することが典型的であり、比色標識は、有色の標識を単に視覚化することにより検出する。

【0348】

WO97/10365において記載されている標識など、検出可能な標識を、ハイブリダイゼーションの前に、またはハイブリダイゼーションの後で、標的（試料）核酸へと付加することができる。これらの検出可能な標識は、ハイブリダイゼーションの前に、標的（試料）核酸へと直接接合することもでき、標的（試料）核酸へと組み込むこともできる。これに対し、「間接標識」は、ハイブリダイゼーションの後で、ハイブリッド体の二重鎖へと接合する。一般に、間接標識は、ハイブリダイゼーションの前に標的核酸へと接合させた、結合性部分へと接合させる。例えば、標的核酸は、ハイブリダイゼーションの前にビオチニル化することができる。ハイブリダイゼーション後、アビジンコンジュゲートフルオロフォアは、ビオチンを保有するハイブリッド体の二重鎖に結合し、容易に検出される標識をもたらす。核酸を標識し、標識された、ハイブリダイズさせた核酸を検出する方法の詳細な総説については、Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 24: Hybridization with Nucleic Acid Probes, P. Tijssen, ed. Elsevier, N.Y. (1993)を参照されたい。

【0349】

Notch3突然変異は、タンパク質へと翻訳されると、特異的抗体により検出することができる。Notch3突然変異の発現レベルはまた、Notch3突然変異体のタンパク質発現またはタンパク質産物を検討することにより決定することもできる。タンパク質レベルの決定は、患者から得られた試料中のバイオマーカーのポリペプチドを選択的に認識し、これに選択的に結合する抗体の間で生じる、任意の免疫特異的結合の量を測定し、これを、対照試料中の少なくとも1つのバイオマーカーの免疫特異的結合の量と比較することを伴う。Notch3のタンパク質発現の量は、対照の発現と比較して増大する場合もあり、低減される場合もある。

【0350】

競合アッセイなどの診断アッセイは、被験試料解析物と、共通の結合パートナー上の限定された数の結合性部位について競合する、標識された類似体（「トレーサー」）の能力に依拠する。結合パートナーは一般に、競合の前に、または競合の後で不溶化させ、次いで、結合パートナーに結合したトレーサーおよび解析物を、結合しなかったトレーサーおよび解析物から分離する。この分離は、デカントすること（結合パートナーをあらかじめ不溶化させる場合）により達成することもでき、遠心分離すること（結合パートナーを競合反応の後で沈殿させる場合）により達成することもできる。被験試料解析物の量は、マーカー物質の量により測定される通り、結合したトレーサーの量に反比例する。被験試料中に存在する解析物の量を定量的に決定するために、公知量の解析物による用量反応曲線を作成し、試験結果と比較する。酵素を、検出可能なマーカーとして使用する場合、これらのアッセイをELISAシステムと呼ぶ。この形態のアッセイでは、抗体とNotch3抗体との競合的結合により、結合したNotch3タンパク質、好ましくは本開示のNotch3エピトープが結果としてもたらされ、血清試料中の抗体、最高度に特定すれば、血清試料中の中和抗体の尺度となる。

【0351】

アッセイの著明な利点は、測定が中和抗体（すなわち、N o t c h 3 タンパク質、具体的に、N o t c h 3 エピトープの結合に干渉する中和抗体）から直接なされることである。特に、E L I S A 試験の形態におけるこのようなアッセイは、臨床環境および日常的な血液スクリーニングにおいて重要な適用を有する。

【0352】

バイオマーカーのアッセイ

本開示の別の態様は、個体における N o t c h 3 核酸の発現または N o t c h 3 タンパク質の活性を決定し、これにより、その個体に適する治療剤または予防剤を選択するための方法（本明細書では「薬理ゲノム学」と称する）を提示する。薬理ゲノム学は、個体の治療的処置または予防的処置のための薬剤（例えば、低分子薬物または抗体もしくはそれらの断片などの生物学的物質）の、個体の遺伝子型（例えば、特定の薬剤に応答する個体の能力を決定する、検討される個体の遺伝子型）に基づく選択を可能とする。

10

【0353】

本開示のさらに別の態様は、臨床試験において、薬剤（例えば、低分子薬物または抗体もしくはそれらの断片などの生物学的物質）の、N o t c h 3 タンパク質の発現または活性に対する影響をモニタリングすることに関する。

【0354】

患者を N o t c h 3 突然変異についてアッセイし、N o t c h 3 阻害剤（例えば、低分子阻害剤または N o t c h 3 抗体もしくはその断片などの生物学的薬剤）に対して感受性であることが予測されたら、任意の N o t c h 3 阻害剤の患者への投与を、処置コースを通して、持続的に行うこともでき、間欠的に行うこともできる。薬剤の適切な剤形および投与法は、N o t c h 3 突然変異体の存在および発現レベルに基づき、経験的に調整することができる。

20

【0355】

患者が、N o t c h 3 処置への感受性を維持しているのかどうかを決定するために、N o t c h 3 突然変異について、N o t c h 3 阻害剤を投与した後でアッセイすることができる。加えて、N o t c h 3 突然変異について、単回の N o t c h 3 阻害剤投与の後の複数の時点においてもアッセイすることができる。例えば、N o t c h 3 阻害剤の初期ボラスを投与し、N o t c h 3 突然変異について、初回の処置の、1 時間後、2 時間後、3 時間後、4 時間後、8 時間後、16 時間後、24 時間後、48 時間後、3 日後、1 週間後、または 1 カ月後もしくは数カ月後においてアッセイすることができる。

30

【0356】

患者に、複数回にわたる N o t c h 3 阻害剤の投与を施し、次いで、異なる時点において、N o t c h 3 突然変異についてアッセイすることもできよう。例えば、処置コースは、N o t c h 3 阻害剤の初回投与、指定された時間後における 2 回目の投与、さらに 2 回目の投与の数時間後における 3 回目の投与の実施を要請する場合がある。N o t c h 3 突然変異について、N o t c h 3 阻害剤の各回の投与を実施した 1 時間後、2 時間後、3 時間後、4 時間後、8 時間後、16 時間後、24 時間後、48 時間後、3 日後、1 週間後、または 1 カ月後もしくは数カ月後においてアッセイすることができる。

40

【0357】

任意の N o t c h 3 阻害剤（例えば、抗体またはその断片）の活性を評価するためのキットを作製することができる。例えば、N o t c h 3 突然変異のための P C R またはマイクロアレイハイブリダイゼーションのための核酸プライマーを含むキットを、N o t c h 3 突然変異体の存在を評価するために使用することができる。代替的に、キットは、表 2 に列挙された N o t c h 3 突然変異のための抗体またはそれらの断片を備えることもできる。

【0358】

N o t c h 3 突然変異を使用して、N o t c h 3 阻害剤についてスクリーニングすることが可能である。この方法は、表 2 による N o t c h 3 突然変異を含有する細胞を用意す

50

るステップと、細胞を、候補 N o t c h 3 阻害剤（例えば、低分子または抗体もしくはその断片などの生物学的薬剤）と接触させるステップと、処置された細胞の IC_{50} を、公知の N o t c h 3 阻害剤と比較するステップとを含む。

【0359】

医薬組成物

N o t c h 3 抗体またはその断片を含む医薬組成物または滅菌組成物を調製するには、N o t c h 3 抗体またはその断片を、薬学的に許容される担体または賦形剤と混合する。組成物は、がん（乳がん、結腸直腸がん、肺がん、多発性骨髄腫、卵巣がん、肝がん、胃がん、膵臓がん、前立腺がん、急性骨髄性白血病、T細胞性急性リンパ芽球性白血病、マントル細胞リンパ腫、慢性リンパ球性白血病、ユーイング肉腫、慢性骨髄性白血病、骨肉腫、有棘細胞癌、末梢神経鞘腫瘍、シュワン細胞腫、頭頸部がん、膀胱がん、食道がん、神経膠芽腫、軟組織明細胞肉腫、悪性中皮腫、神経線維腫症、腎がん、および黒色腫）を処置またはを防止するのに適する、1または複数の他の治療剤をさらに含有しうる。

10

【0360】

治療剤および診断剤の処方物は、例えば、凍結乾燥粉末、スラリー、水溶液、ローション、または懸濁液の形態における、生理学的に許容される担体、賦形剤、または安定化剤と混合することにより調製することができる（例えば、Hardman et al., (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, N.Y.; Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams, and Wilkins, New York, N.Y.; Avis, et al. (eds.) (1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY; Lieberman, et al. (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY; Lieberman, et al. (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY; Weiner and Kotkoskie (2000) Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.を参照されたい）。

20

【0361】

治療剤のための投与レジメンの選択は、血清中または組織中の実体の代謝回転率、症状のレベル、実体の免疫原性、および生物学的マトリックス中の標的細胞の接近可能性を含む、複数の因子に依存する。ある種の実施形態では、投与レジメンにより、許容可能な副作用のレベルと符合する限りにおいて、患者へと送達される治療剤の量を最大化する。したがって、送達される生物学的薬剤の量は、部分的に、特定の実体および処置される状態の重症度に依存する。抗体、サイトカイン、および低分子の適切な用量の選択における指針は、入手可能である（例えば、Wawrzynczak (1996) Antibody Therapy, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, UK; Kresina (ed.) (1991) Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis, Marcel Dekker, New York, N.Y.; Bach (ed.) (1993) Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases, Marcel Dekker, New York, N.Y.; Baert et al., (2003) New Engl. J. Med. 348:601-608; Milgrom et al., (1999) New Engl. J. Med. 341:1966-1973; Slamon et al., (2001) New Engl. J. Med. 344:783-792; Beniaminovitz et al., (2000) New Engl. J. Med. 342:613-619; Ghosh et al., (2003) New Engl. J. Med. 348:24-32; Lipsky et al., (2000) New Engl. J. Med. 343:1594-1602を参照されたい）。

30

40

【0362】

適切な用量の決定は、例えば、処置に影響を及ぼすことが当技術分野で公知であるかもしくは疑われるか、または処置に影響を及ぼすことが予測されるパラメータまたは因子を使用して、主治医が行う。一般に、投与は、いくぶんか最適用量未満の量で始め、以後、任意の負の副作用と比べて、所望の効果または最適の効果が達成されるまで、小さな増分で増大させる。重要な診断的尺度は、症状、例えば、炎症の症状、または産生される炎症性サイトカインのレベルについての尺度を含む。

【0363】

本開示の医薬組成物中の、有効成分の実際の投与量レベルは、患者に対して毒性となら

50

ずに、特定の患者、組成物、および投与方式について所望の治療的応答を達成するのに有効な量の有効成分を得るように変化させることができる。選択される投与量レベルは、援用される本開示の特定の組成物、またはそれらのエステル、塩、もしくはアミドの活性、投与経路、投与回数、援用される特定の化合物の排出速度、処置の持続期間、援用される特定の組成物と組み合わせて使用される、他の薬物、化合物、および／または材料を含む、様々な薬物動態因子、処置される患者の年齢、性別、体重、状態、全般的な健康、および既往歴、ならびに医療技術分野で公知のその他の因子に依存するであろう。

【0364】

抗体またはそれらの断片を含む組成物は、連続注入により施すこともでき、例えば、1日おき、1週間おき、または毎週1～7回の投与により施すこともできる。投与は、静脈内投与、皮下投与、局所投与、経口投与、鼻腔内投与、直腸内投与、筋内投与、脳内投与、または吸入により施すことができる。具体的な投与プロトコールは、著明な所望されない副作用を回避する、最大用量または最高投与頻度を伴う投与プロトコールである。毎週の総用量は、体重1kg当たり少なくとも0.05μg、少なくとも0.2μg/kg、少なくとも0.5μg/kg、少なくとも1μg/kg、少なくとも10μg/kg、少なくとも100μg/kg、少なくとも0.2mg/kg、少なくとも1.0mg/kg、少なくとも2.0mg/kg、少なくとも10mg/kg、少なくとも25mg/kg、または少なくとも50mg/kgでありうる（例えば、Yang et al., (2003) New Engl. J. Med. 349:427-434; Herold et al., (2002) New Engl. J. Med. 346:1692-1698; Liu et al., (1999) J. Neurol. Neurosurg. Psych. 67:451-456; Portielji et al., (2003) Cancer Immunol. Immunother. 52:133-144を参照されたい）。抗体またはそれらの断片の所望の用量は、体重1kg当たりのモルベースの抗体またはポリペプチドの用量とほぼ同じである。抗体またはそれらの断片の所望の血漿中濃度は、ほぼ、体重1kg当たりのモルベースの濃度である。用量は、少なくとも15μg、少なくとも20μg、少なくとも25μg、少なくとも30μg、少なくとも35μg、少なくとも40μg、少なくとも45μg、少なくとも50μg、少なくとも55μg、少なくとも60μg、少なくとも65μg、少なくとも70μg、少なくとも75μg、少なくとも80μg、少なくとも85μg、少なくとも90μg、少なくとも95μg、または少なくとも100μgでありうる。対象へと投与される投与回数は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または12回以上でありうる。

【0365】

本開示の抗体またはそれらの断片の、患者へと投与される投与量は、患者の体重1kg当たり0.0001mg～100mgでありうる。投与量は、患者の体重1kg当たり0.0001mg～20mgの間、0.0001mg/kg～10mg/kgの間、0.0001mg/kg～5mg/kgの間、0.0001mg/kg～2mg/kgの間、0.0001～1mg/kgの間、0.0001mg/kg～0.75mg/kgの間、0.0001mg/kg～0.5mg/kgの間、0.0001mg/kg～0.25mg/kg、0.0001～0.15mg/kg、0.0001～0.10mg/kg、0.001～0.5mg/kg、0.01～0.25mg/kg、または0.01～0.10mg/kgでありうる。

【0366】

抗体またはそれらの断片の投与量は、mg/kg単位の投与される用量を乗じた、キログラム(kg:kilogram)単位の患者の体重を使用して計算することができる。抗体またはそれらの断片の投与量は、患者の体重1kg当たり150μg以下、125μg/kg以下、100μg/kg以下、95μg/kg以下、90μg/kg以下、85μg/kg以下、80μg/kg以下、75μg/kg以下、70μg/kg以下、65μg/kg以下、60μg/kg以下、55μg/kg以下、50μg/kg以下、45μg/kg以下、40μg/kg以下、35μg/kg以下、30μg/kg以下、25μg/kg以下、20μg/kg以下、15μg/kg以下、10μg/kg以下、5μg/kg以下、2.5μg/kg以下、2μg/kg以下、1.5μg/kg以下、1μg/kg

以下、 $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 以下、または $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 以下でありうる。

【0367】

抗体またはそれらの断片の単位用量は、 $0.1 \text{mg} \sim 20 \text{mg}$ 、 $0.1 \text{mg} \sim 15 \text{mg}$ 、 $0.1 \text{mg} \sim 12 \text{mg}$ 、 $0.1 \text{mg} \sim 10 \text{mg}$ 、 $0.1 \text{mg} \sim 8 \text{mg}$ 、 $0.1 \text{mg} \sim 7 \text{mg}$ 、 $0.1 \text{mg} \sim 5 \text{mg}$ 、 $0.1 \sim 2.5 \text{mg}$ 、 $0.25 \text{mg} \sim 20 \text{mg}$ 、 $0.25 \sim 15 \text{mg}$ 、 $0.25 \sim 12 \text{mg}$ 、 $0.25 \sim 10 \text{mg}$ 、 $0.25 \sim 8 \text{mg}$ 、 $0.25 \text{mg} \sim 7 \text{mg}$ 、 $0.25 \text{mg} \sim 5 \text{mg}$ 、 $0.5 \text{mg} \sim 2.5 \text{mg}$ 、 $1 \text{mg} \sim 20 \text{mg}$ 、 $1 \text{mg} \sim 15 \text{mg}$ 、 $1 \text{mg} \sim 12 \text{mg}$ 、 $1 \text{mg} \sim 10 \text{mg}$ 、 $1 \text{mg} \sim 8 \text{mg}$ 、 $1 \text{mg} \sim 7 \text{mg}$ 、 $1 \text{mg} \sim 5 \text{mg}$ 、または $1 \text{mg} \sim 2.5 \text{mg}$ でありうる。

【0368】

抗体またはそれらの断片の投与量は、対象において、少なくとも $0.1 \text{mg}/\text{ml}$ 、少なくとも $0.5 \text{mg}/\text{ml}$ 、少なくとも $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $6 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $15 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $125 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $150 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $175 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $225 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $250 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $275 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $300 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $325 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $350 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $375 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、または少なくとも $400 \mu\text{g}/\text{ml}$ の血清中力価を達成しうる。代替的に、抗体またはそれらの断片の投与量は、対象において、少なくとも $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $6 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $15 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $125 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $150 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $175 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $225 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $250 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $275 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $300 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $325 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $350 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $375 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、または少なくとも $400 \mu\text{g}/\text{ml}$ の血清中力価を達成しうる。

【0369】

抗体またはそれらの断片の投与は、繰り返すことができ、投与は、少なくとも1日間、2日間、3日間、5日間、10日間、15日間、30日間、45日間、2カ月間、75日間、3カ月間、または少なくとも6カ月間隔てることができる。

【0370】

特定の患者にとっての有効量は、処置される状態、患者の全般的健康、投与経路および投与用量、ならびに副作用の重症度などの因子に応じて変化する（例えば、Maynard et al., (1996) A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice, Interpharm Press, Boca Raton, Fla.; Dent (2001) Good Laboratory and Good Clinical Practice, Urch Publ., London, UKを参照されたい）。

【0371】

投与経路は、例えば、局所適用または皮内適用を介する投与の場合もあり、静脈内注射または静脈内注入、腹腔内注射または腹腔内注入、脳内注射または脳内注入、筋内注射または筋内注入、眼内注射または眼内注入、動脈内注射または動脈内注入、脳脊髄内注射または脳脊髄内注入、病変内注射または病変内注入を介する投与の場合もあり、持続放出系またはインプラントを介する投与の場合もある（例えば、Sidman et al., (1983) Biopolymers 22:547-556; Langer et al., (1981) J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277; Langer (1982) Chem. Tech. 12:98-105; Epstein et al., (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688-3692; Hwang et al., (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030-4034; 米国特許第6,350,466号、および同第6,316,024号を参照されたい）。必要な場合、組成物はまた、可溶化剤、および注射部位の痛みを和らげるリドカインなどの

局所麻酔剤も含みうる。加えて、例えば、吸入器または噴霧器、およびエアゾール化剤を伴う処方物を使用することにより、肺内投与もまた援用することができる。例えば、それらの各々が参照によりそれらの全体において本明細書に組み込まれる、米国特許第6,019,968号、同第5,985,320号、同第5,985,309号、同第5,934,272号、同第5,874,064号、同第5,855,913号、同第5,290,540号、および同第4,880,078号；ならびにPCT公開第WO92/19244号、同第WO97/32572号、同第WO97/44013号、同第WO98/31346号、および同第WO99/66903号を参照されたい。

【0372】

本開示の組成物はまた、当技術分野で公知の様々な方法のうちの1または複数を使用する、1または複数の投与経路を介して投与することもできる。当業者により察知される通り、投与経路および／または投与方式は、所望の結果に応じて変化するであろう。抗体またはそれらの断片のために選択される投与経路は、例えば、注射または注入による、静脈内投与経路、筋内投与経路、皮内投与経路、腹腔内投与経路、皮下投与経路、脊髄内投与経路、または他の非経口投与経路を含む。非経口投与は、通例注射による、腸内投与および局所投与以外の投与方式を表す場合があり、限定なしに述べると、静脈内注射および静脈内注入、筋内注射および筋内注入、動脈内注射および動脈内注入、髄腔内注射および髄腔内注入、関節包内注射および関節包内注入、眼窩内注射および眼窩内注入、心内注射および心内注入、皮内注射および皮内注入、腹腔内注射および腹腔内注入、経気管注射および経気管注入、皮下注射および皮下注入、表皮下注射および表皮下注入、関節内注射および関節内注入、被膜下注射および被膜下注入、くも膜下注射およびくも膜下注入、脊髄内注射および脊髄内注入、硬膜外注射および硬膜外注入、ならびに胸骨下注射および胸骨下注入を含む。代替的に、組成物は、局所投与経路、表皮投与経路、または経粘膜投与経路、例えば、鼻腔内投与経路、経口投与経路、膣内投与経路、直腸内投与経路、舌下投与経路、または局所投与経路など、非経口経路以外の経路を介して投与することもできる。一実施形態では、抗体またはそれらの断片を、注入により投与する。別の実施形態では、多特異性エピトープ結合性タンパク質を皮下投与する。

【0373】

抗体またはそれらの断片を、制御放出系または持続放出系で投与する場合は、ポンプを使用して、制御放出または持続放出を達成することができる (Langer, supra; Sefton, (1987) CRC Crit. Ref Biomed. Eng. 14:20; Buchwald et al., (1980), Surgery 88:507; Saudek et al., (1989) N. Engl. J. Med. 321:574を参照されたい)。ポリマー材料を使用して、治療の制御放出または持続放出を達成することもできる (例えば、Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas, (1983) J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61を参照されたい；また、Levy et al., (1985) Science 228:190; During et al., (1989) Ann. Neurol. 25:351; Howard et al., (1989) J. Neurosurg. 71:105; 米国特許第5,679,377号；米国特許第5,916,597号；米国特許第5,912,015号；米国特許第5,989,463号；米国特許第5,128,326号；PCT公開第WO99/15154号；およびPCT公開第WO99/20253号も参照されたい)。持続放出处方物中で使用されるポリマーの例は、ポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)、ポリ(メチルメタクリレート)、ポリ(アクリル酸)、ポリ(エチレン-*c o*-酢酸ビニル)、ポリ(メタクリル酸)、ポリグリコリド(PLG)、ポリ無水物、ポリ(N-ビニルピロリドン)、ポリ(ビニルアルコール)、ポリアクリルアミド、ポリ(エチレングリコール)、ポリラクチド(PLA)、ポリ(ラクチド-*c o*-グリコリド)(PLGA)、およびポリオルトエステルを含むがこれらに限定されない。一実施形態では、持続放出处方物中で使用されるポリマーは不活性であり、濾過可能な不純物を含まず、保管において安定的であり、無菌であり、生体分解性である。制御放出系または持続放出系は、予防標的または治療標的に近接させ

10

20

30

40

50

て配置することができ、したがって、全身用量の一部を要請するに過ぎない（例えば、Godson, in Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pp. 115-138 (1984)を参照されたい）。

【0374】

制御放出系は、Langer, (1990), Science 249:1527-1533による総説において論じられている。当業者に公知の任意の技法を使用して、1または複数の本開示の抗体またはそれらの断片を含む持続放出处方物を作製することができる。例えば、それらの各々が参照によりそれらの全体において本明細書に組み込まれる、米国特許第4, 526, 938号、PCT公開第WO 91/05548号、PCT公開第WO 96/20698号、Ning et al., (1996), Radiotherapy & Oncology 39:179-189; Song et al., (1995) PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397; Cleek et al., (1997) Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854; およびLam et al., (1997) Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760を参照されたい。

【0375】

抗体またはそれらの断片を局所投与する場合、それらは、軟膏、クリーム、経皮パッチ、ローション、ゲル、シャンプー、スプレー、エアゾール、溶液、エマルジョンの形態、または当業者に周知の他の形態で製剤化することができる。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 19th ed., Mack Pub. Co., Easton, Pa. (1995)を参照されたい。スプレー不可能な局所剤形では、局所適用に適合性であり、場合によって、水を超える動粘性を有する、担体または1もしくは複数の賦形剤を含む、粘性形態～半固体形態または固体形態を援用することが典型的である。適切な処方物は、限定なしに述べると、所望の場合、滅菌されるかまたは例えば、浸透圧などの多様な特性に影響を与えるための補助剤（例えば、保存剤、安定化剤、保湿剤（wetting agent）、緩衝剤、または塩）と混合された、溶液、懸濁液、エマルジョン、クリーム、軟膏（ointment）、粉末、塗布剤、軟膏（salve）などを含む。他の適切な局所剤形は、場合によって、固体または液体の不活性担体と組み合わせた有効成分を、高圧揮発性物質（例えば、フロンなどの推進剤ガス）との混合物中、またはスクイズボトル内にパッケージングした、スプレー可能なエアゾール調製物を含む。また所望の場合、保湿剤（moisturizerまたはhumectant）も、医薬組成物および剤形へと添加することができる。当技術分野では、このようなさらなる成分の例が周知である。

【0376】

抗体またはそれらの断片を含む組成物を、鼻腔内投与する場合は、組成物を、エアゾール形態、スプレー、ミスト、または液滴の形態で製剤化することができる。特に、本開示に従う使用のための予防剤または治療剤は、適切な推進剤（例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素、または他の適切なガス）の使用を伴う、高圧バックまたは噴霧器からのエアゾールスプレーによる提示形態で送達すると好都合でありうる。高圧エアゾールの場合、投与単位は、計量された量を送達するバルブを装備することにより決定することができる。吸入器（inhalerまたはinsufflator）における使用のためのカプセルおよびカートリッジ（例えば、ゼラチンからなる）であって、化合物の粉末ミックスおよびラクトースまたはデンプンなど、適切な粉末ベースを含有する、カプセルおよびカートリッジも製剤化することができる。

【0377】

当技術分野では、第2の治療剤、例えば、サイトカイン、ステロイド、化学療法剤、抗生剤、または放射線との共投与または共処置ための方法が公知である（例えば、Hardman et al., (eds.) (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10.sup.th ed., McGraw-Hill, New York, N.Y.; Poole and Peterson (eds.) (2001) Pharmacotherapeutics for Advanced Practice: A Practical Approach, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., Pa.; Chabner and Longo (eds.) (2001) Cancer Chemotherapy and Biotherapy, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., Pa.を参照されたい）。有効量の治療剤は、症状を、少なくとも10%; 少なくとも20%; 少なくとも約30

% ; 少なくとも 40 %、または少なくとも 50 % 減殺しうる。

【0378】

抗体またはそれらの断片と組み合わせて投与されうる、さらなる治療（例えば、予防剤または治療剤）は、本開示の抗体またはそれらの断片から、5 分間未満の間隔を置いて、30 分間未満の間隔を置いて、1 時間の間隔を置いて、約 1 時間の間隔を置いて、約 1 ～ 約 2 時間の間隔を置いて、約 2 時間～約 3 時間の間隔を置いて、約 3 時間～約 4 時間の間隔を置いて、約 4 時間～約 5 時間の間隔を置いて、約 5 時間～約 6 時間の間隔を置いて、約 6 時間～約 7 時間の間隔を置いて、約 7 時間～約 8 時間の間隔を置いて、約 8 時間～約 9 時間の間隔を置いて、約 9 時間～約 10 時間の間隔を置いて、約 10 時間～約 11 時間の間隔を置いて、約 11 時間～約 12 時間の間隔を置いて、約 12 時間～18 時間の間隔を置いて、18 時間～24 時間の間隔を置いて、24 時間～36 時間の間隔を置いて、36 時間～48 時間の間隔を置いて、48 時間～52 時間の間隔を置いて、52 時間～60 時間の間隔を置いて、60 時間～72 時間の間隔を置いて、72 時間～84 時間の間隔を置いて、84 時間～96 時間の間隔を置いて、または 96 時間～120 時間の間隔を置いて投与することができる。2 つ以上の治療を、1 回の同じ患者来院内に投与することもできる。

10

【0379】

抗体またはそれらの断片および他の治療は、周期的に投与することができる。サイクリング療法は、ある期間にわたる第 1 の治療（例えば、第 1 の予防剤または治療剤）の投与を伴い、これに続き、ある期間にわたる第 2 の治療（例えば、第 2 の予防剤または治療剤）の投与を伴い、これに続き、任意選択で、ある期間にわたる第 3 の治療（例えば、予防剤または治療剤）の投与などを伴い、治療のうちの 1 つに対する耐性の発生を低減し、治療のうちの 1 つの副作用を回避もしくは低減し、かつ／または治療の有効性を改善するために、この逐次的投与、すなわち、サイクルを繰り返す。

20

【0380】

ある種の実施形態では、抗体またはそれらの断片は、*in vivo* における適正な分布を確保するように製剤化することができる。例えば、血液脳関門（BBB: blood-brain barrier）は、多くの高度に親水性の化合物を排除する。治療用化合物が BBB を越えることを確保するために（所望の場合）、例えば、リポソームにより製剤化することができる。リポソームの製造法については、例えば、米国特許第 4, 522, 811 号、同第 5, 374, 548 号および同第 5, 399, 331 号を参照されたい。リポソームは、特異的な細胞または臓器へと選択的に輸送され、これにより、薬物送達のターゲティングを増強する、1 または複数の部分を含みうる（例えば、Ranade, (1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685 を参照されたい）。例示的なターゲティング部分は、葉酸またはビオチン（例えば、Low らによる、米国特許第 5, 416, 016 号を参照されたい）；マンノシド（Umezawa et al., (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038）；抗体（Bloeman et al., (1995) FEBS Lett. 357:140 ; Owais et al., (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39:180）；界面活性剤であるプロテイン A 受容体（Briscoe et al., (1995) Am. J. Physiol. 1233:134）；p120（Schreier et al, (1994) J. Biol. Chem. 269:9090）を含み、また、K. Keinänen; M. L. Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346:123 ; J. J. Killian; I. J. Fidler (1994) Immunomethods 4:273 も参照されたい。

30

40

【0381】

本開示は、抗体またはそれらの断片を含む医薬組成物を、単独で、または他の治療と組み合わせて、それを必要とする対象へと投与するためのプロトコールを提示する。本開示の組合せ療法の治療（例えば、予防剤または治療剤）は、対象へと、共時的に投与することもでき、逐次的に投与することもできる。本開示の組合せ療法の治療（例えば、予防剤または治療剤）はまた、周期的に投与することもできる。サイクリング療法は、ある期間にわたる第 1 の治療（例えば、第 1 の予防剤または治療剤）の投与を伴い、これに続き、ある期間にわたる第 2 の治療（例えば、第 2 の予防剤または治療剤）の投与を伴い、治療（例えば、薬剤）のうちの 1 つに対する耐性の発生を低減し、治療（例えば、薬剤）のう

50

ちの1つの副作用を回避もしくは低減し、かつ／または治療の有効性を改善するために、この逐次的投与、すなわち、サイクルを繰り返す。

【0382】

組合せ療法の治療（例えば、予防剤または治療剤）は、対象へと、共時的に投与することができる。「共時的に」という用語は、まさに同じ時点における治療（例えば、予防剤または治療剤）の投与に限定されず、むしろ、抗体が、他の治療と併せて作用して、それらを他の形で投与した場合より増大させた利益をもたらすように、抗体またはそれらの断片を含む医薬組成物を、逐次的に、かつ、ある間隔以内に対象へと投与することも意図される。例えば、各治療は、対象へと、同時に投与することもでき、異なる時点において、任意の順序で、逐次的に投与することもできるが、同時に投与しない場合は、所望の治療効果または予防効果をもたらすように、時間的に十分に近接させて投与するものとする。各治療は、対象へと、個別に、任意の適切な形態で、かつ、任意の適する経路を介して投与することができる。多様な実施形態では、治療（例えば、予防剤または治療剤）を、15分間未満、30分間未満、1時間未満の間隔を置いて、約1時間の間隔を置いて、約1時間～約2時間の間隔を置いて、約2時間～約3時間の間隔を置いて、約3時間～約4時間の間隔を置いて、約4時間～約5時間の間隔を置いて、約5時間～約6時間の間隔を置いて、約6時間～約7時間の間隔を置いて、約7時間～約8時間の間隔を置いて、約8時間～約9時間の間隔を置いて、約9時間～約10時間の間隔を置いて、約10時間～約11時間の間隔を置いて、約11時間～約12時間の間隔を置いて、24時間の間隔を置いて、48時間の間隔を置いて、72時間の間隔を置いて、または1週間の間隔を置いて、対象へと投与する。他の実施形態では、2つ以上の治療（例えば、予防剤または治療剤）を、同じ患者来院内に投与する。

【0383】

組合せ療法の予防剤または治療剤は、同じ医薬組成物により、対象へと投与することができる。代替的に、組合せ療法の予防剤または治療剤は、個別の医薬組成物により、対象へと、共時的に投与することができる。予防剤または治療剤は、対象へと、同じ投与経路により投与することもでき、異なる投与経路により投与することもできる。

【0384】

本開示について十分に記載してきたが、以下の実施例および特許請求の範囲によりこれをさらに例示するが、これらは、例示的なものであり、さらに限定的であることを意図するものではない。

【0385】

ICD3アッセイおよびその使用

一態様では、本開示は、Notch3シグナル伝達を検出するためのアッセイに関する。Notchシグナル伝達は、一連のタンパク質分解性切断により活性化される。ガンマセクレターゼ複合体は、核へと移行して、Notch標的遺伝子の転写を活性化させる、Notch細胞内ドメイン（ICD）を最終的に放出する、Notch受容体の最終的な切断を媒介する。ネオエピトープ抗体（検出抗体）を作り出して、ヒトNotch3のアミノ酸であるGly1661とVal1662との間で切断される場合に限る、Notch3 ICD（ICD3：Notch3 ICD）のガンマセクレターゼによる切断形態を検出した。

【0386】

アッセイは、Notch3の、ガンマセクレターゼにより切断されたドメイン（ICD3）内のネオエピトープである、VMVARRK（配列番号243）を検出する検出抗体の使用を含む。ICD3は、野生型Notch3または突然変異体Notch3の位置Gly1661～Val1662における切断により作製することができる。

【0387】

本明細書で開示されるアッセイによるICD3の検出は、Notch3シグナルの活性化および伝達を指し示す。Notch3シグナルの活性化および伝達を防止する抗体またはその断片は、ICD3の産生を防止し、これにより、その中に含有されるネオエピトー

プの、検出抗体による検出も防止する。一実施形態では、抗体またはその断片は、N o t c h 3を自己阻害コンフォメーションで保持し、これにより、S 2切断部位およびS 3切断部位のプロテアーゼへの曝露を不可能とし、これにより、検出抗体により認識されるネオエピトープを含むI C D 3の形成を防止する。

【0388】

一態様では、本開示は、がん罹患しているか、またはがんを発症する危険性がある個体に由来する生体試料（例えば、血液、血清、細胞、組織）の文脈において、N o t c h 3タンパク質および／またはN o t c h 3核酸の発現のほか、N o t c h 3タンパク質の機能も決定するための診断アッセイを包摂する。

【0389】

I C D 3アッセイを使用して、活性化されたN o t c h 3シグナル伝達の存在を検出することができる。N o t c h 3シグナル伝達の活性化は、N o t c h 3突然変異または高度なN o t c h 3発現／遺伝子の増幅により達成することができる。生体試料を調製し、I C D 3タンパク質の存在または非存在について解析することができる。N o t c h 3 I C Dが存在する場合、N R Rドメインは、N R Rの自己阻害コンフォメーションを変化させ、これにより、H Dドメインをプロテアーゼによる切断へと露出させることと、本開示の抗体を検出することにより検出する、I C D 3の産生とを結果としてもたらす突然変異を含有する。これらの試験の結果および解釈に関する情報は、被験個体との通信のために、医療ケア従事者へと返還することができる。このような診断法は、診断検査室で実施することもでき、代替的に、診断キットを製造し、医療ケア従事者へと販売することもでき、自己診断用に、個人の個体へと販売することもできる。

