

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5982698号
(P5982698)

(45) 発行日 平成28年8月31日 (2016. 8. 31)

(24) 登録日 平成28年8月12日 (2016. 8. 12)

(51) Int. Cl.	F I	
C O 7 K 16/18 (2006. 01)	C O 7 K 16/18	
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 1 2 N 1/15 (2006. 01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19 (2006. 01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006. 01)	C 1 2 N 1/21	

請求項の数 11 (全 25 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-520051 (P2015-520051)	(73) 特許権者	516207687
(86) (22) 出願日	平成25年7月2日 (2013. 7. 2)		エービーエルバイオ
(65) 公表番号	特表2015-524390 (P2015-524390A)		大韓民国 06236, ソウル, カンナム
(43) 公表日	平成27年8月24日 (2015. 8. 24)		ーク, テヘランーロ, 146
(86) 国際出願番号	PCT/KR2013/005855	(74) 代理人	100113376
(87) 国際公開番号	W02014/007513		弁理士 南条 雅裕
(87) 国際公開日	平成26年1月9日 (2014. 1. 9)	(74) 代理人	100179394
審査請求日	平成27年1月28日 (2015. 1. 28)		弁理士 瀬田 あや子
(31) 優先権主張番号	10-2012-0071996	(74) 代理人	100185384
(32) 優先日	平成24年7月2日 (2012. 7. 2)		弁理士 伊波 興一朗
(33) 優先権主張国	韓国 (KR)	(74) 代理人	100137811
(31) 優先権主張番号	10-2013-0071261		弁理士 原 秀貢人
(32) 優先日	平成25年6月20日 (2013. 6. 20)		
(33) 優先権主張国	韓国 (KR)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 D L L 4 に特異的に結合する新規モノクローナル抗体及びその用途

(57) 【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であって、

ここで、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モノクローナル抗体、

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モノクローナル抗体、

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モノクローナル抗体、または、

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

10

20

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、である、モノクローナル抗体。

【請求項 2】

請求項 1 に記載のモノクローナル抗体であって、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モノクローナル抗体、

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モノクローナル抗体、

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モノクローナル抗体、または、

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モノクローナル抗体、である、

モノクローナル抗体。

10

【請求項 3】

請求項 1 または 2 に記載の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 4】

請求項 3 のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項 5】

請求項 4 の発現ベクターが導入された形質転換体。

20

【請求項 6】

請求項 4 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 7】

請求項 1 または 2 に記載の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 8】

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 7 に記載の組成物。

30

【請求項 9】

請求項 1 または 2 に記載のモノクローナル抗体を含む癌診断用組成物。

【請求項 1 0】

請求項 1 または 2 に記載の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 1】

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 0 に記載の組成物。

40

【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

50

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。

【背景技術】

【0002】

No 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。No 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、4つのNo t c h受容体を持っており(No t c h 1、2、3及び4)、それぞれのNo t c h受容体は、300 - 350 k D aの大きさを有するタンパク質として合成されm G o l g i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No t c hリガンド(J a g g e d - 1 / 2及びD e l t a類リガンド(D L L)1 / 3 / 4)が発見された。

【0003】

No t c h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、No t c h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。No t c hシグナル伝達で、リガンドとNo t c hが互いに結合すると、No t c h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A D A M 1 0 / 1 7 (a disintegrin and metalloprotease 10/17) / T A C E (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。S 2部位が切断されると、No t c h受容体の膜間通領域のS 3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、プレセニリン1、プレセニリン2、ニカストリン、P e n - 2及びA p h 1から構成されている。2回のタンパク質分解切断後、No t c h細胞内部分(N I C D)は、分離されて核の中に移動する。核の中で、N I C Dは、転写抑制因子であるC S L (CBF-1/Suppressor of Hairless/Lag-1)と結合し、C S Lに結合していた補助抑制因子(CoR)のと交代する。N I C D / C S L複合体は、補助活性因子(CoA)であるM A M L (マスターマインド様)又はp 3 0 0などを集め、サイクリンD 1、p 2 1、N F - k B、c - M y c、p r e - T a (pre-T cell receptor alpha chain)、G A T A 3、N R A R P及びD e l t e x 1などのNo t c hターゲット遺伝子を活性化させ発現を誘導する。

