(19)日本国特許庁（ＪＰ）　(12) **公開特許公報**（Ａ）　(11)特許出願公開番号

特開2003－47470
(P2003－47470A)

(43)公開日 平成15年2月18日(2003.2.18)

(51)Int.Cl⁷	識別記号	ＦＩ		テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ 15/09	ZNA	Ｃ０７Ｋ 1/22		４Ｂ０２４
		16/28		４Ｂ０２９
Ｃ０７Ｋ 1/22		Ｃ１２Ｍ 1/00	Ａ	４Ｂ０６４
16/28		Ｇ０１Ｎ 33/53	Ｄ	４Ｂ０６５
Ｃ１２Ｍ 1/00			Ｙ	４Ｈ０４５

審査請求　未請求　請求項の数 14ＯＬ（全 20数）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2001－233284(P2001－233284)

(22)出願日　平成13年8月1日(2001.8.1)

(71)出願人　000000033
旭化成株式会社
大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号

(72)発明者　坂野　誠治
静岡県富士市鮫島2番地の1　旭化成株式会社内

(72)発明者　三宅　健介
東京都目黒区駒場3－6－15

(74)代理人　100090941
弁理士　藤野　清也　（外２名）

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 新規な抗体及びその用途

(57)【要約】
【課題】　未変性のノッチリガンド細胞外部分蛋白質を特異的に認識する抗体を提供する。
【解決手段】未変性のノッチリガンド細胞外部分蛋白質を特異的に認識する抗体によって未変性ノッチリガンド細胞外蛋白質と変性ノッチリガンド細胞外蛋白質とを分別する。生理活性がより期待される未変性ノッチリガンド蛋白質のみを精製でき、さらに生理活性を有するノッチリガンドのみ選択的に検出できる。

1

【特許請求の範囲】

【請求項１】　未変性のノッチリガンド蛋白質の細胞外部分を特異的に認識することを特徴とする抗体。

【請求項２】　ノッチリガンド蛋白質がヒトノッチリガンド蛋白質である請求項１記載の抗体。

【請求項３】　未変性のノッチリガンド蛋白質がヒトジャグドー2 蛋白質である請求項１記載の抗体。

【請求項４】　抗体が、モノクローナル抗体である請求項１記載の抗体。

【請求項５】　抗体が、ラットに免疫して得られるラットモノクローナル抗体である請求項１記載の抗体。

【請求項６】　受託番号FERM BP-7600のハイブリドーマ TS-11により産生される請求項１記載の抗体。

【請求項７】　未変性のノッチリガンド蛋白質の細胞外部分が配列表配列番号１のアミノ酸配列を有するポリペプチドから構成される請求項１記載の抗体。

【請求項８】　分離した体液、請求項１～７のいずれかに記載の抗体を用いて反応させて活性を有するノッチリガンド蛋白質を検出することを特徴とする疾患の検査方法。

【請求項９】　疾患が細胞の分化異常に伴う疾患である請求項８記載の検査方法。

【請求項１０】　請求項１～７のいずれかに記載される抗体を用いた活性を有するノッチリガンド蛋白質を細胞表面上に発現する細胞の分離または検出方法。

【請求項１１】　少なくとも請求項１～７のいずれかに記載される抗体を含有することを特徴とする検査薬キット。

【請求項１２】　少なくとも請求項１～７のいずれかに記載される抗体を含有することを特徴とする細胞分離キットまたは細胞分離装置。

【請求項１３】　請求項１～７のいずれかに記載される抗体を固定化した担体。

【請求項１４】　請求項１３に記載の担体を用いることを特徴とする活性を有するノッチリガンド蛋白質の精製および製造方法。

【発明の詳細な説明】

【０００１】

【発明の属する技術分野】本発明は、新規な抗体およびその使用方法に関する。

【０００２】

【従来の技術】ノッチ(Notch) はショウジョウバエで発見された神経細胞の分化制御に関わるリセプター型膜蛋白質であり、ヒトを含めた哺乳類では４種のノッチ分子(Notch-1～4)が同定されている（Artavanis-Tsakonas et al., Science. 284: 770-6,1999.)。一方、このノッチを活性化するアゴニストであるリガンド分子として、ショウジョウバエノッチリガンドであるショウジョウバエデルタ(Delta) およびショウジョウバエセレイト(Serrate) の２つが見いだされている。これらリガンド分子

2

はリセプターのノッチ同様、Ｉ 型の膜蛋白質である。これらリガンド分子は、ヒトを含めた哺乳類において３種のデルタ分子 (Dll1、Dll3、Dll4) と２つのセレイト（ジャグド)(Jagged-1～2)が同定され、報告されている。本発明においては、これら５種の分子を総称して、ノッチリガンドという。

【０００３】これらのヒト分子、すなわちヒトノッチリガンドについては国際公開公報WO97/19172、WO98/02458、WO98/51799、日本特許公開平11-299493 にアミノ酸配列、遺伝子配列、遺伝子クローニング手法、蛋白質の発現方法、用途などが記載されている。これら以外にも、国際公開公報WO96/27610、WO97/45143、WO98/58958にはヒトジャグドー 1、WO96/27610にはヒトジャグドー2 のアミノ酸配列と一部アミノ酸配列がオーバーラップするヒトジャグドー2 様分子、さらに国際公開公報WO97/01571、WO2000/53753にはヒトデルター1 、国際公開公報WO2000/47602、WO2001/12664にはヒトダルター3 、国際公開公報WO98/45434、WO2000/06726、日本特許公開2000-23674にはヒトデルター4 について記載されており、ヒトを含む脊椎動物のノッチリガンドのアミノ酸配列が開示されている。特に、ヒトジャグドー2 に関しては、坂野、伊藤は国際公開公報WO98/02458において抗体の作成及びその用途について記述している。

【０００４】国際公開公報WO98/02458によると、坂野、伊藤は抗体としてはマウスモノクローナル抗体とウサギポリクローナル抗体を通常の方法で作製した。これら抗体は還元剤 2－メルカプトエタノール（以下、2-MEと記す）により還元を受けた細胞外ヒトジャグドー2 ポリペプチド、すなわち変性を受けた細胞外ヒトジャグドー2 蛋白質を認識すると共に、還元剤2-MEによる還元を受けない細胞外ヒトジャグドー2 ポリペプチド、すなわち未変性の細胞外ヒトジャグドー2 蛋白質を認識することがウエスタンブロット法により明らかにされている。また、このモノクローナル抗体を用いることにより細胞外ヒトジャグドー2 ポリペプチドがアフィニティークロマトグラフィー法にて精製できることが明らかにされている。また、これらの用途として、ヒトジャグドー2 蛋白質の精製に使用できること、細胞の分化異常に伴う疾患、例えば悪性腫瘍など疾患の検査薬として使用できることが記載されている。上記に示したその他のヒトノッチリガンドに関しても同様な機能を有する抗体であることが示されている。しかしながら、いずれも変性ならびに未変性蛋白質を共に認識する抗体しか知られていない。つまり、上記のように通常の方法、すなわち一般的なハイブリドーマ作製と一般的なスクリーニング方法で抗体を作製した場合、上記のような性質の抗体が得られることが理解される。

【０００５】一般に変性した蛋白質は元来その蛋白質が有している活性を消失する場合が多い。たとえば酵素を還元剤で処理すると酵素活性を消失することが多い。特

に、細胞外に分泌、もしくは細胞膜外に存在する蛋白質は、システイン残基のようなＳＨ基を有するとそれ自身もしくは他の蛋白質上にあるシステイン残基のＳＨ基とジスルフォニル結合によって共有結合し、その結果、それら蛋白質の高次構造が保たれる。これら高次構造はそれらの蛋白質の性質を保つためには非常に重要である。

【０００６】ノッチ並びにノッチリガンドはその構造上の特徴として、それらの細胞外部分においてシステイン残基を極めて多く有し、特に６つのシステイン残基を一つの構造体とするEpidermal Growth Factor(EGF)様配列を繰り返し複数有する。このEGF 様配列はその一つのユニット中に６つのシステイン残基により３対のジスルフォニル結合を持ち、他の分子との結合や酵素活性を有するためにはカルシウムイオンを必要とすることを特徴とする。また、リセプターであるノッチとノッチリガンドの結合にはカルシウムイオンが必要であることが知られている。したがって、これらの点から、このシステイン間のジスルフォニル結合はノッチリガンド固有の活性にとって必須であることが判る。

【０００７】しかしながら、上記抗体は未変性の活性を有したノッチリガンドのみならず、還元剤処理された変性ノッチリガンドをも同時に認識してしまう。すなわち、活性を有したノッチリガンドを検出すると同時に、元来の活性を有しないノッチリガンドを検出したり、活性を有したノッチリガンドを精製すると同時に、元来の活性を有さないノッチリガンドを分別することなく同時に精製してしまう。従来の抗体にはこの様な問題点があった。

【０００８】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、上記問題点を解決するためになされたものであって、未変性のノッチリガンドを特異的に認識し得る抗体を作製し、これを使用することを課題とする。

