



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

ヒトデルタ様リガンド 4 (D L L 4) に特異的に結合し、ヒトデルタ様リガンド 4 と N o t c h 受容体間の相互作用を阻害するモノクローナル抗体。

**【請求項 2】**

前記モノクローナル抗体は、配列番号 2 で記載された重鎖 C D R 1 ; 配列番号 3 で記載された重鎖 C D R 2 ; 及び配列番号 4 で記載された重鎖 C D R 3 を含む重鎖可変領域と、配列番号 1 6 で記載された軽鎖 C D R 1 ; 配列番号 1 7 で記載された軽鎖 C D R 2 ; 及び配列番号 1 8 で記載された軽鎖 C D R 3 を含む軽鎖可変領域を含む請求項 1 に記載のモノクローナル抗体。

10

**【請求項 3】**

前記モノクローナル抗体は、配列番号 1 で記載された重鎖可変領域のアミノ酸配列及び配列番号 1 5 で記載された軽鎖可変領域のアミノ酸配列を含む請求項 2 に記載のモノクローナル抗体。

**【請求項 4】**

前記モノクローナル抗体は、配列番号 2 で記載された重鎖 C D R 1 ; 配列番号 6 で記載された重鎖 C D R 2 ; 及び配列番号 7 で記載された重鎖 C D R 3 を含む重鎖可変領域と、配列番号 2 0 で記載された軽鎖 C D R 1 ; 配列番号 2 1 で記載された軽鎖 C D R 2 ; 及び配列番号 2 2 で記載された軽鎖 C D R 3 を含む軽鎖可変領域を含む請求項 1 に記載のモノクローナル抗体。

20

**【請求項 5】**

前記モノクローナル抗体は、配列番号 5 で記載された重鎖可変領域のアミノ酸配列及び配列番号 1 9 で記載された軽鎖可変領域のアミノ酸配列を含む請求項 4 に記載のモノクローナル抗体。

**【請求項 6】**

前記モノクローナル抗体は、配列番号 2 で記載された重鎖 C D R 1 ; 配列番号 9 で記載された重鎖 C D R 2 ; 及び配列番号 1 0 で記載された重鎖 C D R 3 を含む重鎖可変領域と配列番号 2 4 で記載された軽鎖 C D R 1 ; 配列番号 2 5 で記載された軽鎖 C D R 2 ; 配列番号 2 6 で記載された軽鎖 C D R 3 を含む軽鎖可変領域を含む請求項 1 に記載のモノクローナル抗体。

30

**【請求項 7】**

前記モノクローナル抗体は、配列番号 8 で記載された重鎖可変領域のアミノ酸配列及び配列番号 2 3 で記載された軽鎖可変領域のアミノ酸配列を含む請求項 6 に記載のモノクローナル抗体。

**【請求項 8】**

前記モノクローナル抗体は、配列番号 1 2 で記載された重鎖 C D R 1 ; 配列番号 1 3 で記載された重鎖 C D R 2 ; 及び配列番号 1 4 で記載された重鎖 C D R 3 を含む重鎖可変領域と、配列番号 2 8 で記載された軽鎖 C D R 1 ; 配列番号 2 9 で記載された軽鎖 C D R 2 ; 及び配列番号 3 0 で記載された軽鎖 C D R 3 を含む軽鎖可変領域を含む請求項 1 に記載のモノクローナル抗体。

40

**【請求項 9】**

前記モノクローナル抗体は、配列番号 1 1 で記載された重鎖可変領域のアミノ酸配列及び配列 2 7 で記載された軽鎖可変領域のアミノ酸配列を含む請求項 8 に記載のモノクローナル抗体。

**【請求項 10】**

請求項 1 ~ 9 のいずれかの前記モノクローナル抗体をコードするポリヌクレオチド。

**【請求項 11】**

請求項 10 のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

**【請求項 12】**

請求項 11 の発現ベクターが導入された形質転換体。

50

## 【請求項 1 3】

請求項 1 1 の発現ベクターの発現を含むヒトデルタ様リガンド 4 (D L L 4) に特異的に結合し、ヒトデルタ様リガンド 4 と N o t c h 受容体間の相互作用を阻害するモノクローナルの製造方法。

## 【請求項 1 4】

請求項 1 ~ 9 のいずれかの前記モノクローナル抗体を含む癌を予防又は治療するための薬学的組成物。

## 【請求項 1 5】

前記癌は、食道癌、胃癌、大腸癌、直腸癌、口腔癌、咽頭癌、喉頭癌、肺癌、結腸癌、乳癌、子宮頸部癌、子宮内膜癌、卵巣癌、前立腺癌、精巣腫瘍、膀胱癌、腎癌、肝癌、膵臓癌、骨癌、結合組織癌、皮膚癌、脳癌、甲状腺癌、白血病、ホジキン病、リンパ腫、多発骨髄腫、血液癌からなる群より選択されるものである請求項 1 4 に記載の組成物。

10

## 【請求項 1 6】

請求項 1 ~ 9 のいずれかの前記モノクローナル抗体を癌を有する疑いのある個体に投与することを含む癌の治療方法。

## 【請求項 1 7】

請求項 1 ~ 9 のいずれかの前記モノクローナル抗体を含む癌診断用組成物。

## 【請求項 1 8】

請求項 1 ~ 9 のいずれかの前記モノクローナル抗体を用いて癌を有する疑いのある個体から分離した生物学的試料のデルタ様リガンド 4 (D L L 4) タンパク質を抗原 - 抗体反応を通じて検出することを含む癌を診断する方法。

20

## 【請求項 1 9】

請求項 1 ~ 9 のいずれかの前記モノクローナル抗体を含む自己免疫疾患を予防又は治療する薬学的組成物。

## 【請求項 2 0】

前記自己免疫疾患は、リウマチ性関節炎、全身性硬化症、全身性紅斑性狼瘡、アトピー皮膚炎、乾癬、円形脱毛症、喘息、クローン病、ベーチェット症候群、シェーグレン症候群、ギラン・バレー症候群、慢性甲状腺炎、多発性硬化症、強直性脊椎炎、脳脊髄炎、線維炎及び結節性多発動脈炎からなる群より選択されるものである請求項 1 9 に記載の組成物。

30

## 【請求項 2 1】

請求項 1 ~ 9 のいずれかの前記モノクローナル抗体を自己免疫疾患を有する疑いのある個体に投与することを含む自己免疫疾患の治療方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0 0 0 1】

本発明は、デルタ様リガンド 4 (D L L 4) に特異的に結合する新規モノクローナル抗体に関し、具体的には、ヒトデルタ様リガンド 4 に特異的に結合してデルタ様リガンド 4 と N o t c h 受容体間の結合を効果的に阻害するモノクローナル抗体、前期モノクローナル抗体をコードするポリヌクレオチド、前期ポリヌクレオチドを含む発現ベクター、前期発現ベクターを含む形質転換体、前期モノクローナル個体の製造方法、前期モノクローナル抗体を含む癌を予防又は治療するための薬学的組成物、前期モノクローナル抗体を含む癌診断用組成物、前期モノクローナル個体を用いた癌を診断するための方法及びモノクローナル抗体を含む自己免疫疾患を予防又は治療するための薬学的組成物に関する。

40

## 【背景技術】

## 【0 0 0 2】

N o t c h シグナル伝達は、脊椎動物から無脊椎動物に至るまで進化論的に高く保存されており、発生初期に細胞の運命を決定する非常に重要な役割を担うと報告されている。N o t c h シグナル伝達は、神経細胞、眼球細胞、リンパ球、筋肉細胞、血球などの分化を調節する主要因子として知られており、また、血管発生にも関与している。哺乳類には

50

、4つのNotch受容体を持っており(Notch 1、2、3及び4)、それぞれのNotch受容体は、300 - 350 kDaの大きさを有するタンパク質として合成され、ゴルジ体でフーリン様転移酵素によってS1部位が切られることで、細胞表面でヘテロ二量体を形成する。さらに、哺乳類では、4つのNotchリガンド(Jagged-1/2及びDelta類リガンド(DLL)1/3/4)が発見された。

#### 【0003】

Notch受容体及びリガンドは、いずれも膜タンパク質であり、2つの近接した細胞間の境界面に結合し、Notchシグナル伝達を誘導する。細胞がそれぞれと接触するとき、これらの細胞の外側のドメインが直接的に結合してシグナル伝達が誘導し、リガンドと受容体の組み合わせによって異なった細胞反応が起きる。Notchシグナル伝達で、リガンドとNotchが互いに結合すると、Notch受容体の構造的に変化し、以後、2回の順次的なタンパク質分解切断を受ける。一番目のタンパク質分解切断は、金属タンパク質分解酵素であるADAM10/17(a disintegrin and metalloprotease 10/17)/TACE(TNF- Converting enzyme)による細胞の外側のドメイン(S2部位)が切断されてから始まる。S2部位が切断されると、Notch受容体の膜間通領域のS3部位が切断される。二番目のタンパク質分解切断は、5つのサブユニットを持つ -セクレターゼによって仲介される。 -セクレターゼ複合体は、プレセニン1、プレセニン2、ニカストリン、Pen-2及びAph1から構成されている。2回のタンパク質分解切断後、Notch細胞内部分(NICD)は、分離されて核の中に移動する。核の中で、NICDは、転写抑制因子であるCSL(CBF-1/Suppressor of Hairless/Lag-1)と結合し、CSLに結合していた補助抑制因子(CoR)のと交代する。NICD/CSL複合体は、補助活性化因子(CoA)であるMAML(マスターマインド様)又はp300などを集め、サイクリンD1、p21、NF-kB、c-Myc、pre-Ta(pre-T cell receptor alpha chain)、GATA3、NRARP及びDeltex1などのNotchターゲット遺伝子を活性化させ発現を誘導する。

10

20

#### 【0004】

活性化されたNotchシグナル伝達は、様々な癌モデルで腫瘍形成を誘発することが知られている。活性化型NotchであるNICDがラットの造血細胞で発現される場合、T細胞白血病/リンパ腫を引き起こし、活性化型Notch 1の約50%が、T-ALL(T細胞急性リンパ芽球性白血病)の約50%発見された(非特許文献1)。さらに、乳癌の場合、Notch 4受容体が、MMTV(マウス乳癌ウイルス)が挿入されたラット(CzechII)で過剰発現されることが発見され、これらのラットの乳腺腫瘍の発生が報告された(非特許文献2)。子宮頸癌、肺癌、膵臓癌、卵巣癌、乳癌及び前立腺癌などの様々な癌でNotch受容体とリガンド及びNotchシグナル伝達のターゲットが活性化されていることが報告されている(非特許文献3)。Notch 1受容体が乳癌患者において 不良な予後と関連されており(非特許文献4)、前立腺癌においては、癌転移と関連している(非特許文献5)。

30

#### 【0005】

デルタ様4(DI4)又はデルタ様リガンド4(以下「DLL4」という)は、血管内皮細胞で過剰発現されているNotchタンパク質に結合するデルタ部類の一つであり、血管新生を調節する主要な要素として知られている。DLL4は、特に、血管内皮細胞で過剰発現されているNotch 1又はNotch 4受容体に結合する。DLL4は、正常的な血管でも発現するが、癌の血管では非常に過剰発現されていることが知られている(非特許文献6)。血管新生は、元の血管から形成される新しい血管による機構を意味する。特に、腫瘍において、血管新生は、癌組織の低酸素領域に酸素と栄養分を供給してもらうために、VEGFのような血管新生因子によって引き起こる。腫瘍において、血管新生は、腫瘍の成長だけでなく、腫瘍の転移においても重要な役割を果たすことが知られている。腫瘍において、DLL4によるNotchシグナル伝達をブロックすると、血管新生が容易に調節されず、それによって、癌の成長が抑制される。さらに、DLL4によるNotchシグナル伝達が抑制されると、制御性T細胞(Treg)の数を増加させることによって、自

40

50

己免疫疾患を治療することができる(特許文献1)。このような理由から、DLL4は、癌及び自己免疫疾患の治療において新しいターゲットになる。

【0006】

DLL4をターゲットとして、癌又は自己免疫疾患を治療するために、様々な部分でNotchシグナル伝達を抑制するための研究がなされている。その例として、Notch/リガンド結合を阻害する受容体であるデコイ、Notchシグナル伝達でNotchタンパク質の切断に關与する -セクレターゼ抑制剤及びNotchシグナル伝達に關与するタンパク質又はNotchのターゲット遺伝子を抑制するためのmiRNA又はsiRNAを含む。これらの様々なNotchシグナル伝達を抑制するための方法の中で、Notchシグナル伝達の初期に作用することができるNotchに対するリガンドに結合するモノクローナル抗体に対する研究の重要性が多くなってきており、特に、臨床研究のためのヒトのDLL4に特異的に結合可能で、免疫原性の危険性を最小化しながらDLL4/Notch受容体の相互作用を効果的に阻害できるヒトモノクローナル抗体の開発が要求されてきた。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】米国公開特許第2011-0189200号

【特許文献2】米国公開特許2011-0189200号

【特許文献3】米国公開特許2011-0117079号

20

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Science 2004; 306:71-269

【非特許文献2】Journal of Virology 1987; 61:66-74

【非特許文献3】Clin Cancer Res 2006; 12(4):1074-79

【非特許文献4】Cancer Reserach 2005; 65:8530-7

【非特許文献5】Cancer Research 2004;64:6854-7

【非特許文献6】Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol 2008; 5(5):250-67