【0004】

活性化されたNo t c h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。活性型No t c hであるN I C D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、活性型No t c h 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、No t c h 4受容体が、M M T V(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)。子宮頸部癌、肺癌、膵臓癌、卵巣癌、乳癌及び前立腺癌などの様々な癌でNo t c h受容体とリガンド及びNo t c h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)。No t c h 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)。

【0005】

デルタ様4(DI4)又はデルタ様リガンド4(以下「D L L 4」という)は、血管内皮細胞で過剰発現されているNo t c hタンパク質に結合するデルタ部類の一つであり、血管

10

20

30

40

50

新生を調節する主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Notch1又はNotch4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。

10

【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参与する-セクレターゼ抑制剤及びNotchシグナル伝達に参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。

20

【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

30

【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

40

【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】

50

従って、本発明者らは、ヒトD L L 4に特異的に結合できると同時に、D L L 4 / N o t c h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D L L 4に特異的に結合するヒトモノクローナル抗体を製作し、D L L 4とN o t c h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、それによって、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(D L L 4)に特異的に結合し、同時に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新規モノクローナル抗体を提供することである。

10

【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。

20

【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。

30

【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。

40

【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に対して強い親和力を示し、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

50

酸配列を示す。FIG 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DLL4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】DLL4を人為的に過剰発現させたHEK293細胞において、DLL4に対するモノクローナルのDLL4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)MLCK-1;(b)MLCK-2;(c)MLCK-3;(d)MLCK-4)。

【図4】モノクローナル抗体のDLL4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DLL4と本発明の抗-DLL4抗体であるMLCK-1、MLCK-2、MLCK-3及びMLCK-4との親和度を測定した結果を示す。

【図6】抗-DLL4抗体であるMLCK-2が、DLL4を介したHUVEC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-DLL4抗体であるMLCK-2が、DLL4及びNotch間の相互作用の抑制を通じて、Notchシグナル伝達を阻害することをウェスタンブロット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Notch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(DLL4)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。

【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、IgA、IgD、IgE、IgM及びIgGを含み、IgGは、サブタイプとして、IgG₁、IgG₂、IgG₃及びIgG₄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、Fab、Fab'、F(ab')₂及びFvを含む。Fab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(CH1ドメイン)を持つ構造として1つの抗原結合部位を持つ。Fab'は、重鎖CH1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Fabと異なる。F(ab')₂抗体は、Fab'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。Fv(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Fv(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Fv(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、全体抗体をパパインで切断することで、Fab断片を得ることができ、ペプシンで切断することで、F(ab')₂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。

【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

10

20

30

40

50

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CDRは、主に抗原のエピトープに結合する役割をする。CDRのそれぞれの鎖は、一般にN-末端から始まり順に数えて、CDR1、CDR2、CDR3と呼ばれ、また、一般にCDRが位置する鎖によって識別される。

【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、前記抗体を外來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、DLL4に対する強い親和力を示し、DLL4を発現する細胞(例 癌細胞)が、Notch1又はNotch4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。

【0027】

ここで用いられる、用語「ヒトデルタ様リガンド4(DLL4)に特異的に結合するモノクローナル抗体」とは、DLL4に結合でき、DLL4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DLL4抗体」と交互に使用され得る。前記DLL4に特異的に結合するモノクローナルは、DLL4に特異的に結合してDLL4とNotch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、DLL4とNotchタンパク質間の相互作用を阻害しながら、ヒトDLL4に特異的に結合し、それによって、Notch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。

【0028】

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2に記載される重鎖CDR1を含むモノクローナル抗体であり得、DLL4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CDR1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CDR3；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「MLCK-1」と命名した。

【0030】

さらに、前記配列番号2で記載された重鎖CDR1を含むモノクローナル抗体は、好ましくは、配列番号2で記載された重鎖CDR1；配列番号6で記載された重鎖CDR2；及び配列番号7で記載された重鎖CDR3を含む重鎖可変領域と配列番号20で記載された軽鎖CDR1；配列番号21で記載された軽鎖CDR2；及び配列番号22で記載され