【０００９】

【課題を解決する手段】本発明者らは、上記の抗体を作製するために、上記に挙げた文献では試みられていないモノクローナル抗体の作製方法を試み、鋭意工夫を重ねて、この課題の解決に取り組んだ。すなわち、本発明者らは、抗原としてヒトノッチリガンドのひとつ、ヒトジャグドー2 細胞外ポリペプチドを免疫原とし、ラットの足の裏に免疫し、所属リンパ節をとりだし、この細胞とマウスミエローマ細胞との融合を行い、ヒトジャグドー2 抗体産生ハイブリドーマを多数作製した。このようにして得られた多数のハイブリドーマクローンの中から、目的の抗体を産生するハイブリドーマを選択するため、マウス細胞株にヒトジャグドー２遺伝子を導入してヒトジャグドー２全長安定発現細胞株を作製し、この細胞株を染色できる抗体を産生するハイブリドーマクローンをフローサイトメーターにより検出して選択した。さらに、このようにして選択されたハイブリドーマから、免疫沈降法ではヒトジャグドー2 蛋白質を認識でき（未変性蛋白を認識することの確認）、2-MEによる変性ヒトジャグドー2 蛋白質を認識しない（変性蛋白を認識しないことの確認）性質を基に最終選択を行った。さらに、このようにして選ばれた抗体を固定化した担体により未変性蛋白質と変性蛋白質を分画できることを明らかにして、本発明を完成した。

【００１０】すなわち、本発明は、未変性のノッチリガンド蛋白質の細胞外部分を特異的に認識することを特徴とする抗体に関する。本発明におけるノッチリガント蛋白質には、ヒトノッチリガンド蛋白質がまた未変性のノッチリガンド蛋白質にはヒトジャグドー2 蛋白質がある。本発明における未変性のノッチリガンド蛋白質の細胞外部分を特異的に認識する抗体としては、そのモノクローナル抗体、特にラットに免疫して得られるモノクローナル抗体、あるいは受託番号 FERM BP-7600 のハイブリドーマTS-11 細胞により産生される抗体、あるいは未変性のノッチリガンド蛋白質の細胞外部分が配列表配列番号１に記載されるアミノ酸配列を有する抗体などがある。

【００１１】また、本発明は、上記記載の抗体を用いる疾患の検査方法、これらの抗体を用いてノッチリガンド蛋白質を発現する細胞の分離または検出方法、これらの抗体を用いる検査薬キット、この分離または検出原理を利用した細胞分離キットまたは細胞分離装置、前記抗体を固定化した担体並びにこの担体を用いたノッチリガンド蛋白質の精製及び製造方法に関する。本発明における検査の対象となる疾患としては、細胞の分化異常に伴う疾患が挙げられる。

【００１２】以下、本発明を詳細に説明する。本発明における、遺伝子操作に必要なcDNAの作製、ハイブリダイゼーションによるスクリーニング、組換え DNAの作製、 DNAの塩基配列の決定、cDNAライブラリーの作製等の一連の分子生物学的な実験、ならびに遺伝子導入による蛋白質の発現、電気泳動法による蛋白質分子量の決定、ウィエスタンブロット、免疫沈降法などの一連の蛋白質化学的な実験は通常の実験書に記載の方法によって行うことができる。前記の通常の実験書としては、たとえば、Sambrookら著、 Molecular Cloning, A laborartory manual, 3rd ed. 2001,Cold Spring Harbor Loboratory Pressを挙げることができる。また、配列表において、配列表配列番号１のアミノ酸配列は、本発明で使用したヒトジャグドー2 のシグナルペプチドを除いた細胞外ドメインの配列である。配列表配列番号２のアミノ酸配列は、ヒトジャグドー2 の成熟型全長アミノ酸配列である。配列表配列番号３の配列は本発明のヒトジャグドー2 の全アミノ酸配列及びそれをコードしているcDNA配列である。なお、配列表に記載されたアミノ酸配列の左端及び右端はそれぞれアミノ基末端（以下 N末）及びカルボキシル基末端（以下 C末）であり、また塩基配列の左

端及び右端はそれぞれ5'末端及び3'末端である。

【００１３】本発明で使用したヒトジャグドー2 細胞外部分ポリペプチドの作製並びに、ヒトジャグドー2 全長発現ベクターで形質転換した細胞株の作製は、参考例に記載した方法に従って行った。なお、これらの詳細については、坂野、伊藤の国際公開公報WO98/02458に記述されている。また、本発明で使用したヒトジャグドー2の全アミノ酸配列をコードするcDNAを含むベクターpUCSR-2 を大腸菌 JM109に遺伝子導入した形質転換細胞は、E. coli: JM109-pUCSR-2 として日本国つくば市東１丁目１番地１　中央第６の独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに寄託されている。寄託日は平成８年10月28日であり、受託番号はFERMBP-5727である。

【００１４】抗体の作製は通常の実験書に記載の方法によって行うことができる。たとえば、その実験書としてはHarlowら著、Antibodies; A Laboratory Manual,1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press を挙げることができる。特に、本発明におけるラットモノクローナル抗体作製手法はSadoらの論文（Kishino, Y. et al. Cell Struct. Funct., 20: 151-156, 1994)もしくは佐渡義一著「ラットリンパ節法実験現場プロトコル；ラットリンパ節法によるモノクローナル抗体の作製」2000年、重井医学研究所発行（〒701-0202岡山県山田2117）にその実験手法の詳細が記述され、これを参考にすることにより行うことができる。

【００１５】また、各種抗体の評価方法は通常の実験書に記載の方法によって行うことができる。たとえば、その実験書としてはHarlowら著、 Using Antibodies; A Laboratory Manual,1999, Cold Spring Harbor Laboratory Pressを挙げることができる。

【００１６】本発明者らは参考例に示したごとく、精製、単離されたヒトノッチリガンドであるヒトジャグドー2 ポリペプチドを作製した。すなわち、細胞外タンパク質を発現する発現ベクターとして、配列表配列番号１に記載のアミノ酸配列の１から1055のアミノ酸の C末側に、8 アミノ酸、すなわち Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lysのアミノ酸配列（以下、FLAG配列という）（配列表配列番号４）を持つポリペプチドを付加したキメラ蛋白質をコードする DNAを発現ベクターpCDNA3（インビトロジェン社）ヒトジャグドー2 の細胞外部分発現ベクターを作製し、CHO-K1細胞（大日本製薬株式会社より購入可能：ATCC:CCL-61)に遺伝子導入し、ネオマイシン存在下で安定発現細胞株の選択を行い、高発現細胞株のクローニング後、その細胞株上清を回収し、抗 FLAG 抗体固定化カラムによるアフィニティークロマトグラフィー法にてヒトジャグドー2 細胞外蛋白質を精製した。

【００１７】また、全長タンパク質を発現する発現ベクターとして、配列表配列番号２の１から1212のアミノ酸の C末端側にFLAG配列を持つポリペプチドを付加したキメラタンパク質コードする DNAを発現ベクター pCDNA3 につなぎ、ヒトジャグドー2の全長発現ベクターを作製した。この発現ベクターをマウス細胞株 BALB3T3 (理化学研究所細胞開発銀行より分与可能。登録番号は RCB0005。もしくは ATCC:CCL-163)に遺伝子導入を行い、ネオマイシンにて発現細胞を選択し、ヒトジャグドー2 を細胞膜上に発現する安定発現細胞株を得た。

【００１８】参考例の方法で作製されたヒトジャグドー2 細胞外蛋白質を免疫原として、実施例１に記載の方法で、抗ヒトジャグドー2 ラットモノクローナル抗体産生ハイブリドーマクローン細胞株を多数作製をした。この実施例の方法の詳細及びそれらの変法などのハイブリドーマ作製に関わる技術的な点は上記の成書「ラットリンパ節法実験現場プロトコル；ラットリンパ節法によるモノクローナル抗体の作製」に記述され、それらを参考にして行うことができる。

【００１９】実施例２に示したように、この様にして作製された複数のハイブリドーマ細胞の培養上清を参考例で作製したヒトジャグドー2 を細胞膜上に発現する安定発現細胞株と反応させ、フローサイトメーターにて該安定発現細胞株に反応する細胞上清を選択した。すなわち、このような作用を有する抗体を産生するハイブリドーマクローン細胞を選択した。フローサイトメーターの手法については H.M.Shapiroによる Practical Flow Cytometory、3rded.、1995、Wiley-Liss,Inc. に詳細な記述があり、これを参考にして行うことができる。

【００２０】実施例３に示したように、この様にして選択されたハイブリドーマクローン細胞の中から、さらに最終的に、1)免疫沈降法で抗原を認識する、2) 2-ME 添加条件で変性した抗原を用いたドットブロット法では抗原を認識しない、の２点を指標にしてこれらのハイブリドーマのクローン細胞が上清に産生するモノクローナル抗体を選択し、最終的にハイブリドーマクローン細胞株 TS-11を作製した。

