



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2011117237/10, 30.09.2009

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
30.09.2009

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
01.10.2008 US 61/101,917

(43) Дата публикации заявки: 10.11.2012 Бюл. № 31

(45) Опубликовано: 10.04.2016 Бюл. № 10

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: WO 2008057144 A2, 15.05.2008. WO 2008091641 A2, 31.07.2008. GORDON W.R. et al., Structural basis for autoinhibition of Notch, Nature Structural & Molecular Biology, 2007, vol.14 no.4, pp.295-300. LI KANG et al., Modulation of Notch signaling by antibodies specific for the extracellular negative regulatory region of NOTCH3, JOURNAL OF BIOLOGICAL (см. прод.)

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 03.05.2011

(86) Заявка РСТ:
US 2009/059028 (30.09.2009)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2010/039832 (08.04.2010)

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, строение 3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры"

(72) Автор(ы):

**СИБЕЛ Кристиан В. (US),
ВУ Янь (US)**

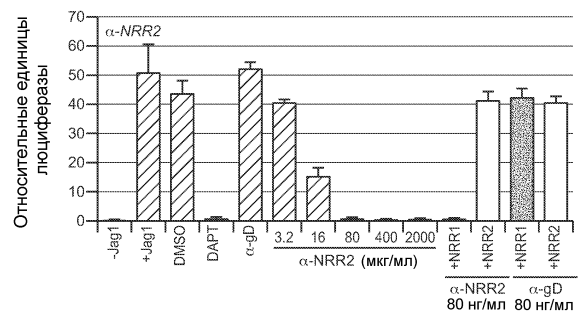
(73) Патентообладатель(и):

ДЖЕНЕНТЕК, ИНК. (US)**(54) АНТИТЕЛА ПРОТИВ NOTCH2 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биохимии, в частности к антителам, которые связывают Notch2. Заявлены моноклональные антитела, которые специфически связываются с доменом Lin12/Notch Repeat (LNR)-А и доменом гетеродимеризации (HD)-С отрицательной регуляторной области (NRR) Notch2 и ингибируют передачу сигнала Notch2. Также изобретение

относится к способам применения этих антител. Изобретение позволяет использовать антитела, связывающие Notch2, для лечения нарушения, ассоциированного с повышенной экспрессией или передачей сигнала Notch2, такого как злокачественная опухоль. 9 н. и 28 з.п. ф-лы, 47 ил., 1 табл.



Фиг. 10В

(56) (продолжение):

CHEMISTRY, March 21, 2008, vol.283, no.12, pp.8046-8054. РОЙТ А., БРОСТОФФ ДЖ., МЕЙЛ Д.
Иммунология: Пер с англ. - М.: Мир, 2000. - 592 с.

R U 2 5 8 0 0 2 9 C 2

R U 2 5 8 0 0 2 9 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 580 029** (13) **C2**

(51) Int. Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: **2011117237/10, 30.09.2009**

(24) Effective date for property rights:
30.09.2009

Priority:

(30) Convention priority:
01.10.2008 US 61/101,917

(43) Application published: **10.11.2012** Bull. № 31

(45) Date of publication: **10.04.2016** Bull. № 10

(85) Commencement of national phase: **03.05.2011**

(86) PCT application:
US 2009/059028 (30.09.2009)

(87) PCT publication:
WO 2010/039832 (08.04.2010)

Mail address:

**129090, Moskva, ul. B. Spasskaja, 25, stroenie 3,
OOO "JUrIdicheskaja firma Gorodisskij i Partnery"**

(72) Inventor(s):

**SIBEL Kristian V. (US),
VU JAn (US)**

(73) Proprietor(s):

DZHENENTEK, INK. (US)

(54) ANTIBODIES AGAINST NOTCH2 AND METHODS FOR APPLICATION THEREOF

(57) Abstract:

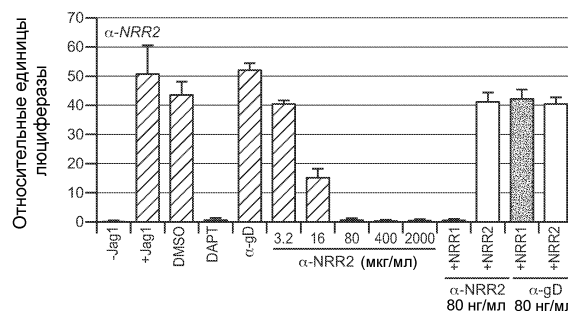
FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: invention relates to field of biochemistry, in particular to Notch2-binding antibodies. Claimed are monoclonal antibodies, which specifically bind with domain Lin12/Notch Repeat (LNR)-A and domain of heterodimerisation (HD)-C of Notch2 negative regulatory region (NRR) and inhibit transmission of Notch2 signal. The invention also relates to method of applying said antibodies.

EFFECT: invention makes it possible to use Notch2-binding antibodies for treating disease, associated with higher expression or transmission of Notch2 signal,

such as malignant tumour.

37 cl, 47 dwg, 1 tbl



Фиг. 10В

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННУЮ ЗАЯВКУ

По данной заявке испрашивается приоритет предварительной заявки США No. 61/101917, поданной 1 октября 2008 года, содержание которой включено в настоящий документ в качестве ссылки в полном объеме.

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится, главным образом, к области молекулярной биологии. Более конкретно, изобретение относится к антителам против Notch, в том числе к антителам против отрицательной регуляторной области (NRR) Notch2, и к их применению. Также представлены антитела против NRR Notch1 и способы их

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Семейство рецепторов Notch представляет собой класс эволюционно консервативных трансмембранных рецепторов, которые передают сигналы, влияющие на развитие организмов, настолько разнообразных, как морские ежи и человек. Рецепторы Notch и их лиганды, Delta и Serrate (у млекопитающих известных как Jagged), представляют собой трансмембранные белки с крупными внеклеточными доменами, которые содержат подобные эпидермальному фактору роста (EGF) повторы. Количество паралогов Notch отличается между видами. Например, существует четыре рецептора Notch у млекопитающих (Notch1-Notch4), два у *Caenorhabditis elegans* (LIN-12 и GLP-1) и один у *Drosophila melanogaster* (Notch). Также рецепторы Notch в процессе транспорта к поверхности клетки подвергаются протеолитическому процессингу фурин-подобной протеазой в участке S1 на N-концевой стороне трансмембранного домена, с образованием внеклеточной субъединицы Notch (ECN) и трансмембранной субъединицы Notch (NTM). Эти две субъединицы остаются нековалентно связанными и формируют зрелый гетеродимерный рецептор клеточной поверхности. Рецепторы Notch и каскад передачи сигнала Notch рассмотрены, например, в Aster et al., Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis. 3:587-613, 2008, и Bolos et al., Endocrine Reviews 28:339-363, 2007.

Субъединицы Notch2 ECN содержат 36 N-концевых EGF-подобных повторов, за которыми следуют три tandemно повторяющихся модуля Lin 12/Notch Repeat (LNR), которые предшествуют участку S1. Каждый модуль LNR содержит три дисульфидных связи и группу консервативных кислотных и полярных остатков, которые, как предполагают, координируют ион кальция. В области EGF-повтора находятся связывающие участки для активирующих лигандов.

Notch2 NTM содержит внеклеточную область (которая содержит участок расщепления S2), трансмембранный сегмент (который содержит участок расщепления S3) и крупную внутриклеточную часть, которая включает домен RAM23, шесть анкириновых повторов, домен трансактивации и С-концевую последовательность PEST. Стабильная ассоциация субъединиц ECN и NTM зависит от домена гетеродимеризации (HD), содержащего С-конец ECN (называемый HD-N) и внеклеточный N-конец NTM (называемый HD-C).

Перед индуцируемой лигандом активацией Notch поддерживается в покоящейся конформации с помощью отрицательной регуляторной области (NRR), которая содержит три LNR и HD-домен. Кристаллическая структура NRR Notch2 описана в Gordon et al, (2007) Nature Structural & Molecular Biology 14:295-300, 2007.

Связывание лиганда Notch с субъединицей ECN инициирует два последовательных протеолитических расщепления, которые происходят путем регулируемого внутримембранного протеолиза. Первое расщепление металлопротеиназой (ADAM17) в участке S2 делает трансмембранную субъединицу Notch чувствительной ко второму расщеплению в участке S3 вблизи внутреннего слоя плазматической мембраны.

Расщепление в участке S3, которое катализируется мультибелковым комплексом, содержащим пресенилин и никастрин и стимулирующим активность γ -секретазы, высвобождает внутриклеточную часть трансмембранной субъединицы Notch, позволяя ей перемещаться в ядро и активировать транскрипцию генов-мишеней. (Для обзора протеолитического расщепления Notch, см., например, Sisodia et al., *Nat. Rev. Neurosci.* 3:281-290, 2002.)

У человека идентифицировано пять лигандов Notch классов Jagged и Delta-подобных белков (Jagged1 (также называемый Serrate1), Jagged2 (также называемый Serrate2), Delta-подобный 1 (также называемый DLL1), Delta-подобный 3 (также называемый DLL3) и Delta-подобный 4 (также называемый DLL4)). Каждый из этих лигандов представляет собой однократно пронизывающий мембрану трансмембранный белок с консервативным N-концевым мотивом Delta, Serrate, LAG-2 (DSL), необходимым для связывания Notch. Серии EGF-подобных модулей, находящихся со стороны С-конца мотива DSL, предшествуют трансмембранному сегменту. В отличие от рецепторов Notch, лиганды имеют на С-конце короткие цитоплазматические хвостовые части из 70-215 аминокислот. Кроме того, описаны другие типы лигандов (например, DNER, NB3 и F3/контактин). (Для обзора лигандов Notch и опосредуемой лигандами активации Notch, см., например, D'Souza et al., *Oncogene* 27:5148-5167, 2008.)

Каскад Notch функционирует в ходе различных связанных с развитием и физиологических процессов, включая процессы, влияющие на нейрогенез у мух и позвоночных. Как правило, передача сигнала Notch вовлечена в латеральное ингибирование, определение направления дифференцировки и установление границ между группами клеток (см., например, Bray, *Molecular Cell Biology* 7:678-679, 2006). Было показано, что множество заболеваний человека, включая злокачественные опухоли и нейродегенеративные нарушения, являются следствием мутаций в генах, кодирующих рецепторы Notch или их лиганды (см., например, Nam et al., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6:501-509, 2002). Связь между неограниченной передачей сигнала Notch и злокачественной опухолью впервые была признана, когда была идентифицирована рекуррентная t(7;9)(q34;q34,3) хромосомная транслокация, которая приводит к укороченному конститутивно активному варианту Notch1 человека в подгруппе острых лимфобластных лейкозов (Т-ALL) человека (см., например, Aster et al., *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 3:587-613, 2008). В моделях на мышах было показано, что передача сигнала Notch1 является необходимой для развития Т-клеток и что опосредуемые Notch1 сигналы стимулируют развитие Т-клеток за счет развития В-клеток (см., например, Wilson et al., *J. Exp. Med.* 194:1003-1012, 2001).

Notch2 также вовлечен в некоторые злокачественные опухоли. В частности, Notch2 сверхэкспрессируется при В-клеточном хроническом лимфоцитарном лейкозе (В-CLL), что в свою очередь приводит к сверхэкспрессии CD23, характерного признака клеток В-CLL. (См. Hubmann et al., *Blood* 99:3742-3747, 2002.) Как Notch1, так и Notch2, высоко экспрессируются в клетках множественной миеломы (злокачественных плазматических В-клетках), и стимуляция лигандом резко увеличивает рост опухолевых клеток. (См. Jundt et al., *Blood* 103:3511-3515, 2004.) Notch2 и последующие эффекторы сверхэкспрессируются при меланоме (см. Hoek et al., *Cancer Res.* 64:5270-5282, 2004; Seykora et al., *Am J Dermatopathol* 25:6-11, 2003), и локус Notch2 рекуррентно амплифицируется в клеточных линиях меланомы (Jonsson et al., *Oncogene*, 26:4738-4748, 2007). Кроме того, во множестве исследований выявлена связь нарушенной передачи сигнала Notch2 с раком молочной железы и другими солидными опухолями (рассмотрено Leong and Karsay, *Blood* 107:2223-2233, 2006). Notch2 также требуется для развития В-

клеточной маргинальной зоны. (См. Pillai et al., Annu. Rev. Immunol. 23:161-196, 2005.)

С учетом вовлечения передачи сигнала Notch в широкое множество заболеваний человека, очевидно, что продолжает существовать потребность в средствах, которые регулируют передачу сигнала Notch и которые имеют клинические качества, подходящие для их разработки в качестве лекарственных средств. Изобретение, описанное в настоящем документе, удовлетворяет эту потребность и обеспечивает другие преимущества.

Все ссылки, цитированные в настоящем документе, включая патентные заявки и публикации, включены в качестве ссылок в полном объеме.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Изобретение относится к антителам против Notch и способам их применения.

В одном аспекте представлено моноклональное антитело, которое связывается с NRR Notch2. В одном варианте осуществления антитело ингибирует активность Notch2. В другом варианте осуществления антитело по существу не связывается с представителями семейства Notch, отличными от Notch2. В другом варианте осуществления антитело связывается с NRR Notch2 мыши и NRR Notch2 человека. В другом варианте осуществления антитело связывается с NRR Notch2 с $K_d \leq 10$ нМ.

В следующем варианте осуществления представлено моноклональное антитело, которое связывается с NRR Notch2, где антитело содержит:

(a) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность, которая соответствует консенсусной последовательности SEQ ID NO:3;

(b) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4;

(c) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5;

(d) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность, которая соответствует консенсусной последовательности SEQ ID NO: 10;

(e) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность, которая соответствует консенсусной последовательности SEQ ID NO: 14; и

(f) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность, которая соответствует консенсусной последовательности SEQ ID NO: 19.

В одном из таких вариантов осуществления антитело содержит HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-2; HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 6-9; HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 11-13; и HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 15-18. В одном варианте осуществления HVR-H1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, HVR-L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, HVR-L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, и HVR-L3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15. В другом варианте осуществления HVR-H1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, HVR-L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, HVR-L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11 и HVR-L3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16. В другом варианте осуществления HVR-H1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, HVR-L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, HVR-L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12 и HVR-L3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17. В другом варианте осуществления HVR-H1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, HVR-L1 содержит аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 9, HVR-L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13 и HVR-L3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18. В любом из указанных выше вариантов осуществления антитела, кроме того, содержит по меньшей мере одну каркасную область, выбранную из каркасной области акцептора 2 VH человека и консенсусной каркасной области подгруппы I VL каппа человека.

В другом аспекте представлено моноклональное антитело, которое связывается с NRR Notch2, где антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи, имеющий по меньшей мере 90% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 20-21, и вариабельный домен легкой цепи, имеющий по меньшей мере 90% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 22-25. В одном варианте осуществления антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи, имеющий по меньшей мере 90% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 20 и вариабельный домен легкой цепи, имеющий по меньшей мере 90% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 22. В одном из таких вариантов осуществления вариабельный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, и вариабельный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22. В другом варианте осуществления антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи, имеющий по меньшей мере 90% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 21, и вариабельный домен легкой цепи, имеющий по меньшей мере 90% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 23-25. В одном из таких вариантов осуществления вариабельный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, и вариабельный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 23-25.

В другом аспекте представлено выделенное антитело, которое связывается с тем же эпитопом, что и антитело, выбранное из антитела D, антитела D-1, антитела D-2 или антитела D-3. В другом аспекте представлено выделенное антитело, которое связывается с доменом LNR-A и с доменом HD-C Notch2.

В другом аспекте антитело против NRR Notch2 представляет собой фрагмент антитела, выбранный из Fab-, Fab'-SH-, Fv-, scFv- или (Fab')₂-фрагмента. В другом аспекте антитело против NRR Notch2 представляет собой гуманизированное, химерное антитело или антитело человека.

Любой из указанных выше вариантов осуществления может существовать отдельно или в комбинации.

В другом аспекте представлен способ ингибирования активности Notch2, включающий воздействие на клетку, которая экспрессирует Notch2, антитела согласно любому из указанных выше вариантов осуществления. В другом аспекте представлен способ лечения нарушения, ассоциированного с повышенной экспрессией или активностью Notch2, включающий введение индивидууму, нуждающемуся в этом, эффективного количества антитела согласно любому из указанных выше вариантов осуществления. В другом аспекте представлен способ лечения В-клеточной злокачественной опухоли, включающий введение индивидууму, нуждающемуся в этом, эффективного количества антитела согласно любому из указанных выше вариантов осуществления. В другом аспекте представлен способ лечения меланомы, включающий введение индивидууму,

нуждающемуся в этом, эффективного количества антитела согласно любому из указанных выше вариантов осуществления.

В другом аспекте представлен способ лечения нарушения, ассоциированный с повышенной экспрессией или активностью Notch1, включающий совместное введение индивидууму, нуждающемуся в этом, эффективного количества антитела против NRR Notch1 и лекарственного средства, выбранного из дексаметазона и тамоксифена, где лекарственное средство снижает изменение дифференцировки клеток кишечника, вызываемое антителом. В одном из таких вариантов осуществления нарушение представляет собой Т-клеточную злокачественную опухоль.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ РИСУНКОВ

На фигуре 1 представлены последовательности гипервариабельных областей (HVR) H1, H2 и H3 тяжелых цепей моноклональных антител против NRR Notch2, обозначаемых как антитело D, антитело D-1, антитело D-2 и антитело D-3, как описано в примере В (1). Аминокислотные положения пронумерованы согласно системе нумерации Kabat, как описано ниже.

На фигуре 2 представлены последовательности HVR L1, L2 и L3 легких цепей моноклональных антител против NRR Notch2, обозначаемых как антитело D, антитело D-1, антитело D-2 и антитело D-3, как описано в примере В(1). Аминокислотные положения пронумерованы согласно системе нумерации Kabat, как описано ниже.

На фигуре 3 представлено выравнивание последовательностей вариабельных областей тяжелых цепей антитела D, антитела D-1, антитела D-2 и антитела D-3. HVR заключены в рамки, как описано в примере В(1).

На фигуре 4 представлено выравнивание последовательностей вариабельных областей легких цепей антитела D, антитела D-1, антитела D-2 и антитела D-3. HVR заключены в рамки.

На фигурах 5А и 5В представлены иллюстративные консенсусные каркасные последовательности вариабельных областей тяжелых цепей (VH) человека для применения для осуществления на практике настоящего изобретения. Идентификаторы последовательностей являются следующими:

- консенсусная каркасная область "А" подгруппы I VH человека минус CDR по Kabat (SEQ ID NO: 32, 33, 34, 35).

- консенсусные каркасные области "В," "С" и "D" подгруппы I VH человека минус удлиненные гипервариабельные области (SEQ ID NO: 36, 37, 34, 35; SEQ ID NO: 36, 37, 38, 35; и SEQ ID NO: 36, 37, 39, 35).

- консенсусная каркасная область "А" подгруппы II VH человека минус CDR по Kabat (SEQ ID NO: 40, 41, 42, 35).

- консенсусные каркасные области "В," "С" и "D" подгруппы II VH человека минус удлиненные гипервариабельные области (SEQ ID NO: 43, 44, 42, 35; SEQ ID NO: 43, 44, 45, 35; и SEQ ID NO: 43, 44, 46, и 35).

- консенсусная каркасная область "А" подгруппы III VH человека минус CDR по Kabat (SEQ ID NO: 47, 48, 49, 35).

- консенсусные каркасные области "В," "С" и "D" подгруппы III VH человека минус удлиненные гипервариабельные области (SEQ ID NO: 50, 51, 49, 35; SEQ ID NO: 50, 51, 52, 35; и SEQ ID NO: 50, 51, 53, 35).

- каркасная область акцептора "А" VH человека минус CDR по Kabat (SEQ ID NO: 54, 48, 55, 35).

- каркасные области акцептора "В" и "С" VH человека минус удлиненные гипервариабельные области (SEQ ID NO: 50, 51, 55, 35; и SEQ ID NO: 50, 51, 56, 35).

- каркасная область акцептора 2 "А" VH человека минус CDR по Kabat (SEQ ID NO: 54, 48, 57, 35).

- каркасные области акцептора 2 "В", "С" и "D" VH человека минус удлиненные гипервариабельные области (SEQ ID NO: 50, 51, 57, 35; SEQ ID NO: 50, 51, 58, 35; и SEQ ID NO: 50, 51, 59, 35).

На фигуре 6 представлены иллюстративные акцепторные консенсусные каркасные последовательности вариабельной области легкой цепи (VL) человека для применения для осуществления на практике настоящего изобретения. Идентификаторы последовательностей являются следующими:

- консенсусная каркасная область подгруппы I VL каппа человека (kv1): SEQ ID NO: 60, 61, 62, 63

- консенсусная каркасная область подгруппы II VL каппа человека (kv2): SEQ ID NO: 64, 65, 66, 63

- консенсусная каркасная область подгруппы III VL каппа человека (kv3): SEQ ID NO: 67, 68, 69, 63

- консенсусная каркасная область подгруппы IV VL каппа человека (kv4): SEQ ID NO: 70, 71, 72, 63

На фигуре 7 показаны каркасные последовательности легкой и тяжелой цепей huMAb4D5-8. Числа в виде надстрочных знаков/выделенные полужирным шрифтом указывают на аминокислотные положения по Kabat.

На фигуре 8 показаны каркасные последовательности легкой и тяжелой цепей huMAb4D5-8 с указанными модификациями. Числа в виде надстрочных знаков/выделенные полужирным шрифтом указывают на аминокислотные положения по Kabat.

На фигурах 9А и 9В показано, что антитела против NRR1 и против NRR2 специфично связываются с их рецепторами, как описано в примере В(1). (А) Анализ ELISA для измерения связывания антитела против NRR1 (левая панель) и антитела против NRR2 (правая панель) с очищенными фрагментами белка NRR из каждого из четырех рецепторов Notch человека (h) и мыши (m). Связывание, показанное как A₅₆₀ на оси у,

представлено на графике против титров антитела против NRR1 или антитела против NRR2. (В) Анализ FACS для определения связывания антитела против NRR1 (панели 1-6) или антитела против NRR2 (панели 7-12) с нетрансфицированными клетками K1-CHO (панели 1, 4, 7 и 10), клетками K1-CHO, стабильно трансфицированными N-мус-Notch1 (панели 2, 5, 8 и 11) или клетками K1-CHO, стабильно трансфицированными N-мус-Notch2 (панели 3, 6, 9 и 12). Трансгены N-мус-Notch экспрессировали под контролем индуцибельного промотора tet; нижний ряд, контрольная экспрессия в отсутствии индукции доксицилином (-Dox); верхний ряд, индуцированная экспрессия после добавления доксицилина (+Dox); следует отметить, что линия K1-CHO эндогенно экспрессирует Notch2, который выявляется антителом против NRR2 в присутствии и отсутствии доксицилина (например, панели 7 и 10 для сравнения).

На фигурах 10А-С показано, что антитело против NRR1 и антитело против NRR2 специфично ингибирует передачу сигнала от его рецепторов-мишеней, включая рецепторы, несущие активирующие мутации, как описано в примерах В(2) и В(3). (А) Анализ совместной культуры для определения ингибирования антителом против NRR1 передачи сигнала Notch1. Клетки NIH-3Т3, стабильно трансфицированные Jag1, использовали для индукции передачи сигнала Notch в клетках NIH-3Т3, стабильно трансфицированных Notch1 (за исключением "-Jag1", где вместо клеток, экспрессирующих Jag1, использовали нетрансфицированные клетки NIH-3Т3). Передачу сигнала Notch

определяли с использованием репортерного гена Notch (CSL-зависимый промотор, запускающий экспрессию люциферазы светляка), и она выражена относительно экспрессии контрольного гена (конститутивный промотор, запускающий экспрессию люциферазы Renilla), нормализованной к условиям с DAPT (определенным как величина 1). +Jag1, стандартный анализ с совместным культивированием; DMSO, носитель DAPT отдельно; DAPT, 5 мкМ в DMSO; α -gD, изотипическое контрольное антитело в концентрации 2000 нг/мл; α -NRR1, антитело против NRR1 в указанных концентрациях; последние четыре анализа включали 80 нг/мл либо α -NRR1, либо α -gD, вместе с очищенными белковыми фрагментами NRR либо Notch1, либо Notch2, как указано (+NRR1 или +NRR2). (B) Анализ совместной культуры для определения ингибирования антителом против NRR2 передачи сигнала Notch2. Клетки NIH-3T3, стабильно трансфицированные Jag1, использовали для индукции передачи сигнала Notch в клетках U87MG, которые экспрессируют высокие уровни Notch2. Анализ проводили, как описано в (A). (C) Анализ совместной культуры для определения ингибирования антителом против NRR1 передачи сигнала Notch1 с рецепторов Notch1 дикого типа или с мутантных рецепторов Notch1. Анализ проводили как в (A) за исключением того, что экспрессирующие рецептор клетки получали путем временной трансфекции плазмид, экспрессирующих указанные рецепторы Notch1. WT, Notch1 дикого типа; Δ PEST, Notch1, лишенный домена PEST; L1594P, Notch1, несущий указанную конститутивно активирующую точечную мутацию; E25, 625 нг/мл изотипического контрольного антитела; α -NRR1, 625 нг/мл антитела против NRR1; DMSO, носитель GSI отдельно; DAPT, 5 мкМ в DMSO; CmpE, 1 мкМ соединение E в DMSO.

На фигурах 11A-D показано, что антитело против NRR1 и антитело против NRR2 функционируют в качестве рецептор-специфичных ингибиторов *in vivo*, как описано в примере B(4). Мышам Balb/c инъекции делали четыре раза каждые четверо суток 5 мг/кг изотипического контрольного α -gD, α -NRR1 или α -NRR2, и на 13 сутки, через одни сутки после четвертой дозы, собирали клетки из тимуса или селезенки. (A) Измерение массы тимуса. Масса тимуса (в мг) выражена относительно общей массы тела (в г). Величины соответствуют среднему значению плюс стандартное отклонение для трех мышей на группу. (B) Количество клеток в тимусе. (C) FACS на CD4 и CD8 для идентификации двойных положительных по CD4+/CD8+ Т-клеток. Числа соответствуют проценту клеток тимуса в двойных отрицательных, одинарных положительных и двойных положительных популяциях. Относительно контрольного антитела против gD (77,5%), антитело против NRR1 резко снижало процент клеток в популяции CD4+/CD8+ (5,89%) в то время как антитело против NRR2 (80%) не имело значительного эффекта. (D) FACS на CD21 и CD23 для идентификации В-клеток маргинальной зоны. Количества соответствуют средним процентам \pm стандартное отклонение (для трех животных) клеток в области ворот MZB, которая заключена в рамку; также указаны значения p ; представлены типичные точечные графики для одного из трех животных в каждой группе. Относительно контрольного антитела против gD (6,61%), антитело против NRR2 практически устраняло клетки MZB (0,97%), в то время как антитело против NRR1 (6%) не имело значительного эффекта.

На фигурах 12A-D структура размером 2,2 Å совместного кристалла Fab против NRR1/NRR1 указывает на то, что антитело против NRR1 одновременно контактирует с доменами LNR-A, LNR-B и HD-C, как описано в примере B(5). (A) В таблице обобщенно представлено связывание α -NRR1 или α -NRR2 с фрагментами химерного белка Notch1-NRR или Notch2-NRR. Указанные фрагменты белка NRR (темно-синий, последовательности Notch1; голубой, последовательности Notch2) экспрессировались

в качестве секретируемых белков, слитых с щелочной фосфатазой, для обеспечения быстрого определения связывания антитела в анализе на планшетах. После использования активности щелочной фосфатазы для нормализации по экспрессии и секреции NRR, культуральную среду, содержащую указанные химерные белки NRR, добавляли в 96-луночный планшет, на который было нанесено α -NRR1, α -NRR2 или изотипическое контрольное антитело (использованное для оценки фонового связывания, не показано). Связывание антитела оценивали путем измерения активности щелочной фосфатазы, которая оставалась связанной с планшетом. Y, сильное связывание; N, связывание не выявлено; W, выявлено слабое связывание. (B) Структура NRR1 человека. NRR1 представлен в качестве С-альфа изображения. Три иона кальция в мотивах LNR показаны в качестве сфер. Положение участка расщепления S2 указано стрелкой. (C) Наложение NRR1 на NRR2 (цепь A из pdb, код 2OO4), исходя из структурно консервативных атомов. NRR1 (закрашенный) и NRR2 (белый) показаны в качестве С-альфа изображений. (D) Вид по типу "открытая книга" для поверхности контакта между NRR1 (слева) и α -NRR1 Fab (справа, граница между тяжелой и легкой цепями показана черной пунктирной линией). Указана степень, с которой доступная для растворителя площадь поверхности погружается при образовании комплекса. Указаны остатки, которые погружены по меньшей мере на 50%, и идентичные остатки NRR в Notch1 и Notch2 обозначены черным шрифтом (см. также фигуру 18).

На фигурах 13A-C показано, что антитело против NRR1 вызывает гиперветвление эндотелиальных клеток, как описано в примере B(6). (A) Анализ ветвления эндотелиальных клеток *in vitro*. HUVEC наносили на гранулы Cytodex и совместно культивировали с фибробластами кожи. Культуры либо обрабатывали имитирующей обработкой (контроль), либо их обрабатывали 1 мкМ DBZ, 5 мкг/мл α -NRR1 или 5 мкг/мл α -Dll4. Планка масштаба = 100 мкм. (B) Измерение длины ветвлений в культурах из (A). (C) Анализ сетчатки новорожденных мышей в отношении ветвления эндотелиальных клеток и ангиогенеза. Новорожденным мышам инъецировали на P1 и P3 указанные антитела, и на P5 сетчатки приготавливали для визуализирующей перфузии изолектина или маркера пролиферации Ki67. Панели I и II, планки масштаба = 1 мм. Панели III-VI представляют собой увеличения частей панелей I и II, планка масштаба = 0,2 мм.

На фигурах 14A-E показано, что селективное антитело, блокирующее передачу сигнала Notch1, нарушает ангиогенез опухоли и ингибирует рост опухоли, как описано в примере B(7). На графиках для трех моделей с ксенотрансплантатами показан объем опухоли (среднее значение \pm SEM) против времени после введения указанных антител: антитела против агглютинаина амброзии (отрицательный контроль), α -VEGF или α -NRR1. Значения P показаны для сравнения антитела против агглютинаина амброзии против α -NRR1. (A) Модель Calu6. (B) Модель HM7. (C) Модель HM7 с титрованием дозы α -NRR1. (D) Окрашивание эндотелиальных клеток в репрезентативных срезах опухолей из модели Calu6, показанной на (A). Антитела, использованные в моделях с ксенотрансплантатами, показаны сверху. DAPI и α -CD31 использовали для окрашивания ДНК и эндотелиальных клеток, соответственно. Нижний ряд панелей демонстрирует объединенные изображения. Планка масштаба = 50 мкм. (E) Количественное определение окрашивания на CD31, представленного в (D). С использованием изображения J для количественного определения окрашивания на CD31 и с помощью DAPI в изображениях, сходных с изображениями, показанными в (D), относительное окрашивание на CD31 (окрашивание на CD31, нормализованное к окрашиванию DAPI) наносили на график для каждого из трех введений антител относительно контрольного

антитела против агглютинина амброзии, которое было принято в качестве значения 1; данные соответствуют среднему значению \pm стандартное отклонение на протяжении 8 изображенных полей.

На фигурах 15А-С показано, что селективное антитело, блокирующее Notch1, является достаточным для изменения участи клеток в тонком кишечнике, как описано в примере В(8). (А) Общее изменение массы тела (среднее значение \pm стандартное отклонение) против времени. Мышам проводили введение, как описано для фигуры 11, контрольного изотипического антитела против gD, LT β R-Fc, антитела против NRR1 или антитела против NRR2. Стрелками указаны сутки дозирования. (В) Иммуногистохимические анализы тонкого кишечника. Мышам вводили указанные концентрации контрольного изотипического антитела против gD, DBZ или антитела против NRR1 на 0, 2 и 6 сутки и на 7 сутки тонкие кишечника подготавливали для иммуногистохимического анализа. В каждом ряду, как указано, представлено окрашивание гематоксилином и эозином (H & E), альтиановым синим на муцин и для маркирования секреторных бокаловидных клеток, окрашивание на лизоцим для маркирования клеток Панета, окрашивание на Ki-67 для определения пролиферации и на Hes1 в качестве нижерасположенной мишени Notch. См. фигуры 19 и 20 для анализов толстого кишечника на 7 сутки и тонкого кишечника на 2 сутки, соответственно. Планка масштаба = 40 мкм. (С) Сравнение специфического ингибирования Notch1 против специфического ингибирования Notch2 в отношении дифференцировки клеток тонкого кишечника. Тонкие кишечника из исследования, описанного в (А), приготавливали для окрашивания альтиановым синим и окрашивания на Ki-67 через одни сутки после конечного дозирования α -gD, α -NRR1 или α -NRR2, как указано. Планка масштаба = 50 мкм.

На фигуре 16 показано, что антитело против NRR1 является сильным ингибитором передачи сигнала Notch1, индуцируемой множеством лигандов, как описано в примере В(2). Анализы передачи сигнала Notch1 в совместной культуре проводили, как описано на фигуре 10А, за исключением того, что лиганд-экспрессирующие клетки экспрессировали Jag1, Jag2 или Dll1, как указано.

На фигуре 17 показаны химерные белковые конструкции NRR Notch1/NRR Notch2 с низким выходом, как описано в примере В(5). Таблица дополняет фигуру 12А, и в ней приведены химерные белки NRR, которые приводили к низкой активности щелочной фосфатазы или к ее отсутствию, указывая на то, что химеры не правильно сворачивались или были иным образом нестабильными. Для фрагментов, которые приводили к слабой, но поддающейся детекции активности щелочной фосфатазы, обобщенно представлено связывание α -NRR1 или α -NRR2. ---, нет экспрессии, и связывание не поддается тестированию; N, отсутствует экспрессия или связывание; W, слабая экспрессия или связывание.

На фигуре 18 показана консервативность остатков NRR1, с которыми контактировало антитело против NRR1, как описано в примере В(1) и В(5). Представлено выравнивание аминокислотных последовательностей NRR-домена Notch1 человека (SEQ ID NO: 26), NRR-домена Notch1 мыши (SEQ ID NO: 27), NRR-домена Notch2 человека (SEQ ID NO: 28) и NRR-домена Notch2 мыши (SEQ ID NO: 29), и границы субдоменов представлены справа. NRR Notch1 человека приведен в качестве эталонной последовательности, и остатки в других последовательностях NRR, которые идентичны остаткам в Notch1 человека, указаны полужирным шрифтом. Остатки, которые по меньшей мере на 25% погружены в структуру Fab против NRR1/Notch1-NRR (фигура 12), подчеркнуты, причем сплошные линии против пунктирных линий отражают повышение степени, с которой остатки погружены. Из 21 аминокислоты, которые по меньшей мере на 25% погружены

в последовательности Notch1 человека, все 21 являются идентичными в последовательности Notch1 мыши, но только шесть из них идентичны в последовательностях Notch2 человека и мыши (плюс седьмое консервативное отличие, T вместо S, в S1712 Notch1 человека); среди этих идентичных и "погруженных" остатков в последовательностях Notch2, ни один из них не относится к классу погруженных >75%. Это сравнение последовательностей согласуется с (а) сильным связыванием антитела против NRR1 (приблизительно равные аффинности) с Notch1 как человека, так и мыши и (b) отсутствием связывания антитела против NRR1 с Notch2 человека и мыши. Более того, все погруженные остатки находятся в пределах LNR-A, LNR-B и HD-C, что согласуется с экспериментом по обмену доменов, представленным на фигурах 11A и 17.

На фигуре 19 показано, что селективное антитело, блокирующее Notch1, является достаточным для изменения участи клеток в толстом кишечнике, как описано в примере B(8). Гистопатологический анализ образцов толстого кишечника, взятых на 7 сутки эксперимента, описан на фигуре 15B.

На фигуре 20 показано, что изменения участи клеток кишечника развиваются на 2 сутки после блокирования Notch1, как описано в примере B(8). Гистопатологический анализ образцов тонкого кишечника, взятых на 2 сутки эксперимента, описан на фигуре 15B, на которой показаны образцы, взятые на 7 сутки.

На фигуре 21 показано, что антитело против NRR1 не блокирует индуцируемую Notch2 передачу сигнала *in vitro*, как описано в примере B(2). Анализ совместной культуры в клетках U87MG, как описано на фигуре 10B. Хотя антитело против NRR1 активно ингибирует передачу сигнала Notch1 *in vitro* (фигура 10A) и *in vivo* (фигуры 11A-C), оно не влияет на передачу сигнала Notch2, даже при использовании в концентрации 1000 нг/мл, что более чем в 100 раз превышает IC₅₀. Этот результат согласуется со специфическим связыванием антитела против NRR1 с Notch1 (фигуры 9 и 12), а также с отсутствием ингибирования Notch2 антителом против NRR1 *in vivo* (фигура 11D).

На фигуре 22 показаны возможные синергические эффекты антитела против NRR1 и антитела против NRR2 на дифференцировку клеток кишечника, как описано в примере B8.

На фигуре 23 показано, что дексаметазон приводит по меньшей мере к частичному восстанавливаю фенотипа кишечника от фенотипа, вызванного антителом против NRR1, как описано в примере B(9).

На фигурах 24A и B показано, что селективное блокирование либо Notch1, либо Notch2 минимизирует или предотвращает метаплазию бокаловидных клеток, ассоциированную с тотальным ингибированием Notch, в то время как блокирование как Notch1, так и Notch2, вызывает тяжелую метаплазию бокаловидных клеток. (A) Как описано в примере B8, мышам вводили дозы 5 мг/кг антитела против NRR1, антитела против NRR2, или оба, или отрицательное контрольное антитело против gD на сутки, отмеченные стрелками; показано общее изменение массы тела (среднее значение +/- стандартное отклонение) против времени. (B) Иммуногистохимические анализы тонкого кишечника от мышей, которым проводили введение согласно (A), с использованием альцианового синего, окрашивающего муцин, для мечения секреторных бокаловидных клеток.

На фигурах 25A и 25B показано, что антитело против NRR2 (обозначаемое как "антитело против N2") ингибирует рост клеточных линий меланомы человека SK23 и LOX-IMVI *in vitro*, как описано в примере B(10).

На фигуре 26 показан эффект антитела против NRR2 (обозначаемого как "антитело против Notch2") на пять клеточных линий диффузных крупноклеточных В-клеточных лимфом (DLBCL) (приведенных справа). Как описано в примере В(11), рост одной из клеточных линий, "DB" строго ингибировался обработкой антителом против NRR2.