10

20

30

40

50

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「MLCK-2」と命名した。

【0031】

さらに、前記配列番号2で記載された重鎖CDR1を含むモノクローナル抗体は、好ましくは、配列番号2で記載された重鎖CDR1；配列番号9で記載された重鎖CDR2；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、I g GのサブタイプであるI g G₁、I g G₂、I g G₃及びI g G₄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I g G₁重鎖不変領域は、配列番号31で記載されたI g G₁重鎖不変領域であり得る；I g G₂重鎖不変領域は、配列番号32で記載されたI g G₂重鎖不変領域であり得る；I g G₃重鎖不変領域は、配列番号33で記載されたI g G₃重鎖不変領域であり得る；及びI g G₄重鎖不変領域は、配列番号34で記載されたI g G₄重鎖不変領域であり得るが、本発明の範囲は、そられに制限されるものではない。

【0038】

さらに、本発明の前記D L L 4に特異的なモノクローナル抗体が、軽鎖不変領域を含み、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。

10

【0039】

本発明の用語「デルタ様リガンド4(D L L 4)」は、N o t c h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、N o t c h 1又はN o t c h 4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。D L L 4は、どの哺乳類のD L L 4でもあり得るが、好ましくは、ヒトD L L 4であり得る。本発明の目的上、D L L 4は、癌細胞又は血管内皮細胞で発現するN o t c h 1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。

20

【0040】

前記D L L 4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、D L L 4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D L L 4タンパク質は、天然型又は変異体D L L 4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D L L 4タンパク質は、一般に、天然型D L L 4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D L L 4タンパク質のアミノ酸配列は、一般に、自然に発生するD L L 4で発見されるアミノ酸配列を意味する。前記D L L 4に対する情報は、米国国立保健研究

30

所のG e n e B a n kを含む公知のデータベースから得ることができ、例えば、Gene bank Accession Number NM_019074.3(Gene ID: 54567)であるD L L 4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「N o t c h受容体」とは、N o t c hシグナル伝達を媒介するタンパク質を意味し、N o t c hと交互して使用することができる。前記N o t c h受容体は、N o t c h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、N o t c h 1又はN o t c h 4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N o t c h受容体は、哺乳類のD L L 4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D L L 4に結合するタンパク質であってもよい。本発明の用語「N o t c h」は、全ての天然型N o t c h又は変異体N o t c h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N o t c h」とは、天然型N o t c h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N o t c hタンパク質のアミノ酸配列」とは、一般に、自然に発生するN o t c h受容体から発見されるアミノ酸を意味する。

40

【0043】

本発明の用語「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の阻害」は、本発明のD L L 4に特異的なモノクローナル抗体が、D L L 4に結合してD L L 4とN o

50

t c h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、D L L 4に特異的なモノクローナル抗体が、D L L 4に結合してD L L 4とN o t c h 1又はN o t c h 4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D L L 4に特異的なモノクローナル抗体は、D L L 4との結合によるN o t c h受容体の構造的変化を防ぐことで、D L L 4とN o t c h受容体間の相互作用の阻害する。従って、N o t c hタンパク質の加水分解を防ぎ、N o t c hシグナル伝達を阻害する。癌において、D L L 4がN o t c h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N o t c h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、D L L 4によりN o t c h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、D L L 4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V E G F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、D L L 4とN o t c h間の相互作用を効果的に抑制する本発明のD L L 4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、D L L 4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、D L L 4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D L L 4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、D L L 4に効果的に結合して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。

【0044】

本発明の一実施例において、前記D L L 4特異的ヒトモノクローナル抗体であるM L C K - 1、M L C K - 2、M L C K - 3及びM L C K - 4を製作し、対照群に比べて、前記抗体に対してヒトD L L 4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 μ Mという低い抗体濃度で、D L L 4とヒトN o t c h 1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-D L L 4抗体M L C K - 1、M L C K - 2、M L C K - 3及びM L C K - 4のh D L L 4に対するK d(M)は、それぞれ2.63 \times 10⁻⁷M、1.71 \times 10⁻⁹M、6.96 \times 10⁻⁹M及び2.13 \times 10⁻⁶Mであった(図5)。また、血管内皮細胞の増殖は、濃度依存的にD L L 4によって阻害された(図6)。また、D L L 4-N o t c hシグナル伝達の活性は、N I C Dの生成の抑制をもたらす(図7)。これらの結果は、本発明のD L L 4特異的ヒトモノクローナル抗体が、D L L 4とN o t c h受容体間の結合を効果的にブロックし及びN o t c h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

10

20

30

40

50

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。

10

【0048】

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。

20

【0049】

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鑄型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。