【００２１】また、本発明の未変性ヒトジャグドー2 細胞外部分を認識するラットモノクローナル抗体産生ハイブリドーマクローン細胞株 TS-11は、TS-11 として日本国つくば市東１丁目１番地１　中央第６に所在の独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに寄託されている。寄託日は平成13年５月23日であり、受託番号は FERM BP-7600 である。

【００２２】このようにして作製されたハイブリドーマクローン細胞株から遺伝子クローニング法などにより分離されたイムノグロブリン遺伝子を用いて、細胞に発現させた遺伝子組換え体抗体によっても作製することができる。このように作製された抗体は同様な抗原認識能を有しているため、同じようにヒトジャグドー2 の精製ならびに他の用途に使用できる。

【００２３】実施例４に示したように、このハイブリドーマクローン細胞 TS-11が産生するモノクローナル抗体

TS-11を固体化した担体を用いて、アフィニティーカラムを作製した。このアフィニティーカラムは未変性型ヒトジャグドー2 のみ吸着できるよう、変性型ヒトジャグドー2 細胞外蛋白質と未変性型ヒトジャグドー2 細胞外蛋白質を分別できる。

【００２４】本発明の抗体は、この様なノッチリガンド蛋白質の精製のみならず検出にも利用できる。元来、ノッチリガンド分子は細胞表面上に膜蛋白として発現する。したがって、本発明の抗体が認識する抗原を検出することにより、抗原であるノッチリガンド蛋白質を発現する細胞を検出できる。この検出法としては、実施例２に示したように、本発明の抗体を用いて、細胞を染色した後、フローサイトメーターにて染色細胞を検出する方法、蛍光顕微鏡にて観察して検出する方法などに応用できる。一般に検査される細胞として末梢血球、骨髄の場合にはフローサイトメーターがで適当であり、固形癌、各種臓器組織の場合には蛍光顕微鏡が適当である。また、疾患としては白血球、各種悪性腫瘍、良性腫瘍、遺伝病などが挙げられる。したがって、本発明の抗体を用いた細胞検査方法並びに細胞検査キットも本発明に含まれる。この目的の検査薬の構成の一例として、蛍光色素ラベルされた本発明の精製抗体と、安定化剤（アルブミンなど）、防腐剤（NaN３など)から構成される溶液を遮光瓶にいれた商品が挙げられる。

【００２５】また、ノッチリガンドは、元来細胞膜蛋白質であるが、自然に分泌型のリガンドとなることも知られている。ノッチリガンドの一つデルター1 は、メタロプロテアーゼのひとつ、クズバニアン（Kzubanian)により細胞膜外で切断され、分泌型となることが知られている（Qi, H. et al., Science, 283: 91-4, 1999)。また、血管内皮細胞からヒトジャグドー1 が遺伝子クローニングされた際に、オルタネイティブスプライシングによる分泌型ジャグドー1 を発現するｍＲＮＡが見つかっている（Zimrin, A.B. et al., J. Biol. Chem., 271: 32499-502, 1996)。　さらに、先天性遺伝子疾患であるアラジュール病（Alagille syndrome)ではノッチリガンドのひとつ、ジャグドー1 のコーディング流域にストップコドンが入り、結果的に分泌型のジャグドー1 が作られ、これが病気の原因ではないかと考えられている（Artavanis-Tsakonas, S., Nat Genet. 16: 212-3, 1997）。

【００２６】これらのことから、血液などの体液中には細胞外部分のノッチリガンドが存在することが推察され、それらを測定することによって各種疾患を検査することができる。特に、本発明の抗体は未変性型の蛋白質のみを認識することから、機能を有した遊離型ノッチリガンド蛋白質の測定に必須といえる。したがって、本発明の抗体を用いたヒト体液中のノッチリガンド濃度の測定方法、本発明の抗体を用いたノッチリガンド濃度の測定方法に基づく検査薬ならびに検査薬キットも本発明のなかに含まれる。測定方法としては、あらゆる免疫学的な測定法が利用できる。たとえば、２種の抗体を用いたサンドイッチ型酵素免疫測定法、ひとつの抗体と抗原を用いた競合型免疫測定法などを挙げることができる。これらの、抗体を用いた測定法については、石川榮治　著による「超高感度酵素免疫測定法」、「酵素標識法」（共に学会出版センター）などに記載されている。もちろん、本発明の抗体はここに示した以外のあらゆるこれらの抗体を用いた物質の測定法に利用できる。

【００２７】本発明の抗体の遺伝子配列を求めることにより、ヒト化抗体、一本鎖抗体等を作製して、医薬品もしくは体内検査薬として使用することも可能である。すなわち、ヒト化抗体とすることにより、抗原性を減らして患者に直接投与することが可能となる。ヒト化抗体とは抗体を構成するアミノ酸配列の定常的な部分、所謂コンスタントリージョンをヒト遺伝子由来のそれに代え、抗原性を低くしたものであり、Mountainらの総説（Mountain, A. et al., Biotechnol. Genet. Eng. Rev., 10: 1-142, 1992）に作製方法、用途などが詳しく記述されている。また、一本鎖抗体とは抗体の軽鎖、重鎖の抗原認識部位をひとつのポリペプチドとして発現させたミニ抗体であり、Hustonらの総説(Huston, J. S. et al., Int. Rev.Immunol., 10 :195-217, 1993) 、Birdらの総説(Bird, R. E. et al., Trends.Biotechnol., 9:132-7, 1991)に作製方法、用途などが詳しく記述されている。

【００２８】医薬品用途としては、ノッチリセプターの下流分子であるレポータージーンアッセイなどのスクリーニングにてノッチリガンドによりノッチリセプターの活性化を抑制する、所謂アンタゴニスト抗体、また、ノッチリガンド同様にノッチリセプターの活性を引き起こすアゴニスト抗体であることが望ましく、これらの作製はノッチリセプターのシグナル伝達を測定することによりスクリーニングできる。たとえば、その方法としてはTP-1プロモーター、Hes-1プロモーターを用いた、レポータージーンアッセイなどが挙げられる(Shimizu, K. et al., Mol. Cell. Biol. 20:6913-22, 2000; Minoguchi, S. et al., Mol. Cell. Biol., 17 :2679-87, 1997)。

【００２９】これらヒト化抗体を医薬品、体内検査薬として用いるには、上記に示した形態を有する本発明の抗体を適当な安定化剤、例えばヒト血清アルブミンなどと共に凍結乾燥品を作製し、用時注射用蒸留水にて溶解もしくは懸濁して使用し得る形状が望ましい。例えば0.1から1000μg/mlの濃度に調整した注射剤、点滴剤として提供することができる。医薬品、体内検査薬として対象となる疾患としては、分化異常にともなう疾患、たとえば悪性腫瘍、遺伝病などが挙げられる。また、組織再生異常を伴う疾患、たとえば肝炎、肝硬変などの肝臓疾患、動脈硬化などの血管疾患、皮膚潰瘍などの皮膚疾

患、潰瘍性大腸炎などの消化器疾患にも適応可能である。また、体内検査薬として用いる場合には放射性同位元素にて標識されることが望ましく、抗体の集積場所の検出はシンチカメラを用いたシンチグラフィーによる体内分布の検出が一般的な使用方法として挙げられる。一方、医薬品として使用する場合は、疾患によって投薬量は異なるが、1 mg/kg/日から 10g/kg/日の投薬が望ましい。

【００３０】実施例においては、ヒトジャグドー2 のみを例示したが、これら実施例と引用文献を参考にすれば、他のノッチリガンドに対する同様な機能を有するモノクローナル抗体も作製できる。したがって、本発明には未変性のノッチリガンド蛋白質の細胞外部分を特異的に認識することを特徴とする抗体すべてが含まれる。特にヒト分子であるヒトノッチリガンドとは少なくとも現在まで哺乳類で知られている次の５種類が知られており、次の特許文献に免疫原の調製法が開示されており、この方法に基づいて作製することができる。

デルター1(Dll1) ：国際公開公報WO97/19172
デルター3(Dll3) ：日本特許公開平11-299493
デルター4(Dll4) ：国際公開番号WO98/51799
ジャグドー1(Jagged-1) ：国際公開公報WO97/19172
ジャグドー2(Jagged-2) ：国際公開番号WO98/02458

【００３１】また、本実施例ではラットに対して免疫しているため、ラットに対する抗体の作製は難しい。したがって、ラットのこれら分子に対する抗体を作製する場合には免疫を行う動物をラット以外、たとえばマウスに行うことが望ましい。

【００３２】本抗体で精製分離された未変性型ノッチリガンド蛋白質は、全てが未変性型ノッチリガンド蛋白質であるため、中に含まれるノッチリガンド蛋白質の全てが細胞の分化抑制作用に対して有効な成分、すなわち活性型蛋白質から構成されると期待できる。したがって、より高比活性なノッチリガンド蛋白質を提供することが可能である。ノッチリガンド蛋白質は多くの幹細胞、未分化細胞の分化を抑制することが知られており、胚性幹細胞、造血幹細胞などのあらゆる幹細胞の体外増幅、分化制御に利用できる。このようにして作製された細胞を患者に移植することにより、各種組織の再生を促す再生医療に用いることができる。例えば、白血病などの根治療法である造血幹細胞移植、パーキンソン病の治療方法である神経幹細胞移植などが挙げられる。