【0390】

本開示の別の態様は、個体におけるN o t c h 3核酸の発現またはN o t c h 3タンパク質の活性を決定し、これにより、その個体に適する治療剤または予防剤を選択するための方法（本明細書では「薬理ゲノム学」と称する）を提示する。薬理ゲノム学は、個体の治療的処置または予防的処置のための薬剤（例えば、低分子薬物または抗体もしくはそれらの断片などの生物学的物質）の、個体の遺伝子型（例えば、特定の薬剤に応答する個体の能力を決定する、検討される個体の遺伝子型）に基づく選択を可能とする。

【0391】

本開示のさらに別の態様は、臨床試験において、薬剤（例えば、低分子薬物または抗体もしくはそれらの断片などの生物学的物質）の、N o t c h 3タンパク質の発現または活性に対する影響をモニタリングすることに関する。

【実施例】

【0392】

〔実施例1〕

カニクイザルN o t c h 3のクローニング

カニクイザルN o t c h 3の配列は公衆のデータベースで利用可能ではなかったので、それを以下のようにクローニングした。

【0393】

カニクイザル全RNA

全ての全RNAは、Z y a g e n (h t t p : / / z y a g e n . c o m / i n d e x . p h p 、サンディエゴ、CA 9 2 1 2 1) から購入した。全RNAは、カニクイザルの種々の組織（脳、腎臓、肝臓、肺、骨格筋、膵臓、脾臓、皮膚、胃、精巣、胸腺、甲状腺、骨髄）から抽出した。起源および個々のサルの参照はZ y a g e nによって特定されなかった。全RNAは、マイクロRNAを含む全RNAの迅速な単離を可能にするグアニジンイソチオシアネートフェノール：クロロホルム抽出法を使用して組織／細胞から通常のように抽出した。RNAをRNAseフリーDNAseで処置して残留DNAを除去し、正確に定量し、- 8 0 ° Cに保存した。インタクトなりボソームRNAによって示されるように、各RNA試料の完全性を変性アガロースゲル電気泳動によって検証した。RNAの純度を分光光度計（A 2 6 0 / A 2 8 0 : 1 . 9 ~ 2 . 1）によって評価した。RNA

10

20

30

40

50

は、ノーザンブロッティング、リボヌクレアーゼ保護アッセイ、S Iヌクレアーゼアッセイ、RT-PCR/Q-PCR分析、cDNA末端の迅速増幅(RACE)およびライブラリー構築のためのmRNAの精製に理想的であった。全RNAは、1mg/mlの濃度にてRNaseフリー水、1mMクエン酸ナトリウムまたは0.1mM EDTA中に提供され、ドライアイス上で輸送された。全ての全RNAを受け取った後、試料を-80℃にて保存する。

【0394】

RNAからcDNAへの逆転写およびPCR増幅

Thermo Script RT-PCRシステム(Invitrogen、Cat. 11146-016)およびオリゴdTを使用して全ての全RNAを逆転写した。2μgの全RNAを概して各cDNAプールのために使用し、20μl中で溶出した。1μlプライマー(50μMオリゴ(dT20)、2μg(組織)。全RNAおよび2μlの10mM dNTP混合物を合わせ、体積をDEPC処置した水で12μlに調製した。65℃にて5分間のインキュベーション後、4μlの5×cDNA合成緩衝液、1μlの0.1M DTT、1μlのRNaseOUT(商標)(40U/μl)、1μlのDEPC処置した水および1μlのThermoScript(商標)RT(15単位/μl)のマスター混合物を調製し、全体積8μlを氷上の各々の以前の反応チューブに加えた。全RNA試料の逆転写相は55℃にて90分で完了した。次いでこの反応を、85℃にて5分間、全反応物をインキュベートすることによって停止させた。最後に、1μlのRNaseHを加え、試料を37℃にて20分間インキュベートした。全てのポリメラーゼ連鎖反応のための原料物質としてcDNA反応物を-20℃にて保存した。

【0395】

2μlのcDNAを使用してPCR増幅を実施した。プライマーをUTR領域およびコード配列において設計した。PCR産物を直接、ゲル抽出し、直接シーケンシングによって分析した。

【0396】

カニクイザルNotch3遺伝子フィッシング(gene fishing)のためのPCRプライマー

非ヒト霊長類、例えば、ゴリラ、オランウータン、アカゲザルの標的配列を、プライマー設計および特異性試験のためのヒト配列と並べた。標的配列のマウスおよびラット配列もまた、必要とされ得る。アラインメントのための標的配列は、NCBI、eEnsemblまたはUniProtのようなデータベースから抽出できる。

【0397】

【表 3 - 1】

プライマー	配列
RS4242 UTR Fw	5' - CGGAGCCCAGGGAAGGAGGGAGGAGGGGAGGGTCG CGGCCGGCCGCC-3' (配列番号 244)
RS4243 UTR Rev	5' - CAGGACGGGGGTCTCTTTAGGCCCCCAAGATCTAAG AACTGACGAGCGTCTCA-3' (配列番号 245)
RS4244 CDS1825bp Fw	5' -CCATGGCGGCAAATGCCTAGACCTGGTGG-3' (配 列番号 246)
RS4245 CDS 1999bp Rev	5' - CAAAGGGGGCCCTGTGAAGCCAGGTTGGCAGACACAG TCG-3' (配列番号 247)
RS4246 CDS 4384bp Fw	5' - CTTCAACAACAGCCGCTGCGACCCCGCCTGCAGCTC G-3' (配列番号 248)
RS4247 CDS 4560bp Rev	5' -CAGCCGCACTCCTCCGTGTTGCAGCCCTGGTCG- 3' (配列番号 249)
RS4277 CDS 1137bp Rev	5' - GTCACAGATAGCATCCTCGTGGCAGGGGTTGCTGAC ACAGG-3' (配列番号 250)
RS4278 CDS 821bp Fw	5' - GGGACATGCGTGGATGGCGTCAACACCTATAACTGC CAGTGCCC-3' (配列番号 251)
RS4279 CDS 3136bp Rev	5' - GGCCCCAGTCTGGACGCAGCGACCCCCGTTTTGACA AGGC-3' (配列番号 252)
RS4280 CDS 2905bp Fw	5' - GAACTCGTTTCAGCTGCCTGTGCCGTCCCGGCTACAC AGGAGCCCCACTGC-3' (配列番号 253)
RS4281 CDS 5692bp Rev	5' - GCCTGAGTGGTCCTGGGCATTGGTGTCTGCCCCAGC ATCC-3' (配列番号 254)
RS4282 cds5501bp Fw	5' - GAAGAGGATGAGGCAGATGACACATCAGCTAGCATC ATCTCC-3' (配列番号 255)
RS4302 CDS 3091bp Fw	5' -TCACTGTGCCAGCGTTCT-3' (配列番号 256)
RS4303 CDS 4147bp Fw	5' -CTTCTTCCGCTGCGCTTGCGCGCAG-3' (配列番号 257)
RS4304 CDS 5046bp Rev	5' -ATGACCAGCAGCAAGACAGCGC-3' (配列番号 258)
RS4305 CDS 5100bp Rev	5' -CAGAGGGTGCTGTGCTCGCGCTTG-3' (配列番号 259)
RS4306 CDS 3901bp Fw	5' -ACAGTGCTGCTGCCGCCAGAGGAGCTAC-3' (配列 番号 260)
RS4361 CDS Seq. Fw	5' -CAGTCCCAGGACATGGCGAGGAGTAC-3' (配列番 号 261)
RS4362 UTR Fw	5' -AGCCCAGGGAAGGAGGGAGGAGGGGAGGGTCG- 3' (配列番号 262)
RS4363 CDS 861bp Rev	5' -ACTGGCAGTTATAGGTGTTGACGCCATCCACGC- 3' (配列番号 263)
RS4364 CDS 1950bp Rev	5' -GCACAGTCGTCAATGTTCACTTCGCAG-3' (配列番 号 264)

10

20

30

40

【表 3 - 2】

プライマー	配列
RS4365 CDS 2822bp Fw	5'-TACGGAGGCTTCCACTGCGAACAG-3' (配列番号 265)
RS4366 CDS 4067bp Rev	5'-CGACCCCGAGAAACTGCGGCAGGAG-3' (配列番号 266)
RS4367 UTR Rev	5'-CCCCAAGATCTAAGAACTGACGAGC-3' (配列番号 267)

【0398】

10

PCRおよびゲル精製

cDNAのPCRは、KAPA（商標）SYBR（登録商標）FAST Master Mix（2×）を使用してCorbett（登録商標）Rotor-Gene 6000（現在QIAGEN（登録商標）Rotor-Gene Q）RT-PCRによって達成した。KAPA（商標）SYBR（登録商標）FAST qPCR Master Mix（2×）Universal、抗体媒介ホットスタートを含有する使用準備済のカクテル、SYBR（登録商標）Green I 蛍光色素、MgCl₂、dNTPならびにqPCRにおけるDNAの増幅および検出のための安定剤（KAPABIOSYSTEMS）。PCRのために、10 μlのSYBR（登録商標）グリーン、0.4 μlのフォワードプライマー（10 μM）、0.4 μlのリバースプライマー（10 μM）、2 μlの鋳型および7.2 μlのH₂O RNaseフリーからなる20 μlの体積の反応混合物を、各々0.1 mlのPCRチューブに調製し、そのチューブをキャップで閉じた。PCRサイクルに先立って、5分間95℃の温度を保持し、サイクルステップを45回反復した。変性は、反応物を10秒間95℃の温度に加熱することからなった。そのステップの後、温度を30秒間60℃に低下させ、一本鎖DNA鋳型に対するプライマーのアニールングを可能にした。30秒間72℃に温度を増加させることによって伸長を得、サイクルステップを反復した。次いで全てのPCR産物を1×TBEアガロースゲル、1%PCR断片サイズに載せ、ゲルを抽出し、エチジウムブロマイド（3×10⁻³ mg/ml）で染色した。

20

【0399】

30

次いで標的DNA断片のゲル抽出をその後実施した。この場合、MACHEREY-NAGEL（登録商標）によるNucleoSpin（登録商標）8/96 Extract IIと組み合わせたQIAquick（登録商標）Gel Extraction Kitプロトコールに基づいた手順を使用してDNA断片を精製した。PCR DNA断片を抽出するために、QIAGEN（登録商標）の400 μlのQG可溶化緩衝液を96ウェルプレート中の各々のゲルバンドの部分に加えた。ゲルバンドを溶解するために、約15分間、ディープウェルプレートを温水浴（50～60℃）に入れた。溶液をNucleoSpin（登録商標）8/96 Extract IIフィルタープレート上にピペットで取る前に、溶液を注意深くボルテックスした。DNAバンドが400 bpより短かった場合、さらに100 μlのイソプロパノールを使用した。溶液を2回濾過した。このステップの後、カラムを650 μlの洗浄緩衝液NT3で2回洗浄し、次いでそれをRNaseフリー水によるDNA断片の溶出前に20分間真空下に置くことによって乾燥させた。そのために、NucleoSpin（登録商標）8/96 Extract IIフィルタープレートの下の回収容器を溶出プレート「U底」と置き換え、100 μlのRNaseフリー水をそれと接触させずに膜の中央に直接加えた。DNAの抽出を真空濾過の使用によって達成し、溶出液は最終的にシーケンシングのために使用できた。

40

【0400】

シーケンシングおよびデータ分析

精製したDNA断片をシーケンシングするために、8 μlの精製したPCR試料を、4 μlのH₂O RNaseフリーおよび1 μlのフォワードまたは1 μlのリバースプ

50

ライマー（10 μM）と混合した。PCR断片のシーケンシングを、Applied Biosystems（登録商標）ABI 3730x1 DNA分析器と組み合わせたSanger法により完了した。DNA配列の読み取りはプログラムに重要であり、トリムし、次いで参照、この場合、ヒト遺伝子の配列にアセンブルした。対応する遺伝子の配列は、EnsembleまたはSwiss-ProtゲノムデータベースブラウザからVector NTI（登録商標）内に直接コピーした。参照配列の使用により、完全長配列の識別が可能となった。

【0401】

カニクイザルNotch3配列。3つの天然SNPを位置：213S/N；719E/D；および2053V/Aにて識別した。

10

【化3-1】

MGPGARGRRRRRRPMSPPPPVRLPLLLLLAGPGAAPPCLDGSPCANGGRCTQLP
SREAACLCPPGWVGERCQLEDPCSHGPCAGRGVCQSSVAGTARFSCRCRGRFRGPD
CSLPDPCLSPPCAHSARCSVGPDRFLCSCPPGYQGRSCRSDVDECRVGEPCRHHGGTC
LNTPGSFRQCPCAGYTGPLCENPAVPCAPSPCRNGGTCTCRQSSGDLTYDCACLPGFEGQ
NCEVNVDDCPGHRCLNNGGTCVDGVNTYNCQCPPEWTGQFCTEDVDECQLQPNACH
NGGTCFNTLGGHSCVCVNGWTGESCSQNIDDCATAVCFHGATCHDRVASFYCACPM
GKTGLLCHLDDACVSNPCHEDAICDTNPVNGRAICTCPPGFTGGACDQDVDECSIGA
NPCEHLGRCVNTQGSFLCQCGRGYTGPRCETDVNECLSGPCRNQATCLDRIGQFTCIC
MAGFTGTGYCEVDIDECQSSPCVNGGICKDRVNGFSCTCPSGFSGSTCQLDVDECASTP
CRNGAKCVDQPDGYECRCAEGFEGMLCERNVDDCSPDPCHHGRCVDGIAFSFSCACA
PGYTGTRCESQVDECRSQPCRHHGGKCLDLVDKYLRCRPSGTTGVNCEVNIDDCASNP
CSFGVCRDGINRYDCVCQPGFTGPLCNVEINECASSPCGEGGSCVDGENGFRLCPPG
SLPPLCLPPSHPCAHEPCSHGICYDAPGGFRVCCEPGWSGPRCSQSLARDACESQPCR
AGGTCSSDGMGFHCTCPPGVQGRQCELLSPCTPNPCEHGGRCESAPGQLPVCSCPQG
WQGPRCQDQVDEACGAPACGPHGICTNLGSFSCTCHGGYTGPSCDQDINDCDPNPC
LNGGSCQDGVGSFSCSCLLGFAGPCARDVDECLSNPCGPGTCTDHVASFTCTCPPG
YGGFHCEQDLDCSPSSCFNGGTCVDGVNSFSCLCRPGYTGAHCQHEADPCLSRPCL
HGGVCSAAHPGFRCTCPQSFTGPQCQTLVDWCSRQPCQNGGRCVQTGAYCLCPPGW
SGRLCDIRSLPCREAAAQIGVRLEQLCQAGGQCVDDEDSSHVCVCEGRTGSHCEQEV
DPCLAQPCQHGGTCRGYMGGYMCECLPGYNGENCEDDVDECASQPCQHGGSCIDL
VARYLCSCPPGTLGVLCEINEDDCGPGPLDSGPRCLHNGTCVDLVGGFRCTCPPGYT
GLRCEADINECRSGACHAAHTRDCLQDPGGGFRCLCHAGFSGPRCQTVLSPCESQPC
QHGGQCRPSPGPGGGLTFTCHCAQPFWGP RCERVARSRELQCPVGVPCQQTTPRGPR
CACPPGLSGPSCRSFSGSPPGASNASCAAAPCLHGGSCRPAAPLAPFFRCACAQGTGP
RCEAPAAAPEVSEEP RCPRAACQAKRGDQRCDRECNSPGCGWDGGDCSLSVGDPWR
QCEALQCWRLFNNRCDPACSSPACLYDNFDCHAGGRERTCNPVYEKYPADHFADG
RCDQGCNTEECGWDGLDCASEVPALLARGVLVLTVLLPPEELLRSSADFLQRLSAILR
TSLRFR LDAHGQAMVFPYHRPSPGSEPRARRELAPEVIGSVVMLEIDNRLCLQSPEND
HCFPDAQSAADYLGALSAVERLDFPYPLRDVRGEPEPPEPSVPLLPLLVAGAVLLLV
ILVLGVMVARRKREHSTLWFPEGFS LHKDVAAGHKGRREPVGQDALGMKNMAKGE
SLMGEVATDWMDETCPEAKRLKVEELGMGAEEAVDCRQWTQHHLVAADIRVAPA
MALTPPQGDADADGMDVNVGRPDGFTPLMLASFCGGALEPMPTEEDEADDTASIIIS

20

30

40

【化 3 - 2】

DLICQGAQLGARTDRTGETALHLAARYARADAAKRLLDAGADTNAQDHSGRTPHHT
 AVTADAQGVFQILIRNRSTDLDARMADGSTALILAAARLAVEGMVEELIASHADVNAV
 DELGKSALHWAAAVNNVEATLALLKNGANKDMQDSKEETPLFLAAREGSYEAACL
 LLDHFANREITDHLDRLPDVAQERLHQDIVRLLDQPSGPRSPPGTHGLGPLLCPPGA
 FLPLGLKVVTQSGSKSRPPGKAGLGPQGPRGRGKKLTACPGPLADSSVTLSPVDSL
 DSPRPFGGPPASPGGFLEGPYAAATATAVSLAQLGGPGRAGLGRQPPGGCVLSLGLL
 NPVAVPLDWARLPPAPPGPSFLLPLAPGPQLLNPGTPVSPQERPPPYLAVPGHGEEYP
 AAGAHSSPPKARFLRVPSEHPYLTSPESPEHWASPSPPSLSDWSESTPSPATATGAMA
 TATGALPAQPLPLSVPSLAQAQTQLGPQPEVTPKRQVLA (配列番号:268).

10

【0402】

〔実施例 2〕

Notch3 抗体のスクリーニングおよびタンパク質／細胞結合の評価

ヒト Notch3 を認識する抗体を選択するために、ファージディスプレイライブラリーを用いたパニングにおいて、Notch3 受容体の重要な領域を表すいくつかの組換えタンパク質を使用した（図 1 における細胞外ドメイン構造の概略図を参照のこと）。Notch3 の NRR、EGF32-NRR およびリガンド結合（LBD）領域をパニングに使用した。加えて、外因性または内因性 Notch3 のいずれかを発現する細胞株を、以下に記載されるような全細胞パニングまたはディファレンシャル全細胞パニングのいずれかに使用した。ヒト Notch3 タンパク質に対する抗体を、抗体バリエーションタンパク質の供給源として市販のファージディスプレイライブラリー、Morphosys HuCAL PLATINUM（登録商標）ライブラリーを使用して、高い親和結合親和性を有するクローンを選択することによって生成した。組換えタンパク質（ヒト、マウス、カンクイザル）および Notch3 を発現する細胞の両方に対する Notch3 抗体の結合特性を図 3～6 に示す。

20

【0403】

細胞株

U2OS、MDA-MB-468、HCC1143 は ATCC から購入し、10% FBS および 1% ペニシリン-ストレプトマイシンを補足した増殖培地中に通常のように維持した。細胞株 TALL-1 は DSMZ から購入し、10% FBS および 1% ペニシリン-ストレプトマイシンを補足した増殖培地中に通常のように維持した。HLR PathDetect 細胞は Stratagene から購入し、製造業者の指示書に従って維持した。

30

【0404】

Notch3-NRR ドメインおよび Notch3-NRR-EGF ドメインについての発現ベクターの生成

40

ヒト Notch3 NRR ドメイン（アミノ酸 1378～1640）についてのコード配列を遺伝子合成し、マウス IgK シグナルペプチドおよび C 末端の 6 個のヒスチジン精製タグを含むように発現ベクター pRS5a の誘導体中にサブクローニングした。同様に、ヒト、カンクイザルおよびマウス EGF32-NRR 二重ドメイン（それぞれ、アミノ酸 1246-1640、1246-1640、1247-1641）を遺伝子合成し、マウス IgK シグナルペプチドおよび C 末端の 6 個のヒスチジン精製タグを含むように pRS5a 内にクローニングした。pRS5a は CMV プロモーターを含有し、HEK293 Freestyle 細胞（Invitrogen）の一過性トランスフェクションによるタンパク質の発現のために使用した。

【0405】

50

組換えNotch3タンパク質の発現／精製

Notch3タンパク質を発現するためのベクターを、1:3の比のDNA:PEITransfection試薬を使用してHEK293 Freestyle細胞内に一過性にトランスフェクトした。トランスフェクションの7日後、ヒスチジンタグ化タンパク質を精製するために、細胞上清をNickel-NTAカラム (Qiagen) に適用した。タンパク質をイミダゾールで溶出し、続いてPBS中のSuperdex 200 (GE) でのサイズ排除によってさらに精製してあらゆる凝集タンパク質を取り除いた。SDS-PAGEおよびHPLC-サイズ排除によってタンパク質を分析して純度および凝集状態を評価した。

【0406】

10

Notch3-LBDタンパク質

組換えヒトNotch3-Fc Chimera (受託番号Q9UM47、aa40-467) はR&D systems (#1559-NT-050) から購入した。組換えマウスNotch3-Fc Chimera (受託番号Q61982、aa40-468) はR&D systems (#1308-NT-050) から購入した。

【0407】

Notch3を過剰発現する細胞株の生成

Notch3を過剰発現する細胞株を生成するために、Notch3-GFP cDNAはOrigene (カタログ番号RG224711) から購入した。製造業者からの指示書に従ってNEONエレクトロポレーション機器 (Invitrogen) を使用してU2OS細胞を電気穿孔した。エレクトロポレーションパラメータは、1230Vパルス電圧、10msパルス幅、4パルスであった。100uLのNEONチップ (Invitrogen、カタログ番号MPK10096) を使用して、100万個のU2OS細胞を2μgのNotch3-GFP cDNAと混合した。エレクトロポレーションの24時間後、細胞を2週間選択 (200μg/mLにおいてG418) 下に置いた。Notch3-GFP陽性細胞は2つの集団: 高GFPおよび中間GFP陽性細胞に分類したFACSであった。各々の亜集団由来のクローン株を選択し、FACSによるNotch3細胞表面発現についてさらに試験した。

20

【0408】

HuCAL PLATINUM (登録商標) パニング

30

ヒトNotch3を認識する抗体を選択するために、複数のパニング戦略を利用した。ヒトNotch3タンパク質に対する治療抗体を、抗体バリエーションタンパク質の供給源として市販のファージディスプレイライブラリー、Morphosys HuCAL PLATINUM (登録商標) ライブラリーを使用して、高い親和結合親和性を有するクローンを選択することによって生成した。ファージミドリライブラリーはHuCAL (登録商標) コンセプト (Knappik et al., (2000) J Mol Biol 296: 57-86) に基づき、ファージ表面上にFabを表示するためのCys Display (登録商標) 技術 (Lohning、WO01/05950) を利用する。抗Notch3抗体を単離するために、固相、溶液、全細胞およびディファレンシャル全細胞パニングアプローチを使用して標準的なパニング戦略を実施した。

40

【0409】

固相パニング

抗原選択プロセスの前に、抗原のための最適なコーティング濃度を決定するためにコーティングチェックELISAを実施した。96ウェルMaxisorp™プレートの適切な数 (サブライブラリープールの数に依存する) のウェルを4℃にて一晩 (o/n)、300μlのNotch3抗原でコーティングした。各パニングのために、約 4×10^{13} 個のHuCAL PLATINUM (登録商標) ファージ抗体をPBS/0.05% Tween 20/5% 粉乳/5% BSAで遮断した。遮断手順の後、予め遮断したファージ混合物を、コーティングした各々の抗原に加え、ウェルを遮断し、マイクロタイタープレートシェーカー上で室温 (RT) にて2時間インキュベートした。その後、非特異的結合

50

ファージを数回の洗浄ステップによって洗い落とし、特異的に結合したファージを溶出するために、10 mM Tris/HCl pH 8 中の DTT を使用した。DTT 溶出物を 14 ml の大腸菌 (E.coli) TG1 に移し、その後、大腸菌 (E.coli) TG1 と DTT 溶出物の混合物をファージ感染のために水浴中で 37 °C にて 45 分間インキュベートした。細菌ペレットを 2 x YT 培地中に再懸濁し、LB/Cam 寒天プレート上に置き、30 °C にて o/n、インキュベートした。コロニーをプレートからこすり取り、ファージレスキュー、選択したクローンのポリクローナル増幅およびファージ産生のために使用した。精製したファージを用いて、次のパニングラウンドを開始した。

【0410】

第2および第3ラウンドの固相パニングを、減少した量の抗原およびよりストリンジェントな洗浄条件を除いて、第1ラウンドのプロトコールに従って実施した。

10

【0411】

ストレプトアビジン結合電磁ビーズを用いた溶液パニングプロトコール

溶液パニングのための必須条件は抗原のビオチン化およびビオチン化抗原の保持活性の確認であった。溶液パニングの間、Fab を表示するファージおよびビオチン化抗原を、ファージによる抗原の接近性を促進する溶液中でインキュベートした。

【0412】

ファージプールごとに、ストレプトアビジンビーズ (Dynabeads (登録商標) M-280 ストレプトアビジン; Invitrogen) および各パニングのために、HuCAL PLATINUM (登録商標) ファージ抗体を Chemiblocker で遮断し、次いで 100 nM ビオチン化 Notch3 抗原をファージ粒子に加え、ローター上で RT にて 1~2 時間インキュベートした。2 mg の遮断したストレプトアビジンビーズを使用してファージ-抗原複合体を捕捉し、ストレプトアビジンビーズに結合したファージ粒子を磁性分離器で回収した。非特異的結合ファージを、PBS/0.05% Tween 20 および PBS を使用した数回の洗浄ステップによって洗い落とした。特異的に結合したファージをストレプトアビジンビーズから溶出するために、DTT を使用した。次いで DTT 溶出物を大腸菌 (E.coli) TG1 に移し、TG1 と DTT 溶出物の混合物をファージ感染のために水浴中で 37 °C にて 45 分間インキュベートした。細菌ペレットを 2 x YT 培地中に再懸濁し、LB/Cam 寒天プレート上に置き、30 °C にて o/n、インキュベートした。コロニーをプレートからこすり取り、ファージレスキュー、選択したコロニーのポリクローナル増幅およびファージ産生のために使用した。精製したファージを用いて、次のパニングラウンドを開始した。

20

30

【0413】

第2および第3ラウンドの溶液パニングを、減少した量の抗原およびよりストリンジェントな洗浄条件を除いて、第1ラウンドのプロトコールに従って実施した。

【0414】

Notch3 に対する全細胞パニング

各パニングのために、約 4×10^{13} 個の HuCAL PLATINUM (登録商標) ファージ抗原を PBS/5% FCS 中で遮断した。並行して、ファージプールごとに、Notch3 抗原を発現する $0.5 \sim 1.0 \times 10^7$ 個の標的細胞および (適用される場合) Notch3 を発現しない $0.5 \sim 1.0 \times 10^7$ 個の吸着細胞を氷上で遮断するために 1 ml の PBS/5% FCS 中に再懸濁した。遮断した標的細胞を沈降させ、予め遮断したファージ粒子中に再懸濁し、回転子上で 4 °C にて 2 時間インキュベートした。ファージ-細胞複合体を PBS/5% FCS 中で 3 回洗浄した。特異的に結合したファージの標的細胞からの溶出を、0.1 M グリシン-HCl/0.5 M NaCl、pH 2.2 を用いた 10 分の酸性溶出により実施した。遠心分離後、2 M の緩衝化されていない Tris を加えることによって上清 (溶出物) を中和した。最終上清を大腸菌 (E.coli) TG1 培養物のファージ感染のために使用した。細菌ペレットを 2 x YT 培地中に再懸濁し、LB/Cam 寒天プレート上に置き、30 °C にて o/n、インキュベートした。コロニーをプレートからこすり取り、ファージレスキューおよびファージ増幅のために使用した。増幅

40

50

したファージを次のパニングラウンドのために使用した。

【0415】

第2および第3ラウンドの全細胞パニングを第1ラウンドのプロトコールに従って実施した。

【0416】

N o t c h 3 に対するディファレンシャル全細胞パニング

ディファレンシャル全細胞パニングにおいて、細胞および精製タンパク質に対して交互に選択を行った。精製抗原についての選択ラウンドを、固相パニングに記載されるように実施した。細胞についての選択ラウンドに関しては、全細胞パニングについての手順を参照のこと。全細胞パニングと対照的に、後の吸着はD W C Pにおいて省略されてもよい。

10

【0417】

成熟パニング

選択した抗体断片の親和性および生物活性を増加させるために、フレームワーク領域を一定に維持しながら、L - C D R 3 および H - C D R 2 領域を、トリヌクレオチド定方向突然変異誘発 (Virnekas et al., (1994) Nucleic Acids Res. 22:5600-5607) を使用したカセット突然変異誘発によって並行して最適化した。親和性成熟についてクローニングする前に、親 F a b 断片を、対応する発現ベクターからディスプレイベクター内にサブクローニングした。

【0418】

親和性を改善した結合剤を選択するために、成熟ライブラリーに由来するファージを、N o t c h 3 抗原 (h N 3 _ _ E G F 4 - 1 1 _ _ F c、h N 3 _ _ E G F 4 - 1 1 _ _ F c _ _ b i o t、h N 3 _ _ E G F 3 2 _ _ N R R _ _ H i s および h N 3 _ _ N R R _ _ H i s _ _ b i o t) を使用した3ラウンドの固相、溶液またはディファレンシャル全細胞パニングに供した。各パニングラウンドにおいて抗原濃度を低下させることによってストリンジェンシーを増加させた (Low et al., (1996) J Mol Biol 260: 359-368)。抗原減少に加えて、オフレート選択 (off-rate selection) (Hawkins et al., (1992) J Mol Biol 226: 889-896) を実施した。これを 22℃ の長時間の洗浄ステップと組み合わせた。

20

【0419】

選択した F a b 断片のサブクローニングおよび微小発現

可溶性 F a b の迅速な発現を促進するために、選択した H u C A L P L A T I N U M (登録商標) ファージの F a b コード挿入物を、p M O R P H (登録商標) 30 ディスプレイベクターから p M O R P H (登録商標) x 1 1 発現ベクター p M O R P H (登録商標) x 1 1 _ _ F H 内にサブクローニングした。

30

【0420】

E c o R I / X b a I / B m t I による3重消化によってサブクローニングを実施した。大腸菌 (E.coli) の形質転換後、T G 1 - F 単クローン発現および H u C A L (登録商標) - F a b 断片を含有するペリプラズム抽出物の調製を以前に記載されたように実施した (Rauchenberger et al., (2003) J Biol Chem. 278:38194-38205)。

【0421】

E L I S A スクリーニングのための F a b 含有細菌溶解物の調製

40

5 μ l の各々の o / n 培養物を、1つのウェルにつき 40 μ l の 2 x Y T 培地 (34 μ g / m l のクロラムフェニコール (C a m) ; 0.1% グルコース) を予め充填した滅菌 384 ウェルマイクロタイタープレートに移した。培養物がわずかに混濁するまで、プレートを 37℃ にてインキュベートした。これらの発現プレートに、1つのウェルにつき 10 μ l の 2 x Y T 培地 (34 μ g / m l の C a m および 5 m M の I P T G) を加えた。プレートをガス透過性テープで密封し、22℃ にて o / n インキュベートした。発現プレートの各ウェルに、15 μ l の B E L 緩衝液 (2.5 m g / m l のリゾチーム、4 m M の E D T A、10 U / μ l のベンゾナーゼ) を加え、プレートを 22℃ にて1時間インキュベートした。後の E L I S A のために、F a b を含有する大腸菌 (E.coli) 溶解物のスクリーニングを、15 μ l の 12.5% M P B S T を各ウェルに加え、400 r p m および 2

50

2℃にて少なくとも30分間プレートを振盪することによって遮断した。発現プレートを即座に使用したか、または-20℃にて保存した。

【0422】

FACSスクリーニングのためのFab含有細菌溶解物の調製

5μlの各々のo/n培養物を、1つのウェルにつき100μlの2xYT培地(34μg/mlのCam; 0.1%のグルコース)を予め充填した滅菌96ウェルマイクロタイタープレートに移した。培養物がわずかに混濁するまでプレートを22℃にてインキュベートした。これらの発現プレートに、1つのウェルにつき20μlの2xYT培地(34μg/mlのCam; 3mMのIPTG)を加えた。プレートをガス透過性テープで密封し、22℃にてo/nインキュベートした。発現プレートの各ウェルに、15μlのBEL緩衝液(2.5mg/mlのリゾチーム、4mMのEDTA、10U/μlのベンザナーゼ)を加え、プレートを22℃にて1時間インキュベートした。後のFACSのために、Fabを含有する大腸菌(E.coli)溶解物のスクリーニングを、15μlの16%FBSを各ウェルに加え、400rpmおよび22℃にて少なくとも30分間プレートを振盪することによって遮断した。インキュベーション後、BEL溶解物を遠心分離して細菌細胞残屑を沈降させた。Fab含有上清をスクリーニング目的のために即座に使用したか、または-20℃にて保存した。

10

【0423】

直接コーティングした抗原についてのELISAスクリーニング

Maxisorp(商標)384ウェルプレートを、PBS中で、2.5μg/ml、5μg/mlまたは1.25μg/mlの濃度にてそれぞれNotch3抗原hN3__NRR__His、hN3__EGF32__NRR__HisおよびhN3__EGF4-11__Fcでコーティングした。PBS中の5%脱脂粉乳でプレートを遮断した後、Fab含有大腸菌(E.coli)溶解物を加えた。Fabの結合を、Attophos蛍光体(Roche、#11681982001)を使用してアルカリ性リン酸塩(Jackson Immuno Research#109-055-097; 1:5000希釈)にコンジュゲートしたF(ab)2特異的ヤギ抗ヒトIgGにより検出した。535nmにおける蛍光発光を430nmにおける励起で記録した。

20

【0424】

ビオチン化抗原のELISAスクリーニング

NeutrAvidin(商標)コーティングプレートを、PBS中で希釈した2.5~5μg/mlのhN3__NRR__His、5~10μg/mlのhN3__EGF32__NRR__Hisビオチン化Notch3抗原または1.25μg/mlのhN3__EGF4-11__Fc抗原のいずれかでコーティングした。PBS中の3%ウシ血清アルブミンで遮断した後、Fab含有大腸菌(E.coli)溶解物を加えた。その後、捕捉したHuCAL(登録商標)-Fab断片を、Attophos蛍光体(Roche、#11681982001)を使用してアルカリ性ホスファターゼ(Jackson Immuno Research#109-055-097; 1:5000希釈)にコンジュゲートしたF(ab)2特異的ヤギ抗ヒトIgGにより検出した。535nmにおける蛍光発光を430nmにおける励起で記録した。

30

40

【0425】

FACSスクリーニング

FACSスクリーニングにおいて、細胞表面に発現した抗原に結合している単一のFabクローンをパニング出力から識別した。Fab含有粗製大腸菌(E.coli)溶解物を使用してFabを試験した。使用した細胞株はU2OS細胞(ATCC#HTB-96; 非修飾細胞=U2OS__parまたはヒトNotch3を高度に発現するように遺伝子組換えされた=U2OS__N3のいずれか)およびNotch3遺伝子の増幅を維持する乳癌細胞株HCC1143(ATCC#CRL-2321)であった。