【非特許文献7】Cancer Res 2007;67(23):11244-53

【非特許文献8】Novartis Found Symp 2007;283:106-20

30

【非特許文献9】J Immunol 2011;187(5)2322-8

【非特許文献10】Nature 1976;256:495

【非特許文献11】A Companion to Methods in Enzymology 2:119

【非特許文献12】J.Virol. 2001 Jul;75(14):6692-9

【非特許文献13】Ann. Rev. Immunol 1994.12:433

【非特許文献14】Cancer Res 2011;71:6030-6039

【非特許文献15】Nature 1994;368:150-4

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

40

従って、本発明者らは、ヒトDLL4に特異的に結合できると同時に、DLL4/Notch受容体の相互作用を効果的に阻害し及び免疫原性の危険性を最小化できるヒトモノクローナル抗体を開発するために鋭意努力した。その結果、本発明者らは、ヒト抗体のライブラリーから重鎖及び軽鎖のドメインが全てヒト由来であるヒトDLL4に特異的に結合するヒトモノクローナル抗体を製作し、DLL4とNotchタンパク質の間の相互作用を効果的に阻害できるヒトモノクローナル抗体を見出し、それにyって、癌のような疾病の治療に効果的に使用できることで、本発明の完成に至った。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明の目的は、ヒトデルタ様リガンド(DLL4)に特異的に結合し、同時にヒトデル

50

タ様リガンド4とN o t c h受容体間の相互作用を阻害する新規モノクローナル抗体を提供することである。

【0011】

本発明の他の目的は、前記モノクローナル抗体をコードするポリヌクレオチド、前記ポリヌクレオチドを含む発現ベクター及び前記発現ベクターを含む形質転換体を提供することである。

【0012】

本発明のさらに他の目的は、前記モノクローナル抗体を製造する方法を提供することである。

【0013】

本発明のさらに他の目的は、前記モノクローナル抗体を含む癌を治療するための薬学組成物を提供することである。

【0014】

本発明のさらに他の目的は、前記モノクローナル抗体を用いて癌を治療する方法を提供することである。

【0015】

本発明のさらに他の目的は、前記モノクローナル抗体を用いて、抗原-抗体反応を通じて癌の疑いのある個体から分離した生物学的試料のデルタ様リガンド4(D L L 4)タンパク質を検出する段階を含む方法である癌を診断する方法を提供することである。

【0016】

本発明のさらに他の目的は、前記モノクローナル抗体を含む癌を診断するための組成物を提供することである。

【0017】

本発明のさらに他の目的は、前記癌を診断するための組成物を含む癌を診断するためのキットを提供することである。

【0018】

本発明のさらに他の目的は、前記モノクローナル抗体を含む自己免疫疾患を治療するための薬学的組成物を提供することである。

【0019】

本発明のさらに他の目的は、前記モノクローナル抗体を用いて自己免疫疾患を治療する方法を提供することである。

【発明の効果】

【0020】

本発明によるヒトモノクローナル抗体は、ヒトD L L 4に対して強い親和性を示し、N o t c h受容体へのD L L 4の結合を効果的に阻害し、重鎖及び軽鎖ドメインである全てがヒト由来であるため、低い免疫原性を示す。従って、本発明のヒトモノクローナル抗体は、癌又は自己免疫診断のような疾患の診断及び治療に効果的に使用され得る。

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1】D L L 4に対するモノクローナル抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のアミノ酸配列を示す。F I G 1で、フレームは、フレームワーク領域を、CDRは補性決定領域を意味する。

【図2】モノクローナル抗体のD L L 4に対する結合能を酵素免疫吸着測定法(ELISA)を通じて分析した結果を示す。

【図3】D L L 4を人為的に過剰発現させたHEK293細胞において、D L L 4に対するモノクローナルのD L L 4に対する結合能を流動細胞分析法を通じて検出した結果を示す((a)M L C K - 1;(b)M L C K - 2;(c)M L C K - 3;(d)M L C K - 4)。

【図4】モノクローナル抗体のD L L 4に対する中和能をELISAを通じて分析した結果を示す。

【図5】ピアコア機器を使用して、抗原D L L 4と本発明の抗-D L L 4抗体であるM L

10

20

30

40

50

C K - 1、M L C K - 2、M L C K - 3 及び M L C K - 4 との親和度を測定した結果を示す。

【図 6】抗-D L L 4 抗体である M L C K - 2 が、D L L 4 を介した H U V E C の増殖抑制をブロックすることを確認した図である。

【図 7】抗-D L L 4 抗体である M L C K - 2 が、D L L 4 及び N o t c h 間の相互作用の抑制を通じて、N o t c h シグナル伝達を阻害することをウェスタンブロッティングによって確認した結果を示す。

【発明の実施するための形態】

【0022】

一態様として、本発明は、ヒトデルタ様リガンド 4 と N o t c h 受容体間の相互作用を阻害しながら、ヒトデルタ様リガンド 4 (D L L 4) に特異的に結合する新規モノクローナル抗体、特に、ヒトモノクローナル抗体を提供する。

10

【0023】

ここで用いられる、用語「抗体」とは、特異的に抗原を認識する受容体の役割をするタンパク質分子を意味し、特定の抗原と免疫学的な反応性を持つ免疫グロブリン分子を含む。前記用語は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、全抗体及び抗体断片もまた含む。さらに、前記用語は、キメラ性抗体(例えば、人間化ネズミ科抗体)及び二価又は二重特異性分子(例えば、二重特異性抗体)、ダイアボディー、トリアボディー、テトラボディーを含む。全抗体は、2つの全長の軽鎖及び2つの全長の重鎖を持ち、それぞれの軽鎖は、重鎖とジスルフィド結合で連結されている。前記全抗体は、I g A、I g D、I g E、I g M 及び I g G を含み、I g G は、サブタイプとして、I g G<sub>1</sub>、I g G<sub>2</sub>、I g G<sub>3</sub> 及び I g G<sub>4</sub> を含む。前記抗体の断片は、抗原に結合する機能を持つ断片を意味し、F a b、F a b'、F (a b')<sub>2</sub> 及び Fv を含む。F a b は、軽鎖及び重鎖の可変領域と軽鎖の不変領域及び重鎖の最初の不変領域(C H 1 ドメイン)を持つ構造として1つの抗原結合部位を持つ。F a b' は、重鎖 C H 1 ドメインの C 末端に少なくともシステイン残基を含むヒンジ領域を持つという点で F a b と異なる。F (a b')<sub>2</sub> 抗体は、F a b' のヒンジ領域のシステイン残基間のジスルフィド結合によって生成される。F v (可変断片) は、重鎖可変部位及び軽鎖可変部位のみを持つ最小の抗体断片を意味する。二本鎖 F v (dsFv) は、重鎖可変部位とジスルフィド結合によって軽鎖可変部位と連結されており、一本鎖 F v (scFv) は、一般的にペプチドリンカーを通じて重鎖可変領域が軽鎖可変領域と共有結合で連結されている。このような抗体断片は、タンパク質加水分解酵素を用いて得ることができ(例えば、全体抗体をパインで切断することで、F a b 断片を得ることができ、ペプシンで切断することで、F (a b')<sub>2</sub> 断片を得ることができる)、好ましくは、遺伝子組み換え技術を通じて、抗体断片を作製することができる。

20

30

【0024】

ここで用いられる、用語「モノクローナル抗体」とは、実際的に同一の抗体集団から取得した単一分子組成を持つ抗体分子を意味し、このモノクローナルは、特定のエピトープに対して単一結合特異性及び親和度を示す。

【0025】

一般に、免疫グロブリンは、重鎖及び軽鎖を持つ。それぞれの重鎖及び軽鎖は、不変領域及び可変領域(前記領域は、さらにドメインとして知られている)を含む。軽鎖及び重鎖の可変領域は、相補性決定領域(以下「CDR」という)と呼ばれる3つの多変可能な領域によって阻害された4つの構造(フレームワーク)領域を含む。前記 C D R は、主に抗原のエピトープに結合する役割をする。C D R のそれぞれの鎖は、一般に N - 末端から始まり順に数えて、C D R 1、C D R 2、C D R 3 と呼ばれ、また、一般に C D R が位置する鎖によって識別される。

40

【0026】

ここで用いられる、用語「ヒト抗体」とは、免疫グロブリンから由来する分子として、相補性決定領域、フレームワーク(構造)領域を含む抗体全長のアミノ酸配列がヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列からなることを意味する。ヒト抗体は、一般に、ヒトの疾患の治療に用いられるが、これは3つ以上の潜在的長点を有する。まず、ヒト抗体は、ヒト免

50

疫システムにより容易に相互作用することができるため、ターゲット細胞は、例えば、補体-依存性細胞毒性(CDC)又は抗体-依存性細胞性毒性(ADCC)によってより効果的に破壊され得る。二番目に、ヒト免疫システムは、前記抗体を外来のものと認識しないという利点がある。三番目に、抗体が、より少ない頻度でより少ない量の薬物を投与した場でも、ヒト循環系におけるその半減期が、天然的に発生する抗体と類似しているという利点がある。従って、本発明によるヒトモノクローナル抗体は、D L L 4に対する強い親和力を示し、D L L 4を発現する細胞(例 癌細胞)が、N o t c h 1又はN o t c h 4受容体に結合することを効果的に阻害し、また重鎖及び軽鎖のドメイン全てがヒト由来であるため、低い免疫原性を示す。従って、本発明のモノクローナル抗体は、癌又は自己免疫疾患などの疾病の治療のために効果的に利用することができる。

10

**【0027】**

ここで用いられる、用語「ヒトデルタ様リガンド4(D L L 4)に特異的に結合するモノクローナル抗体」とは、D L L 4に結合でき、D L L 4の生物学的活性の抑制を誘導する抗体を意味し、本発明で「抗D L L 4抗体」と交互に使用され得る。前記D L L 4に特異的に結合するモノクローナルは、D L L 4に特異的に結合してD L L 4とN o t c h受容体間の相互作用を阻害するものであれば、制限されない。前記モノクローナル抗体の実施例は、前記で説明したように、全抗体及び抗体断片を含む。本発明のモノクローナル抗体は、D L L 4とN o t c hタンパク質間の相互作用を阻害しながら、ヒトD L L 4に特異的に結合し、それによって、N o t c hシグナル伝達が関与する癌又は自己免疫疾患などの疾病の治療に効果的に使用され得る。

20

**【0028】**

前記D L L 4に特異的に結合するモノクローナル抗体は、好ましくは配列番号2に記載される重鎖C D R 1を含むモノクローナル抗体であり得、D L L 4に特異的に結合するが、それらに制限されない。

**【0029】**

前記配列番号2で記載された重鎖C D R 1を含むモノクローナル抗体は、好ましくは、配列番号2で記載された重鎖C D R 1；配列番号3で記載された重鎖C D R 2；及び配列番号4で記載された重鎖C D R 3を含む重鎖可変領域と配列番号16で記載された軽鎖C D R 1；配列番号17で記載された軽鎖C D R 3；及び配列番号18で記載された軽鎖C D R 3を含む軽鎖可変領域を含むモノクローナル抗体であり得る。より好ましくは、配列番号2で記載された重鎖C D R 1は、配列番号1で記載された重鎖可変領域のアミノ酸配列及び配列番号15で記載された軽鎖可変領域のアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体であり得るが、それらに制限されない。本発明の一実施例では、配列番号1で記載されたアミノ酸配列を有する重鎖可変領域及び配列番号15で記載されたアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含むヒトモノクローナル抗体を「M L C K - 1」と命名した。

30

**【0030】**

さらに、前記配列番号2で記載された重鎖C D R 1を含むモノクローナル抗体は、好ましくは、配列番号2で記載された重鎖C D R 1；配列番号6で記載された重鎖C D R 2；及び配列番号7で記載された重鎖C D R 3を含む重鎖可変領域と配列番号20で記載された軽鎖C D R 1；配列番号21で記載された軽鎖C D R 2；及び配列番号22で記載された軽鎖C D R 3を含む軽鎖可変領域を含むモノクローナル抗体であり得る。より好ましくは、配列番号2で記載された重鎖C D R 1を含むモノクローナル抗体は、配列番号5で記載された重鎖可変領域のアミノ酸配列及び配列番号19で記載された軽鎖可変領域のアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体であり得るが、それらに制限されない。本発明の一実施例では、配列番号5で記載されたアミノ酸配列を有する重鎖可変領域及び配列番号19で記載されたアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含むヒトモノクローナル抗体を「M L C K - 2」と命名した。

40

**【0031】**

さらに、前記配列番号2で記載された重鎖C D R 1を含むモノクローナル抗体は、好ましくは、配列番号2で記載された重鎖C D R 1；配列番号9で記載された重鎖C D R 2；

50

及び配列番号10で記載された重鎖CDR3を含む重鎖可変領域と配列番号24で記載された軽鎖CDR1；配列番号25で記載された軽鎖CDR2；及び配列番号26で記載された軽鎖CDR3を含む軽鎖可変領域を含むモノクローナル抗体であり得る。より好ましくは、配列番号2で記載された重鎖CDR1を含むモノクローナル抗体は、配列番号8で記載された重鎖可変領域のアミノ酸配列及び配列番号23で記載された軽鎖可変領域のアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体であり得るが、それらに制限されない。本発明の一実施例では、配列番号8で記載されたアミノ酸配列を有する重鎖可変領域及び配列番号23で記載されたアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含むヒトモノクローナル抗体を「MLCK-3」と命名した。

#### 【0032】

さらに、前記DLL4に特異的に結合するモノクローナル抗体は、好ましくは、配列番号12で記載された重鎖CDR1；配列番号13で記載された重鎖CDR2；配列番号14で記載された重鎖CDR3を含む重鎖可変領域と配列番号28で記載された軽鎖CDR1；配列番号29で記載された軽鎖CDR2；配列番号30で記載された軽鎖CDR3を含む軽鎖可変領域を含むモノクローナル抗体であり得る。より好ましくは、配列番号11で記載された可変領域のアミノ酸配列及び配列番号27で記載された可変領域のアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体であり得るが、それらに制限されない。本発明の一実施例では、配列番号11で記載されたアミノ酸配列を有する重鎖可変領域及び配列番号27で記載されたアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含むヒトモノクローナル抗体を「MLCK-4」と命名した。