【００３３】

【発明の実施の形態】以下に発明を実施する形態について参考例及び実施例として示すが、必ずしもこれらに限定されるものではない。

【参考例】ヒトジャグドー2 細胞外部分ポリペプチドの作製並びに、ヒトジャグドー2 全長発現ベクターで形質転換した細胞株の作製

本参考例の詳細は国際公開公報WO98/02458に記述されている。また、本参考例で使用したヒトジャグドー2 の全アミノ酸配列をコードするcDNAを含むベクターpUCSR-2を大腸菌JM109 に遺伝子導入した形質転換細胞は、E. coli :JM109-pUCSR-2 として日本国つくば市東１丁目１番３号に所在の通商産業省独立行政法人産業技術総合研究所　特許生物寄託センターに寄託されている。寄託日は平成８年10月28日であり、受託番号はFERM BP-5727である。

【００３４】配列表配列番号２のヒトジャグドー2 の全アミノ酸配列をコードするcDNAを含むベクターpUCSR-2を用い、配列表配列番号１のアミノ酸配列の１から1055のポリペプチドの C末端にFLAG配列をコードするcDNAを付加したキメラタンパク質をコードするcDNAを、発現ベクター pCDNA3 につなぎ、発現ベクターｐJ2exFlagを作製した。また、配列表配列番号２のヒトジャグドー2 の全アミノ酸配列をコードするcDNAを含むベクター pUCSR-2を用い、配列表配列番号２のアミノ酸配列の１から1212のポリペプチドの C末端にFLAG配列をコードするcDNAを付加したキメラタンパク質をコードするcDNAを、発現ベクター pCDNA3 につなぎ、発現ベクター pJ2Flagを作製した。なお、これらベクターはネオマイシン耐性遺伝子を同時に発現するため、G418（インビトロジェン社）にて遺伝子導入細胞を選択することができる。

【００３５】発現ベクター pJ2exFlagは、 CHO-K1 細胞（大日本製薬株式会社より購入可能：ATCC:CCL-61)に、発現ベクター pJ2FlagはBALB3T3 細胞（理化学研究所細胞開発銀行より分与可能。登録番号は RCB0005。もしくはATCC:CCL-163）に各々エレクトロポレーション法にて遺伝子導入し、G418存在下で培養し、限外希釈法にてクローニングをおこなった。これら細胞における、目的の蛋白質発現確認を抗 Flag マウスモノクローナル抗体M2（シグマ・アルドリッチ社製）にてウエスタンブロット法にて行い、発現細胞を各々樹立した。したがって、発現ベクターpJ2exFlag を遺伝子導入したCHO-K1細胞は細胞外ヒトジャグドー2 Flag蛋白質発現CHO-K1細胞（以下、J2ex/CHO細胞という）、発現ベクターpJ2Flag を遺伝子導入したBALB3T3 細胞は全長ヒトジャグドー2Flag蛋白発現BALB3T3 細胞（以下、J2/BALB 細胞という）である。また、同時にpCDNA3ベクターのみ導入したBALB3T3 細胞も同様に作製し、コントロール細胞（以下、Neo/BALB細胞という）として以下の実施例で使用した。

【００３６】この様に作製されたJ2ex/CHO細胞の培養上清から、抗 Flag 抗体M2結合セファロースビーズ（シグマ・アルドリッチ社製）にて作製したアフィニティーカラムを用いて、最終精製細胞外ヒトジャグドー2 Flag蛋白質を得た。また、得られた精製物が目的の分泌型ヒトジャグドー2 Flag蛋白質であることを、SDS-PAGE法、ウエスタンブロット法、N末端アミノ酸配列同定法にて確認を行った。

【００３７】

【実施例１】抗原の免疫並びにハイブリドーマの作製
参考例のごとく作製した細胞外ヒトジャグドー2 Flag蛋白質をPBS(-)に溶液置換を行い、蛋白質濃度が1mg/mlとなるように調整した。免疫を行うラットはWKY/NCrjを用いた。免疫原蛋白質とフロイント完全アジュバント(FCA) をよく混ぜ合わせて完全なエマルジョンを形成させた後、ラットの後肢に１００μｌ注射を行った。

【００３８】その７～10日間後、免疫を行ったラット後肢側の膝窩リンパ節、鼠蹊リンパ節もしくは腸管リンパ節を無菌的に取り出し、はさみ等で切り刻み、ステンレスメッシュで裏ごしした後、遠心分離操作を経て、最終的にリンパ節由来リンパ球を分離した。この様に分離された細胞とミエローマ細胞マウスSP2 細胞（大日本製薬より入手可能）を混合し、次の細胞融合ステップに用いた。

【００３９】リンパ球、ミエローマ細胞混合液にD-MEM培地（インビトロジェン社）を加え、遠心分離(1200rpm、10分間）し、上清を吸引して細胞ペレットにし、タッピングにて細胞をほぐした後、37℃に加温した50％ポリエチレングリコール溶液(5%DMSOを含むD-MEM 培地に溶解したもの）を１分間かけてゆっくりと細胞に1ml 滴下する。その後、２分間ゆっくりと振って混ぜ合わせた後、37℃に加温した D-MEM培地を4.5ml を３分間かけてゆっくりと滴下し混ぜ合わせる。さらに4.5ml のD-MEM培地を 2分間かけて加える。これを遠心分離（900rpm、5 分間）して上清を除去する。この細胞ペレットに HAT培地（10%牛胎児血清添加 GIT培地：和光純薬製にヒポキサンチン 100μM 、アミノプテリン 0.4μM 、チミジン16μM 添加して作製）を36ml添加し、緩やかに懸濁させる。最後にBM-CondimedH1(ロシュ・ダイアグノスティック社）を4ml 加え、この液を96穴プレート４枚に各ウエル100μl づつ分注する。これをCO２　インキュベーターにて培養を行う。６日後、培地を新しい10% BM-CondimedH1を含む HAT培地に交換し、更に２日間培養を行う。この様に96穴プレートに培養したハイブリドーマの中から抗原を認識する抗体を産生している細胞を次の方法で選択した。

【００４０】

【実施例２】ハイブリドーマのフローサイトメーターによる一次スクリーニング
実施例１にて作製した各ハイブリドーマの細胞上清を用いて、参考例で作製したJ2/BALB 細胞への反応性を調べた。すなわち、前もって培養しておいたJ2/BALB 細胞をセルスクレーパーではがし、ピペッティングにて細胞をばらばらにして、10^5個づつ試験管に分けて入れておく。その細胞を、培地にて遠心分離して洗浄後、細胞ペレットとしたものに上記のハイブリドーマ培養上清を加え、細胞をほぐして氷中で１時間置く。その後、5 %牛胎児血清を含むPBS(-)を用いて遠心分離して洗浄し、細胞ペレットとしたものに、山羊抗ラットIgG 抗体フィコエリスリン(PE)標識抗体（サザンバイオテック社）を加えて、30分間氷中で放置後、同様に洗浄し、フローサイトメーターによって抗体の結合の解析を行った。フローサイトメーターは FACS Caliber(BD社）を用いて測定した。このようにしてJ2/BALB 細胞に反応する抗体を産生しているハイブリドーマを選び出した。

【００４１】

【実施例３】ハイブリドーマの免疫沈降法と変性条件下ドットブロット法による二次スクリーニング
実施例２で選択されたハイブリドーマの培養上清を用いて次の実験を行い、二次スクリーニングを行った。

1) 免疫沈降法による選択
ハイブリドーマ細胞培養上清を用いた免疫沈降法にて、未変性のヒトノッチリガンド蛋白質の細胞外部分を認識する抗体を産生しているハイブリドーマを以下のようにして選択した。10cm培養ディシュにて培養を行ったヒトジャグドー2 を高発現するJ2/BALB 細胞及びコントロール細胞 Neo/BALB 細胞をPBS(-)10mlで洗浄し、セルスクレイパー（コースター社製）にて細胞を剥がし、再度PBS(-)を10ml加えて、1500rpm で５分間遠心分離し洗浄した。

【００４２】この細胞沈殿物をセルリシスバッファー［50mM Hepes (pH7.5)、1 %　Triton×100 、10%　グリセロール、4mM EDTA、50μg/ml Aprotinin、100 μM Leupeptin 、25μM PepstatinA、1mM PMSF]　500μl に懸濁し、氷中に20分間放置し、その後、15000rpmで20分間遠心して上清を取り細胞抽出液を得た。