30

【0050】

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。

【0051】

前記モノクローナルは、前記の説明のとおりである。

【0052】

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。

40

【0053】

50

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。

【0054】

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(ベビーハムスター腎臓細胞)、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。

10

【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、リポソーム-媒介-トランスフェクション、リポソーム-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。

20

【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。

30

【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。

40

【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

50

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。

【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、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、非水溶液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。

10

【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。

20

【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。

30

【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。

40

【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、エーロゾル、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

50

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。

【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。

【0072】

前記癌を診断する方法は、本発明のDLL4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、DLL4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DLL4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14)、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DLL4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。

【0073】

具体的に、癌の診断方法は、(a)抗原-抗体反応を通じてDLL4タンパク質を検出するために、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DLL4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DLL4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。

【0074】

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。DLL4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。

【0075】

本発明の用語「抗原-抗体複合体」とは、試料中のDLL4タンパク質の抗原及びDLL4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。

【0076】

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。

【0077】

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、 β -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 β -ラクタマーゼを含む。蛍光材料の例は、 Eu^{3+} 、 Eu^{3+} 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、 ^{57}Co 、 ^3H 、 ^{125}I 、and ^{125}I -ポルトン・ハンター試薬を含む。

【0078】

10

20

30

40

50

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

【0079】

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捕獲することができる。

10

【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。

20

【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。

30

【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。

40

【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る、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

50

。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。

【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 Systemから購入されたヒトDLL4タンパク質(Cat: 1506-D4/CF)である。前記DLL4抗原タンパク質は、DLL4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DLL4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、DLL4のアミノ酸残基の27~251番のアミノ酸を含む。この領域は、Notch1受容体と結合することが知られているdelta/serrate/lag-2(DSL)ドメインと呼ばれるモチーフを含有する(非特許文献15)。Fcタンパク質に融合されたDLL4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CMV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DNA技術を使用して生成した。Fcタンパク質に融合されたヒトDLL4のキメラであるDLL4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DNA技術を使用して生成した。Fcタンパク質に融合されたヒトDLL4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親和カクログラフィーを通じて条件培養液から精製された。

【0095】

実施例1-2：ライブラリーファージの製造

10 μ g/mLの組み換えヒトDLL4溶液(R&D System)を免疫試験管に添加して4 μ g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(BSA)溶液を試験管に添加してDLL4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BSA溶液に分散された10¹²CFU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% Tween 20(PBS-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ER2537に37 $^{\circ}$ C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Luria-Bertani(LB)寒天培地に塗抹し、37 $^{\circ}$ Cで一晩培養した。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 $^{\circ}$ Cに保管し、残りの50mLを20mLのSB-カルベニシリン培養液に、2%ブドウ糖溶液を添加して37 $^{\circ}$ C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、10¹²PFUのVCSM13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 $^{\circ}$ C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 μ g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PBS 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。

【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。培養して単一クローンを得てこれを400 μ 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。

【実施例2】

【0097】

抗D L L 4抗体のD L L 4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M L C K - 1、M L C K - 2、M L C K - 3及びM L C K - 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(M L C K - 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(M L C K - 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(M L C K - 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(M L C K - 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D L L 4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(4で一晚PBS溶液中の2 μ g/mLの濃度のh D L L 4-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D L L 4抗体(精製させたタンパク質)を抗体の一定の濃度に従い0 nM~128 nM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D L L 4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ーを用いて450 nm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D L L 4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D L L 4抗体のD L L 4リガンドに対する結合能の測定

ELISA結果と共にF A C S分析を通じて抗D L L 4抗体がD L L 4に結合する能力を測定した。

【0100】

この実験のために、ヒトD L L 4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F A C S C a l i b u r (BD Biosciences)機器を用いて、抗D L L 4抗体とD L L 4の結合した程度を測定した。D L L 4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D L L 4モノクローナル抗体を10 μ g処理後、室温で30分間反応した。反応後、細胞をPBSで洗浄後、F I T C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、F I T C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D L L 4モノクローナル抗体を処理した実験群でヒトD L L 4-モノクローナル抗体-F I T C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D L L 4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、M L C K - 1を示した(図3)。

【0102】

10

20

30

40

50

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hNotch-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、非特異的結合部位は、BSAで2時間ブロックした。

10

【0105】

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0nM~140nM範囲の濃度で抗体を抗原タンパク質(DLL4抗原、600ng/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(50ng/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。450nm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。