На фигуре 27 показан эффект антитела против NRR2 (называемого "антителом против Notch2") на рост клеточной линии DB DLBCL с течением времени, как описано в примере В(11).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Изобретение относится к выделенным антителам, которые связываются с Notch, и к способам их применения, например, для диагностики или лечения заболеваний, ассоциированных с экспрессией или активностью Notch.

I. ОБЩИЕ СПОСОБЫ

Способы и процедуры, описанные или цитированные в настоящем документе, обычно хорошо понятны и широко применяются с использованием общепринятых технологий специалистами в данной области, например, таких как широко используемые технологии, описанные в Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3rd. edition (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; *Current Protocols in Molecular Biology* (F. M. Ausubel, et al. eds., (2003)); серия *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.); *PCR 2: A Practical Approach* (M. J. MacPherson, B. D. Hames и G. R. Taylor eds. (1995)), Harlow and Lane, eds. (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, and *Animal Cell Culture* (R. I. Freshney, ed. (1987)); *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait, ed., 1984); *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J. E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; *Animal Cell Culture* (R. I. Freshney), ed., 1987); *Introduction to Cell and Tissue Culture* (J. P. Mather and P. E. Roberts, 1998) Plenum Press; *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle, J. B. Griffiths, and D. G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley and Sons; *Handbook of Experimental Immunology* (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds.); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J. M. Miller and M. P. Calos, eds., 1987); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis et al, eds., 1994); *Current Protocols in Immunology* (J. E. Coligan et al., eds., 1991); *Short Protocols in Molecular Biology* (Wiley and Sons, 1999); *Immunobiology* (C. A. Janeway and P. Travers, 1997); *Antibodies* (P. Finch, 1997); *Antibodies: A Practical Approach* (D. Catty, ed., IRL Press, 1988-1989); *Monoclonal Antibodies: A Practical Approach* (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); *Using Antibodies: A Laboratory Manual* (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); *The Antibodies* (M. Zanetti and J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); и *Cancer: Principles and Practice of Oncology* (V. T. DeVita et al., eds., J. B. Lippincott Company, 1993).

II. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Для интерпретации описания применяются следующие определения, и, когда это приемлемо, термины, используемые в единственном числе, также включают множественное число и наоборот. В случае, когда любое указанное ниже определение противоречит документу, включенному в настоящий документ в качестве ссылки, следует руководствоваться определением, указанным ниже.

Термин "антитело" используют в настоящем документе в наиболее широком значении и, конкретно, он охватывает моноклональные антитела, поликлональные антитела, полиспецифические антитела (например, биспецифические антитела), образованные из по меньшей мере двух целых антител, и фрагменты антител, при условии, что они проявляют требуемую биологическую активность.

"Выделенное" антитело представляет собой антитело, которое идентифицировано и отделено и/или извлечено из компонента его естественных окружающих условий.

Загрязняющие компоненты его естественных окружающих условий представляют собой вещества, которые препятствуют исследовательскому, диагностическому или терапевтическому применению антитела, и могут включать ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные вещества. В предпочтительных вариантах осуществления антитело является очищенным (1) до более чем 95% по массе антитела, как определяют способом Лоури, и наиболее предпочтительно до более чем 99% по массе, (2) до степени, достаточной для получения по меньшей мере 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности с использованием секвенатора с вращающимся стаканом, или (3) до гомогенности при SDS-PAGE в восстанавливающих или невосстанавливающих условиях с использованием кумасси синего или, предпочтительно, окрашивания серебром. Выделенное антитело включает антитело в рекомбинантных клетках *in situ*, поскольку в этом случае отсутствует по меньшей мере один компонент условий естественного окружения антитела. Однако, как правило, выделенное антитело получают посредством по меньшей мере одной стадии очистки.

"Нативные антитела" обычно представляют собой гетеротетрамерные гликопротеины массой приблизительно 150000 дальтон, состоящие из двух идентичных легких (L) цепей и двух идентичных тяжелых (H) цепей. Каждая легкая цепь связана с тяжелой цепью одной ковалентной дисульфидной связью, в то время как количество дисульфидных связей варьирует среди тяжелых цепей различных изотипов иммуноглобулинов. Каждая тяжелая и легкая цепь также имеет межцепочечные дисульфидные мостики, находящиеся на правильных расстояниях. Каждая тяжелая цепь имеет на ее одном конце переменный домен (V_H), за которым следует ряд константных доменов. Каждая легкая цепь имеет переменный домен на одном конце (V_L) и константный домен на ее другом конце; причем константный домен легкой цепи находится на одном уровне с первым константным доменом тяжелой цепи, а переменный домен легкой цепи находится на одном уровне с переменным доменом тяжелой цепи. Полагают, что поверхность контакта между переменными доменами легкой цепи и тяжелой цепи формируют конкретные аминокислотные остатки.

Термин "антитело против NRR Notch1" или "антитело, которое связывается с NRR Notch1" относится к антителу, которое способно связывать NRR Notch1 с достаточной аффинностью, чтобы антитело было пригодным в качестве диагностического и/или лекарственного средства при нацеливании на Notch1. Предпочтительно, степень связывания антитела против NRR Notch1 с неродственным не являющимся Notch белком составляет менее чем приблизительно 10% от связывания антитела с NRR Notch1 при определении, например, радиоиммунным анализом (RIA). В определенных вариантах осуществления антитело, которое связывается с NRR Notch1, имеет константу диссоциации (K_d) ≤ 1 мкМ, ≤ 100 нМ, ≤ 10 нМ, ≤ 1 нМ или $\leq 0,1$ нМ. В определенных вариантах осуществления антитело против NRR Notch1 связывается с эпитопом Notch, который является консервативным среди Notch из различных видов, например, грызунов (мышей, крыс) и приматов.

Термин "антитело против NRR Notch2" или "антитело, которое связывается с NRR Notch2" относится к антителу, которое способно связывать NRR Notch2 с достаточной аффинностью, чтобы антитело было пригодным в качестве диагностического и/или лекарственного средства при нацеливании на Notch2. Предпочтительно, степень связывания антитела против NRR Notch2 с неродственным не являющимся Notch белком составляет менее чем приблизительно 10% от связывания антитела с NRR Notch2 при определении, например, радиоиммунным анализом (RIA). В определенных вариантах

осуществления антитело, которое связывается с NRR Notch2, имеет константу диссоциации (K_d) ≤ 1 мкМ, ≤ 100 нМ, ≤ 10 нМ, ≤ 1 нМ или $\leq 0,1$ нМ. В определенных вариантах осуществления антитело против NRR Notch2 связывается с эпитопом Notch, который является консервативным среди Notch из различных видов, например, грызунов (мышей, крыс) и приматов.

"Вариабельная область" или "вариабельный домен" антитела относится к N-концевым доменам тяжелой и легкой цепи антитела. Вариабельный домен тяжелой цепи может быть обозначен как "VH". Вариабельный домен легкой цепи может быть обозначен как "VL". Эти домены, как правило, являются наиболее вариабельными частями антитела и содержат антигенсвязывающие центры.

Термин "вариабельный" относится к тому факту, что последовательности определенных сегментов вариабельных доменов значительно отличаются среди антител. Однако вариабельность не является равномерно распределенной на протяжении вариабельных доменов антител. Она сконцентрирована в трех сегментах, называемых гипервариабельными областями (HVR) в вариабельных доменах как легких цепей, так и тяжелых цепей. Наиболее высоко консервативные участки вариабельных доменов называются каркасными областями (FR). Все вариабельные домены природных тяжелых и легких цепей содержат четыре области FR, главным образом, примающих конфигурацию бета-слоев, соединенных тремя HVR, которые формируют петли, соединяющие структуры бета-слоев, и в некоторых случаях формирующие их часть. HVR в каждой цепи расположены вместе в непосредственной близости от FR и, совместно с HVR другой цепи, участвуют в формировании антигенсвязывающего центра антител (см. Kabat et al., *Sequences of Protein of Immunological Interest*, 5th Ed. National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Константные домены не вовлечены непосредственно в связывание антитела с антигеном, но они проявляют различные эффекторные функции, такие как участие антитела в антителозависимой клеточной цитотоксичности.

"Легкие цепи" антител (иммуноглобулинов) любого вида позвоночных могут быть отнесены к одному из двух типов, называемых каппа (κ) и лямбда (λ), отчетливо различающихся на основе аминокислотных последовательностей их константных доменов.

В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена их тяжелых цепей, антитела (иммуноглобулины) могут быть отнесены к различным классам. Существует пять основных классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них могут быть дополнительно подразделены на подклассы (изотипы), например, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂. Константные домены тяжелых цепей, которые соответствуют различным классам иммуноглобулинов, называют α , δ , ϵ , γ и μ , соответственно. Субъединичные структуры и трехмерные конфигурации различных классов иммуноглобулинов хорошо известны и описаны, главным образом, например, в Abbas et al. *Cellular and Mol. Immunology*, 4th ed. (W.B. Saunders, Co., 2000). Антитело может быть частью более крупной слитой молекулы, образованной путем ковалентной или нековалентной ассоциации антитела с одним или несколькими другими белками или пептидами.

Термины "полноразмерное антитело", "интактное антитело" и "целое антитело" используют в настоящем документе взаимозаменяемо для обозначения антитела в его по существу целой форме, а не фрагментов антитела, определенных ниже. Эти термины, в частности, относятся к антителу с тяжелыми цепями, которые содержат Fc-область.

"Простое антитело" для целей настоящего описания представляет собой антитело, которое не конъюгировано с цитотоксической группой или радиоактивной меткой.

"Фрагменты антитела" содержат часть целого антитела, предпочтительно его антигенсвязывающую область. Примеры фрагментов антител включают Fab-, Fab'-, F(ab')₂- и Fv-фрагменты, антитела-димеры, линейные антитела, одноцепочечные молекулы антител, и полиспецифические антитела, образованные фрагментами антител.

Расщепление антител папаином приводит к образованию двух идентичных антигенсвязывающих фрагментов, называемых "Fab"-фрагментами, каждый из которых содержит один антигенсвязывающий центр, и остаточного "Fc"-фрагмента, название которого отражает его способность легко кристаллизоваться. Обработка пепсином приводит к одному крупному F(ab')₂-фрагменту, который имеет два антигенсвязывающих центра и все еще способен перекрестно связывать антиген.

"Fv" представляет собой минимальный фрагмент антитела, который содержит полный антигенсвязывающий центр. В одном варианте осуществления двухцепочечный тип Fv состоит из димера, состоящего из одного переменного домена тяжелой цепи и одного переменного домена легкой цепи, связанных прочной нековалентной связью. В одноцепочечных типах Fv (scFv), один переменный домен тяжелой цепи и один переменный домен легкой цепи могут быть ковалентно связаны подвижным пептидным линкером, так чтобы легкая и тяжелая цепи могли ассоциировать в "димерные" структурные аналоги, аналогичные двухцепочечным типам Fv. Именно в этой конфигурации три HVR каждого переменного домена взаимодействуют, определяя антигенсвязывающий центр на поверхности димера VL-VH. В совокупности шесть HVR придают антигенсвязывающую специфичность антителу. Однако даже один переменный домен (или половина Fv, содержащая только три HVR, специфичных к антигену) обладает способностью распознавать и связывать антиген, хотя и с более низкой аффинностью, чем целый участок связывания.

Fab-фрагмент состоит из переменных доменов тяжелой и легкой цепей, а также он содержит константный домен легкой цепи и первый константный домен (CH1) тяжелой цепи. Fab'-фрагменты отличаются от Fab-фрагментов наличием дополнительных нескольких остатков на С-конце домена CH1, включая один или несколько цистеинов из шарнирной области антитела. Fab'-SH представляет собой обозначение для Fab', в котором остаток(ки) цистеина константных доменов обладает свободной тиольной группой. F(ab')₂-фрагменты антитела исходно были получены в качестве пар Fab'-фрагментов, которые обладают шарнирными цистеинами между ними. Также известно другое химическое связывание фрагментов антител.

"Одноцепочечные Fv" или "scFv", представляют собой фрагменты антител, которые содержат VH- и VL-домены антитела, где эти домены присутствуют в единой полипептидной цепи. Как правило, полипептид sFv также необязательно содержит полипептидный линкер между VH- и VL-доменами, который обеспечивает формирование в sFv структуры, требуемой для связывания антигена. Для обзора sFv см. Pluckthun, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York, 1994), pp. 269-315.

Термин "антитела-димеры" относится к фрагментам антитела с двумя антигенсвязывающими участками, причем эти фрагменты содержат переменный домен тяжелой цепи (VH), связанный с переменным доменом легкой цепи (VL) в одной полипептидной цепи (VH-VL). С использованием линкера, который является слишком коротким для возможности спаривания двух доменов одной цепи, домены вынуждают образовывать пары с комплементарными доменами другой цепи с образованием двух антигенсвязывающих центров. Антитела-димеры могут быть двухвалентными или

биспецифическими. Антитела-димеры описаны более подробно, например, в EP 404097; WO93/1161; Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003); и Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993). Антитела-тримеры и антитела-тетрамеры также описаны в Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003).

5 В настоящем документе, термин "моноклональное антитело" относится к антителу из совокупности по существу однородных антител, т.е. отдельные антитела, составляющие совокупность, являются идентичными, за исключением возможных мутаций, например, природных мутаций, которые могут быть представлены в небольших количествах. Таким образом, определение "моноклональный" указывает на тот признак
10 антитела, что оно не является смесью различных антител. В определенных вариантах осуществления такое моноклональное антитело, как правило, включает антитело, содержащее полипептидную последовательность, которая связывает мишень, где связывающая мишень полипептидная последовательность получена посредством процесса, который включает селекцию единичной связывающей мишень полипептидной
15 последовательности из множества полипептидных последовательностей. Например, процесс селекции может представлять собой селекцию единичного клона из множества клонов, таких как пул гибридных клонов, фаговых клонов или клонов рекомбинантных ДНК. Следует понимать, что отобранную связывающую мишень последовательность можно дополнительно изменять, например, для повышения
20 аффинности к мишени, для гуманизации связывающей мишень последовательности, для повышения ее продукции в клеточной культуре, для снижения ее иммуногенности *in vivo*, для создания полиспецифичного антитела, и т. д., и что антитело, содержащее измененную связывающую мишень последовательность, также является моноклональным антителом по настоящему изобретению. В противоположность
25 препаратам поликлональных антител, которые как правило, включают различные антитела, направленные против различных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело в препарате моноклонального антитела направлено против одной детерминанты на антигене. В дополнение к их специфичности, препараты моноклонального антитела является преимущественными в том, что они, как правило,
30 не содержат примесей других иммуноглобулинов.

Определение "моноклональный" указывает на тот признак антитела, что его получают из по существу гомогенной совокупности антител, и не подразумевает того, что антитело должно быть получено каким-либо конкретным способом. Например, моноклональные антитела, предназначенные для применения в соответствии с настоящим изобретением,
35 можно получать множеством способов, включая, например, способ гибридом, (например, Kohler and Milstein, Nature, 256:495-97 (1975); Hongo et al, Hibridoma, 14 (3): 253-260 (1995); Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling et al., in Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681, (Elsevier, N.Y., 1981)), способы рекомбинантных ДНК (см., например, патент США
40 No. 4816567), технологии фагового дисплея (см., например, Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991); Sidhu et al., J. Mol. Biol. 338(2):299-310 (2004); Lee et al., J. Mol. Biol. 340(5):1073-1093 (2004); Fellouse, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 101(34):12467-12472 (2004); и Lee et al., J. Immunol. Methods 284(1-2):119-132 (2004), и технологии продуцирования антитела человека или антител, подобных
45 антителам человека, у животных, которые имеют части локусов или генов иммуноглобулинов человека, кодирующие последовательности иммуноглобулинов, или все эти локусы или гены (см., например, WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits

et al., *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggemann et al., *Year in Immuno.*, 7:33 (1993); патенты США No. 5545807; 5545806; 5569825; 5625126; 5633425; и 5661016; Marks et al., *Bio/Technology*, 10: 779-783 (1992); Lonberg et al., *Nature*, 368:856-859 (1994); Morrison, *Nature*, 368:812-813 (1994); Fishwild et al., *Nature Biotechnology*, 14:845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology*, 14:826 (1996); и Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.*, 13:65-93 (1995).

Моноклональные антитела в настоящем документе конкретно включают "химерные" антитела, в которых участок тяжелой и/или легкой цепи идентичен или гомологичен соответствующим последовательностям в антителах, полученных из конкретного вида или принадлежащих к конкретному классу или подклассу антител, в то время как оставшаяся часть цепи(ей) идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, полученных из другого вида или принадлежащих другому классу или подклассу антител, а также фрагменты таких антител, при условии, что они проявляют требуемую биологическую активность (см, например, патент США No 4816567; и Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 81:6851-6855 (1984)). Химерные антитела включают PRIMATIZED®-антитела, где антигенсвязывающая область антитела происходит из антитела, продуцируемого, например, путем иммунизации макака представляющим интерес антигеном.

"Гуманизированные" формы не являющихся человеческими антител (например, грызунов) представляют собой химерные антитела, которые содержат минимальную последовательность, полученную из иммуноглобулина, не являющегося человеческим. В одном осуществлении, гуманизированные антитела представляют собой иммуноглобулины человека (реципиентное антитело), в которых остатки из гипервариабельной области реципиента заменены остатками из гипервариабельной области видов, не относящихся к человеку, (донорное антитело), таких как мышь, крыса, кролик или не относящиеся к человеку приматы, которые обладают требуемой специфичностью, аффинностью и емкостью. В некоторых случаях, остатки каркасной области (FR) иммуноглобулина человека заменяют соответствующими остатками, не являющиеся человеческими. Более того, гуманизированные антитела могут содержать остатки, которые отсутствуют в реципиентном антителе или в донорном антителе. Эти модификации проводят для дополнительного улучшения параметров антитела. Как правило, гуманизированное антитело содержит по существу все по меньшей мере из одного, и, как правило, из двух, вариабельных доменов, в которых все или по существу все гипервариабельные петли соответствуют гипервариабельным петлям иммуноглобулина, не являющегося человеческим, и все или по существу все FR-области представляют собой FR-области из последовательности иммуноглобулина человека. Также гуманизированное антитело необязательно содержит по меньшей мере участок константной области (Fc) иммуноглобулина, как правило, константного домена иммуноглобулина человека. Для более подробной информации см. Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); и Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992). Также см. следующие обзорные статьи и ссылки, цитированные в них: Vaswani and Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurlle and Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994) и патенты США No. 6982321 и 7087409.

"Антитело человека" представляет собой антитело, которое содержит аминокислотную последовательность, соответствующую последовательности антитела, продуцируемой у человека и/или полученной с использованием любых способов получения антител человека, как описано в настоящем документе. Это определение антитела человека, в частности, не включает гуманизированное антитело, содержащее

антигенсвязывающие остатки не человека. Антитела человека можно получать с использованием различных способов, известных в данной области, включая библиотеки фагового дисплея. Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol, 222:581 (1991). Также для получения моноклональных антител человека доступны

5 способы, описанные в Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner et al., J. Immunol, 147(1): 86-95 (1991). Также см. van Dijk and van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol, 5: 368-74 (2001). Антитела человека можно получить путем введения антигена трансгенному животному, модифицированному для продукции таких антител в ответ на нагрузку антигеном, но имеющему поврежденные эндогенные

10 локусы, например, иммунизированным ксеномышам (см., например, патенты США No. 6075181 и 6150584 в отношении технологии XENOMOUSETM). Также см, например, Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562 (2006) в отношении антител человека, полученных технологией В-клеточных гибридом человека.

Термины "гипервариабельная область", "HVR" или "HV" в настоящем документе

15 относятся к участкам вариабельного домена антитела, которые являются гипервариабельными по последовательности и/или образуют структурно определенные петли. Обычно антитела включают шесть гипервариабельных областей: три в VH (H1, H2, H3), и три в VL (L1, L2, L3). В нативных антителах H3 и L3 проявляют наибольшее разнообразие среди шести HVR, и, в частности, полагают, что H3 играет уникальную

20 роль в обеспечении высокой специфичности антител. См., например, Xu et al., Immunity 13:37-45 (2000); Johnson and Wu, Methods in Molecular Biology 248:1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003). Действительно, природные антитела верблюжьих, состоящие только из тяжелых цепей, являются функциональными и стабильными в отсутствии

25 легких цепей. См., например, Hamers-Casterman et al., Nature 363:446-448 (1993); Sheriff et al., Nature Struct. Biol. 3:733-736 (1996).

Используют несколько способов обозначения гипервариабельных областей, и они включены в рассматриваемое описание. Определяющие комплементарность области (CDR) по Kabat основаны на вариабельности последовательностей и используются

30 наиболее часто (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). Chothia вместо этого рассматривает расположение структурных петель (Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). HVR AbM представляют собой компромисс между HVR по Kabat и структурными петлями по Chothia, и они используются в программном обеспечении моделирования антител Oxford Molecular's AbM. "Контактные" HVR основаны на анализе

35 доступных комплексных кристаллических структур. Остатки из каждой из указанных HVR указаны ниже.

Петля	Kabat	AbM	Chothia	Контактные
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
	(Нумерация по Kabat)			
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
	(Нумерация по Chothia)			
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

HVR могут включать следующие "удлиненные HVR": 24-36 или 24-34 (L1), 46-56 или 50-56 (L2) и 89-97 (L3) в VL и 26-35B (H1), 50-65, 47-65 или 49-65 (H2) и 93-102, 94-102

или 95-102 (H3) в VH. Остатки переменных доменов пронумерованы согласно Kabat et al., выше, для каждого из этих определений.

Остатки "каркасной области" или "FR" представляют собой остатки переменного домена, отличные от остатков HVR, как определено в настоящем документе.

5 Термины "нумерация остатка переменного домена по Kabat" или "нумерация аминокислотного положения по Kabat", и их варианты, относятся к системе нумерации, которую используют для переменных доменов тяжелой цепи или переменных доменов легкой цепи в совокупности антител, представленной в Kabat et al., выше. С использованием этой системы нумерации, истинная линейная аминокислотная
10 последовательность может содержать меньшее количество или дополнительное количество аминокислот, что соответствует укорочению FR или HVR переменного домена или встраиванию в них. Например, переменный домен тяжелой цепи может включать одну вставку представляющей интерес аминокислоты (остаток 52a по Kabat) после остатка 52 в H2 и встроенные остатки (например, остатки 82a, 82b, и 82c, и т.д.
15 по Kabat) после остатка 82 FR тяжелой цепи. Нумерацию по Kabat для остатков можно определить для конкретного антитела путем выравнивания по участкам гомологии последовательности антитела со "стандартной" последовательностью, пронумерованной по Kabat.

Систему нумерации Kabat обычно используют при указании на остаток в
20 переменном домене (приблизительно остатки 1-107 легкой цепи и остатки 1-113 тяжелой цепи) (например, Kabat et al., Sequences of Immunological Interest. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). "Систему нумерации EU" или "индекс EU" обычно используют при указании на остаток в константной области тяжелой цепи иммуноглобулина (например, индекс EU, указанный в Kabat et al., выше).
25 "Индекс EU по Kabat" относится к нумерации остатков антитела IgG1 человека EU. Если в настоящем документе нет иных указаний, указания на номера остатков в переменных доменах антител означают нумерацию остатков в соответствии с системой нумерации Kabat. Если в настоящем документе нет иных указаний, указания на номера остатков в константном домене антител означают нумерацию остатков в соответствии
30 с системой нумерации EU. (например, см. публикацию патентной заявки No. US 2008/0181888 A1, фигуры для нумерации EU).

Антитело, полученное "созреванием аффинности", представляет собой антитело с одним или несколькими изменениями в одной или нескольких его HVR, которые приводят к повышению аффинности антитела к антигену, по сравнению с исходным
35 антителом, которое не имеет этого изменения(ий). Предпочтительные антитела, полученные "созреванием аффинности", имеют наномолярную или даже пикомолярную аффинность к антигену-мишени. Антитела, полученные созреванием аффинности, получают способами, известными в данной области. В Marks et al., Bio./Technology 10: 779-783 (1992) описано созревание аффинности способом "перетасовки" VH- и VL-
40 доменов. Случайный мутагенез HVR и/или каркасных остатков описан: Barbas et al., Proc Nat. Acad. Sci. USA 91:3809-3813 (1994); Schier et al., Gene 169:147-155 (1995); Yelton et al., J. Immunol. 155:1994-2004 (1995); Jackson et al., J. Immunol. 154(7):3310-9 (1995); и Hawkins et al., J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992).

"Блокирующее антитело" или "антитело-антагонист" представляет собой антитело,
45 которое ингибирует или снижает биологическую активность антигена, который оно связывает. Предпочтительные блокирующие антитела или антитела-антагонисты частично или полностью ингибируют биологическую активность антигена.

"Антитело-агонист" в настоящем документе представляет собой антитело, которое

частично или полностью имитирует по меньшей мере один из видов функциональной активности представляющего интерес полипептида.

"Ингибирующие рост" представляют собой антитела, которые препятствуют пролиферации или снижают пролиферацию клетки, экспрессирующей антиген, с которым антитело связывается. Например, антитело может препятствовать пролиферации злокачественных клеток *in vitro* и/или *in vivo*, снижать ее.

Антитела, которые "индуцируют апоптоз", представляют собой антитела, которые индуцируют запрограммированную гибель клеток при определении стандартными анализами апоптоза, такими как связывание аннексина V, фрагментация ДНК, сморщивание клеток, расширение эндоплазматической сети, фрагментация клетки и/или образование мембранных везикул (называемых апоптотическими тельцами).

"Эффекторные функции" антитела относятся к таким видам биологической активности, которые являются свойственными Fc-области (Fc-области с нативной последовательностью или варианта Fc-области по аминокислотной последовательности) антитела, и варьируют в зависимости от изотипа антитела. Примеры эффекторных функций антитела включают: связывание C1q и комплементзависимую цитотоксичность (CDC); связывание Fc-рецептора; антителозависимую клеточно-опосредуемую цитотоксичность (ADCC); фагоцитоз; отрицательную регуляцию рецепторов клеточной поверхности (например, B-клеточного рецептора; BCR) и активацию B-клеток.

Термин "Fc-область" используют в настоящем документе для определения C-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина, включая Fc-области с нативной последовательностью и варианты Fc-областей. Хотя границы Fc-области тяжелой цепи иммуноглобулина могут варьировать, Fc-область тяжелой цепи IgG человека обычно определяют как отрезок от аминокислотного остатка в положении Cys226, или от Pro230, до его C-конца. C-концевой лизин (остаток 447 в системе нумерации EU) Fc-области может быть удален, например, в процессе получения или очистки антитела, или при рекомбинантном конструировании нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелую цепь антитела. Соответственно, композиция целых антител может включать совокупности антител, во всех из которых удален остаток K447, совокупности антител, в которых не удален остаток K447, и совокупности антител, содержащие смесь антител, содержащих и не содержащих остаток K447.

"Функциональная Fc-область" обладает "эффекторной функцией" Fc-области с нативной последовательностью. Примеры "эффекторных функций" включают связывание C1q; CDC; связывание Fc-рецептора; ADCC; фагоцитоз; отрицательную регуляцию рецепторов клеточной поверхности (например, рецептора B-клеток; BCR) и т.д. Такие эффекторные функции обычно требуют, чтобы Fc-область была объединена со связывающим доменом (например, вариабельным доменом антитела) и их можно оценить, используя различные анализы, как описано, например, в разделе "Определения", настоящего документа.

"Fc-область с нативной последовательностью" включает аминокислотную последовательность, идентичную нативной аминокислотной последовательности Fc-области. Fc-области человека с нативной последовательностью включают Fc-область IgG1 человека с нативной последовательностью (аллотипы не-A и A); Fc-область IgG2 человека с нативной последовательностью; Fc-область IgG3 человека с нативной последовательностью; и Fc-область IgG4 человека с нативной последовательностью, а также их природные варианты.

"Вариант Fc-области" включает аминокислотную последовательность, которая отличается от Fc-области с нативной последовательностью тем, что содержит по

меньшей мере одну модификацию аминокислоты, предпочтительно одну или несколько аминокислотную замену(замен). Предпочтительно, вариант Fc-области включает по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с Fc-областью с нативной последовательностью или с Fc-областью исходного полипептида, например от

5 приблизительно одной до приблизительно десяти аминокислотных замен, и предпочтительно от приблизительно одной до приблизительно пяти аминокислотных замен в Fc-области с нативной последовательностью или в Fc-области исходного полипептида. Вариант Fc-области в настоящем документе предпочтительно обладает по меньшей мере приблизительно 80% гомологией с Fc-областью с нативной

10 последовательностью и/или Fc-областью исходного полипептида, и наиболее предпочтительно он обладает гомологией с ними по меньшей мере приблизительно 90%, более предпочтительно он обладает гомологией с ними по меньшей мере приблизительно 95%.

Термины "Fc-рецептор" или "FcR" обозначают рецептор, который связывается с Fc-областью антитела. В некоторых вариантах осуществления FcR представляет собой FcR человека с нативной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления FcR представляет собой FcR, который связывает антитело IgG (гамма-рецептор) и включает рецепторы подклассов FcγRI, FcγRII и FcγRIII, в том числе аллельные варианты и альтернативно-сплайсированные формы этих рецепторов. Рецепторы FcγRII включают

15 FcγRIIA ("активирующий рецептор") и FcγRIIB ("ингибирующий рецептор"), которые обладают сходными аминокислотными последовательностями, отличающимися, главным образом, своими цитоплазматическими доменами. Активирующий рецептор FcγRIIA в своем цитоплазматическом домене содержит иммунорецепторный тирозин-связывающий активирующий мотив (ITAM). Ингибирующий рецептор FcγRIIB в своем

20 цитоплазматическом домене содержит иммунорецепторный тирозин-связывающий ингибирующий мотив (ITIM), (см. обзор М. в Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)). FcR описаны в Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991); Capel et al., Immunomethods 4:25-34 (1994); и de Haas et al., J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995). К термину "FcR" в настоящем описании относятся другие FcR, в том числе FcR, которые

30 будут выявлены в будущем.

Термин "Fc рецептор" или "FcR" также включает неонатальный рецептор, FcRn, который ответствен за перенос материнских IgG в плод (Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976) и Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)) и регуляцию гомеостаза иммуноглобулинов. Способы определения связывания с FcRn известны (см., например, Ghetie and Ward.,

35 Immunol. Today 18(12):592-598 (1997); Ghetie et al, Nature Biotechnology, 15(7):637-640 (1997); Hinton et al, J. Biol. Chem. 279(8):6213-6216 (2004); WO 2004/92219 (Hinton et al).

Связывание с FcRn человека *in vivo* и период полужизни в сыворотке для полипептидов с высокой аффинностью связывания FcRn человека можно анализировать, например, у трансгенных мышей или в трансфицированных клеточных линиях человека,

40 экспрессирующих FcRn человека, или у приматов, которым вводят полипептиды с вариантом Fc-области. В WO 2000/42072 (Presta) описаны варианты антител с повышенным или сниженным связыванием с FcR. См. также, например, Shields et al. J. Biol. Chem. 9(2):6591-6604 (2001).

"Эффекторные клетки человека" представляют собой лейкоциты, которые

45 экспрессируют один или несколько FcR и выполняют эффекторные функции. В некоторых вариантах осуществления клетки экспрессируют по меньшей мере FcγRIII и выполняют эффекторную функцию ADCC. Примеры лейкоцитов человека, которые осуществляют ADCC, включают периферические мононуклеарные клетки крови (PBMC),

естественные киллерные (NK) клетки, моноциты, цитотоксические Т-клетки и нейтрофилы; при этом предпочтительными являются РВМС и NK-клетки. Эффекторные клетки можно выделять из их природных источников, например, из крови.

"Антителозависимая клеточно-опосредуемая цитотоксичность" или "ADCC" относится к форме цитотоксичности, при которой секретируемые Ig, связанные с Fc-рецепторами (FcR), находящимися на определенных цитотоксических клетках (например, естественных киллерных (NK) клетках, нейтрофилах и макрофагах), вызывают специфичное для этих цитотоксических эффекторных клеток связывание с несущей антиген клеткой-мишенью, а затем уничтожают клетки-мишени посредством цитотоксинов. Основные клетки для осуществления ADCC, NK-клетки, экспрессируют только FcγRIII, в то время как моноциты экспрессируют FcγRI, FcγRII и FcγRIII. Экспрессия FcR на кроветворных клетках представлена в таблице 3 на странице 464 Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991). Для оценки активности представляющей интерес молекулы в отношении ADCC можно проводить анализ ADCC *in vitro*, такой как анализ, описанный в патенте США No. 5500362 или 5821337 или в патенте США No.6737056 (Presta). Пригодные для таких анализов эффекторные клетки включают РВМС и NK-клетки. Альтернативно, или дополнительно, активность представляющей интерес молекулы в отношении ADCC можно оценивать *in vivo*, например, в модели на животных, такой как описана в Clynes et al. *PNAS (USA)* 95:652-656 (1998).

"Комплементзависимая цитотоксичность" или "CDC" относится к лизису клетки-мишени в присутствии комплемента. Активация классического каскада комплемента начинается со связывания первого компонента системы комплемента (C1q) с антителами (соответствующего подкласса), связанными с распознаваемым им антигеном. Для оценки активации комплемента можно проводить анализ CDC, например, как описано в Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996). Варианты полипептидов с измененными аминокислотными последовательностями Fc-областью и повышенной или сниженной способностью связывать C1q описаны в патенте США No. 6194551B1 и WO99/51642. См. также, Idusogie et al. *J. Immunol.* 164:4178-4184 (2000).

Термин "содержащее Fc-область антитело" относится к антителу, которое включает Fc-область. С-концевой лизин (остаток 447 согласно системе нумерации EU) Fc-области может быть удален, например, во время очистки антитела или путем рекомбинантного конструирования антитела. Таким образом, композиция, включающая содержащее Fc-область антитело в соответствии с настоящим изобретением, может включать антитело, содержащее K447, антитело, из которого полностью удален K447, или смесь антител, содержащих и не содержащих остаток K447.

"Аффинность связывания", как правило, относится к силе полной суммы нековалентных взаимодействий между единичным участком связывания молекулы (например, антитела) и ее партнера по связыванию (например, антигена). Если нет иных указаний, "аффинность связывания" в настоящем документе, относится к присущей аффинности, которая отражает взаимодействие 1:1 между членами связывающей пары (например, антителом и антигеном). Аффинность молекулы X в отношении ее партнера Y, как правило, может быть выражена константой диссоциации (Kd). Аффинность можно измерять общепринятыми способами, известными в данной области, включая способы, описанные в настоящем документе. Низкоаффинные антитела, как правило, связывают антиген медленно и имеют тенденцию к легкой диссоциации, в то время как высокоаффинные антитела, как правило, связывают антиген быстрее и имеют тенденцию к тому, чтобы дольше оставаться связанными. В данной области известно множество способов измерения аффинности связывания, любые из которых можно использовать

для целей настоящего изобретения. Конкретные иллюстративные и типичные варианты осуществления для измерения аффинности связывания описаны ниже.

В одном варианте осуществления "Kd" или "величину Kd" в соответствии с настоящим изобретением измеряют с помощью анализа связывания меченного радиоактивной меткой антигена (RIA), проводимого с Fab-версией представляющего интерес антитела и его антигеном, как описано в следующем анализе, в котором измеряют аффинность связывания Fab с антигеном в растворе путем уравнивания Fab минимальной концентрацией (^{125}I)-меченного антигена в присутствии серии титров немеченого антигена, с последующей фиксацией связанного антигена на планшете, покрытом антителом против (см. Chen, et al., J. Mol. Biol 293:865-881 (1999)). Чтобы установить условия для анализа, на многолуночные планшеты MICROTITER® (Dynex) наносят в течение ночи 5 мкг/мл фиксирующего антитела против Fab (Cappel Labs) в 50 мМ растворе карбоната натрия (pH 9,6), а затем блокируют с использованием 2% (масс./об.) бычьего сывороточного альбумина в PBS в течение от двух до пяти часов при комнатной температуре (приблизительно 23°C). В неадсорбирующей планшете (Nunc #269620), 100 пМ или 26 пМ [^{125}I]-антигена смешивают с серийными разведениями представляющего интерес Fab (например, в соответствии с антителом против VEGF, Fab-12, в Presta et al., Cancer Res. 57:4593-4599) (1997). Затем представляющий интерес Fab инкубируют в течение ночи; однако, инкубацию можно продолжать в течение более длительного периода (например, 65 часов), чтобы убедиться в том, что равновесие достигнуто. После этого смеси переносят на фиксирующий планшет для инкубации при комнатной температуре (например, в течение 1 часа). Затем раствор удаляют, и планшет промывают восемь раз 0,1% TWEEN-20TM в PBS. После того, как планшеты высыхают, добавляют 150 мкл/лунка сцинтиллятора (MICROSCINT-20TM; Packard), и проводят подсчет в планшетах с использованием счетчика гамма-импульсов TOPCOUNTTM (Packard) в течение десяти минут. Концентрации каждого из Fab, которые обеспечивают связывание, меньшее или равное 20% от максимального связывания, выбирают для использования в конкурентных анализах связывания.

В соответствии с другим вариантом осуществления Kd или величину Kd измеряют с использованием анализа способом поверхностного плазмонного резонанса с использованием BIACORE®-2000 или BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) при 25°C с чипами CM5 с иммобилизованным на них антигеном при ~10 единицах ответа (RU). В кратком изложении, биосенсорные чипы из карбоксиметилированного декстрана (CM5, BIACORE Inc.) активируют гидрохлоридом N-этил-N'-(3-диметиламинопропил) карбодиимида (EDC) и N-гидроксисукцинимидом (NHS) в соответствии с инструкциями поставщика. Антиген разбавляют 10 мМ ацетатом натрия, pH 4,8, до 5 мкг/мл (~0,2 мкМ) перед инъекцией со скоростью потока 5 мкл/минута для достижения приблизительно 10 единиц ответа (RU) связанного белка. После инъекции антигена инъецируют 1 М этаноламин для блокирования не вступивших в реакцию групп. Для определения показателей кинетики, инъецируют двукратные серийные разведения Fab (от 0,78 нМ до 500 нМ) в PBS с 0,05% TWEEN-20TM (PBST) при 25°C со скоростью потока приблизительно 25 мкл/мин. Константу ассоциации (k_{on}) и константу диссоциации (k_{off}) вычисляют с использованием простой модели связывания Ленгмюра "один к одному" (BIACORE® Evaluation Software версии 3.2) посредством одновременного приведения в соответствие сенсограмм ассоциации и диссоциации. Равновесную

константу диссоциации (K_d) вычисляют как соотношение k_{off}/k_{on} . См., например, Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999). Если константа ассоциации антитела превышает $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ в анализе способом поверхностного плазмонного резонанса, указанным выше, тогда константу ассоциации можно определять с использованием способа тушения флуоресценции, в котором измеряют повышение или снижение интенсивности испускания флуоресценции (возбуждение = 295 нм; испускание = 340 нм, полоса пропускания 16 нм) при 25°C 20 нМ антитела (форма Fab) в PBS, pH 7,2, в присутствии возрастающих концентраций антигена при измерении в спектрофотометре, таком как спектрофотометр с останавливаемой струей (Aviv Instruments) или спектрофотометр SLM-AMINCO™ серии 8000 (ThermoSpectronic) с перемешиваемой кюветой.