【００４３】こうして得られた細胞抽出液に対して、各種ハイブリドーマ培養上清を加え、同時にProteinGセファロースゲル（アマシャムファルマシア社）を添加して、ゆっくりと撹拌して一晩 4℃にて反応させる。反応後、このセファロースゲルを遠心分離にて洗浄し、その沈殿物を用いて次の抗FLAG抗体を用いたウェスタンブロットにて、ヒトジャグドー2 蛋白質の検出を行った。

【００４４】SDS-PAGE用電気泳動槽及びSDS-PAGE用ポリアクリルアミドゲル（いずれも第一化学薬品社製)(グラジエントゲル５～15%）を用い、添付の取扱い説明書に従ってSDS-PAGEをおこなった。サンプルは上記沈殿物に対して2-MEを加えて５分間の沸騰水浴加熱処理により還元処理を行った。サンプルバッファー、泳動バッファーについては添付の取扱い説明書に従って作製した。SDS-PAGE終了後、アクリルアミドゲルをPVDFメンブランフィルター（BioRad社製）にBioRad社製ミニトランスブロットセルにより転写した。

【００４５】このように作製されたフィルターを４%スキムミルクを含むTBS-T [20mM Tris、137mM NaCl(pH7.6)、0.1 % Tween20] に 4℃で一晩振盪してブロッキングした。ECL ウェスタンブロッティング検出システム（アマシャムファルマシア社製）に添付の説明書に従い、一次抗体としてマウスモノクローナル抗体 Anti-FL

AG M2(シグマ社製）、二次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗マウスIg羊抗体（マシャムファルマシア社製）を反応させた。抗体の反応時間は各々室温で一時間反応させ、各反応間はTBS-T にて10分間室温で振盪洗浄する操作を３回ずつ繰り返した。最後の洗浄後、フィルターをECL ウエスタンブロッティング検出システムの反応液に１分間浸し、ポリ塩化ビニリデンラップに包んでＸ線フィルムに感光させた。

【００４６】その結果、もしはじめに反応させたハイブリドーマ培養上清中に未変性のヒトジャグドー2 蛋白質の細胞外部分を認識する抗体が存在するならば、およそ150Kダルトンのバンドが検出される。この様にして、免疫沈降法によるハイブリドーマの選択をおこなった。

【００４７】2)　変性条件下ドットブロットによる選択
免疫原に用いた細胞外ヒトジャグドー2 Flag蛋白質を還元処理して変性させ、それをハイブリドーマ培養上清中の抗体が認識できないことを指標に以下のようにハイブリドーマの選択を行った。上記1)のSDS-PAGEバッファーの2-MEを加えて５分間の沸騰水浴加熱処理により還元処理を行った変性細胞外ヒトジャグドー2 Flag蛋白質とこの処理を行わなかった未変性細胞外ヒトジャグドー2 Flag蛋白質を各々100ng/μl となるように調整し、ニトロセルロースメンブランフィルター（アマシャムファルマシア社製）に 1μl 滴下して、変性及び未変性蛋白質が固定化されたフィルターを作製した。

【００４８】このように作製されたフィルターを 4%スキムミルクを含む TBS-Tに 4℃一晩振盪してブロッキングした。ECL ウェスタンブロッティング検出システムに添付の説明書に従い、一次抗体としてハイブリドーマの培養上清、二次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗ラットIg羊抗体（ダコ社製）を反応させた。抗体の反応時間は各々室温で一時間反応させ、各反応間はTBS-T にて10分間室温で振盪洗浄する操作を３回ずつ繰り返した。最後の洗浄後、フィルターをECL ウエスタンブロッティング検出システムの反応液に１分間浸し、ポリ塩化ビニリデンラップに包んでＸ線フィルムに感光させた。

【００４９】その結果、未変性蛋白を認識し、変性蛋白質を認識しないハイブリドーマ培養上清を産生しているハイブリドーマを選択した。この結果により、最終的に目的のTS-11 ハイブリドーマが選択された。さらのこの培養上清から定法に従ってモノクローナル抗体、すなわちTS-11 抗体を精製した。

【００５０】

【実施例４】TS-11 抗体を用いたアフィニティーカラムによる未変性ヒトジャグドー2 細胞外蛋白質の精製

実施例３において最終的に樹立された抗未変性ヒトジャ*グドー2 細胞外蛋白質を特異的に認識するラットモノクローナル抗体TS-11を固定化したセファロースゲルを用いたカラムにて未変性ヒトジャグドー2 蛋白質の精製を行った。

【００５１】アフィニティーゲルの作製はアマシャムファルマシア社製 CNBr 活性化 Sepharose4Bにて添付の取扱い説明書にしたがって行った。このゲルの 2mlを2cm ２×1cm のサイズのカラムを作製した。カラムは内径10mmのディスポカラム（バイオラッド社製）を用い、上記ゲルを 5ml充填した。

【００５２】このカラムに対して、参考例で作製したJ2 ex/CHO細胞の培養上清を流して吸着させた。吸着は培地ボトル→カラム→ペリスターポンプ→培地ボトルの環流式回路を組み立て、流速1ml/分で72時間循環させた。その後、カラムをPBS(-)35mlで洗浄し、0.5M Tris-グリシン(pH3.0) 50mlで溶出した。あらかじめ小チューブ（ファルコン社製2063）に0.5M Tris-HCl(pH9.5)を 200μl 分注しておき、溶出液は 2mlずつ25画分をそのチューブに分取し、各々の画分を中和した。

【００５３】この様にして溶出した画分の各10μl は実施例３に記載の還元処理を行い、5-15%濃度勾配ポリアクリルアミドゲルによるSDS-PAGE電気泳動を行い、電気泳動終了後、ワコー銀染キットII (和光純薬社製) を用いて、添付の説明書に従って銀染色を行った。結果として、目的の蛋白質であるヒトジャグドー2 細胞外蛋白質が検出され、このTS-11 抗体を固定化したゲルが期待通り精製に用いることを確認した。

【００５４】さらに、変性ヒトジャグドー2 細胞外蛋白質が吸着しないことを確認するため、細胞培養上清中に2-MEを添加して、変性をおこない同様に上記のカラムに通して精製プロセスを行ったが、溶出画分には一切ヒトジャグドー2 細胞外蛋白質は検出されなかった。したがって、このカラムには変性ヒトジャグドー2 細胞外蛋白質は吸着しない。

【００５５】これらの検討から、本発明のTS-11 抗体は未変性ヒトジャグドー2 細胞外蛋白質を特異的に精製できることがわかる。

【００５６】

【発明の効果】本発明の抗体は未変性のノッチリガンド蛋白質の細胞外部分を特異的に認識することを特徴とする抗体であり、この抗体は、未変性のノッチリガンド蛋白質の精製に用いることができる。また未変性のノッチリガンド蛋白質を測定することによって細胞の分化異常に伴う疾患を検査することができる。

【００５７】

【配列表】

<110>Asahi Kasei Corporation
<120>新規な抗体及びその用途
<130>Ｘ１３－６７１
<150>

<151>
<160>3
<210>1
<211>1055
<212>PRT
<213>homo sapiens
<400>1
Met Gly Tyr Phe Glu Leu Gln Leu Ser Ala
Leu Arg Asn Val Asn Gly
1　　5　　10　　15
Glu Leu Leu Ser Gly Ala Cys Cys Asp Gly
Asp Gly Arg Thr Thr Arg
20　　25　　30
Ala Gly Gly Cys Gly His Asp Glu Cys Asp
Thr Tyr Val Arg Val Cys
35　　40　　45
Leu Lys Glu Tyr Gln Ala Lys Val Thr Pro
Thr Gly Pro Cys Ser Tyr
50　　55　　60
Gly His Gly Ala Thr Pro Val Leu Gly Gly
Asn Ser Phe Tyr Leu Pro
65　　70　　75　　80

Pro Ala Gly Ala Ala Gly Asp Arg Ala Arg
Ala Arg Ala Arg Ala Gly
85　　90　　95
Gly Asp Gln Asp Pro Gly Leu Val Val Ile
Pro Phe Gln Phe Ala Trp
100　　105　　110
Pro Arg Ser Phe Thr Leu Ile Val Glu Ala
Trp Asp Trp Asp Asn Asp
115　　120　　125
Thr Thr Pro Asn Glu Glu Leu Leu Ile Glu
Arg Val Ser His Ala Gly
130　　135　　140
Met Ile Asn Pro Glu Asp Arg Trp Lys Ser
Leu His Phe Ser Gly His
145　　150　　155　　1
60
Val Ala His Leu Glu Leu Gln Ile Arg Val
Arg Cys Asp Glu Asn Tyr
165　　170　　175
Tyr Ser Ala Thr Cys Asn Lys Phe Cys Arg
Pro Arg Asn Asp Phe Phe
180　　185　　190
Gly His Tyr Thr Cys Asp Gln Tyr Gly Asn
Lys Ala Cys Met Asp Gly
195　　200　　205
Trp Met Gly Lys Glu Cys Lys Glu Ala Val
Cys Lys Gln Gly Cys Asn
210　　215　　220
Leu Leu His Gly Gly Cys Thr Val Pro Gly
Glu Cys Arg Cys Ser Tyr