#### 【0033】

前記MLCK-1、MLCK-2、MLCK-3及びMLCK-4の重鎖及び軽鎖可変領域の配列を図1に示した。

#### 【0034】

本発明のヒトモノクローナル抗体が不変領域を含む場合、IgG、IgA、IgD、IgE及びIgM、又はこれらの組み合わせ、並びにこれらのハイブリットから由来する不変領域を含むことができる。

#### 【0035】

本発明の用語「組み合わせ」とは、同一起源の単鎖免疫グロブリン不変領域をコードするポリペプチドが、二量体又は多量体を形成する異なる起源の単鎖ポリペプチドと連結されていることを意味する。その例として、二量体又は多量体は、IgG、IgA、IgD、IgE及びIgMの不変領域からなるグループより選択される2つ以上の不変領域を形成することができる。

#### 【0036】

本発明の用語「ハイブリット」とは、2つ以上の異なる起源の免疫グロブリン重鎖不変領域にをコードする配列が単鎖免疫グロブリン重鎖不変領域内に存在することを意味する。その例として、ドメインのハイブリットは、IgG、IgA、IgD、IgE及びIgMのCH1、CH2、CH3及びCH4から選択される1～4つのドメインから構成され得る。

#### 【0037】

一方、IgGのサブタイプであるIgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>及びIgG<sub>4</sub>重鎖不変領域の組み合わせ又はハイブリットもまた可能である。これらの組み合わせ及びハイブリットは、前記に説明したとおりである。前記IgG<sub>1</sub>重鎖不変領域は、配列番号31で記載されたIgG<sub>1</sub>重鎖不変領域であり得る；IgG<sub>2</sub>重鎖不変領域は、配列番号32で記載されたIgG<sub>2</sub>重鎖不変領域であり得る；IgG<sub>3</sub>重鎖不変領域は、配列番号33で記載されたIgG<sub>3</sub>重鎖不変領域であり得る；及びIgG<sub>4</sub>重鎖不変領域は、配列番号34で記載されたIgG<sub>4</sub>重鎖不変領域であり得るが、本発明の範囲は、それらに制限されるものではない。

#### 【0038】

さらに、本発明の前記DLL4に特異的なモノクローナル抗体が、軽鎖不変領域を含み

10

20

30

40

50

、前記軽鎖不変領域は、ラムダ( )又はカッパ( )軽鎖由来であり得る。前記モノクローナル抗体の軽鎖不変領域がラムダ軽鎖由来である場合、配列番号35で記載されたラムダ軽鎖不変領域であり得るが、これらに制限されるものではない。

【0039】

本発明の用語「デルタ様リガンド4(DLL4)」は、Notch受容体に結合するデルタクラスリガンドの一つとして、好ましくは、Notch1又はNotch4に結合するタンパク質を意味するが、それらに制限されるものではない。DLL4は、どの哺乳類のDLL4でもあり得るが、好ましくは、ヒトDLL4であり得る。本発明の目的上、DLL4は、癌細胞又は血管内皮細胞で発現するNotch1又は4受容体のいずれにも結合でき、癌の成長を誘導したり、自己免疫疾患の進行を誘導するタンパク質を意味するが、それらに制限されるものではない。

10

【0040】

前記DLL4は、癌の血管系を含む様々な癌細胞で過剰発現されており、癌モデルにおいて、腫瘍内の脈管機能を向上させることによって、癌の増殖と転移に関与することが知られている。また、DLL4の抑制は、自己免疫疾患を治療できることが知られている。

【0041】

前記DLL4タンパク質は、天然型又は変異体DLL4タンパク質を含むが、それらに制限されるものではない。ここで用いられる用語、天然型DLL4タンパク質は、一般に、天然型DLL4タンパク質のアミノ酸配列を含むポリペプチドを意味し、そして、The phrase前記天然型DLL4タンパク質のアミノ酸配列は、一般に、自然に発生するDLL4

20

で発見されるアミノ酸配列を意味する。前記DLL4に対する情報は、米国国立保健研究所のGeneBankを含む公知のデータベースから得ることができ、例えば、GeneBank Accession Number NM\_019074.3(Gene ID: 54567)であるDLL4の情報であり得るが、それらに制限されるものではない。

【0042】

本発明の用語「Notch受容体」とは、Notchシグナル伝達を媒介するタンパク質を意味し、Notchと交互して使用することができる。前記Notch受容体は、Notchシグナル伝達を媒介するどのタンパク質でもあり得る。好ましくは、Notch1又はNotch4受容体であり得るが、それらに制限されるものではない。本発明の目的上、前記Notch受容体は、哺乳類のDLL4に結合するどんなタンパク質でもあり得るが、好ましくは、ヒトDLL4に結合するタンパク質であってもよい。本発明の用語「Notch」は、全ての天然型Notch又は変異体Notchタンパク質を含むことを意味する。ここで用いられる用語「天然型Notch」とは、天然型Notchタンパク質のアミノ酸配列を含むポリペプチドを意味し、前記(The phrase)「天然型Notchタンパク質のアミノ酸配列」とは、一般に、自然に発生するNotch受容体から発見されるアミノ酸を意味する。

30

【0043】

本発明の用語「ヒトデルタ様リガンド4とNotch受容体間の相互作用の阻害」は、本発明のDLL4に特異的なモノクローナル抗体が、DLL4に結合してDLL4とNotch受容体間の相互作用を阻害することを意味し、好ましくは、DLL4に特異的なモノクローナル抗体が、DLL4に結合してDLL4とNotch1又はNotch4受容体との相互作用を阻害することを意味するが、それらに制限さえるものではない。本発明のDLL4に特異的なモノクローナル抗体は、DLL4との結合によるNotch受容体の構造的変化を防ぐことで、DLL4とNotch受容体間の相互作用の阻害する。従って、Notchタンパク質の加水分解を防ぎ、Notchシグナル伝達を阻害する。癌において、DLL4がNotch受容体に結合すると、血管内皮細胞間のシグナル伝達又は癌のがん幹細胞と血管内皮細胞間のNotchシグナル伝達が活性化され、血管の大きさを増大し、腫瘍内の脈管機能が向上し、それによって、癌の増殖と転移への役割を担うことが知られている(非特許文献7)。従って、癌においては、DLL4によりNotch

40

50

シグナル伝達がブロックされると、血管新生がうまく調節されず、それによって、癌の成長を抑制することができる。さらに、DLL4がブロックされると、血管新生部位の末端の細胞から外側抑制の欠失は、過剰な発芽を引き起こすようである。その結果、低い生産性及び酸素を供給するための還流を有する血管新生の反応が低下することによる結果として、癌周辺の低酸素を誘導を減少させることができ、抗VEGF治療において抵抗性を示す癌に対しても、抗癌効果を結果として示す。(非特許文献8)。従って、DLL4とNotch間の相互作用を効果的に抑制する本発明のDLL4に特異的なヒトモノクローナル抗体は、癌の治療に効果的に使用することができる。さらに、DLL4の抑制が制御性T細胞の発達を促進させ、脳脊髄炎などの自己免疫疾患を緩和させることが知られている(非特許文献9)。さらに、DLL4アンタゴニストは、自己免疫疾患の治療に利用でき(特許文献2)、そして抗体などのDLL4結合タンパク質が、自己免疫疾患の治療に使用できることが知られている(特許文献3)。従って、DLL4に効果的に結合してDLL4とNotch受容体間の相互作用を抑制する本発明の抗体は、自己免疫疾患の治療でも効果的に使用され得る。

10

20

30

40

50

#### 【0044】

本発明の一実施例において、前記DLL4特異的ヒトモノクローナル抗体であるMLCK-1、MLCK-2、MLCK-3及びMLCK-4を製作し、対照群に比べて、前記抗体に対してヒトDLL4との結合能のパーセンテージが、それぞれ47.82%、59%、52.85%及び52.46%であることを証明し(図3)、これら抗体は、0.1 $\mu$ Mという低い抗体濃度で、DLL4とヒトNotch1受容体間の結合をほとんどブロックすることが観察された(図4)。さらに、本発明の抗-DLL4抗体MLCK-1、MLCK-2、MLCK-3及びMLCK-4のhDLL4に対するKd(M)は、それぞれ2.63 $\times$ 10<sup>-7</sup>M、1.71 $\times$ 10<sup>-9</sup>M、6.96 $\times$ 10<sup>-9</sup>M及び2.13 $\times$ 10<sup>-6</sup>Mであった(図5)。また、血管内皮細胞の増殖は、濃度依存的にDLL4によって阻害された(図6)。また、DLL4-Notchシグナル伝達の活性は、NICDの生成の抑制をもたらす(図7)。これらの結果は、本発明のDLL4特異的ヒトモノクローナル抗体が、DLL4とNotch受容体間の結合を効果的にブロックし及びNotchシグナル伝達を抑制することによって、自己免疫疾患に対する抗癌効果及び治療効果を提供できることを示す。

#### 【0045】

他の態様として、本発明は、前述したモノクローナル抗体を製造する方法を提供する。

#### 【0046】

本発明のモノクローナル抗体は、従来のモノクローナル抗体製造技術を用いて容易に製造することができる。例えば、モノクローナル抗体を製造する方法は、免疫された動物から得られたBリンパ球を用いてハイブリドーマを製造することで、行うことができ(非特許文献10)又はファージディスプレイ技術を用いることによって行うことができるが、それらに制限されるものではない。

#### 【0047】

ファージディスプレイを用いた抗体ライブラリーは、ハイブリドーマを製作することなく、Bリンパ球から直接的に得られた抗体遺伝子を持つファージの表面で抗体を発現させる方法である。ファージディスプレイ法によって、B-細胞不滅化によるモノクローナル抗体を生成することに関連し、多くの困難を、ファージディスプレイ法によって克服することができる。従来のファージディスプレイは、1)ファージ外皮タンパク質pIII(又はpIV)のN-末端に該当する領域にランダム配列を有するオリゴヌクレオチドを挿入する；2)ランダム配列を有する前記オリゴヌクレオチドによってコードされる天然型の外皮タンパク質及びポリペプチドの融合タンパク質を発現させる；3)前記オリゴヌクレオチドによってコードされるポリペプチドに結合できる受容体物質を処理する；4)受容体に結合するペプチド-ファージ粒子を、低いpH又は結合競争力のある分子を利用して溶出させる；5)パンニングによって溶出したファージを宿主細胞内で増幅させる；6)所望の量のファージを得るために前記段階を繰り返す；及び7)パンニングによって選別されたファージクローンのDNA配列を有する活性化ペプチドの配列を決定する段階から構成される。

## 【 0 0 4 8 】

好適な実施例において、本発明のモノクローナル抗体の製造方法は、ファージディスプレイ法によって行ってもよい。当分野の当業者は、例えば、Barbas(非特許文献11, 12)など及びWinterなど(非特許文献13)の論文などに記載されているファージディスプレイ技術を参考して、前記本発明の製造方法の前記段階を容易に行うことができる。抗体ライブラリーを構築するために使用できるファージの例は、それに制限されないが、fd, M13, f1, lf1, lke, Zj/Z, Ff, Xf, Pf1及びPf3などの繊維状ファージを含む。また、前記繊維状ファージの表面上に異種の遺伝子の発現のための使われ得るベクターの例は、それに制限されないが、fUSE5, fAFF1, fd-CAT1又はfdtetDOGなどのファージベクター又はpHEN1, pComb3, pComb8又はpSEXなどのファージミドベクターを含む。さらに、組み換えファージの成功的な再感染のために要求される野生型外皮タンパク質を提供するために使用できるヘルパーファージの例は、それに制限されないが、M13K07及びVCSM13を含む。

10

## 【 0 0 4 9 】

本発明のハイブリドーマ由来のモノクローナル抗体又はファージディスプレイクローンをコードするポリヌクレオチドは、従来の手続きを用いて容易に単離され、配列分析することができる(その例として、ハイブリドーマ又はファージの鋳型DNAから目的の重鎖及び軽鎖領域を特異的に増幅するように設計されたオリゴヌクレオチドプライマーを使用することで)。ひとまず、前記ポリヌクレオチドが単離されると、発現ベクター内に入れることができ、次に、適切な宿主細胞に遺伝子導入して、形質転換された宿主細胞(つまり、形質変換体)から所望のモノクローナル抗体を生産することができる。従って、本発明のヒトモノクローナル抗体を製造する方法は、ヒトモノクローナル抗体をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを増幅させる段階を含むが、それらに制限されるものではない。

20

## 【 0 0 5 0 】

他の態様として、本発明は、前記モノクローナル抗体をコードするポリヌクレオチド、前記ポリヌクレオチドを含む発現ベクター及び前記発現ベクターを含む形質転換体を提供する。

## 【 0 0 5 1 】

前記モノクローナルは、前記の説明のとおりである。

## 【 0 0 5 2 】

本発明による前記モノクローナル抗体をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターは、特に制限されないが、哺乳類細胞(例えば、ヒト、サル、ウサギ、ラット、ハムスター又はマウス細胞など)、植物細胞、酵母細胞、昆虫細胞又はバクテリア細胞(例えば、大腸菌など)を含む真核又は原核細胞から前期ポリヌクレオチドを複製及び/又は発現可能なベクターであり得る。好ましくは、宿主細胞でポリヌクレオチドが発現できるように、適切なプロモータと作動可能であるように連結されており、少なくとも一つの選別マーカを含むベクターであり得る。その例として、前記ベクターは、ファージ、プラスミド、コスミド、微小染色体、ウィルス又はレトロウィルスに導入された前記ポリヌクレオチドを含む。

30

## 【 0 0 5 3 】

前記モノクローナル抗体をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターは、前記モノクローナル抗体の重鎖又は軽鎖を含むベクター又は、前記モノクローナル抗体の重鎖及び軽鎖をコードするポリヌクレオチドを含むいずれの発現ベクターであり得る。