"Скорость связывания" или "скорость ассоциации" или "скорость соединения" или " k_{on} " согласно настоящему изобретению также можно определять, как описано выше с использованием систем BIACORE®-2000 или BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ).

Выражение "по существу сходный" или "по существу такой же" в настоящем документе обозначает достаточно высокую степень сходства между двумя числовыми значениями (как правило, одно связано с антителом по изобретению, а другое связано с эталонным/сравнительным антителом), так что специалист в данной области может считать различие между двумя значениями небольшим или не имеющим биологической и/или статистической значимости в контексте биологического признака, измеряемого указанными значениями (например, значениями K_d). Различие между указанными двумя значениями предпочтительно составляет менее чем приблизительно 50%, предпочтительно менее чем приблизительно 40%, предпочтительно менее чем приблизительно 30%, предпочтительно менее чем приблизительно 20%, и/или менее чем приблизительно 10% в качестве функции от значения для эталонного/сравнительного антитела.

Выражение "значимо сниженный" или "значимо отличающийся" в настоящем документе обозначает значимую высокую степень отличия между двумя числовыми значениями (как правило, одно связано с молекулой, а другое связано с эталонной/сравнительной молекулой), так что специалист в данной области может считать различие между двумя значениями статистически значимым в контексте биологического признака, измеряемого указанными значениями (например, значениями K_d). Различие между указанными двумя значениями предпочтительно составляет более чем приблизительно 10%, более чем приблизительно 20%, более чем приблизительно 30%, более чем приблизительно 40%, и/или более чем приблизительно 50% в качестве функции от значения для эталонной/сравнительной молекулы.

"Акцепторная каркасная область человека" или "человеческая каркасная область" для целей настоящего описания представляет собой каркасную область, содержащую аминокислотную последовательность каркасной области VL или VH, образованной каркасной областью иммуноглобулина человека или консенсусной последовательностью каркасной области человека. Акцепторная каркасная область человека, "образованная" каркасной областью иммуноглобулина человека или консенсусной последовательностью каркасной области человека, может содержать такую же как и в них аминокислотную последовательность, или она может содержать предсуществующие изменения в аминокислотных последовательностях. В некоторых вариантах осуществления количество предсуществующих аминокислотных изменений составляет 10 или менее, 9 или менее, 8 или менее, 7 или менее, 6 или менее, 5 или менее, 4 или менее, 3 или менее

или 2 или менее. Когда предсуществующие аминокислотные изменения присутствуют в VH, предпочтительно, чтобы указанные изменения существовали только в трех, двух или одном из положений 71H, 73H и 78H; например, аминокислотные остатки в указанных положениях могут представлять собой 71A, 73T и/или 78A. В одном варианте осуществления акцепторная каркасная область VL человека идентична по последовательности каркасной области VL иммуноглобулина человека или консенсусной последовательности каркасной области человека.

"Консенсусная каркасная область человека" представляет собой каркасную область, которая представляет собой наиболее часто встречающиеся аминокислотные остатки при выборе каркасных последовательностей VL или VH иммуноглобулина человека. Обычно выбор последовательностей VL или VH иммуноглобулина человека осуществляют из подгруппы последовательностей переменных доменов. Обычно подгруппа последовательностей представляет собой подгруппу согласно Kabat et al, выше. В одном варианте осуществления для VL подгруппа представляет собой подгруппу каппа I по Kabat et al, выше. В одном варианте осуществления для VH подгруппа представляет собой подгруппу III по Kabat et al, выше.

"Консенсусная каркасная область VH подгруппы III" включает консенсусную последовательность, образованную аминокислотными последовательностями переменных областей тяжелой цепи подгруппы III по Kabat et al, выше. В одном варианте осуществления аминокислотная последовательность консенсусной каркасной области VH подгруппы III включает по меньшей мере часть или все из каждой из следующих последовательностей: (SEQ ID NO: 50)-H1-(SEQ ID NO: 51)-H2-(SEQ ID NO: 57 или 59)-H3-(SEQ ID NO: 35). В некоторых вариантах осуществления последний остаток (S11) SEQ ID NO: 35 заменен аланином.

"Консенсусная каркасная область VL подгруппы I" включает консенсусную последовательность образованную аминокислотными последовательностями переменных областей легкой цепи каппа подгруппы I по Kabat et al., выше. В одном варианте осуществления аминокислотная последовательность консенсусной каркасной области VH подгруппы I включает по меньшей мере часть или все из каждой из следующих последовательностей: (SEQ ID NO: 60)-L1-(SEQ ID NO: 61)-L2-(SEQ ID NO: 62)-L3-(SEQ ID NO: 63).

"Очищенный" означает, что молекула присутствует в образце в концентрации по меньшей мере 95% по массе, или по меньшей мере 98% по массе образца, в котором она содержится.

"Выделенная" молекула нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая отделена по меньшей мере от одной другой молекулы нуклеиновой кислоты, с которой она обычно ассоциирована, например, в ее природном окружении. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кроме того, включает молекулу нуклеиновой кислоты, содержащуюся в клетках, которые обычно экспрессируют молекулу нуклеиновой кислоты, но молекула нуклеиновой кислоты находится вне хромосомы или в области хромосомы, которая отличается от ее природного расположения на хромосоме.

Термин "вектор" в настоящем документе относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной осуществлять транспорт другой нуклеиновой кислоты, с которой она связана. Одним типом вектора является "плазмида", которая относится к кольцевой двухцепочечной петле ДНК, в которую можно лигировать дополнительные сегменты ДНК. Другим типом вектора является фаговый вектор. Другим типом вектора является вирусный вектор, где дополнительные сегменты ДНК можно лигировать в вирусный

геном. Определенные векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они введены (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальный ориджин репликации и эписомальные векторы млекопитающих). Другие векторы (например, неэписомальные векторы млекопитающих) могут встраиваться в геном клетки-хозяина при введении в клетку-хозяина, и, тем самым, они реплицируются вместе с геномом хозяина. Более того, некоторые векторы способны направлять экспрессию генов, с которыми они функционально связаны. Такие векторы называют в настоящем документе "рекомбинантными экспрессирующими векторами" или просто "экспрессирующими векторами". Как правило, экспрессирующие векторы, применяемые в способах рекомбинантных ДНК, часто имеют форму плазмид. В настоящем описании термины "плазида" и "вектор" могут быть использованы взаимозаменяемо, поскольку плазида является наиболее часто используемой формой вектора.

Термин "полинуклеотид" или "нуклеиновая кислота", используемые в настоящем документе взаимозаменяемо, относится к полимерам нуклеотидов любой длины, и включают ДНК и РНК. Нуклеотиды могут представлять собой дезоксирибонуклеотиды, рибонуклеотиды, модифицированные нуклеотиды или основания, и/или их аналоги, или любой субстрат, который может быть включен в полимер ДНК- или РНК-полимеразой, или посредством синтетической реакции. Полинуклеотид может содержать модифицированные нуклеотиды, такие как метилированные нуклеотиды и их аналоги. До и после сборки полимера может происходить модификация нуклеотидной структуры, если она происходит. Последовательность нуклеотидов может прерываться ненуклеотидными компонентами. Кроме того, полинуклеотид может быть модифицирован после полимеризации, например, конъюгацией с осуществляющим мечение компонентом. Другие типы модификаций включают, например, "кэпы", замену одного или нескольких природных нуклеотидов аналогом, межнуклеотидные модификации, например, такие как модификации незаряженными связями (например, метилфосфонатами, фосфотриэфирами, фосфоамидатами, карбаматами и т.д.) и заряженными связями (например, фосфоротиоатами, фосфородитиоатами, и т.д.), модификации выступающими группами, например, такими как белки (например, нуклеазы, токсины, антитела, сигнальные пептиды, поли-L-лизин и т.д.), модификации интеркаляторами (например, акридином, псораленом, и т.д.), модификации хелаторами (например, металлами, радиоактивными металлами, бором, окислительными металлами и т.д.), модификации алкилирующими соединениями, модификации модифицированными связями (например, альфа-аномерные нуклеиновые кислоты и т.д.), а также немодифицированные формы полинуклеотида(ов). Кроме того, любые гидроксильные группы, обычно присутствующие в сахарах, могут быть заменены, например, фосфонатными группами, фосфатными группами, они могут быть защищены стандартными защитными группами или активированы для образования дополнительных связей с дополнительными нуклеотидами, или они могут быть конъюгированы с твердыми подложками. 5'- и 3'-концевой ОН может быть фосфорилирован или замещен аминами или органическими кэпирующими группами из от 1 до 20 атомов углерода. Другие гидроксилы также могут быть преобразованы в стандартные защитные группы. Полинуклеотиды также могут содержать аналогичные формы сахаров рибозы или дезоксирибозы, которые, главным образом, известны в данной области, включая, например, 2'-О-метил-, 2'-О-аллил-, 2'-фтор- или 2'-азидорибозу, карбоциклические аналоги сахаров, альфа-аномерные сахара, эпимерные сахара, такие как арабиноза, ксилозы или ликсозы, сахара пиранозы, сахара фуранозы, седогептулозы, ациклические аналоги и абазические нуклеозидные аналоги, такие как метилрибозид.

Одна или несколько фосфодиэфирных связей могут быть заменены альтернативными линкерными группами. Эти альтернативные линкерные группы включают, но не ограничиваются ими, варианты осуществления где фосфат заменен на P(O)S ("тиоат"), P(S)S ("дитиоат"), "(O)NR₂" ("амидат"), P(O)R, P(O)OR', CO или CH₂ ("формацеталь"), где

каждый R или R' независимо представляет собой H или замещенный или незамещенный алкил (1-20 C), необязательно содержащий простую эфирную связь (-O-), арил, алкенил, циклоалкил, циклоалкенил или аралдил. Не обязательно, чтобы все связи в полинуклеотиде были идентичными. Представленное выше описание применимо ко всем полинуклеотидам, указанным в настоящем документе, включая РНК и ДНК.

"Олигонуклеотид" в настоящем документе относится, главным образом, к коротким, как правило, одноцепочечным, как правило, синтетическим полинуклеотидам длиной, как правило, но не обязательно, менее 200 нуклеотидов. Термины "олигонуклеотид" и "полинуклеотид" не являются взаимоисключающими. Представленное выше описание полинуклеотидов в равной степени и полностью применимо к олигонуклеотидам.

Термин "Notch" в настоящем документе относится к любому нативному Notch (Notch1-4) из любого являющегося его источником позвоночного, включая млекопитающих, таких как приматы (например, люди) и грызунов (например, мышей и крыс), если нет иных указаний. Термин охватывает "полноразмерный" непротессированный Notch, а также любую форму Notch, которая является следствием процессинга в клетке. Термин также охватывает природные варианты Notch, например, варианты по сплайсингу или аллельные варианты.

Термин "Notch1" в настоящем документе относится к любому нативному Notch1 из любого являющегося источником позвоночного, включая млекопитающих, таких как приматы (например, люди) и грызуны (например, мыши и крысы), если нет иных указаний. Термин охватывает "полноразмерный" непротессированный Notch1, а также любую форму Notch1, которая является следствием процессинга в клетке. Термин также охватывает природные варианты Notch1, например, варианты по сплайсингу или аллельные варианты.

Термин "Notch2" в настоящем документе относится к любому нативному Notch2 из любого являющегося источником позвоночного, включая млекопитающих, таких как приматы (например, люди) и грызуны (например, мыши и крысы), если нет иных указаний. Термин охватывает "полноразмерный" непротессированный Notch2, а также любую форму Notch2, которая является следствием процессинга в клетке. Термин также охватывает природные варианты Notch2, например, варианты по сплайсингу или аллельные варианты.

Термин "активность Notch2" относится к передаче сигнала Notch2. Средство (например, антитело), которое "ингибирует активность Notch2" в значительной степени снижает передачу сигнала Notch2 относительно уровня передачи сигнала Notch2, наблюдаемого у соответствующего контроля по существу в идентичных условиях. В определенных вариантах осуществления активность Notch2 можно оценивать с помощью пригодного репортерного анализа, как описано в настоящем документе в примере В (2). В определенных вариантах осуществления активность Notch2 можно оценивать путем измерения образования клеток маргинальной В-зоны, как описано в настоящем документе в примере В(4). В определенных вариантах осуществления снижение передачи сигнала Notch2 по меньшей мере в 2, 3, 4, 5 или 10 раз ниже уровня, наблюдаемого в контроле.

Термин "NRR Notch2" относится к области Notch2, состоящей из трех модулей LNR (LNR-A, LNR-B и LNR-C) и HD-домена (HD-N и HD-C). Иллюстративные

последовательности NRR Notch2 человека и мыши представлены на фигуре 18 (SEQ ID NO: 28 и 29, соответственно). NRR Notch2 может состоять из нековалентно связанных фрагментов, например, которые являются результатом процессинга Notch2 в S1, а также из единой непрерывной полипептидной последовательности. В качестве примера и ссылаясь на фигуру 18, NRR Notch2 человека может состоять из аминокислот 1422-1677 Notch2 человека (SEQ ID NO: 75), или альтернативно аминокислот 1422-1608 SEQ ID NO: 75, нековалентно связанных с аминокислотами 1609-1677 SEQ ID NO: 75.

"Процентную (%) идентичность аминокислотных последовательностей" в отношении последовательности эталонного полипептида определяют как процент аминокислотных остатков в последовательности-кандидате, которые идентичны аминокислотным остаткам в последовательности эталонного полипептида, после выравнивания последовательностей и внесения пропусков, если необходимо, для достижения максимальной процентной идентичности последовательностей, и не считая какие-либо консервативные замены частью идентичности последовательностей. Выравнивание для целей определения процентной идентичности аминокислотных последовательностей можно проводить различными способами, которые находятся в пределах специальных знаний, например, с использованием общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как программное обеспечение BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области могут определить соответствующие параметры для проведения выравнивания, включая любые алгоритмы, требуемые для достижения максимального выравнивания на протяжении всей длины сравниваемых последовательностей. Однако для целей, представленных в настоящем документе, значения % идентичности аминокислотных последовательностей получают с использованием компьютерной программы для сравнения последовательностей ALIGN-2. Компьютерная программа для сравнения последовательностей ALIGN-2 была составлена в Genentech, Inc. и исходный текст был представлен с пользовательской документацией в U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, где он зарегистрирован под U.S. Copyright Registration No. TXU510087. Программа ALIGN-2 является общедоступной через Genentech, Inc., South San Francisco, California или ее можно составить из исходного текста, представленного в таблице 1, ниже. Программа ALIGN-2 должна быть составлена для применения на операционной системе UNIX, предпочтительно цифровой UNIX V4.0D. Все параметры сравнения последовательностей установлены программой ALIGN-2 и не изменяются.

В случаях, когда ALIGN-2 используют для сравнений аминокислотных последовательностей, % идентичность аминокислотных последовательностей для данной аминокислотной последовательности А к, с или против данной аминокислотной последовательности В (что альтернативно может быть сформулировано как данная аминокислотная последовательность А, которая обладает определенной % идентичностью аминокислотной последовательности, содержит % идентичность аминокислотной последовательности, к, с или против данной аминокислотной последовательности В), или вычисляют следующим образом:

$$100 \text{ умножить на частное } X/Y$$

где X представляет собой число аминокислотных остатков, оцененных как идентичные совпадения программой для выравнивания последовательностей ALIGN-2 при выравнивании этой программой А и В, и где Y представляет собой общее количество аминокислотных остатков в В. Понятно, что когда длина аминокислотной последовательности А не равна длине аминокислотной последовательности В, % идентичность аминокислотных последовательностей А к В не равна % идентичности

аминокислотных последовательностей В к А. Если нет иных конкретных указаний, все величины % идентичности аминокислотных последовательностей, использованные в настоящем документе, получены, как описано в предыдущем абзаце с использованием компьютерной программы ALIGN-2.

5 "Нарушение" представляет собой любое состояние, при котором может быть полезным лечение композицией или способом по изобретению. Оно включает хронические и острые нарушения или заболевания, включая патологические состояния, которые предрасполагают млекопитающего к рассматриваемому нарушению. Неограничивающие примеры нарушений, подлежащих лечению согласно настоящему
10 описанию, включают такие состояния, как злокачественная опухоль.

"В-клеточные злокачественные опухоли", также называемые "В-клеточными новообразованиями", включают, но не ограничиваются ими, болезнь Ходжкина (например, болезнь Ходжкина с преобладанием лимфоцитов (LPHD)); неходжкинскую лимфому (NHL); лимфомы фолликулярных центральных клеток (FCC); острый
15 лимфоцитарный лейкоз (ALL, также называемый В-ALL); лейкоз предшественников В-лимфоцитов; хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL, также называемый В-CLL); волосатоклеточный лейкоз; лимфомы В-клеток маргинальной зоны (включая узелковый, MALT и селезеночный типы); множественную миелому (плазмацитому, миелому плазматических клеток); лимфомы мелких клеток с нерасщепленным ядром (например,
20 лимфома Беркитта); крупноклеточные лимфомы (включая диффузную крупноклеточную (В-клеточную) лимфому, диффузную лимфому смешанных клеток и иммунобластную лимфому); лимфома из клеток мантийной зоны; мелколимфоцитарную лимфому; связанную со СПИД лимфому и макроглобулинемию Вальденстрема. Вялотекущая лимфома представляет собой медленно растущее неизлечимое заболевание, при котором
25 в среднем пациент выживает между шестью и 10 годами после многочисленных периодов ремиссии и обострения; агрессивные лимфомы представляют собой быстрорастущие формы лимфомы, охватывающие высокозлокачественные и некоторые категории среднезлокачественных NHL.

Термин "меланома" относится к злокачественной опухоли меланоцитов, которые
30 встречаются, главным образом, в коже, однако которые также встречаются в глазу (уvealная меланома) или в кишечнике.

В настоящем документе "лечение" (и его варианты, такие как "лечить" или "проведение лечения") относится к клиническому вмешательству в попытках изменения естественного течения у индивидуума или в клетке, подвергаемых лечению, и его можно проводить
35 либо для профилактики, либо в ходе клинической патологии. Желаемые эффекты лечения включают предотвращение возникновения или рецидива заболевания, смягчение симптомов, уменьшение любого прямого или непрямого патологического последствия заболевания, предотвращение метастазирования, снижение скорости прогрессирования заболевания, смягчение или временное облегчение болезненного состояния и ремиссию
40 или улучшенный прогноз. В некоторых вариантах осуществления антитела по изобретению используют для замедления развития заболевания или нарушения или для замедления прогрессирования заболевания или нарушения.

"Индивидуум", "субъект" или "пациент" представляет собой позвоночное. В определенных вариантах осуществления позвоночным является млекопитающее.
45 Млекопитающие включают, но не ограничиваются ими, сельскохозяйственных животных (таких как коровы), спортивных животных, домашних животных (таких как кошки, собаки и лошади), приматов, мышей и крыс. В определенных вариантах осуществления млекопитающим является человек.

Термин "фармацевтический состав" относится к препарату, который имеет такую форму, чтобы обеспечить эффективность биологической активности активного ингредиента, и который не содержит дополнительных компонентов, которые являются неприемлемо токсичными для индивидуума, которому состав будут вводить. Такие составы могут быть стерильными.

"Стерильный" состав является асептическим или не содержит живых микроорганизмов и их спор.

"Эффективное количество" антитела относится к количеству, эффективному, в необходимых дозировках и в течение необходимых периодов времени, для осуществления желаемой терапевтической или профилактической цели.

"Терапевтически эффективное количество" вещества/молекулы по изобретению может варьировать, в зависимости от таких факторов, как болезненное состояние, возраст, пол и масса индивидуума и способность вещества/молекулы вызывать желаемый ответ у индивидуума. Терапевтически эффективное количество охватывает количество, в котором над любыми токсическими или вредными эффектами вещества/молекулы преобладают терапевтически полезные эффекты. "Профилактически эффективное количество" относится к количеству, эффективному, в необходимых дозировках и в течение необходимых периодов времени, для достижения требуемого профилактического результата. Как правило, но не обязательно, поскольку профилактическую дозу используют у субъектов до заболевания или на его ранних стадиях, профилактически эффективное количество будет меньшим, чем терапевтически эффективное количество.

Термин "цитотоксическое средство" в настоящем документе относится к веществу, которое ингибирует функционирование клеток, или препятствует ему, и/или вызывает разрушение клеток. Подразумевают, что термин включает радиоактивные изотопы (например, At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} и радиоактивные изотопы Lu), химиотерапевтические средства, например метотрексат, адриамицин, алкалоиды барвинка (винкристин, винбластин, этопозид), доксорубицин, мелфалан, митомицин С, хлорамбуцил, даунорубицин или другие интеркалирующие вещества, ферменты и их фрагменты, такие как нуклеолитические ферменты, антибиотики и токсины, такие как низкомолекулярные токсины или ферментативно активные токсины из бактерий, грибов, растений или животных, включая их фрагменты и/или варианты, и различные противоопухолевые средства или средства против злокачественной опухоли, как описано ниже. Другие цитотоксические средства описаны ниже. Уничтожающее опухолевые клетки средство вызывает разрушение опухолевых клеток.

"Токсин" представляет собой любое вещество, способное оказывать вредный эффект на рост или пролиферацию клетки.

"Химиотерапевтическое средство" представляет собой химическое соединение, полезное при лечении злокачественной опухоли. Примеры химиотерапевтических средств включают алкилирующие средства, такие как тиотепа и циклофосфамид (CYTOXAN®); алкилсульфонаты, такие как бисульфат, импросульфат и пипосульфат; азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, в том числе альтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентифосфорамид и триметилломеламин; ацетогинины (особенно буллатацин и буллатацинон); дельта-9-тетрагидроканнабиол (дронабинол, MARINOL®); бета-лапахон; лапахол; колхицины; бетулиновую кислоту; камптотецин (в том числе синтетический аналог топотекан (HYCAMTIN®), CPT-11 (иринотекан, CAMPTOSAR®), ацетилкамптотецин, скополектин и 9-аминокамптотецин); бриостатин; каллистатин;

СС-1065 (в том числе его синтетические аналоги адозелезин, карзелезин и бизелезин);
 подофиллотоксин; подофиллиновую кислоту; тенипозид; криптофицины (в частности,
 криптофицин 1 и криптофицин 8); доластатин; дуокармицин (в том числе синтетические
 аналоги KW-2189 и CB1-TM1); элеутеробин; панкрастатин; саркодиктиин; спонгистатин;
 5 азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, холофосфамид, эстрамустин,
 ифосфамид, мехлорэтамин, мехлорэтамину оксида гидрохлорид, мелфалан, новэмбихин,
 фенестерин, преднемустин, трофосфамид, иприт урацила; нитрозомочневина, такая
 как кармустин, хлорзотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин и ранимустин;
 10 антибиотики, такие как эндииновые антибиотики (например, калихеамицин, особенно,
 калихеамицин гамма I и калихеамицин омега I (см., например, Agnew, *Chem Intl. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994)); CDP323, пероральный ингибитор альфа-4 интегрина, динемидин,
 в том числе динемидин А; эсперамицин; а также хромофор неокарциностатин и сходные
 хромофоры хромопротеиновых эндииновых антибиотиков), аклациномизины,
 15 актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, карабицин,
 карминомицин, карцинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин,
 деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин (в том числе ADRIAMYCIN®,
 морфолино-доксорубицин, цианоморфолино-доксорубицин, 2-пирролино-доксорубицин,
 липосомную инъекцию доксорубицина-HCl (DOXIL®), липосомальный доксорубицин
 20 TLC D-99 (MYOCET®), пегилированный липосомальный доксорубицин (CAELYX®), и
 деоксидоксорубицин), эпирубицин, эзорубицин, идарубицин, марселломицин,
 митомицины, такие как митомицин С, микофеноловую кислоту, ногаламицин,
 оливомицины, пепломицин, потфирамицин, пурамицин, квеламицин, родорубицин,
 стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубицин;
 25 антиметаболиты, такие как метотрексат, гемцитабин (GEMZAR®), тегафур (UFTORAL®
), капецитабин (XELODA®), эпотионин и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты,
 такие как даноптерин, метотрексат, птероптерин, триметотрексат; аналоги пуринов, такие
 как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тiogуанин; аналоги пиримидинов, такие
 как анцитабин, азациитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидеоксиуридин,
 30 доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин; андрогены, такие как калустерон,
 дромостанолон пропионат, эпителиостанол, мепителиостан, тестостерон, антиадреналовые
 средства, такие как аминоглутетимид, митотан, трилостан; освежающий раствор на
 основе фолиевой кислоты, такой как фролиновая кислота; ацеглатон; гликозид
 альдофосфамида; аминолевулиновую кислоту; энилурацил; амсакрин; бестрабуцил;
 35 бисантрен; эдатраксат; дефофамин; демекольцин; диазиквон; элфорнитин; эллиптиния
 ацетат; эпотионин; этоглуцид; нитрат галлия; гидроксимочевину; лентинан; лонидаинин;
 майтанзиноиды, такие как майтанзин и ансамитоцины; митогуазон; митоксантрон;
 мопиданмол; нитраэрин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; лозоксантрон; 2-
 этилгидразид; прокарбазин; полисахаридный комплекс PSK® (JHS Natural Products,
 40 Eugene, OR); разоксан; ризоксин; сизофиран; спирогерманий; теназоновую кислоту;
 триазиквон; 2,2',2''-трихлортриэтиламин; трихотецены (особенно токсин Т-2, верракурин
 А, рорицин А и ангвидин); уретан; виндезин (ELDISINE®, FILLDISINE®), декарбазин;
 манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид ("Ara-
 45 С"); тиотепу; таксоид, например, паклитаксел (TAXOL®), сконструированный на основе
 альбумина препарат из наночастиц паклитаксела (ABRAXANE™) и доцетаксел
 (TAXOTERE®); хлорамбуцил; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; средства на

основе платины, такие как цисплатин, оксаплатин (например, ELOXATIN[®]) и карбоплатин; средства на основе барвинка, которые предотвращают полимеризацию тубулина при формировании микротрубочек, в том числе винбластин (VELBAN[®]),
 5 винкристин (ONCOVIN[®]), виндезин (ELDISINE[®], FILDESIN[®]) и винорелбин (NAVELBINE[®]); этопозид (VP-16); ифосфамид; митоксантрон; лейковорин; новантрон; эдатрексат; дауномицин; аминоптерин; ибандронат; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; диформетилорнитин (DMFO); ретиноиды, такие как ретиноевая кислота, в том
 10 числе бексаротен (TARGRETIN[®]); бифосфонаты, такие как клодронат (например, BONEFOS[®] или OSTAC[®]), этидронат (DIDROCAL[®]), NE-58095, золедроновая кислота/золедронат (ZOMETA[®]), алендронат (FOSAMAX[®]), памидронат (AREDIA[®]), тилудронат (SKELID[®]) или ризедронат (ACTONEL[®]); троксацитабин (1,3-диоксолановый
 15 нуклеозидный аналог цитозина); антисмысловые олигонуклеотиды, в частности олигонуклеотиды, которые ингибируют экспрессию генов сигнальных путей, вовлеченных в абберантную клеточную пролиферацию, таких как, например, *PKC-alpha*, *Raf*, *H-Ras* и рецептор эпидермального фактора роста (EGF-R); вакцины, такие как вакцина THERATOPE[®] и вакцины для генной терапии, например, вакцина
 20 ALLOVECTIN[®], вакцина LEUVECTIN[®], и вакцина VAXID[®]; ингибитор топоизомеразы 1 (например, LAUROTECAN[®]); rmRH (например, ABARELIX[®]); BAY439006 (сорафениб; Bayer); SU-11248 (Pfizer); перифозин, ингибитор COX-2 (например, целекоксиб или эторикоксиб), ингибитор протеасом (например, PS341); бортезомиб (VELCADE[®]); CCI-
 25 779; типифарниб (R11577); орафениб, ABT510; ингибитор Bcl-2, такой как облимерсен натрия (GENASENSE[®]); пиксантрон; ингибиторы EGFR (см. определение ниже); ингибиторы тирозинкиназы (см. определение ниже); ингибиторы серин-треонинкиназы, такие как рапамицин (сиролимус, RAPAMUNE[®]); ингибиторы фарнезилтрансферазы,
 30 такие как лонафарниб (SCH 6636, SARASARTM); и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из указанных выше; а также сочетания двух или более из указанных выше, такие как CHOP, сокращение для комбинированной терапии циклофосфамидом, доксорубицином, винкристином и преднизолоном, и FOLFOX, сокращение для режима лечения оксалиплатином (ELOXATINTM) в сочетании с 5-FU
 35 и лейковорином.

Химиотерапевтические средства, как определено в настоящем документе, включают "антигормональные средства" или "эндокринные лекарственные средства", которые действуют посредством регуляции, уменьшения, блокирования или ингибирования
 40 воздействия гормонов, которые могут стимулировать рост опухоли. Они сами по себе могут представлять собой гормоны, включая, но не ограничиваясь ими, антиэстрогены со смешанным профилем агонист/антагонист, в том числе, тамоксифен (NOLVADEX[®]), 4-гидрокситамоксифен, торемифен (FARESTON[®]), идоксифен, дролоксифен, ралоксифен (EVISTA[®]), триоксифен, кеоксифен и селективные модуляторы рецепторов эстрогена
 45 (SERM), такие как SERM3; полные антиэстрогены без свойств агонистов, такие как (FASLODEX[®]) и EM800 (такие средства могут блокировать димеризацию рецепторов эстрогенов (ER), ингибировать связывание ДНК, повышать обновление ER, и/или снижать уровень ER); ингибиторы ароматазы, в том числе стероидные ингибиторы

ароматазы, такие как форместан и экземестан (AROMASIN[®]) и нестероидные ингибиторы ароматазы, такие как анастразол (ARIMIDEX[®]), лектрозол (FEMARA[®]) и аминоклутетимид, и другие ингибиторы ароматазы, в том числе ворозол (RIVISOR[®]),
 5 ацетат магестрола (MEGASE[®]), фадрозол, и 4(5)-имидазолы; агонисты лютеинизирующего релизинг-гормона, в том числе леупролид (LUPRON[®] и ELIGARD[®]), гозерелин, бузерелин и триптерелин; половые стероидные гормоны, включающие прогестины, такие как ацетат магестрола и ацетат медроксипрогестерона, эстрогены,
 10 такие как диэтилстилбестрол и премарин, и андрогены/ретиноиды, такие как флуоксиместерон, полностью трансретиноевая кислота и фенретирид; онапристон; анти-прогестероны; ингибиторы рецепторов эстрогена (ERD); антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид и бикалутамид; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из указанных выше; а также комбинации двух или более из
 15 указанных выше.

"Ингибирующее рост средство", в настоящем документе, относится к соединению или композиции, которые ингибируют рост клетки (такой как клетка, экспрессирующая Notch), либо *in vitro*, либо *in vivo*. Таким образом, ингибирующее рост средство может представлять собой средство, которое значительно снижает процентное количество
 20 клеток (таких как клетка, экспрессирующая Notch) в S-фазе. Примеры ингибирующих рост средств включают средства, которые блокируют прогрессирование клеточного цикла (в месте, отличном от S-фазы), такие как средства, которые индуцируют остановку в G1-фазе и остановку M-фазе. Классические блокаторы M-фазы включают алкалоиды барвинка (винкристин и винбластин), таксаны и ингибиторы топоизомеразы II, такие
 25 как доксорубин, эпирубин, даунорубин, этопозид и блеомицин. Те средства, которые вызывают остановку в G1-фазе, также вовлекают остановку в S-фазе, например, алкилирующие ДНК средства, такие как тамоксифен, преднизон, декарбазин, мехлорэтамин, цисплатин, метотрексат, 5-фторурацил и ara-C. Дополнительную информацию можно найти в The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel, eds.,
 30 Chapter 1, entitled "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs", Murakami et al. (WB Saunders: Philadelphia, 1995), especially p. 13. Таксаны (паклитаксел и доцетаксел) представляют собой лекарственные средства против злокачественной опухоли, полученные из тисового дерева. Доцетаксел (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), полученный из тиса европейского, представляет собой полусинтетический аналог
 35 паклитаксела (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). Паклитаксел и доцетаксел обеспечивают сборку микротрубочек из димеров тубулина и стабилизируют микротрубочки, препятствуя деполимеризации, что приводит к ингибированию митоза в клетках.

III. КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ

Изобретение основано, частично, на идентификации связывающих Notch средств, например, антител и их фрагментов. В конкретных вариантах осуществления изобретение
 40 относится к средствам, связывающим отрицательную регуляторную область Notch2 (NRR), таким как выделенные антитела, которые связывают NRR Notch2 и его фрагменты. Такие антитела пригодны, например, для диагностики или лечения нарушений, ассоциированных с экспрессией и/или активностью Notch2 (например, повышенной экспрессией или активностью). В конкретных вариантах осуществления
 45 антитела против NRR Notch2 пригодны для диагностики или лечения злокачественной опухоли, например, В-клеточных злокачественных опухолей и меланомы. Таким образом, изобретение относится к способам, композициям, наборам и изделиям, связанным со связыванием NRR Notch2.

А. Антитела против NRR Notch2

1. Иллюстративные антитела, полученные с помощью фаговой библиотеки

В настоящем документе представлены иллюстративные моноклональные антитела, которые были получены с помощью фаговой библиотеки, как описано в примере В.

5 Было выделено антитело, обозначенное "антителом D", которое связывается с NRR Notch2. Это антитело подвергали созреванию аффинности с получением антител, обозначенных как антитело D-1, антитело D-2 и антитело D-3. Последовательности гипервариабельных областей тяжелой цепи и легкой цепи (HVR) антитела D, антитела D-1, антитела D-2 и антитела D-3, представлены на фигурах 1 и 2. Последовательности
10 вариабельных доменов тяжелой и легкой цепей антитела D, антитела D-1, антитела D-2 и антитела D-3 представлены на фигурах 3 и 4. Следующие варианты осуществления антител против NRR Notch2 представлены ниже.

В одном аспекте представлено антитело, которое специфично связывается с NRR Notch2, где антитело содержит по меньшей мере одну, две, три, четыре, пять или шесть
15 HVR, выбранных из:

- (a) HVR-H1, содержащей аминокислотную последовательность, которая соответствует консенсусной последовательности SEQ ID NO: 3;
- (b) HVR-H2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4;
- (c) HVR-H3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5;
- 20 (d) HVR-L1, содержащей аминокислотную последовательность, которая соответствует консенсусной последовательности SEQ ID NO: 10;
- (e) HVR-L2, содержащей аминокислотную последовательность, которая соответствует консенсусной последовательности SEQ ID NO: 14; и
- (f) HVR-L3, содержащей аминокислотную последовательность, которая соответствует
25 консенсусной последовательности SEQ ID NO: 19.

В следующем аспекте антитело содержит HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 и по меньшей мере одну, две, три, четыре или пять HVR, выбранных из (a), (b), (d), (e) и (f), выше. В следующем аспекте, антитело содержит (a), (b), (c), (d), (e) и (f), выше. В отношении (a), (d), (e) и (f), предусматривается любой
30 один или несколько из следующих вариантов осуществления: HVR-H1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-2; HVR-L1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 6-9; HVR-L2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 11-13; и HVR-L3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 15-18.

35 В другом аспекте представлено антитело, которое специфично связывается с NRR Notch2, где антитело содержит HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность, которая соответствует консенсусной последовательности SEQ ID NO: 3, HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, и HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5. В одном
40 варианте осуществления HVR-H1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-2.

В другом аспекте представлено антитело, которое специфично связывается с NRR Notch2, где антитело содержит HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность, которая соответствует консенсусной последовательности SEQ ID
45 NO: 10, HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность, которая соответствует консенсусной последовательности SEQ ID NO: 14, и HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность, которая соответствует консенсусной последовательности SEQ ID NO: 19. Следующие варианты осуществления

- (с) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5;
- (d) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9;
- (е) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13; и
- (f) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18.

5 В определенных вариантах осуществления любое из указанных выше антител, кроме того, содержит по меньшей мере одну каркасную область, выбранную из консенсусной каркасной области VH подгруппы III и консенсусной каркасной области VL подгруппы I.

10 В определенных вариантах осуществления антитело против NRR Notch2 является подвергнутым созреванию аффинности. Например, любую из представленных ниже замен в указанных положениях HVR (нумерация Kabat) можно проводить в любой комбинации:

- в HVR-H1 (SEQ ID NO: 1): S28T; T30S;
- в HVR-L1 (SEQ ID NO: 6): S28N; I29N или V; S30R или K; S31R; Y32F
- 15 - в HVR-L2 (SEQ ID NO: 11): G50R; S53I или T; A55E
- в HVR-L3 (SEQ ID NO: 15): S93I или R; L96W или H

Конкретные антитела, описанные в настоящем документе, т.е., антитело D, а также полученные созреванием аффинности формы антитела D (D-1, D-2 и D-3), могут подвергаться дальнейшему созреванию аффинности. Таким образом, представлены 20 подвергнутые созреванию аффинности формы любых из антител, описанных в настоящем документе.

В определенных вариантах осуществления антитело против NRR Notch2, имеющее любую из указанных выше последовательностей HVR, может, кроме того, содержать любую пригодную последовательность каркасной области варибельного домена, при 25 условии по существу сохранения активности связывания с NRR Notch2. В определенных вариантах осуществления антитело против NRR Notch2 содержит консенсусную последовательность каркасной области варибельного домена тяжелой цепи (VH) человека, как в любой из консенсусных последовательностей каркасных областей VH, показанных на фигурах 5A и 5B. В одном варианте осуществления консенсусная 30 последовательность каркасной области VH содержит консенсусную последовательность каркасной области тяжелой цепи подгруппы III человека, например, как показано на фигурах 5A и 5B. В другом варианте осуществления консенсусная последовательность каркасной области VH содержит каркасную последовательность акцептора 2, например, как показано на фигурах 5A и 5B. В конкретном варианте осуществления консенсусная 35 последовательность каркасной области VH содержит FR1-FR4 акцептора 2B или акцептора 2D, где FR4 содержит SEQ ID NO: 35 (фигуры 5A и 5B), причем последний остаток SEQ ID NO: 35 (S11) необязательно замещен аланином. В следующем конкретном варианте осуществления консенсусная последовательность каркасной области VH содержит последовательности SEQ ID NO: 50; 51; 57 или 59; и 35, где S11 SEQ ID NO: 40 35 необязательно замещен аланином.