20

【0106】

【表1】

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

30

【0107】

その結果、本発明の4つの抗体全て0.4~3.7nM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。

【0108】

実施例5：抗体-DLL4抗体の結合能の分析

40

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。

【0109】

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10mM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100nM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

50

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。

【0110】

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)。

【0111】

実施例6：DLL4抗体の血管内皮細胞(HUVEC)増殖に対する影響の分析

DLL4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-DLL4小唄であるMLCK-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。

【0112】

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。HUVECの培養は1%ゼラチン(Sigma)に溶解されたPBS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、PBSで洗浄して使用した。使用された培地はEGM-2 Single Quotient(Lonza)が含まれたEMB-2(Lonza)で、細胞培養は密集度が80%を超えないように、37、5%CO₂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。hDLL4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96-ウェルプレートにrhDLL4を緩衝液を使用して希釈した後、100μl/ウェルでウェルに摂取して4で一晚静止させた。さらに、HUVECは0.1%FBSが添加されたEBM-2最小培地で24時間放置して血清による効果を最小化させた。実験当日rhDLL4がコーティングされたプレートは、それぞれのウェルをPBS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20分間静止させた。前日から24時間静止したHUVEC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96時間静止した。細胞増殖が修了されたとき、各ウェルに10μLずつ処理し、5時間後機器を用いて450nm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。

【0113】

その結果、図6に示すように、本発明の代表的な抗-DLL4抗体は、DLL4によるHUVEC増殖抑制を濃度依存的に解除させる結果を示した。

【0114】

実施例7：DLL4抗体のDLL4/Notchシグナル伝達経路抑制活性の分析

Notchシグナル伝達で、Notch受容体がDLL4と結合すると、Notch受容体の構造的変化をもたらし、Notch受容体が切断され、Notch受容体の細胞内部分(NICD)が核内に移動されNotchシグナル伝達を媒介する。それで、本は発明の抗DLL4抗体がDLL4とNotch受容体間の結合を抑制し、Notchシグナル伝達を防ぐことができるかの有無をNotch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。

【0115】

具体的に、DLL4に結合する抗体のDLL4/Notchシグナル伝達経路抑制活性を調べるために、HUVEC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(BD)に組み換えヒトDLL4を1μg/mLで緩衝溶液を使用して希釈させた後、1mL/ウェルで添加した後、4で一晚静止させた。rhDLL4を処理しない対照実験群では、緩衝溶液単独で1mL/ウェルで処理して同様に4で一晚静止させた。次の日、4の冷蔵庫でDLL4がコーティングされたプレートを出して、PBSで1回洗浄した後、EGM-2培地を各ウェルに1mLずつ処理し、各ウェルに1mLずつ処理

10

20

30

40

50

して、各ウェル別に抗体を処理した。最終培養液の量は2mlであり、抗体処理を2倍にして常温で20分間反応させた。抗体処理時間の間、75Tプレートで培養されたHUV EC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培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1mlずつ摂取し、一晚培養した。0.2%FBSが含まれたEBM-2最小培地を準備し、一晚培養されたHUV ECの各ウェル培地を除去し、PBSで1回洗浄した後、0.2%FBSが含まれたEBM-2最小培地を2ml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、一晚培養した。抗体が処理されたHUV ECの各ウェルにhVEGFを100ng/ml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、PBS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150μlを添加した。

10

【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HUV ECを集めた後、1.5mlチューブを集めた後、氷に置いた。5分単位で氷から1.5ml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×SDS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ゲルを通じて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MLCK-2モノクローナル抗体の処理によって、DLL4処理によって増加したNICDを減少させる結果を示した(レーン7)