40

## 【 0 0 5 4 】

本発明の前記発現ベクターが形質変換体を形成するために導入される必要がある細胞は、大腸菌、ストレプトミセス(*Streptomyces*)、ネズミチフス菌(*Salmonella typhimurium*)などのバクテリア細胞；酵母細胞；ピキア・パストリス(*Pichia pastoris*)などの菌類細胞；ショウジョウバエ(*Drosophila*)又はスポドプテラ(*Spodoptera*)Sf9細胞などの昆虫細胞；CHO(中国のハムスター卵巣細胞)細胞、SP2/0(マウス骨髄腫)、ヒトリンパ芽球、COS、NSO(マウスの骨髄腫)、293T、ボーズメラノーマ、HT-1080、BHK(ペビーハムス

50

ター腎臓細胞)、HEK(ヒト胎児由来腎臓細胞)、PERC.6(ヒト網膜細胞)などの動物細胞など;又は植物細胞を含む。

【0055】

本発明の用語「導入」は、前記モノクローナル抗体をコードするポリヌクレオチドを含むベクターを宿主細胞に伝達する方法を意味する。このような導入は、calcium phosphate-DNA coprecipitation、DEAE-dextran-mediated transfection、ポリブレン-媒介-トランスフェクション、エレクトロポレーション、微量注射法、リボソーム-媒介-トランスフェクション、リボソーム-媒介-トランスフェクション、リポフェクション及び原形質体融合法を含む当分野に公知の様々な方法によって行うことができる。また、形質転換導入は、所望の試料をウイルス粒子を用いた感染を手段として細胞内に伝達することを意味する。さらに、遺伝子ボンバードメントによってベクターを宿主細胞内に導入することができる。本発明で導入は形質移入と混用されて使用され得る。

10

【0056】

他の態様として、本発明は、前記モノクローナル抗体を含む癌を予防又は治療するための薬学的組成物を提供する。

【0057】

本発明のモノクローナル抗体は、DLL4に結合してDLL4とNotch受容体間の結合を阻害し、それによって、癌の成長の抑制に参与することができる。ここで、前記DLL4及びNotch受容体は、前記の説明のとおりである。

【0058】

本発明の用語「癌」は、本発明の抗体によって治療できるどんな種類の癌も意味する。前記モノクローナル抗体によって治療できる癌の例は、それに制限されないが、食道癌、胃癌、大腸癌、直腸癌、口腔癌、咽頭癌、喉頭癌、肺癌、結腸癌、乳癌、子宮頸部癌、子宮内膜癌、卵巣癌、前立腺癌、精巣腫瘍、膀胱癌、腎癌、肝癌、膵臓癌、骨癌、結合組織癌、皮膚癌、脳癌、甲状腺癌、白血病、ホジキン病、リンパ腫、多発骨髄腫及び血液癌(blood cancer)を含む。

20

【0059】

本発明の用語「予防」とは、前記組成物を投与することによって癌の発病を抑制又は遅延させる全ての行為を意味し、「治療」とは、組成物を投与することによって癌の症状が好転又は有利に変化する全ての行為を意味する。

30

【0060】

前記薬学的組成物は、薬学的に許容可能な担体をさらに含んでもよい。

【0061】

本発明の用語「薬学的に許容可能な担体」とは、生物体にかなり大きな刺激を誘発することなく、生物核的活性及び投与された化合物の特性を抑止しない担体及び希釈体を意味する。薬学的に許容可能な担体の例は、液状溶液で製剤化される組成物において許容される薬学的担体としては、滅菌及び生体に適したものとして、食塩水、滅菌水、リンガー液、緩衝食塩水、アルブミン注射溶液、デキストロース溶液、マルトデキストリン溶液、グリセロール、エタノール及びこれら二つ以上の混合物を含む溶液の形態の本発明の組成物を製剤して用いることができる。必要に応じて、本発明の組成物は、水溶液、懸濁剤、乳剤、丸薬、カプセル、顆粒及び錠剤などの注射可能な製剤を製剤化するために、希釈剤、分散剤、界面活性剤、結合剤及び潤滑剤をさらに含んでもよい。

40

【0062】

前記薬学的組成物は、経口又は非経口の様々な製形であり得る。薬学的組成物は、充填剤、増量剤、結合剤、湿潤剤、崩壊剤、界面活性剤を含む希釈剤又は賦形剤を用いて製形化される。経口投与のための固形製剤には、錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤、カプセルなどが含まれる。このような固形製剤は、少なくとも一つ以上の化合物に一つ以上の賦形剤、例えば、デンプン、炭酸カルシウム、スクロース又はラクトース、ゼラチンなどを混ぜて調剤する。単純な賦形剤以外に、ステアリン酸マグネシウム又はタルクなどのような潤滑剤もまた使用され得る。さらに、経口投与のための液状製剤には、懸濁剤、内溶液剤、

50

乳剤、シロップ剤などが含まれる。一般に、単純希釈剤及び流動パラフィンとして使われる水以外に、様々な賦形剤、例えば、湿潤剤、甘味剤、芳香剤、保存剤などが含まれ得る。非経口投与のための製剤には、滅菌された水溶液、非水性溶剤、懸濁剤、乳剤、凍結乾燥製剤、坐剤が含まれる。プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物性油、オレイン酸エチルのような注射可能なエステルなどが、非水溶剤及び懸濁剤として使用され得る。坐剤のベースは、ウィテップゾール、マクロゴール、tween 61、カカオ脂、ラウリン脂、グリセロゼラチンなどが使用され得る。

【0063】

前記薬学的組成物は、錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤、懸濁剤、内容液剤、乳剤、シロップ剤、滅菌された水溶液、非水性溶剤、懸濁剤、乳剤、凍結乾燥剤及び坐剤からなる群より選択されるいずれか一つの製形であり得る。

10

【0064】

前記本発明の組成物は、薬学的に有効な量で投与され得る。

【0065】

本発明の用語「薬学的に有効な量」とは、医学治療に適用可能な合理的な利益/危険の比率で疾患を治療するのに十分な量を意味する。組成物の効果的な服用レベルは、個体の種類、疾病重症度、個体の年齢及び性別、薬物の活性、薬物に対する敏感度、投与時間、投与経路、排出比率、治療期間、組成物と組み合わせて使用される薬物及び医学分野に良く知られる要素によって決定され得る。本発明の薬学的組成物は、個別で投与又は他の治療剤と併用して投与され得、従来の治療剤と順次的又は同時に投与され得る。前記組成物は、そして単一又は多重剤形として投与され得る。前記で述べた全ての要素を考慮して、副作用を引き起こすことなく、最大の効果を示せる最小限の量の組成物を投与することが重要であり、この最小量は、当分野の当業者によって容易に決定することができる。

20

【0066】

他の態様として、本発明は、前記モノクローナル抗体を使用して癌を治療する方法を提供する。

【0067】

ここで、前記モノクローナル抗体及び癌は、前記に説明したとおりである。

【0068】

前記癌を治療する方法は、モノクローナル抗体並びに薬学的に許容可能な担体を含む薬学的組成物を、癌を有する又は癌の疑いのある個体に投与する段階を含んでもよい。ここで、前記薬学的に許容可能な担体は、前記に説明したとおりである。前記個体の例は、ウシ、豚、羊、鳥、犬、ヒトを含む哺乳動物を含む。前記個体は、本発明の前記組成物の投与によって癌が治療されるどんな個体でもあり得る。

30

【0069】

前記組成物は、治療的に有効な量で単一又は多重剤形として投与され得る。ここで、組成物は、液剤、散剤、エロゾル、カプセル剤、腸溶性錠剤、又はカプセル剤又は坐剤の剤形として投与され得る。さらに、組成物は、腹腔内、静脈内、筋肉内、皮下、経口、鼻腔内、肺内、直腸内に投与され得るが、それらに制限されない。しかし、組成物を経口投与時、ペプチドは胃で消化され、これらの理由から経口用組成物は、活性薬剤をコーティングしたり、胃における分解から保護されるように製形化されなければならない。さらに、薬物学的組成物は、活性物質が標的細胞へ移動可能な任意の装置を用いて投与され得る。

40

【0070】

他の態様として、本発明は、前記に述べたモノクローナル抗体を利用して癌の疑いのある個体から分離された生物学的試料のデルタ様リガンド4(DLL4)タンパク質を抗原-抗体反応を通じて検出する段階を含む癌を診断する方法を提供する。

【0071】

ここで、前記モノクローナル抗体、癌、個体及びDLL4タンパク質は、前記に述べたとおりである。

50

## 【 0 0 7 2 】

前記癌を診断する方法は、本発明の D L L 4 特異的モノクローナル抗体を、癌の疑いのある個体から分離された生物学的試料と反応させ、抗原-抗体の複合体形成を検出することで、D L L 4 タンパク質を検出することができ、それによって、癌の診断のための情報を提供でき、又は癌を診断することができる。前記 D L L 4 は、卵巣癌細胞を含む様々な癌細胞で過剰発現しており(非特許文献 1 4)、癌は、正常細胞又は組織などの対照群と、生物学的試料内の D L L 4 の発現量を比較することで癌を診断することができるが、それらに制限されるものではない。

## 【 0 0 7 3 】

具体的に、癌の診断方法は、(a) 抗原-抗体反応を通じて D L L 4 タンパク質検出するために、前記に述べたモノクローナル抗体を癌の疑いのある個体から分離された生物学的試料に処理する；(b) 前記(a)段階で検出された D L L 4 タンパク質のレベルと対照群を比較する、及びもし、生物学的試料内の D L L 4 タンパク質のレベルが対照群と比較して高ければ、癌を有する個体であると判断する段階を含む癌の診断のための情報を提供又は癌を診断する方法であり得る。

10

## 【 0 0 7 4 】

本発明の用語「生物学的試料」とは、組織、細胞、全血液、血清、血漿、組織剖検試料(脳、皮膚、リンパ節、脊髄など)、細胞培養上清液、破裂された真核細胞及び細菌発現系を含むことを意味するが、それらに制限されるものではない。D L L 4 タンパク質の存在又は癌の有無を確認するために、これらの生物学的試料を操作したり又は操作しない状態で本発明の抗体と反応させることができる。

20

## 【 0 0 7 5 】

本発明の用語「抗原-抗体複合体」とは、試料中の D L L 4 タンパク質の抗原及び D L L 4 タンパク質の抗原を認識する本発明のモノクローナル抗体との結合物を意味し、この抗原-抗体複合体の形成は、比色法、電気化学法、蛍光法、発光法、粒子計数法、肉眼測定法及び液体シンチレーション計測法からなる群より選択される任意の方法で検出することができるが、それらに制限されるものではなく、様々な方法が使用され得る。

## 【 0 0 7 6 】

本発明において、様々なラベルは、抗原-抗体複合体を検出するために使用され得る。ラベルの具体的な例は、それに制限されないが、酵素、蛍光物、リガンド、発光物、微小粒子及び放射性同位元素からなるグループより選択され得る。

30

## 【 0 0 7 7 】

ラベル検出として使用される酵素の例は、アセチルコリンエステラーゼ、アルカリフォスファターゼ、 $\alpha$ -D-ガラクトシダーゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ及び $\beta$ -ラクタマーゼを含む。蛍光材料の例は、Eu<sup>3+</sup>、Eu<sup>3+</sup>キレート剤、クリプテートなどを含む。リガンドの例は、ビオチン誘導体などを含み、発光材料の例は、アクリジニウムエステル、イソルミノール誘導体などを含む。さらに、微小粒子の例は、コロイド金、着色されたラテックスなどを含み、放射性同位元素の例は、<sup>57</sup>Co、<sup>3</sup>H、<sup>125</sup>I、and <sup>125</sup>I-ボルトン・ハンター試薬を含む。

## 【 0 0 7 8 】

好ましくは、抗原-抗体複合体は酵素免疫吸着法(ELISA)を用いて検出することができる。ELISA法の例は、固体支持体に付着した抗原を認識するラベルされた抗体を利用する直接的ELISA、固体支持体に付着した抗体を認識する抗体複合体には、捕獲抗体を認識するラベルされた2次抗体を利用する間接的ELISA、固体支持体に付着された抗体と抗原の複合体で抗原を認識するラベルされた抗体を利用する直接的サンドイッチELISA、固体支持体に付着した抗体と抗原の複合体で抗体と抗原が反応し、次いでラベルされた2次抗体と反応した抗体との反応を含む間接的サンドイッチELISAを含む

40

## 【 0 0 7 9 】

前記モノクローナル抗体は、検出ラベルを持つことができ、もしも前記モノクローナル抗体が検出ラベルを持たないとすれば、検出ラベルを持つ他の抗体の処理によって検出し

50

捕獲することができる。

【0080】

他の態様として、本発明は、前記に述べたモノクローナル抗体を含む癌を診断するための組成物を提供する。

【0081】

ここで、前記モノクローナル抗体及び癌は、前記に述べたとおりである。

【0082】

本発明のDLL4特異的モノクローナル抗体を含む診断用組成物を、癌のようなDLL4の発現レベルと関連した疾患又はDLL4によって媒介される疾患であるDLL4の発現を診断に利用することができる。

10

【0083】

さらに他の態様として、本発明は、前記に述べた診断用組成物を含む癌を診断するキットを提供する。

【0084】

ここで、前記組成物及び癌は、前記で述べたとおりである。

【0085】

さらに、前記癌診断用キットは、分析に適した一つ以上の他の構成成分を持つ組成物、溶液又は装置をさらに含んで構成され得る。

【0086】

さらに他の態様として、本発明は、前記に述べたモノクローナル抗体を含む自己免疫疾患を予防又は治療するための薬学的組成物を提供する。

20

【0087】

ここで、前記モノクローナル抗体、予防及び治療は、前記に述べたとおりである。さらに、前記薬学的組成物は、薬学的に許容可能な担体をさらに含むことができ、ここで、薬学的組成物は前記に述べたとおりである。