В определенных вариантах осуществления антитело против NRR Notch2, имеющее любую из указанных выше последовательностей HVR, может, кроме того, содержать последовательность каркасной области варибельного домена легкой цепи (VL) человека, как показано на фигурах 6A и 6B. В одном варианте осуществления 45 консенсусная последовательность каркасной области VL содержит консенсусную последовательность каркасной области VL каппа подгруппы I человека (kv1), например, как показано на фигурах 6A и 6B. В другом варианте осуществления консенсусная последовательность каркасной области VL содержит FR1-FR4 huMAb4D5-8, как показано

на фигурах 7 или 8. В конкретном варианте осуществления консенсусная последовательность каркасной области VL содержит последовательности SEQ ID NO: 60, 61, 62 и 63.

В другом аспекте антитело против NRR Notch2 содержит последовательность 5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65
 70
 75
 80
 85
 90
 95
 100
 105
 110
 115
 120
 125
 130
 135
 140
 145
 150
 155
 160
 165
 170
 175
 180
 185
 190
 195
 200
 205
 210
 215
 220
 225
 230
 235
 240
 245
 250
 255
 260
 265
 270
 275
 280
 285
 290
 295
 300
 305
 310
 315
 320
 325
 330
 335
 340
 345
 350
 355
 360
 365
 370
 375
 380
 385
 390
 395
 400
 405
 410
 415
 420
 425
 430
 435
 440
 445
 450
 455
 460
 465
 470
 475
 480
 485
 490
 495
 500
 505
 510
 515
 520
 525
 530
 535
 540
 545
 550
 555
 560
 565
 570
 575
 580
 585
 590
 595
 600
 605
 610
 615
 620
 625
 630
 635
 640
 645
 650
 655
 660
 665
 670
 675
 680
 685
 690
 695
 700
 705
 710
 715
 720
 725
 730
 735
 740
 745
 750
 755
 760
 765
 770
 775
 780
 785
 790
 795
 800
 805
 810
 815
 820
 825
 830
 835
 840
 845
 850
 855
 860
 865
 870
 875
 880
 885
 890
 895
 900
 905
 910
 915
 920
 925
 930
 935
 940
 945
 950
 955
 960
 965
 970
 975
 980
 985
 990
 995
 1000
 1005
 1010
 1015
 1020
 1025
 1030
 1035
 1040
 1045
 1050
 1055
 1060
 1065
 1070
 1075
 1080
 1085
 1090
 1095
 1100
 1105
 1110
 1115
 1120
 1125
 1130
 1135
 1140
 1145
 1150
 1155
 1160
 1165
 1170
 1175
 1180
 1185
 1190
 1195
 1200
 1205
 1210
 1215
 1220
 1225
 1230
 1235
 1240
 1245
 1250
 1255
 1260
 1265
 1270
 1275
 1280
 1285
 1290
 1295
 1300
 1305
 1310
 1315
 1320
 1325
 1330
 1335
 1340
 1345
 1350
 1355
 1360
 1365
 1370
 1375
 1380
 1385
 1390
 1395
 1400
 1405
 1410
 1415
 1420
 1425
 1430
 1435
 1440
 1445
 1450
 1455
 1460
 1465
 1470
 1475
 1480
 1485
 1490
 1495
 1500
 1505
 1510
 1515
 1520
 1525
 1530
 1535
 1540
 1545
 1550
 1555
 1560
 1565
 1570
 1575
 1580
 1585
 1590
 1595
 1600
 1605
 1610
 1615
 1620
 1625
 1630
 1635
 1640
 1645
 1650
 1655
 1660
 1665
 1670
 1675
 1680
 1685
 1690
 1695
 1700
 1705
 1710
 1715
 1720
 1725
 1730
 1735
 1740
 1745
 1750
 1755
 1760
 1765
 1770
 1775
 1780
 1785
 1790
 1795
 1800
 1805
 1810
 1815
 1820
 1825
 1830
 1835
 1840
 1845
 1850
 1855
 1860
 1865
 1870
 1875
 1880
 1885
 1890
 1895
 1900
 1905
 1910
 1915
 1920
 1925
 1930
 1935
 1940
 1945
 1950
 1955
 1960
 1965
 1970
 1975
 1980
 1985
 1990
 1995
 2000
 2005
 2010
 2015
 2020
 2025
 2030
 2035
 2040
 2045
 2050
 2055
 2060
 2065
 2070
 2075
 2080
 2085
 2090
 2095
 2100
 2105
 2110
 2115
 2120
 2125
 2130
 2135
 2140
 2145
 2150
 2155
 2160
 2165
 2170
 2175
 2180
 2185
 2190
 2195
 2200
 2205
 2210
 2215
 2220
 2225
 2230
 2235
 2240
 2245
 2250
 2255
 2260
 2265
 2270
 2275
 2280
 2285
 2290
 2295
 2300
 2305
 2310
 2315
 2320
 2325
 2330
 2335
 2340
 2345
 2350
 2355
 2360
 2365
 2370
 2375
 2380
 2385
 2390
 2395
 2400
 2405
 2410
 2415
 2420
 2425
 2430
 2435
 2440
 2445
 2450
 2455
 2460
 2465
 2470
 2475
 2480
 2485
 2490
 2495
 2500
 2505
 2510
 2515
 2520
 2525
 2530
 2535
 2540
 2545
 2550
 2555
 2560
 2565
 2570
 2575
 2580
 2585
 2590
 2595
 2600
 2605
 2610
 2615
 2620
 2625
 2630
 2635
 2640
 2645
 2650
 2655
 2660
 2665
 2670
 2675
 2680
 2685
 2690
 2695
 2700
 2705
 2710
 2715
 2720
 2725
 2730
 2735
 2740
 2745
 2750
 2755
 2760
 2765
 2770
 2775
 2780
 2785
 2790
 2795
 2800
 2805
 2810
 2815
 2820
 2825
 2830
 2835
 2840
 2845
 2850
 2855
 2860
 2865
 2870
 2875
 2880
 2885
 2890
 2895
 2900
 2905
 2910
 2915
 2920
 2925
 2930
 2935
 2940
 2945
 2950
 2955
 2960
 2965
 2970
 2975
 2980
 2985
 2990
 2995
 3000
 3005
 3010
 3015
 3020
 3025
 3030
 3035
 3040
 3045
 3050
 3055
 3060
 3065
 3070
 3075
 3080
 3085
 3090
 3095
 3100
 3105
 3110
 3115
 3120
 3125
 3130
 3135
 3140
 3145
 3150
 3155
 3160
 3165
 3170
 3175
 3180
 3185
 3190
 3195
 3200
 3205
 3210
 3215
 3220
 3225
 3230
 3235
 3240
 3245
 3250
 3255
 3260
 3265
 3270
 3275
 3280
 3285
 3290
 3295
 3300
 3305
 3310
 3315
 3320
 3325
 3330
 3335
 3340
 3345
 3350
 3355
 3360
 3365
 3370
 3375
 3380
 3385
 3390
 3395
 3400
 3405
 3410
 3415
 3420
 3425
 3430
 3435
 3440
 3445
 3450
 3455
 3460
 3465
 3470
 3475
 3480
 3485
 3490
 3495
 3500
 3505
 3510
 3515
 3520
 3525
 3530
 3535
 3540
 3545
 3550
 3555
 3560
 3565
 3570
 3575
 3580
 3585
 3590
 3595
 3600
 3605
 3610
 3615
 3620
 3625
 3630
 3635
 3640
 3645
 3650
 3655
 3660
 3665
 3670
 3675
 3680
 3685
 3690
 3695
 3700
 3705
 3710
 3715
 3720
 3725
 3730
 3735
 3740
 3745
 3750
 3755
 3760
 3765
 3770
 3775
 3780
 3785
 3790
 3795
 3800
 3805
 3810
 3815
 3820
 3825
 3830
 3835
 3840
 3845
 3850
 3855
 3860
 3865
 3870
 3875
 3880
 3885
 3890
 3895
 3900
 3905
 3910
 3915
 3920
 3925
 3930
 3935
 3940
 3945
 3950
 3955
 3960
 3965
 3970
 3975
 3980
 3985
 3990
 3995
 4000
 4005
 4010
 4015
 4020
 4025
 4030
 4035
 4040
 4045
 4050
 4055
 4060
 4065
 4070
 4075
 4080
 4085
 4090
 4095
 4100
 4105
 4110
 4115
 4120
 4125
 4130
 4135
 4140
 4145
 4150
 4155
 4160
 4165
 4170
 4175
 4180
 4185
 4190
 4195
 4200
 4205
 4210
 4215
 4220
 4225
 4230
 4235
 4240
 4245
 4250
 4255
 4260
 4265
 4270
 4275
 4280
 4285
 4290
 4295
 4300
 4305
 4310
 4315
 4320
 4325
 4330
 4335
 4340
 4345
 4350
 4355
 4360
 4365
 4370
 4375
 4380
 4385
 4390
 4395
 4400
 4405
 4410
 4415
 4420
 4425
 4430
 4435
 4440
 4445
 4450
 4455
 4460
 4465
 4470
 4475
 4480
 4485
 4490
 4495
 4500
 4505
 4510
 4515
 4520
 4525
 4530
 4535
 4540
 4545
 4550
 4555
 4560
 4565
 4570
 4575
 4580
 4585
 4590
 4595
 4600
 4605
 4610
 4615
 4620
 4625
 4630
 4635
 4640
 4645
 4650
 4655
 4660
 4665
 4670
 4675
 4680
 4685
 4690
 4695
 4700
 4705
 4710
 4715
 4720
 4725
 4730
 4735
 4740
 4745
 4750
 4755
 4760
 4765
 4770
 4775
 4780
 4785
 4790
 4795
 4800
 4805
 4810
 4815
 4820
 4825
 4830
 4835
 4840
 4845
 4850
 4855
 4860
 4865
 4870
 4875
 4880
 4885
 4890
 4895
 4900
 4905
 4910
 4915
 4920
 4925
 4930
 4935
 4940
 4945
 4950
 4955
 4960
 4965
 4970
 4975
 4980
 4985
 4990
 4995
 5000
 5005
 5010
 5015
 5020
 5025
 5030
 5035
 5040
 5045
 5050
 5055
 5060
 5065
 5070
 5075
 5080
 5085
 5090
 5095
 5100
 5105
 5110
 5115
 5120
 5125
 5130
 5135
 5140
 5145
 5150
 5155
 5160
 5165
 5170
 5175
 5180
 5185
 5190
 5195
 5200
 5205
 5210
 5215
 5220
 5225
 5230
 5235
 5240
 5245
 5250
 5255
 5260
 5265
 5270
 5275
 5280
 5285
 5290
 5295
 5300
 5305
 5310
 5315
 5320
 5325
 5330
 5335
 5340
 5345
 5350
 5355
 5360
 5365
 5370
 5375
 5380
 5385
 5390
 5395
 5400
 5405
 5410
 5415
 5420
 5425
 5430
 5435
 5440
 5445
 5450
 5455
 5460
 5465
 5470
 5475
 5480
 5485
 5490
 5495
 5500
 5505
 5510
 5515
 5520
 5525
 5530
 5535
 5540
 5545
 5550
 5555
 5560
 5565
 5570
 5575
 5580
 5585
 5590
 5595
 5600
 5605
 5610
 5615
 5620
 5625
 5630
 5635
 5640
 5645
 5650
 5655
 5660
 5665
 5670
 5675
 5680
 5685
 5690
 5695
 5700
 5705
 5710
 5715
 5720
 5725
 5730
 5735
 5740
 5745
 5750
 5755
 5760
 5765
 5770
 5775
 5780
 5785
 5790
 5795
 5800
 5805
 5810
 5815
 5820
 5825
 5830
 5835
 5840
 5845
 5850
 5855
 5860
 5865
 5870
 5875
 5880
 5885
 5890
 5895
 5900
 5905
 5910
 5915
 5920
 5925
 5930
 5935
 5940
 5945
 5950
 5955
 5960
 5965
 5970
 5975
 5980
 5985
 5990
 5995
 6000
 6005
 6010
 6015
 6020
 6025
 6030
 6035
 6040
 6045
 6050
 6055
 6060
 6065
 6070
 6075
 6080
 6085
 6090
 6095
 6100
 6105
 6110
 6115
 6120
 6125
 6130
 6135
 6140
 6145
 6150
 6155
 6160
 6165
 6170
 6175
 6180
 6185
 6190
 6195
 6200
 6205
 6210
 6215
 6220
 6225
 6230
 6235
 6240
 6245
 6250
 6255
 6260
 6265
 6270
 6275
 6280
 6285
 6290
 6295
 6300
 6305
 6310
 6315
 6320
 6325
 6330
 6335
 6340
 6345
 6350
 6355
 6360
 6365
 6370
 6375
 6380
 6385
 6390
 6395
 6400
 6405
 6410
 6415
 6420
 6425
 6430
 6435
 6440
 6445
 6450
 6455
 6460
 6465
 6470
 6475
 6480
 6485
 6490
 6495
 6500
 6505
 6510
 6515
 6520
 6525
 6530
 6535
 6540
 6545
 6550
 6555
 6560
 6565
 6570
 6575
 6580
 6585
 6590
 6595
 6600
 6605
 6610
 6615
 6620
 6625
 6630
 6635
 6640
 6645
 6650
 6655
 6660
 6665
 6670
 6675
 6680
 6685
 6690
 6695
 6700
 6705
 6710
 6715
 6720
 6725
 6730
 6735
 6740
 6745
 6750
 6755
 6760
 6765
 6770
 6775
 6780
 6785
 6790
 6795
 6800
 6805
 6810
 6815
 6820
 6825
 6830
 6835
 6840
 6845
 6850
 6855
 6860
 6865
 6870
 6875
 6880
 6885
 6890
 6895
 6900
 6905

содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15. В другом из таких вариантов осуществления VL содержит одну, две или три HVR, выбранных из (a) HVR-L1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; (b) HVR-L2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11; и (c) HVR-L3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16. В другом из таких вариантов осуществления VL содержит одну, две или три HVR, выбранных из (a) HVR-L1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; (b) HVR-L2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12; и (c) HVR-L3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17. В другом из таких вариантов осуществления VL содержит одну, две или три HVR, выбранных из (a) HVR-L1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9; (b) HVR-L2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13; и (c) HVR-L3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18.

В определенных вариантах осуществления варианты последовательностей VH и VL, представленных выше, замены, вставки или делеции могут встречаться в HVR. В таких вариантах осуществления замены, вставки или делеции могут встречаться в пределах одной или нескольких HVR, при условии, что такие изменения по существу не снижают способность антитела связывать антиген. Например, в HVR можно вносить консервативные изменения, которые по существу не снижают аффинность связывания. В некоторых случаях, изменения в HVR могут в действительности повысить аффинность антитела. Такие изменения можно проводить в "горячих точках" HVR (т.е., в остатках, кодируемых кодонами, которые претерпевают мутацию с высокой частотой в ходе процессов соматического созревания) в целях повышения аффинности антитела. (см., например, Chowdhury, Способы Mol. Biol. 207:179-196, 2008.) В определенных вариантах осуществления вариантов последовательностей VH и VL, представленных выше, каждая HVR либо является консервативной (неизменной), либо содержит не более одной аминокислотной замены, вставки или делеции.

В другом аспекте представлено антитело, которое специфично связывает NRR Notch2, где антитело содержит VH, как в любом из вариантов осуществления представленных выше, и VL, как в любом из вариантов осуществления представленных выше. В одном варианте осуществления антитело содержит VH, имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 20, и VL, имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 22.

В одном из таких вариантов осуществления VH содержит одну, две или три HVR, выбранных из: (a) HVR-H1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, (b) HVR-H2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, и (c) HVR-H3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и VL содержит одну, две или три HVR, выбранных из (a) HVR-L1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6; (b) HVR-L2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11; и (c) HVR-L3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15. В конкретном варианте осуществления антитело содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22.

В другом варианте осуществления антитело против NRR Notch2, которое специфично связывает NRR Notch2, содержит VH, имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%,

94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 21, и VL, имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 23-25.

В одном из таких вариантов осуществления VH содержит одну, две или три HVR, выбранных из: (a) HVR-H1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, (b) HVR-H2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, и (c) HVR-H3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и VL содержит одну, две или три HVR, выбранных из (a) HVR-L1, содержащей аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 7-9; (b) HVR-L2, содержащей аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 11-13; и (c) HVR-L3, содержащей аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 16-18. В конкретных вариантах осуществления антитело содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, и VL, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 23-25.

В определенных вариантах осуществления представлена подвергнутая созреванию аффинности форма любого из указанных выше антител. В следующих вариантах осуществления представлен рекомбинантный белок, который специфично связывает NRR Notch2, где рекомбинантный белок содержит антигенсвязывающий центр(ы) любого из указанных выше антител. В одном из таких вариантов осуществления рекомбинантный белок содержит любую одну или несколько из HVR, представленных выше.

В определенных вариантах осуществления представлен полинуклеотид, кодирующий любое из указанных выше антител. В одном варианте осуществления представлен вектор, содержащий полинуклеотид. В одном варианте осуществления представлена клетка-хозяин, содержащая вектор. В одном варианте осуществления клетка-хозяин является эукариотической клеткой. В одном варианте осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку CHO. В одном варианте осуществления представлен способ получения антитела против NRR Notch2, где способ включает культивирование клетки-хозяина в условиях, пригодных для экспрессии полинуклеотида, кодирующего антитело, и выделение антитела.

2. Дополнительные иллюстративные антитела

В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному антителу против NRR Notch2, которое ингибирует активность Notch2. Например, антитела по изобретению могут модулировать один или несколько аспектов передачи сигнала Notch2, включая нарушение любого биологически значимого каскада передачи сигнала Notch2.

В следующем варианте осуществления изобретение относится к выделенному антителу против NRR Notch2, которое связывает NRR Notch2 с $K_d \leq 100$ нМ. В определенных вариантах осуществления антитело против NRR Notch2 связывает NRR Notch2 с $K_d \leq 10$ нМ, ≤ 1 нМ или $\leq 0,1$ нМ. Как описано в разделе "Примеры" настоящего документа, иллюстративное фаговое антитело D-3 связывается с K_d 5 нМ. Как общепринято в данной области, аффинность связывания лиганда с его рецептором можно определять с использованием любого из множества анализов, и ее можно выражать с помощью различных количественных величин. Таким образом, в одном варианте осуществления аффинность связывания выражают как величины K_d , и она отражает собственно аффинность связывания (например, с минимизированными эффектами авидности).

Как правило и предпочтительно, аффинность связывания измеряют *in vitro*, как в бесклеточных, так и в связанных с клетками условиях. Для получения показателей аффинности связывания можно использовать любое количество анализов, известных в данной области, включая анализы, описанные в настоящем документе, включая,

например, Biacore, радиоиммунный анализ (RIA) и ELISA.

В другом варианте осуществления представлено выделенное антитело, которое связывается с NRR Notch2, где антитело по существу не связывается с представителем семейства Notch, отличным от Notch2 (т.е., Notch1, 3 и 4 у млекопитающих). Такое антитело можно идентифицировать с использованием анализов, представленных в

примере B(I). В одном варианте осуществления антитело связывается с NRR Notch2 человека и NRR Notch2 из по меньшей мере одного другого не являющегося человеком вида, например, мыши.

В другом варианте осуществления представлено выделенное антитело, которое связывается с тем же эпитопом, что и антитело, представленное в настоящем документе.

В одном варианте осуществления представлено выделенное антитело против NRR Notch2, которое связывается с тем же эпитопом, что и антитело, выбранное из антитела D, антитела D-1, антитела D-2 и антитела D-3. В другом варианте осуществления изобретение относится к антителу против NRR Notch2, которое конкурирует с антителом, выбранным из антитела D, антитела D-1, антитела D-2 и антитела D-3. В другом варианте осуществления представлено выделенное антитело, которое связывается по меньшей мере с одним доменом, выбранным из домена LNR-A и домена HD-C Notch2. В одном из таких вариантов осуществления антитело связывается как с доменом LNR-A и так и с доменом HD-C. В другом из таких вариантов осуществления антитело, кроме того, связывается с доменами LNR-B и/или HD-N. Эти домены указаны на фигуре 18.

Указанные выше варианты осуществления антител против NRR Notch2 могут существовать отдельно или в любой комбинации. Более того, любое антитело против NRR Notch2, описанное в настоящем документе, может обладать любым одним или несколькими из следующих признаков: в определенных вариантах осуществления антитело против NRR Notch2 представляет собой моноклональное антитело. В определенных вариантах осуществления антитело против NRR Notch2 представляет собой фрагмент антитела, выбранный из Fab-, Fab'-SH-, Fv-, scFv- или (Fab')₂-фрагмента. В другом варианте осуществления антитело против NRR Notch2 представляет собой гуманизированное антитело, антитело человека или химерное антитело.

3. Фрагменты антител

Настоящее изобретение охватывает фрагменты антител. Фрагменты антител можно получать традиционными способами, такими как ферментативное расщепление, или рекомбинантными способами. В определенных обстоятельствах, преимущественным является применение фрагментов антител, а не целых антител. Меньший размер фрагментов позволяет быстрое выведение и может привести к повышенному доступу к солидным опухолям. Для обзора определенных фрагментов антител, см. Hudson et al. (2003) Nat. Med. 9:129-134.

Для получения фрагментов антител были разработаны различные способы. Традиционно, эти фрагменты получали протеолитическим расщеплением полноразмерных антител (см., например, Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992); и Brennan et al., Science, 229:81 (1985)). Однако эти фрагменты в настоящее время можно получать непосредственно с помощью рекомбинантных клеток-хозяев. Fab-, Fv- и scFv-фрагменты антител могут быть экспрессированы и секретированы в *E. coli*, таким образом, позволяя простой способ

получения больших количеств этих фрагментов. Фрагменты антител можно выделять из фаговых библиотек антител, описанных выше. Альтернативно фрагменты Fab'-SH можно выделять непосредственно из *E. coli* и химически связывать с получением фрагментов F(ab')₂ (Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)). В соответствии с

5 другим подходом фрагменты F(ab')₂ можно выделять непосредственно из рекомбинантной культуры клеток-хозяев. Fab- и F(ab')₂-фрагмент с повышенным временем полужизни *in vivo*, содержащий остатки связывающего рецептор спасения эпитопа, описан в патенте США No. 5869046. Другие способы получения фрагментов

10 антител будут очевидны квалифицированному специалисту. В других вариантах осуществления предпочтительное для выбора антител представляет собой одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv). См. WO 93/16185; патент США No. 5571894; и патент США No. 5587458. Fv и sFv являются единственными типами с целыми антигенсвязывающими участками, которые лишены константных участков; таким

15 образом, они пригодны для снижения неспецифического связывания в ходе применения *in vivo*. Можно конструировать слитые с sFv белки с получением эффекторного белка либо на N-, либо на C- конце sFv. См. Antibody Engineering, ed. Borrebaeck, выше. Фрагмент антитела также может представлять собой "линейное антитело", например, как описано в патенте США 5641870. Такие линейные фрагменты антител могут быть

20 моноспецифическими или биспецифическими.

4. Гуманизированные антитела

Изобретение охватывает гуманизированные антитела. Способы гуманизации антител, не являющихся человеческими, описаны в данной области. Как правило, гуманизированное антитело обладает одним или несколькими встроенными в него

25 аминокислотными остатками из источника, который не является человеческим. Такие не являющиеся человеческими аминокислотные остатки часто называют "импортными" остатками, которые, как правило, взяты из "импортной" вариабельной области. Гуманизацию, главным образом, можно проводить в соответствии со способом Winter и коллег [Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-327 (1988);

30 Verhoeven et al., Science, 239:1534-1536 (1988)], посредством замены CDR или последовательностями CDR крысы соответствующих последовательностей антитела человека. Таким образом, такие "гуманизированные" антитела представляют собой химерные антитела (патент США No. 4816567), где по существу менее целой вариабельной области человека замещено соответствующей последовательностью

35 вида, не относящегося к человеку. На практике, гуманизированные антитела, как правило, представляют собой антитела человека, в которых некоторые остатки CDR и возможно некоторые остатки FR заменены остатками из аналогичных участков антител грызунов.

Выбор вариабельных доменов человека, как легких, так и тяжелых цепей, для

40 использования при получении гуманизированных антител является очень важным для снижения антигенности. Согласно так называемому способу "наилучшего соответствия", последовательность вариабельного домена антитела грызуна анализируют относительно целой библиотеки известных последовательностей вариабельных доменов человека. Последовательность человека, которая является наиболее сходной с

45 последовательностью грызуна, затем принимают в качестве каркасной области человека для гуманизированного антитела. См., например, Sims et al. (1993) J. Immunol, 151:2296; Chothia et al. (1987) J. Mol. Biol, 196:901. В другом способе используют конкретную каркасную область, полученную из консенсусной последовательности всех антител

человека из конкретной подгруппы легких или тяжелых цепей. Одну и ту же каркасную область можно использовать для нескольких различных гуманизированных антител. См., например, Carter et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci USA, 89:4285; Presta et al. (1993) J. Immunol, 151:2623.

5 Кроме того, обычно желательно, чтобы антитела были гуманизированы с сохранением высокой аффинности к антигену и других положительных биологических свойств. Для достижения этой цели, в соответствии с предпочтительным способом гуманизированные антитела получают с помощью процесса анализа исходных последовательностей и различных предполагаемых гуманизированных продуктов с
10 использованием трехмерных моделей исходных и гуманизированных последовательностей. Трехмерные модели иммуноглобулинов являются широко доступными и известны специалистам в данной области. Доступными являются компьютерные программы, которые иллюстрируют и выводят на экран возможные трехмерные конформационные структуры выбранных последовательностей
15 иммуноглобулинов-кандидатов. Исследование этих выведенных на экран данных позволяет проводить анализ возможной роли остатков в функционировании предполагаемых последовательностей иммуноглобулинов, т.е., анализ остатков, которые влияют на способность иммуноглобулина-кандидата связывать свой антиген. Таким образом, можно отобрать остатки FR и комбинировать их из реципиентной и импортной
20 последовательностей таким образом, чтобы были достигнуты требуемые свойства антител, такие как повышенная аффинность к антигену(ам)-мишени. Как правило, остатки гипервариабельной области оказывают непосредственное и наиболее значительное влияние на связывание антигена.

5. Антитела человека

25 Антитела человека по изобретению можно конструировать путем комбинирования последовательности(ей) переменного домена клона Fv, выбранную из библиотек фагового дисплея, полученных из последовательностей человека, с известной последовательностью(ями) константного домена человека, как описано выше. Альтернативно моноклональные антитела человека по изобретению можно получать
30 способом гибридом способ. Клеточные линии миеломы человека и гетеромиеломы мыши-человека для продукции моноклональных антител человека описаны, например, Kozbor J. Immunol, 133: 3001 (1984); Brodeur et al, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); и Boerner et al, J. Immunol, 147: 86 (1991).

35 В настоящее время возможным является получение трансгенных животных (например, мышей), которые при иммунизации способны продуцировать полный набор антител человека в отсутствие продукции эндогенных иммуноглобулинов. Например, было описано, что гомозиготная делеция гена участка соединения тяжелых цепей антител (JH) у химерных мышей и мутантных мышей зародышевой линии приводит к полному
40 ингибированию продукции эндогенных антител. Перенос системы генов иммуноглобулинов зародышевой линии человека в таких мутантных мышей зародышевой линии приводит к продукции антител человека при антигенной стимуляции. См., например, Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993); Bruggermann et al., Year in Immuno., 7:33 (1993).

45 Также для получения антител человека из не являющихся человеческими антител, например антител грызунов, можно использовать перетасовку цепей, где антитело человека имеет аффинность и специфичность, сходные с исходным не являющимся человеческим антителом. Согласно этому способу, который также называют

"импринтингом эпитопов", либо вариабельную область тяжелой цепи, либо вариабельную область легкой цепи, не являющегося человеческим фрагмента антитела, полученного способами фагового дисплея, как описано в настоящем документе, заменяют набором генов V-доменов человека, создавая популяцию химер scFv или Fab с не являющейся человеческой цепью/являющейся человеческой цепью. Селекция с антигеном приводит к выделению химерного scFv или Fab с не являющееся человеческой цепью/являющейся человеческой цепью, где человеческая цепь восстанавливает антигенсвязывающий центр, разрушенный при удалении соответствующей не являющейся человеческой цепи в первичном клоне фагового дисплея, т.е. эпитоп определяет (осуществляет импринтинг) выбор цепи человека-партнера. Когда этот процесс повторяют для замены оставшейся не являющейся человеческой цепи, получают антитело человека (см. PCT WO 93/06213, опубликованную 1 апреля 1993 года). В отличие от традиционной гуманизации не являющихся человеческими антител путем пересадки CDR, этот способ обеспечивает полностью человеческие антитела, которые не имеют остатков FR или CDR происхождением не из человека.

6. Биспецифические антитела

Биспецифические антитела представляют собой моноклональные антитела, которые обладают специфичностью связывания по отношению к по меньшей мере двум различным антигенам. В определенных вариантах осуществления биспецифические антитела представляют собой антитела человека или гуманизированные антитела. В определенных вариантах осуществления одна из специфичностей связывания направлена на Notch2, а другая направлена на другой антиген. В определенных вариантах осуществления биспецифические антитела могут связываться с двумя различными эпитопами Notch2. Биспецифические антитела также можно использовать для локализации цитотоксических средств у клеток, которые экспрессируют Notch2. Эти антитела обладают Notch2-связывающим плечом и плечом, которое связывает цитотоксическое средство, например, такое как сапорин, антитело против интерферона- α , алкалоид барвинка, А-цепь рицина, метотрексат или гаптен радиоактивного изотопа. Биспецифические антитела можно получать в качестве полноразмерных антител или фрагментов антител (например, биспецифические антитела F(ab')₂).

Способы получения биспецифических антител известны в данной области. Традиционно, рекомбинантный способ получения полноразмерных биспецифических антител основан на совместной экспрессии двух пар тяжелая цепь - легкая цепь иммуноглобулинов, где две цепи обладают различной специфичностью (Millstein and Cuello, Nature, 305:537-539 (1983)). Вследствие случайной сборки тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов, такие гибридомы (квадромы) потенциально продуцируют смесь из 10 различных молекул антител, из которых только одна обладает правильной биспецифичной структурой. Очистка правильных молекул, которую обычно проводят посредством стадий аффинной хроматографии, является довольно трудоемкой, и выход продукта является низким. Аналогичные способы описаны в WO 93/08829 опубликованном 13 мая 1993 года, и в Trautnecker et al., EMBO J., 10:3655-3659 (1991).

В соответствии с другим подходом проводят слияние вариабельных доменов антитела с требуемой специфичностью связывания (участками связывания антитело-антиген) с последовательностями константных доменов иммуноглобулинов. Слияние проводят, например, с константным доменом тяжелой цепи Ig, содержащим по меньшей мере часть шарнирной области, CH2 и CH3. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере один из компонентов, предназначенных для слияния, обладает первым константным доменом тяжелой цепи (CH1), содержащим участок, необходимый для

связывания легкой цепи. ДНК, кодирующие предназначенные для слияния компоненты тяжелых цепей иммуноглобулинов и, если желательно, легкой цепи иммуноглобулина, встраивают в отдельные экспрессирующие векторы, и совместно трансфицируют в пригодный организм-хозяин. Это обеспечивает значительную гибкость при
 5 регулировании соотношений трех полипептидных фрагментов друг с другом в вариантах осуществления, где неравные соотношения трех полипептидных цепей в конструкции обеспечивает оптимальный выход требуемого биспецифического антитела. Однако возможным является встраивание двух или всех трех полипептидных цепей в один экспрессирующий вектор, если экспрессия по меньшей мере двух полипептидных цепей
 10 в равных соотношениях приводит к высокому выходу продукта или если соотношения не имеют существенного влияния на требуемое сочетание цепей.

В одном варианте осуществления этого подхода, биспецифические антитела состоят из тяжелой цепи гибридного иммуноглобулина с одной специфичностью связывания на одном плече, и пары тяжелая цепь - легкая цепь гибридного иммуноглобулина
 15 (обладающей другой специфичностью связывания) на другом плече. Было обнаружено, что такая ассиметричная структура облегчает разделение требуемого биспецифического соединения и нежелательных сочетаний цепей иммуноглобулинов, поскольку наличие легкой цепи иммуноглобулина только в одной половине биспецифической молекулы обеспечивает легкий способ разделения. Этот подход описан в WO 94/04690. Для более
 20 подробного описания получения биспецифических антител см., например, Suresh et al., *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

В соответствии с другим подходом, для максимального увеличения процентного количества гетеродимеров, которые выделяют из рекомбинантных клеточных культур, можно сконструировать область контакта между парой молекул антител. Область
 25 контакта содержит по меньшей мере часть СН3-домена константного домена антитела. В этом способе одну или несколько небольших боковых цепей аминокислот из области контакта первой молекулы антитела заменяют на более крупные боковые цепи (например, тирозин или триптофан). В области контакта второй молекулы антитела создают компенсирующие "полости" идентичного или сходного с крупной боковой
 30 цепью(ями) размера посредством замены крупных боковых цепей аминокислот на цепи меньших размеров (например, аланин или треонин). Это обеспечивает механизм для повышения выхода гетеродимера по сравнению с другими нежелательными конечными продуктами, такими как гомодимеры.

Биспецифические антитела включают поперечно-сшитые антитела или
 35 "гетероконъюгаты" антител. Например, одно из антител в гетероконъюгате может быть связано с авидином, а другое с биотином. Такие антитела, например, были предложены для нацеливания клеток иммунной системы против нежелательных клеток (патент США No. 4676980), и для лечения ВИЧ-инфекции (WO 91/00360, WO 92/200373, и EP 03089). Гетероконъюгаты антител можно получать с использованием любого
 40 пригодного способа поперечного сшивания. Пригодные средства для поперечного сшивания хорошо известны в данной области, и описаны в патенте США No. 4676980, совместно с рядом способов поперечного сшивания.

Способы получения биспецифических антител из фрагментов антител также описаны в литературе. Например, биспецифические антитела можно получать с использованием
 45 образования химических связей. В Brennan et al., *Science*, 229: 81 (1985) описан способ, где полноразмерные антитела протеолитически расщепляют с получением F (ab')₂-фрагментов. Эти фрагменты восстанавливают в присутствии вещества, образующего комплексы с дитиолами, арсенита натрия, для стабилизации соседних

дители и предотвращения образования межмолекулярного дисульфида. Затем полученные Fab'-фрагменты превращают в производные с тионитробензоатом (TNB). Одно из производных Fab'-TNB затем повторно превращают в Fab'-тиол восстановлением меркаптоэтиламина и смешивают с эквимольным количеством другого производного Fab'-TNB с получением биспецифического антитела. Полученные биспецифические антитела можно использовать в качестве средств для селективной иммобилизации ферментов.

Последние достижения упростили прямое выделение из *E. coli* фрагментов Fab'-SH, которые можно химически связывать с получением биспецифических антител. В Shalaby et al., J. Exp. Med., 175: 217-225 (1992) описано получение полностью гуманизированной молекулы F(ab')₂ биспецифического антитела. Осуществляли секрецию из *E. coli* каждого Fab'-фрагмента по отдельности и их подвергали прямому химическому соединению *in vitro* с образованием биспецифического антитела. Биспецифическое антитело, полученное таким образом, обладало способностью связываться с клетками, сверхэкспрессирующими рецептор HER2, и нормальными Т-клетками человека, а также запускать литическую активность цитотоксических лимфоцитов человека против мишеней, представляющих собой рак молочной железы человека.

Также были описаны различные способы получения и выделения фрагментов биспецифических антител непосредственно из рекомбинантной клеточной культуры. Например, были получены биспецифические антитела с использованием лейциновых молний. Kositelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992). Пептиды лейциновой молнии белков Fos и Jun связывали с Fab'-участками двух различных антител посредством слияния генов. Гомодимеры антител восстанавливали в шарнирной области с получением мономеров, а затем повторно окисляли с получением гетеродимеров антител. Этот способ также можно использовать для получения гомодимеров антител. Способ "димеров антител", описанный Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 90:6444-6448 (1993) обеспечивает альтернативный механизм получения биспецифических фрагментов антител. Фрагменты содержат вариабельный домен тяжелой цепи (VH), связанный с вариабельным доменом легкой цепи (VL) посредством линкера, который является слишком коротким для возможности образования пары между двумя доменами на одной и той же цепи. Таким образом, домены VH и VL одного фрагмента вынуждены образовывать пару с комплементарными доменами VL и VH другого фрагмента, таким образом, формируя два антигенсвязывающих центра. Также описана другая стратегия для получения фрагментов биспецифических антител с использованием димеров одноцепочечных Fv (sFv). См. Gruber et al., J. Immunol, 152: 5368 (1994).

Также представлены антитела более чем с двумя валентностями. Например, можно получать триспецифические антитела. Tutt et al. J. Immunol. 147: 60 (1991).

7.Поливалентные антитела

Поливалентное антитело может интернализироваться (и/или катаболизироваться) быстрее, чем двухвалентное антитело, клеткой, экспрессирующей антиген, с которым антитела связываются. Антитела по настоящему изобретению могут представлять собой поливалентные антитела (которые могут относиться к классу, отличному от класса IgM) с тремя или более антигенсвязывающими участками (например, четырехвалентные антитела), которые можно легко получать посредством рекомбинантной экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептидные цепи антитела. Поливалентное антитело может содержать домен димеризации и три или более антигенсвязывающих участков. В определенных вариантах осуществления домен димеризации содержит (или состоит из них) Fc-участок или шарнирную область. В этом

случае антитело будет содержать Fc-область и три или более антигенсвязывающих участка со стороны N-конца Fc-участка. В определенных вариантах осуществления поливалентное антитело, представленное в настоящем документе, содержит (или состоит из) от трех до приблизительно восьми антигенсвязывающих участков. В одном из вариантов осуществления поливалентное антитело содержит четыре антигенсвязывающих участка. Поливалентное антитело содержит по меньшей мере одну полипептидную цепь (и предпочтительно две полипептидные цепи), где полипептидная цепь(и) содержит два или более переменных доменов. Например, полипептидная цепь(и) может содержать $VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc$, где $VD1$ представляет собой первый переменный домен, $VD2$ представляет собой второй переменный домен, Fc представляет собой одну полипептидную цепь Fc-участка, $X1$ и $X2$ представляют собой аминокислоту или полипептид, и n равно 0 или 1. Например, полипептидная цепь(и) может содержать: цепь VH-CH1-подвижный линкер-VH-CH1-Fc-участок; или цепь VH-CH1-VH-CH1-Fc-участок. Поливалентное антитело, представленное в настоящем документе, например, может дополнительно содержать от приблизительно двух (например, четырех) полипептидов переменного домена легкой цепи. Поливалентное антитело, представленное в настоящем документе, например, может содержать от приблизительно двух до приблизительно восьми полипептидов переменного домена легкой цепи. Полипептиды переменного домена легкой цепи, рассматриваемые в настоящем документе, содержат переменный домен легкой цепи и, необязательно, дополнительно содержат CL-домен.