【0426】

100μlの細胞懸濁液を新鮮な96ウェルプレート内に移した(1×10⁵個の細胞

50

／ウェルを生じた)。標的細胞懸濁液を含有するプレートを経心分離し、上清を捨てた。残っている細胞ペレットを再懸濁し、50 μ l の F a b 含有 F A C S B E L 抽出物を対応するウェルに加えた。プレートを氷上で1時間インキュベートした。インキュベーション後、細胞を沈降させ、200 μ l の F A C S 緩衝液 (P B S、3 % F C S) で3回洗浄した。各洗浄ステップの後、細胞を経心分離し、注意深く再懸濁した。

【0427】

P E がコンジュゲートしたヤギ抗ヒト I g G 二次検出抗体 (J a c k s o n、カタログ番号109-116-098) を加え、試料を氷上でインキュベートし、その後、F a b インキュベーションに応じて洗浄した。

【0428】

最後に、細胞ペレットを1つのウェルにつき150 μ l の F A C S 緩衝液中に再懸濁し、試料を B D F A C S アレイにおいて分析した。

【0429】

親和性成熟後のスクリーニング

(Haenel et al., (2005) Anal Biochem. 339:182-184) に記載されている原理に基づいて溶液平衡滴定によって成熟した結合剤をランク付けするために、一定量の希釈した B E L 抽出物を異なる濃度の抗原で一晩平衡化した。

【0430】

次いで混合物を、以前に抗原でコーティングした M S D プレートに移し、インキュベーションおよび洗浄後、適切な M S D -スルホタグ標識化検出抗体を加えた。

【0431】

その後、未結合の F a b の濃度を、S e c t o r I m a g e r 6 0 0 0 (M e s o S c a l e D i s c o v e r y、ゲイザースバーグ、MD、USA) を使用して E C L 検出により定量した。

【0432】

X L f i t (I D B S) ソフトウェアを使用し、親和性を推定し、それによって成熟により最も改善されたクローンを識別するために対応するフィットモデルを適用して、結果を処理した。

【0433】

大腸菌 (E.coli) (m g スケール) 中の H i s タグ化 H u C A L (登録商標) F a b 断片の発現および精製

大腸菌 (E.coli) T G 1 F 細胞中の p M O R P H (登録商標) x 1 1 _ F a b _ F H によりコードされた F a b 断片の発現を、0.1 % のグルコースおよび 3 4 μ g / m l のクロラムフェニコールを補足した 5 0 0 m l の 2 x Y T 培地を使用して振盪フラスコ培養物中で実施した。O D 6 0 0 が 0.5 の値に到達するまで培養物を 3 0 $^{\circ}$ C にて振盪した。F a b 発現を、0.7 5 m M の最終濃度で I P T G (イソプロピルー β -D-チオガラクトピラノシド) を加え、3 0 $^{\circ}$ C にてさらに 2 0 時間培養することにより誘導した。細胞を収集し、リゾチームを使用して破壊した。H i s 6 タグ付き F a b 断片を I M A C (B i o -R a d、ドイツ) により単離し、イミダゾールを使用して溶出した。1 x ダルベッコ P B S (p H 7.2) への緩衝液の交換を、P D 1 0 カラム (G E H e a l t h c a r e、ドイツ) を使用して実施した。試料を濾過滅菌した (0.2 μ m)。タンパク質濃度を U V 分光光度法によって判定した。1 5 % S D S -P A G E を変性させ、還元させる際に試料の純度を分析した。校正基準を用いたサイズ排除クロマトグラフィー (H P -S E C) により天然状態において F a b 調製物の均一性を判定した。

【0434】

I g G への変換

完全長 I g G を発現するために、重鎖 (V H) および軽鎖 (V L) の可変ドメイン断片を F a b 発現ベクターから、ヒト I g G 1 f についての適切な p M o r p h 4 (登録商標) _ h I g G 1 f ベクター内にサブクローニングした。

【0435】

10

20

30

40

50

I g Gスクリーニングスケールにおけるヒト I g Gの一過性発現

真核性H E K 2 9 3 c 1 8細胞 (A T C C # C R L - 1 0 8 5 2) を、特異性および／または機能的スクリーニングアッセイにおいて後で使用するために完全長 I g G を含有する馴化細胞培養物上清を生成するために96ウェル発現系において使用した。

【0436】

H u C A L (登録商標) F a b断片を、p M O R P H (登録商標) 発現またはディスプレイベクターからp M O R P H (登録商標) 4 I g 発現ベクター内にサブクローニングした。生じたライゲーションを大腸菌 (E.coli) X L 1 B l u e の形質転換のために使用し、続いて100 μ g / m l のアンピシリンおよび1 % のグルコースを含有するL Bプレート上に試料を播種した。

10

【0437】

単一コロニーのD N A調製物を、B i o R o b o t (登録商標) 8000デバイスと組み合わせた適切なD N A調製物キットを使用することによって調製した。個々のD N A濃度をU V分光光度法によって判定した。

【0438】

真核性H E K 2 9 3 c 1 8細胞を、前日に約 4×10^4 個の細胞 / 50 μ l / ウェルの密度で96ウェル平底プレート中に播種し、これに等量のI g 発現ベクターD N Aをトランスフェクトした。37 $^{\circ}$ Cおよび6 % C O ₂ にて40 ~ 50時間インキュベーションした後、培養物上清を96ウェルU底プレートに移し、遠心分離によって清澄した。生じたI g上清を、既知の標準物を参照してI g濃度を算出するために抗F d捕捉E L I S Aによって試験し、特異性および／または機能的スクリーニングアッセイにおいて後で使用するために-20 $^{\circ}$ Cに保存した。

20

【0439】

直接コーティングした抗原上での精製したI g GによるE L I S A

M a x i s o r p (商標) 384ウェルプレートを、P B S中のN o t c h 3抗原h N 3 _ N R R _ H i s (2.5 μ g / m l)、N 3 _ E G F 3 2 _ N R R _ H i s (ヒト、カニクイザルおよびマウスについて5 μ g / m l) およびN 3 _ E G F 4 - 1 1 _ F c (h u 1.25 μ g / m l ; カニクイザルおよびマウス : 5 μ g / m l) でコーティングした。P B S中の5 % 脱脂粉乳でプレートを遮断した後、試験的スケール発現からのI g Gを加えた (E L I S A E C 5 0判定について、1 : 3希釈ステップにおいて50 μ g / m l (333.3 nM) から減少させた12点滴定を実施した)。I g Gの結合を、A t t o p h o s 蛍光体 (R o c h e、# 1 1 6 8 1 9 8 2 0 0 1) を使用してアルカリ性ホスファターゼ (J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h # 1 0 9 - 0 5 5 - 0 9 7 ; 1 : 5 0 0 0希釈) にコンジュゲートしたF (a b) 2特異的ヤギ抗ヒトI g Gにより検出した。535 nmにおける蛍光発光を430 nmにおける励起で記録した。

30

【0440】

試験的スケールI g GによるF A C Sスクリーニング

F A C Sスクリーニングにおいて、細胞表面に発現した抗原に結合している試験的スケール発現からのI g Gを識別した。使用した細胞株は、U 2 O S細胞 (A T C C # H T B - 9 6 ; 非修飾細胞 = U 2 O S _ p a rまたはヒトN o t c h 3を高度に発現するように遺伝子組換えされた = U 2 O S _ N 3のいずれか) およびN o t c h 3遺伝子の増幅を維持する乳癌細胞株H C C 1 1 4 3 (A T C C # C R L - 2 3 2 1) であった。

40

【0441】

100 μ lの細胞懸濁液を新鮮な96ウェルプレート内に移した (1×10^5 個の細胞 / ウェルを生じた)。標的細胞懸濁液を含有するプレートを遠心分離し、上清を捨てた。残っている細胞ペレットを再懸濁し、50 μ lのI g G希釈物に対応するウェルに加えた。F A C S E C ₅₀判定を、1 : 5希釈ステップにおいて20 μ g / m lから減少させて実施した。プレートを氷上で1時間インキュベートした。インキュベーション後、細胞を沈降させ、200 μ lのF A C S緩衝液 (P B S、3 % F C S) で3回洗浄した。各洗浄ステップの後、細胞を遠心分離し、注意深く再懸濁した。P Eがコンジュゲートしたヤ

50

ギ抗ヒト IgG 二次検出抗体 (Jackson、カタログ番号 109-116-098) を加え、試料を氷上でインキュベートし、その後、Fab インキュベーションに応じて洗浄した。最後に、細胞ペレットを 1 つのウェルにつき 150 μ l の FACS 緩衝液中に再懸濁し、試料を BD FACS アレイにおいて分析した。

【0442】

Notch3 抗体を発現する安定な細胞株を生成するための発現ベクター

Notch3 抗体のより大きなスケールの発現のために、軽鎖および重鎖コード配列を、ファージベクターから、安定な細胞株を生成するための単一の二重 CMV プロモータープラスミドを含有するマウス IgK シグナルペプチド内にクローニングした。細胞を Notch3 抗体の高レベル発現のために ELISA によりスクリーニングした。

10

【0443】

Biacore Kd 判定

動態パラメータを判定することによって親和性判定を、以下に記載されるように Biacore 3000 機器 (Biacore、GE Healthcare) を使用して SPR により実施した。

【0444】

直接コーティングした抗原での Biacore 判定。固定化抗原への結合を以下のように分析した。製造業者のプロトコールに従って抗原をチップ表面上に固定した。6 つの異なる Fab 濃度 (2 倍連続希釈) を使用して動態測定を行った。各サイクルの後、センサーチップを再生した。ランニング緩衝液のブランク注入を二重参照のために使用した。BIA 評価ソフトウェア 4.1.1 (Biacore、GE Healthcare) を使用して全てのセンサーグラムを適合して、 k_{on} および k_{off} 速度定数を判定し、それらを、KD を算出するために使用した。

20

【0445】

あるいは、定性的結合実験のために、IgG 試料を試料として使用した。IgG 試料の相対比較のために Fab 断片に関して同じモデルを使用して結合曲線を適合した。

【0446】

10 μ g/mL に 10 mM 酢酸塩緩衝液、pH 4.5 中で希釈した約 100 RU hN3__NRR__His (または 400 RU hN3__EGF32__NRR__His) を、標準的な EDC-NHS アミンカップリング化学作用を使用して CM5 チップ (Biacore、GE Healthcare) 上に固定した。参照フローセル 1 のみを活性化および非活性化させた。ランニング緩衝液は、25 μ l/分の流量で 0.005% (v/v) Tween 20 を有する PBS (GIBCO) pH 7.2 であった。15.6 ~ 500 nM の範囲の Fab 濃度を 120 秒の注入時間および例えば 240 秒の適切な解離時間で使用した。グリシン/HCl pH 2.5 (20 秒) の 1 回の注入およびグリシン/HCl pH 2 (20 秒) の 1 回の注入を用いて、結合した検体の再生を行った。「グローバル (global)」に設定したパラメータ Rmax および 0 に設定した RI を用いて適合を実施した。

30

【0447】

抗体捕捉設定による Biacore KD 判定。捕捉抗体への単量体抗原の結合を以下のように分析した。CM5 チップ (Biacore、GE Healthcare) 上に、適切な捕捉抗体 (Biacore、GE Healthcare) を、EDC/NHS 化学作用を使用して共有結合により固定した。抗体を捕捉し、その後、6 つの異なる抗原濃度 (2 倍連続希釈) を注入することによって動態測定を行った。各サイクルの後、センサーチップを再生した。ランニング緩衝液のブランク注入を二重参照のために使用した。BIA 評価ソフトウェア 4.1.1 (Biacore、GE Healthcare) を使用して全てのセンサーグラムを適合して、 k_{on} および k_{off} 速度定数を判定し、それらを、KD を算出するために使用した。

40

【0448】

ランニング緩衝液は、0.05% Tween 20 を有する PBS (GIBCO) pH 7

50

． 2であった。抗ヒトFc抗体（Biacore、GE Healthcare）を使用して100RUのIgGを捕捉した。例えば15．6～500nMの範囲の抗原濃度（hN3__NRR__HisまたはhN3__EGF32__NRR__His）を、30μl／分の流量、180秒の注入時間および例えば360秒の適切な解離時間で使用した。抗体／抗原複合体の再生を30秒にて3MのMgCl₂の2回の注入により行った。「グローバル」に設定したパラメータRmaxおよび0に設定したRIを用いて適合を実施した。

【0449】

抗原捕捉によるBiacore K_D判定に関して。捕捉抗原へのFabの結合を以下のように分析した。CM5チップ（Biacore、GE Healthcare）上に、適切な抗-抗原タグ捕捉抗体を、EDC／NHS化学作用を使用して共有結合により固定した。抗原を捕捉し、その後、6つの異なるFab濃度（2n連続希釈）の注入により動態測定を行った。各サイクルの後、センサーチップを再生した。ランニング緩衝液のブランク注入を二重参照のために使用した。全てのセンサーグラムを、BIA評価ソフトウェア4．1．1（Biacore、GE Healthcare）を使用して適合して、konおよびkoff速度定数を判定し、それらを、K_Dを算出するために使用した。

【0450】

ランニング緩衝液は0．05%Tween20を有するPBS（GIBCO）pH7．2であった。約75RUの抗原（例えば、hN3__EGF4-11__Fc、50nM）を、抗ヒトFc抗体（Biacore、GE Healthcare）を使用して捕捉した。例えば、15．6～500nMの範囲の抗体Fab断片濃度を、30μl／分の流量、180秒の注入時間および適切な解離時間（例えば最大1800秒）で使用した。抗体／抗原複合体の再生を、35秒にて3M MgCl₂の2回の注入により行った。「グローバル」に設定したパラメータRmaxおよび0に設定したRIを用いて適合を実施した。

【0451】

Sector Imager 6000（MSD）を使用したKD判定のための溶液平衡滴定（SET）法

溶液中の親和性判定を基本的に文献（Friquet et al., (1985) J Immunol Methods 77: 305-319）に記載されているように実施した。SET法の感度および精度を改善するために、それを古典的ELISAからECLベースの技術（Haenel et al., (2005) Anal Biochem 339: 182-184）に移した。

【0452】

1mg／mlのヤギ抗ヒト（Fab）2断片特異的抗体（DianovaまたはBethyl）を、製造業者の指示書に従ってMSDスルホ-TAGTM NHS-Ester（Meso Scale Discovery、ゲイザースバーグ、MD、USA）で標識した。マウス抗体のK_D判定のために、対応する抗マウスIgGを標識し、検出試薬として使用した。

【0453】

この実験は、アッセイ緩衝液として0．5%BSAおよび0．02%Tween-20を含有するポリプロピレンマイクロタイタープレートおよびPBS pH7．4中で実施した。未標識の抗原を、予想されるKDより少なくとも10倍高い濃度で開始して、2倍連続で希釈した。抗原を含まないウェルを使用してBmax値を判定し、アッセイ緩衝液のみを含有するウェルを使用してバックグラウンドを判定した。適切な量の結合剤（予想されるK_Dと同等またはそれ未満の抗体濃度、60μlの最終体積）を添加した後、混合物を室温にて一晩インキュベートした。

【0454】

MSDプレートを抗原（30μl／ウェル）でコーティングした。0．02%Tween-20を有するPBSでプレートを洗浄した後、平衡化した試料をこれらのプレート（30μl／ウェル）に移し、20分間インキュベートした。洗浄後、30μl／ウェルのMSD-スルホタグで標識した検出抗体（抗ヒト（Fab）2、最終希釈は典型的に1：2,000）をMSDプレートに加え、Eppendorfシェーカー（700rpm

）で室温にて30分間インキュベートした。

【0455】

MSDプレートを洗浄し、界面活性剤を有する30μl／ウェルのMSDリード緩衝液Tを加えた後、Sector Imager 6000 (Meso Scale Discovery、ゲイザースバーグ、MD、USA)を使用して電気化学発光シグナルを検出した。

【0456】

カスタマイズされた適合モデルを適用しているXLfit (IDBS)ソフトウェアを用いてデータを評価した。Fab分子のKD判定のために、(Abraham et al., (1996) J Mol Recognit. 9, 456-461)に従って改変された、(Haenel et al., (2005) Anal Biochem 339: 182-184)に従って以下の適合モデルを使用した：

【0457】

【数1】

$$y = B_{\max} - \left(\frac{B_{\max}}{2[Fab]_t} \left([Fab]_t + x + K_D - \sqrt{([Fab]_t + x + K_D)^2 - 4x[Fab]_t} \right) \right)$$

[Fab]_t：適用された全Fab濃度

x：適用された全可溶性抗原濃度（結合部位）

Bmax：抗原を有しないFabの最大シグナル

KD：親和性

【0458】

IgG分子のKD判定のために、IgGについて以下の適合モデルを使用した (Piehler et al., (1997) J Immunol Methods 201: 189-206)に従って改変した：

【0459】

【数2】

$$y = \frac{2B_{\max}}{[IgG]} \left(\frac{[IgG]}{2} - \frac{\left(\frac{x + [IgG] + K_D}{2} - \sqrt{\left(\frac{x + [IgG] + K_D}{4} \right)^2 - x[IgG]} \right)^2}{2[IgG]} \right)$$

[IgG]：適用された全IgG濃度

x：適用された全可溶性抗原濃度（結合部位）

Bmax：抗原を有しないIgGの最大シグナル

KD：親和性

【0460】

実験設定：

HuCAL（登録商標）__Fab（またはIgG）のKD判定を基本的に以下のように実施した：抗原hN3__EGF4-11__Fcを標準的なMSDプレート上で4℃にてo／n、PBS中で0.2μg／mLにてコーティングした（または試料の特異性に依じて1μg／mLにてhN3__NRR__His）。続いて、MSDプレートを、室温にて1時間、3%BSAを含有するPBSで遮断した。単量体抗原（hN3__NRR__His）が、IgG試料を滴定するために使用されなければならない、Fab断片のKD判定のために、hN3__NRR__HisおよびhN3__EGF4-11__Fcの両方が使用できた。

【0461】

パニング戦略およびスクリーニングの概要

組換えNotch3抗原およびNotch3発現細胞株を単独または組合せのいずれかで使用して11の初期のパニング戦略を実施した。パニング出力を抗原結合および機能活

10

20

30

40

50

性についてスクリーニングした。3771個の最初のヒットはN o t c h 3組換え抗原に結合し、774個はN o t c h 3を発現する細胞で陽性であり、295個の特有のクローンを生じたことが示された。完全な抗体特徴付けを55個のI g Gで実施し、12個の候補を親和性成熟のために選択した(N o t c h 3 N R Rドメインに結合する5個のクローンおよびN o t c h 3 L B Dドメインに結合する7個のクローンを含む)。親和性成熟後のS E Tスクリーニングにより、315個の改善された特有のクローン(9個のファミリー)が生じた。I g Gを発現した111μスケールを抗原結合および機能性についてスクリーニングした。31/111個のI g G(8個の異なるH C D R 3ファミリー由来)をさらに特徴付けし、4個の異なるH C D R 3ファミリーに属する9個の優先的なクローンが生じた。

10

【0462】

〔実施例3〕

リガンド駆動レポーター遺伝子アッセイにおけるN o t c h 3抗体の特徴付け

1つの細胞においてN o t c h受容体が隣接細胞におけるリガンドと相互作用する場合、標準的なN o t c hシグナル伝達が活性化する。哺乳動物において、5つの膜貫通型リガンド、3つのD e l t a様リガンド(D L L 1、D L L 4およびD L L 3)および2つのJ a g g e dリガンド(J a g 1、J a g 2)が存在する。N o t c h 3リガンド誘発シグナル伝達を阻害する抗N o t c h 3抗体の能力を判定するために、二重安定レポーター細胞株H L R-h u N o t c h 3-G a l 4-N L S-V P 1 6/G a l 4-U Aールシフェラーゼを使用したレポーター遺伝子アッセイ(R G A)を開発した。このアッセイを使用して、J a g 1またはD L L 1のいずれかによって活性化されるN o t c h 3シグナル伝達の阻害を試験した。同様のアッセイをヒトN o t c h 1およびN o t c h 2受容体について開発した。この一連のN o t c h受容体特異的R G AアッセイにおけるN o t c h 3抗体の試験により、N o t c h 3の阻害について抗体の特異性評価が可能となった。

20

【0463】

N o t c h 3リガンド誘導シグナル伝達を阻害する抗N o t c h 3抗体の能力を判定するために、二重安定レポーター細胞株H L R-h u N o t c h 3-G a l 4-N L S-V P 1 6/G a l 4-U Aールシフェラーゼを使用したレポーター遺伝子アッセイ(R G A)を開発した。

30

【0464】

ヒトN o t c h 3-G a l 4-N L S-V P 1 6/G a l 4-U Aールシフェラーゼを発現する細胞株の生成

ヒトN o t c h 1、N o t c h 2およびN o t c h 3ならびにカニクイザルN o t c h 3細胞外および膜貫通部分、続いてG a l 4 DNA結合ドメイン、V P 1 6および核局在配列(N L S)をレトロウイルスベクターp L N C X 2(C l o n t e c h、カタログ番号631503)内にクローニングした。これらのキメラN o t c h受容体および対応するレポーター遺伝子アッセイの生成により、N o t c h受容体特異的シグナル伝達のN o t c h 3抗体の効果の試験が可能となった。

【0465】

N o t c h 1-、N o t c h 2-、およびN o t c h 3-G a l 4-V P 1 6についての発現ベクター

40

G a l 4-V P 1 6についてのコード配列を遺伝子合成し、ベクターp L N X C 2(C l o n t e c h)のS a l I-C l a I部位内にクローニングしてp L N X C 2-G a l 4-V P 1 6を作製した。カニクイザルN o t c h 3(アミノ酸1~1669)、ヒトN o t c h 1(アミノ酸1~1762)およびヒトN o t c h 2(1~1704)の細胞外(E C D)および膜貫通ドメインを遺伝子合成し、p L N X C 2-G a l 4-V P 1 6のH i n d I I I-S a l I部位内にクローニングして、それぞれのN o t c hタンパク質とG a l 4-V P 1 6との融合物を産生した。

【0466】

50

N o t c h - G a l 4 - V P 1 6 発現系の構築

ヒト N o t c h 3 - G a l 4 - V P 1 6

【化 4 - 1】

MGPGARGRRRRRPMSPPPPPPVRLPLLLLLAGPGAAAPPCLDGSPCANGGRCTQ
LPSREAACLCPPGWVGERCQLEDPCSHGPCAGRGVCQSSVVAGTARFSCRCPRGFRG
PDCSLPDPCLSSPCA HGARCSVGP DGRFLCSCPPGYQGRSCRSDVDECRVGEPCRHHG
TCLNTPGSFRCQCPAGYTGPLCENPAVPCAPSPCRNNGGTCRQSGDLTYDCACLPGFEG
QNCEVNVDDCPGHRCLNNGGTCVDGVNTYNCQCPPEWTGQFCTEDVDECQLQPNAC
HNGGTCFNTLGGHSCVCVNGWTGESCSQNIDDCATAVCFHGATCHDRVASFYCACP
MGKTGLLCHLDDACVSNPCHEDAICDTNPVNGRAICTCPPGFTGGACDQDVDECSIG
ANPCEHLGRCVNTQGSFLCQCGRGYTGPRCETDVNECLSGPCR NQATCLDRIGQFTCI
CMAGFTGTyceVDIDECQSSPCVNGGVCKDRVNGFSCTCPSGFSGSTCQLDVDECAS
TPCRNGAKCVDQPDGYECRAEGFEGTLCDRNVDDCSPDPCHHGRCVDGIAFSFAC
APGYTGTRCESQVDECRSQPCRHHGKCLDLVDKYLRCRPSGTTGVNCEVNIDDCASN
PCTFGVCRDGINRYDCVCQPGFTGPLCNVEINECASSPCGEGGSCVDGENGFRCLCPP
GSLPPLCLPPSHPCAHEPCSHGICYDAPGGFRCVCEPGWSGPRCSQSLARDACESQPC

10

【化 4 - 2】

RAGGTCSSDGMGFHCTCPPGVQGRQCELLSPCTPNPCEHGGRCESAPGQLPVCSCPQ
GWQGPRCQQDVDECAGPAPCGPHGICTNLAGSFSCCTCHGGYTGPSCDQDINDCDPNP
CLNGGSCQDGVGSFSCSCLPGFAGPRCARDVDECLSNPCGPGTCTDHVASFTCTCPPG
YGGFHCEQDLDCSPSSCFNGGTCVDGVNSFSCLCRPGYTGAHCQHEADPCLSRPCL
HGGVCSAAHPGFRCTCLESFTGPQCQTLVDWCSRQPCQNGGRCVQTGAYCLCPPGW
SGRLCDIRSLPCREAAAQIGVRLEQLCQAGGQCVDDESSHVCVCPEGRTGSHCEQEV
DPCLAQPCQHGGTCRGYMGGYMCECLPGYNGDNCEDDVDECASQPCQHGGSCIDL
VARYLCSCPPGTGLVLCEINEDDCGPGPLDSGPRCLHNGTCVDLVGGFRCTCPPGYT
GLRCEADINECRSGACHAATRDCQLQDPGGGFRCLCHAGFSGPRCQTVLSPCESQPC
QHGGQCRPSPGPGGGLTFTCHCAQPFWGPRCERVARSRELQCPVGVPCQQTTPRGPR
CACPPGLSGPSCRSFPGSPPGASNASCAAAPCLHGGSCRPA LAPFFRCACAQGWTP
RCEAPAAAEVSEEP RCPRAACQAKRGDQRCDRECNSPGCGWDGGDCSLSVGDPWR
QCEALQCWRLFNNRCDPACSSPACLYDNFDCHAGGRERTCNPVYEK YCADHFADG
RCDQGCNTEECGWDGLDCASEVPALLARGVLVLT VLLPPEELLRSSADFLQRLSAILR
TSLRFRLDAHGQAMVFPYHRPSPGSEPRARRELAPEVIGSVVMLEIDNRLCLQSPEND
HCFPDAQSAADYLGALSAVERLDFPYPLRDVRGEPEPPEPSVPLLPLLVAGAVLLLV
ILVLGVMVARRKRVDKLLSSIEQACDICRLKCLKSKEKPKCAKCLKNNWECRYSPK
TKRSPLTRAHLTEVESRLERLEQLFLIFPREDLDMILKMDSLQDIKALLTGLFVQDNV
NKDAVTDRLASVETDMPLTLRQHRISATSSSEESSNKGQRQLTVSKLKLSSIEQACP
KKKRKVDEFPGISTAPPTDVSLGDELHLDGEDVAMAHADALDDFDLMDLGDGDSPG
PG (配列番号: 272)

20

30

40

【0 4 6 7】

カニクイザル N o t c h 3 - G a l 4 - V P 1 6

【化 5 - 1】

MGP GARGRRRRRPMSPPPPVRLPLLLLLAGPGA AVPPCLDGSPCANGGRCTQLP
 SREAACLCPPGWVGERCQLEDPC HSGPCAGRGVCQSSV VAGTARFSCRCPRGFRGPD
 CSLPDPCLSSPCAHSARCSVGP DGRFLCSCPPGYQGRSCRSDVDECRVGEPCR HGGTC
 LNTPGSFRCQCPAGYTG PLCENPAVPCAPSPCRNGGTCRQSGDLTYDCACLPGFEGQ
 NCEVNVD DCPGHRCLNGGTCVDGVNTYNCQCPPEWTGQFCTEDVDECQLQPNACH
 NGGTCFNTLGGHSCVCVNGWTGESCSQNIDDCATAVCFHGATCHDRVASFYCACPM
 GKTGLLCHLDDACVSNPCHEDAICDTNPVNGRAICTCPPGFTGGACDQDVDECSIGA
 NPCEHLGRCVNTQGSFLCQCGRGYTGPRCETDVNECLSGPCR NQATCLDRIGQFTCIC
 MAGFTGTGYCEVDIDECQSSPCVNGGICKDRVNGFSCTCPSGFSGSTCQLDVDECASTP
 CRNGAKCVDQPDGYECRCAEGFEGMLCERNVDDCSPDPCHHGRCVDG IASFSCACA
 PGYTGTRCESQVDECRSQPCR HGGKCLDLVDKYLRCPSGTTGVNCEVNIDDCASN

10

【化 5 - 2】

CSFGVCRDGINRYDCVCQPGFTG PLCNVEINECASSPCGEGGSCVDGENGFRC LCPPG
 SLPLCLPPSHPCAHEPCSHGICYDAPGGFRVCCEPGWSGPRCSQSLARDACESQPCR
 AGGTCSSDGMGFHCTCPPGVQGRQCELLSPCTPNPCEHGGRCESAPGQLPVCSCPQG
 WQGPCRQQDVDECAGPAPCGPHGICTNL AGSFSTCHGGYTGPSCDQDINDCDPNPC
 LGGSCQDGVGSFSCSCLLGFA GPRCARDVDECLSNPCGPGTCTDHVASFTCTCPPG
 YGGFHCEQDLPDCSPSSCFNGGTCVDGVNSFSC LCRPGYTGAHCQHEADPCLSRPCL
 HGGVCSAAHPGFRCTCPQSFTGPQCQTLVDWCSRQPCQNGGRCVQTGAYCLCPPGW
 SGRLCDIRSLPCREAAAQIGVRLEQLCQAGGQCVD EDDSSHVCVPEGRTGSHCEQEV
 DPCLAQPCQHGGTCRGYMGGYMCECLPGYNGENCEDD VDECASQCQHGGSCIDL
 VARYLCSCPPGTLGVLCEINEDDCGPGPPLDSGPRCLHNGTCVDLVGGFRCTCPPGYT
 GLRCEADINECRSGACHAAHTRDCLQDPGGGFRCLCHAGFSGPRCQTVLSPCESQPC
 QHGGQCRSPGPGGGLTFTCHCAQPFWGPRCERVARSCRELQCPVGVPCCQTPRGPR
 CACPPGLSGPSCRSFSGSPPGASNASCAAAPCLHGGSCRPA LAPFFRCACAQGWTP
 RCEAPAAAEVSEEP RCPRAACQAKRGDQRC DRECNSPGCGWDGGDCSLSVGDPWR
 QCEALQCWRLFNNRCDPACSSPACLYDNFDCHAGGRERTCNPVYEKYCADHFADG
 RCDQGCNTEECGWDGLDCASEVPALLARGVLVLT VLLPPEELLRSSADFLQRLSAILR
 TSLRFR LDAHGQAMVFPYHRPSPGSEPRARRELAPEVIGSVVMLEIDNRLCLQSPEND
 HCFPDAQSAADYLGALSAVERLDFPYPLRDVRGEPEPPEPSVPLLPLLVAGAVLLL
 ILVLGVMVARRKRVDKLLSSIEQACDICRLK LKCSKEKPKCAKCLKNNWECRYSPK
 TKRSPLTRAHLTEVESRLERLEQLFLIFPREDLDMILKMDSLQDIKALLTG L FVQDNV
 NKDAVTDRLASVETDMPLTLRQHRISATSSSEESSNKGQRQLTVSQLKLLSSIEQACP
 KKKRKVDEFPGISTAPPTDVSLGDELHLDGEDVAMAHADALDDFDLMDLGDGDS PG
 PG (配列番号: 273)

20

30

40

【0 4 6 8】

ヒト N o t c h 1 - G a l 4 - V P 1 6

【化 6 - 1】

MPPLLAPLLCLALLPALAARGPRCSQPGETCLNGGKCEAANGTEACVCGGAFVGP
 QDPNPCLSTPCKNAGTCHVVDRRGVADYACSCALGFSGPLCLTPLDNACLTNPCRNG
 GTCDLLTLTEYKCRCPGWSGKSCQQADPCASNPCANGGQCLPFEASYICHCPPSFHG
 PTCRQDVNECGQKPGLCRHGGTCHNEVGSYRCVCRATHGPNCERPYVPCSPSPCQN
 GGTCTRPTGDVTHECACLPGFTGQNCENIDDCPGNNCKNGGACVDGVNTYNCRCPP
 EWTGQYCTEDVDECQLMPNACQNGGTCHNTHGGYNCVCVNGWTGEDCSENIDDC
 ASAACFHGATCHDRVASFYCECPHGRTGLLCHLNDACISNPCNEGSNCDTNPVNGKA
 ICTCPSGYTGPAQSQDVDECSLGNPCEHAGKCINTLGSFECQCLQGYTGPRCEIDVN
 ECVSNPCQNDATCLDQIGEFQCICMPGYEGVHCEVNTDECASSPCLHNGRCLDKINEF

10

【化 6 - 2】

QCECPTGFTGHLCCQYDVDECASTPCKNGAKCLDGPNTYTCVCTEGYTGTHCEVDIDE
 CDPDPCHYGSKDGVATFTCLCRPGYTGHHCETNINECSSQPCRHHGGTCQDRDNAYL
 CFCLKGTTGPNCEINLDDCASSPCDSGTCLDKIDGYECACEPGYTGSMCNINIDECAG
 NPCHNGGTCEGDINGFTCRCPEGYHDPCLSEVNECNSNPCVHGACRDSLNGYKCDC
 DPGWSGTNCDINNNECESNPCVNGGTCKDMTSGYVCTCREGFSGPNCQTNINECASN
 PCLNQGTCIDDVAGYKCNCLLPYTGATCEVVLAPCAPSPCRNGGECRQSEDYESFSC
 VCPTGWQGTCEVDINECVLSPCRHGASCQNTHTGGYRCHCQAGYSGRNCETDIDDC
 RPNPCHNGGSGTCDGINTAFCDCLPGFRGTFCCEEDINECASDPCRNGANCTDCVDSYTC
 TCPAGFSGIHCENNTPDCTESSCFNGGTCTVDGINSFTCLCPPGFTGSYCQHDVNECDS
 QPCLHGGTCQDGCYSYRCTCPQGYTGPNQNLVHWCDSPPCKNGGKCWQTHYQYR
 CECPSGWTGLYCDVPSVSCEVAAQRQGVVVARLCQHGGCLVDAGNTHHCRCQAGY
 TGSYCEDLVDECSPPCQNGATCTDYLGGYSCKCVAGYHGVCNSEEIDECLSHPCQN
 GGTCLDLPTYKCSGPRGTQGVHCEINVDDCNPPVDPVSRSPKCFNNGTCTVDQVGGY
 SCTCPPGFVGERCEGDVNECLSNPCDARGTQNCVQRVNDHFCECRAGHTGRRCESVI
 NGCKGKPCKNGGTCAVASNTARGFICKCPAGFEGATCENDARTCGSLRCLNGGTCS
 GPRSPTCLCLGPFTGPECQFPASSPCLGGNPCYNQGTCEPTSESPFYRCLCPAKFNGLL
 CHLDYSFGGAGRDIPPLIEEACELPECQEDAGNKVCSLQCNNHACGWDGGDCSL
 NFNDPWKNCTQSLQCWKYFSDGHCDSCNSAGCLFDGFDQRAEGQCNPLYDQYC
 KDHFSDBGHCDQGCNSAECEWDGLDCAEHVPERLAAGTLVVVVVLMPEQLRNSSFHF
 LRELSRVLHTNVVFKRDAHGQQMIFPYYGREEELRKHPIKRAAEGWAAPDALLGQV
 KASLLPGGSEGRRRRELDPMVDRGSIVYLEIDNRQCVQASSQCFQSATDVAAFLGA
 LASLGSNLNIPYKIEAVQSETVEPPPPAQLHFMVAAAAFVLLFFVGCGLVLLSRKRRRV
 DKLLSSIEQACDICRLKKLKCSKEKPKCAKCLKNNWECRYSPKTKRSPLTRAHLTEVE
 SRLERLEQLFLIFPREDLDMILKMDSLQDIKALLTGLFVQDNVNKDAVTDRLASVET
 DMPLTLRQHRISATSSSESSNKGQRQLTVSQLKLLSSIEQACPKKKRKVDEFPGISTA
 PPTDVSLGDELHLDGEDVAMAHADALDDFDLMDLGDGDSPPGP (配列番号: 274)