【0088】

本発明の用語「自己免疫疾患」は、病的な固体の抗原に対する免疫反応によって起こる直間接的な疾患を総称する意味する。自己免疫疾患の例は、リウマチ性関節炎、全身性硬化症、全身性紅斑性狼瘡、アトピー皮膚炎、乾癬、円形脱毛症、喘息、クローン病、ベーチェット症候群、シェーグレン症候群、ギラン・バレー症候群、慢性甲状腺炎、多発性硬化症、強直性脊椎炎、脳脊髄炎、線維炎及び結節性多発動脈炎であり得る。

30

【0089】

前記に述べたように、本発明のDLL4特定ヒトモノクローナル抗体は、調節T細胞の発達を促進することができ、それによって自己免疫疾患の治療に利用することができる。

【0090】

さらに他の態様として、本発明は、前記に述べたモノクローナル抗体を利用して自己免疫疾患を治療する方法を提供する。

【0091】

具体的に、自己免疫疾患の治療方法は、モノクローナル抗体を含む薬学的組成物並びに薬学的に許容可能な担体を自己免疫疾患を有する疑いのある個体に投与する段階を含む。ここで、前記自己免疫疾患、個体及び薬学的に許容可能な担体は前記に述べたとおりである。

40

【発明の実施もための形態】

【0092】

以下、本発明を下記実施例でより具体的に説明する。しかし、理解のために、これらの実施例は、例示的目的であり本発明の範囲を制限するためではない。

【実施例1】

【0093】

抗DLL4抗体の製造

実施例1-1：この実施例で用いられたDLL4の細胞外ドメイン抗体は、R&D Sy

50

s t e mから購入されたヒトD L L 4 タンパク質(Cat: 1506-D4/CF)である。前記D L L 4 抗原タンパク質は、D L L 4のアミノ酸残基27~522番のアミノ酸を含む。また、そのタンパク質のC-末端がヒスチジンでタグされている。

#### 【0094】

次に、さらに他のD L L 4細胞外ドメインの特定の領域に対する抗原を生産した。その特定の領域は、D L L 4のアミノ酸残基の27~251番のアミノ酸を含む。この領域は、N o t c h 1受容体と結合することが知られているdelta/serrate/lag-2(D S L)ドメインと呼ばれるモチーフを含有する(非特許文献15)。F cタンパク質に融合されたD L L 4細胞外ドメインの欠失断片をコードするポリヌクレオチド上流にC M Vプロモーターを含む哺乳類プラスミド発現ベクターを標準組み換えD N A技術を使用して生成した。F cタンパク質に融合されたヒトD L L 4のキメラであるD L L 4の欠失断片をコードする追加的構築物もまた標準組み換えD N A技術を使用して生成した。F cタンパク質に融合されたヒトD L L 4の27~251番のアミノ酸残基を含む組み換え融合タンパク質は、HEK293細胞に一時的に形質移入し細胞内で発現させた。抗原タンパク質の製造のために、条件培養液を72時間毎に集め、この過程は、4回繰り返された。抗原タンパク質は、プロテインA親和カクロマトグラフィーを通じて条件培養液から精製された。

10

#### 【0095】

##### 実施例1-2:ライブラリーファージの製造

10  $\mu$ g/mLの組み換えヒトD L L 4溶液(R&D S y s t e m)を免疫試験管に添加して4 で一晚試験管表面にタンパク質を吸着させた。1%のウシ血清アルブミン(B S A)溶液を試験管に添加してD L L 4が付着されない表面を保護した。試験管を空けたあと、1%のB S A溶液に分散された $10^{12}$  C F Uの抗体ファージライブラリーを入れ、抗原と結合させた。非特異的に結合したファージを除くため、リン酸緩衝生理食塩水-0.5% T w e e n 20(P B S - T)溶液で5回洗い、残っている抗原特異的ファージ抗体を100mMトリエチルアミン溶液を利用して回収した。回収したファージを1Mトリスバッファー(pH7.4)で中和させ、次いで大腸菌E R 2 5 3 7に37 で1時間感染させた。形質移入された大腸菌をカルベニシリン含有のL u r i a - B e r t a n i(L B)寒天培地に塗抹し、37 で一晚培養した。翌日に培養された大腸菌を4mLのスーパーブロス(SB)-カルベニシリン培養液に懸濁して15%グリセロールを添加した。次に、細胞懸濁液の一部は、-80 に保管し、残りの50mLを20mLのSB-カルベニシリ培養液に、2%ブドウ糖溶液を添加して37 で培養した。培養液の吸光度が600nmで0.6になると、遠心分離して培養液を除去し、残った細胞ペレットは再び20mLのSB-カルベニシリン培養液に懸濁し、 $10^{12}$  P F UのV C S M 1 3ヘルパーファージを加えた。細胞培養液は、ゆっくり攪拌し37 で培養した。翌日、培養液を遠心分離し、培養液のみをポリエチレングリコール8000(PEG8000)を4%、塩化ナトリウム(NaCl)3%を添加して4 で30分間沈殿させ、次に遠心分離した。上清液を除去し沈殿したファージをP B S 1mLに懸濁し、これをライブラリーとして使用し、前記パンニング過程を繰り返すことで、抗原特異的クローンを増幅/濃縮した。

20

30

#### 【0096】

##### 実施例1-3:ファージでスプレイを通じたパンニング

ヒトD L L 4タンパク質内のN o t c h 1と結合する部位に結合する抗体を選別するために、ヒトD L L 4タンパク質とヒトD L L 4の特異的領域を示す断片(27番アミノ酸~251番アミノ酸)を交差して進行し、3回まで進行した。その後、抗体遺伝子を含むLB-寒天培地に塗抹した。培養して単クローンを得てこれを400  $\mu$ LのSB-カルベニシリン培養液に摂取、培養した後、IPTGで誘導してscFv形態のタンパク質を大腸菌で発現させた。大腸菌をTES溶液(Tris, EDTA, Sucrose)に懸濁した後、4 で1時間放置した後、遠心分離抽出し、これをELISA法を利用して組み換えヒトD L L 4抗原とscFvとの結合を確認・するのに使用した。結合したscFvは、HRP-anti-HA抗体とTMB基質を利用して検出した。これから確認された抗原特異的抗体クローンは、塩基配列分析を通じて分析した。

40

#### 【実施例2】

50

## 【0097】

抗DLL4抗体のDLL4に対する結合力のアッセイ

前記実施例1から分離された抗体をそれぞれMLCK-1、MLCK-2、MLCK-3及びMLCK-4と命名し、それぞれの配列番号1である重鎖可変領域と配列番号15である軽鎖可変領域(MLCK-1)、配列番号5である重鎖可変領域と配列番号19である軽鎖可変領域(MLCK-2)、配列番号8である重鎖可変領域と配列番号23である軽鎖可変領域(MLCK-3)及び配列番号11である重鎖可変領域と配列番号27である軽鎖可変領域(MLCK-4)を含むことを確認した。このような分離された抗体の抗原に対する親和度を下記のように分析した。

## 【0098】

抗DLL4抗体-抗原結合の親和度は、ELISA-基盤溶液結合試験を使用して評価した。96-ウェル微細力価プレートを4で一晚PBS溶液中の2µg/mLの濃度のhDLL4-Hisタンパク質でコーティングし、非特異的な結合部位は、BSAで2時間ほどブロックした。96-ウェル微細力価プレート上で、抗DLL4抗体(精製させたタンパク質)を抗体の一定の濃度に従い0nM~128nM範囲で微細力価プレートに移した。移した後、2時間処理した後に、プレートを0.05%の20を含むPBSで5回洗浄し、プレート-結合されたDLL4抗体をHRP-接合されたFab多重くろーナル抗体試薬(Pierce)で検出するために1:10,000比率にし、微細力価プレートに移した後、1時間37度で反応させた。反応後、基質を使用して発色させた。酵素反応を中止させ、マイクロプレートリーダを用いて450nmで吸光度を記録した。その結果、それぞれの抗体全て濃度依存的にDLL4に対する結合力が増加することを確認した(図2)。

## 【0099】

実施例3:抗DLL4抗体のDLL4リガンドに対する結合能の測定

ELISA結果と共にFACS分析を通じて抗DLL4抗体がDLL4に結合する能力を測定した。

## 【0100】

この実験のために、ヒトDLL4を安定的に発現させるヒト腎細胞(HEK293)を製造し、前記製造された細胞とFACSCalibur(BD Biosciences)機器を用いて、抗DLL4抗体とDLL4の結合した程度を測定した。DLL4を安定的に発現させるHEK293細胞を解離させて、PBSで洗浄した後、細胞数を合わせた後、それぞれのDLL4モノクローナル抗体を10µg処理後、室温で30分間反応した。反応後、細胞をPBSで洗浄後、FITCラベルされた不可変領域(Fc)特異的な抗体をPBSで懸濁して4で1時間反応した。反応後、細胞をPBSで洗浄し、FACSCalibur機器上で測定した。対照群は、FITCラベルされた不可変領域(Fc)特異的な抗体のみ処理した。それぞれのDLL4モノクローナル抗体を処理した実験群でヒトDLL4-モノクローナル抗体-FITC結合による移動された判読結果を対照群の結合と比較した。

## 【0101】

その結果であるそれぞれのモノクローナル抗体がヒトDLL4抗原に結合した程度を図3に示した。結合程度は、対照群と比較して、MLCK-1を示した(図3)。

## 【0102】

このような結果は、本発明のMLCK-1、MLCK-2、MLCK-3及びMLCK-4抗体がヒトDLL4に対して優れた結合能を持つことを示す。

## 【0103】

実施例4:抗DLL4抗体の中和効果のアッセイ

抗DLL4抗体に対してELISA-溶液競争試験を使用して抗DLL4抗体の中和効果を評価した。

## 【0104】

96-ウェル微細力価プレートを4で一晚500ng/mLの濃度のhNatch-1-hFcタンパク質(PBSで希釈)でウェル当たり100µlずつコーティングし、非特異的な結合部位は、BSAで2時間ブロックした。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 0 5 】

96 - ウェル微細力価プレートと上で抗DLL4抗体(精製されたタンパク質)を0 nM ~ 140 nM範囲の濃度で抗体を抗原タンパク質(DLL4抗原、600 ng/mL)の系列希釈液と混合させた。前記抗原と抗体を30分間処理した後に、遊離抗体の測定のために前記混合溶液をDLL4受容体であるhNotch-1タンパク質で改めてコーティング(50 ng/ウェル)された微細力価プレートに移した。その後、前記プレートを2時間処理し、0.05%含むPBSで5回洗浄し、プレートに結合したDLL4抗原をHRP-接合させたHis抗マウスIgGポリクローナル抗体試薬で検出するために1:500比率で前記HRP-接合されたHis抗-マウスIgGポリクローナル抗体を微細力価プレートで処理した後、1時間37℃で反応させた。その後、発色させ、酵素反応を中止させた。450 nmで吸光度を記録してその結果を図4に示しており、プレート-固定されたNotch1-Fcに結合されたヒトDLL4-Hisの50%の減少を達成するのに必要な抗体の量を下記の表1に示した。

10

## 【 0 1 0 6 】

## 【表1】

クローン	IC <sub>50</sub> (nM)
MLCK-1	1.32
MLCK-2	0.41
MLCK-3	0.38
MLCK-4	3.72

20

## 【 0 1 0 7 】

その結果、本発明の4つの抗体全て0.4 ~ 3.7 nMの値を示し、DLL4リガンドであるヒトNotch1に対する結合を非常に低い濃度で阻害することを示した(図4及び表1)。このような結果は、本発明の4つの抗体がDLL4リガンドとNotchとの結合を抑制させることを、癌細胞の成長を抑制できることを裏付けるものである。

## 【 0 1 0 8 】

実施例5：抗体-DLL4抗体の結合能の分析

30

抗DLL4抗体の結合能を調べるために、BIACOREアッセイを実施した。

## 【 0 1 0 9 】

具体的に、SPR分析は、T200を使用し、緩衝液は、HBS-EPを使用した。表面準備は、表面準備\_標的皇帝化を利用して、リガンドであるhDLL4を10 mMになるように希釈した後、CM5チップ表面に各試験が目標とするターゲット固定化ラベルほど固定させた。固定化は、一つのセットで進行し、本試験で最初のblankとして指定し、二つ目はhDLL4として固定化した。最初は、非特異的結合及びバッファーによる変化の数値を見せるとして、試験結果は、Fc2-Fc1の数値を使用した。hDLL4と結合する物質として抗-DLL4抗体であるMLCK-1、MLCK-2、MLCK-3及びMLCK-4をモル濃度として換算して100 nMに希釈した後、1/2連続希釈し5濃度区間で分析した。分析試料は、最小希釈倍数100以上になるように高純度/高濃度で準備して緩衝液変換による影響を最小化した。全ての分析は、プログラムを用い、一試料に対して2倍数で進行し、全ての分析間では、再生段階をおき、試験の基準船が一定に維持されるようにした。このとき、Fc2-Fc1, Fc4-Fc3の結果からBaselineを0に設定した後、緩衝液注入部分を全体Sensorgramから引いた後、結果を1:1結合モデルで結合親和度を分析した。

40

## 【 0 1 1 0 】

その結果、図5に示したように、ヒトDLL4に対するMLCK-1抗体の結合能の程度を図3に示した。結合程度は、大將軍と比較して、MLCK-1は、47.82(%)、MLCK-2(59%)、MLCK-3(52.85%)及びMLCK-4(52.46%)を示した(図3)。

## 【 0 1 1 1 】

50

**実施例 6 : D L L 4 抗体の血管内皮細胞 ( H U V E C ) 増殖に対する影響の分析**

D L L 4 に結合する抗体の血管内皮細胞増殖に対する影響を分析するために、対標的な抗 - D L L 4 小唄である M L C K - 2 抗体を用いて血管内皮細胞の増殖に及ぼす影響を調査した。