8. Однодоменные антитела

В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению представляет собой однодоменное антитело. Однодоменное антитело представляет собой единичную полипептидную цепь, содержащую весь переменный домен тяжелой цепи антитела или его часть, или весь переменный домен легкой цепи антитела или его часть. В определенных вариантах осуществления однодоменное антитело представляет собой однодоменное антитело человека (Domantis, Inc., Waltham, MA; см., например, патент США No. 6248516 B1). В одном варианте осуществления однодоменное антитело состоит из всего переменного домена тяжелой цепи антитела или его части.

9. Варианты антител

В некоторых вариантах осуществления представлена модификация(и) аминокислотной последовательности антител, описанных в настоящем документе. Например, может быть желательным повышение аффинности связывания и/или других биологических свойств антитела. Варианты антител по аминокислотной последовательности можно получать путем внесения соответствующих изменений в нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело, или с помощью пептидного синтеза. Такие модификации включают, например, делеции и/или вставки и/или замены остатков в аминокислотных последовательностях антитела. Для достижения конечного продукта можно проводить любую комбинацию из делеции, вставки и замены, при условии, что конечная конструкция обладает желаемыми характеристиками. Аминокислотные изменения можно вносить в рассматриваемую аминокислотную последовательность антитела во время получения этой последовательности.

Пригодный способ идентификации определенных остатков или участков антитела, которые являются предпочтительными участками для мутагенеза, называют "сканирующим аланином мутагенезом", как описано Cunningham and Wells (1989) Science, 244:1081-1085. В данном случае, выявляют остаток или группу остатков-мишеней (например, заряженные остатки, такие как arg, asp, his, lys и glu) и заменяют на

нейтральную или отрицательно заряженную аминокислоту (наиболее предпочтительно аланин или полиаланин) для нарушения взаимодействия аминокислот с антигеном. Те положения аминокислот, которые демонстрируют функциональную чувствительность к замещению, затем подтверждают посредством внесения дополнительных или других вариантов в участки замещения, или вместо них. Таким образом, поскольку участок для внесения изменения в аминокислотную последовательность является предопределенным, нет необходимости в непосредственной предопределенности характера мутации. Например, для анализа действия мутации в данной области, в кодоне-мишени или участке-мишени проводят сканирующий ala или случайный мутагенез и экспрессированные варианты антитела против сфинголипида подвергают скринингу в отношении наличия требуемой активности.

Вставки в аминокислотную последовательность включают N- и/или C-концевые слитые последовательности, обладающие длиной в диапазоне от одного остатка до полипептидов, содержащих сто или более остатков, а также вставки одного или нескольких аминокислотных остатков внутрь последовательности. Примеры концевых вставок включают антитело против сфинголипида с N-концевым метионильным остатком или антитело, слитое с эпитопной меткой. Другие варианты вставок в молекулу антитела включают слияние N- или C-конца антитела с ферментом (например, ADEPT) или полипептидом, который повышает время полужизни антитела в сыворотке.

В определенных вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению изменяют для повышения или снижения степени гликозилирования антитела. Гликозилирование полипептидов, как правило, является либо N-связанным, либо O-связанным. N-связанное гликозилирование относится к присоединению углеводной группы к боковой цепи остатка аспарагина. Трипептидные последовательности аспарагин-X-серин и аспарагин-X-треонин, где X представляет собой любую аминокислоту, за исключением пролина, представляют собой последовательности, распознаваемые для ферментативного присоединения углеводной группы к боковой цепи аспарагина. Таким образом, наличие любой из этих трипептидных последовательностей в полипептиде создает потенциальный участок гликозилирования. O-связанное гликозилирование относится к присоединению одного из сахаров, представляющих собой N-ацетилгалактозамин, галактозу или ксилозу, к гидроксикамину, обычно, к серину или треонину, хотя также можно использовать 5-гидроксипролин или 5-гидроксиллизин.

Добавление участков гликозилирования к антителу удобно проводить, изменяя аминокислотную последовательность, чтобы происходило внесение или удаление одной или нескольких из описанных выше трипептидных последовательностей (для участков N-связанного гликозилирования). Также изменение можно проводить посредством добавления, делеции или замены одного или нескольких остатков серина или треонина в последовательности исходного антитела (для участков O-связанного гликозилирования).

Когда антитело содержит Fc-область, можно изменять углевод, связанный с ним. Нативные антитела, продуцируемые клетками млекопитающих, как правило, содержат разветвленный биантенный олигосахарид, который, как правило, связан N-связью с Asn297 CH2-домена Fc-области. См., например, Wright et al. (1997) TIBTECH 15:26-32. Олигосахарид может включать различные углеводы, например, маннозу, N-ацетилглюкозамин (GlcNAc), галактозу и сиаловую кислоту, а также фукозу, присоединенную к GlcNAc в "стебле" биантенной олигосахаридной структуры. В некоторых вариантах осуществления модификации олигосахарида в антителе по

изобретению можно проводить для получения вариантов антител с определенными улучшенными свойствами.

Например, представлены варианты антител, имеющие углеводную структуру, которая лишена фукозы, присоединенной (прямо или непрямо) к Fc-области. Такие варианты могут иметь улучшенную функцию ADCC. См., например, публикации патентов США No. US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Примеры публикаций, относящихся к "дефукозилированным" или "дефицитным по фукозе" вариантам антител включают: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki et al. J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004). Примеры клеточных линий, способных продуцировать дефукозилированные антитела, включают клетки Lee 13 CHO, дефицитные по фукозилрованию белков (Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249: 533-545 (1986); патентная заявка США No US 2003/0157108 A1, Presta, L; и WO 2004/056312 A1, Adams et al., особенно в примере 11), и клеточные линии с нокаутом, такие как клетки CHO с нокаутом генов альфа-1,6-фукозилтрансферазы, FUT8 (см., например, Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004); Kanda, Y. et al, Biotechnol. Bioeng., 94 (4):680-688 (2006); и WO2003/085107).

Кроме того, представлены варианты антител с олигосахаридами из двух частей, например, в которых биантенный олигосахарид, связанный с Fc-областью антитела, разделен пополам посредством GlcNAc. Такие варианты антител могут иметь сниженное фукозилрование и/или улучшенную функцию ADCC. Примеры таких вариантов антител описаны, например, в WO 2003/011878 (Jean-Mairet et al); патенте США No. 6602684 (Umana et al); и US 2005/0123546 (Umana et al). Также представлены варианты антител по меньшей мере с одним остатком галактозы в олигосахариде, присоединенном к Fc-области. Такие варианты антител могут иметь улучшенную функцию CDC. Такие варианты антител описаны, например, в WO 1997/30087 (Patel et al); WO 1998/58964 (Raju, S.); и WO 1999/22764 (Raju, S.).

В определенных вариантах осуществления вариант антитела содержит Fc-область с одной или несколькими аминокислотными заменами, которые дополнительно улучшают ADCC, например, замены в положениях 298, 333, и/или 334 Fc-области (нумерация остатков Eu). Такие замены могут встречаться в комбинации с любым из вариантов, описанных выше.

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к варианту антитела, который обладает некоторыми, но не всеми эффекторными функциями, которые делают его желаемым кандидатом для многих применений, в которых важно время полужизни антитела *in vivo*, но, тем не менее определенные эффекторные функции (такие как комплементзависимая цитотоксичность и ADCC) являются необязательными или вредными. В определенных вариантах осуществления активность Fc антитела определяют для того, чтобы убедиться, что сохранены только желаемые свойства. Анализы цитотоксичности *in vitro* и/или *in vivo* можно проводить для подтверждения снижения/устранения видов активности CDC и/или ADCC. Например, анализы связывания Fc-рецепторов (FcR) можно проводить, чтобы убедиться, что антитело не связывает FcγR (таким образом, вероятно не имеет активности ADCC), однако сохраняет способность связывать FcRn. Главные опосредующие ADCC клетки, NK-клетки, экспрессируют только FcγRIII, в то время как моноциты экспрессируют FcγRI, FcγRII и FcγRIII. Экспрессия FcR на кроветворных клетках обобщенно представлена в таблице

3 на странице 464 Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991).

Неограничивающие примеры анализов *in vitro* для оценки активности ADCC представляющей интерес молекулы описаны в патенте США No. 5500362 (см., например Hellstrom, L, et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83:7059-7063 (1986)) и Hellstrom, I., et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82:1499-1502 (1985); 5821337 (см. Bruggemann, M. et al., J. Exp. Med. 166:1351-1361 (1987)). Альтернативно можно использовать нерадиоактивные способы анализа (см., например, нерадиоактивный анализ цитотоксичности АСТИTM для проточной цитометрии (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA); и нерадиоактивный анализ цитотоксичности CytoTox 96® (Promega, Madison, WI). Пригодные эффекторные клетки для таких анализов включают моноклеарные клетки периферической крови (PBMC) и естественные киллерные (NK) клетки. Альтернативно или дополнительно, активность ADCC представляющей интерес молекулы можно оценивать *in vivo*, например, в модели на животных, такой как модель, описанная в Clynes et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:652-656 (1998). Также можно проводить анализы связывания C1q для подтверждения того, что антитело неспособно связывать C1q и, таким образом, лишено активности CDC. Для анализа активации комплемента можно проводить анализ CDC (см., например, Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996); Cragg, M.S. et al., Blood 101:1045-1052 (2003); и Cragg, M.S. и M.J. Glennie, Blood 103:2738-2743 (2004)). Также можно проводить определение связывания FcRn и выведения/времени полужизни *in vivo* с использованием способов, известных в данной области (см., например, Petkova, S.B. et al., Int'l. Immunol. 18(12):1759-1769 (2006)).

Представлены другие варианты антител, имеющие одну или несколько аминокислотных замен. Представляющие интерес участки для мутагенеза с заменами включают гипервариабельные области, однако также предусмотрены изменения FR. Консервативные замены представлены в таблице 1 под заголовком "Предпочтительные замены". Более существенные изменения, обозначенные как "иллюстративные замены" предоставлены в таблице 1, или как дополнительно описано ниже в отношении классов аминокислот. Аминокислотные замены можно вносить в представляющее интерес антитело и продукты можно подвергать скринингу, например, в отношении желательной активности, такой как улучшенное связывание антигена, сниженная иммуногенность, повышенная ADCC или CDC, и т.д.

Таблица 1

Исходный остаток	Иллюстративные замены	Предпочтительные замены
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg(R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly(G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Норлейцин	Leu
Leu (L)	Норлейцин; He; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys(K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; He	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser

Trp(W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr(Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Норлейцин	Leu

Модификации биологических свойств антитела можно проводить, выбирая замены, которые влияют на (а) структуру полипептидного остова в области замены, например, такую как конформация в виде слоя или спирали, (b) заряд или гидрофобность молекулы в заданном участке, или (с) объем боковой цепи. Аминокислоты можно подразделить на группы на основе сходства свойств их боковых цепей: (A. L. Lehninger, in Biochemistry, second ed., pp. 73-75, Worth Publishers, New York (1975)):

- (1) неполярные: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)
- (2) незаряженные полярные: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)
- (3) кислотные: Asp (D), Glu (E)
- (4) основные: Lys (K), Arg (R), His(H)

Альтернативно природные остатки можно подразделить на группы, исходя из общих свойств боковых цепей:

- (1) гидрофобные: Норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) кислые: Asp, Glu;
- (4) основные: His, Lys, Arg;
- (5) остатки, которые влияют на ориентацию цепи: Gly, Pro;
- (6) ароматические: Trp, Tyr, Phe.

Неконсервативные замены вовлекают замену члена одного из этих классов членом из другого класса. Такие замещенные остатки также можно вносить в участки консервативных замен или, более предпочтительно, в остальные (неконсервативные) участки.

Один из типов варианта с заменами включает замену одного или нескольких остатков гипервариабельного участка исходного антитела (например, гуманизированного антитела или антитела человека). Как правило, полученный вариант(ы), выбранный для дальнейшей разработки, будет обладать модифицированными (улучшенными) биологическими свойствами относительно исходного антитела, из которого они получены. Иллюстративным вариантом с заменами является антитело, полученное созревaniem аффинности, которое можно удобным образом получать способами созревания аффинности с использованием фагового дисплея. В кратком изложении несколько областей гипервариабельной области (например, 6-7 областей) подвергают мутации с получением всех возможных аминокислотных замен в каждом участке. Полученные таким образом варианты антитела экспонируются на частицах нитевидных фагов в качестве молекул, слитых по меньшей мере с частью белка оболочки фага (например, продукта гена III фага M13), упакованных в каждую частицу. Затем экспонированные на фаге варианты подвергают скринингу в отношении их биологической активности (например, аффинности связывания). В целях идентификации участков гипервариабельной области-кандидатов для модификации можно проводить сканирующий мутагенез (например, сканирование аланином), идентифицируя остатки гипервариабельной области, вносящие значительный вклад в связывание антигена. Альтернативно или дополнительно, может быть целесообразным анализ кристаллической структуры комплекса антиген-антитело в целях идентификации точек контакта между антителом и антигеном. Такие контактные остатки и соседние остатки являются кандидатами для замены в соответствии со способами, известными в данной области, включая способы, приведенные в настоящем документе. После получения

таких вариантов панель вариантов подвергают скринингу с использованием способов, известных в данной области, включая способы, описанные в настоящем документе, и варианты с наилучшими свойствами в одном или нескольких соответствующих анализах можно отбирать для дальнейшей разработки.

Молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие варианты антитела по аминокислотной последовательности, получают различными способами, известными в данной области. Эти способы включают, но не ограничиваются ими, выделение из природного источника (в случае природных вариантов аминокислотной последовательности) или получение олигонуклеотид-опосредуемым (или сайт-направленным) мутагенезом, мутагенезом посредством PCR, и кассетным мутагенезом ранее полученного варианта или не являющейся вариантом версии антитела.

Может быть желательным внесение одной или нескольких аминокислотных модификаций в Fc-область антител по изобретению, тем самым получая вариант по Fc-области. Вариант по Fc-области может включать последовательность Fc-области человека (например, Fc-области IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека), содержащую аминокислотную модификацию (например, замену) в одном или нескольких аминокислотных положениях, включая положение цистеина шарнирной области.

Согласно описанию и указаниям в данной области предусматривается, что в некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению может содержать одно или несколько изменений по сравнению с альтернативным антителом дикого типа, например в Fc-области. Эти антитела, тем не менее, сохраняют по существу те же характеристики, которые требуются для терапевтической применимости по сравнению с их аналогом дикого типа. Например, полагают, что в Fc-область можно вносить определенные изменения, которые могут привести к измененному (т.е., либо повышенному, либо сниженному) связыванию C1q и/или комплементзависимой цитотоксичности (CDC), например, как описано в WO99/51642. Также см. Duncan & Winter, Nature 322:738-40 (1988); патент США No. 5648260; патент США No. 5624821; и WO94/29351, касающиеся других примеров вариантов Fc-области. В WO00/42072 (Presta) и WO 2004/056312 (Lowman) описаны варианты антител с улучшенным или сниженным связыванием с FcR. Содержание этих патентных публикаций конкретно включено в настоящий документ в качестве ссылки. Также см., Shields et al. J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001). Антитела с увеличенным временем полужизни и повышенным связыванием с неонатальным Fc-рецептором (FcRn), которые отвечают за перенос материнских IgG в плод (Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976) и Kim et al, J. Immunol. 24:249 (1994)), описаны в US2005/0014934A1 (Hinton et al.). Эти антитела содержат Fc-область с одной или несколькими заменами в ней, которые повышают связывание Fc-области с FcRn. Варианты полипептидов с измененными аминокислотными последовательностями Fc-области и повышенной или сниженной способностью связывать C1q описаны в патенте США No. 6194551B1, WO99/51642. Содержание этих патентных публикаций конкретно включено в настоящий документ в качестве ссылки. Также см., Idusogie et al. J. Immunol. 164:4178-4184 (2000).

В другом аспекте изобретение относится к антителам, содержащим модификации на границе контакта Fc-полипептидов, содержащих Fc-область, где модификации способствуют гетеродимеризации и/или запускают ее. Эти модификации включают внесение выступа в первый Fc-полипептид и полости во второй Fc-полипептид, где выступ может располагаться в полости так, чтобы обеспечить образование комплекса первого и второго Fc-полипептидов. Способы получения антител с этими модификациями известны в данной области, например, как описано в патенте США

No. 5731168.

В другом аспекте, может быть желательным создание антител со встроенным способами инженерии цистеином, например, "тио-MAb", в которых один или несколько остатков антитела замещены остатками цистеина. В конкретных вариантах осуществления замещенные остатки находятся в доступных участках антитела. Путем замены этих остатков цистеином, в доступные участки антитела помещают реакционноспособные тиольные группы и их можно использовать для конъюгации антитела с другими группами, такими как группы лекарственных средств или группы линкер-лекарственное средство, как описано в настоящем документе далее. В определенных вариантах осуществления цистеином может быть заменен один или несколько из следующих остатков: V205 (нумерация по Kabat) легкой цепи; A118 (нумерация EU) тяжелой цепи; и S400 (нумерация EU) Fc-области тяжелой цепи.

10. Производные антител

Антитела по настоящему изобретению можно дополнительно модифицировать, чтобы они содержали дополнительные небелковые группы, которые известны в данной области и легкодоступны. Предпочтительно, группы, пригодные для получения производного антитела, представляют собой растворимые в воде полимеры. Неограничивающие примеры растворимых в воде полимеров включают, но не ограничиваются ими, полиэтиленгликоль (PEG), сополимеры этиленгликоль/пропиленгликоль, карбоксиметилцеллюлозу, декстран, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон, поли-1,3-диоксолан, поли-1,3,6-триоксан, сополимер этилен/малеиновый ангидрид, полиаминокислоты (либо гомополимеры, либо случайные сополимеры), и декстран или поли(н-винил пирролидон)полиэтиленгликоль, пропропиленгликоль гомополимеры, сополимеры окись полипропилена/окись этилена, полиоксиэтилированные полиолы (например, глицерин), поливиниловый спирт и их смеси. Пропиональдегид полиэтиленгликоля может иметь преимущества при изготовлении вследствие его стабильности в воде. Полимер может иметь любую молекулярную массу, и он может быть разветвленным или неразветвленным. Количество полимеров, связанных с антителом, может варьировать, и если связано более одного полимера, они могут представлять собой одинаковые или разные молекулы. Как правило, количество и/или тип полимеров, используемых для получения производного, можно определять, исходя из соображений, включающих, но не ограничивающихся ими, конкретные свойства или функции антитела, подлежащего усовершенствованию, применения производного антитела в терапии в определенных условиях и т.д.

В другом варианте осуществления представлены конъюгаты антитела и небелковой группы, которые можно селективно нагревать путем воздействия облучения. В одном варианте осуществления небелковая группа представляет собой углеродную нанотрубку (Kam et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 11600-11605 (2005)). Облучение может быть любой длины волны, и оно включает, но не ограничивается ими, длины волн, которые не повреждают обычные клетки, но которые нагревают небелковую группу до температуры, при которой происходит уничтожение клеток вблизи конъюгата антитело-небелковая групп.

В. Определенные способы получения антител

1. Определенные способы на основе гибридом

Моноклональные антитела по изобретению можно получать с использованием способа гибридом, впервые описанного Kohler et al, Nature, 256:495 (1975), и, кроме того, описанного, например, в Hongo et al, Hybridoma, 14 (3): 253-260 (1995), Harlow et al, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988);

Hammerling et al, in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981), и Ni, Xiandai Mianyixue, 26(4):265-268 (2006) в отношении гибридом человека-человека. Дополнительные способы включают способы, описанные, например, в патенте США No. 7189826 в отношении продукции моноклональных природных антител IgM человека из гибридомных клеточных линий. Технология гибридом человека (технология триом) описана в Vollmers and Brandlein, Histology and Histopathology, 20(3):927-937 (2005) и Vollmers and Brandlein, Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 27(3):185-91 (2005).

Для различных других способов гибридом, см., например, US 2006/258841; US 2006/183887 (полностью человеческие антитела), US 2006/059575; US 2005/287149; US 2005/100546; US 2005/026229; и патенты США No. 7078492 и 7153507. Иллюстративный протокол для получения моноклональных антител с использованием способа гибридом описан далее. В одном варианте осуществления мышь или другое подходящее животное-хозяина, такое как хомячок, иммунизируют для индукции лимфоцитов, которые продуцируют или способны продуцировать антитела, которые специфично связываются с белком, используемым для иммунизации. Антитела индуцируют у животных путем множества подкожных (sc) или внутрибрюшинных (ip) инъекций полипептида, содержащего Notch2 или его фрагмент (например, NRR Notch2), и адъювант, такой как монофосфорилипид A (MPL)/дикрономиколат трегалозы (TDM) (Ribi Immunochem. Research, Inc., Hamilton, MT). Полипептид, содержащий Notch2 или его фрагмент, можно получать с использованием способов, хорошо известных в данной области, таких как рекомбинантные способы, некоторые из которых дополнительно описаны в настоящем документе. Сыворотку иммунизированных животных анализируют в отношении антител против Notch2, и необязательно проводят вспомогательные иммунизации. Лимфоциты животных, продуцирующих антитела против Notch2, выделяют. Альтернативно лимфоциты можно иммунизировать *in vitro*.

Затем лимфоциты подвергают слиянию с клетками миеломы с использованием пригодного средства для слияния, такого как полиэтиленгликоль, с образованием гибридомных клеток. См., например, Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986). Клетки миеломы можно использовать для эффективного слияния, поддержания стабильной продукции антитела на высоком уровне с помощью выбранных антителопродуцирующих клеток, и они являются чувствительными к среде, такой как среда НАТ. Иллюстративные клетки миеломы включают, но не ограничиваются ими, линии миеломы мыши, такие как линии, происходящие из опухолей мыши MOPC-21 и MPC-11, доступные от Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA, и клетки SP-2 или X63-Ag8-653, доступные от American Type Culture Collection, Rockville, Maryland USA. Также для продукции моноклональных антител человека описаны миеломные клеточные линии и линии гетеромиеломы мыши-человека (Kozbor, J. Immunol, 133:3001 (1984); и Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

Полученные таким образом гибридомные клетки высевают и выращивают в пригодной культуральной среде, которая предпочтительно содержит одно или несколько веществ, которые ингибируют рост или выживание неслитых исходных клеток миеломы. Например, если исходные клетки миеломы лишены фермента гипоксантин-гуанин-фосфорибозил-трансферазы (HGPRT или HPRT), культуральная среда для гибридом, как правило, включает гипоксантин, аминоптерин и тимидин (среда НАТ), которые препятствуют росту клеток, дефицитных по HGPRT. Предпочтительно, используют бессывороточные способы культивирования гибридомных клеток для уменьшения

применения полученной от животного сыворотки, такой как эмбриональная телячья сыворотка, как описано, например, в Even et al., Trends in Biotechnology, 24(3), 105-108 (2006).

Олигопептиды в качестве инструментов повышения продуктивности гибридных клеточных культур описаны в Franek, Trends in Monoclonal Antibody Research, 111-122 (2005). Конкретно, стандартную культуральную среду обогащают определенными аминокислотами (аланином, серином, аспарагином, пролином), или фракциями белкового гидролизата, и апоптоз можно значительно подавлять с помощью синтетических олигопептидов, сконструированных из от трех до шести аминокислотных остатков. Пептиды присутствуют в миллимолярных или более высоких концентрациях.

Культуральную среду, в которой выращивают гибридные клетки, оценивают на продукцию моноклональных антител, которые связывают Notch2. Специфичность связывания моноклональных антител, продуцируемых гибридными клетками, определяют посредством иммунопреципитации или анализа связывания *in vitro*, такого как радиоиммунный анализ (RIA) или твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA). Аффинность связывания моноклонального антитела можно определять, например, посредством анализа Скэтчарда, описанного в Munson et al., Anal. Biochem., 107:220 (1980).

После идентификации гибридных клеток, которые продуцируют антитела с требуемой специфичностью, аффинностью и/или активностью, клоны можно субклонировать способами лимитирующих разведений и выращивать стандартными способами. См., например, Goding, выше. Пригодные для этой цели культуральные среды включают, например, среду D-MEM или RPMI-1640. Кроме того, гибридные клетки можно выращивать *in vivo* у животных в качестве асцитных опухолей. Моноклональные антитела, секретируемые субклонами, пригодным образом выделяют из культуральной среды, асцитной жидкости или сыворотке с помощью общепринятых способов очистки иммуноглобулинов, например, таких как хроматография с белком A-Sepharose, хроматография с гидроксипатитом, гель-электрофорез, диализ или аффинная хроматография. Один из способов выделения белков из гибридных клеток описан в US 2005/176122 и патенте США No. 6919436. Способ включает применение минимальных солей, таких как лиотропные соли, в процессе связывания, а также предпочтительно с использованием небольших количеств органических растворителей в процессе элюирования.

2. Некоторые способы скрининга библиотек

Антитела по изобретению можно получать с использованием комбинаторных библиотек для скрининга антител с требуемой активностью или видами активности. Например, в данной области известны различные способы создания библиотек фагового дисплея и скрининга таких библиотек в отношении антител, обладающих требуемыми характеристиками связывания. Такие способы описаны, главным образом, в Hoogenboom et al., in Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001). Например, один способ получения представляющих интерес антител осуществляют с использованием фаговой библиотеки антител, как описано в Lee et al. (2004) J. Mol. Biol. 340:1073-1093.

По существу, клоны синтетических антител подвергают селекции посредством библиотек фагового дисплея, которые содержат фаг, который экспонирует различные фрагменты вариабельной области (Fv) антитела, слитые с белком оболочки фага. Такие фаговые библиотеки сортируют с помощью аффинной хроматографии против требуемого антигена. Клоны, экспрессирующие Fv-фрагменты, способные связываться

с требуемым антигеном, адсорбируются на антиген и, таким образом, их отделяют от несвязывающих клонов в библиотеке. Затем связывающие клоны элюируют от антигена, и их содержание можно далее повышать посредством дополнительных циклов адсорбции/элюирования антигена. Путем разработки пригодного способа скрининга с помощью антигена для селекции представляющего интерес клон фага с последующим конструированием клон полноразмерного антитела с использованием последовательностей Fv из представляющего интерес фагового клон и пригодных последовательностей константной области (Fc), описанных в Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3, можно получать любые из антител по изобретению.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий домен антитела образован из двух переменных (V) областей приблизительно из 110 аминокислот, по одной из легкой (VL) и тяжелой (VH) цепей, в обеих из которых присутствуют три гиперпеременные петли (HVR) или определяющие комплементарность области (CDR). Переменные домены могут функционально экспонироваться на фаге, либо в качестве одноцепочечных Fv-фрагментов (scFv), в которых VH и VL ковалентно связаны через короткий подвижный пептид, либо в качестве Fab-фрагментов, в которых они обе являются слитыми с константным доменом и взаимодействуют нековалентно, как описано в Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). В настоящем документе фаговые клоны, кодирующие scFv, и фаговые клоны, кодирующие Fab, совместно называют "фаговыми клонами Fv" или "клонами Fv".

Репертуары генов VH и VL можно по отдельности клонировать полимеразной цепной реакцией (ПЦР) и подвергать случайной рекомбинации в фаговых библиотеках, в которых затем проводят поиск антигенсвязывающих клонов, как описано в Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Библиотеки из иммунизированных источников обеспечивают высокоаффинные антитела к иммуногену без необходимости конструирования гибридом. Альтернативно, можно клонировать наивный репертуар для обеспечения одного источника антител человека к широкому диапазону несобственных, а также собственных антигенов без иммунизации, как описано Griffiths et al., *EMBO J.*, 12: 725-734 (1993). В заключение, библиотеки с наивным репертуаром также можно получать синтетически путем клонирования не подвергнутых реаранжировке сегментов V-генов из стволовых клеток, и использования праймеров для ПЦР, содержащих случайную последовательность, для кодирования высоко переменных областей CDR3 и для проведения реаранжировки *in vitro*, как описано Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992).

В определенных вариантах осуществления используют нитевидные фаги для экспонирования фрагментов антител путем слияния с минорным белком оболочки рIII. Фрагменты антител могут быть экспонированы в виде одноцепочечных Fv-фрагментов, в которых VH- и VL-домены связаны на одной полипептидной цепи подвижным полипептидным спейсером, например, как описано в Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), или в качестве Fab-фрагментов, в которых одна цепь является слитой с рIII, а другая секретируется в периплазму бактериальной клетки-хозяина, где собирается структура Fab-белок оболочки, которая экспонируется на поверхности фага путем вытеснения некоторых из белков оболочки дикого типа, например, как описано в Hoogenboom et al., *Nucl. Acids Res.*, 19: 4133-4137 (1991).

Как правило, нуклеиновые кислоты, кодирующие фрагменты гена антитела, получают из иммунных клеток, полученных от человека или животных. Если является желательной библиотека, смещенная в сторону клонов, направленных против Notch2 (клонов против

NRR Notch2), индивидуума иммунизируют посредством Notch2 (или NRR Notch2) для обеспечения антительного ответа, и выделяют клетки селезенки и/или циркулирующие В-клетки, и другие лимфоциты периферической крови человека (PBL) для конструирования библиотеки. В предпочтительном варианте осуществления получают библиотеку фрагментов гена антитела человека, смещенную в сторону клонов, направленных против Notch2, путем обеспечения ответа антител против Notch2 у трансгенной мыши, обладающей функциональным набором генов иммуноглобулинов человека (и лишенной функциональной эндогенной системы продукции антител), так что иммунизация посредством Notch2 приводит к возникновению В-клеток, продуцирующих антитела человека против Notch2. Создание продуцирующих антитела человека трансгенных мышей описано ниже.

Дополнительное повышение содержания популяций клеток, реактивных против Notch2, можно обеспечивать с использованием пригодного способа скрининга для выделения В-клеток, экспрессирующих специфичное к Notch2 мембраносвязанное антитело, например, путем разделения клеток с использованием аффинной хроматографии с Notch2 или адсорбции клеток на меченный флуорохромом Notch2 с последующей активированной флуоресценцией сортировкой клеток (FACS).

Альтернативно применение клеток селезенки и/или В-клеток или других PBL от неиммунизированного донора обеспечивает лучшее представление возможного репертуара антител, и также позволяет конструирование библиотеки антител с использованием любого вида животных (человека или не относящегося к человеку), в котором Notch2 не является антигенным. Для библиотек, включающих конструирование генов антител *in vitro*, собирают стволовые клетки субъекта для получения нуклеиновых кислот, кодирующих не подвергнутые реаранжировке сегменты генов антител.

Представляющие интерес иммунные клетки можно получать из различных видов животных, таких как человек, мышь, крыса, видов зайцеобразных, волчьих, собачьих, кошачьих, свиней, крупного рогатого скота, лошадей и птиц и т.д.

Нуклеиновую кислоту, кодирующую переменные сегменты генов (включая сегменты VH и VL) выделяют из представляющих интерес клеток и амплифицируют. В случае подвергнутых реаранжировке библиотек генов VH и VL, требуемую ДНК можно получать путем выделения геномной ДНК или мРНК из лимфоцитов с последующей полимеразной цепной реакцией (ПЦР) с праймерами, совпадающими с 5'- и 3'-концами подвергнутых реаранжировке генов VH и VL, как описано в Orlandi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 3833-3837 (1989), тем самым получая разнообразные репертуары V-генов для экспрессии. V-гены можно амплифицировать из кДНК и геномной ДНК с помощью обратных праймеров на 5'-конце экзона, кодирующего зрелый V-домен, и прямых праймеров, располагающихся в J-сегменте, как описано в Orlandi et al. (1989) и Ward et al., Nature, 341:544-546 (1989). Однако для амплификации из кДНК, обратные праймеры также могут располагаться в лидерном экзоне, как описано в Jones et al., Biotechnol., 9:88-89 (1991), а прямые праймеры могут располагаться в константной области, как описано в Sastry et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 5728-5732 (1989). Для максимального повышения комплементарности, в праймеры можно включать вырожденность, как описано в Orlandi et al. (1989) или Sastry et al. (1989). В определенных вариантах осуществления разнообразие библиотеки максимально увеличивают с использованием праймеров ПЦР, направленных на каждое семейство V-генов для амплификации всех доступных расположений VH и VL, присутствующих в образце нуклеиновой кислоты иммунных клеток, например, как описано в способе Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991) или как описано в способе Orum et al., Nucleic

Acids Res., 21:4491-4498 (1993). Для клонирования амплифицированной ДНК в экспрессирующие векторы, в праймер для ПЦР можно вносить редкие участки рестрикции в качестве метки на одном конце, как описано в Orlandi et al. (1989), или путем дальнейшей амплификации посредством ПЦР с праймером с меткой, как описано

5 в Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991).
Репертуары подвергнутых синтетической реаранжировке V-генов можно получать *in vitro* из сегментов V-генов. Большинство из сегментов VH-генов человека были клонированы и отсекуены (как описано в Tomlinson et al., J. Mol. Biol, 227: 776-798 (1992)), и картированы (описано в Matsuda et al., Nature Genet., 3: 88-94 (1993)); эти
10 клонированные сегменты (включая все главные конформации петли H1 и H2) можно использовать для получения разнообразных репертуаров VH-генов с помощью праймеров для ПЦР, кодирующих петли H3 с разнообразной последовательностью и длиной, как описано в Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381-388 (1992). Также можно получать репертуары VH, где все разнообразие последовательности
15 сфокусировано в длинной петле H3 с единой длиной, как описано в Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4457-4461 (1992). Сегменты V κ и V λ человека были клонированы и отсекуены (описано в Williams and Winter, Eur. J. Immunol., 23:1456-1461 (1993)) и их можно использовать для получения синтетических репертуаров легких цепей. Синтетические репертуары V-генов, на основе ряда сборок VH и VL, и длин L3 и H3,
20 кодируют антитела со значительным структурным разнообразием. После амплификации ДНК, кодирующей V-ген, сегменты V-генов зародышевой линии можно подвергать реаранжировке *in vitro* в соответствии со способами Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol, 227:381-388 (1992).

Репертуары фрагментов антител можно конструировать, комбинируя репертуары
25 генов VH и VL различными путями. Каждый репертуар можно создавать в отдельных векторах, и векторы подвергать рекомбинации *in vitro*, например, как описано в Hogrefe et al., Gene, 128: 119-126 (1993), или *in vivo* путем комбинаторной инфекции, например, с помощью системы loxP, описанной в Waterhouse et al., Nucl. Acids Res., 21: 2265-2266 (1993). В подходе рекомбинации *in vivo* используется двухцепочечная структура Fab-
30 фрагментов для преодоления ограничения размера библиотеки, определяемого эффективностью трансформации *E. coli*. Наивные репертуары VH и VL клонируют по отдельности, один в плазмиду, а другой в фаговый вектор. Затем две библиотеки комбинируют посредством инфекции фагом содержащих фагмиду бактерий, так что каждая клетка содержит отличающееся сочетание, и размер библиотеки ограничивается
35 только числом присутствующих клеток (приблизительно 10^{12} клонов). Оба вектора содержат сигналы рекомбинации *in vivo*, так что гены VH и VL рекомбинируют в один репликон и совместно упаковываются в фаговые вирионы. Эти огромные библиотеки обеспечивают большие количества разнообразных антител с высокой аффинностью
40 (K_d^{-1} приблизительно 10^{-8} M).

Альтернативно репертуары можно клонировать последовательно в один вектор, например, как описано в Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:7978-7982 (1991), или объединять посредством ПЦР, а затем клонировать, например как описано в Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991). Сборку посредством ПЦР также можно использовать
45 для связывания ДНК VH и VL с ДНК, кодирующей подвижный пептидный спейсер, с образованием репертуаров одноцепочечных Fv (scFv). В другом способе используют "сборку посредством ПЦР в клетках" для объединения генов VH и VL в лимфоцитах посредством ПЦР, а затем клонирования репертуаров связанных генов, как описано

в Embleton et al., Nucl. Acids Res., 20:3831-3837 (1992).

Антитела, продуцируемые наивными библиотеками (либо природными, либо синтетическими) могут иметь умеренную аффинность (K_d^{-1} приблизительно от 10^6 до

5 10^7 M^{-1}), однако созревание аффинности также можно имитировать *in vitro* посредством конструирования и повторной селекции из вторичных библиотек, как описано в Winter et al. (1994), выше. Например, мутацию можно вносить случайным образом *in vitro* с использованием полимеразы с пониженной точностью (описано Leung et al., Technique, 1:11-15 (1989)) в способе Hawkins et al., J. Mol. Biol., 226:889-896 (1992) или в способе
10 Gram et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 89: 3576-3580 (1992). Кроме того, созревание аффинности можно проводить путем внесения мутации случайным образом в одну или несколько CDR, например, с использованием ПЦР с праймерами, имеющими случайную последовательность, охватывающую представляющую интерес CDR, в выбранных отдельных клонах Fv, и скринингом на клоны с наиболее высокой аффинностью. В WO
15 9607754 (опубликованной 14 марта 1996 года) описан способ индукции мутагенеза в определяющей комплементарности области легкой цепи иммуноглобулина для создания библиотеки генов легкой цепи. Другим эффективным подходом является рекомбинация VH- или VL-доменов, отобранных посредством фагового дисплея, с репертуарами природных вариантов V-доменов, полученными из неиммунизированных доноров, и
20 скрининг на наиболее высокую аффинность в нескольких раундах повторной перетасовки цепей, как описано в Marks et al., Biotechnol., 10:779-783 (1992). Этот способ позволяет продукцию антител и фрагментов антител с аффинностью приблизительно 10^{-9} M или менее.

Скрининг библиотек можно проводить различными способами, известными в данной области. Например, Notch2 (или NRR Notch2) можно использовать для нанесения на
25 лунки адсорбционных планшетов, экспрессировать на клетках-хозяевах, фиксированных на адсорбционных планшетах или использовать в сортировке клеток, или конъюгировать с биотином для улавливания покрытыми стрептавидином гранулами, или использовать в любом способе пэннинга библиотек фагового дисплея.

30 Образцы для фагового дисплея подвергают контактированию с иммобилизованным Notch2 в условиях, пригодных для связывания по меньшей мере части фаговых частиц с адсорбентом. Обычно выбирают условия, включая pH, ионную силу, температуру и т.п., имитирующие физиологические условия. Фаги, связанные с твердой фазой, промывают, а затем элюируют кислотой, например, как описано в Barbas et al., Proc.
35 Natl. Acad. Sci USA, 88:7978-7982 (1991), или щелочью, например, как описано в Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991), или посредством конкуренции с антигеном Notch2, например в способе, сходным со способом конкуренции с антигеном в Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991). За один раунд селекции фаги можно обогащать в 20-1000 раз. Более того, обогащенные фаги можно выращивать в бактериальной культуре и
40 подвергать последующим раундам селекции.