340 345 350
Gly Pro Thr Cys Ala Leu Asp Ile Asp Glu
Cys Ala Ser Asn Pro Cys
355 360 365
Ala Ala Gly Gly Thr Cys Val Asp Gln Val
Asp Gly Phe Glu Cys Ile
370 375 380
Cys Pro Glu Gln Trp Val Gly Ala Thr Cys
Gln Leu Asp Ala Asn Glu
385 390 395 4
00
Cys Glu Gly Lys Pro Cys Leu Asn Ala Phe
Ser Cys Lys Asn Leu Ile
405 410 415
Gly Gly Tyr Tyr Cys Asp Cys Ile Pro Gly
Trp Lys Gly Ile Asn Cys
420 425 430
His Ile Asn Val Asn Asp Cys Arg Gly Gln
Cys Gln His Gly Gly Thr
435 440 445
Cys Lys Asp Leu Val Asn Gly Tyr Gln Cys
Val Cys Pro Arg Gly Phe
450 455 460
Gly Gly Arg His Cys Glu Leu Glu Arg Asp
Lys Cys Ala Ser Ser Pro
465 470 475 4
80
Cys His Ser Gly Gly Leu Cys Glu Asp Leu
Ala Asp Gly Phe His Cys
485 490 495
His Cys Pro Gln Gly Phe Ser Gly Pro Leu
Cys Glu Val Asp Val Asp
500 505 510
Leu Cys Glu Pro Ser Pro Cys Arg Asn Gly
Ala Arg Cys Tyr Asn Leu
515 520 525
Glu Gly Asp Tyr Tyr Cys Ala Cys Pro Asp
Asp Phe Gly Gly Lys Asn
530 535 540
Cys Ser Val Pro Arg Glu Pro Cys Pro Gly
Gly Ala Cys Arg Val Ile
545 550 555 5
60
Asp Gly Cys Gly Ser Asp Ala Gly Pro Gly
Met Pro Gly Thr Ala Ala
565 570 575
Ser Gly Val Cys Gly Pro His Gly Arg Cys
Val Ser Gln Pro Gly Gly
580 585 590
Asn Phe Ser Cys Ile Cys Asp Ser Gly Phe
Thr Gly Thr Tyr Cys His
595 600 605
Glu Asn Ile Asp Asp Cys Leu Gly Gln Pro

740 745 750
Asp Gly Trp Glu Gly Arg Thr Cys Thr His
Asn Thr Asn Asp Cys Asn
755 760 765
Pro Leu Pro Cys Tyr Asn Gly Gly Ile Cys
Val Asp Gly Val Asn Trp
770 775 780
Phe Arg Cys Glu Cys Ala Pro Gly Phe Ala
Gly Pro Asp Cys Arg Ile
785 790 795 8
00
Asn Ile Asp Glu Cys Gln Ser Ser Pro Cys
Ala Tyr Gly Ala Thr Cys
805 810 815
Val Asp Glu Ile Asn Gly Tyr Arg Cys Ser
Cys Pro Pro Gly Arg Ala
820 825 830
Gly Pro Arg Cys Gln Glu Val Ile Gly Phe
Gly Arg Ser Cys Trp Ser
835 840 845
Arg Gly Thr Pro Phe Pro His Gly Ser Ser
Trp Val Glu Asp Cys Asn
850 855 860
Ser Cys Arg Cys Leu Asp Gly Arg Arg Asp
Cys Ser Lys Val Trp Cys
865 870 875 8
80
Gly Trp Lys Pro Cys Leu Leu Ala Gly Gln
Pro Glu Ala Leu Ser Ala
885 890 895
Gln Cys Pro Leu Gly Gln Arg Cys Leu Glu
Lys Ala Pro Gly Gln Cys
900 905 910
Leu Arg Pro Pro Cys Glu Ala Trp Gly Glu
Cys Gly Ala Glu Glu Pro
915 920 925
Pro Ser Thr Pro Cys Leu Pro Arg Ser Gly
His Leu Asp Asn Asn Cys
930 935 940
Ala Arg Leu Thr Leu His Phe Asn Arg Asp
His Val Pro Gln Gly Thr
945 950 955 9
60
Thr Val Gly Ala Ile Cys Ser Gly Ile Arg
Ser Leu Pro Ala Thr Arg
965 970 975
Ala Val Ala Arg Asp Arg Leu Leu Val Leu
Leu Cys Asp Arg Ala Ser
980 985 990
Ser Gly Ala Ser Ala Val Glu Val Ala Val
Ser Phe Ser Pro Ala Arg
995 1000 1005
Asp Leu Pro Asp Ser Ser Leu Ile Gln Gly

Leu Lys Glu Tyr Gln Ala Lys Val Thr Pro
Thr Gly Pro Cys Ser Tyr
50 55 60
Gly His Gly Ala Thr Pro Val Leu Gly Gly
Asn Ser Phe Tyr Leu Pro
65 70 75 80

Pro Ala Gly Ala Ala Gly Asp Arg Ala Arg
Ala Arg Ala Arg Ala Gly
85 90 95
Gly Asp Gln Asp Pro Gly Leu Val Val Ile
Pro Phe Gln Phe Ala Trp
100 105 110
Pro Arg Ser Phe Thr Leu Ile Val Glu Ala
Trp Asp Trp Asp Asn Asp
115 120 125
Thr Thr Pro Asn Glu Glu Leu Leu Ile Glu
Arg Val Ser His Ala Gly
130 135 140
Met Ile Asn Pro Glu Asp Arg Trp Lys Ser
Leu His Phe Ser Gly His
145 150 155 1
60
Val Ala His Leu Glu Leu Gln Ile Arg Val
Arg Cys Asp Glu Asn Tyr
165 170 175
Tyr Ser Ala Thr Cys Asn Lys Phe Cys Arg
Pro Arg Asn Asp Phe Phe
180 185 190
Gly His Tyr Thr Cys Asp Gln Tyr Gly Asn
Lys Ala Cys Met Asp Gly
195 200 205
Trp Met Gly Lys Glu Cys Lys Glu Ala Val
Cys Lys Gln Gly Cys Asn
210 215 220
Leu Leu His Gly Gly Cys Thr Val Pro Gly
Glu Cys Arg Cys Ser Tyr
225 15 230 235 2
40
Gly Trp Thr Gly Arg Phe Cys Ile Asp Gly
Cys Pro Ser Pro Gly Cys
355 245 360 250 365 255
Val Ala Gly Ser Thr Val Glu Asp Trp Val
Cys Asn Phe Glu Thr Ile
370 260 375 265 380 270
Trp Pro Gly Gln Trp Val Asp Ala Thr Cys
Asn Leu Cys Gly Asn Gln
385 275 390 280 395 285 4
00
His Pro Cys Thr Asn Gly Gly Thr Cys Ile
Cys Glu Gly Pro Asp Gln Leu Asn Ala Phe
Ser Cys Lys Asn Leu Ile 295 300
Tyr Arg Cys Thr Cys Pro Asp Gly Tyr Ser 415
Gly Arg Tyr Cys Gly Asp Cys Ile Pro Gly

435 440 445
Cys Lys Asp Leu Val Asn Gly Tyr Gln Cys
Val Cys Pro Arg Gly Phe
450 455 460
Gly Gly Arg His Cys Glu Leu Glu Arg Asp
Lys Cys Ala Ser Ser Pro
465 470 475 4
80
Cys His Ser Gly Gly Leu Cys Glu Asp Leu
Ala Asp Gly Phe His Cys
485 490 495
His Cys Pro Gln Gly Phe Ser Gly Pro Leu
Cys Glu Val Asp Val Asp
500 505 510
Leu Cys Glu Pro Ser Pro Cys Arg Asn Gly
Ala Arg Cys Tyr Asn Leu
515 520 525
Glu Gly Asp Tyr Tyr Cys Ala Cys Pro Asp
Asp Phe Gly Gly Lys Asn
530 535 540
Cys Ser Val Pro Arg Glu Pro Cys Pro Gly
Gly Ala Cys Arg Val Ile
545 550 555 5
60
Asp Gly Cys Gly Ser Asp Ala Gly Pro Gly
Met Pro Gly Thr Ala Ala
565 570 575
Ser Gly Val Cys Gly Pro His Gly Arg Cys
Val Ser Gln Pro Gly Gly
580 585 590
Asn Phe Ser Cys Ile Cys Asp Ser Gly Phe
Thr Gly Thr Tyr Cys His
595 600 605
Glu Asn Ile Asp Asp Cys Leu Gly Gln Pro
Cys Arg Asn Gly Gly Thr
610 615 620
Cys Ile Asp Glu Val Asp Ala Phe Arg Cys
Phe Cys Pro Ser Gly Trp
625 630 635 6
40
Glu Gly Glu Leu Cys Asp Thr Asn Pro Asn
Asp Cys Leu Pro Asp Pro
645 650 655
Cys His Ser Arg Gly Arg Cys Tyr Asp Leu
Val Asn Asp Phe Tyr Cys
660 665 670
Ala Cys Asp Asp Gly Trp Lys Gly Lys Thr
Cys His Ser Arg Glu Phe
675 680 685
Gln Cys Asp Ala Tyr Thr Cys Ser Asn Gly
Gly Thr Cys Tyr Asp Ser
690 695 700
Gly Asp Thr Phe Arg Cys Ala Cys Pro Pro