20

30

40

【0 4 6 9】

ヒト N o t c h 2 - G a l 4 - V P 1 6

【化 7 - 1】

MPALRPALLWALLALWLCCAAPAHALQCRDGYEPCVNEGMCVTYHNGTGYCKCPE
 GFLGEYCQHRDPCEKNRCQNGGTCTVAQAMLGKATCRCASGFTGEDCQYSTSHPCFV
 SRPCLNGGTCHMLSRDYEECTCQVGFTGKECQWTDACLSHPCANGSTCTTVANQFS
 CKCLTGFTGQKCETDVNECDIPGHCQHGGTCLNLPGSYQCQCPQGFTGQYCDSLYVP
 CAPSPCVNGGTCTGTDFTFECNCLPGFEGSTCERNIDDCPNHRCQNGGVCDGVNT
 YNCRCPPQWTGQFCTEDVDELLQPNACQNGGTANRNGGYGVCVNGWSGDDCS

【化 7 - 2】

ENIDDCAFASCTPGSTCIDRVASFSCMCPEGKAGLLCHLDDACISNPCHKGALCDTNP
 LNGQYICTCPQGYKGADCTEDVDECAMANSNPCEHAGKCVNTDGAHCECLKGYA
 GPRCEMDINECHSDPCQNDATCLDKIGGFTCLCMPGFKGVHCELEINECQSNPCVNN
 GQCVDKVNRQCLCPPGFTGPVCQIDIDDCSSTPCLNGAKCIDHPNGYECQCATGFTG
 VLCEENIDNCDPDPCHHGQCQDGIDSYTCINPGYMGAIQSDQIDECYSSPCLNDGRCI
 DLVNGYQCNCQPGTSGVNCEINFDDCASNPCHGICMDGINRYSCVCSPGFTGQRCNI
 DIDECASNPCKRGATCINGVNGFRICPEGPHHPSCYSQVNECLSNPCHGNCTGGLSG
 YKCLCDAGWVGINCEVDKNECLSNPCQNGGTCDNLVNGYRCTCKKGFKGYNCQVN
 IDECASNPCLNQGTCFDDISGYTCHCVLPYTGKNCQTVLAPCSPNCPENAAVCKESPN
 FESYTCLCAPGWQGRCTIDIDECKPCMNHGLCHNTQGSYMCECPPGFSGMDCEE
 DIDDCLANPCQNGGSCMDGVNTFSCCLCPGFTGDKCQTDMECLSEPCKNGGTCS
 YVNSYTCKCQAGFDGVHCENNINECTESSCFNGGTCDVGINSFSCCLCPVGFTGFSCLH
 EINECSSHPCLNEGTCVDGLGTYRCSCLPGYTGKNCQTLVNLCSPCKNKGTCVQK
 KAESQCLCPSGWAGAYCDVPNVSCDIAASRRGVLEHLCQHSGVCINAGNTHYCQC
 PLGYTGSYCEEQLDECASNPCHGATCSDFIGGYRCECVPGYQGVNCEYEVDECQN
 QPCQNGGTCLDNVHFKCSCPPGTRGLLCEENIDDCARGPHCLNGGQCMDRIGGYSC
 RCLPGFAGERCEGDINECLSNPCSSEGLDCIQLTNDYLCVCRSAFTGRHCETFDVDCP
 QMPCLNGGTCAVASNMPDGFICRPPGFSGARCQSSCGQVKCRKGEQCVHTASGPR
 CFCPSPRDCESGCASSPCQHGGSCHPQRQPPYYSCQCAPFSGSRCELYTAPPSTPPAT
 CLSQYCADKARDGVCDEACNSHACQWDGGDCSLTMENPWANCSSPLPCWDYINNQ
 CDELCNTVECLFDNFECQNSKTCKYDKYCADHFKNHCDQGCNSEECGWDGLDC
 AADQPENLAEGTLVIVVLMPEQLLQDARSFLRALGTLHTNLRIKRSQGELMVYP
 YYGEKSAAMKKQRMTRRSLPGEQEVEAGSKVFLEIDNRQCVQDSDFHCFKNTDAA
 AALLASHAIQGTLSYPLVSVVSESLTPERTQLLYLLAVAVVILFIILLGVIMAKRKRVD
 KLLSSIEQACDICRLKCLKCSKEKPKCAKCLKNNWECRYSPKTKRSPLTRAHLTEVES
 RLERLEQLFLLIFPREDLDMILKMDSLQDIKALLTGLFVQDNVNKDAVTDRLASVETD
 MPLTLRQHRISATSSSEESSNKGQRQLTVSQLKLLSSIEQACPKKKRKVDEFPGISTAPP
 TDVSLGDELHLDGEDVAMAHADALDDFDLMDLGDGDSPPGP (配列番号: 275)

10

20

30

40

【0470】

Notch3-Gal4-VP16を発現するためのレトロウイルスの生成

適切なレトロウイルスベクター (pLNCX2__hNotch1__Gal4-VP16、pLNCX2__hNotch2__Gal4-VP16、pLNCX2__hNotch3__Gal4-VP16、pLNCX2__cNotch3__Gal4-VP16) を 293-GP2 パッケージング細胞株 (Clontech、カタログ番号 631458) にトランスフェクトしてレトロウイルスを産生した。Promega の Eugene 6 を脂質系トランスフェクション試薬として使用した。トランスフェクションを製造業者の指示書に

50

従って実施した。トランスフェクションの48時間後にウイルスを収集し、即座に使用してHLR細胞(HLR-PathDetect、Stratagene)に形質導入した。形質導入した細胞を少なくとも2週間選択下に置き、その後、それらを共培養アッセイにおいて試験した。各細胞株についてのクローン集団を選択した。

【0471】

Notch3-Gal4-NLS-VP16-UA-ルシフェラーゼリガンド誘導レポーター遺伝子アッセイ

HLR-Notch3-Gal4-NLS-VP16/Gal4-UA-TATA-ルシフェラーゼ(HLR-N3)細胞を、細胞表面で発現したrrJagged1(SN3T9)またはrrDelta1(DLL1-19)のいずれかを安定に発現するL細胞との共培養により活性化した(Hicks C et al. (2000) Nature Cell Bio 2:515-520; Lindsell C et al. (1995) Cell 80:909-917)。リガンドを発現する細胞との共培養により、Notch3シグナル伝達およびNotch3キメラ受容体のタンパク質分解切断の活性化が生じてGal4-NLS-VP16を放出した。このGal4-NLS-VP16は、それがGal4-ルシフェラーゼレポーターに結合する核へ移行し、ルシフェラーゼの産生を生じる。90%コンフルエンスにて、トリプシン-EDTAを使用してHLR-N3細胞を解離し、 2×10^5 個の細胞/mlの濃度でアッセイ培地(DMEM、高グルコース、L-Glu、Invitrogen、カタログ番号21063-029; 10% FBS、1% P/Sを補足した)中に希釈した。50 μ lのHLR-N3細胞/ウェル(= 1×10^4 個の細胞)を白色平底96ウェルプレート(Costar、カタログ番号3917)内に播種し、37℃および5% CO₂にて一晩インキュベートした。

10

20

【0472】

翌日、HuCAL(登録商標)抗体(IgG)をPBS中に所望の濃度にて希釈した。ウェルごとに10 μ lの抗体希釈物を播種した細胞に加え、37℃および5% CO₂にて2時間インキュベートした。次のJagged1およびDelta1リガンド発現マウスL細胞を、トリプシン-EDTAを使用して解離し、 8×10^5 個の細胞/mlの濃度でアッセイ培地中に希釈した。ウェルごとに50 μ lのマウスL細胞(= 4×10^4 個の細胞/ウェル)を培養したHLR-N3細胞(50 μ lのHLR細胞+10 μ lの抗体+50 μ lのマウス細胞=110 μ lの最終体積)に加え、37℃および5% CO₂にて一晩インキュベートした。対照として、50 μ lのマウス親L細胞をリガンドの独立した設定の代わりに加えた。

30

【0473】

一晩のインキュベーション後、50 μ lの新たに調製したBright-Glo試薬を室温に適合し(Promega、カタログ番号E2610)、各ウェルに加えた。5分のインキュベーション時間後、発光を照度計(Genios Pro、Tecan)で読み取った。それぞれの抗体の全滴定後、Prismを使用してIC₅₀値を算出した。IgG対照に対する阻害パーセントを示す。抗体を加えると、増加したシグナル伝達を検出した場合、負の数を使用した。

【0474】

概要および考察

40

huNotch3 RGAに加えて、カニクイザルNotch3 RGAならびにhuNotch1 RGA(DLL1リガンド設定のみ)およびhuNotch2 RGA(Jagged1およびDLL1)を上記のように実施した。記載されるNotch3抗体のどれも、10 μ g/mlの最大濃度までhuNotch1またはhuNotch2 RGAにおいていかなる活性も示さなかった。Notch3抗体は、Jagged1およびDelta1の両方により誘導されるNotch3シグナル伝達を阻害することを確認した。阻害パーセントおよびIC₅₀は活性化のために使用した抗体およびリガンドに応じて変化した。LBDドメイン(12229、20364、20802)に対して向けられたパニングから識別した抗体は、図7A~Dに示されるように、このリガンド駆動RGAアッセイからのシグナル伝達を阻害するのに最も効果的であった。

50

【0475】

〔実施例4〕

Notch 標的遺伝子 mRNA レベルに対する Notch 3 抗体の効果

一連の乳癌細胞株において Notch 標的遺伝子を識別するために、遺伝子の mRNA 発現に対するガンマセクレターゼ阻害剤 (GSI) 処置の効果を評価した。Affymetrix ヒト U133A アレイを使用して、72 時間、DMSO または $10 \mu\text{M}$ の DAPT (Calbiochem 565770) のいずれかによる HCC70、MDA-MB468 または HCC1143 細胞の処置をプロファイルした。時点ごとに 3 つの複製が存在した。R/Bioconductor フレームワークを使用し、Limma パッケージを利用して、DMSO 処置と DAPT 処置との間で異なって発現された遺伝子を決定した。0.05 の調整した P 値を閾値として使用して、異なって発現された遺伝子のセットを決定した。最終的に、2 つの標的遺伝子を細胞株ごとに選択し、以下の表にまとめた。Hes1、MMP7 および VSNL1 mRNA レベルは Notch シグナル伝達を阻害すると減少するが、DKK1 mRNA レベルは Notch シグナル伝達を阻害すると増加する。

【0476】

【表4】

遺伝子	細胞株
PP1A	全て
Hes1	HCC1143, MDA-MB-468
MMP7	HCC1143
DKK1	MDA-MB-468
Hey2	HCC70
VSNL1	HCC70

【0477】

上記の遺伝子の mRNA レベルを定量するために、細胞株 HCC70、MDA-MB-468 または HCC1143 を、 1×10^5 個の細胞/mL の細胞密度にて 96 ウェルプレート (Costar、カタログ番号 3610) の $100 \mu\text{L}$ 中で播種した。プレートを 37°C にて一晚インキュベートし、その後、適切な濃度にて抗体で処置した。処置したプレートをさらに 72 時間インキュベーターに戻し、その後、Qiagen の RNeasy キット (カタログ番号 74181) を使用して RNA 抽出のために溶解した。Taqman 逆転写試薬 (Applied Biosystems、カタログ番号 N808-0234) を使用して cDNA を合成した。mRNA 発現をリアルタイム PCR (Taqman Fast Advanced Master Mix、Applied Biosystems、カタログ番号 4444557) により判定した。リアルタイム PCR を ViiA 7 リアルタイム PCR システムまたは 7900 HT Fast リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems) において実施した。各標的遺伝子のレベルを定量するために、 $2^{-[\Delta\Delta\text{Ct}]}$ Ct 法を利用した。デルタデルタ Ct の算出は、対象の試料の Ct 値を未処置の試料または DMSO 処置した試料 (Schmittgen および Livak 2008 Nature Protocols 3:1101-1108) などの対照と比較することを含む。

【0478】

概要および考察

図8に示されるように、N o t c h 3抗体は一連の乳癌細胞株において内因性N o t c h 3シグナル伝達を阻害できることを確認した。N o t c h 3抗体による乳癌細胞株の処置により、H E S 1またはM M P 7 m R N Aの減少した発現ならびにD K K 1 m R N Aの増加した発現が生じた。

【0479】

〔実施例5〕

N o t c h 3 N R RおよびP E S Tドメインの突然変異の識別および特徴付け

今まで、がんにおけるN o t c h受容体についての証拠は主にN o t c h 1シグナル伝達の変化に焦点を当てていた。N o t c h 3は卵巣がんにおいて増幅するが、その増幅はN o t c h 3シグナル伝達への依存につながるという直接的な証拠は存在しない。加えて、N o t c h 3において突然変異を活性化させるという証拠は存在しない。N o t c h 3を細胞株のパネルにおいて配列決定して、さらなる特徴付けのために遺伝子における突然変異を識別した。

10

【0480】

がん細胞株エンサイクロペディア（C C L E）を使用して947個のヒトがん細胞株を特徴付けした（Barretina J. et al. (2012) Nature 483:603-7）。液相ハイブリッド捕捉技術を使用した大量の並行シーケンシングにより突然変異体情報を>1600個の遺伝子について得た。エクソーム捕捉シーケンシングについての多重ライブラリーを、S u r e S e l e c t T a r g e t E n r i c h m e n tシステム（A l i g e n t T e c h n o l o g i e s）を使用して記載されるように構築した。N o t c h 3は配列決定した遺伝子の1つであり、データを分析してタンパク質のN R R（エクソン25、26、アミノ酸1378～1640）およびP E S T（エクソン33アミノ酸1972～2322）ドメインにおける任意の突然変異を識別した。947個のがん細胞株からの配列データの精密な検査により、突然変異を識別するためにエクソン25および33において不十分な配列包括度が存在することが決定された。表はN o t c h 3におけるエクソンの平均包括度を示す。記載される数字は表3における塩基対ごとの読み取り値の平均数である。

20

【0481】

30

【表 5】

表3: Notch3エクソン読み取り値

Notch3のエクソン	平均包括度
e01	0.03
e02	-
e03	-
e04	10.49
e05	595.39
e06	277.47
e07	79.71
e08	99.63
e09	210.51
e10	0.58
e11	42.39
e12	558.77
e13	0.77
e14	0.66
e15	1.71
e16	168.88
e17	1.65
e18	1.13
e19	111.12
e20	53.03
e21	414.89
e22	12.79
e23	6.72
e24	-
e25	0.44
e26	171.70
e27	52.77
e28	3.44
e29	36.78
e30	280.90
e31	404.35
e32	223.13
e33	1.27

10

20

30

【0482】

これらの細胞株または原発性腫瘍のいずれかがこれらの領域において突然変異を含有しているかどうかを判定するために、Sanger Sequencing (Genewiz)、RainDance (Tewhey et al. (2009) Nature Biotechnology 27:1025-1031) およびRNAseq (Wang et al. (2009) Nature Reviews Genetics 10:57-63) を含む3つのアプローチを使用した。突然変異を図9に示されるように複数の細胞株および腫瘍試料のNRRおよびPESTDメインの両方において識別した。図9aにおいて、上側のパネルはNRR突然変異を有する細胞株を示し、一方、下側のパネルはPEST突然変異を有する。原発性腫瘍において識別したNRR突然変異は図9bに示される。

40

【0483】

原発性腫瘍の単離および原発性腫瘍異種移植片のバンクの生成

原発性ヒト腫瘍異種移植片から得られるデータを以下のように生成した：腫瘍試料を、

50

1 時間未満の虚血時間で外科的切除の間に患者から、1 % ペニシリン／ストレプトマイシンを補足した R P M I 中に収集した。壊死組織を含まない 1 5 ～ 3 0 m m ³ の断片を、イソフルラン麻酔下で 6 ～ 8 週齢のメスのヌードマウスの肩甲骨脂肪体内に皮下移植した。マウスを、特定の病原体を含まない動物収容施設に維持し、承認されたプロトコールおよび規則に従って処理した。異種移植片が移植から 2 ～ 8 カ月後に移植部位において現れた。その後、合理的に一貫性のある増殖速度が達成されるまで、腫瘍が 7 0 0 ～ 8 0 0 m m ³ に到達すると、それらの異種移植片をマウスからマウスに移植した。5 0 % F B S および 1 0 % D M S O を補足した R P M I 中に凍結したストックをマウスにおける連続継代の間に生成し、異種移植モデルの首尾良い構築を確実にするために試験した。患者由来の 3 0 ～ 5 0 m g の断片および各継代における異種移植片を、遺伝子発現プロファイリング、コピー数および突然変異分析のために即座に凍結した。各々の首尾良く生着された異種移植モデルの 1 5 0 m g の断片も収集し、組織学的分析に供した。構築した腫瘍異種移植モデルを、4 回の継代後、*i n v i v o* での研究のためにさらに使用した。遺伝子発現プロファイリングのために、親和性樹脂 (Q I A G E N R N e a s y M i n i K i t ; Q I A G E N A G) を使用して全 R N A を単離した。R N A 完全性および純度を、B i o a n a l y z e r 2 1 0 0 (A g i l e n t T e c h n o l o g i e s) における R N A 6 0 0 0 N a n o L a b C h i p システムを用いて評価した。

10

【0484】

〔実施例 6〕

レポーター遺伝子アッセイにおける N o t c h 3 N R R 突然変異の特徴付け

20

N o t c h 3 N R R 突然変異による N o t c h 3 発現ベクターの生成

2 つの突然変異を特徴付けのために選択した。T A L L - 1 細胞は S 1 5 8 0 L 突然変異を有する t 細胞急性リンパ芽球性細胞株である。T A L L - 1 細胞は D S M Z (# A C C 5 2 1) から購入した。乳房腫瘍 (X - 1 0 0 4) もまた、G 1 4 8 7 D 突然変異で識別した。X - 1 0 0 4 試料中の突然変異を検出する R N A s e q 分析のために使用した R N A は 5 回の継代のマウスの由来であった。これらの突然変異をベクター p L N C X 2 _ N o t c h 3 - G A L 4 - N L S - V P 1 6 内に導入した。

【0485】

構築物

N o t c h 3 _ S 1 5 8 0 L _ G a l 4 - V P 1 6

30

【化 8 - 1】

MGP GARGRRRRRRPMSPPPPPPVRALPLLLLLAGPGAAAPPCLDGSPCANGGRCTQ
 LPSREAA CLCPPGWVGERCQLEDPC HSGPCAGRGVCQSSV VAGTARFSCRCPRGFRG
 PDCSLPDPCLSSPCA HGARCSVGP DGRFLCSCPPGYQGRSCRSDVDECRVGEPCR HGG
 TCLNTPGSFRCQCPAGYTGPLCENPAVPCAPSPCRNGGTCRQSGDLTYDCACLPGFEG
 QNCEVNVD DCPGHRCLNGGTCVDGVNTYNCQCPEWTGQFCTEDVDECQLQPNAC
 HNGGTCFNTLGGHSCVCVNGWTGESCSQNIDDCATAVCFHGATCHDRVASFYCACP
 MGKTG LLLCHLDDACVSNPCHEDAICDTNPVNGRAICTCPPGFTGGACDQDVDECSIG
 ANPCEHLGRCVNTQGSFLCQCGRGYTGPRCETDVNECLSGPCR NQATCLDRIGQFTCI
 CMAGFTGT YCEVDIDECQSSPCVNGGVCKDRVNGFSCTCPSGFSGSTCQLDVDECAS
 TPCRNGAKCVDQPDGYECRCAEGFEGTLCDRNVDDCSPDPCHHGRCVDG IASFSCAC
 APGYTGTRCESQVDEC RSQPCR HGGKCLDLVDKYLRCRPSGTTGVNCEVNIDDCASN
 PCTFGVCRDGINRYDCVCQPGFTGPLCNVEINECASSPCGEGGSCVDGENGFRC LCPP
 GSLPPLCLPPSHPCAHEPCSHGICYDAPGGFRVCPEPGWSGPRCSQSLARDACESQPC
 RAGGTCSSDGMGFHCTCPPGVQGRQCELLSPCTPNPCEHGGRCESAPGQLPVCSCPQ
 GWQGPRCQQDVDECAGPAPCGPHGICTNLAGSF SCTCHGGYTGPSCDQDINDCDPNP
 CLNGGSCQDGVGSFSCSCLPGFAGPRCARDVDECLSNPCGPGTCTDHVASFTCTCPPG
 YGGFHCEQDL PDCSPSSCFNGGTCVDGVNSFSCLCRPGYTGAHCQHEADPCLSRPCL
 HGGVCSAAHPGFRCTCLESFTGPQCQTLVDWCSRQPCQNGGRCVQTGAYCLCPPGW
 SGRLCDIRSLPCREAAAQIGVRLEQLCQAGGQC VDEDSSHVCPEGRTGSHCEQEV
 DPCLAQPCQHGGTCRGYMGGYMCECLPGYNGDNCEDDVDECASQPCQHGGSCIDL
 VARYLCSCPPGTGLVLC EINEDDCGPGPPLDSGPRCLHNGTCVDLVGGFRCTCPPGYT
 GLRCEADINECRSGACHAAHTRDCLQDPGGGFRCLCHAGFSGPRCQTVLSPCESQPC
 QHGGQCRPSPGPGGGLTFTCHCAQPFWGPRCERVARSCRELQCPVGVPCQQTTPRGPR
 CACPPGLSGPSCRSFPGSPPGASNASCAAAPCLHGGSCRPA PLAPFFRCACAQGWTP
 RCEAPAAAPEVSEEPRCPRAACQAKRGDQRC DRECNSPGCGWDGGDCSLSVGDPWR
 QCEALQCWRLFNN SRCDPACSSPACLYDNFDCHAGGRERTCNPVYEKYCADHFADG
 RCDQGCNTEECGWDGLDCASEVPALLARGVLVLT VLLPPEELLRSSADFLQRLSAILR
 TSLRFRLDAHGQAMVFPYHRPSPGSEPRARRELAPEVIGLVVMLEIDNRLCLQSPEND
 HCFPDAQSAADYLGALSAVERLDFPYPLRDVRGE PLEPEPSVPLLPLL VAGAVLLLV
 ILVLGVMVARRKRVDKLLSSIEQACDICRLK LKCSKEKPKCAKCLKNNWECRYSPK
 TKRSPLTRAHLTEVESRLERLEQLFLIFPREDLDMILKMDSLQDIKALLTG L FVQDNV

10

20

30

【化 8 - 2】

NKDAVTDRLASVETDMPLTLRQHRSATSSSEESSNKGQRQLTVSKLKLSSIEQACP
 KKKRKVDEFPGISTAPPTDVSLGDELHLDGEDVAMAHADALDDFDLMDLGDGDS PG
 PG (配列番号: 276)

40

【0 4 8 6】

Notch3 __ G 1 4 8 7 D __ G a 1 4 - V P 1 6

【化 9 - 1】

MGP GARGRRRRRRPMSPPPPPPVRALPLLLLLAGPGAAAPPCLDGSPCANGGRCTQ
 LPSREAACLCPPGWVGERCQLEDPC HSGPCAGRGVCQSSVVAGTARFSCRCPRGFRG
 PDCSLPDPCLSSPCA HGARCSVGP DGRFLCSCPPGYQGRSCRS DVECRVGEPCR HGG
 TCLNTPGSFRQCQ PAGYTGPLCENPAVPCAPSPCRNNGGTCRQSGDLTYDCACLPGFEG
 QNCEVNVDDCPGHRCLNNGGTCVDGVNTYNCQCPPEWTGQFCTEDVDECQLQPNAC
 HNGGTCFNTLGGHSCVCVNGWTGESCSQNIDDCATAVCFHGATCHDRVASFYCACP
 MGKTGLLCHLDDACVSNPCHEDAICDTNPVNGRAICTCPPGFTGGACDQDVDECSIG
 ANPCEHLGRCVNTQGSFLCQCGRGYTGPRCETDVNECLSGPCR NQATCLDRIGQFTCI
 CMAGFTGTyceVDIDECQSSPCVNGGVCKDRVNGFSCTCPSGFSGSTCQLDVDECAS
 TPCRNGAKCVDQPDGYECRCAEGFEGTLCDRNVDDCSPDPCHHGRCVDG IASFSCAC
 APGYTGTRCESQVDECRSQPCR HGGKCLDLVDKYLRCRPSGTTGVNCEVNIDDCASN
 PCTFGVCRDGINRYDCVCQPGFTGPLCNVEINECASSPCGEGGSCVDGENGFRCLCPP
 GSLPPLCLPPSHPCAHEPCSHGICYDAPGGFRCVCEPGWSGPRCSQSLARDACESQPC
 RAGGTCSSDGMGFHCTCPPGVQGRQCELLSPCTPNPCEHGGRCESAPGQLPVCSCPQ
 GWQGPRCQQDVDECAGAPCGPHGICTNLAGSFSC TCHGGYTGPSCDQDINDCDPNP
 CLNGGSCQDGVGSFSCSCLPGFAGPRCARDVDECLSNPCGPGTCTDHVASFTCTCPPG
 YGGFHCEQDLDPDCSPSSCFNGGTCVDGVNSFSCLCRPGYTGAHCQHEADPCLSRPCL
 HGGVCSAAHPGFRCTCLESFTGPQCQTLVDWCSRQPCQNGGRCVQTGAYCLCPPGW
 SGRLCDIRSLPCREAAAQIGVRLEQLCQAGGQCVD EDDSSHVCVCPEGRTGSHCEQEV
 DPCLAQPCQHGGTCRGYMGGYMCECLPGYNGDNCEDDVDECASQPCQHGGSCIDL
 VARYLCSCPPGTLGVLCEINEDDCGPGPPLDSGPRCLHNGTCVDLVGGFRCTCPPGYT
 GLRCEADINECRSGACHAAHTRDCLQDPGGGFRCLCHAGFSGPRCQTVLSPCESQPC
 QHGGQCRPSPGGGGLTFTCHCAQPFWGPRCERVARSRELQCPVGVPCQQTTPRGPR
 CACPPGLSGPSCRSFPGSPPGASNASCAAAPCLHGGSCRPA LAPFFRCACAQGW TGP
 RCEAPAAAEVSEEP RCPRAACQAKRGDQRC DRECNSPGCGWDGGDCSLSVGDPWR
 QCEALQCWRLFNNSRCDPACSSPACLYDNFDCHAGGRERTCNPVYEKYCADHFADG
 RCDQDCNTEECGWDGLDCASEVPALLARGVLVLT VLLPPEELLRSSADFLQRLSAILR
 TSLRFRLDAHGQAMVFPYHRPSPGSEPRARRELAPEVIGSVVMLEIDNRLCLQSPEND
 HCFPDAQSAADYLGALSAVERLDFPYPLRDV RGEPEPEPSVPLLPLL VAGAVLLL V

10

20

30

40

【化 9 - 2】

ILVLGVMVARRKRVDKLLSSIEQACDICRLKKLKCSKEKPKCAKCLKNNWECRYSPK
 TKRSPLTRAHLTEVESRLERLEQLFLIFPREDLDMILKMDSLQDIKALLTGLFVQDNV
 NKDAVTDRLASVETDMPLTLRQHRISATSSSEESSNKGQRQLTVSKLKLLSSIEQACP
 KKKRKVDEFPGISTAPPTDVSLGDELHLDGEDVAMAHADALDDFDLMDLGDGDS PG

PG (配列番号: 277)

【0487】

293-GP2 パッケージング細胞株 (Clontech、カタログ番号 631458)
 に適切なレトロウイルスベクターをトランスフェクトすることによってレトロウイルス
 を産生した。Promega の Eugene 6 を脂質系トランスフェクション試薬として
 使用した。製造業者の指示書に従ってトランスフェクションを実施した。トランスフェク
 ションの 48 時間後にウイルスを収集し、HLR 細胞 (HLR-Path Detect、
 Stratagene) に形質導入するために即座に使用した。HLR 細胞 (Stratagene) に、
 Notch3wt-Gal4-VP16、Notch3__p. S1850L

50

－Gal4－VP16またはNotch3__p. G1487D－Gal4－VP16レトロウイルス粒子のいずれかを形質導入した。試験前の2週間にG418を用いて細胞を選択した。

【0488】

Notch3野生型およびNotch3 NRR突然変異受容体の基礎活性を評価するためのNotch3レポーター遺伝子アッセイ

Notch3受容体遺伝子アッセイ：HLR－Notch3wt－Gal4－VP16、HLR－Notch3__p. S1580L－Gal4－VP16およびHLR－Notch3__p. G1487D－Gal4－VP16細胞を、フェノールレッドを含まないDMEM、10%FBS（Hyclone、カタログ番号SH30071）、1%ペニシリン（Gibcoカタログ番号15140-122）、L-グルタミン（Gibco、カタログ番号25030-081）、100μg/mLハイグロマイシン（Gibco、カタログ番号10687-010）および400μg/mL G418（Gibco、カタログ番号10131-027）中に維持した。HLR親系統を、フェノールレッドを含まないDMEM、10%FBS（Hyclone、カタログ番号SH30071）、1%ペニシリン（Gibcoカタログ番号15140-122）、L-グルタミン（Gibco、カタログ番号25030-081）および100μg/mLハイグロマイシン（Gibco、カタログ番号10687-010）中に維持した。完全培地中で増殖したサブコンフルエントな細胞をPBS（Gibco、カタログ番号20012-027）で洗浄し、TrypLE（Gibco、カタログ番号12605010）でトリプシン処理し、 4×10^4 個の細胞/mLに希釈し、100μLの細胞懸濁液を、4000個の細胞/ウェルの密度にて96ウェルの透明底の白色プレート（Costar、カタログ番号3610）の中に入れた。次いで全てのプレートをDAPT（10μM、CalBiochem）による処置の前に37℃にて一晩インキュベートした。プレートを24時間インキュベーターに戻し、その後、Bright-Glo（Promega）を使用してルシフェラーゼ活性を判定した。Envisionプレートリーダー（PerkinElmer）を使用して発光量を判定した。

【0489】

野生型および突然変異Notch3受容体の細胞表面レベルを評価するためのFACSアッセイ

細胞株における突然変異Notch3受容体の発現を実証するために、フローサイトメトリーを使用した。突然変異Notch3および野生型Notch3（標準的な条件下で増殖させた）を発現する細胞株を、0.1%BSAおよび0.01%アジ化ナトリウムを含有するPBS中でAPCフルオレセイン標識（R&D カatalog番号FAB1559A）を含有する抗Notch3結合および検出抗体と混合し、4℃にて1時間インキュベートした。洗浄後、単細胞をゲートするために光および側方散乱特性を使用してBD FACSCanto機器により細胞を分析した。

【0490】

突然変異体および内因性Notch3を発現する細胞に対する、市販の抗Notch3 APC（R&D#FAB1559A）で標識した抗体の結合により細胞表面上のNotch3受容体のレベルを判定し、FACSによって評価した。細胞をトリプシン処理（Invitrogen TrypLEカタログ番号12605-010）、FACS緩衝液（PBS/3% FBS/0.01% NaN₃）中で 2×10^6 個の細胞/mLに希釈した。 2.5×10^5 個の細胞/ウェルを96ウェルプレート（Corningカタログ番号3610）の各ウェルに加え、4℃で1500rpmにて5分間遠心分離し、その後、上清を除去した。抗Notch3 APC抗体またはAPC（R&Dカタログ番号IC016A）で標識したヒツジIgGアイソタイプ対照を、100μLのFACS緩衝液中に0.1μgの最終濃度にて細胞ペレットに加え、4℃にて1時間インキュベートした。細胞を洗浄し、100μL FACS緩衝液で2回ペレット化した（pelleted）。最後に、細胞を200μL FACS緩衝液中に再懸濁し、BD FACSCanto（BD

10

20

30

40

50

Biosciences)を用いて蛍光値を測定した。細胞表面に結合した抗Notch3 APC抗体の量を、平均チャンネル蛍光を測定することによって評価した。

【0491】

概要および考察

S1580L突然変異またはG1487D突然変異のいずれかのNotch3受容体内への導入により、野生型対照と比較して受容体からの基礎シグナル伝達の約10倍の増加が生じた。この系において、野生型および突然変異受容体は、FACSアッセイによって判定して、ほぼ等しいレベルで発現した。このデータは、これらの突然変異がこれらおよび他の同様の突然変異を発現する細胞株および腫瘍においてNotch3シグナル伝達を活性化することを示唆している（実施例7、9、10、11、15におけるさらなる考察を参照のこと）。

10

【0492】

〔実施例7〕

TALL-1細胞におけるNotch3シグナル伝達およびin vitro増殖に対するNotch3抗体の効果

TALL-1細胞株はS1580LにおけるNotch3のNRRドメインにおいて突然変異を有する。この突然変異のNotch3発現構築物内への導入により、Notch3シグナル伝達の活性化が生じた。この細胞株におけるNotch3シグナル伝達の阻害の効果をさらに特徴付けるために、Notch標的遺伝子のmRNAレベルを試験し、細胞のin vitro増殖をNotch3抗体の存在下でモニターした。

20

【0493】

TALL-1 in vitro増殖アッセイ

1×10^4 個のTALL-1細胞/ウェルを、96ウェル組織培養プレート（Corning、カタログ番号3610）内の100 μ l培地（10%ウシ胎仔血清および1%ペニシリン/ストレプトマイシンを補足したRPMI-1640）中に播種した。同じ日に、抗体希釈物を1X PBS中に調製し、それからの5 μ lの20X抗体希釈物をウェルごとに加えた。細胞を37 $^{\circ}$ C/5%CO₂にて抗体とインキュベートした。37 $^{\circ}$ C/5%CO₂における0および9日間のインキュベーション後、100 μ lのCellTiter-Glo試薬（Promega）を加え、プレートシェーカーでプレートを10分間インキュベートした。Perkin Elmer Envisionプレートリーダーを使用して発光量を判定した。IgG対照で処置した細胞のCellTiter-Glo発光値を使用してデータを正規化し、Notch3抗体による処置に起因する増殖の阻害パーセントを算出した。