Эффективность селекции зависит от множества факторов, включая кинетику диссоциации при промывании, и возможность одновременной встречи множества фрагментов антител с антигеном. Антитела с быстрой кинетикой диссоциации (и слабой аффинностью связывания) можно задерживать с использованием короткого
45 промывания, поливалентного фагового дисплея и высокой плотности нанесения антигена на твердую фазу. Высокая плотность не только стабилизирует фаг при поливалентных взаимодействиях, но также способствует повторному связыванию фага, который диссоциировал. Селекцию антител с низкой кинетикой диссоциации (и высокой

аффинностью связывания) можно обеспечивать, используя длительные промывания и одновалентный фаговый дисплей, как описано в Bass et al., *Proteins*, 8:309-314 (1990) и в WO 92/09690, и низкую плотность нанесения антигена, как описано в Marks et al., *Biotechnol.*, 10:779-783 (1992).

5 Селекцию между фаговыми антителами с различной аффинностью к Notch2 можно проводить даже при аффинности, которая отличается немного. Однако случайная мутация выбранного антитела (например, как происходит в некоторых способах созревания аффинности) может привести к возникновению многих мутантов, большинство из которых связываются с антигеном, и немногие из которых обладают
10 более высокой аффинностью. При ограничении Notch2, редкий высокоаффинный фаг может быть конкурентно устранен. Для сохранения всех мутантов с более высокой аффинностью, фаги можно инкубировать с избытком биотинилированного Notch2, но с биотинилированным Notch2 в концентрации с более низкой молярностью, чем предполагаемая молярная аффинность, постоянная для Notch2. Затем связывающиеся с
15 высокой аффинностью фаги можно улавливать покрытыми стрептавидином парамагнитными гранулами. Такое "равновесное улавливание" позволяет селекцию антител согласно их аффинности связывания, с чувствительностью, которая позволяет выделение мутантных клонов с аффинностью, большей только в два раза, из большого избытка фагов с более низкой аффинностью. Также можно изменять условия,
20 используемые для промывания фагов, связанных с твердой фазой, для различения на основе кинетики диссоциации.

Клоны, направленные против Notch2, можно отбирать на основе активности. В определенных вариантах осуществления изобретение относится к антителам против Notch2, которые связываются с живыми клетками, которые естественным образом
25 экспрессируют Notch2. В одном варианте осуществления изобретение относится к антителам против Notch2, которые блокируют связывание между лигандом Notch2 и Notch2, но не блокируют связывание между лигандом Notch2 и вторым белком. Клоны Fv, соответствующие таким антителам против Notch2, можно подвергать селекции посредством (1) выделения клонов, направленных против Notch2, из фаговой библиотеки,
30 как описано выше, и необязательно размножения выделенной популяции фаговых клонов путем выращивания популяции в пригодном бактериальном хозяине; (2) селекции Notch2 и второго белка, против которого является желательной блокирующая и неблокирующая активность, соответственно; (3) адсорбции фаговых клонов, направленных против Notch2, на иммобилизованный Notch2; (4) применения избытка
35 второго белка для элюирования каких-либо нежелательных клонов, которые распознают связывающие Notch2 детерминанты, которые перекрываются или являются общими со связывающими детерминантами второго белка; и (5) элюирования клонов, которые остаются адсорбированными после стадии (4). Необязательно, клоны с требуемыми блокирующими/неблокирующими свойствами можно дополнительно обогащать путем
40 повторения процессов селекции, описанных в настоящем документе, один или несколько раз.

ДНК, кодирующую образованные из гибридомы моноклональные антитела или клоны Fv фагового дисплея по изобретению, легко выделять и секвенировать с использованием общепринятых способов (например, с использованием
45 олигонуклеотидных праймеров, сконструированных для специфичной амплификации представляющих интерес кодирующих участков тяжелой и легкой цепей из гибридомы или ДНК-матрицы фага). После выделения ДНК можно помещать в экспрессирующие векторы, которые затем трансфицируют в клетки-хозяева, такие как клетки *E. coli*,

клетки COS обезьяны, клетки яичника китайского хомячка (СНО), или клетки миеломы, которые в ином случае не продуцируют белок иммуноглобулина, обеспечивая синтез требуемых моноклональных антител в рекомбинантных клетках-хозяевах. Обзорные статьи по рекомбинантной экспрессии в бактериях ДНК, кодирующей антитело, включают Skerra et al., Curr. Opinion in Immunol., 5:256 (1993) и Pluckthun, Immunol. Revs, 130:151 (1992).

ДНК, кодирующую клоны Fv по изобретению, можно комбинировать с известными последовательностями ДНК, кодирующими константные участки тяжелой цепи и/или легкой цепи (например, соответствующие последовательности ДНК можно получать в соответствии с Kabat et al., выше) с образованием клонов, кодирующих полноразмерные или неполные тяжелые и/или легкие цепи. Будет понятно, что для этой цели можно использовать константные области любого изотипа, включая константные области IgG, IgM, IgA, IgD и IgE, и что такие константные области можно получать от человека или из любого вида животных. Клон Fv, образованный из ДНК варибельного домена одного вида животных (такого как человек), а затем слитый с ДНК константной области другого вида животных с образованием кодирующей последовательности(ей) "гибридной" полноразмерной тяжелой цепи и/или легкой цепи, включен в определение "химерного" и "гибридного" антитела как используют в настоящем документе. В определенных вариантах осуществления клон Fv, образованный из ДНК варибельной области человека, является слитым с ДНК константной области человека с образованием кодирующей последовательности(ей) для полноразмерной или неполной тяжелой и/или легкой цепей.

ДНК, кодирующую антитело против Notch2, происходящую из гибридомы, также можно модифицировать, например, путем замены кодирующей последовательности константными доменами тяжелой и легкой цепей вместо гомологичных последовательностей мыши, происходящих из клона гибридомы (например, как в способе Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)). ДНК, кодирующую происходящее из гибридомы или Fv-клона антитело или фрагмент, можно дополнительно модифицировать ковалентным связыванием с кодирующей последовательностью иммуноглобулина всей кодирующей последовательности не являющегося иммуноглобулином полипептида, или ее части. Таким образом, получают "химерные" или "гибридные" антитела, которые обладают специфичностью связывания происходящих из Fv-клона или клона гибридомы антител по изобретению.

3. Векторы, клетки-хозяева и рекомбинантные способы

Также антитела можно получать с использованием рекомбинантных способов. Для рекомбинантной продукции антитела против Notch2 нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, выделяют и встраивают в реплицируемый вектор для последующего клонирования (амплификации ДНК) или для экспрессии. ДНК, кодирующую антитело, можно легко выделять и секвенировать с использованием общепринятых способов (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, которые способны специфично связываться с генами, кодирующими тяжелую и легкую цепи антитела). Доступно множество векторов. Компоненты векторов, как правило, включают, но не ограничиваются ими, один или несколько из следующих компонентов: сигнальная последовательность, ориджин (начало) репликации, один или несколько генов селективных маркеров, энхансерный элемент, промотор и последовательность терминации транскрипции.

а) Компонент - сигнальная последовательность

Антитело по изобретению можно получать рекомбинантными способами не только

непосредственно, но также в качестве полипептида, слитого с гетерологичным полипептидом, который предпочтительно представляет собой сигнальную последовательность или другой полипептид, обладающий участком для специфичного расщепления на N-конце зрелого белка или полипептида. Выбранная гетерологичная

5 сигнальная последовательность предпочтительно представляет собой последовательность, которая распознается и преобразуется (т.е., расщепляется сигнальной пептидазой) в клетке-хозяине. В случае прокариотических клеток-хозяев, которые не распознают и не преобразуют нативную сигнальную последовательность антитела, сигнальную последовательность можно заменять прокариотической

10 сигнальной последовательностью, выбранной, например, из группы из лидерных последовательностей щелочной фосфатазы, пенициллиназы, Ipp или термостабильного энтеротоксина II. В случае секреции в дрожжах, нативную сигнальную последовательность можно заменять, например, лидерной последовательностью инвертазы дрожжей, лидерной последовательностью α -фактора (включая лидерные

15 последовательности α -фактора *Saccharomyces* и *Kluyveromyces*) или лидерной последовательностью кислой фосфатазы, лидерной последовательностью глюкоамилазы *C. albicans* или сигнальной последовательностью, описанной в WO 90/13646. Для экспрессии в клетках млекопитающих, доступны сигнальные последовательности млекопитающих, а также вирусные секреторные лидерные последовательности,

20 например, сигнальная последовательность gD вируса простого герпеса.

б) Оридгин репликации

Векторы как для экспрессии, так и для клонирования, содержат последовательность нуклеиновой кислоты, которая обеспечивает репликацию вектора в одной или нескольких выбранных клетках-хозяевах. Как правило, в векторах для клонирования

25 эта последовательность представляет собой последовательность, которая обеспечивает репликацию вируса независимо от хромосомной ДНК хозяина, и включает ориджины репликации или автономно реплицирующиеся последовательности. Такие последовательности хорошо известны для множества бактерий, дрожжей и вирусов. Оридгин репликации из плазмиды pBR322 является пригодным для большинства

30 грамотрицательных бактерий, плазмидный ориджин 2 μ пригоден для дрожжей, и различные вирусные ориджины (SV40, вируса полиомы, аденовируса, VSV или BPV) пригодны для клонирования векторов в клетках млекопитающих. Как правило, для экспрессирующих векторов млекопитающих компонент, представляющий собой ориджин репликации, не требуется (ориджин SV40, главным образом, можно

35 использовать только потому, что он содержит ранний промотор).

с) Компонент - селективный ген

Экспрессирующие и клонирующие векторы могут содержать ген для селекции, также называемый селективным маркером. Типичные гены для селекции кодируют белки, которые (а) придают устойчивость к антибиотикам или другим токсинам, например,

40 ампициллину, неомицину, метотрексату или тетрациклину, (b) комплементируют дефекты ауксотрофов или (с) обеспечивают основные питательные вещества, которые не доступны из комплексных сред, например, ген, кодирующий D-аланинацетамид для *Bacilli*.

В одном примере схемы селекции используют лекарственное средство для остановки

45 роста клетки-хозяина. Клетки, которые успешно трансформированы гетерологичным геном, продуцируют белок, придающий устойчивость к лекарственному средству и, таким образом, выживают после режима селекции. Примерами такого доминантного вида селекции является применение лекарственных средств неомицина, микофеноловой

кислоты и гигромицина.

Другим примером пригодных селективных маркеров для клеток млекопитающих являются маркеры, которые позволяют идентификацию клеток, способных захватывать нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, такие как гены DHFR, глутаминсинтетазу (GS), тимидинкиназы, металлотеонеина-I и -II, предпочтительно гены металлотеонеина приматов, аденозиндезаминазы, орнитиндекарбоксилазы и т.д.

Например, клетки, трансформированные геном для селекции DHFR, сначала идентифицируют культивированием всех трансформантов в культуральной среде, которая содержит метотрексат (Mtx), конкурентный антагонист DHFR. В этих условиях ген DHFR амплифицируется вместе с любой другой совместно трансформированной нуклеиновой кислотой. При использовании DHFR дикого типа, пригодные клетки-хозяева представляют собой клеточную линию яичника китайского хомячка (CHO), дефицитную по активности DHFR (например, ATCC CRL-9096).

Альтернативно, клетки, трансформированные геном CS, выявляют культивированием трансформантов в культуральной среде, содержащей L-метионинсульфоксимин (Msx), ингибитор GS. В этих условиях ген GS амплифицируется вместе с любой другой совместно трансформированной нуклеиновой кислотой. Систему для селекции/амплификации GS можно использовать в комбинации с системой селекции/амплификации DHFR, описанной выше.

Альтернативно, клетки-хозяева (в частности, хозяева дикого типа, которые содержат эндогенный DHFR), трансформированные или совместно трансформированные с последовательностями ДНК, кодирующими антитело по изобретению, ген DHFR дикого типа и другой селективный маркер, такой как аминокликозид-3'-фосфотрансфераза (APH), можно отбирать выращиванием клеток на среде, содержащей вещество для селекции по селективному маркеру, такое как аминокликозидный антибиотик, например, канамицин, неомицин или G418. См. патент США No. 4965199.

Пригодным геном для селекции для применения в дрожжах является ген *trp1*, находящийся в дрожжевой плазмиде YRp7 (Stinchcomb et al., Nature, 282:39 (1979)). Ген *trp1* представляет собой селективный маркер для мутантного штамма дрожжей, у которого отсутствует способность расти в отсутствии триптофана, например, ATCC No. 44076 или PER4-1. Jones, Genetics, 85:12 (1977). Затем наличие повреждения *trp1* в геноме дрожжевой клетки-хозяина обеспечивает эффективные условия для определения трансформации по росту в отсутствии триптофана. Аналогично, дефицитные по *Leu2* штаммы дрожжей (ATCC 20622 или 38626), комплементируют известными плазмидами, обладающими геном *Leu2*.

Кроме того, векторы, полученные из 1,6-мкм кольцевой плазмиды pKD1, можно использовать для трансформации дрожжей *Kluyveromyces*. Альтернативно описаны экспрессирующие системы для крупномасштабной продукции рекомбинантного химозина телят для *K. lactis*. Van den Berg, Bio/Technology, 8:135 (1990). Также описаны стабильные мультикопийные экспрессирующие векторы для секреции зрелого рекомбинантного сывороточного альбумина человека посредством промышленных штаммов *Kluyveromyces*. Fleer et al., Bio/Technology, 9:968-975 (1991).

d) Компонент - промотор

Экспрессирующие и клонирующие векторы, как правило, содержат промотор, который распознается организмом-хозяином и функционально связан с нуклеиновой кислотой, кодирующей антитело. Промоторы, пригодные для применения в прокариотических хозяевах, включают промотор *phoA*, промоторные системы β -лактамазы и лактозы, промотор щелочной фосфатазы, промоторную систему

триптофана (trp) и гибридные промоторы, такие как промотор tac. Однако пригодными являются другие бактериальные промоторы. Промоторы для применения в бактериальных системах также содержат последовательность Шайна-Дальгарно (S.D.), функционально связанную с ДНК, кодирующей антитело.

5 Известны промоторные последовательности для эукариот. Практически все эукариотические гены обладают АТ-богатой областью, расположенной приблизительно от 25 до 30 оснований выше участка инициации транскрипции. Другая последовательность, находящаяся от 70 до 80 оснований выше точки начала транскрипции множества генов, представляет собой участок CNCAAT, где N может
10 представлять собой любой нуклеотид. На 3'-конце большинства эукариотических генов находится последовательность AATAAA, которая может представлять собой сигнал для добавления поли-А хвоста к 3'-концу кодирующей последовательности. Все из этих последовательностей можно встраивать в эукариотические экспрессирующие векторы.

Примеры пригодных промоторных последовательностей для применения в
15 дрожжевых хозяевах включают промоторы 3-фосфоглицераткиназы или других гликолитических ферментов, таких как енолаза, глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа, гексокиназа, пируватдекарбоксилаза, фосфофруктокиназа, глюкоза-6-фосфат изомераза, 3-фосфоглицеромутаза, пируваткиназа, триозофосфатизомераза, фосфоглюкоизомераза и глюкокиназа.

20 Другие дрожжевые промоторы, которые представляют собой индуцибельные промоторы, обладающие дополнительным преимуществом контролируемой условиями выращивания транскрипции, представляют собой промоторные участки алкогольдегидрогеназы 2, изоцитохрома C, кислой фосфатазы, ферментов деградации, связанных с метаболизмом азота, металлотеонеина, глицеральдегид-3-фосфат
25 дегидрогеназы и ферментов, ответственных за употребление мальтозы и галактозы. Кроме того, пригодные векторы и промоторы для применения для экспрессии в дрожжах описаны в EP 73657. Также предпочтительно с дрожжевыми промоторами используют дрожжевые энхансеры.

Транскрипция антитела с векторов в клетках-хозяевах млекопитающих
30 контролируется, например, промоторами, получаемыми из геномов вирусов, таких как вирус полиомы, вирус оспы птиц, аденовирус (такой как аденовирус 2), вирус папилломы крупного рогатого скота, вирус саркомы птиц, цитомегаловирус, ретровирус, вирус гепатита-B и наиболее предпочтительно, вирус обезьяны 40 (SV40), гетерологичными промоторами млекопитающих, например, промотором актина или промотором
35 иммуноглобулина, промоторами теплового шока, при условии, что такие промоторы являются совместимыми с системами клеток-хозяев.

Ранние и поздние промоторы вируса SV40 обычно получают в качестве рестрикционного фрагмента SV40, который также содержит ориджин репликации вируса SV40. Предранний промотор цитомегаловируса человека обычно получают в
40 качестве рестрикционного фрагмента HindIII E. Система для экспрессии ДНК в хозяевах, относящихся к млекопитающим, с использованием вируса папилломы крупного рогатого скота в качестве вектора описана в патенте США No. 4419446. Модификация этой системы описана в патенте США No. 4601978. См. также Reyes et al., Nature 297:598-601 (1982) в отношении экспрессии кДНК интерферона человека в клетках мышей под
45 контролем промотора тимидинкиназы из вируса простого герпеса. Альтернативно в качестве промотора можно использовать длинный концевой повтор вируса саркомы Рауса.

е) Компонент - энхансерный элемент

Транскрипцию ДНК, кодирующей антитело по настоящему изобретению, у высших эукариот часто усиливают посредством встраивания в вектор энхансерной последовательности. Известно много энхансерных последовательностей из генов млекопитающих (глобина, эластазы, альбумина, α -фетопротеина и инсулина). Однако, как правило, используют энхансер из вируса эукариотической клетки. Их примеры включают энхансер SV40 на поздней стороне ориджина репликации (п.о. 100-270), энхансер раннего промотора цитомегаловируса, энхансер полиомы на поздней стороне ориджина репликации и энхансеры аденовируса. См. также Yaniv, Nature 297:17-18 (1982) в отношении энхансеров для активации эукариотических промоторов. Энхансер может быть присоединен в векторе к кодирующей антитело последовательности в положении 5' или 3', однако предпочтительно он расположен в участке, расположенном в 5'-направлении от промотора.

f) Компонент для терминации транскрипции

Экспрессируемые векторы, используемые в эукариотических клетках-хозяевах (в клетках дрожжей, грибов, насекомых, растений, животных, человека, или содержащих ядро клетках из других многоклеточных организмов) также содержат последовательности, необходимые для терминации транскрипции и для стабилизации мРНК. Такие последовательности обычно находятся на 5'- и, иногда, на 3'-нетранслируемых участках эукариотических или вирусных ДНК или кДНК. Эти участки содержат нуклеотидные фрагменты, транскрибируемые в качестве полиадинилированных фрагментов в нетранслируемом участке мРНК, кодирующей антитело. Одним пригодным компонентом для терминации транскрипции является участок полиадинилирования бычьего гормона роста. См. WO94/11026 и описанный в ней экспрессирующий вектор.

g) Выбор и трансформация клеток-хозяев.

Пригодные клетки-хозяева для клонирования или экспрессии ДНК в векторах, представленных в настоящем документе, представляют собой клетки прокариот, дрожжей или высших эукариот, описанных выше. Пригодные для этой цели прокариоты включают эубактерии, такие как грамотрицательные или грамположительные организмы, например, Enterobacteriaceae, такие как *Escherichia*, например, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, например, *Salmonellatyphimurium*, *Serratia*, например, *Serratia marcescans*, и *Shigella*, а также *Bacilli*, такие как *B. subtilis* и *B. licheniformis* (например, *B. licheniformis* 41P, описанные в DD 266710, опубликованной 12 апреля 1989 года), *Pseudomonas*, такие как *P. aeruginosa* и *Streptomyces*. Одним предпочтительным хозяином *E. coli* для клонирования является *E. coli* 294 (ATCC 31446), хотя также пригодными являются другие штаммы, такие как *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31537) и *E. coli* W3110 (ATCC 27325). Эти примеры являются иллюстративными, но не ограничивающими.

Полноразмерное антитело, слитые белки антитела и фрагменты антитела можно получать в бактериях, в частности, когда гликозилирование и Fc-эффекторная функция не требуются, например, когда терапевтическое антитело конъюгировано с цитотоксическим средством (например, токсином) и иммуноконъюгат самостоятельно демонстрирует эффективность в отношении разрушения клеток опухоли.

Полноразмерные антитела обладают более высоким временем полужизни в кровотоке. Продукция в *E. coli* является более быстрой и более экономичной. Для экспрессии фрагментов антитела и полипептидов в бактериях, см., например, U.S. 5648237 (Carter et. al.), U.S. 5789199 (Joly et al.), и U.S. 5840523 (Simmons et al.), в которых описаны участок инициации трансляции (TIR) и сигнальные последовательности для оптимизации

экспрессии и секреции. См. также Charlton, *Methods in Molecular Biology*. Vol.248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254, в которой описана экспрессия фрагментов антител в *E. coli*. После экспрессии антитело выделяют из клеточной массы *E. coli* в растворимой фракции и их можно очищать, например, с помощью колонки с белком А или G, в зависимости от изоформа. Конечную очистку можно проводить, аналогично процессу очистки антитела, экспрессируемого, например, в клетках CHO.

В дополнение к прокариотам, пригодными хозяевами для клонирования или экспрессии кодирующих связывающего IgG антитела векторов являются эукариотические микроорганизмы, такие как нитевидные грибы или дрожжи. *Saccharomyces cerevisiae*, или обычные пекарские дрожжи, наиболее распространены среди низших эукариотических микроорганизмов-хозяев. Однако широко доступным и пригодным здесь является ряд других родов, видов и штаммов, таких как *Schizosaccharomyces pombe*, хозяева *Kluyveromyces*, такие как, например, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12424), *K. bulgaricus* (ATCC 16045), *K. wickerhamii* (ATCC 24178), *K. waltii* (ATCC 56500), *K. drosophilae* (ATCC 36906), *K. thermotolerans*, и *K. marxianus*; *Yarrowia* (EP 402226); *Pichia pastoris* (EP 183070); *Candida*; *Trichoderma reesei* (EP 244234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces*, такие как *Schwanniomyces occidentalis*, и нитевидные грибы, такие как, например, хозяева *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* и *Aspergillus*, такие как *A. nidulans* и *A. niger*. Для обзора применения дрожжей и нитчатых грибов для продукции терапевтических белков см., например, Gerngross, Nat. Biotech. 22:1409-1414 (2004).

Можно выбирать определенные штаммы грибов и дрожжей, в которых каскады гликозилирования являются "гуманизированными", что приводит к продукции антитела с частично или полностью человеческим паттерном гликозилирования. См., например, Li et al., Nat. Biotech. 24:210-215 (2006) (где описана гуманизация каскада гликозилирования в *Pichia pastoris*); и Gerngross et al., выше.

Пригодные клетки-хозяева для экспрессии гликозилированного антитела также получают из многоклеточных организмов (безпозвоночных и позвоночных). Примеры клеток беспозвоночных включают клетки растений и насекомых. Выявлен ряд штаммов и вариантов бакуловирусов и соответствующих перmissive клеток-хозяев среди хозяев, таких как *Spodoptera frugiperda* (гусеница), *Aedes aegypti* (москит), *Aedes albopictus* (москит), *Drosophila melanogaster* (плодовая мушка) и *Bombyx mori*. Множество штаммов вирусов для трансфекции являются широко доступными, например, вариант L-1 *Autographa californica* NPV и штамм Bm-5 *Bombyx mori* NPV и такие вирусы можно использовать здесь в качестве вирусов в соответствии с настоящим изобретением, в частности, для трансфекции клеток *Spodoptera frugiperda*.

Также в качестве хозяев можно использовать растительные клеточные культуры хлопка, кукурузы, картофеля, сои, петунии, томата, ряски (*Lemnaceae*), люцерны (*M. truncatula*) и табака. См., например, патенты США No. 5959177, 6040498, 6420548, 7125978 и 6417429 (где описана технология PLANTIBODIESTM для продукции антител трансгенными растениями).

В качестве хозяев можно использовать клетки позвоночных, и размножение клеток позвоночных в культуре (культуре тканей) стало общепринятой методикой. Примерами пригодных хозяев, представляющих собой клеточные линии млекопитающих, являются линия клеток почки обезьяны CV1, трансформированных SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); эмбриональная линия почки человека (клетки 293 или 293, субклонированные для выращивания в суспензионной культуре, Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)); клетки почки молодого хомячка (BHK, ATCC CCL 10); клетки Сертоли мыши (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); клетки почки обезьяны (CV1 ATCC CCL 70);

клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76, ATCC CRL-1587); клетки цервикальной карциномы человека (HELA, ATCC CCL 2); клетки почки собаки (MDCK, ATCC CCL 34); клетки печени крысы буффало (BRL 3A, ATCC CR11442); клетки легкого человека (W138, ATCC CCL 75); клетки печени человека (Hep G2, HB 8065); клетки опухоли молочной железы мыши (MMT 060562, ATCC CCL51); клетки TRI (Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci* 383:44-68 (1982)); клетки MRC 5; клетки FS4; и линия гепатомы человека (Hep G2). Другие пригодные клеточные линии млекопитающих включают клетки яичника китайского хомячка (CHO), включающие клетки DHFR⁻ CHO (Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 11:4216 (1980)); и клеточные линии миеломы, такие как NSO и Sp2/0. Для обзора определенных клеточных линий млекопитающих, пригодных для продукции антител, см., например, Yazaki and Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 255-268.

Для продукции антитела клетки-хозяева трансформируют описанными выше экспрессирующими и клонирующими векторами и культивируют их в общепринятой среде, модифицированной соответствующим образом, для индукции промоторов, селекции трансформантов или амплификации генов, кодирующих требуемые последовательности.

h) Культивирование клеток-хозяев

Клетки-хозяева, используемые для продукции антитела по настоящему изобретению, можно культивировать в различных средах. Для культивирования клеток-хозяев пригодными являются коммерчески доступные среды, такие как среда Хэма F10 (Sigma), минимальная поддерживающая среда ((MEM), (Sigma)), RPMI-1640 (Sigma), и среда Игла, модифицированная способом Дульбекко, ((DMEM), Sigma). Кроме того, для клеток-хозяев в качестве культуральной среды можно использовать любую из сред, описанных в Ham et al., *Meth. Enz.* 58:44 (1979), Barnes et al., *Anal Biochem.* 102:255 (1980), патентах США No. 4767704; 4657866; 4927762; 4560655 или 5122469; WO9003430; WO 87/00195; или патенте США Re. 30985. Любые из этих сред можно дополнить при необходимости гормонами и/или другими факторами роста (такими как инсулин, трансферрин или эпидермальный фактор роста), солями (такими как хлорид натрия, кальция, магния и фосфат), буферами (такими как HEPES), нуклеотидами (такими как аденозин и тимидин), антибиотиками (такими как лекарственное средство GENTAMYCINTM), микроэлементами (определяемыми как неорганические соединения, обычно представленные в конечных концентрациях микромолярного диапазона) и глюкозой или эквивалентными источниками энергии. Также можно добавлять любые другие необходимые дополнительные вещества в соответствующих концентрациях, которые известны специалистам в данной области. Условия культивирования, такие как температура, pH и т.п., представляют собой условия, которые ранее использовали для выбранных для экспрессии клеток-хозяев, и они будут понятны специалисту в данной области.

i) Очистка антитела

При использовании рекомбинантных способов антитело может продуцироваться внутриклеточно, в периплазматическом пространстве или оно может непосредственно секретироваться в среду. При внутриклеточной продукции антитела в качестве первого этапа удаляют частицы дебриса, либо клетки-хозяева, либо лизированные фрагменты, например, посредством центрифугирования или ультрафильтрации. В Carter et al., *Bio/Technology* 10: 163-167 (1992) описан способ выделения антител, которые секретируются в периплазматическое пространство *E. coli*. В кратком изложении, клеточную массу размораживают в присутствии ацетата натрия (pH 3,5), EDTA и

фенилметилсульфонилфторида (PMSF) в течение приблизительно 30 мин. Клеточный дебрис можно удалять центрифугированием. Когда антитело секретируется в среду, супернатанты из таких экспрессирующих систем, как правило, сначала концентрируют с использованием коммерчески доступного фильтра для концентрирования белка, например, элемента для ультрафильтрации Amicon или Millipore Pellicon. На любой из предшествующих стадий можно включать ингибитор протеаз, такой как PMSF, для ингибирования протеолиза, и для предотвращения роста ненужных контаминирующих организмов можно добавлять антибиотики.

Композицию антитела, полученную из клеток, можно очищать с использованием, например, хроматографии с гидроксипатитом, хроматографии гидрофобного взаимодействия, гель-электрофореза, диализа и аффинной хроматографии, причем аффинная хроматография является предпочтительным способом очистки. Пригодность белка А в качестве аффинного лиганда зависит от вида и изотипа любого Fc-домена иммуноглобулина, который находится в антителе. Белок А можно использовать для очистки антител, в основе которых лежат тяжелые цепи $\gamma 1$, $\gamma 2$ или $\gamma 4$ человека (Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983)). Белок G рекомендован для всех изотипов мыши и для цепи $\gamma 3$ человека (Guss et al., EMBO J. 5:1567-1575 (1986)). Матрица, к которой присоединен аффинный лиганд, наиболее часто представляет собой агарозу, однако доступными являются и другие матрицы. Механически стабильные матрицы, такие как стекло с контролируемым размером пор или поли(стиролдивинил)бензол, обеспечивают более высокие скорости потока и более короткое время обработки, чем те, которых достигают с помощью агарозы. В случае, когда антитело содержит домен C_H3 , для очистки пригодна смола ABXTM (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ). Также в зависимости от антитела, подлежащего выделению, пригодны другие способы очистки белка, такие как фракционирование на ионообменной колонке, осаждение этанолом, обращенно-фазовая ВЭЖХ, хроматография на диоксиде кремния, хроматография на SEPHAROSETM с гепарином, хроматография на анионной или катионной обменной смоле (такая как колонка с полиаспарагиновой кислотой), хроматофокусирование, SDS-PAGE и осаждение сульфатом аммония.

После предварительной стадии(ий) очистки смесь, содержащую представляющее интерес антитело и примеси, можно подвергать хроматографии гидрофобного взаимодействия с низким значением pH с использованием буфера для элюирования при pH между приблизительно 2,5-4,5, предпочтительно проводимой при низких концентрациях соли (например, от приблизительно 0-0,25 М соли).

В общем, в данной области хорошо известны различные способы получения антител для применения в разработке, тестировании и клинике, которые согласуются с описанными выше способами и/или которые специалист в данной области сочтет пригодными для конкретного представляющего интерес антитела.

С. Иммуноконъюгаты

Это изобретение также относится к иммуноконъюгатам (также взаимозаменяемо называемым "конъюгатами антитело-лекарственное средство" или "ADC"), содержащим антитело, конъюгированное с цитотоксическим средством, таким как химиотерапевтическое средство, лекарственное средство, ингибирующее рост средство, токсин (например, белковый токсин, ферментативно активный токсин бактерий, грибов, растений или животных, или их фрагменты), или с радиоактивным изотопом (т.е., радиоконъюгатом).

Иммуноконъюгаты применяют для локальной доставки цитотоксических средств, т.е., лекарственных средств, которые уничтожают или ингибируют рост или

пролиферацию клеток, при лечении злокачественной опухоли (Lambert, J. (2005) *Curr. Opinion in Pharmacology* 5:543-549; Wu et al (2005) *Nature Biotechnology* 23(9): 1137-1146; Payne, G. (2003) *i* 3:207-212; Syrigos and Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19:605-614; Niculescu-Duvaz and Springer (1997) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 26: 151-172; патент США No. 4975278). Иммуноконъюгаты позволяют направленную доставку группы лекарственного средства к опухоли и ее внутриклеточное накопление, где системное введение неконъюгированных лекарственных средств может приводить к неприемлемым уровням токсичности в отношении нормальных клеток, наряду с опухолевыми клетками, подлежащими устранению (Baldwin et al., *Lancet* (Mar. 15, 1986) pp. 603-05; Thorpe (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications* (A. Pinchera et al., eds) pp. 475-506. В качестве пригодных в этих стратегиях описаны как поликлональные антитела, так и моноклональные антитела (Rowland et al., (1986) *Cancer Immunol. Immunother.* 21:183-87). Лекарственные средства, используемые в этих способах, включают дауномицин, доксорубин, метотрексат и виндезин (Rowland et al., (1986), выше). Токсины, используемые в конъюгатах антитело-токсин, включают бактериальные токсины, такие как дифтерийный токсин, растительные токсины, такие как рицин, низкомолекулярные токсины, такие как гелданамицин (Mandler et al (2000) *J. Nat. Cancer Inst.* 92(19):1573-1581; Mandler et al (2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10:1025-1028; Mandler et al (2002) *Bioconjugate Chem.* 13:786-791), майтанзиноиды (EP 1391213; Liu et al., (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623) и калихеамицин (Lode et al (1998) *Cancer Res.* 58:2928; Hinman et al (1993) *Cancer Res.* 53:3336-3342). Токсины могут оказывать их цитотоксическое действие через механизмы, включающие связывание тубулина, связывание ДНК или ингибирование топоизомеразы. Некоторые цитотоксические лекарственные средства имеют тенденцию к инактивации или снижению активности при конъюгации с крупными антителами или лигандами белкового рецептора.

ZEVALIN® (ибритумомаб тиуксетан, Biogen/Idec) представляет собой конъюгат антитело-радиоизотоп, состоящий из моноклонального антитела IgG1 каппа мыши, направленного против антигена CD20, находящегося на поверхности нормальных и злокачественных В-лимфоцитов, и радиоизотопа ^{111}In или ^{90}Y , связанного линкером-хелатором на основе тиомочевины (Wiseman et al (2000) *Eur. Jour. Nucl. Med.* 27(7):766-77; Wiseman et al (2002) *Blood* 99(12):4336-42; Witzig et al (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(10):2453-63; Witzig et al (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(15):3262-69). Хотя ZEVALIN обладает активностью против В-клеточной неходжкинской лимфомы (NHL), его введение приводит к тяжелым и длительным цитопениям у большинства пациентов. MYLOTARGTM (гемтузумаб озагомицин, Wyeth Pharmaceuticals), конъюгат антитело-лекарственное средство, состоящий из антитела huCD33, связанного с калихеамицином, был одобрен в 2000 для лечения острого миелоидного лейкоза путем инъекции (*Drugs of the Future* (2000) 25(7): 686; патенты США No. 4970198; 5079233; 5585089; 5606040; 5693762; 5739116; 5767285; 5773001). Кантузумаб мертансин (Immunogen, Inc.), конъюгат антитело-лекарственное средство, состоящий из антитела huC242, связанного через дисульфидный линкер SPP с группой майтанзиноидного лекарственного средства, DM1, проходит испытание фазы II для лечения злокачественных опухолей, которые экспрессируют CanAg, таких как злокачественные опухоли толстого кишечника, поджелудочной железы, желудка и другие злокачественные опухоли. MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologies, Immunogen Inc.), конъюгат антитело-лекарственное средство, состоящий из моноклонального антитела против простатспецифического мембранного антигена (PSMA), связанного с группой майтанзиноидного лекарственного средства, DM1, находится на стадии

разработки для возможного лечения злокачественных опухолей предстательной железы. Пептиды ауристати́на, ауристатин Е (АЕ) и монометилауристатин (ММАЕ), синтетические аналоги доластати́на, были конъюгированы с химерными моноклональными антителами сBR96 (специфичными к Lewis Y на карциноме) и сAC10 (специфичными к CD30 на гематологических злокачественных опухолях) (Doronina et al (2003) Nature Biotechnol. 21(7):778-784) и находятся на стадии терапевтической разработки.

В определенных вариантах осуществления иммуноконъюгат содержит антитело и химиотерапевтическое средство или другой токсин. Химиотерапевтические средства, пригодные для получения таких иммуноконъюгатов, описаны в настоящем документе (например, выше). Ферментативно активные токсины и их фрагменты, которые можно использовать, включают А-цепь дифтерийного токсина, несвязывающие активные фрагменты дифтерийного токсина, А-цепь экзотоксина (из *Pseudomonas aeruginosa*), А-цепь рицина, А-цепь абрина, А-цепь модецина, альфа-сарцин, белки *Aleurites fordii*, белки-диантаны, белки *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII и PAP-S), ингибитор *momordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор *sapaonaria officinalis*, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, эномицин и трихотецены. См. например, WO 93/21232, опубликованную 28 октября 1993 года. Для получения радиоконъюгированных антител доступны

различные радионуклиды. Их примеры включают ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y и ^{186}Re .

Конъюгаты антитела и цитотоксического средства можно получать с использованием множества бифункциональных связывающих белки веществ, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитиол)пропионат (SPDP), иминотиолан (IT), бифункциональные производные имидоэфиров (такие как диметиладипимидат HCL), активные сложные эфиры (такие как дисукцинимидилсуберат), альдегиды (такие как глутаральдегид), бис-азидосоединения (такие как бис(п-азидобензоил)гександиамин), производные бис-диазония (такие как бис-(п-диазонийбензоил)этилендиамин), диизоцианаты (такие как 2,6-диизоцианат толуола), и вторичные активные соединения фтора (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол). Например, иммунотоксин на основе рицина можно получать, как описано в Vitetta et al. Science 238: 1098 (1987). Меченная углеродом-14 1-изотиоцианатбензил-3-метилдиэтилентриаминпентауксусная кислота (MX-DTPA) представляет собой иллюстративный хелатирующий агент для конъюгации радионуклеотида с антителом. См. WO94/11026.

Также в настоящем документе представлены конъюгаты антитела и одного или нескольких низкомолекулярных токсинов, таких как калихеамицин, майтанзиноиды, доластати́ны, ауростати́ны, трихоте́цен и CC1065, и производные этих токсинов, которые обладают активностью токсинов.

1. Майтанзин и майтанзиноиды

В некоторых вариантах осуществления иммуноконъюгат содержит антитело (полноразмерное или фрагменты), конъюгированное с одной или несколькими молекулами майтанзиноида.

Майтанзиноиды представляют собой ингибиторы митоза, которые действуют, ингибируя полимеризацию тубулина. Майтанзин впервые был выделен из восточно-африканского кустарника *Maytenus serrata* (патент США No. 3896111). Впоследствии, было открыто, что определенные микроорганизмы также продуцируют майтанзиноиды, такие как майтанзинол и С-3 сложные эфиры майтанзинола (патент США No. 4151042). Синтетический майтанзинол и его производные и аналоги описаны, например, в патентах США No. 4137230; 4248870; 4256746; 4260608; 4265814; 4294757; 4307016; 4308268; 4308269; 4309428; 4313946; 4315929; 4317821; 4322348; 4331598; 4361650; 4364866; 4424219;

4450254; 4362663 и 4371533.