**【 0 1 1 2 】**

具体的に、血管内皮細胞をLonza社から購入して実験に使用した。H U V E C の培養は 1 %ゼラチン(Sigma)に溶解された P B S 緩衝液(Gibco)でT-フラスコを常温で 4 ~ 6 時間コーティングさせた後、P B S で洗浄して使用した。使用された培地はEGM- 2 Single Quo t (Lonza)が含まれたEMB-2(Lonza)で、細胞培養は密集度が 8 0 % が超えないように、3 7 、 5 % C O <sub>2</sub> 培養を進行し、6 以内の細胞を利用して実験した。血管内皮細胞の増殖抑制は次のような方法で行った。h D L L 4 がコーティングされたプレートを準備するために、実験前日 9 6 - ウェルプレートに r h D L L 4 を緩衝液を使用して希釈した後、1 0 0 μ l / ウェルでウェルに摂取して 4 で一晩静止させた。さらに、H U V E C は 0 . 1 % F B S が添加された E B M - 2 最小培地で 2 4 時間放置して血清による効果を最小化させた。実験当日 r h D L L 4 がコーティングされたプレートは、それぞれのウェルを P B S で 2 回洗浄した後、それぞれの実験群別に改めて使用したEBM-2最小培地で希釈して処理して常温で 2 0 分間静止させた。前日から 2 4 時間静止した H U V E C を単一細胞化したあと、EBM-2最小培地を使用し希釈した。希釈された細胞を抗体が処理されたウェルに摂取して 9 6 時間静止した。細胞増殖が修了されたとき、各ウェルに 1 0 μ l ずつ処理し、5 時間後機器を用いて 4 5 0 n m の波長で吸光度を測定し、細胞の増殖程度を各分別に比較した。

10

20

**【 0 1 1 3 】**

その結果、図 6 に示すように、本発明の代表的な抗 - D L L 4 抗体は、D L L 4 による H U V E C 増殖抑制を濃度依存的に解除させる結果を示した。

**【 0 1 1 4 】****実施例 7 : D L L 4 抗体の D L L 4 / N o t c h シグナル伝達経路抑制活性の分析**

N o t c h シグナル伝達で、N o t c h 受容体が D L L 4 と結合すると、N o t c h 受容体の構造的変化をもたらし、N o t c h 受容体が切断され、N o t c h 受容体の細胞内部分 ( N I C D ) が核内に移動され N o t c h シグナル伝達を媒介する。それで、本は発明の抗 D L L 4 抗体が D L L 4 と N o t c h 受容体間の結合を抑制し、N o t c h シグナル伝達を防ぐことができるかの有無を N o t c h 受容体の切断抑制の有無を通じて下記のように確認した。

30

**【 0 1 1 5 】**

具体的に、D L L 4 に結合する抗体の D L L 4 / N o t c h シグナル伝達経路抑制活性を調べるために、H U V E C 細胞を用いて、シグナル伝達経路抑制の有無を確認した。実験前日 6 ウェルプレート ( B D ) に組み換えヒト D L L 4 を 1 μ g / m l で緩衝溶液を使用して希釈させた後、1 m l / ウェルで添加した後、4 で一晩静止させた。r h D L L 4 を処理しない対照実験群では、緩衝溶液単独で 1 m l / ウェルで処理して同様に 4 で一晩静止させた。次の日、4 の冷蔵庫で D L L 4 がコーティングされたプレートを出して、P B S で 1 回洗浄した後、EGM-2倍地を各ウェルに 1 m l ずつ処理し、各ウェルに 1 m l ずつ処理して、各ウェル別に抗体を処理した。最終培養液の量は 2 m l であり、抗体処理を 2 倍にして常温で 2 0 分間反応させた。抗体処理時間の間、7 5 T プレートで培養された H U V E C を引き出し、培地除去後、単一細胞化した。遠心分離過程を通じて細胞を洗浄し、新鮮なEGM-2倍地を使用して細胞の個数を数えて希釈した後、それぞれのウェルに 1 m l ずつ摂取し、一晩培養した。0 . 2 % F B S が含まれたEBM-2最小培地を準備し、一晩培養された H U V E C の各ウェル培地を除去し、P B S で 1 回洗浄した後、0 . 2 % F B S が含まれたEBM-2最小培地を 2 m l 処理した。さらに、それぞれウェルに前日処理した同様の濃度の抗体を処理し、一晩培養した。抗体が処理された H U V E C の各ウェルに h V E G F を 1 0 0 n g / m l で処理し、5 分間反応させた後、プレートを引き出し、素早く培地を捨て、P B S で 1 回洗浄した後、細胞溶解溶液を準備してそれぞれのウェルに 1 5 0 μ l を添加し

40

50

た。

【0116】

その次、このプレートを氷の上においてPPでそれぞれのウェルのH U V E Cを集めた後、1.5 mLチューブに集めた後、氷に置いた。5分単位で氷から1.5 mLチューブを引き出してボルテックス3回後、再び氷に浸し、細胞溶解を行った後、これを遠心分離し、上清液を新しいチューブに移した後、定量を行い5 × S D S サンプル緩衝液に混ぜ100 で10分間沸騰した後、SDS-PAGE分析を行った。このとき、用意されたタンパク質試料を4% ~ 12% bis-TRISゼルを通じてSDS-PAGEを行い、大きさ別に分離した後、

【0117】

その結果、図7に示したように、本発明の代表的M L C K - 2モノクローナル抗体の処理によって、D L L 4処理によって増加したN I C Dを減少させる結果を示した(レーン7)

10

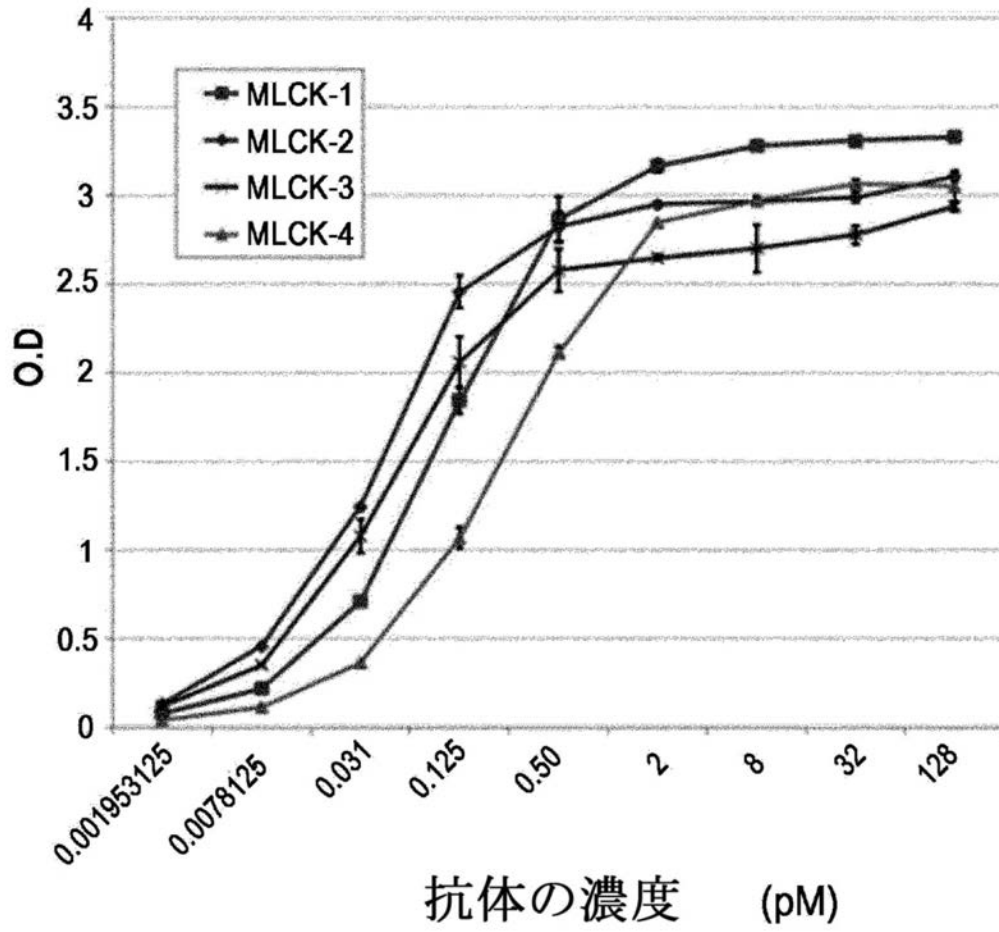
【0118】

以上の説明から、本発明が属する技術分野の当業者は、本発明がその技術的思想又は必須的特徴を変更することなく、他の具体的形態として実施できることを理解することができる。これと関連して、以上の技術した実施例は、全ての面で例指的なものであり、限定的なものではないこととして、理解されるべきである。本発明の範囲は、前記詳細な説明よりは、後述する特許請求範囲の意味及び範囲そしてそのその概念から全ての変更又は変更された形態が本発明の範囲に含まれるものとして解釈されるべきである。

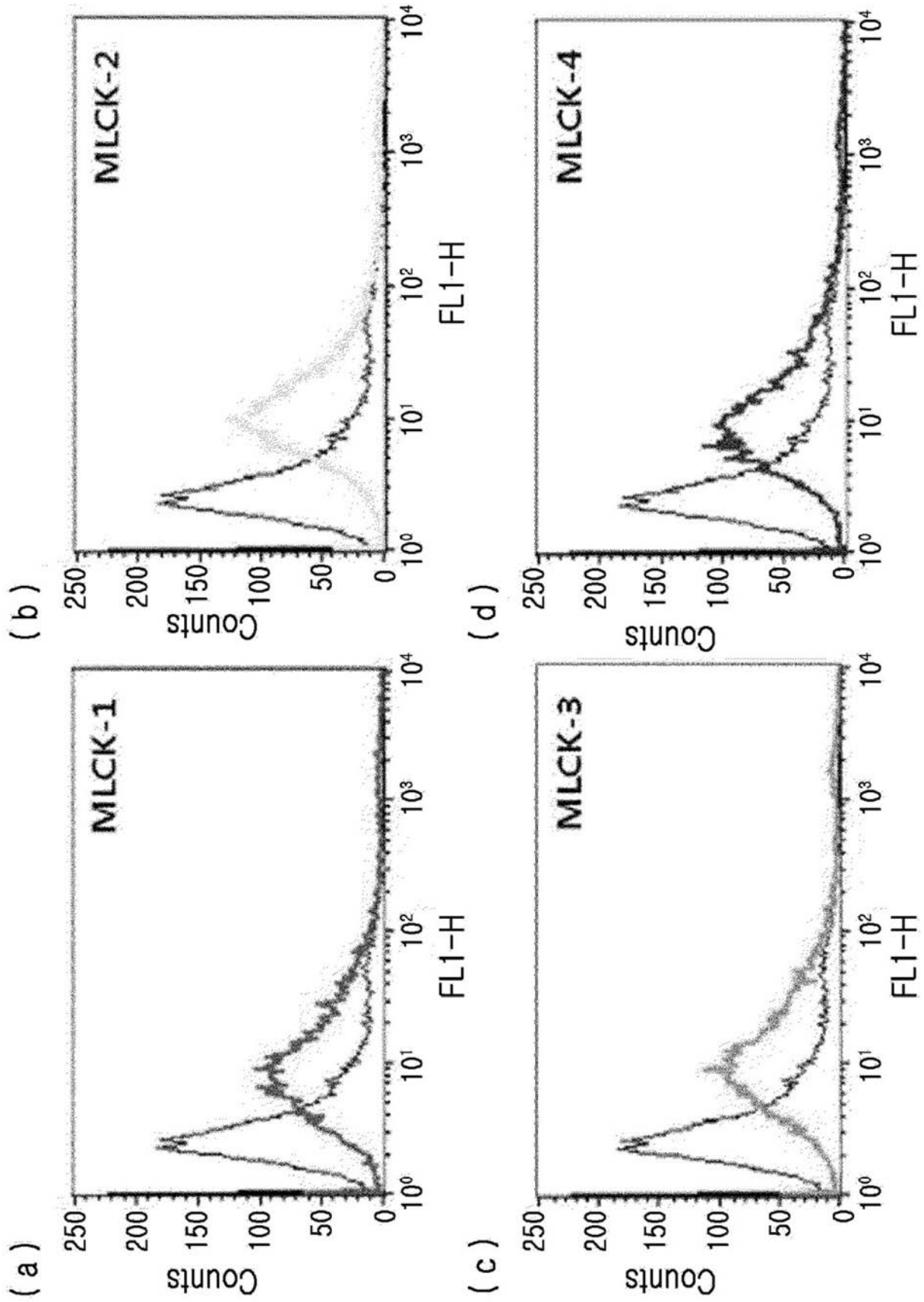
【 1 】

VH						
CLONE	Frame 1	CDR1	Frame 2	CDR2	Frame 3	Frame 4
M1CK-1 (SEQ ID NO.1)	EYQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSDYANIS (SEQ ID NO.2)	WVRQAPGKGLGVAS	WNYSDGKMYVADSVKIG (SEQ ID NO.3)	RFTISRDNISKNTLVLQINISLRRAEDTAVNYCAR	ADPPFDY (SEQ ID NO.4)
M1CK-2 (SEQ ID NO.5)	EYQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSDYANIS (SEQ ID NO.2)	WVRQAPGKGLGVAS	WNYSGGKMYVADSVKIG (SEQ ID NO.6)	RFTISRDNISKNTLVLQINISLRRAEDTAVNYCAR	ADVPPFDY (SEQ ID NO.7)
M1CK-3 (SEQ ID NO.8)	EYQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSDYANIS (SEQ ID NO.2)	WVRQAPGKGLGVAS	WNYVDSGKMYVADSVKIG (SEQ ID NO.9)	RFTISRDNISKNTLVLQINISLRRAEDTAVNYCAR	ADLPPFDY (SEQ ID NO.10)
M1CK-4 (SEQ ID NO.11)	EYQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSDYANIS (SEQ ID NO.12)	WVRQAPGKGLGVAS	WNYHGGDDTYVADSVKIG (SEQ ID NO.13)	RFTISRDNISKNTLVLQINISLRRAEDTAVNYCAR	GNVTFGKPPFDY (SEQ ID NO.14)
VL						
클론명	Frame 1	CDR1	Frame 2	CDR2	Frame 3	Frame 4
M1CK-1 (SEQ ID NO.15)	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISC	TGSSSNIGSNRVS (SEQ ID NO.16)	WYVQLPQTAPRLIY	SDNWRPS (SEQ ID NO.17)	GVPDRFSGSKSGTSSASLASGIRSEDEADVNYC	ATVDSUNGIV (SEQ ID NO.18)
M1CK-2 (SEQ ID NO.19)	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISC	TGSSSNIGSNVIT (SEQ ID NO.20)	WYVQLPQTAPRLIY	ADSKRPS (SEQ ID NO.21)	GVPDRFSGSKSGTSSASLASGIRSEDEADVNYC	GTVDYLSLAVV (SEQ ID NO.22)
M1CK-3 (SEQ ID NO.23)	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISC	SGSSNIGSNVAVT (SEQ ID NO.24)	WYVQLPQTAPRLIY	SDNWRPS (SEQ ID NO.25)	GVPDRFSGSKSGTSSASLASGIRSEDEADVNYC	GTVDASLSGV (SEQ ID NO.26)
M1CK-4 (SEQ ID NO.27)	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISC	RGSPSNIGSNVTV (SEQ ID NO.28)	WYVQLPQTAPRLIY	SDSQRPS (SEQ ID NO.29)	GVPDRFSGSKSGTSSASLASGIRSEDEADVNYC	GSVDYLSLAVV (SEQ ID NO.30)