30

【0494】

TALL-1 mRNA定量アッセイ

Deltex1はTALL株におけるNotchシグナル伝達の十分に特徴付けられた標的遺伝子である（Weng et al., 2006, Genes Dev. 20:2096-2109）。 1×10^4 個のTALL-1細胞/ウェルを、96ウェル組織培養プレート（Corning、カタログ番号3610）内の100 μ l培地（10%ウシ胎仔血清および1%ペニシリン/ストレプトマイシンを補足したRPMI-1640）中に播種した。同じ日に、抗体および化合物希釈物を1X PBS中で調製し、そこからの5 μ lの20X抗体または化合物希釈物をウェルごとに加えた。DAPT（Calbiochem、カタログ番号565770）およびDMSO（ATCC、カタログ番号4-X-5）はこのアッセイに使用した化合物であった。細胞を37 $^{\circ}$ C/5%CO₂にて72時間、抗体または化合物とインキュベートした。Qiagen RNeasy96キットを使用してRNAを単離した。TaqMan逆転写試薬（Life Technologies）およびMJ Research PTC-225サーマルサイクラーを使用してcDNAを作製した。Deltex1（DTX1）（Hs00269995_m1、Life Technologies）およびハウスキーピング遺伝子PPIA（Hs99999904_m1、Life Technologies）についての遺伝子発現プローブと共にTaqMan Universal

40

50

PCR Master Mix (Life Technologies) を使用して TaqMan 遺伝子発現アッセイを実施した。TaqMan 遺伝子発現アッセイを、Applied Biosystems ABI Prism 7900HT FastリアルタイムPCRシステムで実施した。Deltex 1 のレベルを定量するために、 $2^{-[\text{デルタ}]}$ [デルタ] Ct 法を利用した。デルタデルタ Ct の算出は、対象の試料の Ct 値を未処置の試料または DMSO 処置した試料などの対照と比較することを含む (Schmittgen and Livak (2008) Nature Protocols 3: 1101-1108)。

【0495】

概要および考察

図 11A~B に示されるように、NRRドメインまたはEGF32-NRRドメイン (20350、20358、20337) に対するパニングから識別された Nctch3 抗体は、TALL-1 細胞における Deltex1 mRNA 発現を強く阻害した。対照的に、LBDドメイン (20364) に対する抗体は Deltex1 mRNA を顕著に阻害しなかった。加えて、20350、20358、20337 は用量依存的に TALL-1 増殖を顕著に阻害した。Nctch3 抗体を他の TALL 細胞株 (DND41、P12-Ichikawa、SUPT1、SUPT11 および RPMI-8402) のパネルにおいて試験した場合、増殖に対する効果は検出されなかった。

【0496】

〔実施例 8〕

Nctch3 細胞内ドメインのガンマセクレターゼ切断型を検出するネオエピトープ抗体の生成

Nctch シグナル伝達を一連のタンパク質分解切断によって活性化する。ガンマセクレターゼ複合体は Nctch 受容体の最後の切断を媒介し、最終的に核へ移行する Nctch 細胞内ドメイン (ICD) を生じて Nctch 標的遺伝子転写を活性化する。ネオエピトープ抗体を生成して、アミノ酸 Gly1661 と Val1662 (ヒト Nctch3) との間で切断した場合のみ、Nctch3 ICD (ICD3) のガンマセクレターゼ切断型を検出した。

【0497】

ICD3 ウサギポリクローナル抗体の生成

免疫付与および陰性選択 (欠失ペプチド) のために使用したペプチドを示す。

免疫付与ペプチド: $H_2N-VMVARRK(dPEG4)-C$ アミド (配列番号 278)

欠失ペプチド: $Ac-VILVLGVMVARRK(dPEG4)-C$ アミド (配列番号 279)。ウサギポリクローナル抗体を標準的手順を使用して Covance にて生成した。簡潔に述べると、77 日プロトコルを、500 μg の免疫ペプチドおよびフロイントアジュバントによる最初の追加免疫により利用した。500 μg の免疫ペプチドによるさらなる追加免疫を 21、42 および 63 日に実施した。ガンマセクレターゼ切断後、ネオエピトープではなく、Nctch3 の VMVARRK (配列番号 243) 配列を認識する非特異的抗体を欠失させるために、欠失ペプチドを陰性選択のために使用した。「陰性」親和性クロマトグラフィーによって欠失ペプチドを使用して、精製した試料を欠失させた。末端システインを使用してペプチドをカラムに結合してペプチドを適切に正しい方向に配置した。交差反応抗体を試料から取り除き、ELISA により確認した。特定のバンドが検出されたかどうかを判定するために、ウサギ由来の血清を TALL1 細胞においてウェスタンブロットによって試験した。

【0498】

ウサギポリクローナル ICD3 抗体のウサギモノクローナル抗体への変換

ウサギポリクローナル抗体をウサギモノクローナル抗体へ変換するために、免疫ペプチドの最後の IV 追加免疫を、選択したウサギで実施した。4 日後、脾臓摘出を実施し、ウサギハイブリドーマを Epitomics において標準的手順によって生成した。簡潔に述べると、1 匹のウサギの脾臓由来の全てのリンパ球を単離した。40 $\times$ 96 ウェルプレ

ートの融合および標準的なELISAスクリーニングを実施した。全てのELISA陽性ハイブリドーマを24ウェルプレートまで増やし、免疫ペプチドおよび欠失ペプチドの両方を用いてELISAを再び実施した。139個の陽性ハイブリドーマ由来の上清をTALL-1細胞におけるウェスタンブロッティングによって分析した。ELISA陽性ハイブリドーマのウェスタンスクリーニングに基づいて、3個のハイブリドーマ(73、128、95)をサブクロニングのために選択した。ハイブリドーマをサブクロニングするために、選択した親ハイブリドーマの限界希釈(0.5個の細胞/ウェル)を実施し、これらのサブクロンを4×96ウェルプレートに置いた。免疫ペプチドおよび欠失ペプチドの両方を使用してELISAによってサブクロンを再びスクリーニングした。クロンを24ウェルプレートまで増やし、ELISA陽性サブクロン由来の上清をTALL-1細胞におけるウェスタンブロッティングによってスクリーニングした。3個のサブクロンからの例示的なウェスタンデータを示す。

【0499】

ICD3抗体を使用したNotch3シグナル伝達阻害の*in vitro*スクリーニング

Notch3 ICDを標的とする抗体を使用して経路活性を評価した。細胞株TALL-1はDSMZから購入し、10%FBSおよび1%ペニシリンーストレプトマイシンを補足した増殖培地中で通常のように維持した。実験設定: 500万個のTALL-1細胞を25cm²組織培養フラスコ(Corning、カタログ番号430639)内の10mLの培地中に播種した。細胞を0.5%DMSOまたは10μM DAPT(Calbiochem、カタログ番号565770)のいずれかで72時間処置した。TALL-1細胞を沈降させ、次いでPBS中で洗浄した。N-エチルマレイミド(Thermo Scientific、カタログ番号23030)およびプロテアーゼおよびホスファターゼ阻害剤(Pierce、カタログ番号78444)を加えることにより、細胞を60μLの1X細胞溶解緩衝液(CST、カタログ番号9803)中で溶解させた。BCA法を使用してタンパク質定量を実施し、Spectramax M5マイクロプレートリーダーで読み取った。30μLのタンパク質試料を4~12%のBis-Trisゲル(Invitrogen、カタログ番号NP0006-1)中にウェルごとに充填した。

【0500】

SDS-PAGE: 180Vにて約90分間、1XNuPage MOPS SDSランニング緩衝液(Invitrogen、カタログ番号NP0001)中で標準的な条件下で試料を流した。ニトロセルロース膜(iBlot、Invitrogen)に移す前に、ゲルを、20%メタノールを有する2×トランスファー緩衝液(Invitrogen、カタログ番号NP0006-1)中に浸した。膜を4%ミルク-TBST中で1時間遮断し、ハイブリドーマ上清由来の上清を2%ミルク-TBST中で1:4に希釈し、穏やかに振盪しながら4℃にてON、インキュベートした。TBSTによる一連の膜の洗浄後、二次抗体を45分間2%ミルク-TBST中に加えた。ECL Plus Western Detection System(GE healthcare、カタログ番号RPN2232)を使用して膜を発展させた。

【0501】

ICD3抗体によるT細胞急性リンパ性白血病細胞株のパネルのスクリーニング

細胞株TALL-1(#ACC521)、RPMI8402(#ACC290)、DND41(#ACC525)、SUPT11(#ACC605)およびP12-Ichikawa(#ACC34)はDSMZから購入し、10%FBSおよび1%ペニシリンーストレプトマイシンを補足した増殖培地中で通常のように維持した。細胞株HPB-ALLおよびJurkat細胞はAndreas Strasser(Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research、オーストラリアから商業的に得た。500万個のTALL-1細胞を25cm²組織培養フラスコ(Corning、カタログ番号430639)中の10mLの培地に入れた。細胞を沈降させ、次いでPBS中で洗浄した。細胞を溶解し、ウェスタンを上記のよう

10

20

30

40

50

に実施した。ハイブリドーマサブクローン 73-8 からの精製した抗体を 1 : 5000 希釈にてさらなる研究のために使用した、この抗体は本明細書以下において「ICD3 Ab」と称し、その配列を表 2 に詳述する。1 : 1000 の希釈にて Cell Signaling (#2421) からの抗体を使用して ICD1 タンパク質レベルを評価した。

【0502】

概要および考察

図 12A~B に示されるように、高レベルの ICD3 タンパク質を、他の T 細胞急性リンパ性白血病細胞株のパネルではなく、TALL-1 細胞のみにおいて検出した。高い ICD1 レベルは、Notch1 において突然変異を活性化することが知られている、HPBAL、RPMI-8402、DND41、P12 Ichikawa および Jurkat を含むいくつかの TALL 株において検出できる (Weng et al. (2004) Science 306:269-71)。ICD3 抗体は、Notch1 突然変異を有するこれらの他の TALL 株におけるシグナルの欠如により証明されるように ICD1 と交差反応しない。

【0503】

〔実施例 9〕

抗体処置による Notch3 シグナル伝達阻害の *in vitro* での評価

CCE 株のパネルにおける Notch3 突然変異状態の評価により、NRR 突然変異を有する TALL-1 および PEST ドメイン突然変異を有する MDA-MB468 が識別された。MDA-MB468 細胞はアミノ酸 2034 においてフレームシフト突然変異を有し、これにより早期停止コドンの導入を生じる。したがって、ICD3 はウェスタンブロットでより速く移動しているバンドとして検出され得る変化した分子量を有する。

【0504】

WT および MDA-MB468 PEST ドメインの部分の配列：

WT Notch3 配列 (NP_000426) アミノ酸 2034 末端

【化 10-1】

PSGPRSPPGHGLGPLLCPGAFPLGLKAAQSGSKSRPPGKAGLGPQGPRGRGKKL
TLACPGPLADSSVTLSPVDSLSPRPFPGPPASPGGFLEGPYAAATATAVSLAQLGGP

【化 10-2】

GRAGLGRQPPGGCVLSLGLLNPAVPLDWARLPPAPPGPSFLLPLAPGPQLLNPGTP
VSPQERPPPYLAVPGHGEEYPAAGAHSSPPKARFLRVPSEHPYLTPSPESPEHWASPS
PSLSDWSESTPSPATATGAMATTTGALPAQPLPSVPSSLAQAQTQLGPQPEVTPKRQ
VLA (配列番号: 280)

【0505】

MDA-MB468 配列 アミノ酸 2034 末端

【化 11】

PSGPRSPRSPRGASALSSRGLPPWPQSGTVGVQEEQEAPREGGAGAAGAPGAGQE
ADAGLPGGP. (配列番号: 281)

最初にこれらの 2 個の細胞株モデルを使用して Notch3 シグナル伝達に対する Notch3 阻害抗体の効果を特徴付けた。ICD3 抗体によるウェスタンブロットを使用してシグナル伝達阻害をモニターした。実験設定：100 万個の MDA-MB468 細胞を 60 mm ディッシュ (Corning、カタログ番号 430196) 内の 3 mL の培地中に入れたか、または 500 万個の TALL-1 細胞を 25 cm² 組織培養フラスコ (Corning、カタログ番号 430639) 内の 10 mL の培地中に入れた。10 µg/mL の最終濃度の Notch3 阻害抗体 20337、20350、20358 および 208

02ならびにIgG対照で処置する前にプレートを37℃にて一晚インキュベートした。抗体をプレートに直接加え、それらを37℃、5%CO₂にて72時間、さらにインキュベートした。加えて、いくつかの細胞を0.5%DMSOまたは10μM DAPT (Calbiochem、カタログ番号565770)のいずれかで72時間処置した。培地を吸引し、1mLのPBS (Gibco、カタログ番号20012-027)中でリンスし、プレートから細胞を剥がし、ベンチ上部の遠心分離機で沈降させることによって細胞を収集した。懸濁細胞を沈降させ、次いでPBS中で洗浄した。ウェスタンブロットを以前に記載されたように精製したICD3抗体で実施した。

【0506】

加えて、3個の他の細胞株を、Notch3抗体処置によるICD3レベルおよびシグナル伝達阻害について特徴付けした：－(i) Ishikawaheraklio02__ERはN1597RにてNRR突然変異を有し、(ii) A549は2034にてPESTフレームシフト突然変異を有し、一方(iii) TE-11は2260にてPESTフレームワークシフト突然変異を有する。

【0507】

概要および考察

図13A～Bに示されるように、以前に記載されたリガンド駆動RGAおよびNotch標的遺伝子mRNA定量に加えて、ICD3のレベルを測定することによってNotch3シグナル伝達もモニターできる。ICD3レベルはNotch3シグナル伝達活性の膜近接読み出し値である。Notch抗体20337、20350、20358によるTALL-1細胞の処置により、減少したレベルのICD3が生じた。ICD3のレベルはIgG対照試料およびDMSO試料において同等であった。このデータはこれらの抗体による処置のときのDeltex1 mRNAおよびTALL-1増殖の阻害と一致する。対照的に、ICD3レベルに対する効果は12229処置により検出されなかった。図13Bに示されるように、MDA-MB468細胞において、アミノ酸2034におけるフレームシフト突然変異により、早期停止コドンおよびより小さなICD3が生じる。このICD3はウェスタンブロットで、より速く移動しているバンドとして検出され得る。Notch3 NRR抗体20337、20350、20358で処置すると、減少したレベルのICD3が検出された。対照的に、20802、LBD抗体による処置は対照IgGと比べてICDレベルが変化しなかった。図14A～Cに示されるように、Ishikawaheraklio02__ER、TE-11およびA549細胞におけるNotch3抗体処置のときに、ICD3レベルに対する様々な効果が検出された。しかしながら、試験した全ての細胞株において、20350処置は一貫して顕著に減少したICD3レベルを生じた。

【0508】

〔実施例10〕

Notch3増幅細胞株における抗体処置によるNotch3シグナル伝達阻害のin vitroでの評価

HCC1143細胞はNotch3を増幅することが記載されていた(Yamaguchi et al. (2008) Cancer Res. 68:1881-1888)。活性Notch3シグナル伝達のレベルを、ICD3抗体を使用してこの細胞株において試験した。ICD3抗体によるウェスタンブロットを使用してシグナル伝達阻害をモニターした。

【0509】

実験設定：100万個のHCC1143細胞を、25cm²組織培養フラスコ(Corning、カタログ番号430639)内の60mmディッシュ(Corning、カタログ番号430196)内の3mLの培地中に入れた。プレートを、10μg/mLの最終濃度のNotch3阻害抗体20337、20350、20358および20802ならびにIgG対照で処置する前に37℃にて一晚インキュベートした。抗体をプレートに直接加え、それらを37℃、5%CO₂にて72時間、さらにインキュベートした。細胞を収集し、ウェスタンブロットを以前に記載されたように実施した。

【0510】

概要および考察

図15に示されるように、HCC1143細胞をNotch3について増幅させると、高レベルのICD3を示す。全てのNotch3抗体処置により、減少したICD3レベルが生じた。10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ にて、20350処理により、ICD3レベルの最大の低下が生じた。

【0511】

〔実施例11〕

in vivoでのPD評価

PD調節を、Notch3において遺伝子異常 (abberations) を有する3つの異種移植モデル：NRR突然変異TALL-1ヒト白血球モデル、PEST突然変異MDA-MB-468ヒト胸部モデルおよびNotch3が増幅したHLUX1823患者由来の肺モデルにおいて調べた。

【0512】

TALL-1ヒト白血病異種移植モデルにおけるin vivoでのPD

TALL-1異種移植片を有するメスのSCIDベージュ色マウスを単回用量のNotch3抗体で処置した。ハンクス平衡塩類溶液の懸濁液中の 10×10^6 個の細胞をマウスに皮下注射により接種した。腫瘍が300から500 mm^3 の間 ($n=3$ /群) に到達すると、マウスを無作為に割り当てて、20 mg/kg 用量の3207 (IgG対照)、20350、20358または20802を単回で静脈内に与えた。処置後、腫瘍を、選択した時点で収集し、ICD3を以下に記載されるようにウェスタンブロットおよびIHCにより評価した。

【0513】

MDA-MB-468ヒト乳癌異種移植モデルにおけるin vivoでのPD

MDA-MB-468異種移植片を有するメスのSCIDベージュ色マウスを単回用量のNotch3抗体で処置した。3 $\times$ 3 $\times$ 3 mm^3 の腫瘍断片をMDA-MB-468腫瘍保有マウス (ドナー) から継代し、左および右脇腹の両方でSCIDベージュ色レシピエントマウス内に皮下移植した。腫瘍が300から500 mm^3 の間 ($n=3$ /群) に到達すると、マウスを無作為に未処置の対照群に割り当てたか、または20 mg/kg 用量の20350を単回で静脈内に与えた。さらなる研究において、PBSまたは3207非標的化IgG対照と比べて20 mg/kg 用量の20350、20358、20337および20802の単回静脈内注射の効果を評価した。種々の処置後、腫瘍を収集し、ICD3を以下に記載されるようにウェスタンブロットにより評価した。

【0514】

HLUX1823患者由来の肺癌異種移植モデルにおけるin vivoでのPD

抗Notch3抗体の活性もまた、Notch3が増幅した患者由来の原発性肺癌腫瘍異種移植モデル、HLUX-1823において評価した。これらの研究において、DME M中に50%フェノールレッドフリーマトリゲル (BD Biosciences) を含有する3 $\times$ 3 $\times$ 3 mm^3 の腫瘍断片をnu/nuマウスに皮下移植すると、移植後30日で約250 mm^3 に到達した。腫瘍が300から500 mm^3 の間 ($n=3$ /群) に到達すると、マウスを無作為に割り当てて、PBSまたは3207非標的化IgG対照抗体もしくは20358もしくは12229 (20364および20802が由来する親抗体) のいずれかの単回の20 mg/kg の静脈内用量のいずれかを与えた。種々の処置後、腫瘍を収集し、ICD3を以下に記載されるようにウェスタンブロットにより評価した。

【0515】

腫瘍細胞溶解物の調製およびICD3ウェスタン

腫瘍試料を、30 Hzにて1分間、Tissue Lyser II (Qiagen) を使用して完全ミニEDTAフリープロテアーゼ阻害剤カクテル錠剤 (Roche、カタログ番号04693159001) を有する200~400 μL のT-PER組織タンパク質抽出試薬 (Pierce、カタログ番号78510) に溶解した。1つの5 mmステ

10

20

30

40

50

ンレス銅ビーズ (Q i a g e n、カタログ番号 6 9 9 6 5) を組織溶解に役立つようにチューブごとに置いた。ビーズ除去後、次いで試料を、4℃にて15分間最高速度で、ベント上部の遠心分離機で遠心分離した。上清を回収し、後の時間の研究のための-80℃またはBAC法 (P i e r c e、カタログ番号 2 3 2 5 5 0) を使用して評価したタンパク質濃度のいずれかで保存し、ICD3についてのウェスタンブロットを以前に記載されたように実施した。適用可能な場合、ウェスタンをもた、完全長N o t c h 3抗体で実施して全レベルのN o t c h 3 (C e l l S i g n a l i n g # 2 8 8 9、1:1000希釈) を検出した。

【0516】

IHCによるICD3レベルの検出

異種移植腫瘍を10%ホルマリン中で固定し、パラフィンに包埋した。5μm切片を荷電したポリリシンでコーティングしたスライドガラス上に置いた。免疫組織化学プロトコルを自動システムD i s c o v e r y U L T R A (V e n t a n a M e d i c a l S y s t e m) で最適化した。

【0517】

切片を60℃にて8分間ベークし、続いて脱パラフィン化した (deparaffination)。抗原回復を、76分間高温にて、C e l l C o n d i t i o n i n g 1 (C C 1、わずかに塩基性pHを有するT R I S系緩衝液) において達成した。抗原の非特異的結合の遮断を、特異的A n t i b o d y B l o c k i n g (カタログ番号 7 6 0 - 4 2 0 4) を使用して継続した。一次抗体N o t c h 3 I C D (20μg/ml) を37℃にて60分間インキュベートし、続いて二次抗体を32分間インキュベートした。製造業者の仕様書に従って特異的D i s c o v e r y A m p l i f i c a t i o n H Q キット # 7 6 0 - 0 5 2 (V e n t a n a M e d i c a l S y s t e m s) を使用して増幅ステップを実施した。検出をジアミノベンジジン (diaminobenzidine) (D A B) を用いて達成し、ヘマトキシリンを用いて対比染色した。全てのこれらのステップはV e n t a n a D i s c o v e r y U L T R A (V e n t a n a M e d i c a l S y s t e m s) で実施した。

【0518】

概要および考察

図16~18はいくつかの異種移植モデルにおけるin vivoでのPD研究を示す。本出願の上記に記載されたように、N o t c h 3抗体を用いたT A L L - 1細胞のin vitroでの処置により、D e l t e x 1 mRNAレベルおよびICD3タンパク質レベルの両方によって評価されるようにシグナル伝達の障害が生じた。T A L L - 1細胞を異種移植片として増殖させ、マウスをN o t c h 3抗体で処置した。T A L L - 1腫瘍におけるN o t c h 3シグナル伝達の変化を、ウェスタンブロットティングまたはIHCによってICD3レベルを評価することによってモニターした。抗体20350または20358での処置により、図16A~Bに示されるように減少したレベルのICD3が生じた。IHCによるICD3染色は図16Bに示されるように腫瘍切片における黒/濃い灰色の細胞により示される。腫瘍におけるICD3レベルを最後のN o t c h 3抗体投与の72時間後に評価し、まだいくつかの細胞が、強いICD3発現を示した腫瘍内に存在した。M D A - M B 4 6 8モデルにおいて、ウェスタンブロットティングによって評価されるように、20350で処置した動物は、未処置の対照マウスと比べて、投与の24時間および72時間後にICD3の顕著な減少を生じた (図17A)。72時間の時点で、20350、20358および20337 (これらの全てはN o t c h 3 N R Rを標的とする) は、P B Sおよび3207 (I g G) 対照と比べて、ICD3レベルの減少を誘導した。対照的に、20802 (これはN R Rの外側のN o t c h 3の領域を標的とする) による処置後、ICD3レベルは対照レベルと同様に見える (図17B)。H L U X 1 8 2 3 N o t c h 3 - 遺伝子増幅モデルにおいて、ウェスタンブロットティングによって評価されるように、20358または12229のいずれかで処置した動物は、対照マウスと比べて、投与の72時間後にICD3の顕著な減少を生じた (図18)。まとめると、

10

20

30

40

50

これらのデータは、N o t c h 3 N R R 抗体が、N R R または P E S T ドメインのいずれかにおける N o t c h 3 遺伝子増幅または突然変異の存在下で N o t c h 3 シグナル伝達を阻害できるのに対して、この領域の外側で増加した N o t c h 3 抗体は遺伝子増幅の存在下で N o t c h 3 シグナル伝達のみを阻害でき、突然変異の存在下で、より限定された活性を有することを実証している。

【0519】

〔実施例12〕

T A L L - 1 異種移植片における i n v i v o での効果

ルシフェラーゼを構成的に発現する T A L L - 1 細胞株の生成

T A L L - 1 細胞株に p M M P - L u c N e o レトロウイルス (U S 7 3 9 9 8 5 1 を参照のこと) を形質導入し、数週間、1 m g / m L のジェネティシン (G 4 1 8) 中で選択した。T A L L - 1 _ L u c 細胞は、このレトロウイルスが不在であった T A L L - 1 細胞と比較して高レベルのルシフェラーゼを発現する。野生型およびルシフェラーゼ型 (luciferased) 細胞を、N o t c h 3 抗体阻害剤を用いた増殖実験に供すると、同一の結果を示し、感染が N o t c h 3 阻害に対する T A L L - 1 感受性を妨げなかったことが示唆される。

10

【0520】

T A L L - 1 細胞株異種移植モデルにおける N o t c h 3 抗体の i n v i v o 活性の評価

ハンス平衡塩類溶液の懸濁液中の 10×10^6 個の T - A L L 1 _ L u c 細胞を皮下注射によりマウスに接種し、X e n o g e n i n v i v o 画像化システム (C a l i p e r L i f e S c i e n c e s) を使用して腫瘍の存在をモニターした。腫瘍の存在は7日までに検出可能であった。11日目に、腫瘍保有動物を無作為に割り当てて、1週間に2回、単一の薬剤として、静脈内用量の P B S あるいは 20 m g / k g の 3 2 0 7 陰性対照 I g G 抗体または N o t c h 3 抗体 2 0 3 3 7、2 0 3 5 0、2 0 3 5 8 もしくは 2 0 8 0 2 のいずれかを与えた。X e n o g e n i n v i v o 画像化システムを使用して腫瘍サイズをモニターした。

20

【0521】

概要および考察

図19に示されるように、2 0 3 5 8 および 2 0 3 5 0 は、この研究において評価した抗体の最大の抗腫瘍活性を示した。図19Aは、研究の時間的経過にわたる種々の処置後に得た発光シグナルのグラフ表示を示し、図19Bは、29日 (腫瘍サイズに起因して画像化することが可能であった最後の時点) における対照群および43日における抗 N o t c h 3 抗体処置群の発光シグナルを示す。

30

【0522】

〔実施例13〕

B i a c o r e を用いた N R R N o t c h 3 抗体のエピトープビニング

B i a c o r e によるエピトープビニングを実施して N o t c h 3 抗体 (I g G または F a b 断片) を同一または顕著に重なるエピトープ、すなわち互いの結合を阻害できる抗体の群に分類した。

40

【0523】

B i a c o r e を用いた実験設定エピトープビニング

B i a c o r e におけるエピトープビニングのために、低密度の固定化または捕捉抗原を有するセンサーチップを使用した (速度実験に相当する)。K D 判定に関して同じ試料の必要条件を適用した (すなわち単量体含有量)。チップの調製 (抗原固定化 / 捕捉) に関する実験条件および再生条件は B i a c o r e における K D 判定と同一であった。エピトープの飽和を達成するために、1つの抗体につき1つの (高い) 濃度のみを使用した (例えば、90秒間 250 n M) 。

【0524】

抗体試料を、完全要因アッセイ設計においてペアワイズ、例えば2つの抗体試料、A お

50

よび B について注入し、以下のペアワイズの注入を必要とした：A－A、A－B、B－A、B－B。

【0525】

センサーチップは第1の注入により抗体で飽和されなければならないので、第2の抗体は異なるエピトープの場合にのみ結合できた。結合抗体の完全な再生は各々の二重注入の後に実施されなければならないかった。

【0526】

対照、すなわち同一の抗体（A－A、B－B）の二重注入の評価のために、各々の注入の最後におけるそれらの結合レベルを評価した：第2の注入はさらなる結合を与えないと予想された。異なる抗体試料対の二重注入を整合性のために比較した。例えば注入A－Bにより、B（異なるエピトープ）のさらなる結合が生じる場合、B－Aの注入もAのさらなる結合を生じると予想された。

【0527】

このような不一致を生じることについての起こり得る原因は、例えば、部分的に重なるエピトープまたはKDの大きな相違であった。

【0528】

概要および考察：

全てのペアワイズ抗体注入の評価をまとめている図20を編纂し、これによりエピトープ群またはビンが判断され得るそれらの相互阻害状態が示される。これらの研究に基づいて、ファージディスプレイスクリーニングから識別されたNRR抗体が異なるコンフォメーションエピトープを有することが決定された。図20に示されるように、20345が最初に加えられ、続いて20350または20351のいずれかが加えられた場合、さらなる結合は検出されなかった。実験においてどの抗体が最初に加えられたかに関係なく同様の情報を得た。したがって、20345、20350および20351は重なるエピトープを有し、それは濃い灰色の陰影で表に指定されている。このエピトープはNRR__Bと定義される。20337が最初に加えられた場合、Biacoreへのさらなる結合が、二番目に加えられる以下の抗体：20345、20350、20351、20358およびA4のいずれかで検出され得る。2つの抗体の添加の順序が逆転された場合、同じ結論に達した。したがって、20337は、試験される他の抗体のいずれかに対する異なるエピトープを有し、エピトープNRR__Aと指定された。20358が最初に加えられた場合、さらなる結合を20337、20345、20350および20351で検出した。2つの抗体の添加の順序が逆転された場合、同じ結論に達した。したがって、20358は、試験されるこれらの他の抗体に対する異なるエピトープを有し、エピトープNRR__Cと指定された。対照的に、20358が最初に加えられ、A4が二番目に加えられた場合、最小のさらなる結合が存在した（概要表において薄い灰色の陰影を有する細胞を参照のこと）。この結果をさらなるBiacore研究においてさらに確認した。これらの実験において、A4または20358のいずれかを適切なセンサーチップに固定し、Notch3 NRR（配列番号282）を表面上に流し、センサー表面に固定せず、Notch3 NRRに結合する他の抗体の能力を評価した。これらのアッセイ条件下で、20358は、固定化A4に結合したNotch3に結合できること、およびA4もまた、センサー表面上で固定化20358に結合したNotch3に結合できることが見出された。このデータは、実施した他の研究ならびにA4および20358がNotch3 NRR内の異なるエピトープに結合するという結論と完全に一致する。さらに、A4が最初に加えられた場合、さらなる結合を、以下の抗体：20337、20345、20350、20351を二番目に加えた場合に検出した。2つの抗体の添加の順序が逆転された場合、同じ結論に達した。したがって、A4は、20337、20345、20350、20351に対する異なるエピトープを有し、エピトープNRR__Dと指定された。

【0529】

【実施例14】

20350およびNRRならびに20358およびNRRを用いた共結晶構造研究

10

20

30

40

50

20350または20358のFab断片に結合したヒトNotch3陰性調節領域（NR R、配列番号282）の2つの結晶構造を決定した。以下に詳述されるように、Notch3 NR Rを発現し、精製し、20350または20358 Fabと混合して複合体を形成した。タンパク質結晶学を利用し、20350または20358 Fabのそれぞれに結合したNotch3 NR Rについての原子分解データを生成して、それらのエピトープを（抗体残基まで5 Å距離内のNotch3 NR R残基として）定義した。

【0530】

タンパク質産生

結晶学のために産生したNotch3 NR R、20350 Fabおよび20358 Fabの配列を以下に示す。Notch3 NR Rの構築物は、組換え発現ベクター（小文字で示される、配列番号282）由来のNおよびC末端残基と共に、ヒトNotch3（UniProt識別子Q9UM47、配列番号1）の残基1378～1640（下線）を含む。マウスIgGカップ軽鎖由来のN末端シグナル配列を分泌発現のために使用し、発現の間に切断し、Notch3 NR RのインタクトなN末端を残した。20350および20358 Fabについて、重鎖および軽鎖の配列を示す（配列番号－6 283、284、285および286）。

10

【0531】

結晶構造決定のために使用したタンパク質
構築物：

ヒトNotch3 NR R（Q9UM47）

20

【化12-1】

MGP GARGRRRRRRPMSPPPPPPVRALPLLLLLAGPGAAAPPCLDGSPCANGGRCTQ
LPSREAAACLCPPGWVGERCQLEDPC HSGPCAGRGVCQSSV VAGTARFSCRCPRGFRG
PDCSLPDCLSSPCA HGARCSVGP DGRFLCSCPPGYQGRSCRSDVDECRVGEPCR HGG
TCLNTPGSFRCQCPAGYTG PLCENPAVPCAPSPCRNGGTCRQSGDLTYDCACLPGFEG
QNCEVNVD DCPGHRCLNGGTCVDGVNTYNCQCPPEWTGQFCTEDVDECQLQPNAC
HNGGTCFNTLGGHSCVCVNGWTGESCSQNIDDCATAVCFHGATCHDRVASFYCACP
MGKTGLLCHLDDACVSNPCHEDAICDTNPVNGRAICTCPPGFTGGACDQDVDECSIG
ANPCEHLGRCVNTQGSFLCQCGRGYTGPRCETDVNECLSGPCR NQATCLDRIGQFTCI
CMAGFTGTyceVDIDECQSSPCVNGGVCKDRVNGFSCTCPSGFSGSTCQLDVDECAS
TPCRNGAKCVDQPDGYECRCAEGFEGTLCDRNVDDCSPDPCHHGRCVDG IASFSCAC
APGYTGTRCESQVDECRSQPCR HGGKCLDLVDKYLRCPSGTTGVNCEVNIDDCASN
PCTFGVCRDGINRYDCVCQPGFTGPLCNVEINECASSPCGEGGSCVDGENGFRC LCPP