Майтанзиноидные группы лекарственного средства являются привлекательными группами лекарственного средства в конъюгатах антитело-лекарственное средство, поскольку они: (i) относительно доступны для получения ферментацией или химической модификацией или преобразованием в производное продуктов ферментации, (ii) поддаются преобразованию в производные с помощью функциональных групп, пригодных для конъюгации через дисульфидные и недисульфидные линкеры с антителами, (iii) являются стабильными в плазме, и (iv) являются эффективными против различных опухолевых клеточных линий.

Иммуноконъюгаты, содержащие майтанзиноиды, способы их получения, и их терапевтическое применение описаны, например, в патентах США No. 5208020, 5416064 и патенте Европы EP 0 425 235 B1, описания которых включены в настоящий документ в качестве ссылок в полном объеме. Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996) описали иммуноконъюгаты, содержащие майтанзиноид, обозначаемый как DM1, связанный с моноклональным антителом C242, направленным против рака ободочной и прямой кишки человека. Было выявлено, что конъюгат является высоко цитотоксичным в отношении культивируемых клеток рака толстого кишечника, и он продемонстрировал противоопухолевую активность в анализе роста опухоли *in vivo*. В Chari et al., Cancer Research 52: 127-131 (1992) описаны иммуноконъюгаты, в которых майтанзиноид конъюгирован через дисульфидный линкер с антителом мыши A7, связывающимся с антигеном на клеточных линиях рака толстого кишечника человека или с другим моноклональным антителом мыши TA.1, которое связывает онкоген HER-2/neu. Цитотоксичность конъюгата TA.1-майтаниноид тестировали *in vitro* на клеточной линии рака молочной железы человека SK-BR-3, которая экспрессирует 3×10^5 поверхностных антигенов HER-2 на клетку. Конъюгат лекарственного средства достигал степени цитотоксичности, сходной со свободным майтанзиноидным лекарственным средством, которую можно повышать путем увеличения количества молекул майтанзиноида на молекулу антитела. Конъюгат A7-майтаниноид продемонстрировал низкую системную цитотоксичность у мышей.

Конъюгаты антитело-майтаниноид получают химическим связыванием антитела с молекулой мейтанзиноида без существенного снижения биологической активности либо антитела, либо молекулы мейтанзиноида. См., например, патент США No. 5208020 (описание которого включено в настоящий документ в качестве ссылки в полном объеме). В среднем 3-4 молекулы мейтанзиноида, конъюгированных с одной молекулой антитела, продемонстрировали эффективность в отношении повышения цитотоксичности клеток-мишеней без отрицательного влияния на функцию или растворимость антитела, хотя можно ожидать, что даже одна молекула токсина/антитело повысит цитотоксичность относительно применения простого антитела. Майтанзиноиды хорошо известны в данной области и их можно синтезировать известными способами или выделять из природных источников. Пригодные майтанзиноиды описаны, например, в патенте США No. 5208020 и в других патентах и непатентных публикациях, указанных в настоящем документе выше. Предпочтительными майтанзиноидами являются майтанзинол и аналоги майтанзинола, модифицированные в ароматическом кольце или в других положениях молекулы майтанзинола, такие как различные сложные эфиры майтанзинола.

Для получения конъюгатов антитело-майтаниноид существует множество линкерных групп, известных в данной области, включая, например, линкерные группы, описанные в патенте США No. 5208020 или в патенте EP 0 425 235 B1; Chari et al. Cancer Research

52:127-131 (1992); и US 2005/016993 A1, описания которых включены в настоящий документ в качестве ссылок в полном объеме. Конъюгаты антитело-майтаниноид, содержащие линкерный компонент SMCC, можно получать, как описано в US 2005/016993 A1. Линкерные группы включают дисульфидные группы, простые тиоэфирные группы, неустойчивые к действию кислот группы, фотолабильные группы, неустойчивые к пептидазам группы, или неустойчивые к эстеразе группы, как описано в указанных выше патентах, причем дисульфидные и тиоэфирные группы являются предпочтительными. Дополнительные линкеры описаны и проиллюстрированы в настоящем документе.

Конъюгаты антитела и мйтаниноида можно получать с использованием множества бифункциональных средств для связывания белков, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP), сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), иминотиолан (IT), бифункциональные производные сложных имидоэфиров (такие как диметиладипимидат HCl), активные сложные эфиры (такие как дисукцинимидилсуберат), альдегиды (такие как глутаральдегид), бис-азидосоединения (такие как бис(п-азидобензоил)гександиамин), производные бис-диазония (такие как бис-(п-диазонийбензоил)этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол 2,6-диизоцианат), и бис-активные соединения фтора (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол). В определенных вариантах осуществления связывающий агент представляет собой N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP) (Carlsson et al., Biochem. J. 173:723-737 (1978)) или N-сукцинимидил-4-(2-пиридилтио)пентаноат (SPP), обеспечивающие дисульфидную связь.

Линкер можно связывать с молекулой мйтаниноида в различных положениях, в зависимости от типа связи. Например, сложноэфирную связь можно образовывать посредством реакции с гидроксильной группой с использованием общепринятых способов присоединения. Реакция может протекать в положении C-3, имеющем гидроксильную группу, положении C-14, модифицированном гидроксиметилем, положении C-15, модифицированном гидроксильной группой, и положении C-20, имеющем гидроксильную группу. В предпочтительном варианте осуществления связь образована в положении C-3 мйтанинола или аналога мйтанинола.

2. Ауристатинны и доластатинны

В некоторых вариантах осуществления иммуноконъюгат содержит антитело, конъюгированное с доластатином или с пептидным аналогом или производным доластатина, например, ауристатином (патенты США No. 5635483; 5780588). Было показано, что доластатинны и ауристатинны нарушают динамику микротрубочек, гидролиз GTP и деление ядер и клеток (Woyke et al. (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):3580-3584) и обладают активностью против злокачественной опухоли (US 5663149) и противогрибковой активностью (Pettit et al. (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965). Группу лекарственного средства в виде доластатина или ауристатина можно связывать с антителом через N(амино)-конец или C(карбоксильный)-конец пептидной группы лекарственного средства (WO 02/088172).

Иллюстративные варианты осуществления ауристатина включают связывающиеся через N-конец группы лекарственного средства в виде монометилауристатина DE и DF, описанные в "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", US с серийным номером No. 10/983340, поданная 5 ноября 2004 года, описание которых включено в настоящий документ в качестве ссылки в полном объеме.

Как правило, группы лекарственного средства на основе пептидов можно получать образованием пептидной связи между двумя или более аминокислотами и/или

пептидными фрагментами. Такие пептидные связи можно получать, например, способом жидкостного синтеза (см. E. Schroder and K. Lubke, "The Peptides", volume 1, pp 76-136, 1965, Academic Press), который хорошо известен в области химии пептидов. Группы лекарственного средства в виде ауристатина/доластатина можно получать согласно способам: US 5635483; US 5780588; Pettit et al. (1989) J. Am. Chem. Soc. 111:5463-5465; Pettit et al. (1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277; Pettit, G.R., et al. Synthesis, 1996, 719-725 и Pettit et al. (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5:859-863. Также см. Doronina (2003) Nat. Biotechnol. 21(7): 778-784; "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", US с серийным номером No. 10/983340, поданная 5 ноября 2004 года, включенная в настоящий документ в качестве ссылки в полном объеме (где описаны, например, линкеры и способы получения соединений монометилвалина, таких как MMAE и MMAF, конъюгированных с линкерами)

3. Калихеамицин

В других вариантах осуществления иммуноконъюгат содержит антитело, конъюгированное с одной или несколькими молекулами калихеамицина. Антибиотики семейства калихеамицина способны образовывать двухцепочечные разрывы ДНК при субпикомолярных концентрациях. Для получения конъюгатов семейства калихеамицина, см. патенты США No. 5712374, 5714586, 5739116, 5767285, 5770701, 5770710, 5773001, 5877296 (все выданы American Cyanamid Company). Структурные аналоги калихеамицина, которые можно использовать, включают, но не ограничиваются ими, γ 1I, α 2I, α 3I, N-ацетил- γ 1I, PSAG и θ 1I (Hinman et al. Cancer Research 53: 3336-3342 (1993), Lode et al. Cancer Research 58: 2925-2928 (1998) и упомянутые выше патенты США, выданные American Cyanamid). Другим противоопухолевым лекарственным средством, с которым можно конъюгировать антитело, является QFA, который представляет собой антифолат. Как калихеамицин, так и QFA, обладают внутриклеточным действием, и они не легко проходят через плазматическую мембрану. Таким образом, клеточный захват этих веществ посредством опосредуемой антителом интернализации значительно повышает их цитотоксические эффекты.

с. Другие цитотоксические средства

Другие противоопухолевые средства, которые можно конъюгировать с антителом, включают BCNU, стрептозоцин, винкристин и 5-фторурацил, семейство средств, совокупно известных как комплекс LL-E33288, описанный в патентах США No. 5053394, 5770710, а также эсперамицины (патент США No. 5877296).

Ферментативно активные токсины и их фрагменты, которые можно использовать, включают А-цепь дифтерийного токсина, несвязывающие активные фрагменты дифтерийного токсина, А-цепь экзотоксина (из *Pseudomonas aeruginosa*), А-цепь рицина, А-цепь абрина, А-цепь модела, альфа-сарцин, белки *Aleurites fordii*, белки-диантаны, белки *Phytolacca americana* (РАPI, РАPII и РАР-S), ингибитор *momordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор *saponaaria officinalis*, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, эномицин и трихотецены. См., например, WO 93/21232, опубликованную 28 октября, 1993.

Кроме того, настоящее изобретение относится к иммуноконъюгату, образованному между антителом и соединением с нуклеолитической активностью (например, рибонуклеазой или эндонуклеазой ДНК, такой как дезоксирибонуклеаза; ДНКаза).

Для селективного разрушения опухоли антитело может содержать высоко радиоактивный атом. Для продукции радиоактивных конъюгированных антител доступны различные радиоактивные изотопы. Их примеры включают At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} и радиоактивные изотопы Lu. В случае

применения конъюгата для детекции, он может содержать радиоактивный атом для скинтиграфических исследований, например ^{99m}Tc или ^{123}I , или спиновую метку для получения изображения ядерного магнитного резонанса (ЯМР) (также известного как магнитно-резонансная томография, МРТ), такую как также йод-123, йод-131, индий-111, фтор-19, углерод-13, азот-15, кислород-17, гадолиний, марганец или железо.

Радиоактивные или другие метки можно встраивать в конъюгат известными способами. Например, пептид может быть биологически синтезированным или его можно синтезировать посредством химического синтеза аминокислот с использованием пригодных предшественников аминокислот, включающих, например, фтор-19 вместо водорода. Метки, такие как ^{99m}Tc или ^{123}I , ^{186}Re , ^{188}Re и ^{111}In можно присоединять через остаток цистеина в пептиде. Иттрий-90 можно присоединять через остаток лизина. Способ с IODOGEN (Fraker et al. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57) можно использовать для встраивания йода-123. В "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) подробно описаны другие способы.

Конъюгаты антитела и цитотоксического средства можно получать с использованием различных бифункциональных средств для связывания белков, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP), сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), иминотиолан (IT), бифункциональные производные сложных имидозэфиров (такие как диметиладипимидат HCl), активные сложные эфиры (такие как дисукцинимидилсуберат), альдегиды (такие как глутаральдегид), бис-азидосоединения (такие как бис(п-азидобензоил)гександиамин), производные бисдиазония (такие как бис(п-диазонийбензоил)этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол-2,6-диизоцианат) и бис-активные соединения фтора (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол). Например, иммунотоксин рицин можно получать, как описано в Vitetta et al., Science 238: 1098 (1987). Иллюстративным хелатирующим агентом для конъюгации радионуклида с антителом является меченная углеродом-14 1-изотиоцианатбензил-3-метилдиэтилентриаминпентауксусная кислота (MX-DTPA). См. WO94/11026. Линкер может представлять собой "расщепляемый линкер", способствующий высвобождению цитотоксического лекарственного средства в клетке. Например, можно использовать неустойчивый к действию кислот линкер, чувствительный к пептидазам линкер, фотолabile линкер, диметиловый линкер или дисульфидсодержащий линкер (Chari et al, Cancer Research 52:127-131 (1992); патент США No. 5208020).

Соединения прямо предусматривают, но не ограничиваются ими, ADC, полученные с помощью поперечно-сшивающих реагентов: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, сульфо-EMCS, сульфо-GMBS, сульфо-KMUS, сульфо-MBS, сульфо-SIAB, сульфо-SMCC и сульфо-SMPB и SVSB (сукцинимидил-(4-винилсульфон)бензоат), которые являются коммерчески доступными (например, от Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A). См. стр. 467-498, 2003-2004 Applications Handbook and Catalog.

5. Получение конъюгатов антитело-лекарственное средство

В конъюгатах антитело-лекарственное средство (ADC) антитело (Ab) конъюгировано с одной или несколькими группами лекарственных средств (D), например от приблизительно 1 до приблизительно 20 групп на антитело, через линкер (L). ADC формулы I можно получать несколькими путями с использованием реакций, условий и реагентов органической химии, известных специалистам в данной области, включая: (1) реакцию нуклеофильной группы антитела с двухвалентным линкерным реагентом с образованием Ab-L через ковалентную связь, с последующей реакцией с группой

лекарственного средства D; и (2) реакцию нуклеофильной группы в группе лекарственного средства с двухвалентным линкерным реагентом, с образованием D-L, через ковалентную связь, с последующей реакцией с нуклеофильной группой антитела. Дополнительные способы получения ADC описаны в настоящем документе.

5

Ab-(L-D)_p

I

Линкер может состоять из одного или нескольких линкерных компонентов. Иллюстративные линкерные компоненты включают 6-малеимидокапроил ("MC"), малеимидопропаноил ("MP"), валин-цитруллин ("val-cit" или "vc"), аланин-фенилаланин ("ala-phe" или "af"), п-аминобензилоксикарбонил ("PAB"), N-сукцинимидил-4-(2-пиридилтио)пентаноат ("SPP"), N-сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат ("SMCC"), N-сукцинимидил-(4-йодоацетил)аминобензоат ("SIAB").

10

Дополнительные линкерные компоненты известны в данной области и некоторые из них описаны в настоящем документе. Также см. "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", US с серийным номером No. 10/983340, поданную 5 ноября 2004 года, описание которой включено в настоящий документ в качестве ссылки в полном объеме.

15

В некоторых вариантах осуществления линкер может содержать аминокислотные остатки. Иллюстративные аминокислотные линкерные компоненты включают дипептид, трипептид, тетрапептид или пентапептид. Иллюстративные дипептиды включают: валин-цитруллин (vc или val-cit), аланин-фенилаланин (af или ala-phe). Иллюстративные трипептиды включают: глицин-валин-цитруллин (gly-val-cit) и глицин-глицин-глицин (gly-gly-gly). Аминокислотные остатки, которые содержат компонент в виде аминокислотного линкера, включают природные аминокислотные остатки, а также минорные аминокислоты и неприродные аналоги аминокислот, такие как цитруллин. Аминокислотные линкерные компоненты можно конструировать и оптимизировать по их селективности к ферментативному расщеплению конкретными ферментами, например, ассоциированной с опухолью протеазой, катепсином В, С и D или протеазой плазмينا.

20

25

Нуклеофильные группы на антителах включают, но не ограничиваются ими: (i) N-концевые аминокислоты, (ii) аминокислоты боковых цепей, например, лизина, (iii) тиольные группы боковых цепей, например, цистеина, и (iv) гидроксилы или аминокислоты сахаров, где антитело является гликозилированным. Амино, тиольная и гидроксильная группы являются нуклеофильными и способны вступать в реакцию с образованием ковалентных связей с электрофильными группами на линкерных группах и линкерных реагентах, включая: (i) активные сложные эфиры, такие как сложные эфиры NHS, сложные эфиры HOBt, галогенформиаты и галогенангидриды; (ii) алкил- и бензилгалогениды, такие как галогенацетамиды; (iii) группы альдегидов, кетонов, карбоксильные и малеинимидные группы. Определенные антитела обладают поддающимися восстановлению дисульфидами между цепями, т.е. цистеиновыми мостиками. Реакционную способность антитела для конъюгации с линкерными реагентами можно обеспечивать посредством обработки восстановителем, таким как DTT (дифиотреитол). Каждый цистеиновый мостик, таким образом, может образовывать, теоретически, два реакционноспособных тиольных нуклеофила. Дополнительные нуклеофильные группы можно вносить в антитело посредством модификации остатков лизина, например, реакцией остатков лизина с 2-иминотиолоном (реагентом Трота), приводящей к превращению амина в тиол. Реакционно способные тиольные группы можно вносить в антитело путем встраивания одного, двух, трех, четырех или более

30

35

40

45

остатков цистеина (например, путем получения мутантных антител, содержащих один или несколько ненативных аминокислотных остатка цистеина).

Конъюгаты антитело-лекарственное средство также можно получать путем модификации антитела внесением электрофильных групп, которые могут реагировать с нуклеофильными заместителями на линкерном реагенте или лекарственном средстве. Сахара гликозилированных антител могут быть окисленными, например окислителями на основе периодатов, с образованием групп альдегидов или кетонов, которые могут реагировать с аминогруппой линкерных реагентов или групп лекарственного средства. Полученные иминогруппы шифового основания могут образовывать стабильную связь, или их можно восстанавливать, например, боргидридными реагентами, с образованием стабильных связей через амин. В одном варианте осуществления реакция углеводной части гликозилированного антитела либо с галактозооксидазой, либо с метапериодатом натрия, может приводить к карбонильным группам (группам альдегидов и кетонов) в антителе, которые могут вступать в реакции с соответствующими группами на лекарственном средстве (Hermanson, Bioconjugate Techniques). В другом варианте осуществления антитела, содержащие N-концевые остатки серина или треонина могут реагировать с метапериодатом натрия, что приводит к образованию альдегида вместо первой аминокислоты (Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138-146; US 5362852). Такой альдегид можно подвергать реакции с группой лекарственного средства или нуклеофилом линкера.

Аналогично, нуклеофильные группы на группе лекарственного средства включают, но не ограничиваются ими: аминогруппу, тиольную, гидроксильную группы, группы гидразида, оксима, гидразина, тиосемикарбазона, гидразина карбоксилата и арилгидразида, способные вступать в реакции с образованием связей с электрофильными группами на линкерных группах и линкерных реагентах, включающих: (i) активные сложные эфиры, такие как сложные эфиры NHS, сложные эфиры HOBT, галформиаты и галогенангидриды; (ii) алкил- и бензилгалогениды, такие как галогенацетамиды; (iii) альдегиды, кетоны, карбоксильные и малеинимидные группы.

Альтернативно слитый белок, содержащий антитело и цитотоксическое средство, можно получать, например, рекомбинантными способами или пептидным синтезом. Отрезок ДНК может содержать соответствующие области, кодирующие две части конъюгата, либо соседние друг с другом, либо разделенные областью, кодирующей линкерный пептид, который на ухудшает желаемые свойства конъюгата.

В другом варианте осуществления антитело может быть конъюгировано с "рецептором" (таким как стрептавидин) для применения в предварительном нацеливании на опухоль, где конъюгат антитело-рецептор вводят пациенту, а затем из кровотока удаляют не связавшийся конъюгат с использованием средства для удаления, с последующим введением "лиганда" (например, авидина), который конъюгирован с цитотоксическим средством (например радионуклидом).

D. Способы

1. Диагностические способы и способы детекции

В одном аспекте антитела по изобретению пригодны для детекции наличия Notch2 в биологическом образце. Термин "детекция" в настоящем документе включает количественную или качественную детекцию. В определенных вариантах осуществления биологический образец включает клетку или ткань, такую как ткань злокачественной опухоли.

В одном аспекте изобретение относится к способу детекции наличия Notch2 в биологическом образце. В определенных вариантах осуществления способ включает

контактирование биологического образца с антителом против Notch2 (например, с антителом против NRR Notch2) в условиях, позволяющих связывание антитела против Notch2 с Notch2, и детекцию образования комплекса между антителом против Notch2 и Notch2.

- 5 В одном аспекте изобретение относится к способу диагностики нарушения, ассоциированного с повышенной экспрессией Notch2. В определенных вариантах осуществления способ включает контактирование тестируемой клетки с антителом против Notch2; определение уровня экспрессии (либо количественно, либо качественно) Notch2 тестируемой клеткой путем детекции связывания антитела против Notch2 с
10 Notch2; и сравнение уровня экспрессии Notch2 тестируемой клеткой с уровнем экспрессии Notch2 контрольной клеткой (например, нормальной клеткой, происходящей из той же ткани, что и тестируемая клетка, или клеткой, которая экспрессирует Notch2 на уровнях, сравнимых с уровнями для нормальной клетки или со средним уровнем экспрессии для множества контрольных клеток), где более высокий уровень экспрессии Notch2
15 тестируемой клеткой по сравнению с контрольной клеткой указывает на наличие нарушения, ассоциированного с повышенной экспрессией Notch2. В определенных вариантах осуществления тестируемую клетку получают от индивида, предположительно имеющего нарушение, ассоциированное с повышенной экспрессией Notch2. В определенных вариантах осуществления нарушение представляет собой клеточно-
20 пролиферативное нарушение, такое как злокачественная опухоль или опухоль.

Иллюстративные нарушения, которые можно диагностировать с использованием антитела по изобретению, включают злокачественную опухоль, например, В-клеточные злокачественные опухоли, меланому, Т-клеточные злокачественные опухоли (например, Т-ALL), рак молочной железы, рак мозга, рак шейки матки, рак толстого кишечника
25 и рак поджелудочной железы.

Для детекции связывания антител против Notch2 с Notch2 можно использовать некоторые другие способы. Такие способы включают, но не ограничиваются ими, анализы связывания антигена, которые хорошо известны в данной области, такие как вестерн-блоты, радиоиммунные анализы, ELISA (твердофазный иммуноферментный
30 анализ), иммунные "сэндвич"-анализы, анализы иммунопреципитации, флуоресцентные иммунологические анализы, иммунологические анализы с белком А и иммуногистохимию (ИНС).

В определенных вариантах осуществления антитела являются мечеными. Метки включают, но не ограничиваются ими, метки или группы, которые подвергают детекции
35 прямо (такие как флуоресцентные, хромофорные, электронноплотные, хемилюминесцентные и радиоактивные метки), а также такие группы, как ферменты или лиганды, которые подвергают детекции непрямо, например, посредством ферментативной реакции или молекулярного взаимодействия. Иллюстративные метки
40 включают, но не ограничиваются ими, радиоизотопы ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H и ^{131}I , флуорофоры, такие как хелаты редкоземельных металлов или флуоресцеин и его производные, родамин и его производные, дансил, умбеллиферон, люциферазы, например, люциферазу светляка и бактериальную люциферазу (патент США No. 4737456), люциферин, 2,3-дигидрофалазиндионы, пероксидазу хрена (HRP), щелочную фосфатазу, β -галактозидазу, глюкоамилазу, лизоцим, оксидазы сахаридов, например,
45 глюкозооксидазу, галактозооксидазу и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу, гетероциклические оксидазы, такие как уриказа и ксантиноксидаза, связанные с ферментом, который использует пероксид водорода для окисления предшественника красителя, такого как HRP, лактопероксидаза или микропероксидаза, биотин/авидин,

спиновые метки, бактериофаговые метки, стабильные свободные радикалы и т.п.

В определенных вариантах осуществления антитела против Notch2 иммобилизуют на нерастворимой матрице. Иммобилизация включает отделение антитела против Notch2 от любого Notch2, который остается свободным в растворе. Ее осуществляют, либо обеспечивая нерастворимость антитела против Notch2 перед анализом, например, путем адсорбции на нерастворимой в воде матрице или поверхности (Bennich et al., U.S. 3720760) или путем ковалентного присоединения (например, с использованием поперечного сшивания глутаральдегидом), либо обеспечивая нерастворимость антитела против Notch2 после образования комплекса между антителом против Notch2 и Notch2, например, путем иммунопреципитации.

Понятно, что любой из указанных выше вариантов осуществления диагностики или детекции можно проводить с использованием иммуноконъюгата по изобретению вместо антитела против Notch2 или дополнительно к нему.

2. Способы лечения

Антитело по изобретению можно использовать, например, в способах лечения *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo*. В одном аспекте изобретение относится к способам ингибирования активности Notch2, т.е. передачи сигнала Notch2, либо *in vivo*, либо *in vitro*, включающий воздействие на клетку антитела против NRR Notch2 по изобретению в условиях, позволяющих связывание иммуноконъюгата с Notch2. В определенных вариантах осуществления клетка представляет собой злокачественную клетку, например, злокачественную В-клетку или клетку меланомы. В одном варианте осуществления антитело против NRR Notch2 по изобретению можно использовать для ингибирования активности Notch2, включающий воздействие на Notch2 антитела против NRR Notch2 по изобретению, так чтобы активность Notch2 ингибировалась.

Антитело против NRR Notch2 по изобретению можно использовать, например, для лечения нарушений, ассоциированных с экспрессией и/или активностью Notch2, например, нарушений, ассоциированных с повышенной экспрессией или активностью Notch2, или нарушений, при которых экспрессия или активность Notch2 приводят к патогенному состоянию. "Нарушение, ассоциированное с повышенной экспрессией или активностью Notch2" относится к нарушению, при котором экспрессия или активность Notch2 значительно превышает норму.

В одном аспекте антитело по изобретению применяют для лечения или профилактики злокачественной опухоли, например, В-клеточных злокачественных опухолей, меланомы, Т-клеточных злокачественных опухолей (например, Т-ALL), рака молочной железы, злокачественной опухоли головного мозга, рака шейки матки, рака толстого кишечника, и рака поджелудочной железы. В определенных вариантах осуществления антитело против NRR Notch2 применяют для лечения злокачественной опухоли, такой как рак молочной железы, В-клеточная злокачественная опухоль или меланома.

В следующем аспекте антитело по изобретению применяют для лечения или профилактики злокачественной опухоли, конкретно, солидной опухоли, содержащей злокачественные стволовые клетки. Злокачественные стволовые клетки способны пролиферировать, давая начало дополнительным злокачественным стволовым клеткам, а также другим популяциям опухолевых клеток. См. Al-Hajj et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 100: 3983-3988 (2003). Полагают, что злокачественные стволовые клетки приводят к рецидивам злокачественных опухолей и устойчивости злокачественных опухолей к лекарственным средствам. Рецепторы Notch идентифицированы в качестве маркеров злокачественных стволовых клеток и в качестве мишени для устранения злокачественных стволовых клеток, ответственных за образование и рецидив солидных

опухолей. См. WO 2008/091641. Такие солидные опухоли включают, но не ограничиваются ими, рак молочной железы, рак толстого кишечника, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, рак легкого, рак головы и шеи, рак прямой кишки и рак ободочной и прямой кишки.

5 В одном аспекте изобретение относится к способам лечения злокачественной опухоли, включающим введение индивидууму, нуждающемуся в этом, эффективного количества антитела по изобретению. В определенных вариантах осуществления способ лечения злокачественной опухоли включает введение индивидууму, нуждающемуся в этом, эффективного количества фармацевтического состава, содержащего антитело по
10 изобретению и, необязательно, по меньшей мере одно дополнительное лекарственное средство, такое как средства, представленные ниже.

Антитела по изобретению можно использовать либо отдельно, либо в комбинации с другими композициями, в лечении. Например, антитело по изобретению можно вводить совместно по меньшей мере с одним дополнительным лекарственным средством и/или
15 адъювантом. В определенных вариантах осуществления антитело против Notch1 (например, антитело против NRR Notch1) вводят с дополнительным лекарственным средством, которое ингибирует или снижает измененную дифференцировку клеток кишечника, которая в ином случае индуцировалась бы таким антителом против Notch1. В определенных вариантах осуществления дополнительным лекарственным средством
20 является дексаметазон или тамоксифен. Такая комбинированная терапия может быть полезна, например, при лечении ангиогенных нарушений, включающих ассоциированный с опухолью ангиогенез, и злокачественной опухоли. В определенных вариантах осуществления антитело против Notch2 (например, антитело против NRR Notch2) вводят с дополнительным лекарственным средством, например, химиотерапевтическим
25 средством. Такая комбинированная терапия может быть пригодна, например, для лечения злокачественной опухоли, такой как В-клеточные злокачественные опухоли и меланома.

Такие комбинированные способы лечения, описанные выше, включают комбинированное введение (где два или более лекарственных средств включены в один
30 и тот же или в отдельные составы), и раздельное введение, в случае которого введение антитела по изобретению может происходить до, одновременно и/или после введения дополнительного лекарственного средства и/или адъюванта. Антитела по изобретению также можно использовать в комбинации с лучевой терапией.

В одном аспекте по меньшей мере некоторые из антител по изобретению могут
35 связывать Notch2 отличных от человека видов. Таким образом, антитела по изобретению можно использовать для связывания Notch2, например, в культуре клеток млекопитающего, экспрессирующих эндогенный или рекомбинантный Notch2, у человека, или у других млекопитающих, имеющих Notch2, с которым антитело по изобретению перекрестно реагирует (например шимпанзе, бабуин, мартышка, яванский
40 макак и макак-резус, свинья, крыса или мышь).

В одном варианте осуществления антитело по изобретению применяют в способе связывания Notch2 у индивидуума, страдающего нарушением, ассоциированным с повышенной экспрессией и/или активностью Notch2, включающий введение индивидууму антитела, так чтобы Notch2 у индивидуума был связан. В одном варианте осуществления
45 Notch2 представляет собой Notch2 человека, и индивидуумом является человек. Альтернативно индивидуум может представлять собой любое млекопитающее, у которого экспрессируется Notch2, с которым связывается антитело по изобретению. Кроме того, индивидуумом может быть млекопитающее, которому вводят Notch2

(например, путем введения Notch2 или экспрессии трансгена, кодирующего Notch2).

Антитело по изобретению можно вводить человеку для терапевтических целей. Более того, антитело по изобретению можно вводить не являющемуся человеком млекопитающему, экспрессирующему Notch2, с которым антитело перекрестно реагирует (например, примату, свинье, крысе или мыши) для ветеринарных целей или в качестве модели на животных для заболевания человека. Что касается последнего, такие модели на животных могут быть пригодны для оценки терапевтической эффективности антител по изобретению (например, тестирования дозировок и длительности введения).

Антитело по изобретению (и любое дополнительное лекарственное средство или адъювант) можно вводить любым пригодным способом, включая парентеральный, подкожный, внутрибрюшинный, внутрилегочный и интраназальный, и, если желательно для местного лечения, введение в область повреждения. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное или подкожное введение. Кроме того, антитело можно вводить импульсной инфузией, в частности, со снижающимися дозами антитела. Дозирование можно проводить любым пригодным способом, например путем инъекций, таких как внутривенные или подкожные инъекции, в зависимости отчасти от того, является ли введение кратковременным или длительным.

При получении и введении антитела можно учитывать расположение мишени для связывания антитела по изобретению. Когда мишень для связывания представляет собой внутриклеточную молекулу, некоторые варианты осуществления изобретения относятся к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, подлежащему введению в клетку, где расположена мишень для связывания. В одном варианте осуществления антитело по изобретению можно экспрессировать внутриклеточно в качестве внутреннего антитела. Термин "внутреннее антитело" в настоящем документе относится к антителу или его антигенсвязывающей части, которые экспрессируются внутриклеточно и которые способны селективно связываться с молекулой мишенью, как описано, например, в Marasco, Gene Therapy 4: 11-15 (1997); Kontermann, Methods 34: 163-170 (2004); патентах США No. 6004940 и 6329173; публикации патентной заявки США No. 2003/0104402 и публикации PCT No. WO2003/077945. Также см, например, WO96/07321, опубликованную 14 марта 1996 года, в отношении применения генной терапии для получения внутриклеточных антител.

Внутриклеточной экспрессии внутреннего антитела можно достигать путем введения нуклеиновой кислоты, кодирующей желаемое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (лишенные лидерной последовательности дикого типа и секреторных сигналов, в норме ассоциированных с геном, кодирующим эти антитело или антигенсвязывающий фрагмент) в клетку-мишень. В клетку мишень можно доставлять одну или несколько нуклеиновых кислот, кодирующих все антитело по изобретению или его часть, так чтобы экспрессировались одно или несколько внутренних антител, которые способны связываться с внутриклеточным полипептидом-мишенью и модулировать активность полипептида-мишени. Можно использовать любой стандартный способ введения нуклеиновых кислот в клетку, включая, но не ограничиваясь ими, микроинъекцию, баллистическую инъекцию, электропорацию, осаждение с фосфатом кальция, липосомы и трансфекцию векторами на основе ретровируса, аденовируса, аденоассоциированного вируса и вируса осповакцины, содержащего представляющую интерес нуклеиновую кислоту.

В определенных вариантах осуществления нуклеиновую кислоту (необязательно содержащуюся в векторе) можно вводить в клетки пациента способами *in vivo* и *ex vivo*.

В одном примере доставки *in vivo* нуклеиновую кислоту инъецируют прямо пациенту, например, в область, где требуется терапевтическое вмешательство. В следующем примере доставки *in vivo* нуклеиновую кислоту вводят в клетку с использованием трансфекции вирусных векторов (таких как аденовируса, вируса простого герпеса I или аденоассоциированного вируса) и систем на основе липидов (пригодными липидами для опосредуемого липидами переноса гена являются, например, DOTMA, DOPE и DC-Choi). Для обзора определенных протоколов генного маркирования и генной терапии см. Anderson et al, Science 256:808-813 (1992) и WO 93/25673 и ссылки, цитированные в них. В примере лечения *ex vivo*, клетки пациента извлекают, в эти выделенные клетки вводят нуклеиновую кислоту, и модифицированные клетки вводят пациенту либо прямо, либо, например, в инкапсулированном виде в пористых мембранах, которые имплантируют пациенту (см., например, патенты США No. 4892538 и 5283187). Обычно для доставки *ex vivo* нуклеиновой кислоты используют ретровирусный вектор.

В другом варианте осуществления представлены интернализирующиеся антитела.

Антитела могут обладать определенными характеристиками, которые усиливают доставку антител в клетку, или они могут быть модифицированы, чтобы они обладали такими характеристиками. Способы для достижения этого известны в данной области. Например, известно, что катионизация антитела способствует его захвату в клетки (см., например, патент США No. 6703019). Также для доставки антитела в клетки можно использовать липофекцию или липосомы. Когда используют фрагменты антител, преимущественным может быть наименьший ингибиторный фрагмент, который специфично связывается с белком-мишенью. Например, на основе последовательностей переменных областей антитела можно разработать пептидные молекулы, которые сохраняют способность связываться с белковой последовательностью-мишенью. Такие пептиды можно синтезировать химически и/или получать способами рекомбинантных ДНК. См., например, Marasco et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893 (1993).

Проникновение антител в клетки-мишени можно усиливать другими способами, известными в данной области. Например, определенные последовательности, такие как последовательности, происходящие из Tat ВИЧ или гомеодоменного белка Antennapedia, способны обеспечивать эффективный захват гетерологичных белков через клеточные мембраны. См., например, Chen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1999), 96: 4325-4329.

Когда мишень для связывания антитела расположена в головном мозге, определенные варианты осуществления изобретения относятся к антителу, проходящему через гематоэнцефалический барьер. Для транспорта молекул через гематоэнцефалический барьер существует несколько известных в данной области подходов, включая, но не ограничиваясь ими, физические способы, способы на основе липидов, способы на основе стволовых клеток и способы на основе рецепторов и каналов.

Физические способы транспорта антитела через гематоэнцефалический барьер включают, но не ограничиваются ими, полный обход гематоэнцефалического барьера или создание отверстий в гематоэнцефалическом барьере. Способы обхода включают, но не ограничиваются ими, прямую инъекцию в головной мозг (см., например, Papanastassiou et al., Gene Therapy 9:398-406 (2002)), интерстициальную инфузию/усиленную конвекцией доставку (см., например, Bobo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:2076-2080 (1994)), и имплантацию устройства для доставки в головной мозг (см., например, Gill et al., Nature Med. 9:589-595 (2003); и Gliadel WafersTM Guildford Pharmaceutical). Способы создания отверстий в барьере включают, но не ограничиваются ими, ультразвук (см., например, публикация патента США No. 2002/0038086), осмотическое давление

(например, путем введения гипертонического маннита (Neuwelt, E. A., Implication of the Blood-Brain Barrier and its Manipulation, Vols 1 & 2, Plenum Press, N. Y. (1989)), повышение проницаемости, например, посредством брадикинина или усиливающего проницаемость средства А-7 (см., например, патенты США No. 5112596, 5268164, 5506206 и 5686416),
 5 и трансфекцию нейронов, которые проходят через гематоэнцефалический барьер, векторами, содержащими гены, кодирующие антитело (см., например, публикацию патента США No. 2003/0083299).

Способы транспорта антитела через гематоэнцефалический барьер на основе липидов включают, но не ограничиваются ими, инкапсулирование антитела в липосомы, которые
 10 связаны со связывающими фрагментами антител, которые связываются с рецепторами на эндотелии сосудов гематоэнцефалического барьера (см., например, публикацию патентной заявки США No. 20020025313), и нанесение антитела на частицы липопротеинов низкой плотности (см., например, публикацию патентной заявки США No. 20040204354) или аполипопротеин Е (см., например, публикацию патентной заявки
 15 США No. 20040131692).

Способы транспорта антитела через гематоэнцефалический барьер на основе стволовых клеток охватывают генную инженерию нейрональных клеток-предшественников (NPC) для экспрессии представляющего интерес антитела, а затем имплантацию стволовых клеток в головной мозг индивидуума, подвергаемого лечению.
 20 См. Behrstock et al. (2005) Gene Ther. последняя он-лайн публикация 15 декабря 2005 года (где описано, что NPC, генетически модифицированные для экспрессии нейротрофического фактора GDNF, снижали симптомы болезни Паркинсона при имплантации в головной мозг в моделях на грызунах и приматах).

Способы транспорта антитела через гематоэнцефалический барьер на основе
 25 рецепторов и каналов включают, но не ограничиваются ими, применение глюкокортикоидных блокаторов для повышения проницаемости гематоэнцефалического барьера (см., например, публикации патентных заявок США No. 2002/0065259, 2003/0162695 и 2005/0124533); активацию калиевых каналов (см., например, публикацию патентной заявки США No. 2005/0089473), ингибирование ABC-переносчиков
 30 лекарственных средств (см., например, публикацию патентной заявки США No. 2003/0073713); нанесение на антитела трансферрина и модулирование активности одного или нескольких рецепторов трансферрина (см., например, публикацию патентной заявки США No. 2003/0129186) и катионизацию антител (см., например, патент США No. 5004697).