20

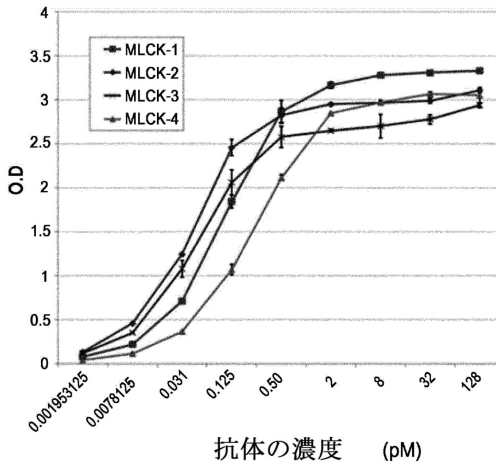
【0118】

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。

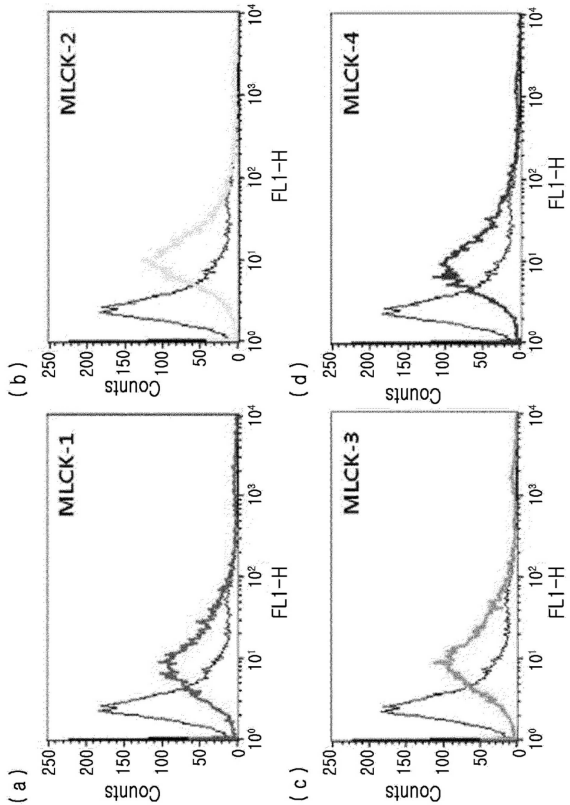
【 図 1 】

VH					VL										
CLONE	Frame 1	CDR1	Frame 2	CDR2	Frame 3	CDR3	Frame 4	CLONE	Frame 1	CDR1	Frame 2	CDR2	Frame 3	CDR3	Frame 4
MLCK-1 (SEQ ID NO.1)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSLSAS	GFRTDPAHS (SEQ ID NO.2)	VARQAPKQKLEWIS	WITSDGQWYADYWG (SEQ ID NO.3)	RFTSDSRNRLTQINKSLADPTAVYICR	ADIPFY (SEQ ID NO.4)	WQGGTLYTSS	MLCK-1 (SEQ ID NO.15)	TGSSINSGRWIS	QVLTLPKPKAKTQKQITDC	WVQQDQTPKAWLY	SDNRPFS (SEQ ID NO.17)	GFPRFSGKSTGASAGSGRSDGQIYC	ATVRSLSLWV (SEQ ID NO.18)	FEGGTQITL
MLCK-2 (SEQ ID NO.5)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSLSAS	GFRTDPAHS (SEQ ID NO.2)	VARQAPKQKLEWIS	WITSSGQWYADYWG (SEQ ID NO.6)	RFTSDSRNRLTQINKSLADPTAVYICR	ADIPFY (SEQ ID NO.7)	WQGGTLYTSS	MLCK-2 (SEQ ID NO.19)	TGSSINSGRWIT	QVLTLPKPKAKTQKQITDC	WVQQDQTPKAWLY	ADNRPFS (SEQ ID NO.21)	GFPRFSGKSTGASAGSGRSDGQIYC	GVWVPSLWV (SEQ ID NO.22)	FEGGTQITL
MLCK-3 (SEQ ID NO.8)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSLSAS	GFRTDPAHS (SEQ ID NO.2)	VARQAPKQKLEWIS	WITDQKQWYADYWG (SEQ ID NO.9)	RFTSDSRNRLTQINKSLADPTAVYICR	ADIPFY (SEQ ID NO.10)	WQGGTLYTSS	MLCK-3 (SEQ ID NO.20)	SGSSINSGRWAVT	QVLTLPKPKAKTQKQITDC	WVQQDQTPKAWLY	SDNRPFS (SEQ ID NO.23)	GFPRFSGKSTGASAGSGRSDGQIYC	GVWVPSLWV (SEQ ID NO.24)	FEGGTQITL
MLCK-4 (SEQ ID NO.11)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSLSAS	GFRTDPAHS (SEQ ID NO.2)	VARQAPKQKLEWIS	WITWGGDQWYADYWG (SEQ ID NO.13)	RFTSDSRNRLTQINKSLADPTAVYICR	GFVITFEPQRY (SEQ ID NO.14)	WQGGTLYTSS	MLCK-4 (SEQ ID NO.21)	NGFPRNGWVY	QVLTLPKPKAKTQKQITDC	WVQQDQTPKAWLY	SDNRPFS (SEQ ID NO.25)	GFPRFSGKSTGASAGSGRSDGQIYC	GVWVPSLWV (SEQ ID NO.26)	FEGGTQITL