30

【化 1 2 - 2】

GSLPPLCLPPSHPCAHEPCSHGICYDAPGGFRCVCEPGWSGPRCSQSLARDACESQPC
 RAGGTCSSDGMGFHCTCPPGVQGRQCELLSPCTPNPCEHGGRCESAPGQLPVCSCPQ
 GWQGPRCQQDVEDECAGPAPCGPHGICTNLGSFSCTCHGGYTGPSCDQDINDCDPNP
 CLNGGSCQDGVGSFSCSCLPGFAGPRCARDVDECLSNPCGPGTCTDHVASFTCTCPPG
 YGGFHCEQDLPCDSSCFNGGTCTVDGVNSFSCLCRPGYTGAHCQHEADPCLSRPCL
 HGGVCSAAHPGFRCTCLESFTGPQCQTLVDWCSRQPCQNGGRCVQTGAYCLCPPGW
 SGRLCDIRSLPCREAAAQIGVRLEQLCQAGGQCVDDEDSSHVCVCEGRTGSHCEQEV
 DPCLAQPCQHGGTCRGYMGGYMCECLPGYNGDNCEDDVDECASQPCQHGGSCIDL
 VARYLCSPPGTGLVLCINEDDCGPGPLDSGPRCLHNGTCVDLVGGFRCTCPPGYT
 GLRCEADINECRSGACHAAHTRDCLQDPGGGFRCLCHAGFSGPRCQTVLSPCESQPC
 QHGGQCRPSPGPGGLTFTCHCAQPFWGP RCERVARSCRELQCPVGVPCQQTTPRGPR
 CACPPGLSGPSCRSFPGSPPGASNASCAAAPCLHGGSCRPA LAPFFRCACAQGWTP
 RCEAPAAAPEVSEEPRCPRACQAKRGDQRCDRECNSPGCGWDGGDCSLSVGDPWR
QCEALQCWRLFNNSRCDPACSSPACLYDNFDCHAGGRERTCNPVYEKYCADHFADG
RCDQGCNTEECGWDGLDCASEVPALLARGVLVLTVLLPPEELLRSSADFLQRLSAILR
TSLRFRLDAGHQAMVFPYHRPSPGSEPRARRELAPEVIGSVVMLEIDNRLCLQSPEND
 HCFPDAQSAADYLGALSAVERLDFPYPLRDVRGEPEPEPSVPLPLLVAGAVLLL
 ILVLGVMVARRKREHSTLWFPEGFSLHKDVASGHKGRREPVGQDALGMKNMAKGE
 SLMGEVATDWMDETECAKRLKVEEPMGAEEAVDCRQWTQHHLVAADIRVAPA
 MALTPPQGDADADGMDVNVVRGPDGFTPLMLASF CGGALEPMPTEEDEADDTASIIIS
 DLICQGAQLGARTDRTGETALHLAARYARADA AKRLLDAGADTNAQDHSGRTPLHT
 AVTADAQGVFQILIRNRSTDLDARMADGSTALILAAARLAVEGMVEELIASHADVNAV
 DELGKSALHWAAA VNNVEATLALLKNGANKDMQDSKEETPLFLAAREGSYEA AKL
 LLDHFANREITDHLDRLPDVAQERLHQDIVRLLDQPSGPRSPPGPHGLGPLLCPGAF
 LPGLKAAQSGSKSRRPPGKAGLGPQGPRGRGKLTACPGPLADSSVTLSPVDSLDS
 PRPFGGPPASPGGFLEGPYAAATATAVSLAQLGGPGRAGLGRQPPGGCVLSLGLLNP
 VAVPLDWARLPPPAPPGSFLPLAPGPQLLNPGTPVSPQERPPPYLAVPGHGEEYPA
 AGAHSSPPKARFLRVPSEHPYLTPSPESPEHWASPSPPSLSDWSESTPSPATATGAMAT
 TTGALPAQPLPLSVPSLAQAQTQLGPQPEVTPKRQVLA (配列番号: 1)

10

20

30

【0 5 3 2】

N o t c h 3 N R R

【化 1 3 - 1】

metdtlllwwlllwwpgstgAPEVSEEPRCPRACQAKRGDQRCDRECNSPGCGWDGGDCSL
 VGDWPWRQCEALQCWRLFNNSRCDPACSSPACLYDNFDCHAGGRERTCNPVYEKYC

40

【化 1 3 - 2】

ADHFADGRCDQGCNTEECGWDGLDCASEVPALLARGVLVLTVLLPPEELLRSSADFL
 QRLSAILRTSLRFR

LDAGHQAMVFPYHRPSPGSEPRARRELAPEVIGSVVMLEIDNRL
 CLQSPENDHCFPDAQSAADYLGALSAVERLDFPYPLRDVRGEPEPEPSgshhhhhh
 (配列番号: 282)

【0 5 3 3】

2 0 3 5 0 F a b 重鎖

【化 1 4】

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYTISWVRQAPGQGLEWMGWIKPRW
 GAAHYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGSFWFGYWGQGL
 VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
 PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH (配列
 番号: 283)

【0 5 3 4】

2 0 3 5 0 F a b 軽鎖

10

【化 1 5】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGINNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASKLQSGV
 PSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLQYPMTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI
 FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS
 LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号: 284)

【0 5 3 5】

2 0 3 5 8 F a b 重鎖

【化 1 6】

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFRTYAMHWVRQAPGQGLEWMGGIVPYH
 GITDYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDYSTYAFAYWGQ
 GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
 HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH
 (配列番号: 285)

20

【0 5 3 6】

2 0 3 5 8 F a b 軽鎖

【化 1 7】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIASYLAWYQQKPGKAPKLLIYDASNLQSGV
 PSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQAYKTPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIF
 PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL
 SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 286)

30

【0 5 3 7】

Notch3 NRRの産生

Notch3 NRRをHEK293S GnTI-細胞(ATCC)において分泌タンパク質として発現した。1mgのNotch3 NRR構築物DNAを50mlのOptiMEMI培地(Life Technologies)中で希釈し、30分間、50mlの同じ培地中で2.5mgのPEI(Polysciences)とインキュベートした。次いで混合物を、トランスフェクションのために8%のCO₂で37℃にて、100万個の細胞/mlでFreeStyle(商標)293発現培地(Life Technologies)中の懸濁液中で増殖する1LのHEK293S GnTI-細胞内に加えた。72時間後、Notch3 NRRを含有する培地を遠心分離により収集した。3mlのNi-NTA Superflow樹脂(Qiagen)を培地中に加え、4℃にて一晚連続して攪拌した。翌日、樹脂を重力カラム内に充填し、50mM Hepes pH7.4、500mM NaCl、20mMイミダゾールで洗浄した。標的タンパク質を同じ緩衝液および300mMイミダゾールで溶出し、4℃にて一晚、20mM He

40

50

p e s p H 7 . 4、1 5 0 m M N a C l、1 0 m M C a C l₂ 中で透析した。次いでタンパク質を 1 m g / m l に濃縮し、5 0 m M T r i s p H 8 . 0、1 0 m M C a C l₂（緩衝液 A）で 3 倍に希釈した。希釈したタンパク質を、緩衝液 A および 4 % の 5 0 m M T r i s p H 8 . 0、1 M C a C l₂ および 1 0 m M C a C l₂（緩衝液 B）中で平衡化した H i T r a p Q H P カラム（G E H e a l t h c a r e）上に負荷した。Q カラムを緩衝液 A および 2 % ~ 1 0 0 % の緩衝液 B の勾配により溶出した。N o t c h 3 N R R を含有する主要ピークを収集し、4 °C にて一晩、3 0 単位 / m g の標的タンパク質にてフーリン（N E B）で処置した。次いで、フーリン処置したタンパク質を濃縮し、2 0 m M H e p e s p H 7 . 4、1 5 0 m M N a C l 中で平衡化した S u p e r d e x 7 5 1 0 / 3 0 0 G L（G E H e a l t h c a r e）上に負荷した。ピーク画分を S D S - P A G E および L C M S により分析し、プールして F a b と複合体化した。

10

【0538】

2 0 3 5 0 および 2 0 3 5 8 F a b の産生

1 0 0 万個の細胞 / m l にて増殖する 1 L の H E K 2 9 3 F 細胞（L i f e T e c h n o l o g i e s）に、3 日間、2 0 3 5 0（または 2 0 3 5 8）の完全長 I g G を含有する 1 m g の D N A 構築物をトランスフェクトした。完全長 I g G を、製造業者のプロトコールに従って P r o S e p - v A 大容量クロマトグラフィー媒体樹脂（M i l l i p o r e）によって培地から精製した。次いで精製した I g G を固定化パバイン（P i e r c e）により消化して F a b 断片を生成した。具体的には、2 0 m M リン酸ナトリウム p H 7 . 0 および 1 0 m M E D T A 中で 2 0 m g / m l にて I g G を 8 0 : 1 の重量比にて固定化パバインと混合した。混合物を 3 7 °C にて一晩 1 5 m l チューブ中で回転させた。翌日、固定化パバインを重力流カラムにより除去し、F a b および F c セグメントの両方を含有するフロースルーを収集し、H i T r a p M a b S e l e c t S U R E カラム（G E H e a l t h c a r e）上に負荷して F c セグメントを除去した。F a b 断片のみを含有する、このステップからのフロースルーを濃縮し、2 0 m M H e p e s p H 7 . 4、1 5 0 m M N a C l 中で平衡化した H i L o a d 1 6 / 6 0 S u p e r d e x 7 5（G E H e a l t h c a r e）上に負荷した。ピーク画分を S D S - P A G E および L C M S により分析し、次いでプールして N o t c h 3 N R R との複合体を形成した。

20

30

【0539】

結晶化および構造決定

N o t c h 3 N R R / 2 0 3 5 0 複合体または N o t c h 3 N R R / 2 0 3 5 8 複合体を同じように調製した。精製した N o t c h 3 N R R を 2 : 1 のモル比（L C U V により測定した濃度）で F a b と混合した。N o t c h 3 N R R / F a b 複合体を 3 0 分間氷上でインキュベートし、2 0 m M H e p e s p H 7 . 5、1 5 0 m M N a C l 中で平衡化した H i L o a d 1 6 / 6 0 S u p e r d e x 7 5（G E H e a l t h c a r e）上に負荷した。ピーク画分を S D S - P A G E および L C M S により分析した。N o t c h 3 N R R / F a b 複合体を含有する画分を、N o t c h 3 N R R / 2 0 3 5 0 複合体について約 2 5 m g / m l、または N o t c h 3 N R R / 2 0 3 5 8 複合体について 1 8 m g / m l に濃縮した。N o t c h 3 N R R / F a b 複合体を即座に遠心分離し、結晶化についてスクリーニングした。

40

【0540】

結晶をシッティングドロップ蒸気拡散法によって成長させた。具体的には、N R R / 2 0 3 5 0 複合体について、0 . 1 μ l の複合体を、0 . 1 M N a A c p H 5 . 6、1 7 . 5 % P E G 3 0 0 0 を含有する 0 . 1 μ l のリザーバー溶液と混合し、ドロップを 2 0 °C にて 4 5 μ l のリザーバー溶液に対して平衡化した。

【0541】

N R R / 2 0 3 5 8 複合体について、0 . 1 M H e p e s p H 7 . 5、1 0 % P E G 8 0 0 0、1 0 % エチレングリコールを使用し、ドロップを 2 0 °C にて 4 5 μ l のリザ

50

ーバー溶液に対して平衡化した。

【0542】

データ収集の前に、N o t c h 3 N R R / F a b 結晶を、N o t c h 3 N R R / 2 0 3 5 0 複合体についてさらに 2.5 % グリセロールを含有するリザーバー溶液に移し、または液体窒素中で即座に冷却する前に N o t c h 3 N R R / 2 0 3 5 8 複合体について 20 % エチレングリコールを含有するリザーバー溶液に移した。

【0543】

回折データを Advanced Photon Source (Argonne National Laboratory, USA) においてベースライン 17-ID にて収集した。データを処理し、HKL 2000 (HKL Research) を使用してスケールした。N o t c h 3 N R R / 2 0 3 5 0 複合体のデータを、セル寸法 $a = 91.92 \text{ \AA}$ 、 $b = 104.35 \text{ \AA}$ 、 $c = 92.85 \text{ \AA}$ 、アルファ = 90° 、ベータ = 113.17° 、ガンマ = 90° で空間群 C2 において $3.2 \text{ \AA}$ に処理した。N o t c h 3 N R R / 2 0 3 5 8 複合体のデータを、セル寸法 $a = 88.34 \text{ \AA}$ 、 $b = 123.86 \text{ \AA}$ 、 $c = 150.57 \text{ \AA}$ 、アルファ = 90° 、ベータ = 90° 、ガンマ = 90° で空間群 $P2_12_12_1$ において $2.1 \text{ \AA}$ に処理した。N o t c h 3 N R R / F a b 複合体の構造を、N o t c h 1 N R R 構造 (PDB ID: 3ETO) および検索モデルとして 20350 または 20358 F a b と最も高い配列同一性を有する社内の F a b 構造と共に P h a s e r (McCoy et al., (2007) J. Appl. Cryst. 40:658-674) を使用して分子置換によって解明した。最終的なモデルを COOT (Emsley & Cowtan (2004) Acta Cryst. 60:2126-2132) において構築し、Buster (Global Phasing, LTD) で精製した。N o t c h 3 N R R / 2 0 3 5 0 複合体について、 R_{work} および R_{free} 値はそれぞれ 23.0 % および 26.9 % であり、結合長さおよび結合角の rmsd 値はそれぞれ $0.008 \text{ \AA}$ および 1.17° であった。N o t c h 3 N R R / 2 0 3 5 8 複合体について、 R_{work} および R_{free} 値はそれぞれ 19.2 % および 22.6 % であり、結合長さおよび結合角の rmsd 値はそれぞれ $0.010 \text{ \AA}$ および 1.13° であった。

【0544】

20350 または 20358 F a b におけるいずれかの原子の $5 \text{ \AA}$ 以内に原子を含有する N o t c h 3 N R R の残基を PyMOL (Schrodinger, LLC) により識別し、表 4 および 5 に記載する。N o t c h 3 N R R と F a b との間の埋もれた表面積を CCP4 プログラムスーツからの AREA MOL により算出する (Winn et al., (2011) Acta. Cryst. D67:235-242)。

【0545】

N o t c h 3 N R R の構造

N o t c h 3 N R R の構造は、N o t c h 3 N R R / 2 0 3 5 0 複合体と N o t c h 3 N R R / 2 0 3 5 8 複合体との間で非常に類似している。2つの複合体から重ね合わせている N o t c h 3 N R R の二乗平均平方根距離 (RMSD) は $0.42 \text{ \AA}$ であり、これは N R R がほとんど同一の構造であることを示している。したがって、N o t c h 3 N R R / 2 0 3 5 8 複合体を、さらに構造を分析するための代表例として使用する。

【0546】

N o t c h 3 N R R は、N o t c h 1 (Gordan et al., (2009) Blood 113:4381-4390; Gordon et al., (2009) 4:e6613; Wu et al., (2010) Nature 464:1052-1057) および N o t c h 2 (Gordon et al., (2007) Nat Struct Mol Biol 14:295-300) のものと同様の全体のフォールディングを有する。それは、3つの Lin12 / N o t c h リピート (LNR)、すなわち LNR-A、LNR-B および LNR-C、ならびに S1 部位 (R1571 と E1572 との間) におけるフーリン切断により N 末端部分 (HD-N) および C 末端部分 (HD-C) に分けられるヘテロ二量化 (HD) ドメインからなる。

【0547】

N R R ドメインは、3つのタンパク質分解ステップに関与する N o t c h 受容体の活性

化を調節する。フーリン様転換酵素は、N o t c h 前駆体の成熟の間、N R R 内の S 1 部位で切断して、活性化を刺激する。A D A M プロテアーゼは、同様に N R R 内の S 2 部位で切断して、ガンマセクレターゼによる S 3 部位での膜内タンパク質分解のための基質を生じる。S 3 切断の後、N o t c h の細胞内部分は核に入って転写を活性化する。S 2 切断はこの活性化シリーズの重要なステップであり、N R R ドメインにより負に調節される。このいわゆる自己阻害の機構は N R R 構造により説明できる。

【0548】

図 2 1 は N o t c h 3 N R R の全体の X 線構造を示す。1) タンパク質の N および C 末端、2) 3 つの L N R リピートおよび配位 Ca^{2+} イオン、3) L 1 4 1 9、自己阻害栓、4) S 1 および S 2 部位、5) H D ドメイン内の二次構造、ならびに 6) N o t c h 1 および N o t c h 2 と顕著に異なる立体構造を有する N o t c h 3 における 2 つの領域 (L N R - B / C リンカーならびに L N R - C の前半および H D ドメインにおける $\beta 4 - \alpha 3$ ループ) が標識される。

10

【0549】

N o t c h 3 N R R 構造のように、各々 Ca^{2+} イオンを配位している 3 つの L N R は、A D A M プロテアーゼによる接近から S 2 部位を保護するために H D 周囲を包み込む。特に、L N R - A / B リンカーから保存されている L 1 4 1 9 は S 2 部位内に直接入り込み、プロテアーゼ接近からそれを立体的に塞ぐ。L N R と H D との間の相互作用およびドメイン内の相互作用の安定性は N R R の自己阻害される立体構造を維持するのに不可欠である。したがって、関連するがんに見出される突然変異のように、N R R を不安定化する突然変異は N o t c h 3 の活性化を増強できる。他方で、L N R - H D 相互作用を安定化できる抗体のような試薬は N o t c h 3 シグナル伝達を阻害できる可能性がある。

20

【0550】

図 2 2 は、N o t c h 1、N o t c h 2 および N o t c h 3 N R R の配列アラインメントを示す。1) ドメイン名および境界、2) 二次構造、3) N o t c h 3 対 N o t c h 1 および N o t c h 2 の特有に構造化された領域、ならびに 4) S 1 および S 2 部位が標識される。N o t c h 3 N R R と N o t c h 1 N R R (P D B I D : 3 I 0 8) および N o t c h 2 N R R (P D B I D : 2 O O 4) の構造的重ね合わせにより、1. 6 8 Å および 1. 4 5 Å の R M S D 値が生じ、これは同様の全体のフォールディングを示す。しかしながら、N o t c h 3 N R R のいくつかの部分は、主に 2 つの領域 L N R - B / C リンカーならびに H D ドメインにおいて L N R - C の前半 (R 1 4 6 3 - A 1 4 7 6) および $\beta 4 - \alpha 3$ ループ (C 1 5 9 1 - D 1 5 9 8) において、顕著に異なる立体構造 (R M S D 値 > 2 Å) を有する。興味深いことに、これらの 2 つの特有の領域の大部分は 2 0 3 5 0 および 2 0 3 5 8 抗体により捕捉される。詳細な相互作用は次の段落に記載される。

30

【0551】

2 0 3 5 0 および 2 0 3 5 8 に対する N o t c h 3 エピトープ
2 0 3 5 0 エピトープ

N o t c h 3 N R R / 2 0 3 5 0 F a b 複合体の結晶構造を使用して、2 0 3 5 0 に対する N o t c h 3 エピトープを識別した。2 0 3 5 0 F a b による N o t c h 3 N R R の相互作用表面を、いくつかの不連続 (すなわち非隣接) 配列: すなわち、表 4 に詳述されるように、残基 1 4 2 7 ~ 1 4 2 9、1 4 4 2、1 4 4 4、1 4 4 5、1 4 4 7 ~ 1 4 5 0、1 4 5 3、1 4 5 8、1 4 6 1、1 4 6 2、1 4 6 4、1 5 0 7、1 5 0 8、1 5 1 0、1 5 9 2、1 5 9 4 ~ 1 5 9 9、1 6 0 2 および 1 6 0 6 により形成した。これらの残基は、図 2 3 に示されるように、2 0 3 5 0 F a b により認識される三次元表面を形成する。興味深いことに、H D ドメインにおける $\beta 4 - \alpha 3$ ループは N o t c h 1 および N o t c h 2 と比較して特有の構造を有し、このセグメントの大部分は 2 0 3 5 0 エピトープ内にある。さらに、このループは N o t c h 3 N R R / 2 0 3 5 8 複合体において大部分は構造化されていない (柔軟性に起因して電子密度がない) が、F a b に直接結合することによってこの 2 0 3 5 0 複合体において安定化し、構造化されている。

40

50

【 0 5 5 2 】

【 表 6 - 1 】

表4: ヒトNotch3 NRRと20350との間の相互作用。Notch3残基はUniProt ID Q9UM47 (配列番号1)に基づいて番号付けされ、ドメインに分類される。Fab重鎖および軽鎖残基は、それらの線状アミノ酸配列の配列番号283および配列番号284のそれぞれに基づいて番号付けされる。示されるNotch3残基は、水により媒介される相互作用の可能性を考慮して、20350Fabにおける原子の5Å以内に少なくとも1つの原子を有する。

Notch3 NRR			20350 Fab		
ドメイン	残基	番号	残基	番号	鎖
LNR-A/B リンカー	GLN	1427	ASN	30	L
			LEU	92	L
			GLN	93	L
	CYS	1428	GLN	93	L
	GLU	1429	LEU	92	L
			GLN	93	L
LNR-B	CYS	1442	TRP	50	H
			ALA	57	H
	PRO	1444	TRP	50	H
			ALA	57	H
			ALA	58	H
			HIS	59	H
			TYR	94	L
	ALA	1445	HIS	59	H
			TYR	94	L
			GLN	93	L
			TYR	94	L
	SER	1447	TRP	50	H
			HIS	59	H
			PHE	101	H
			TYR	94	L
	SER	1448	PHE	101	H
			LEU	92	L
	PRO	1449	PHE	101	H
			TYR	32	L
			TYR	91	L
			LEU	92	L
	ALA	1450	LEU	92	L
			GLN	93	L
	TYR	1453	PHE	101	H
			TYR	32	L
	CYS	1458	TRP	50	H
			LYS	52	H
LNR-B/C リンカー	GLY	1461	TRP	55	H
	GLY	1462	ARG	54	H
			TRP	55	H
	GLU	1464	ARG	54	H
LNR-HD リンカー	LEU	1507	TYR	49	L
	LEU	1508	LYS	53	L
	ARG	1510	ASN	31	L
			ASP	50	L

10

20

30

40

【表 6 - 2】

HD $\beta 4$ - $\alpha 3$ リンカー		1592	ALA	51	L
			SER	52	L
			LYS	53	L
	LEU	1592	TRP	102	H
			TRP	102	H
			TYR	49	L
	SER	1594	TYR	32	H
	PRO	1595	SER	31	H
			TYR	32	H
	GLU	1596	SER	31	H
			TYR	32	H
			THR	33	H
			LYS	52	H
			SER	100	H
	ASN	1597	TRP	102	H
	ASP	1598	THR	33	H
			GLY	99	H
			SER	100	H
			PHE	101	H
			TRP	102	H
	ASP	1598	TYR	91	L
	HIS	1599	SER	100	H
			PHE	101	H
			TYR	32	L
	PRO	1602	ASP	50	L
			TYR	91	L
			TYR	91	L
HD $\alpha 3$ ヘリックス	SER	1606	TYR	32	L

【0553】

20350 Fab は、Notch3 NRR の LNR（主に LNR-B 周囲）および HD ドメイン（主に $\beta 4$ - $\alpha 3$ ループ周囲）の両方にわたって結合する。20350 Fab と LNR との間の埋もれた表面積は $554.9 \text{ \AA}^2$ であり、20350 Fab と HD ドメインとの間には $535.2 \text{ \AA}^2$ である。Fab のこの配置は、20350 が LNR および HD ドメインを一緒に保持でき、Notch3 NRR の自己阻害立体構造を安定化でき、Notch3 活性化を阻害できることを示す。

【0554】

20358 エピトープ

Notch3 NRR / 20358 Fab 複合体の結晶構造を使用して、20358 に対する Notch3 エピトープを識別した。20358 Fab による Notch3 NRR 上の相互作用表面をいくつかの不連続（すなわち非隣接）配列：すなわち、表 5 に詳述されるように、残基 1440、1463、1465～1472、1474、1486、1487、1534、1618、1619 および 1621 によって形成した。これらの残基は、図 24 に示されるように、20350 Fab によって認識される三次元表面を形成する。興味深いことに、前半の LNR-C における LNR-B / C リンカーは Notch1 および Notch2 と比較して特有の構造を有し、このセグメントの大部分は 20358 エピトープ内にある。

【0555】

【表 7 - 1】

表5: ヒトNotch3 NRRと20358との間の相互作用。Notch3残基はUniProt ID Q9UM47(配列番号1)に基づいて番号付けされ、ドメインに分類される。Fab重鎖および軽鎖残基は、それらの線状アミノ酸配列の配列番号4285および配列番号5286のそれぞれに基づいて番号付けされる。示されるNotch3残基は、水により媒介される相互作用の可能性を考慮して、20358Fabにおける原子の5 Å以内に少なくとも1つの原子を有する。

Notch3 NRR			20358 Fab		
ドメイン	残基	番号	残基	番号	鎖
LNR-B	SER	1440	SER	31	L
LNR-B/C リンカー	ARG	1463	PHE	29	H
			THR	31	H
			ASP	99	H
			ASP	100	H
			TYR	101	H
			SER	102	H
			THR	103	H
			TYR	104	H
	ARG	1465	TYR	32	L
	THR	1466	TYR	104	H
			TYR	32	L
	CYS	1467	TYR	104	H
	ASN	1468	THR	31	H
			ALA	33	H
			VAL	52	H
			ASP	99	H
			TYR	104	H
			TYR	96	L
LNR-C	PRO	1469	ASP	59	H
			TYR	104	H
			ALA	91	L
			TYR	92	L
			LYS	93	L
			THR	94	L
			TYR	96	L
	VAL	1470	ILE	57	H
			THR	58	H
			ASP	59	H
			GLY	50	H
			VAL	52	H
			HIS	35	H
			TRP	47	H
			GLY	50	H
			ASP	59	H
			THR	94	L
			TYR	96	L
	TYR	1471	VAL	52	H
			HIS	55	H
			ILE	57	H
	GLU	1472	LYS	93	L

10

20

30

40

【表 7 - 2】

			THR	94	L
	TYR	1474	ILE	57	H
	GLN	1486	HIS	55	H
	GLY	1487	HIS	55	H
HD α2ヘリックス			ILE	57	H
	ARG	1534	LYS	93	L
HD α3-β5 リンカー	GLU	1618	SER	28	L
	ARG	1619	ALA	30	L
			SER	31	L
			TYR	32	L
			SER	67	L
	ASP	1621	GLN	27	L
			SER	28	L
			TYR	92	L

10

【0556】

20358 Fab は、Notch3 NRR の LNR（主に LNR-B/C リンカーおよび LNR-C 周囲）および HD ドメイン（主に α3-β5 ループ周囲）の両方にわたって結合する。20358 Fab と LNR との間の埋もれた表面積は $729.6 \text{ \AA}^2$ であり、20358 Fab と HD ドメインとの間には $152.2 \text{ \AA}^2$ である。Fab のこの配置は、20358 が LNR および HD ドメインを一緒に保持でき、Notch3 NRR の自己阻害立体構造を安定化でき、Notch3 活性化を阻害できることを示す。

20

【0557】

20350 および 20358 エピトープは重ならない

20350 および 20358 のエピトープが重なるかどうかを決定するために、Notch3 NRR/20350 複合体および Notch3 NRR/20358 複合体の結晶構造を、図 25 に示されるように、Notch3 NRR に重ね合わせた。この図は、20350 および 20358 が、重ならない Notch3 NRR 内の異なる別のコンフォメーションエピトープに結合することを明確に実証している。実際に、それらは最も近い領域（20350 との E1464-R54 水素結合および 20358 との R1463-D100 塩橋）においてさえ十分に分離している。これは、2つの抗体が同時に Notch3 NRR に結合できることを示しており、それらが異なるピンにあり、Notch3 を結合する際に互いに競合しないことを示すビニング実験と一致する（図 20 を参照のこと）。

30

【0558】

20350、20358、256A-13、256A-4 および 256A-8 の間のエピトープ比較

20350 および 20358 のエピトープを 256A-13（本明細書以下で「A13」と称する）（US2008/0118520A1）のエピトープならびに 256A-4（本明細書以下で「A4」と称する）および 256A-8（本明細書以下で「A8」と称する）（US7,935,791B2）のエピトープと比較した。A13 に関して、そのエピトープは、LNR-A ドメインにおいて D1402、R1403 および E1404 を含み、完全に 20350 および 20358 のエピトープの外側である。

40

【0559】

A4 および A8 に関して、それらは Notch3（US7,935,791B2）上の同じエピトープにマッピングされているので、A4 エピトープのみを比較のために使用する。

【0560】

図 26 に示されるように、20350 のエピトープは完全に A4 のエピトープの外側であり、20358 のエピトープは重なる可能性がある 3つの残基（Glu1618、Ar

50

g 1 6 1 9 および A s p 1 6 2 1) を有するが、以下の理由のために可能性はかなり低い：1) 2 0 3 5 8 のエピトープは単一原子およびそれ故単一残基の分解能まで X 線結晶学によって決定されたのに対して、A 4 のエピトープは、3～8 個のアミノ酸残基ストレッチの限定された分解能まで突然変異生成によって決定された。A 4 に対する実際のエピトープ、またはそれが直線もしくはコンフォメーションエピトープであるかどうかをさらに定義するための精細エピトープマッピングは行わなかった。これは、3～8 個のアミノ酸ストレッチ内の A 4 と接触する 1 つの残基が存在する限り、ストレッチの残りは、その残基がなくてもエピトープとして定義されることを意味する。したがって、3 個のアミノ酸が A 4 に対するエピトープを実際に構成するかどうかに対して高い程度の不確実性が存在したままである。2) 実施例 1 3 に詳述されたエピトープビニングおよび結合実験は、2 0 3 5 8 および A 4 が N o t c h 3 N R R を結合する際に互いに競合せず、その両方は N o t c h 3 N R R に同時に結合できることを示す。これは、2 つの抗体が重なったエピトープを有しない場合にのみ達成され得る。したがって、2 0 3 5 8 および A 4 のエピトープは重ならないと考えられる。

【0 5 6 1】

N o t c h 3 N R R の構造上にマッピングされたがん突然変異

N o t c h 3 の N R R のさらなる機構の洞察を得るために、がん突然変異を N o t c h 3 N R R 構造上にマッピングした。構造解析により、これらの突然変異のいくつかがドメイン内またはドメイン間相互作用を混乱させ、N o t c h 3 N R R の自己阻害立体構造を不安定化させ、N o t c h 3 活性化およびシグナル変換を引き起こすことが示唆された。

【0 5 6 2】

その一方で、これらの突然変異と 2 0 3 5 0 および 2 0 3 5 8 エピトープとの比較は、それらのほとんどがエピトープ内に存在しないことを示し、これは、2 0 3 5 0 および 2 0 3 5 8 が、N o t c h 3 シグナル変換を阻害するために自己阻害した立体構造において野生型および突然変異体 N o t c h 3 N R R の両方に結合できることを示している。

【0 5 6 3】

【表 8】

表7: Notch3突然変異の構造に基づいた解釈を示す

突然変異	細胞データ	構造ベースの解釈
群1		
S1580L	活性化	ドメイン内水素結合を喪失し、これにより、HDドメインを不安定化させる
R1510H		
D1587N		
R1589Q		
Y1624H		
群2		
G1487D	活性化	構造的完全性に影響を及ぼし、衝突を引き起こす
A1476T		
A1609T		
L1518M		
A1537T		
群3		
N1597K	活性化	明らかな解釈ではないが、NRRの表面上では、タンパク質間相互作用に対する干渉がなされうであろう
L1547V		
R1526C		

【0 5 6 4】

1 群 (S 1 5 8 0 L、R 1 5 1 0 H、D 1 5 8 7 N、Y 1 6 2 4 H、R 1 5 8 9 Q)

この群における突然変異は H D ドメイン内の水素結合を損失し、それにより不安定化を引き起こす。

【0 5 6 5】

この群からの代表例はS 1 5 8 0 Lである。それは細胞アッセイにおいてN o t c h 3シグナル伝達を活性化し（図1 3 a）、T A L L-1の駆動力である。構造において、（H D-Nにおいて）S 1 5 8 0の側鎖の酸素は、（H D-Cにおいて）P 1 5 2 1の骨格窒素との水素結合を形成する。S 1 5 8 0 L突然変異はこの水素結合を損失し得、H Dドメインを不安定化させ得る。S 1 5 8 0がS 2部位に近い（約1 0 Å）ことを考慮して、この不安定化はS 2部位をA D A Mプロテアーゼにとってより接近しやすくし得るので、N o t c h 3の活性化を増強する。

【0 5 6 6】

同様に、H D-NにおけるR 1 5 1 0 H突然変異はH D-CにおいてD 1 6 0 3との水素結合を損失し得、D 1 5 8 7 N R 1 5 8 9 Q突然変異は、最初に2つの残基tの間に存在する塩橋を損失し得、H D-NにおけるY 1 6 2 4 H突然変異はH D-CにおけるS 1 5 2 7およびD 1 5 3 0との水素結合を損失し得る。全てのこれらの突然変異はH Dドメインを不安定化させ得、N o t c h 3シグナル伝達を活性化する可能性がある。

【0 5 6 7】

2群（G 1 4 8 7 D、A 1 4 7 6 T、A 1 6 0 8 T、L 1 5 1 8 M、A 1 5 3 7 T）

この群における突然変異は、ドメイン内の構造完全性に影響を与え得るか、または周囲残基との衝突を引き起こし得、それによりN o t c h 3 N R Rを不安定化させる。

【0 5 6 8】

この群からの代表例はG 1 4 8 7 Dである。それは細胞アッセイにおいてN o t c h 3シグナル伝達を活性化する。G 1 4 8 7は、L N R-CのC 1 4 7 5-C 1 4 8 8ジスルフィド結合に隣接し、構造完全性およびこのドメイン内のC a²⁺配位に不可欠である。G 1 4 8 7 D突然変異はこのジスルフィド結合の正確な配置を妨げ得、L N R-Cドメインを不安定化させる。

【0 5 6 9】

L 1 5 1 8は、R 1 6 2 7、Y 1 5 5 8およびI 1 5 7 8の側鎖によって形成される、S 2部位に隣接する疎水性ポケットに存在する。L 1 5 1 8 M突然変異はこの疎水性ポケットと衝突し得、それによりS 2部位を不安定化させる。

【0 5 7 0】

H D-NにおけるA 1 5 3 7はL N R-CにおけるE 1 4 9 2から3. 3 Åだけ離れている。A 1 5 3 7 T突然変異はE 1 4 9 2と衝突し得、L N R-H D相互作用を不安定化させる。

【0 5 7 1】

3群（N 1 5 9 7 K、L 1 5 4 7 V、R 1 5 2 6 C）

この群における突然変異はN o t c h 3 N R Rの表面上にある。N 1 5 9 7 Kは細胞アッセイにおいてN o t c h 3シグナル伝達を活性化し（図1 4 a）、これは、これらの表面突然変異がN R Rの不安定化以外の機構、例えばタンパク質間相互作用事象の妨げにより機能し得ることを示す。

【0 5 7 2】

がん突然変異対エピトープ

がん突然変異対2 0 3 5 0エピトープ

がん突然変異は2 0 3 5 0エピトープの大部分の範囲内にあるか、または外側にあり、2 0 3 5 0は依然として野生型および突然変異体N o t c h 3 N R Rの両方に結合できることを示す。

【0 5 7 3】

エピトープ内の2つのがん突然変異はR 1 5 1 0 HおよびN 1 5 9 7 Kである。例えば、R 1 5 1 0 HはN o t c h 3 N R Rへの2 0 3 5 0の結合を弱め得る。なぜならこの突然変異は、D 5 0との塩橋およびN 3 1との水素結合を含む、軽鎖とのいくつかの相互作用を損失し得る。

【0 5 7 4】

がん突然変異対2 0 3 5 8エピトープ

G 1 4 8 7 Dを除く全てのがん突然変異は2 0 3 5 8 エピトープの外側にあり、2 0 3 5 8 は依然として野生型および突然変異体N o t c h 3 N R R の両方に結合できることを示す。

【0 5 7 5】

G 1 4 8 7 DはN o t c h 3 N R R への2 0 3 5 8 の結合を弱め得る。なぜならこの突然変異は、Y 1 4 7 1 (N o t c h 3) とH 5 5 (2 0 3 5 8 重鎖) との間の水素結合と衝突し、破壊し得るからである。

【0 5 7 6】

〔実施例 1 5〕

ヒトN o t c h 3 N R R / 2 0 3 5 0、ヒトN o t c h 3 N R R / 2 0 3 5 8 および
ヒトN o t c h 3 N R R / 2 0 3 3 7 複合体のH D x - M S エピトープマッピング