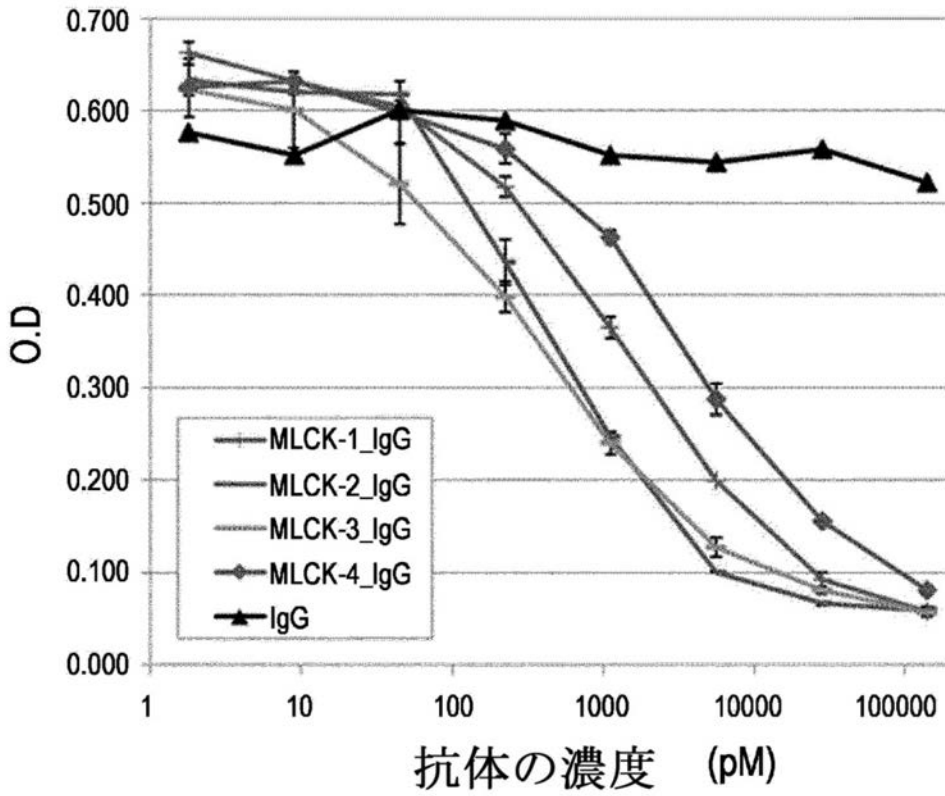
【 図 2 】



【 図 3 】



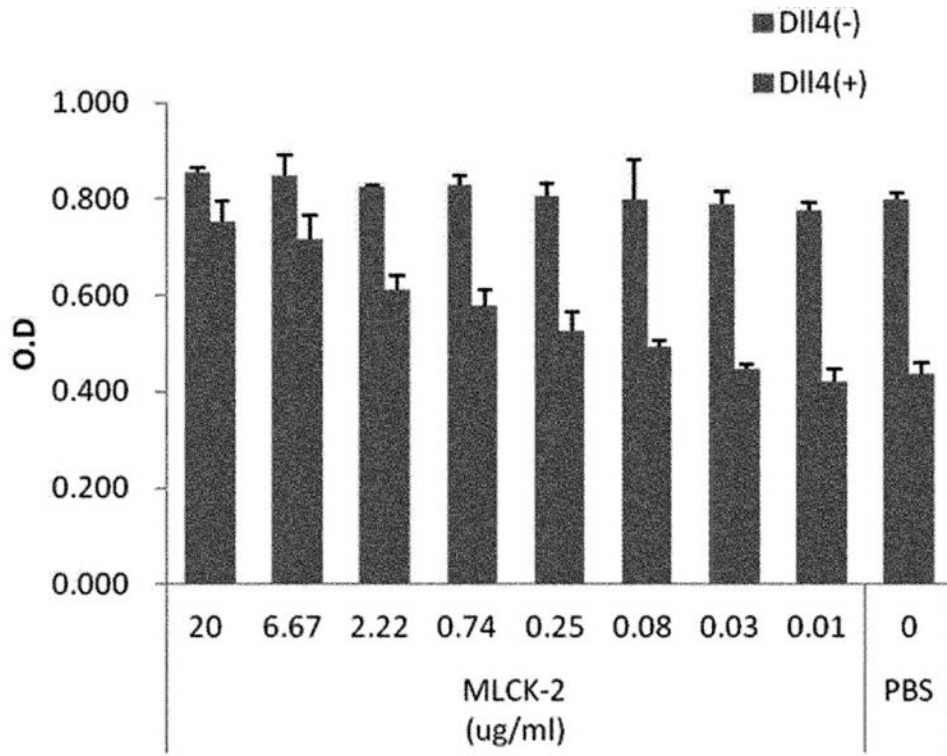
【 図 4 】



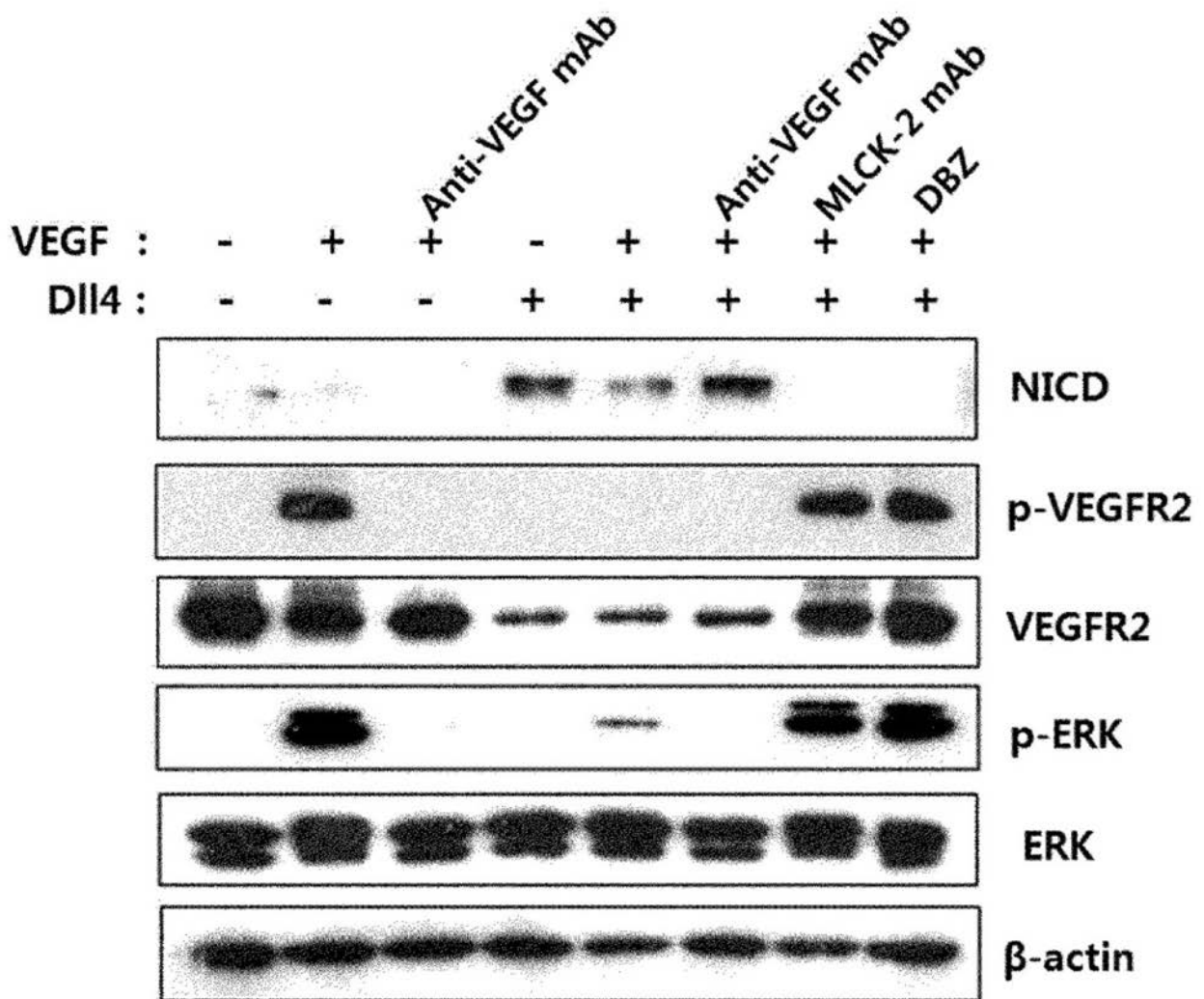
【 図 5 】

抗体		rhDII4	二価結合	$K_a (M^{-1}S^{-1})$	$k_d (s^{-1})$	$K_a (1/M)$	$K_D (M)$
MLCK1		rhDII4	二価結合	$6.41E+04$	$1.69E-02$	$3.80E+06$	$2.63E-07$
MLCK2		rhDII4	二価結合	$1.36E+05$	$2.32E-04$	$5.86E+08$	$1.71E-09$
MLCK3		rhDII4	二価結合	$5.16E+05$	$3.59E-03$	$1.44E+08$	$6.96E-09$
MLCK4		rhDII4	二価結合	$2.22E+03$	$4.74E-03$	$4.69E+05$	$2.13E-06$

【 図 6 】



【図 7】



## 【配列表】

2015524390000001.app

## 【手続補正書】

【提出日】平成27年1月28日(2015.1.28)

## 【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】

ヒトデルタ様リガンド4(DLL4)に特異的に結合し、ヒトデルタ様リガンド4とNotch受容体間の相互作用を阻害するモノクローナル抗体。

【請求項2】

前記モノクローナル抗体は、配列番号2で記載された重鎖CDR1;配列番号3で記載された重鎖CDR2;及び配列番号4で記載された重鎖CDR3を含む重鎖可変領域と、配列番号16で記載された軽鎖CDR1;配列番号17で記載された軽鎖CDR2;及び配列番号18で記載された軽鎖CDR3を含む軽鎖可変領域を含む請求項1に記載のモノクローナル抗体。

【請求項3】

前記モノクローナル抗体は、配列番号 1 で記載された重鎖可変領域のアミノ酸配列及び配列番号 15 で記載された軽鎖可変領域のアミノ酸配列を含む請求項 2 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 4】

前記モノクローナル抗体は、配列番号 2 で記載された重鎖 C D R 1 ; 配列番号 6 で記載された重鎖 C D R 2 ; 及び配列番号 7 で記載された重鎖 C D R 3 を含む重鎖可変領域と、配列番号 20 で記載された軽鎖 C D R 1 ; 配列番号 21 で記載された軽鎖 C D R 2 ; 及び配列番号 22 で記載された軽鎖 C D R 3 を含む軽鎖可変領域を含む請求項 1 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 5】

前記モノクローナル抗体は、配列番号 5 で記載された重鎖可変領域のアミノ酸配列及び配列番号 19 で記載された軽鎖可変領域のアミノ酸配列を含む請求項 4 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 6】

前記モノクローナル抗体は、配列番号 2 で記載された重鎖 C D R 1 ; 配列番号 9 で記載された重鎖 C D R 2 ; 及び配列番号 10 で記載された重鎖 C D R 3 を含む重鎖可変領域と配列番号 24 で記載された軽鎖 C D R 1 ; 配列番号 25 で記載された軽鎖 C D R 2 ; 配列番号 26 で記載された軽鎖 C D R 3 を含む軽鎖可変領域を含む請求項 1 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 7】

前記モノクローナル抗体は、配列番号 8 で記載された重鎖可変領域のアミノ酸配列及び配列番号 23 で記載された軽鎖可変領域のアミノ酸配列を含む請求項 6 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 8】

前記モノクローナル抗体は、配列番号 12 で記載された重鎖 C D R 1 ; 配列番号 13 で記載された重鎖 C D R 2 ; 及び配列番号 14 で記載された重鎖 C D R 3 を含む重鎖可変領域と、配列番号 28 で記載された軽鎖 C D R 1 ; 配列番号 29 で記載された軽鎖 C D R 2 ; 及び配列番号 30 で記載された軽鎖 C D R 3 を含む軽鎖可変領域を含む請求項 1 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 9】

前記モノクローナル抗体は、配列番号 11 で記載された重鎖可変領域のアミノ酸配列及び配列 27 で記載された軽鎖可変領域のアミノ酸配列を含む請求項 8 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 9 のいずれかの前記モノクローナル抗体をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 11】