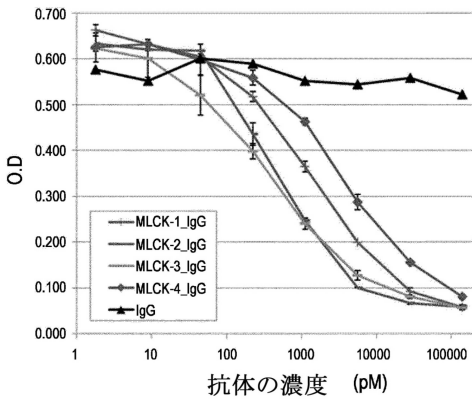
【 図 2 】



【 図 3 】



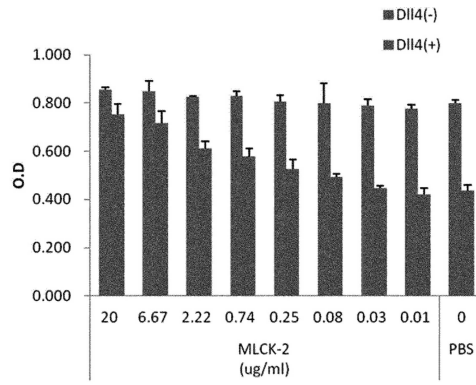
【 図 4 】



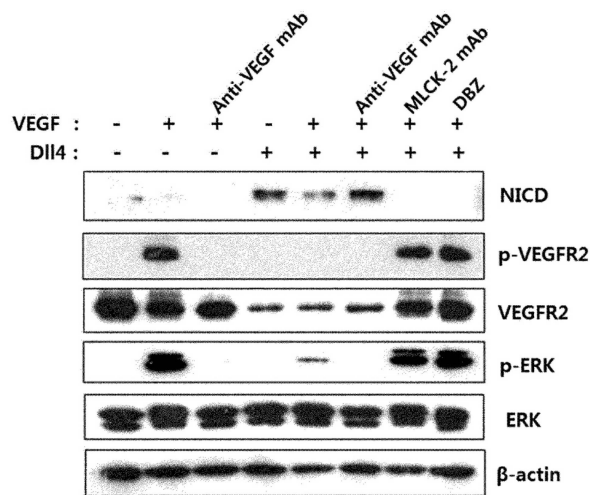
【 図 5 】

抗体	rhDII4	結合	k_a (M ⁻¹ S ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	K_d (1/M)	$K_{0.5}$ (M)
MLCK1	rhDII4	二価結合	6.4E+04	1.69E-02	3.80E+06	2.63E-07
MLCK2	rhDII4	二価結合	1.38E+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】

0005982698000001.app

フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I		
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10	
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

- (72)発明者 キム ウン エイ
大韓民国 3 0 5 - 8 0 5 テジョン 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 テジョン 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 テジョン 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 テジョン 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 テジョン 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 テジョン 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 テジョン ユソン - グ シンソン - ドン 6

審査官 小石 真弓

- (56)参考文献 特表2010 - 5 1 2 7 4 9 (J P , A)
特表2012 - 5 0 2 6 5 0 (J P , A)
特表2009 - 5 3 9 3 8 4 (J P , A)
国際公開第2011 / 1 0 9 2 9 8 (W O , A 1)
国際公開第2011 / 0 3 9 3 6 8 (W O , A 1)
国際公開第2011 / 0 5 0 2 6 2 (W O , A 1)

国際公開第2011/025964(WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/

C07K

A61K

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

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	JP5982698B2	公开(公告)日	2016-08-31
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		
当前申请(专利权)人(译)	AB厄尔尼诺生物		
[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 C12N5/10 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		
优先权	1020120071996 2012-07-02 KR 1020130071261 2013-06-20 KR		
其他公开文献	JP2015524390A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及一种特异性结合δ样配体 (DLL4) 的新型单克隆抗体, 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。

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