835 840 845
Arg Gly Thr Pro Phe Pro His Gly Ser Ser
Trp Val Glu Asp Cys Asn
850 855 860
Ser Cys Arg Cys Leu Asp Gly Arg Arg Asp
Cys Ser Lys Val Trp Cys
865 870 875 8
80
Gly Trp Lys Pro Cys Leu Leu Ala Gly Gln
Pro Glu Ala Leu Ser Ala
885 890 895
Gln Cys Pro Leu Gly Gln Arg Cys Leu Glu
Lys Ala Pro Gly Gln Cys
900 905 910
Leu Arg Pro Pro Cys Glu Ala Trp Gly Glu
Cys Gly Ala Glu Glu Pro
915 920 925
Pro Ser Thr Pro Cys Leu Pro Arg Ser Gly
His Leu Asp Asn Asn Cys
930 935 940
Ala Arg Leu Thr Leu His Phe Asn Arg Asp
His Val Pro Gln Gly Thr
945 950 955 9
60
Thr Val Gly Ala Ile Cys Ser Gly Ile Arg
Ser Leu Pro Ala Thr Arg
965 970 975
Ala Val Ala Arg Asp Arg Leu Leu Val Leu
Leu Cys Asp Arg Ala Ser
980 985 990
Ser Gly Ala Ser Ala Val Glu Val Ala Val
Ser Phe Ser Pro Ala Arg
995 1000 1005
Asp Leu Pro Asp Ser Ser Leu Ile Gln Gly
Ala Ala His Ala Ile Val
1010 1015 1020
Ala Ala Ile Thr Gln Arg Gly Asn Ser Ser
Leu Leu Leu Ala Val Thr
1025 1030 1035
1040
Glu Val Lys Val Glu Thr Val Val Thr Gly
Gly Ser Ser Thr Gly Leu
1045 1050 105
5
Leu Val Pro Val Leu Cys Gly Ala Phe Ser
Val Leu Trp Leu Ala Cys
1060 1065 1070
Val Val Leu Cys Val Trp Trp Thr Arg Lys
Arg Arg Lys Glu Arg Glu
1075 1080 1085
Arg Ser Arg Leu Pro Arg Glu Glu Ser Ala
Asn Asn Gln Trp Ala Pro
1090 1095 1100

<213>homo sapiens
<400>3
t cgcgggggca atg cgg gcg cag ggc
cgg ggg cgc ctt ccc 41
Met Arg Ala Gln Gly Arg Gl
y Arg Leu Pro
-26 -25 -20
cgg cgg ctg ctg ctg ctg ctg gcg ctc tgg
gtg cag gcg gcg cgg ccc 89
Arg Arg Leu Leu Leu Leu Leu Ala Leu Trp
Val Gln Ala Ala Arg Pro
-15 -10 -5 -
1
atg ggc tat ttc gag ctg cag ctg agc gcg
ctg cgg aac gtg aac ggg 137
Met Gly Tyr Phe Glu Leu Gln Leu Ser Ala
Leu Arg Asn Val Asn Gly
1 5 10 15
gag ctg ctg agc ggc gcc tgc tgt gac ggc
gac ggc cgg aca acg cgc 185
Glu Leu Leu Ser Gly Ala Cys Cys Asp Gly
Asp Gly Arg Thr Thr Arg
20 25 30
gcg ggg ggc tgc ggc cac gac gag tgc gac
acg tac gtg cgc gtg tgc 233
Ala Gly Gly Cys Gly His Asp Glu Cys Asp
Thr Tyr Val Arg Val Cys
35 40 45
ctt aag gag tac cag gcc aag gtg acg ccc
acg ggg ccc tgc agc tac 281
Leu Lys Glu Tyr Gln Ala Lys Val Thr Pro
Thr Gly Pro Cys Ser Tyr
50 55 60
ggc cac ggc gcc acg ccc gtg ctg ggc ggc
aac tcc ttc tac ctg ccg 329
Gly His Gly Ala Thr Pro Val Leu Gly Gly
Asn Ser Phe Tyr Leu Pro
65 70 75 80

ccg gcg ggc gct gcg ggg gac cga gcg cgg
gcg cgg gcc cgg gcc ggc 377
Pro Ala Gly Ala Ala Gly Asp Arg Ala Arg
Ala Arg Ala Arg Ala Gly
85 90 95
ggc gac cag gac ccg ggc ctc gtc gtc atc
ccc ttc cag ttc gcc tgg 425
Gly Asp Gln Asp Pro Gly Leu Val Val Ile
Pro Phe Gln Phe Ala Trp
100 105 110
ccg cgc tcc ttt acc ctc atc gtg gag gcc
tgg gac tgg gac aac gat 473
Pro Arg Ser Phe Thr Leu Ile Val Glu Ala
Trp Asp Trp Asp Asn Asp

ttg ctc cac ggg gga tgc acc gtg cct ggg
gag tgc agg tgc agc tac　809
Leu Leu His Gly Gly Cys Thr Val Pro Gly
Glu Cys Arg Cys Ser Tyr
225　230　235　2
40
ggc tgg caa ggg agg ttc tgc gat gag tgt
gtc ccc tac ccc ggc tgc　857
Gly Trp Gln Gly Arg Phe Cys Asp Glu Cys
Val Pro Tyr Pro Gly Cys
245　250　255
gtg cat ggc agt tgt gtg gag ccc tgg cag
tgc aac tgt gag acc aac　905
Val His Gly Ser Cys Val Glu Pro Trp Gln
Cys Asn Cys Glu Thr Asn
260　265　270
tgg ggc ggc ctg ctc tgt gac aaa gac ctg
aac tac tgt ggc agc cac　953
Trp Gly Gly Leu Leu Cys Asp Lys Asp Leu
Asn Tyr Cys Gly Ser His
275　280　285
cac ccc tgc acc aac gga ggc acg tgc atc
aac gcc gag cct gac cag　1001
His Pro Cys Thr Asn Gly Gly Thr Cys Ile
Asn Ala Glu Pro Asp Gln
290　295　300
tac cgc tgc acc tgc cct gac ggc tac tcg
ggc agg aac tgt gag aag　1049
Tyr Arg Cys Thr Cys Pro Asp Gly Tyr Ser
Gly Arg Asn Cys Glu Lys
305　310　315　3
20
gct gag cac gcc tgc acc tcc aac ccg tgt
gcc aac ggg ggc tct tgc　1097
Ala Glu His Ala Cys Thr Ser Asn Pro Cys
Ala Asn Gly Gly Ser Cys
325　330　335
cat gag gtg ccg tcc ggc ttc gaa tgc cac
tgc cca tcg ggc tgg agc　1145
His Glu Val Pro Ser Gly Phe Glu Cys His
Cys Pro Ser Gly Trp Ser
340　345　350
ggg ccc acc tgt gcc ctt gac atc gat gag
tgt gct tcg aac ccg tgt　1193
Gly Pro Thr Cys Ala Leu Asp Ile Asp Glu
Cys Ala Ser Asn Pro Cys
355　360　365
gcg gcc ggt ggc acc tgt gtg gac cag gtg
gac ggc ttt gag tgc atc　1241
Ala Ala Gly Gly Thr Cys Val Asp Gln Val
Asp Gly Phe Glu Cys Ile
370　375　380
tgc ccc gag cag tgg gtg ggg gcc acc tgc

485 490 495
cac tgc ccc cag ggc ttc tcc ggg cct ctc
tgt gag gtg gat gtc gac 1625
His Cys Pro Gln Gly Phe Ser Gly Pro Leu
Cys Glu Val Asp Val Asp
500 505 510
ctt tgt gag cca agc ccc tgc cgg aac ggc
gct cgc tgc tat aac ctg 1673
Leu Cys Glu Pro Ser Pro Cys Arg Asn Gly
Ala Arg Cys Tyr Asn Leu
515 520 525
gag ggt gac tat tac tgc gcc tgc cct gat
gac ttt ggt ggc aag aac 1721
Glu Gly Asp Tyr Tyr Cys Ala Cys Pro Asp
Asp Phe Gly Gly Lys Asn
530 535 540
tgc tcc gtg ccc cgc gag ccg tgc cct ggc
ggg gcc tgc aga gtg atc 1769
Cys Ser Val Pro Arg Glu Pro Cys Pro Gly
Gly Ala Cys Arg Val Ile
545 550 555 5
60
gat ggc tgc ggg tca gac gcg ggg cct ggg
atg cct ggc aca gca gcc 1817
Asp Gly Cys Gly Ser Asp Ala Gly Pro Gly
Met Pro Gly Thr Ala Ala
565 570 575
tcc ggc gtg tgt ggc ccc cat gga cgc tgc
gtc agc cag cca ggg ggc 1865
Ser Gly Val Cys Gly Pro His Gly Arg Cys
Val Ser Gln Pro Gly Gly
580 585 590
aac ttt tcc tgc atc tgt gac agt ggc ttt
act ggc acc tac tgc cat 1913
Asn Phe Ser Cys Ile Cys Asp Ser Gly Phe
Thr Gly Thr Tyr Cys His
595 600 605
gag aac att gac gac tgc ctg ggc cag ccc
tgc cgc aat ggg ggc aca 1961
Glu Asn Ile Asp Asp Cys Leu Gly Gln Pro
Cys Arg Asn Gly Gly Thr
610 615 620
tgc atc gat gag gtg gac gcc ttc cgc tgc
ttc tgc ccc agc ggc tgg 2009
Cys Ile Asp Glu Val Asp Ala Phe Arg Cys
Phe Cys Pro Ser Gly Trp
625 630 635 6
40
gag ggc gag ctc tgc gac acc aat ccc aac
gac tgc ctt ccc gat ccc 2057
Glu Gly Glu Leu Cys Asp Thr Asn Pro Asn
Asp Cys Leu Pro Asp Pro
645 650 655