請求項 10 のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項 12】

請求項 11 の発現ベクターが導入された形質転換体。

【請求項 13】

請求項 11 の発現ベクターの発現を含むヒトデルタ様リガンド 4 ( D L L 4 ) に特異的に結合し、ヒトデルタ様リガンド 4 と N o t c h 受容体間の相互作用を阻害するモノクローナルの製造方法。

【請求項 14】

請求項 1 ~ 9 のいずれかの前記モノクローナル抗体を含む癌を予防又は治療するための薬学的組成物。

【請求項 15】

前記癌は、食道癌、胃癌、大腸癌、直腸癌、口腔癌、咽頭癌、喉頭癌、肺癌、結腸癌、乳癌、子宮頸部癌、子宮内膜癌、卵巣癌、前立腺癌、精巣腫瘍、膀胱癌、腎癌、肝癌、膵臓癌、骨癌、結合組織癌、皮膚癌、脳癌、甲状腺癌、白血病、ホジキン病、リンパ腫、多

発骨髓腫、血液癌からなる群より選択されるものである請求項 1 4 に記載の組成物。

【請求項 1 6】

請求項 1 ~ 9 のいずれかの前記モノクローナル抗体を含む癌診断用組成物。



【請求項 1 7】

請求項 1 ~ 9 のいずれかの前記モノクローナル抗体を含む自己免疫疾患を予防又は治療する薬学的組成物。

【請求項 1 8】

前記自己免疫疾患は、リウマチ性関節炎、全身性硬化症、全身性紅斑性狼瘡、アトピー皮膚炎、乾癬、円形脱毛症、喘息、クローン病、ベーチェット症候群、シェーグレン症候群、ギラン・バレー症候群、慢性甲状腺炎、多発性硬化症、強直性脊椎炎、脳脊髄炎、線維炎及び結節性多発動脈炎からなる群より選択されるものである請求項 1 7 に記載の組成物。

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. <b>PCT/KR2013/005855</b>
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
<b>C07K 16/28(2006.01)I, C12N 15/13(2006.01)I, A61K 39/395(2006.01)I, A61P 35/00(2006.01)I</b>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K 16/28; A61K 39/395; A61K 49/00; C07K 16/18; C07K 16/00; C07H 21/00; A61K 31/7088; C12N 15/13; A61P 35/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: monoclonal antibody, delta-like ligand 4, DLL4, notch receptor, interaction		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2011-0117079 A1 (BENATUJIL, LORENZO et al.) 19 May 2011 See abstract; paragraphs [0792] and [1098]; sequence listing; claims 1-3, 29, 33, 54, 55, 57, 67, 77, 94-97, 122, 126, 147, 148, 150, 160 and 170.	1,10-15,17,19,20
A		2-9
A	NCBI GenBank no.BAI54638.1 (01 December 2009) See the whole document.	1-15,17,19,20
A	NCBI GenBank no.ADM44137.1 (31 August 2010) See the whole document.	1-15,17,19,20
A	NCBI GenBank no.ABP98628.1 (26 May 2009) See the whole document.	1-15,17,19,20
A	NCBI GenBank no.ADM43922.1 (31 August 2010) See the whole document.	1-15,17,19,20
X	US 2011-0217237 A1 (CHEN, MING-JIU et al.) 08 September 2011 See abstract; paragraphs [0523] and [0923]; sequence listing; claims 2, 4, 5, 53, 54, 76, 77 and 79.	1,10-15,17,19,20
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 23 September 2013 (23.09.2013)		Date of mailing of the international search report <b>25 September 2013 (25.09.2013)</b>
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon Metropolitan City, 302-701, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-472-7140		Authorized officer HEO Joo Hyung  Telephone No. +82-42-481-8150

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. <b>PCT/KR2013/005855</b>
---

<b>Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)</b>	
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1. <input checked="" type="checkbox"/>	Claims Nos.: 16, 18, 21 because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Claims 16, 18 and 21 pertain to methods for treatment of the human body by therapy, as well as diagnostic methods, and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2. <input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. <input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
<b>Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)</b>	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:	
1. <input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. <input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. <input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. <input type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
<b>Remark on Protest</b>	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee. <input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. <b>PCT/KR2013/005855</b>
---

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2011-0213127 A1 (GILL, PARKASH et al.) 01 September 2011 See paragraphs [0091], [0092], [0124], [0125] and [0136]; sequence listing; claims 1, 3, 5-7 and 18.	1,10-15,17,19,20
X	US 8192738 B2 (BEDIAN, VAHE et al.) 05 June 2012 See column 23 - column 26; sequence listing; claims 1, 2, 4-7, 11, 12, 15-17, 20 and 21.	1,10-15,17,19,20
X	US 2010-0292312 A1 (YAN, MINHONG et al.) 18 November 2010 See paragraphs [0085], [0089], [0090]-[0092], [0095], [0098], [0185] and [0199]-[0201]; sequence listing; claims 1, 2, 18, 20, 24 and 25.	1,10-15,17,19,20

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No.

**PCT/KR2013/005855**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2011-0117079 A1	19/05/2011	AR 077998 A1	05/10/2011
		AU 2012-286518 A1	29/03/2012
		CA 2771575 A1	03/03/2011
		CN 102741288 A	17/10/2012
		CR 20120105 A	22/06/2012
		DO P2012000052 A	31/07/2012
		EP 2470568 A2	04/07/2012
		IL 218401 D0	30/04/2012
		KR 10-2012-0089659 A	13/08/2012
		MX 2012002605 A	02/04/2012
		SG 178930 A1	27/04/2012
		TW 201113038 A	16/04/2011
		UY 32869 A	31/03/2011
		WO 2011-025964 A2	03/03/2011
WO 2011-025964 A3	21/04/2011		
US 2011-0217237 A1	08/09/2011	AR 080452 A1	11/04/2012
		AU 2012-223919 A1	25/10/2012
		CA 2791631 A1	09/09/2011
		TW 201134487 A	16/10/2011
		UY 33254 A	30/09/2011
		WO 2011-109298 A2	09/09/2011
WO 2011-109298 A3	24/11/2011		
US 2011-0213127 A1	01/09/2011	CA 2710082 A1	09/07/2009
		CN 101970004 A	09/02/2011
		IL 206502 D0	30/12/2010
		JP 2011-507852 A	10/03/2011
		US 2009-0035308 A1	05/02/2009
		US 7906116 B2	15/03/2011
		WO 2009-085209 A2	09/07/2009
		WO 2009-085209 A3	17/12/2009
US 8192738 B2	05/06/2012	AU 2010-294415 A1	25/03/2010
		CA 2735900 A1	25/03/2010
		CN 102264763 A	30/11/2011
		EP 2344536 A1	20/07/2011
		JP 2012-502650 A	02/02/2012
		KR 10-2011-0057244 A	31/05/2011
		US 2010-0196385 A1	05/08/2010
		US 2012-0195905 A1	02/08/2012
		WO 2010-032060 A1	25/03/2010
US 2010-0292312 A1	18/11/2010	AR 061246 A1	13/08/2008
		AU 2008-319672 A1	22/05/2008
		AU 319672 B2	30/06/2011
		BR PI0710413 A2	23/08/2011
		CA 2654000 A1	22/05/2008
		CR 10530 A	29/01/2009

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	1 0 1
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 P 17/06 (2006.01)	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 17/14 (2006.01)	A 6 1 P 17/14	
A 6 1 P 11/06 (2006.01)	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 5/14 (2006.01)	A 6 1 P 5/14	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/577 (2006.01)	G 0 1 N 33/577	B
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	G 0 1 N 33/574	A

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

- (72)発明者 キム ウン エイ  
大韓民国 3 0 5 - 8 0 5 テジヨン ユソン - グ シンソン - ドン 2 5 3 - 2 1 1 0 2 ホ
- (72)発明者 パク サン キュン  
大韓民国 3 0 5 - 7 7 3 テジヨン ユソン - グ ジジヨク - ドン バンソクマウル アパート  
メント 3 1 1 - 4 0 1
- (72)発明者 ムン キュン ダク  
大韓民国 3 0 5 - 3 4 0 テジヨン ユソン - グ ドリヨン - ドン ロイヤル バレー アパー  
トメント 3 0 6 ホ
- (72)発明者 リー ドン ホン  
大韓民国 3 0 2 - 1 2 2 テジヨン ソ - グ ダンサン 2 - ドン ネクサス バレー ビー -  
5 2 0
- (72)発明者 チョイ ユ ビン  
大韓民国 3 0 5 - 8 0 4 テジヨン ユソン - グ シンソン - ドン 1 4 9 - 1 2 0 5 ホ
- (72)発明者 キム ドン イン  
大韓民国 3 0 2 - 8 5 7 テジヨン ソ - グ タンバン - ドン 8 5 - 5 3 0 6 ホ
- (72)発明者 カン キュン ジェ  
大韓民国 3 0 5 - 8 0 4 テジヨン ユソン - グ シンソン - ドン 6

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA12 BA53 CA02 DA03 DA06 EA03 EA04 GA11 GA19

HA15  
4B064 AG27 CA02 CA19 CC06 CC24 CD09 CE08 DA05 DA14  
4B065 AA26X AB01 AC14 BA02 BB16 BB37 BC03 BD15 CA25 CA44  
CA46  
4C085 AA14 CC23  
4H045 AA11 AA20 AA30 DA76 EA20 EA51 FA74 GA15

专利名称(译)	特异性结合DLL4的新型单克隆抗体及其用途		
公开(公告)号	<a href="#">JP2015524390A</a>	公开(公告)日	2015-08-24
申请号	JP2015520051	申请日	2013-07-02
[标]申请(专利权)人(译)	韩华石油化学株式会社		
申请(专利权)人(译)	韩华石油化学株式会社		
[标]发明人	キムウンエイ パクサンキュン ムンキュンダク リードンホン チョイユビン キムドンイン カンキュンジェ		
发明人	キム ウン エイ パク サン キュン ムン キュン ダク リー ドン ホン チョイ ユ ビン キム ドン イン カン キュン ジェ		
IPC分类号	C07K16/18 C12N15/09 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 A61K39/395 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/06 A61P29/00 A61P25/00 A61P17/00 A61P11/00 A61P37/08 A61P17/06 A61P17 /14 A61P11/06 A61P1/04 A61P5/14 A61P37/02 G01N33/53 G01N33/577 G01N33/574		
CPC分类号	A61K2039/505 C07K16/22 C07K16/28 C07K2317/76 C07K2317/92 G01N33/574 G01N33/577 G01N2333/4703 A61P1/04 A61P5/14 A61P11/00 A61P11/06 A61P17/00 A61P17/06 A61P17/14 A61P25/00 A61P29/00 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/00 A61P37/02 A61P37/06 A61P37/08 A61K39 /395 A61K2300/00 C07K16/00 A61K39/3955 C07K14/475 C07K14/52 C07K16/18 C07K16/24 C07K16 /30		
FI分类号	C07K16/18 C12N15/00.ZNA.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 C12P21/08 A61K39/395. N A61P35/00 A61P35/02 A61P37/06 A61P29/00.101 A61P25/00 A61P17/00 A61P11/00 A61P37/08 A61P17/06 A61P17/14 A61P11/06 A61P1/04 A61P5/14 A61P37/02 G01N33/53.D G01N33/577.B G01N33/574.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/BA53 4B024/CA02 4B024/DA03 4B024/DA06 4B024/EA03 4B024 /EA04 4B024/GA11 4B024/GA19 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA02 4B064/CA19 4B064/CC06 4B064/CC24 4B064/CD09 4B064/CE08 4B064/DA05 4B064/DA14 4B065/AA26X 4B065/AB01 4B065 /AC14 4B065/BA02 4B065/BB16 4B065/BB37 4B065/BC03 4B065/BD15 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA14 4C085/CC23 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/DA76 4H045 /EA20 4H045/EA51 4H045/FA74 4H045/GA15		
优先权	1020120071996 2012-07-02 KR 1020130071261 2013-06-20 KR		
其他公开文献	JP5982698B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		
摘要(译)			

本発明涉及一种特异性结合δ样配体 ( DLL4 ) の新型单克隆抗体，更具  
 体地说，涉及一种特异性结合人类δ样配体4的单克隆抗体，以有效抑制δ  
 样配体4与之间的相互作用。Notch受体，编码单克隆抗体的多核苷酸，  
 包含该多核苷酸的表达载体，包含该表达载体的转化体，该单克隆抗体  
 的制备方法，用于预防或治疗癌症的药物组合物，其包含该单克隆抗  
 体，用于诊断癌症的组合物包含单克隆抗体，使用该单克隆抗体诊断癌  
 症的方法，以及用于预防或治疗自身免疫疾病的药物组合物，其包含该  
 单克隆抗体。

(21) 出願番号	特願2015-520051 (P2015-520051)	(71) 出願人	595137310
(66) (22) 出願日	平成25年7月2日 (2013. 7. 2)		ハンファ ケミカル コーポレーション
(85) 翻訳文提出日	平成26年12月25日 (2014. 12. 25)		大韓民国 ソウルシ チュンク チャンギ
(86) 国際出願番号	PCT/KR2013/005855		ヨドン1
(87) 国際公開番号	WO2014/007513	(74) 代理人	100113376
(87) 国際公開日	平成26年1月9日 (2014. 1. 9)		弁理士 南条 雅裕
(31) 優先権主張番号	10-2012-0071996	(74) 代理人	100179394
(32) 優先日	平成24年7月2日 (2012. 7. 2)		弁理士 瀬田 あや子
(33) 優先権主張国	韓国 (KR)	(74) 代理人	100185384
(31) 優先権主張番号	10-2013-0071261		弁理士 伊波 興一朗
(32) 優先日	平成25年6月20日 (2013. 6. 20)	(74) 代理人	100137811
(33) 優先権主張国	韓国 (KR)		弁理士 原 秀貢人

最終頁に続く