重水素交換質量分析 (H D x - M S) はタンパク質のアミド骨格上の重水素吸収を測定し、これらの測定はアミドの溶媒露出度および骨格アミドの水素結合ネットワークの変化に敏感である。H D x - M S は、多くの場合、アポ (apo) およびリガンド結合などの2 つの異なる状態におけるタンパク質を比較するために使用され、迅速なペプシン消化と関連がある。このような実験において、2 つの異なる状態の間で異なる重水素吸収を示す、典型的に1 0 ~ 1 5 個のアミノ酸の領域を位置付けることができる。複合体において保護される領域はリガンド結合に直接関与するか、またはリガンドの結合によってアロステリックに影響を受けるかのいずれかである。

【0 5 7 7】

これらの実験において、N o t c h 3 N R R タンパク質 (配列番号2 8 2) の重水素吸収を、3 つのI g G 抗体: 2 0 3 5 0 (配列番号2 8 7)、2 0 3 5 8 (配列番号2 8 8) および2 0 3 3 7 (配列番号2 8 9) の不在および存在下でカルシウムを用いて測定した。抗体が結合すると重水素吸収の減少を示すN o t c h 3 N R R における領域はエピトープに関与する可能性があるが、測定の性質に起因して、直接結合部位から離れた位置の変化 (アロステリック効果) を検出することも可能である。アロステリック効果からの直接結合事象を示すために、直交測定 (例えば、以前の実施例に示されたX 線結晶学) も行った。

【0 5 7 8】

H D x - M S 実験に使用されるタンパク質

N o t c h 3 N R R

【化 1 8】

```
metdtlllwwlllwpvgstgAPEVSEEP RCPRAACQAKRGDQRC DRECN S P G C G W D G G D C S L S
VGDPWRQCEALQCWRLFNNSRCDPACSSPACLYDNFDCHAGGRERTCNPVYEKYC
ADHFADGRCDQGCNTEECGW DGLDCASEVPALLARGVLVLT VLLPPEELLRSSADFL
QRLSAILRTSLRFR LDAHGQAMVFPYHRPSPGSEPRARRELAPEVIGSVVMLEIDNRL
CLQSPENDHCFPD AQSAADYLGALSAVERLDFPYPLRDVRGE PLEPPEPSgshhhhhh
```

(配列番号: 282)

【0 5 7 9】

2 0 3 5 0 I g G

【化 1 9 - 1】

MGLGARGRRRRRLMALPPPPPMRALPLLLLLAGLGAAAPPCLDGSPCANGGRCTH
QQPSLEAACLCPLPGWVGERCQLEDPCSHSGPCAGRGVCQSSVVAGTARFSCRCRLRGFQ
GPDCSQPDPCVSRPCVHGAPCSVGPDRFACACPPGYQQQSCQSDIDECRSGTTCRH
GGTCLNTPGSFRCQCPLGYTGLLCENPVVPCAPSPCRNGGTCRQSSDVTYDCACLPGF
EGQNCEVNVDDCPGHRCLNGGTCVDGVNTYNCQCPPEWTGQFCTEDVDECQLQPN
ACHNGGTCFNLLGGHSCVCVNGWTGESCSQNIDDCATAVCFHGATCHDRVASFYCA
CPMGKTGLLCHLDDACVSNPCHEDAICDTNPVSGRAICTCPPGFTGGACDQDVDECSI
GANPCEHLGRCVNTQGSFLCQCGRGYTGPRCETDVNECLSGPCRNQATCLDRIGQFT
CICMAGFTGTyceVDIDECQSSPCVNGGVCKDRVNGFSCTCPSGFSGSMCQLDVDEC
ASTPCRNGAKCVDQPDGYECRCAEGFEGTLCERNVDDCSPDPCHHGRCVDGIAFSFC

10

【化 1 9 - 2】

ACAPGYTGIRCESQVDECRSQPCRYGGKCLDLVDKYLRCPPGTTGVNCEVNIDDCA
SNPCTFGVCRDGINRYDCVCQPGFTGPLCNVEINECASSPCGEGGSCVDGENGFHCLC
PPGSLPPLCLPANHPCAHKPCSHGVCHDAPGGFRCVCEPGWSGPRCSQSLAPDACES
QPCQAGGTCTSDGIGFRCTCAPGFQGHQCEVLSPECTPSLCEHGGHCESDPDRLTVCS
PPGWQGPCRQDQVDECAGASPCGPHGTCTNLPGNFRCICHRGYTGPFCDQDIDDCDP
NPCLHGGSCQDGVGSFSCSLDGFAGPRCARDVDECLSSPCGPGTCTDHVASFTCAC
PPGYGGFHCEIDLDCSPSSCFNGGTCVDGVSSFSCLCRPGYTGTHCQYEADPCFSRPC
LHGGICNPTHPGFECTCREGFTGSQCQNPVDWCSQAPCQNGGRCVQTGAYCICPPGW
SGRLCDIQSLPCTEAAAQMGVRLEQLCQEGGKCIDKGRSHYCVCEGRTGSHCEHEV
DPCTAQPCQHGGTCRGMGGYVCECPAGYAGDSCEDNIDECASQPCQNGGSCIDL
ARYLCSPPGTLGLVLCINEDDCDLGPSLDSGVQCLHNGTCVDLVGGFRCNCPPGYT
GLHCEADINECRPGACHAAHTRDCLQDPGGHFRCVCHPGFTGPRCQIALSPCESQPCQ
HGGQCRHSLGRGGGLTFTCHCVPPFWGLRCERVARSCRELQCPVGIPCQQTARGPRC
ACPPGLSGPSCRVSRAASPGATNASCASAPCLHGGSCLPVQSVFFRCVCAPGWGGPR
CETPSAAPEVPPEPRCPRAACQAKRGDQNCDCRENTPGCGWDGGDCSLNVDDPWRQ
CEALQCWRLFNNSRCDPACSSPACLYDNFDCYSGGRDRTCNPVYEKYCADHFADGR
CDQGCNTEECGWDGLDCASEVPALLARGVLVLTVLLPPEELLRSSADFLQRLSAILRT
SLRFRLDARGQAMVFPYHRSPGSESVRRELGPVIGSVVMLEIDNRLCLQSAENDH
CFPDAQSAADYLGALSAVERLDFPYPLRDVRGEPLAEPQSVPLPLLVAGAVFLLIIF
ILGVMVARRKREHSTLWFPEGFALHKDIAAGHKGRREPVGQDALGMKNMAKGESL
MGEVVDLNDSECPEAKRLKVEEPMGAEEPEDCRQWTQHHLVAADIRVAPATALT
PPQGDADADGVDVNVRGPDGFTPLMLASFCGGALEPMPAEDEADDTASIIISDLICQ
GAQLGARTDRTGETALHLAARYARADAAKRLLDAGADTNAQDHSGRTPHHTAVTA
DAQGVFQILIRNRSTDLDARMADGSTALILAAARLAVEGMVEELIASHADVNAVDELG
KSALHWAAAVNNVEATLALLKNGANKDMQDSKEETPLFLAAREGSYEAAKLLLDH
LANREITDHLDRLPDVAQERLHQDIVRLLDQPSGPRSPSGPHGLGPLLCPPGAFLPGL
KAVQSGTKKSRPPGKTGLGPQGTRGRGKLTACPGPLADSSVTLSPVDSLDSRPF
SGPPASPGGFLEGPYATTATAVSLAQLGASRAGPLGRQPPGGCVLSFGLLNPAVAVPL
DWARLPPAPPGPSFLLPLAPGPQLLNPGAPVSPQERPPPYLAAPGHGEEYPAAGTRSS
PTKARFLRVPSEHPYLTPSPESPEHWASPPSLSDWSDSTPSPATATNATASGALPAQ
PHPIVPSLPQSQTQLGPQPEVTPKRQVMA (配列番号: 287)

20

30

40

50

【 0 5 8 0 】

2 0 3 5 8 I g G

【 化 2 0 - 1 】

MGLGARGRRRRRLMALPPPPPPMRALPLLLLLLAGLGAAAPPCLDGSPCANGGRCTH
QQPSLEAACLCLPGWVGERCQLEDPCCHSGPCAGRGVCQSSVVAGTARFSCRCRLRGFQ
GPDCSQPDPCVSRPCVHGAPCSVGPDGRFACACPPGYQGQSCQSDIDECRSGTTCTRH
GGTCLNTPGSFRCQCPLGYTGLLCENPVVPCAPSPCRNNGGTCRQSSDVTYDCACLPGF
EGQNCEVNVDCCPGHRCNLGGTCVDGVNTYNCQCPPEWTGQFCTEDVDECQLQPN
ACHNGGTCFNLLGGHSCVCVNGWTGESCSQNIDDCATAVCFHGATCHDRVASFYCA
CPMGKTGLLCHLDDACVSNPCHEDAICDTNPVSGRAICTCPPGFTGGACDQDVDECSI
GANPCEHLGRCVNTQGSFLCQCGRGYTGPRCETDVNECLSGPCRNQATCLDRIGQFT
CICMAGFTGTYCEVDIDEQSSPCVNGGVCKDRVNGFSCTCPSGFSGSMCQLDVDEC
ASTPCRNGAKCVDQPDGYECRAEGFEGTLCERNVDDCSPDPCHHGRCVDGIAFSFC
ACAPGYTGIRCESQVDECRSQPCRYGGKCLDLVDKYLRCRPPGTTGVNCEVNIDDC
SNPCTFGVCRDGINRYDCVCQPGFTGPLCNVEINECASSPCGEGGSCVDGENGFHCLC
PPGSLPPLCLPANHPCAHKPCSHGVCHDAPGGFRCVCEPGWSGPRCSQSLAPDACES
QPCQAGGTCTSDGIGFRCTCAPGFQGHQCEVLSPTPSLCEHGGHCESDPDRLTVCS
PPGWQGPCRQDQDVDECAGASPCGPHGTCTNLPGNFRCICHRGYTGPFCDQDIDDCDP
NPCLHGGSCQDGVGSFSCSLDGFAGPRCARDVDECLSSPCGPGTCTDHVASFTCAC
PPGYGGFHCEIDLDCSPSSCFNGGTCVDGVSSFSCLCRPGYTGTHCQYEADPCFSRPC
LHGGICNPTHGPFECTCREGFTGSQCQNPVDWCSQAPCQNGGRCVQTGAYCICPPGW
SGRLCDIQSLPCTEAAAQMGVRLEQLCQEGGKCIDKGRSHYCVCEGRTGSHCEHEV
DPCTAQPCQHGGTCRGMGGYVCECPAGYAGDSCEDNIDECASQPCQNGGSCIDL
ARYLCSPPGTLGLVCEINEDDCDLGPSLDSGVQCLHNGTCVDLVGGFRCNCPPGYT
GLHCEADINECRPGACHAAHTRDCLQDPGGHFRCVCHPGFTGPRCQIALSPCESQPCQ
HGGQCRHSLGRGGGLTFTCHCVPPFWGLRCERVARSRELQCPVGIPCQQTARGPRC
ACPPGLSGPSCRVSRAASPGATNASCASAPCLHGGSCLPVQSVFFRCVCAPGWGGPR
CETPSAAPEVPPEPRCPRAACQAKRGDQNCNDCRENTPGCGWDGGDCSLNDDPW
CEALQCWRLFNNSRCDPACSSPACLYDNFDCYSGGRDRTCNPVYEKCADHFADGR
CDQGCNTEECGWDGLDCASEVPALLARGVLVLTVLLPPEELLRSSADFLQRLSAILRT
SLRFRDLARGQAMVFPYHRPSPGSESVRRELGPVIGSVVMLEIDNRLCLQSAENDH
CFPDQAQAADYLGALSAVERLDFPYPLRDVRGEPLAEQSVPLLPVAGAVFLLIIF
ILGVMVARRKREHSTLWFPEGFALHKDIAAGHKGRREPVGQDALGMKNMAKGESL
MGEVVTDLNDSECPEAKRLKVEEPPMGAEPEDCRQWTQHHLVAADIRVAPATALT
PPQGDADADGVDVNVVRGPDGFTPLMLASFCGGALEPMPEEEDADDTSASIIISDLICQ
GAQLGARTDRTGETALHLAARYARADAAKRLLDAGADTNAQDHSGRTPHHTAVTA
DAQGVFQILIRNRSTDLDARMADGSTALILAAARLAVEGMVEELIASHADVNAVDELG

10

20

30

40

【化 2 0 - 2】

KSALHWAAAVNNVEATLALLKNGANKDMQDSKEETPLFLAAREGSYEAAKLLLDH
LANREITDHLDRLPDVAQERLHQDIVRLLDQPSGPRSPSGPHGLGPLLCPPGAFLPGL
KAVQSGTKKSRPPGKTGLGPQGTRGRGKLTACPGPLADSSVTLSPVDSLDSRPF
SGPPASPGGFLEGPYATTATAVSLAQLGASRAGPLGRQPPGGCVLSFGLLNPAVPL
DWARLPPPAPPGPSFLLPLAPGPQLLNPGAPVSPQERPPPYLAAPGHGEEYPAAGRSS
PTKARFLRVPSEHPYLTPSPESPEHWASPSPPSLSDWSDSTPSPATATNATASGALPAQ
PHPISVPSLPQSQTQLGPQPEVTPKRQVMA (配列番号: 288)

10

【0 5 8 1】

2 0 3 3 7 I g G

【化 2 1 - 1】

MGLGARGRRRRRLMALPPPPPPMRALPLLLLLAGLGAAAPPCLDGSPCANGGRCTH
QQPSLEAACLCPLPGWVGERCQLEDPCSHGPGCAGRGVCQSSVVAGTARFSCRCLRGFQ
GPDSCQPDPCVSRPCVHGAPCSVGPDRFACACPPGYQGQSCQSDIDECRSGTTCRH
GGTCLNTPGSFRQCPLGYTGLLCENPVVPCAPSPCRNGGTCRQSSDVTYDCACLPGF
EGQNCEVNVDCCPGHRCNLGGTCVDGVNTYNCQCPPEWTGQFCTEDVDECQLQPN
ACHNGGTCFNLLGGHSCVCVNGWTGESCSQNIDDCATAVCFHGATCHDRVASFYCA
CPMGKTGLLCHLDDACVSNPCHEDAICDTNPVSGRAICTCPPGFTGGACDQDVDECSI
GANPCEHLGRCVNTQGSFLCQCGRGYTGPRCETDVNECLSGPCRNQATCLDRIGQFT
CICMAGFTGTyceVDIDECQSSPCVNGGVCKDRVNGFSCTCPSGFSGSMCQLDVDEC
ASTPCRNGAKCVDQPDGYECRAEGFEGTLCERNVDDCSPDPCHHGRCVDGASFSC
ACAPGYTGIRCESQVDECRSQPCRYGGKCLDLVDKYLRCPPGTTGVNCEVNIDDC
SNPCTFGVCRDGINRYDCVCQPGFTGPLCNVEINECASSPCGEGGSCVDGENGFHCLC
PPGSLPPLCLPANHPCAHKPCSHGVCHDAPGGFRCVCEPGWSGPRCSQSLAPDACES
QPCQAGGTCTSDGIGFRCTCAPGFQGHQCEVLSPTPSLCEHGGHCESDPDRLTVCS
PPGWQGPCRCQDQDVDECAGASPCGPHGTCTNLPGNFRICHRGYTGPFCDQDIDDCDP
NPCLHGGSCQDGVGSFSCSCLDGFAGPRCARDVDECLSSPCGPGTCTDHVASFTCAC
PPGYGGFHCEIDLPCDSSCFNGGTCVDGVSSFSCLCRPGYTGTGHCQYEADPCFSRPC
LHGGICNPTHPGFECTCREGFTGSQCQNPVDWCSQAPCQNGGRCVQTGAYCICPPGW
SGRLCDIQSLPCTEAAAQMGVRLEQLCQEGGKCIDKGRSHYCVCEGRTGSHCEHEV
DPCTAQPCQHGGTCRGMGGYVCECPAGYAGDSCEDNIDECASQPCQNGGSCIDL
ARYLCSCPPGTLGVLCEINEDCDLGPLSLDSGVQCLHNGTCVDLVGGFRCNCPPGYT
GLHCEADINECRPGACHAAHTRDCLQDPGGHFRVCVCHPGFTGPRCQIALSPCESQPCQ
HGGQCRHSLGRGGGLTFTCHCVPPFWGLRCERVARSCRELQCPVGIPCQQTARGPRC
ACPPGLSGPSCRVSRAASPGATNASCASAPCLHGGSCLPVQSVPPFRVCAPGWGGPR
CETPSAAPEVPPEPRCPRAACQAKRGDQNCNDCRECNTPGCGWDGGDCSLNVDDPWQ

20

30

40

【化 2 1 - 2】

CEALQCWRLFNNSRCDPACSSPACLYDNFDCYSGGRDRTCNPVYEKYNADHFADGR
 CDQGCNTEECGWDGLDCASEVPALLARGVLVLTVLLPPEELLRSSADFLQRLSAILRT
 SLRFRDLARGQAMVFPYHRSPGSESRVRRELGPVIGSVVMLEIDNRLCLQSAENDH
 CFPDAQSAADYLGALSAVERLDFPYPLRDVRGEPLAEPQSVPLLPVAGAVFLLIIF
 ILGVMVARRKREHSTLWFPEGFALHKDIAAGHKGRREPVGQDALGMKNMAKGESL
 MGEVVTDLNDSECPEAKRLKVEEPGMGAEEPEDCRQWTQHHLVAADIRVAPATALT
 PPQGDADADGVVDVNVVRGPDGFTPLMLASFCGGALEPMPAEDEADDTASASISDLICQ
 GAQLGARTDRTGETALHLAARYARADAAKRLLDAGADTNAQDHSGRTPHHTAVTA
 DAQGVFQILIRNRSTDLDARMADGSTALILAAARLAVEGMVEELIASHADVNAVDELG
 KSALHWAAAVNNVEATLALLKNGANKDMQDSKEETPLFLAAREGSYEAACKLLLDH
 LANREITDHLDRLPDVAQERLHQDIVRLLDQPSGPRSPSGPHGLGPLCPGAFPLPGL
 KAVQSGTKKSRRPPGKTGLGPQGTRGRGKLTACPGPLADSSVTLSPVDSLSDSPRPF
 SGPPASPGGFLEGPYATTATAVSLAQLGASRAGPLGRQPPGGCVLSFGLLPVAVPL
 DWARLPPAPPGPSFLLPLAPGPQLLNPGAPVSPQERPPPYLAAPGHGEEYPAAGTRSS
 PTKARFLRVPSEHPYLTPSPESPEHWASPPPSLSDWSDSTPSPATATNATASGALPAQ
 PHPISVPSLPQSQTQLGPQPEVTPKRQVMA (配列番号: 289)

10

20

【0 5 8 2】

H D x - M S 実験の段落

L E A P ロボットシステム、ナノ A C Q U I T Y U P L C システムおよび S y n a p t G 2 質量分析計を備える、W a t e r s S y n a p t G 2 H D X プラットフォームで H D x - M S 実験を実施した。2つの実験方法を使用して H D x - M S 測定を実施した。第1の方法において全ての実験αを溶液中で実施し、第2の方法において抗体をビーズに固定して、N o t c h 3 N R R 抗原のペプチド被覆を改善した。

【0 5 8 3】

第1の方法において、実験は、L e a p S h e l l ソフトウェアにより作動する L E A P ロボットによって自動化し、重水素交換反応の開始、反応時間制御、クエンチ反応、U P L C システムへの注入および消化時間制御を実施した。L e a p ロボットは、H D x 反応のために 3 7 °C に維持され、タンパク質およびクエンチ溶液の保存のために 2 °C に維持される2つの温度で制御されたスタックを備える。3連の対照実験を、2 5 0 p m o l の N o t c h 3 N R R 抗原を使用して実施した。抗原は、3 7 °C にて 4 0 分間、9 0 . 0 % D の最終重水素濃度にて重水素化 T r i s 緩衝液 (D 2 O 中の 1 5 m M T r i s H C l 、1 0 m M 塩化カルシウム、1 0 m M 塩化ナトリウム、p H = 7 . 6) に交換した。重水素交換は、2 °C にて 5 分間、交換溶液を (6 M 尿素および 1 M T C E P p H = 2 . 5) と 1 : 1 で希釈することによってクエンチした。クエンチ後、試料を W a t e r s U P L C システムに注入し、そこでその試料を、1 2 °C に維持した固定化ペプシンカラムを使用して消化した。消化後、ペプチドを W a t e r s U P L C H S S T 3 2 . 1 × 5 m m プレカラム上に保持した。次いでペプチドをプレカラムから溶出し、8 分の 2 ~ 3 5 % アセトニトリル勾配を使用して W a t e r s U P L C C S H C 1 8 1 . 0 × 1 0 0 m m カラム上で分離した。次に、3連の実験を抗原-m A b 複合体で実施した。これらの実験において、2 5 0 p m o l の N o t c h 3 N R R 抗原を、室温にて 1 5 分間、T r i s 緩衝液 (水中の 1 5 m M T r i s H C l 、1 0 m M 塩化カルシウム、1 0 m M 塩化ナトリウム、p H = 7 . 6) 中で 3 7 5 p m o l の抗体とブレインキュベートした。全ての他の実験パラメータは対照実験と同一であった。

30

40

【0 5 8 4】

L N R - B ドメインにおける N o t c h 3 N R R のペプチド被覆を改善するために、L C - M S 実験における抗体シグナルを最小化するためにビーズへの m A b の固定化を組

50

み込む第2のHDX-MS法を使用した。この方法において、3連の対照実験を以下のよう
 に実施した。400 pmolのNotch3 NRR抗原を、予め加温した37℃の9
 9%重水素化TRIS緩衝液(pH7.6)中で希釈し、Thermoミキサー(700
 rpm)において37℃にて40分間インキュベートする(%D=96.1%)。重水素
 交換を、氷上で5分間、冷クエンチ緩衝液(6M尿素および1M TCEP pH=2.
 5)との1:1希釈によりクエンチした。クエンチ後、チューブをLEAPシステムに移
 し、クエンチした試料を分析のためにUPLCシステム上にLEAPシステムにより注入
 した。UPLCシステムは作動中のペプシン消化(12℃に維持した)を組み込む。8分
 の2~35%アセトニトリル勾配およびWaters UPLC CSH C18 1.
 0×100mmカラムを分離のために使用した。次に、抗体を使用して3連の実験を実施
 した。20350および20358抗体を、標準的な技術を使用してプロテインGアガロ
 ースビーズ(Thermoカタログ番号22851)に固定した。簡潔に述べると、抗体
 を遠心分離して保存緩衝液を除去した。次いで200 μlのTRIS緩衝液(pH7.6)
)および400 pmolのNotch3 NRRを固定化Abに加え、25℃にて15分
 間インキュベートした。インキュベーション後、複合体を遠心分離し、200 μlのTR
 IS緩衝液で洗浄し、再び遠心分離した。重水素交換のために、200 μLの重水素化T
 RISを、37℃にて40分間、インキュベーションのために抗原-抗体複合体に加えた
 (%D=96.1%)。次いで重水素緩衝液を除去し、即座に125 μLの氷冷クエンチ
 緩衝液を加えた。クエンチ後、カラムを遠心分離し、フロースルーを予冷したHPLCバ
 イアルに移し、同じ作動中のペプシン消化/LC-MS設定を使用して分析した。

10

20

【0585】

HDX-MSの結果 20350および20358

HDX-MSの結果を図27および図28にまとめる。図27は20350および20
 358の不在(対照)および存在下でのNotch3 NRRペプチドについての平均重
 水素吸収を示す。図27において、2つの相違:対照とmAbとの間の相違およびmAb
 間の相違を試験することは有用である。図28は20350および20358抗体につい
 てのアポと結合状態との相違を示す。0.5Da未満の相違(例えば、未結合のNotc
 h3 NRR対照と比べて変化なし)は重要でないと考えられる。相違の試験により、I
 gG結合に対して保護されるNotch3 NRRの領域を決定することができる。

【0586】

図27および28から、LNR-A領域において、保護の全体のわずかな量が存在した
 。この観察は、20350と20358抗体のどちらも、Notch3 NRRのこの領
 域と顕著に相互作用しないことを示唆している。LNR-Bドメインにおいて、特にペ
 プチド1432~1463において保護が増加した。このペプチドはLNR-Bの大部分お
 よびLNR-B/Cリンカーの一部におよび、固定化抗体実験においてのみ検出された。
 LNR-B/CリンカーおよびLNR-C領域において、少しのペプチド(1457~1
 471、1457~1472および1457~1489)は20358において保護され
 るが、これらのペプチドは20350において保護されない。Notch3 NRRへい
 ずれかの抗体を結合することによって保護されなかったより短い領域1478~1489
 も検出された。この情報により、20358により異なって保護される領域は1457~
 1477に及ぶ領域であると推測できる。最後に、LNR-C(1490~1500)に
 おける1つの他の領域は両方の抗体により保護された。HD-Nドメインにおいて、15
 32~1545に及ぶ領域を除いて、調べた抗体のいずれによる保護も観察されなかった
 。HD-Cドメインにおいて、領域1580~1583、1592~1616および16
 17~1628は、Notch3 NRRへの20350または20358のいずれかの
 結合に対して重水素交換から両方とも保護された。

30

40

【0587】

図29は、実施例14に示されるNotch3 NRR結晶構造を使用してHDX-M
 S実験において保護された領域のマップを示す。構造上で保護された領域をマッピングす
 ることにより、タンパク質の表面上に存在する領域(エピトープを形成するのに関与する

50

可能性がある)から構造内に多く埋もれる保護領域(アロステリック効果の可能性)を示すことができる。例えば、図27および28において、 $\alpha 3$ ヘリックスの中心部分に対応する領域1609~1616は、たとえそれが20350または20358のいずれとも直接相互作用しなくても両方の抗体によって実質的に保護される。保護は、性質上、アロステリックであり、抗体が結合すると、 $\alpha 3$ ヘリックスを取り囲む、LNRドメインの安定化に起因し得る。 $\alpha 3$ ヘリックスを取り囲むLNRドメインの安定化は、後で重水素接近性を $\alpha 3$ ヘリックスの中心に制限し得る。 $\alpha 3$ ヘリックス保護はまた、抗体が結合すると、 $\alpha 3$ ヘリックス水素結合ネットワークの安定化の増加に起因し得る。

【0588】

表面上の保護を調べることにより、領域1457~1477が表面上に位置することが即座に観察された。全LNR-B/CリンカーおよびLNR-CのN末端に及ぶこの領域は、Notch3 NRRへ20358が結合したときにのみ保護され、20350では保護されなかった。この領域における異なる保護を使用して20350および20358抗体を識別することができ、これはX線結晶学研究(実施例14)と一致する。表5から、領域1457~1477は20358複合体に埋もれている11個の残基を含有する。対照的に、表4は、この領域が20350複合体に埋もれている4個のみの残基を含有することを示す。図29から、両方の抗体がまた、LNR-Bドメインと実質的に相互作用と解釈することができる。X線結晶学(実施例14)から、20350のみがこの領域(Notch3 NRRにおける1個の埋もれた残基に対して9個)と実質的に相互作用する。HDx-MS実験における制限された分解能およびアロステリック効果に対する感受性は誤った解釈の原因となる可能性がある。以前に述べられているように、LNR-Bドメインにおいて、最も保護されたペプチドは1432~1463の範囲の31アミノ酸に及ぶ。このペプチドは両方の結晶構造に埋もれている残基を含有する(20358において2個の埋もれた残基に対して20350において11個の埋もれた残基)。両方の複合体は1432~1457からの同様の保護を有するので、近接するLNR-Cドメインにおいて20358の結合はまた、この領域においていくつかのアロステリック保護を誘導するように見える。最後に、LNR-AのC末端およびA/Bリンカーを含有する、より小さなペプチド(例えば、1420~1430)もまた、両方の抗体によるいくつかの(および等しい)保護を示す。X線結晶学(実施例14)は、この領域が20350複合体においてのみ埋もれたことを示す。HDx-MSデータは、この領域がまた、20358が結合すると、アロステリックに保護され、20358の直接結合事象から識別できないことを示唆している。

【0589】

最後に、図30はHDx-MSによって決定した保護された領域の概要を提供し、それらを、X線結晶学研究(実施例14)からの埋もれた残基と比較する。全体として、HDx-MS実験はX線結晶学によりほとんど全ての埋もれた残基を含有する保護された領域を検出する。以前に述べられているように、 $\alpha 3$ ヘリックスの中心などの、性質上、アロステリックである可能性がある、保護のいくつかのさらなる領域も検出された。

【0590】

IgG抗体20337についてのHDx-MS実験および結果

カルシウムの不在下でNotch3 NRRを用いた予備実験もまた、自動化HDx-MSシステムを使用して2つの以前に記載されたIgG抗体および1つのさらなるIgG抗体:20337(配列番号289)の存在下で未結合のNotch3 NRRおよびNotch3を使用して実施した。これらの実験において、200pmolのNotch3 NRR(対照)または200pmolのNotch3 NRR+300pmolのIgG抗体を、37℃にて40分間、D-PBS(最終%D=88.3%)に交換する。重水素交換を、2℃にて5分間、(6M尿素および1M TCEP pH=2.5)を有する交換溶液を1:1に希釈することによってクエンチした。クエンチ後、試料をWaters UPLCシステム上に注入し、そこで、12℃に維持した固定化ペプシンカラムを使用してその試料を消化した。消化後、ペプチドをWaters UPLC HSS T3

2. 1×5 mmプレカラム上に保持した。次いでペプチドをプレカラムから溶出させ、8分の2～35%アセトニトリル勾配を使用してWaters UPLC CSH C18 1.0×100 mmカラム上で分離した。

【0591】

図31の左側は、 Ca^{2+} の不在下で20358または20337のいずれかと複合体化したNotch3 NRRについてのHDx-MS相違プロットを示す。このプロットの試験により、これらの2つの抗体間で異なって(differentially)保護される領域を見ることができる。例えば、領域1419～1432および1456～1488は20337と比べて20358の存在下で、より保護された。対照的に、領域1489～1498、1500～1506、1538～1568、1571～1582および1583～1591は20358の結合と比べてNotch3 NRRへの20337結合後に、より保護された。20337および20358についての保護領域は図31の右側で2つの図において黒色で強調される。異なるHDx-MSの観察により、20337抗体は20358(データを示した)および20350(データは示さず)抗体と比べてNotch3 NRR抗原と異なって相互作用することが示される。全体として、HDx-MSデータはエピトープビニングデータ(実施例13)およびx線結晶学(実施例14)と一致し、20337、20358および20350がNotch3 NRR上で異なる相互作用(およびエピトープ)を有することが示される。

10

【0592】

同じ実験を、 Ca^{2+} の存在下でNotch3 NRR-20337複合体に対応するHDx-MSデータを獲得するために反復してもよく、 Ca^{2+} の不在下で見られるものと同様のデータ、すなわち、3つ全ての抗体によって異なって保護されるNotch3 NRRの領域が見られる可能性があることが予想される。

20

【0593】

〔実施例16〕

Notch3 NRRのさらなるコンフォメーションナルエピトープの識別

Notch3 NRRのさらなるコンフォメーションナルエピトープは、本明細書に開示される抗体(例えば、20337、20350、20358およびA4)でNotch3 NRRを予め遮断することによって見ることができる。本明細書に開示されるNotch3 NRRの構造に基づいて、抗体20337、20350、20358およびA4のエピトープをNotch3 NRRの表面上でマッピングできる。図32に示されるように、4つの抗体のエピトープはLNRおよびHDドメインの両方にわたって、Notch3 NRRの表面の約67%を覆い、約33%の表面は覆われていないままである(図32)。

30

【0594】

本明細書に開示される4つの抗体によって例示されるように、LNRおよびHDを架橋するコンフォメーションナルエピトープを結合する抗体は、Notch3シグナル伝達を阻害する抗体についての潜在的な機構である。抗体はLNRおよびHDと一緒に固定し、Notch3 NRRの自己阻害状態を安定化することによって機能する。Notch3 NRRの表面上の少なくとも2つのさらなる潜在的なエピトープは、20337、20350、20358およびA4によって覆われていないままであることを確認した。図34に示されるように、第1の潜在的なエピトープはLNR-CおよびHDドメインを含み、第2はLNR-A/Bリンカー、LNR-AおよびHDドメインを含む。(LNRおよびHDを直接架橋する)これらの2つの潜在的なエピトープの有益な形状に関して、Notch3のさらなる阻害抗体がそれらに対して見出され得るようである。

40

【0595】

これらの2つの潜在的エピトープおよび他のコンフォメーションナルエピトープを標的とする抗体をスクリーニングするために、以下の実験戦略を利用できる。一般に、以前に識別されたNotch3抗体(例えば、20337、20350または20358のいずれか)は、Morphosys HuCAL PLATINUM(登録商標)ライブラリー

50

などの市販のファージディスプレイライブラリーによるパニング前に組換えNRRタンパク質とプレインキュベートできる。加えて、これらのN o t c h 3抗体（20337、20350、20358）は、パニング前にN o t c h 3を発現する細胞に事前に結合できる。単独または組合せのいずれかでのN o t c h 3抗体とのプレインキュベーションはこれらの抗体のエピトープを遮断し、異なるおよび特有のエピトープに結合するクローン／抗体を豊富にする。記載されるように、組換えNRRタンパク質ならびに全細胞およびディファレンシャル全細胞パニングと共に固相または液相パニングのいずれかを使用した包括的なパニング戦略が使用される。次いで、図3～6に記載されるように組換えタンパク質としてのN o t c h 3およびN o t c h 3を発現する細胞の両方への選択的結合を示すクローン／抗体が選択される。加えて、上記のアプローチから識別された抗体は、図7、8、11、13、14、15に記載されるように細胞ベースの機能アッセイ（リガンド駆動レポーター遺伝子アッセイ、N o t c h 標的遺伝子mRNA定量、ICD3タンパク質レベル、TALL-1増殖）においてN o t c h 3シグナル伝達の阻害についてスクリーニングされる。新たに識別されたN o t c h 3抗体が、20337、20350、20358と同じエピトープまたは異なり、重なっていないエピトープに結合するかどうかを判定するために、これらの一般的アプローチを使用できる：Biacoreによるエピトープマッピング（図20）；NRRタンパク質による共結晶構造（図21、23、24、25）；および抗体／N o t c h 3 NRR複合体のHDx-MSエピトープマッピング（図27～31）。最終的に、NRRタンパク質とのこれらの新規抗体の共結晶構造により、抗体のエピトープを識別し、エピトープが20337、20358および20350と異なるかどうかを判定することが可能となる。

10

20

【0596】

均等物

上述の記載された明細書は、当業者が本開示を実施できるようにするのに十分であるとみなされる。上述の記載および実施例は本開示の特定の好ましい実施形態を詳述し、本発明者らによって意図される最適な様式を記載している。しかしながら、上述が本文中にいかにより詳細に記載されているように見え得るとしても、本開示は多くの手段で実施可能であり、本開示は添付の特許請求の範囲およびその任意の均等物に従って解釈されるべきであることは理解されるであろう。

【0597】

30

参照による組み込み

特許、特許出願、論文、教科書などを含む、本明細書に引用される全ての参考文献およびそれらに引用される参考文献は、それらが既に引用されていない限り、本明細書に参照によりその全てが組み込まれる。