Asp Gly Trp Glu Gly Arg Thr Cys Thr His
Asn Thr Asn Asp Cys Asn
755　　760　　765
cct ctg cct tgc tac aat ggt ggc atc tgt
gtt gac ggc gtc aac tgg　2441
Pro Leu Pro Cys Tyr Asn Gly Gly Ile Cys
Val Asp Gly Val Asn Trp
770　　775　　780
ttc cgc tgc gag tgt gca cct ggc ttc gcg
ggg cct gac tgc cgc atc　2489
Phe Arg Cys Glu Cys Ala Pro Gly Phe Ala
Gly Pro Asp Cys Arg Ile
785　　790　　795　　8
00
aac atc gac gag tgc cag tcc tcg ccc tgt
gcc tac ggg gcc acg tgt　2537
Asn Ile Asp Glu Cys Gln Ser Ser Pro Cys
Ala Tyr Gly Ala Thr Cys
805　　810　　815
gtg gat gag atc aac ggg tat cgc tgt agc
tgc cca ccc ggc cga gcc　2585
Val Asp Glu Ile Asn Gly Tyr Arg Cys Ser
Cys Pro Pro Gly Arg Ala
820　　825　　830
ggc ccc cgg tgc cag gaa gtg atc ggg ttc
ggg aga tcc tgc tgg tcc　2633
Gly Pro Arg Cys Gln Glu Val Ile Gly Phe
Gly Arg Ser Cys Trp Ser
835　　840　　845
cgg ggc act ccg ttc cca cac gga agc tcc
tgg gtg gaa gac tgc aac　2681
Arg Gly Thr Pro Phe Pro His Gly Ser Ser
Trp Val Glu Asp Cys Asn
850　　855　　860
agc tgc cgc tgc ctg gat ggc cgc cgt gac
tgc agc aag gtg tgg tgc　2729
Ser Cys Arg Cys Leu Asp Gly Arg Arg Asp
Cys Ser Lys Val Trp Cys
865　　870　　875　　8
80
gga tgg aag cct tgt ctg ctg gcc ggc cag
ccc gag gcc ctg agc gcc　2777
Gly Trp Lys Pro Cys Leu Leu Ala Gly Gln
Pro Glu Ala Leu Ser Ala
885　　890　　895
cag tgc cca ctg ggg caa agg tgc ctg gag
aag gcc cca ggc cag tgt　2825
Gln Cys Pro Leu Gly Gln Arg Cys Leu Glu
Lys Ala Pro Gly Gln Cys
900　　905　　910
ctg cga cca ccc tgt gag gcc tgg ggg gag
tgc ggc gca gaa gag cca　2873
Leu Arg Pro Pro Cys Glu Ala Trp Gly Glu

gcc gcc atc acc cag cgg ggg aac agc tca
ctg ctc ctg gct gtc acc 3209
Ala Ala Ile Thr Gln Arg Gly Asn Ser Ser
Leu Leu Leu Ala Val Thr
1025 1030 1035
1040
gag gtc aag gtg gag acg gtt gtt acg ggc
ggc tct tcc aca ggt ctg 3257
Glu Val Lys Val Glu Thr Val Val Thr Gly
Gly Ser Ser Thr Gly Leu
1045 1050 105
5
ctg gtg cct gtg ctg tgt ggt gcc ttc agc
gtg ctg tgg ctg gcg tgc 3305
Leu Val Pro Val Leu Cys Gly Ala Phe Ser
Val Leu Trp Leu Ala Cys
1060 1065 1070
gtg gtc ctg tgc gtg tgg tgg aca cgc aag
cgc agg aaa gag cgg gag 3353
Val Val Leu Cys Val Trp Trp Thr Arg Lys
Arg Arg Lys Glu Arg Glu
1075 1080 1085
agg agc cgg ctg ccg cgg gag gag agc gcc
aac aac cag tgg gcc ccg 3401
Arg Ser Arg Leu Pro Arg Glu Glu Ser Ala
Asn Asn Gln Trp Ala Pro
1090 1095 1100
ctc aac ccc atc cgc aac ccc atc gag cgg
ccg ggg ggc cac aag gac 3449
Leu Asn Pro Ile Arg Asn Pro Ile Glu Arg
Pro Gly Gly His Lys Asp
1105 1110 1115
1120
gtg ctc tac cag tgc aag aac ttc acg ccg
ccg ccg cgc agg gcg gac 3497
Val Leu Tyr Gln Cys Lys Asn Phe Thr Pro
Pro Pro Arg Arg Ala Asp
1125 1130 113
5
gag gcg ctg ccc ggg ccg gcc ggc cac gcg
gcc gtc agg gag gat gag 3545
Glu Ala Leu Pro Gly Pro Ala Gly His Ala
Ala Val Arg Glu Asp Glu
1140 1145 1150
gag gac gag gat ctg ggc cgc ggt gag gag
gac tcc ctg gag gcg gag 3593
Glu Asp Glu Asp Leu Gly Arg Gly Glu Glu
Asp Ser Leu Glu Ala Glu
1155 1160 1165
aag ttc ctc tca cac aaa ttc acc aaa gat
cct ggc cgc tcg ccg ggg 3641
Lys Phe Leu Ser His Lys Phe Thr Lys Asp
Pro Gly Arg Ser Pro Gly

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]	識別記号	ＦＩ		テーマコード(参考)
Ｃ１２Ｎ　5/06		Ｇ０１Ｎ　33/577	Ｂ	
Ｇ０１Ｎ　33/53		Ｃ１２Ｐ　21/08		
		Ｃ１２Ｎ　15/00	ＺＮＡＡ	
33/577			Ｆ	
// Ｃ１２Ｐ　21/08		5/00	Ｅ	

Ｆターム(参考)　4B024 AA11 BA53 CA04 DA02 GA03 GA14 HA04
4B029 AA27 BB17 CC03
4B064 AG20 AG27 CA10 CA19 CA20 CC24 DA13 DA16
4B065 AA91X AA92X AA93Y AB01 AB05 AC14 BA02 BA08 CA24 CA25 CA46 CA60
4H045 AA11 CA40 DA76 EA54 EA61 FA72

专利名称(译)	新型抗体及其用途		
公开(公告)号	JP2003047470A	公开(公告)日	2003-02-18
申请号	JP2001233284	申请日	2001-08-01
[标]申请(专利权)人(译)	旭化成工业株式会社		
申请(专利权)人(译)	旭化成株式会社		
[标]发明人	坂野誠治 三宅健介		
发明人	坂野 誠治 三宅 健介		
IPC分类号	G01N33/53 C07K1/22 C07K16/28 C12M1/00 C12N5/07 C12N5/0793 C12N15/09 C12P21/08 G01N33/577 C12N5/06		
FI分类号	C07K1/22 C07K16/28 C12M1/00.A G01N33/53.D G01N33/53.Y G01N33/577.B C12P21/08 C12N15/00.ZNA.A C12N15/00.F C12N5/00.E C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N15/09.200 C12N5/00.202.S C12N5/00.202.Z C12N5/07 C12N5/0793		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA53 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/GA03 4B024/GA14 4B024/HA04 4B029/AA27 4B029/BB17 4B029/CC03 4B064/AG20 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4B064/DA16 4B065/AA91X 4B065/AA92X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA08 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA46 4B065/CA60 4H045/AA11 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA54 4H045/EA61 4H045/FA72		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种特异性识别天然Notch配体细胞外部分蛋白的抗体。 解决方案：天然Notch配体细胞外蛋白和变性的Notch配体细胞外蛋白被特异性识别天然Notch配体细胞外部分蛋白的抗体分开。 只能纯化预期具有更高生理活性的天然Notch配体蛋白，并且只能选择性地检测具有生理活性的Notch配体。