【 図 1 】

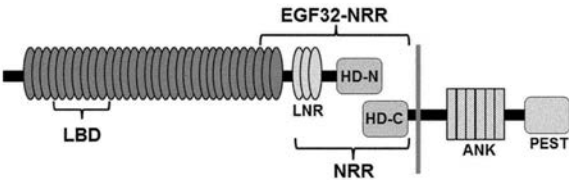


図1

【 図 2 】

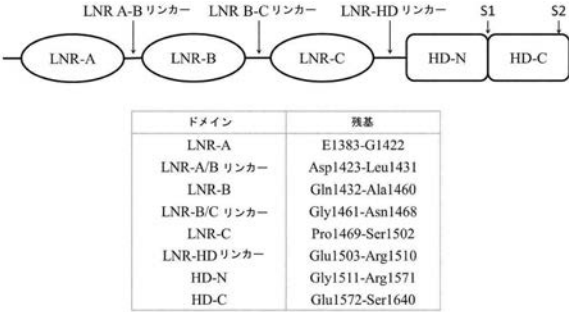


図2

【 図 3 A 】

MOR	タンパク質ドメイン	ヒトEC50 nM	カニクイザルEC50 nM	マウスEC50 nM
12215	EGF32 NRR	0.9	0.6	2.2
20337	EGF32 NRR	0.8	0.6	0.7
12225	EGF32 NRR	0.8	0.9	0.7
20345	EGF32 NRR	0.7	0.6	0.3
20350	EGF32 NRR	1.3	1.4	29.0
20351	EGF32 NRR	0.9	0.8	0.4
12981	EGF32 NRR	0.4	0.4	結合なし
20358	EGF32 NRR	0.4	0.5	S.D.F.
12229	LBD	0.4	0.5	1.3
20364	LBD	1.0	1.5	1.6
20802	LBD	0.5	0.7	1.2

飽和に到達しなかった

図3a

【 図 3 B 】

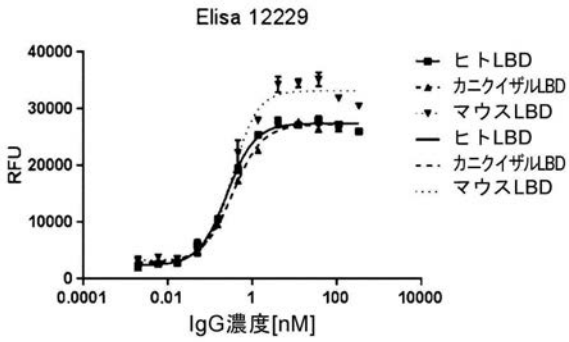


図3b

【 図 3 C 】

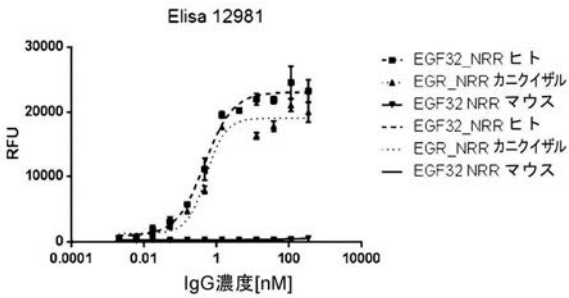


図3c

【 図 4 】

MOR	タンパク質ドメイン	ヒトKd nM	カニクイザルKd nM	マウスKd nM
12215	EGF32 NRR	0.9	2.7	1.0
20337	EGF32 NRR	0.5	0.4	4.4
12225	EGF32 NRR	2.3	2.7	6.8
20345	EGF32 NRR	1.0	0.7	4.1
20350	EGF32 NRR	0.1	0.3	2.9
20351	EGF32 NRR	0.2	1.2	2.7
12981	EGF32 NRR	43	19	nsd
20358	EGF32 NRR	1.6	2.7	70
12229	LBD	14	24	16
20364	LBD	0.2	0.1	0.1

可能な記載なし(不十分な結合)

図4

【図 5 A】

MOR	FACS EC50 U2OS_N3 細胞
12215	0.65
20337	0.34
12225	<u>nsp</u>
20345	0.38
20350	0.16
20351	0.34
12981	<u>s.n.f.</u>
20358	0.14
12229	<u>s.n.f.</u>
20364	0.09
20802	0.01

飽和に到達しなかった

可能な記載なし(不十分な結合)

図5a

【図 5 B】

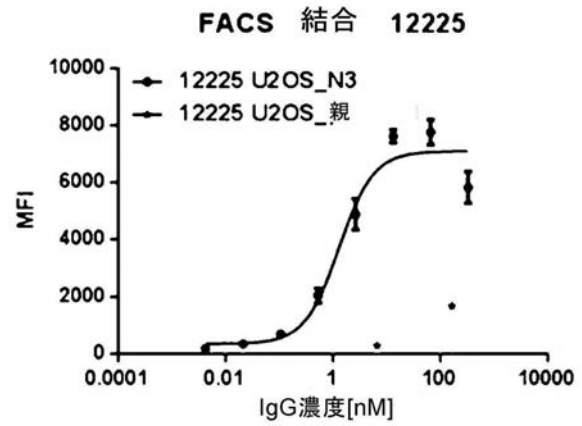


図5b

【図 5 C】

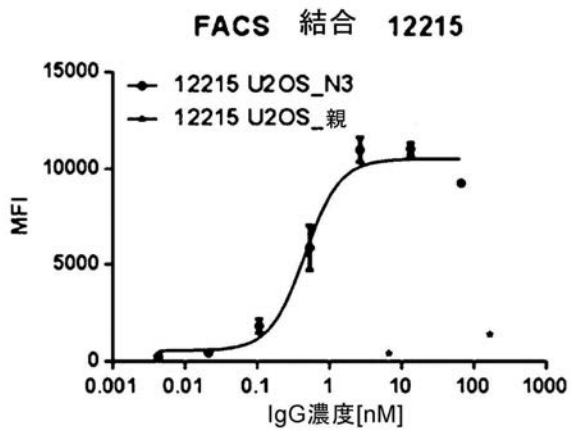


図5c

【図 6 A】

MOR	FACS EC50 U2OS_N3 細胞
12215	0.65
20337	0.34
12225	<u>nsp</u>
20345	0.38
20350	0.16
20351	0.34
12981	<u>s.n.f.</u>
20358	0.14
12229	<u>s.n.f.</u>
20364	0.09
20802	0.01

飽和に到達しなかった

可能な記載なし(不十分な結合)

図6a

【図 6 B】

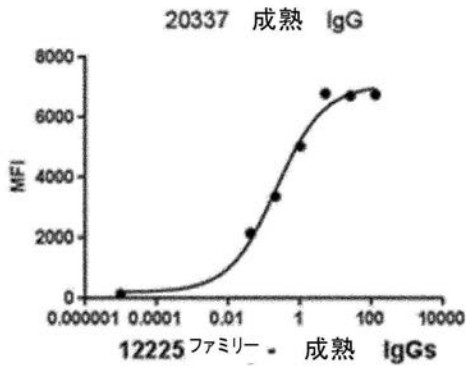


図6b

【図 6 D】

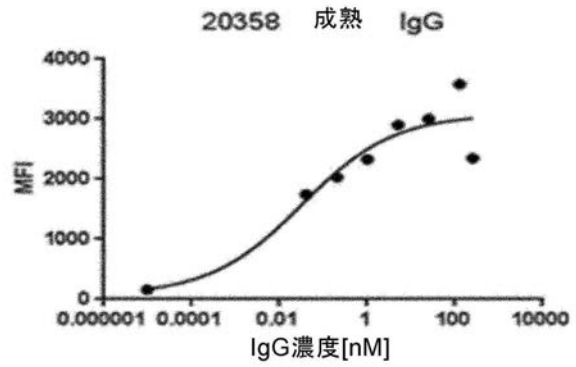


図6d

【図 6 C】

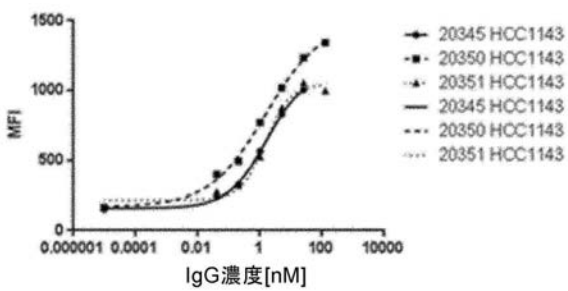


図6c

【図 6 E】

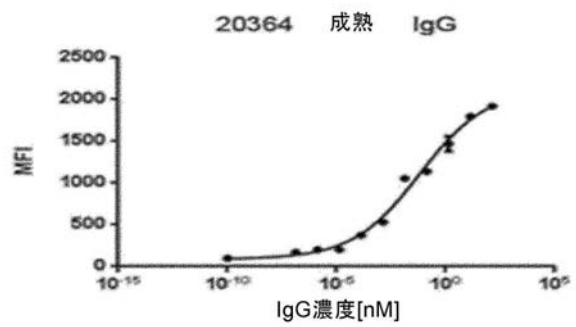


図6e

【図 6 F】

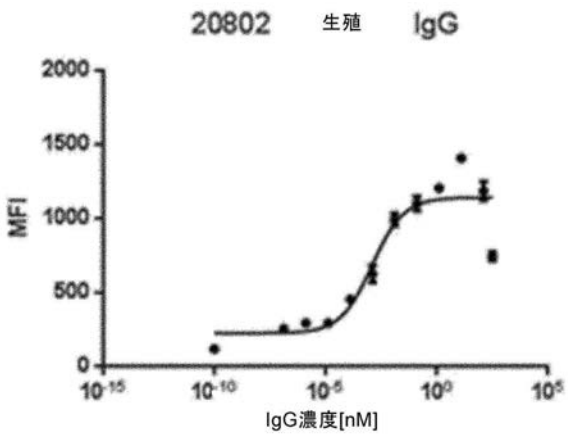


図6f

【図 7 A】

MOR	Jagged1 阻害%	Jagged1 IC50 (nM)	Delta 1 阻害%	Delta 1 IC50 (nM)
12215	-5	n.a.	-1	n.a.
20337	60	4.6	18	6.4
12225	-165	5.8	-8	n.a.
20345	-88	0.4	19	0.3
20350	-67	0.6	29	0.5
20351	-50	0.8	30	1.4
12981	56	0.2	16	22
20358	80	0.1	29	0.4
12229	77	0.7	85	5.5
20364	72	2.0	91	1.8
20802	70	2.1	93	3.9

図7a

【図 7 B】

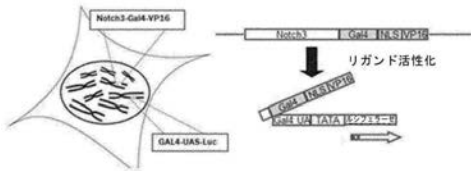


圖7b

【図 7 C】

共培養

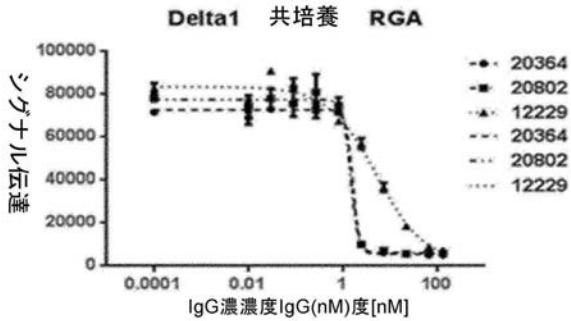


図7c

【図 7 D】

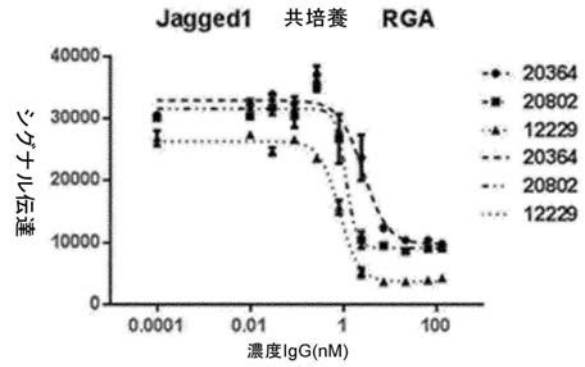


图7d

【图 8】

MOR	HCC1143 MMP7 10ug/ml	HCC1143 HES1 10ug/ml	MDA-MB468 DKK1 10ug/ml	MDA-MB468 HES1 10ug/ml
20337	38	45	278	34
20345	44	38	215	63
20350	45	39	287	47
20351	49	39	292	42
20358	12	21	276	44
20364	63	34	167	-14

圖8

【图 9 A】

遺伝子名・系統	DNA 変化	コドン	タンパク質変化
QMS10_CNS	C→G(30C→)	C(6839-4641)CTG→TGT	P1545V
SHKAP 幹細胞	A→G(24C→)	C(4582-4544)CTC→TTC	P15158M
SEKINAWAHERAOKAZUOZUO 牛草内臓	T→C(71T→)	C(4789-4791)AAT→AAA	P15158M
QMS102 植物およびヒト	A→G(24C→)	C(4582-4544)CTG→TGT	P15158M
SHKAP 幹細胞	A→G(24C→)	C(4582-4544)CTG→TGT	P15158M
KUSATE	A→G(24C→)	C(4582-4544)CTG→TGT	P15158M
CHYKATE 牛草	A→G(24C→)	C(4582-4544)CTG→TGT	P15158M
SHUJ15 大腸	A→G(27C→)	C(4870-4872)ATC→GAC	P17604H
SHUJ75 大腸	A→G(29C→)	C(4826-4830)CGC→CAG	P15158M
SHKAP7 牛草幹細胞	A→G(24C→)	C(4582-4544)CTG→TGT	P15158M
TALL1 牛草幹細胞	T→C(27C→)	C(4738-4740)CTG→TTC	P23598L
WM88 皮膚	A→G(29C→)	C(4759-4761)GAC→TTC	P15187H

組換え系統	GDNA 変化	コンシグ変化	タンパク質変異と補綴	
ATD4 組換え	C.63359A>A	C.63359G>GAT	G2112D	ヒトセズ
FC1C2 組換え	C.65343A>A	C.65343G>CTG-TG-ATG	T21212M	ヒトセズ
FC1C3 2 対換	C.63811T>T	C.63811-53631TCT-GTC	F21211	ヒトセズ
FC1C3 3 対換	C.61133G>A	C.61133G>GAC	F21211	ヒトセズ
GCT 対換	C.61775G>A	C.61775-61775G>AGC	G2098R	ヒトセズ
GMS10 組換え	C.62139G>A	C.62138-62139G>CAG	R2080Q	ヒトセズ
HEC103 子育シバ	C.60855D>A	C.60855-60855D>GAC	G2022H	ヒトセズ
KCT 組換え	C.63371T>T	C.63371T>TCT-AT	G21211	ヒトセズ
KGT 子育シバ	C.63623A>A	C.63623-63623TAC>TGC	T21211C	ヒトセズ
KYH1 対換	C.62323T>T	C.62322-62323GAC>TAG	G20725	ヒトセズ
L34111 組換え	C.66945D>A	C.66945-66945D>TAC>ATC	G20370	ヒトセズ
L513 組換え	C.62670T>T	C.62669-62670T>TCT	G20686	ヒトセズ
NCH2347 株	C.65115D>A	C.65114-65115D>TGC-TG	W21172*	ヒトセズ
NCH2440 株	C.62860T>T	C.62858-62860T>GCG>CTG	G20691	ヒトセズ
NCH2476 株	C.62850T>T	C.62850-62850T>TCC>G>T	G20506	ヒトセズ
NCH2478 株	C.64811T>T	C.64810-64811T>GCG>T	G20481	ヒトセズ
SP295 株	C.62923C>A	C.64333-64333C>ATC	R2145Q	ヒトセズ
SW1116 株	C.65320C>T	C.65320-65320C>TCT>T	P21785	ヒトセズ
Z313287 株	C.60211 0202mG>A	C.61199-60400C>G505G	P20676	フォームント
HC103 対換	C.61035G>A	C.61035G>GAC	P21778	フォームント
HC151 子育シバ	C.65330 3615mC>A	C.65328-65331G	P21778	フォームント
HC240 対換	C.65308G>A	C.6528-6531G>CAG	P21778	フォームント
AG49 対換	C.61012 4103mC>A	C.61004-61010C>G507G	P20676	フォームント
HC404 対換	C.61022 4103mC>A	C.61004-61010C>G507G	P20676	フォームント
SH293 対換	C.62014mC>A	C.61199-6201C>C	P20676	フォームント

图9a

【 図 9 B 】

腫瘍_系統	タンパク質_変化
X-1004 胸部	G1487D
X-1407 胸部	A1537T
X-1569 腎臓	R1526C

图9b

【図 10 A】

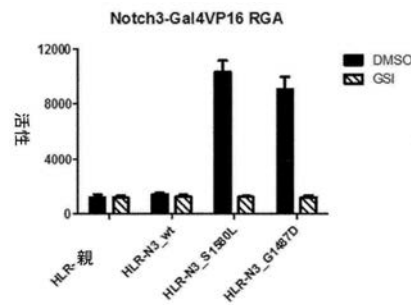


图 10a

【 図 1 0 B 】

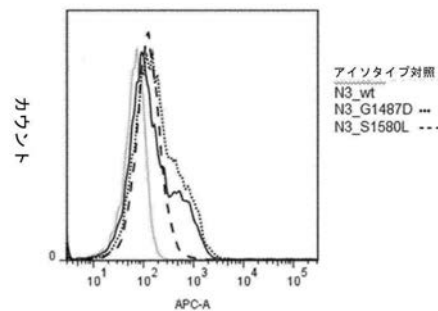


图 10b

【図 1 1 A】

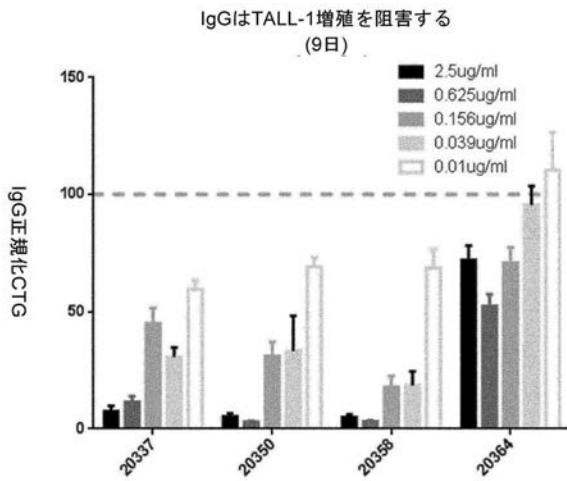


図11a

【図 1 1 B】

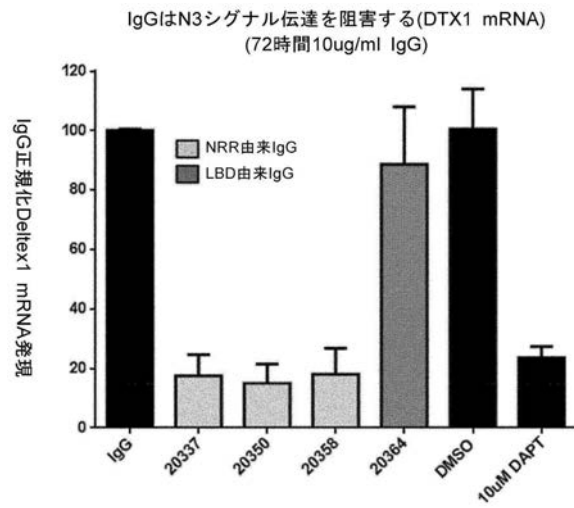


図11b

【図 1 2 A】

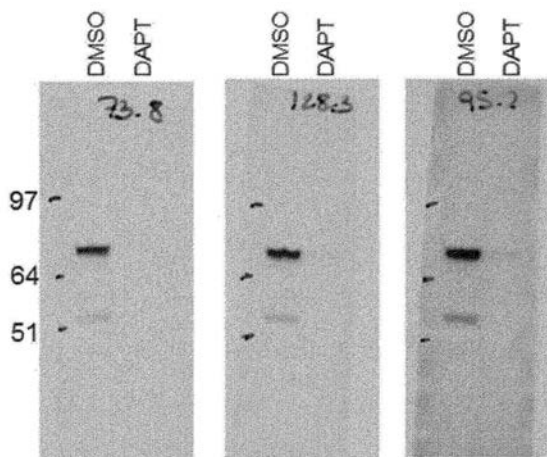


図12a

【図 1 2 B】

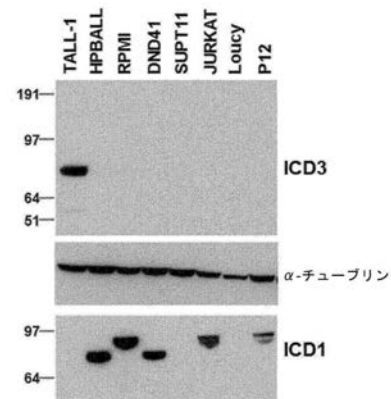


図12b

【図 1 3 A】

TALL-1細胞におけるICD3レベル

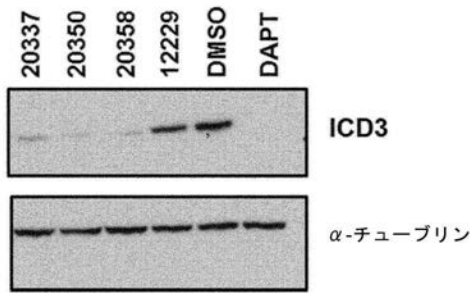


図13a

【図 1 3 B】

MDA-MB468細胞におけるICD3レベル

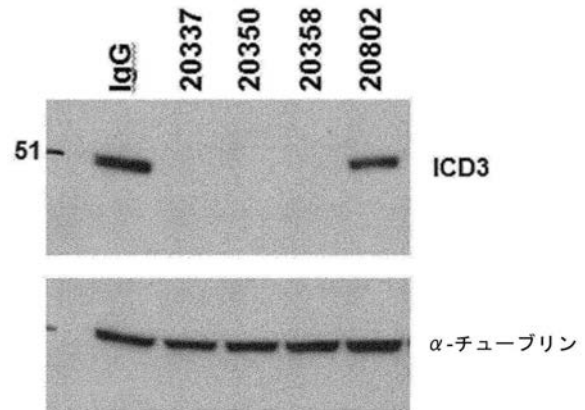


図13b

【図 1 4 A】

ISHIKAWAHERAKLIO02_ER細胞におけるICD3レベル

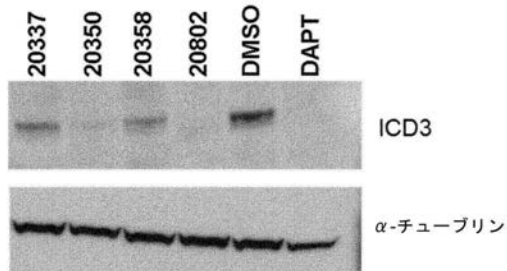


図14a

【図 1 4 B】

TE-11細胞におけるICD3レベル

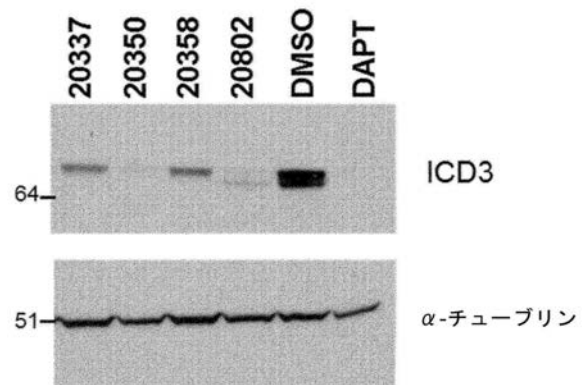


図14b

【図 1 4 C】

A549細胞におけるICD3レベル

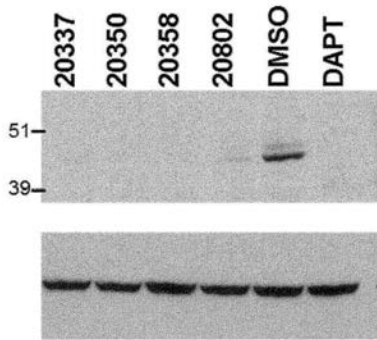


図14c

【図 1 5】

HCC1143細胞におけるICD3レベル

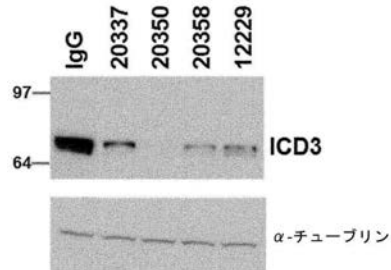


図15

【図 1 6 A】

In vivo PD TALL-1

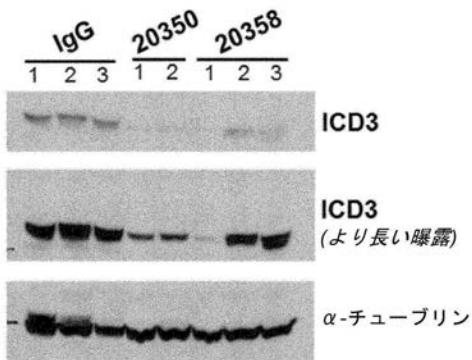


図16a

【図 1 6 B】

In vivo PD TALL-1 IHC

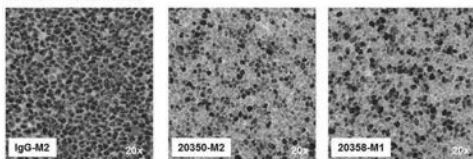


図16b

【図 1 7 A】

In vivo PD MDA-MB468

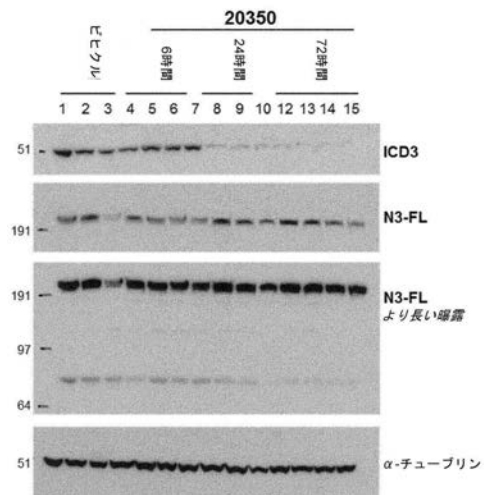


図17a

【図 17 B】

In vivo PD MDA-MB468
(72時間)

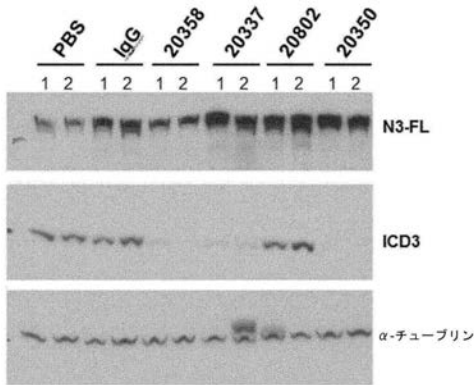


図17b

【図 18】

In vivo PD-HLUX1823 モデル

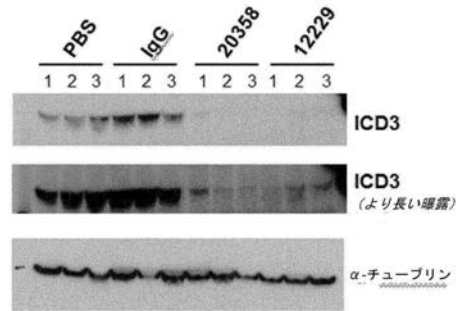


図18

【図 19 A】

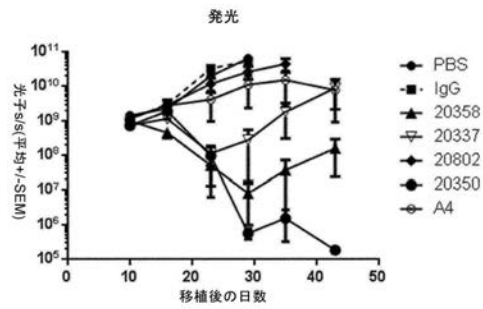


図19a

【図 19 B】

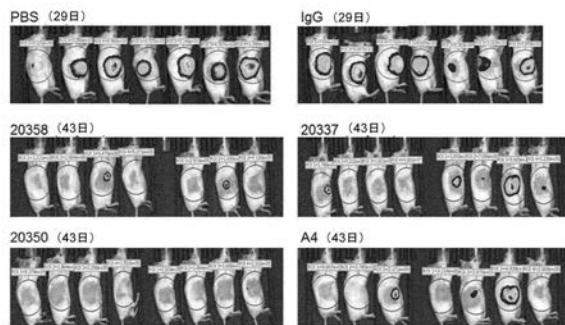


図19b

【図 21】

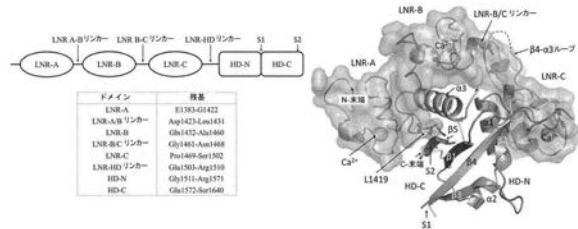


図21

【図 22】

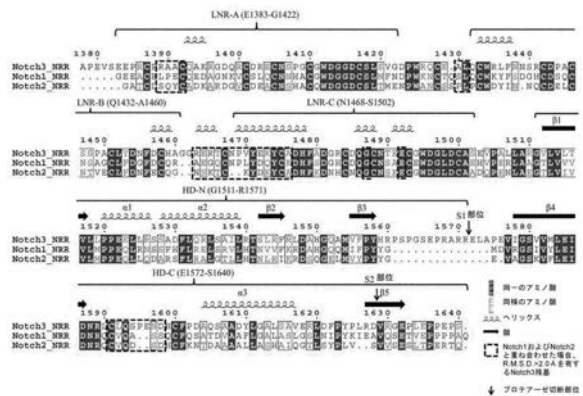


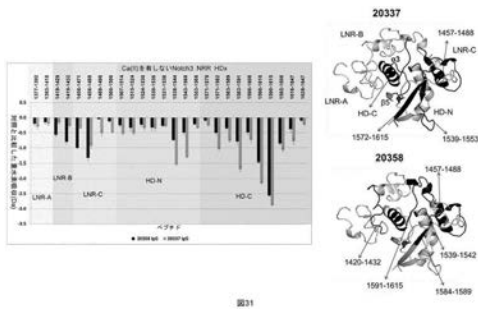
図22

【図 20】

		IgG 試料 1					
群	MOR	20337	20345	20350	20351	20358	A4
12215	20337	-3.4	65.3	69.9	71.2	71	43.3
12225	20345	77.8	9.7	9	12.7	46.6	69.9
12225	20350	47.1	8.3	6.2	9.9	15	15.6
12225	20351	74	4.6	3.4	6.2	27	48.9
12981	20358	72.7	51.1	52.4	50.5	8.1	44.2
Refmab	A4	81.6	78.9	78.9	78	60.4	0.2
	PBST	-1.1	-1.5	-1.5	-2.3	-9.5	-19.7
	エビトープ	NRR_A	NRR_B	NRR_B	NRR_C	NRR_D	

図20

【図 3 1】



【図 3 2】

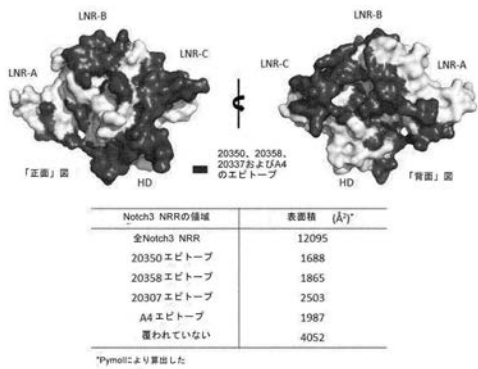
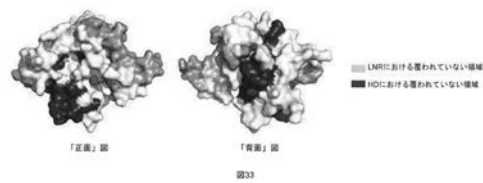
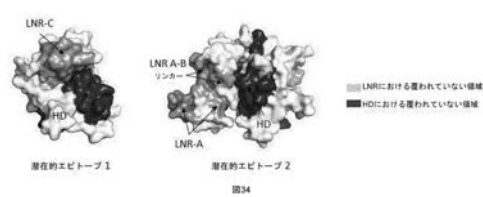


図32

【図 3 3】



【図 3 4】



【配列表】

2019011331000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成30年9月26日(2018.9.26)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

Notch3受容体のコンフォメーションルエピトープを含む単離ポリペプチドであって、前記コンフォメーションルエピトープが、Notch3受容体のNRRドメインの、LNR (Lin Notch Repeat) 領域内、ヘテロ二量体化 (HD: heterodimerization) ドメイン内、およびリンカー領域内の、連続アミノ酸配列および非連続アミノ酸配列を含み、前記LNR領域が、LNR-A、LNR-B、LNR-Cからなる群から選択され、前記HDドメインが、N末端HDおよびC末端HDからなる群から選択され、前記リンカー領域が、LNR-A/Bリンカー、LNR-B/Cリンカー、LNR-HDリンカーからなる群から選択される、単離ポリペプチド。

フロントページの続き

- (51)Int.Cl. F I テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/686 (2018.01) C 1 2 Q 1/686 Z
- (72)発明者 デプラゼスローバー, ジョエル
ドイツ国 8 2 1 5 2 プラネーク, レナークリストーシュトラーク 4 8, モルフォシス アー
ゲー
- (72)発明者 フライヤー, クリスティ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, マサチューセッツ アベニ
ュー 2 5 0, ノバルティス インスティテューツ フォー バイオメディカル リサーチ, イン
コーポレイテッド
- (72)発明者 フ, チアンセン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, マサチューセッツ アベニ
ュー 2 5 0, ノバルティス インスティテューツ フォー バイオメディカル リサーチ, イン
コーポレイテッド
- (72)発明者 ジェンキンス, デイビッド
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 1 7 4 1, カーリスル, エスタブルーク ロード 1 4
9
- (72)発明者 ペトロプーロス, コンスタンティン
ドイツ国 8 2 1 5 2 プラネーク, レナークリストーシュトラーク 4 8, モルフォシス アー
ゲー
- (72)発明者 ティール, フィリップ
ドイツ国 6 7 0 7 1 ルートヴィヒスハーフェン, エアフルター リング 1 4
- F ターム (参考) 4B063 QA01 QA13 QA18 QQ02 QQ03 QQ08 QQ42 QQ52 QR32 QR35
QR55 QR59 QR62 QS02 QS25 QS32 QX02
4H045 AA11 BA10 CA40 DA50 DA75 DA76 EA20 FA74

【外国語明細書】
2019011331000001.pdf