Антитела по изобретению можно изготавливать, дозировать и вводить способами, согласующимися с "Надлежащей медицинской практикой". Факторы, учитываемые в этом контексте, включают конкретное нарушение, подвергаемое лечению, конкретное
 35 млекопитающее, подвергаемое лечению, клиническое состояние отдельного пациента, причину нарушения, область доставки средства, способ введения, график введения и другие факторы, известные врачам. Антитело или иммуноконъюгат не должны быть
 40 изготовлены, однако их необязательно изготавливают, с одним или несколькими средствами, используемыми в настоящее время для профилактики и лечения рассматриваемого нарушения. Эффективное количество таких других средств зависит от количества антител по изобретению, присутствующего в составе, типа нарушения
 45 или лечения, и других факторов, рассмотренных выше. Их обычно используют в тех же дозировках и с теми же способами введения, которые описаны в настоящем документе выше или в количестве приблизительно от 1 до 99% от дозировок, описанных в настоящем документе, или в любой дозировке и с любым способом, которые

эмпирически/клинически определены, как пригодные.

Для профилактики или лечения заболевания, дозировка и способ введения антитела (при использовании отдельно в сочетании с одним или несколькими дополнительными лекарственными средствами) могут зависеть от типа заболевания, подлежащего лечению, как определено выше, тяжести и течения заболевания, от профилактических или терапевтических целей введения молекулы, предшествующего лечения, клинического анамнеза пациента и ответа на антитело и от решения лечащего врача. Антитело подходящим образом вводят пациенту за один раз или на протяжении серии введений. В зависимости от типа и тяжести заболевания, исходная предполагаемая дозировка для введения пациенту составляет от приблизительно 1 мкг/кг до 15 мг/кг (например, приблизительно 0,1 мг/кг - 10 мг/кг) антитела, например, либо посредством одного или нескольких отдельных введений, либо посредством непрерывной инфузии. Одна из типичных суточных доз может находиться в диапазоне приблизительно от 1 мкг/кг до 100 мг/кг или более, в зависимости от факторов, упомянутых выше. В случае многократных введений в течение нескольких суток или более, в зависимости от состояния, введение повторяют до возникновения требуемого подавления симптомов заболевания. Одна иллюстративная дозировка антитела или иммуноконъюгата может находиться в диапазоне от приблизительно 0,05 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг. Таким образом, пациенту можно вводить одну или несколько доз, составляющих приблизительно 0,5 мг/кг, 2,0 мг/кг, 4,0 мг/кг или 10 мг/кг (или любое их сочетание) антител. Такие дозы можно вводить периодически, например каждую неделю или каждые три недели (например, так чтобы пациент получал от приблизительно двух до приблизительно двадцати, или, например, приблизительно шесть доз антитела). Можно вводить первоначальную более высокую нагрузочную дозу, а затем одну или несколько более низких доз. Иллюстративная схема дозирования может включать введение исходной нагрузочной дозы, составляющей приблизительно 4 мг/кг, с последующей поддерживающей дозой антитела приблизительно 2 мг/кг каждую неделю. Однако могут быть пригодными другие схемы дозирования. Мониторинг хода этой терапии легко проводить посредством общепринятых способов и анализов.

Понятно, что любой из описанных выше способов лечения можно проводить с использованием иммуноконъюгата по изобретению вместо добавления антитела против Notch2.

3. Способы анализа

Антитела против Notch2 по изобретению могут быть охарактеризованы по их физическим/химическим свойствам и/или видам биологической активности различными анализами, известными в данной области.

а) Анализы активности

В одном аспекте представлены анализы для идентификации антител против Notch2 (например, антител против NRR Notch2), имеющих биологическую активность. Биологическая активность может включать, например, ингибирование или снижение активности Notch2, например, передачи сигнала Notch2. Также представлены антитела, имеющие такую биологическую активность *in vivo* и/или *in vitro*.

В определенных вариантах осуществления антитело против NRR Notch2 по изобретению тестируют в отношении его способности ингибировать образование В-клеток маргинальной зоны. Иллюстративный способ анализа предоставлен в разделе "Примеры". В некоторых других вариантах осуществления антитело по изобретению тестируют в отношении его способности ингибировать экспрессию репортерного гена, который отвечает за передачу сигнала Notch2. Иллюстративный способ анализа

представлен в разделе "Примеры".

б) Анализы связывания и другие способы анализа

В одном аспекте антитело по изобретению тестируют в отношении его антигенсвязывающей активности, например, известными способами, такими как ELISA, вестерн-блоттинг и т.д. В другом аспекте можно использовать конкурентные анализы для идентификации антитела (например, моноклонального антитела), которое конкурирует с антителом по изобретению. В одном варианте осуществления антитело конкурирует с антителом D, антителом D-1, антителом D-2 или антителом D-3 за связывание с Notch2. В одном из таких вариантов осуществления конкурирующее антитело связывается с тем же эпитопом (например, линейным или конформационным эпитопом), с которым связывается антитело D, антитело D-1, антитело D-2 или антитело D-3. В другом варианте осуществления конкурирующее антитело связывается с тем же эпитопом (например, линейным или конформационным эпитопом), с которым связывается антитело против NRR1, как описано в примере В(5), т.е., с эпитопом, содержащим домены LNR-A, LNR-B и HD-C из NRR Notch1. Иллюстративные конкурентные анализы включают, но не ограничиваются ими, общепринятые анализы, такие как представлены в Harlow and Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY). Подробное описание иллюстративных способов картирования эпитопа, с которым связывается антитело, представлены в Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols", in *Methods in Molecular Biology* vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ). Два антитела называют "связывающимися с одним эпитопом", если каждое из них блокирует связывание другого на 50% или более.

В иллюстративном конкурентном анализе иммобилизованный NRR Notch2 инкубируют в растворе, содержащем первое меченое антитело, которое связывается с NRR Notch2 (например, антитело D, антитело D-1, антитело D-2 или антитело D-3), и второе немеченое антитело, которое тестируют в отношении его способности конкурировать с первым антителом за связывание с NRR Notch2. Второе антитело может присутствовать в супернатанте гибридом. В качестве контроля иммобилизованный NRR Notch2 инкубируют в растворе, содержащем первое меченое антитело, но не второе немеченое антитело. После инкубации в условиях, позволяющих связывание первого антитела с NRR Notch2, избыток несвязанного антитела удаляют и измеряют количество метки, связанной с иммобилизованным NRR Notch2. Если количество метки, ассоциированной с иммобилизованным NRR Notch2, является по существу сниженным в тестируемом образце относительно контрольного образца, тогда это указывает на то, что второе антитело конкурирует с первым антителом за связывание с NRR Notch2.

В одном аспекте антитела по изобретению можно далее охарактеризовать с помощью серии анализов, включающих, но не ограничивающихся ими, N-концевое секвенирование, анализ аминокислот, неденатурирующую эксклюзионную высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ), масс-спектрометрию, ионообменную хроматографию и расщепление папаином.

Понятно, что любой из описанных выше способов можно проводить с использованием иммуноконъюгата по изобретению вместо антитела против NRR Notch2 или в дополнение к нему.

Е. Изделия

В другом аспекте изобретения представлено изделие, содержащее материалы, пригодные для лечения, профилактики и/или диагностики нарушений, описанных выше. Изделие содержит контейнер и ярлык на контейнере или вкладыш в упаковку,

прилагаемый к контейнеру. Пригодные контейнеры включают, например, бутылки, флаконы, шприцы и т.д. Контейнеры могут быть изготовлены из различных материалов, таких как стекло или пластмасса. В контейнере находится композиция, которая самостоятельно или в комбинации с другой композицией эффективна для лечения, профилактики и/или диагностики состояния и может иметь отверстие для стерильного доступа (например, контейнер может представлять собой мешок с внутривенным раствором или флакон, имеющий пробку, проницаемую для иглы для подкожной инъекции). По меньшей мере одно активное средство в композиции представляет собой антитело или иммуноконъюгат по изобретению. На ярлыке или вкладыше в упаковку указано, что композицию используют для лечения выбранного состояния. Более того, изделие может содержать (а) первый контейнер с содержащейся в нем композицией, где композиция содержит антитело или иммуноконъюгат по изобретению; и (б) второй контейнер с композицией, содержащейся в нем, где композиция содержит дополнительное цитотоксическое или иное лекарственное средство. В этом варианте осуществления изобретения изделие может дополнительно содержать вкладыш в упаковку, на котором указано, что композиции можно использовать для лечения конкретного состояния. Альтернативно или дополнительно, изделие может дополнительно содержать второй (или третий) контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый буфер, такой как бактериостатическая вода для инъекции (BWI), фосфатно-солевой буфер, раствор Рингера и раствор декстрозы. Кроме того, он может включать другие материалы, желательные с коммерческой точки зрения и с точки зрения потребителя, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы и шприцы.

IV. ПРИМЕРЫ

Ниже предоставлены примеры способов и композиций по изобретению. Понятно, что можно осуществлять на практике различные другие варианты осуществления с учетом общего описания, представленного выше.

A. Материалы и способы

1. Получение антител против NRR Notch2

Сортировка библиотеки и скрининг для идентификации антител против NRR Notch2

Для пэннинга использовали фаговые библиотеки антител человека с разнообразными синтетическими выбранными определяющими комплементарность областями (H1, H2, H3, L3), имитирующими природное разнообразие набора IgG человека. Fab-фрагменты бивалентно экспонировали на поверхности частиц бактериофага M13. (См. Lee et al., J. Mol. Biol. 340:1073-1093 (2004).) Фрагменты NRR Notch2 экспрессировали в качестве секретируемых белков, слитых с эпитопными метками (FLAG или 6xHis) с использованием бакуловирусной экспрессирующей векторной системы или клеток 293T, очищенных до чистоты >90% с использованием аффинной хроматографии и тестированных в отношении отсутствия агрегации с использованием рассеяния света. Последовательности антигенов NRR Notch2 были следующими:

FLAG-NRR-Notch2-человека-6xHis:

KDDDDKSGSDVCPQMPCLNNGGTCAVASNMPDGFICRCPGFSGARCQSSCGQVK C
RKGEQCVHTASGPRCFSPRDCESGCASSPCQHGGSGCHPQRQPPYYSCQCAPPF SGSR
CELYTAPPSTPPATCLSQYCADKARDGVCDEACNSHACQWDGGDCSLTME NPWANCS
SPLPCWDYINNQCDEL CNTVECLFDNFECQGN SKTCKY

DKYCADHFKDNHCNQGCSNSEECSGWDGLDCAADQPENLAEGTLVIVVLMPPPEQLL Q
DARSFLRALGTLLHTNLRIKRDSQGELMVYPYYGEKSAAMKKQRM TRRSLPGEQE
VAGSKVFLEIDNRQCVQSDHCFKNTD AAAALLASHAIQGTLSY PLVSVVSES LTPER
TEFGLVPRGSGHHHHHHH (SEQ ID NO:73)

NRR-Notch2-мышь-FLAG:

ADVCPQKPCLNGGTCAVASNMPDGFICRCPPGFSGARCSQSSCGQVKCRRGEQCIH T
 DSGPRCFCLNPKDCESGCASNPCQHGGTCYPQRQPPHYSCRCPPSFGGSHCELYT APTS
 TPPATCQSQYCADKARDGICDEACNSHACQWDGGDCSLTMEDPWANCTST LRCWEYI
 5 NNQCDEQCNTAECLFDNFECQRNSKTCKYDKYCADHFKDNHCDQGCN SEECGWDGL
 DCASDQPENLAEGTLIIVVLLPPEQLLQDSRSFLRALGTLHTNLRIK QDSQGALMVYPY
 FGEKSAAMKKQKMTRRSLPEEQEQEQEVIGSKIFLEIDNRQCV QDSDQCFKNTDAAAA
 LLASHAIQGTLSYPLVSVFSELESPRNARRAGSGDYKDDD
 DKENLYFQ (SEQ ID NO:74)

10 На 96-луночные иммунопланшеты Maxisorp Nunc immunoplates наносили в течение
 ночи при 4°C антиген-мишень (10 мкг/мл) и блокировали в течение 1 часа при комнатной
 температуре буфером для блокирования фага PBST (фосфатно-солевой буфер (PBS) и
 1% (масс./об.) бычьим сывороточным альбумином (BSA) и 0,05% (об./об.) tween-20). В
 планшеты с антигеном по отдельности добавляли V_H (см., например, Lee et al., J. Immunol.
 15 Meth. 284:119-132, 2004) и V_H/V_L (см. Liang et al., J. Mol. Biol. 366: 815-829, 2007) фаговых
 библиотек антител и инкубировали в течение ночи при комнатной температуре. На
 следующие сутки покрытые антигеном планшеты промывали десять раз посредством
 PBT (PBS с 0,05% Tween-20) и связавшийся фаг элюировали посредством 50 mM HCl и
 500 mM NaCl в течение 30 минут и нейтрализовывали равным объемом 1 M основания
 20 Tris (pH7,5). Выделенный фаг амплифицировали в клетках *E. coli* XL-1 Blue. В ходе
 последующих раундов селекции инкубацию фага с антителом в покрытых антигеном
 планшетах снижали до 2-3 часов, и строгость промывания планшета постепенно
 повышали.

После 4 раундов пэннинга, наблюдали значительное обогащение. При сортировке
 25 V_H и V_H/V_L было отобрано 96 клонов для определения того, связываются ли они
 специфически с NRR Notch2 человека и мыши. Вариабельные области этих клонов
 секвенировали способом ПЦР для идентификации уникальных по последовательности
 клонов.

Аффинность фаговых антител ранжировали с использованием точечного
 30 конкурентного ELISA. Величины IC₅₀ фаговых антител далее определяли с
 использованием конкурентного ELISA связывания фага. Уникальные фаговые антитела,
 которые связывали NRR Notch2 как человека, так и мыши, выбирали и преобразовывали
 в полноразмерные IgG для оценки в клеточном анализе *in vitro*.

Представляющие интерес клоны преобразовывали в IgG путем клонирования
 35 областей V_L и V_H отдельных клонов в векторы LPG3 и LPG4, соответственно, временно
 экспрессируя их в клетках млекопитающих CHO, и очищая на колонке с белком А.

Конструирование библиотек для повышения аффинности антитела D

Фагида pW0703 (полученная на основе фагмиды pV0350-2b (Lee et al, J. Mol. Biol
 340, 1073-1093 (2004)), экспонирующей одновалентный Fab на поверхности бактериофага
 40 M13) служила в качестве матрицы библиотеки для пересадки вариабельных доменов
 легкой (V_L) и тяжелой (V_H) цепей антитела D из библиотеки V_H/V_L для созревания
 аффинности. Затем стоп-кодона включали в CDR-L3 матрицы библиотеки. Для
 созревания аффинности использовали стратегию слабой рандомизации, которая
 45 обеспечивала скорость мутаций приблизительно 50% в выбранных положениях при
 использовании стратегии "испорченных" олигонуклеотидов со смесями 70-10-10-10
 оснований в пользу нуклеотидов дикого типа (Gallop et al., Journal of Medicinal Chemistry
 37: 1233-1251 (1994)). В частности, нацеливались на остатки в положениях 28-32 CDR-

L1, 50 и 53-55 CDR-L2, 91-94 и 96 CDR-L3, 28-35 CDR-H1, 50-58 CDR-H2, 95-100 CDR-H3. Также конструировали три различных библиотеки с комбинациями слабо рандомизированных петель CDR, L1/L2/L3, L3/H1/H2 и L3/H3.

Стратегия фаговой сортировки для обеспечения повышения аффинности

5 Для селекции по повышению аффинности, фаговые библиотеки подвергали сортировке на планшетах на первом раунде, с последующими пятью раундами сортировки в растворе. Библиотеки сортировали против NRR Notch2 мыши и человека по отдельности. На первом раунде сортировки на планшетах три библиотеки сортировали против покрытого планшета (планшет NUNC Maxisorp) по отдельности
10 с фагом, добавленным в количестве приблизительно 3 O.D./мл в 1% BSA и 0,05% Tween 20, в течение 2 часов при комнатной температуре. На следующем раунде сортировки в растворе, 1 O.D./мл фага, размножившегося на первом раунде сортировки в планшете, инкубировали с 50 нМ биотинилированного белка-мишени (концентрация основана на величине IC₅₀ для исходного клона фага) в 100 мкл буфера, содержащего 1%
15 Superblock (Pierce Biotechnology) и 0,05% Tween20 в течение 30 минут при комнатной температуре. Смесь далее разбавляли 10X 1% Superblock и 100 мкл/лунка добавляли в покрытые нейтравидином лунки (5 мкг/мл) в течение 15 минут при комнатной температуре при осторожном встряхивании для улавливания связавшегося с биотинилированной мишенью фага. Затем лунки промывали PBS-0,05% Tween20 десять
20 раз. Для определения фонового связывания в контрольных лунках, содержащих фаг с мишенями, которые не были биотинилированными, проводили улавливание на покрытые нейтравидином планшеты. Связавшийся фаг элюировали 0,1 Н HCl в течение 20 минут, нейтрализовывали 1/10 объема 1 М Tris pH11, титровали и размножали для следующего раунда. Далее проводили четыре дополнительных раунда сортировки в растворе вместе
25 с двумя способами повышения строгости селекции. Первым из этих способов является зависимость от уровня селекция путем снижения концентрации биотинилированного белка-мишени от 10 нМ до 0,5 нМ, и второй из которых представляет собой независимую от уровня селекцию путем добавления избыточных количеств небитинилированного белка-мишени (избыток в 100-500) для устранения путем конкуренции более слабых связывающих веществ при комнатной температуре. Также добавление фага снижали (0,1-
30 0,5 O.D./мл) для снижения фонового связывания фага.

Высокопроизводительный ELISA со скринингом аффинности (конкуренция в одной точке)

35 Колонии отбирали после шестого раунда сортировки и выращивали в течение ночи при 37°C в 500 мкл/лунка среды 2YT с 50 мкг/мл карбенициллина и 1Е10/мл КО7 в 96-луночном планшете (Falcon). Из того же планшета в качестве контроля отбирали колонию XL-1, инфицированных исходным фагом. На 96-луночные планшеты Maxisorp Nunc наносили 100 мкл/лунка белка NRR Notch2 человека и мыши (1 мкг/мл) по отдельности в PBS при 4°C в течение ночи или комнатной температуре в течение 2
40 часов. Планшеты блокировали 65 мкл 1% BSA в течение 30 мин и 40 мкл 1% Tween 20 в течение других 30 минут.

Супернатант фага разбавляли 1:5 в буфере для ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ) (PBS с 0,5% BSA, 0,05% Tween20) с 10 нМ белком-мишенью в или без него в общем объеме 100 мкл и инкубировали в течение по меньшей мере 1
45 часа при комнатной температуре в F-планшете (NUNC). 75 мкл смеси с белком-мишенью или без него переносили параллельно в планшеты, покрытые белком-мишенью. Планшеты осторожно встряхивали в течение 15 мин для обеспечения улавливания не связавшегося фага с планшетом, покрытым белком-мишенью. Планшет промывали

по меньшей мере пять раз посредством PBS-0,05% Tween 20. Связывание количественно определяли путем добавления конъюгированного с пероксидазой хрена (HRP) антитела против M13 в буфере для ELISA (1:5000) и инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре. Планшеты промывали посредством PBS-0,05% Tween 20 по меньшей мере пять раз. Затем в лунки добавляли 100 мкл/лунка субстрата пероксидазы, 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ), и раствора пероксидазы В (H_2O_2) (Kirkegaard-Perry Laboratories (Gaithersburg, MD)) в соотношении 1:1 и инкубировали в течение 5 минут при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением в каждую лунку 100 мкл 1 М фосфорной кислоты (H_3PO_4) и реакционную смесь инкубировали в течение 5 минут при комнатной температуре. OD (оптическую плотность) для желтого цвета в каждой лунке определяли с использованием стандартного устройства для считывания планшетов для ELISA при 450 нм. Снижение OD (%) вычисляли с помощью следующего уравнения.

Снижение $OD_{450nm}(\%) = [(OD_{450nm} \text{ лунки с конкурентом}) / (OD_{450nm} \text{ лунки без конкурента})] * 100$

По сравнению со снижением $OD_{450nm}(\%)$ для лунки исходного фага (100%), клоны, которые имели снижение $OD_{450nm}(\%)$ ниже чем 50% для мишени как человека, так и мыши, отбирали для анализа последовательности. Уникальные клоны подвергали селекции для получения фага для определения аффинности связывания (IC_{50} для фага) против NRR Notch2 как человека, так и мыши, по сравнению с исходными клонами. Клоны с наибольшим повышением аффинности преобразовывали в IgG1 человека и экспрессировали в клетках млекопитающих.

Характеризация антител против NRR Notch2 (Biacore)

Аффинность связывания антител против NRR Notch2 измеряли путем поверхностного плазмонного резонанса (SRP) с использованием устройства BIAcoreTM-3000. IgG человека против NRR Notch2 улавливали с помощью антитела мыши против IgG человека, нанесенного на сенсорный чип CM5, до достижения приблизительно 200 единиц ответа (RU). Для определения кинетики двукратные серийные разведения NRR Notch2 человека и мыши (от 3,9 нМ до 500 нМ) инъецировали в буфер PBT (PBS с 0,05% Tween 20) при 25°C со скоростью потока 30 мкл/мин. Константы ассоциации (k_{on}) и константы диссоциации (k_{off}) вычисляли с использованием простой модели связывание Ленгмюра "один к одному" (BIAcore Evaluation Software версии 3.2). Равновесную константу диссоциации (K_D) вычисляли в качестве соотношения k_{off}/k_{on} .

2. Получение антител против NRR Notch1

Получение и характеристика определенных антител против NRR Notch1 описаны ранее. См. публикацию патентной заявки США No. US 2009/0081238 A1.

3. ELISA

Антитело против Anti-Flag использовали для улавливания меченного Flag белка NRR из всех четырех рецепторов для Notch в планшете высокого связывания с черными лунками (Greiner). Антитело против NRR и контрольные антитела E25 связывали с белками NRR и отмывали PBS. Конъюгированное с щелочной фосфатазой вторичное антитело против (H+L) человека (Jackson ImmunoResearch) использовали для детекции связанного антитела против NRR и E25. Несвязанное вторичное антитело отмывали и проводили детекцию AP с субстратом PNPP (Pierce).

4. FACS

Получали экспрессирующие плазмиды, в которых внеклеточный домен и

трансмембранные домены либо Notch1, либо Notch2, были мечены на N-конце посредством мус, и экспрессировали их под контролем отвечающего на тетрациклин элемента (TRE) выше минимального предраннего промотора CMV. Эти плазмиды стабильно трансфицировали в клетки CHO-K1 (Clonetech), сконструированные для экспрессии трансаактиваторного белка в присутствии доксицилина, который связывает и активирует TRE в трансфицированной плазмиде. Клетки обрабатывали 1 мг/мл доксицилина или носителем в течение 48 ч, а затем окрашивали антителом против NRR, антителом против мус (9E10, Millipore) или контрольным антителом E25 и вторичными антителами козы против антител человека либо с Alexa 488, либо с Alexa 647 (Invitrogen). После окрашивания, клетки анализировали на устройстве FACScalibur (BD Biosciences) и накапливали 15000 событий и ворота диапазона были настроены для оценки положительно и отрицательно окрашенных популяций.

5. Репортерный анализ Notch

Клетки NIH-3T3, либо стабильно трансфицированные Notch1, либо временно трансфицированные плазмидами, содержащими другие рецепторы Notch, котрансфицировали отвечающей на Notch TP-1 (12X CSL), люциферазный репортер светляка и конститутивно активным люциферазным репортером Renilla (pRL-CMV, Promega) для контроля эффективности трансфекции. Клеткам позволяли восстановиться после трансфекции от 6 часов до периода в течение ночи. Для стимуляции рецепторных клеток используют обработку антителами и клетками NIH-3T3, стабильно трансфицированными лигандом. Через 20 часов люциферазу светляка и Renilla определяют с помощью системы для анализа люциферазы Dual Glo Luciferase Assay system (Promega). Для каждого условия анализировали восемь повторений путем деления сигнала от люциферазы светляка на сигнал от Renilla для контроля эффективности трансфекции. Среднее значение и стандартное отклонение вычисляли и величины нормализовывали к вычисленным значениям для совместной культуры, стимулированной клетками NIH-3T3 без трансфекции лиганда.

6. Картирование эпитопов

Конструировали синтетические последовательности NRR Notch1 и Notch2 с уникальными участками рестрикции в точках соединения между пятью доменами NRR - LNR-A; LNR-B; LNR-C; HD-N; и HD-C - и изготавливали их в Blue Heron Technology (Bothell, WA). Обмен различными доменами между этими двумя синтетическими последовательностями с использованием сконструированных участков рестрикции приводил к химерным белкам NRR. Химерные клоны собирали в модифицированный вектор pUC19 и переносили в вектор, содержащий SEAP, pCSC.AP, для экспрессии. Меченные AP белки NRR получали путем трансфекции клеток 293T. После культивирования в течение 72 ч, кондиционированные среды собирали, очищали центрифугированием и тестировали в отношении активности AP с использованием системы Phospha-Light System (Applied Biosystems, Bedford, MA). Активность AP в каждом образце нормализовывали и ELISA проводили для тестирования способности α -NRR1 или α -NRR2 связывать химерные белки NRR. ELISA проводили следующим образом: либо α -NRR1, либо α -NRR2, улавливали с помощью связанного с планшетом антитела α -Fc в 96-луночном формате и инкубировали с кондиционированной средой в течение ночи. Планшет промывали для удаления не связавшегося белка, и уловленный белок тестировали в отношении активности AP с использованием системы Phospha-Light System. Полученную активность AP использовали для количественного определения способности каждого антитела против α -NRR связывать конкретные химерные белки и установления важных эпитопов для связывания.

7. Анализ HUVEC на гранулах из фибринового геля

Клетки HUVEC выращивали на гранулах из фибринового геля, как описано ранее (Nakatsu et al., 2003). На гранулы Cytodex 3 (Amersham Pharmacia Biotech) наносили 350-400 HUVEC на гранулу в 2 мл среды EGM-2 (Clonetics). Приблизительно 200 гранул, покрытых HUVEC, погружали в фибриновый сгусток в одной лунке 12-луночного планшета для культивирования тканей. 6×10^4 фибробластных клеток Detroit 551 высевали сверху сгустка и среды, содержащей либо 5 мкг/мл антитела против NRR1, либо 5 мкг/мл антитела против DLL4, либо 1 мкМ DBZ, либо контроль в виде носителя. Среда меняли каждые двое суток. После от семи до девяти суток, фибриновые гели фиксировали 4% параформальдегидом и эндотелиальные клетки окрашивали антителом против CD31 (R&D Systems AF806) с использованием конъюгированного с FITC вторичного антитела для детекции.

8. Анализ неонатальной сетчатки *in vivo*

Новорожденным CD1 инъецировали внутривбрюшинно на P1 и P3 либо 10 мг/кг полученного из амброзии контроля, либо 20 мг/кг Notch-1. Глаза собирали на P5 и фиксировали с помощью 4% PFA. Сетчатки вырезали, блокировали (5% BSA, 0,5% Triton X-100) течение одного часа, а затем проводили обработку в течение 10 мин 1 М цитратом натрия. Затем сетчатки инкубировали в течение ночи при 4°C с биотинилированным изолектином B4 (Sigma) и антителом Ki67 (NeoMarkers). Затем сетчатки промывали и окрашивали конъюгатом стрептавидин-Alexa 488 и антителом козы против антител кролика с Cy3 в 1% BSA, 0,5% Triton X-100. Сетчатки помещали на предметное стекло и визуализировали с использованием эпифлуоресцентного микроскопа.

9. Исследования опухоли *in vivo*

Опухолевые клеточные линии человека Calu-6 и HM7 выращивали в среде Хэма F12 и DMEM с низким содержанием 1:1 глюкозы, дополненной 10% об./об. FBS, 1% об./об. пенициллином/стрептомицином, 2 мМ L-Gln и 1 мкг/мл FungizoneTM (InvitrogenTM, CA). Клетки инкубировали при 37°C в атмосфере 95% воздух/5% CO₂. Для экспериментов с ксенотрансплантатами мышей, опухолевые клетки суспендировали в концентрации 1×10^8 или 1×10^9 клеток/мл и подкожно инъецировали (100 мкл/мышь) в дорзальную боковую область мышей Balb-c nude (Harlan Sprague Dawley, IN). Когда опухоли достигали объема 400 мм³, случайным образом выбирали группу (n=10) в качестве контролей 0 суток. Оставшихся мышей разделяли на группы по 10 мышей, и фаговое антитело против Notch1 вводили внутривбрюшинно в дозе 10 мг/кг два раза в неделю. Трансплантированные опухоли измеряли два раза в неделю вдоль наибольшей оси и перпендикулярной оси, как описано. Для каждых суток, на которые измеряли опухоли, для каждой мыши вычисляли объем опухоли и средние объемы опухолей для каждого контрольного антитела (антитела против агглютинаина амброзии), группу антител против VEGF сравнивали со средним объемом опухоли у мышей, которым вводили антитело против Notch1, с помощью критерия Даннетта, осуществленного в системе для статистического анализа JMPTM (версии 5.1 для Windows; SAS Institute, Cary, NC), на уровне P<0,05. Мышей умерщвляли, когда объем опухоли достигал 2000 мм³. С помощью криостата делали срезы опухолей размером 7 микрометров, их фиксировали ацетоном и окрашивали посредством DAPI (Invitrogen), антитела хомячка против CD31 (Serotech, Inc.) и вторичного антитела против антител хомячка с Cy3 (Jackson Immunolabs). Предметные стекла закрепляли флуоресцентной закрепляющей средой (Dako).

Изображения получали с помощью микроскопа Zeiss Axioskop2 и анализировали посредством ImageJ в отношении площади окрашивания DAPI и окрашивания Cy3. Окрашивание Cy3 делили на площадь окрашивания DAPI для нормализации к количеству присутствующих клеток и величины нормализовали к величинам для опухоли, обработанной антителом против агглютинина амброзии. Все исследования на животных проводили согласно протоколам, одобренным Institutional Animal Care and Use Committee.

10. Анализ В-клеток маргинальной зоны

Мышам Balb-c (Jackson) в возрасте 12 недель внутрибрюшинно инъецировали два раза в неделю 5 мг/кг антитела против gD, антитела против NRR1 или антитела против NRR2. Спленоциты мышей выделяли и окрашивали для FACS посредством B220-PerCP, CD23-PE и CD21-FITC (BD Biosciences), как описано ранее (Saito, et al, Immunity, Vol. 18, 675-685, May 2003).

11. Гистология и иммуногистохимия ткани кишечника мыши

В шести группах по шесть мышей C57BL/6 в возрасте 10 недель (Jackson) вводили либо MCT раз в двое суток, либо DBZ в количестве 30 мкмоль/кг раз в двое суток, либо антитело против NRR1 в количестве 10, 2, или 0,4 мг/кг или контроля в виде антитела против gD (HSV-I) в количестве 10 мг/кг на 0, 2 и 6 сутки, или, в ином случае, как указано. Фиксированные в формалине и погруженные в парафин ткани тонкого кишечника мыши нарезали на срезы толщиной 3 микрометра. Гистохимическую идентификацию типов клеток кишечника проводили с помощью альцианового синего, как рекомендовано изготовителем (PolyScientific). Для окрашивания антителом против Ki67, срезы предварительно обрабатывали раствором для извлечения мишени (S1700, DAKO) и инкубировали с антителом кролика против Ki67 (1:200, клон SP6, Neomarkers). Вторичное антитело козы против антител кролика в концентрации 7,5 мкг/мл (Vector labs) подвергали детекции с помощью набора Vectastain ABC Elite Kit (Vector labs). Окрашенные на Ki67 срезы контрастно окрашивали гематоксилином Мейера. Для окрашивания антителом против лизоцима срезы обрабатывали на платформе Discovery XT (Ventana Medical Systems, Inc.) с использованием условий выделения эпитопа CC1m, детекции антител кролика с помощью OmniMap и гематоксилина Ventana II/c контрастным окрашиванием синим красителем. Для окрашивания с помощью HES-1, после антитела против HES-1 крысы (клон NM1, MBL, International) следовала обработка TSA-HRP.

В. Результаты

1. Получение синтетических антител, которые специфично нацелены на отрицательные по Notch1 и Notch2 регуляторные области

Для обеспечения независимого антагонизма передачи сигнала Notch1 и Notch2 у человека и мышей, авторы изобретения использовали фаговый дисплей для нацеливания на NRR и отбора синтетических антител человека с нижеследующими качествами. Во-первых, каждое антитело отбирали, чтобы оно эффективно ингибировало свою мишень - Notch1 или Notch2 - но не другие рецепторы Notch. Во-вторых, антитела отбирали по связыванию с последовательностями-мишенями человека для обеспечения терапевтического нацеливания. В-третьих, для установления биологических последствий системного ингибирования Notch1 или Notch2 *in vivo* и для исследования функций этих рецепторов в моделях на мышах, антитела совместно отбирали по связыванию с ортологичными последовательностями мыши. В-четвертых, для предотвращения иммунного ответа человека против антител определяющие комплементарность области клонировали в каркас иммуноглобулинов человека.

В соответствии с этим подходом, авторы выделили антитела против NRR Notch1 и

против NRR Notch2 с каждым из этих желаемых свойств. Эти антитела имеют несколько преимуществ относительно "общих ингибиторов Notch", которые нацелены на множество рецепторов Notch, таких как ингибиторы γ -секретазы. Поскольку эти антитела отличают конкретные рецепторы Notch, они могут устранять различные функции этих отдельных рецепторов. Более того, общие ингибиторы Notch демонстрируют потенциально нежелательные побочные эффекты *in vivo* вследствие двойного ингибирования как Notch1, так и Notch2, и, таким образом, антитела, которые являются селективными в отношении либо Notch1, либо Notch2, могут быть более привлекательными кандидатами для терапевтических целей. Антитела против NRR Notch1 и против NRR Notch2, выделенные согласно указанному выше подходу, дополнительно описаны и охарактеризованы ниже.

Выделение и характеристика антител против Notch NRR1 рассмотрены в публикации патентной заявки США No. US 2009/0081238 A1. Одно из антител, описанных в этой заявке, "антитело A-2", было охарактеризовано в отношении его структуры и некоторых видов биологической активности. Некоторые из исследований, рассмотренные в этой заявке, обобщены в настоящем документе. Для удобства "антитело A-2" из публикации патентной заявки США No. US 2009/0081238 A1 называют в настоящем документе "антителом против NRR1".

Выделение и характеристика антител против NRR Notch2 описаны в настоящем документе. Было выделено антитело против NRR Notch2, называемое "антителом D". Это антитело подвергали созреванию аффинности, как описано выше, с получением антитела D-1, антитела D-2 и антитела D-3. На фигуре 1 показаны последовательности HVR-H1, HVR-H2 и HVR-H3 антитела D, антитела D-1, антитела D-2 и антитела D-3. На фигуре 2 показаны последовательности HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3 антитела D, антитела D-1, антитела D-2 и антитела D-3. На фигуре 3 показаны последовательности вариабельной области тяжелой цепи антитела D, антитела D-1, антитела D-2 и антитела D-3. На фигуре 4 показаны последовательности вариабельной области легкой цепи антитела D, антитела D-1, антитела D-2 и антитела D-3. Для удобства антитело D-3 называют в настоящем документе как "антитело против NRR2".

Измерение аффинности связывания с использованием поверхностного плазмонного резонанса (SPR) показало, что антитело против NRR1 связывалось со сходной и высокой аффинностью ($K_d=3$ нМ) с очищенными белками NRR1 с последовательностью как мыши, так человека. Авторы изобретения наблюдали сходную аффинность ($K_d=5$ нМ) в отношении антигенов NRR2 в тестах антител против NRR2. Связывание обоих антител оказалось высоко специфичным в отношении их рецепторов; не было выявлено связывания с последовательностями человека или мыши любого из других трех не являющихся мишенями рецепторов как для антитела против NRR1, так и для антитела против NRR2, с использованием различных способов, включающих SPR, твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) и активированную флуоресценцию сортировку клеток (FACS) (фигура 9 и данные не представлены). Например, результаты ELISA показали, что антитело против NRR1 связывалось в равной степени хорошо с очищенными белками NRR Notch1 человека и мыши, причем полумаксимальное связывание наблюдали при концентрации антитела приблизительно 0,1 мкг/мл. Антитело против NRR1 не связывалось на поддающемся детекции уровне с очищенными белками NRR Notch2, NRR Notch3 или NRR Notch4 человека или мыши, даже при наиболее высокой протестированной концентрации антитела (фигура 9А, левая панель), несмотря на тот факт, что последовательности NRR Notch1 и NRR Notch2 человека являются на 45% идентичными (фигура 18). Авторы настоящего изобретения выявили сходные результаты

для антитела против NRR2, которое специфично связывалось с белками NRR Notch2, но не с белками NRR из других рецепторов Notch (фигура 9А, правая панель).

Для определения того, связывается ли антитело против NRR1 и антитело против NRR2 специфично с полноразмерными рецепторами, экспрессированными на поверхности клеток, авторы настоящего изобретения использовали активируемую флуоресценцией сортировку клеток (FACS). Авторы настоящего изобретения оценивали связывание либо с Notch1, либо с Notch2, каждый из которых содержит эпитопную метку мус на N-конце для того, чтобы отличать трансгенные рецепторы Notch от эндогенных рецепторов Notch (в частности Notch2, который экспрессировался клетками К1-СНО). Экспрессию рецептора индуцировали в клетках К1-СНО, которые либо оставались нетрансфицированными (фигура 9В, панели 1, 4, 7 и 10), либо были трансфицированы мус-Notch1 (фигура 9В, панели 2, 5, 8 и 11), либо были трансфицированы мус-Notch2 (фигура 9В, панели 3, 6, 9 и 12). Связывание антитела против NRR1 с мус-положительными клетками наблюдали в клетках мус-N1 (фигура 9В, панель 2), но не в исходных клетках К1-СНО (фигура 9В, панель 1) и только после индукции (фигура 9В, сравнить панели 2 и 5), указывая на то, что антитело против NRR1 специфично связывалось с Notch1. Напротив, хотя экспрессия мус-Notch2 очевидно индуцировалась в клетках мус-N2 (фигура 9В, сравни панели 3 и 6), антитело против NRR1 не связывалось с мус-Notch2 (фигура 9В, сравнить панели 2 и 3). Авторы изобретения провели сходный анализ с использованием антитела против NRR2 (фигура 9В, панели 7-12), хотя этот анализ был осложнен экспрессией мус-Notch2, происходящей в отсутствие индукции (фигура 9В, панели 6 и 12) и эндогенной экспрессией Notch2 хомячка в линии К1-СНО (фигура 9В, сравнить панели 7 и 10 с панелями 1 и 4). Тем не менее, антитело против NRR2 в значительной степени связывалось только с клетками, экспрессирующими мус-Notch2 после индукции, что согласуется со специфичным связыванием с Notch2 (фигура 9В, сравнить панель 9 с панелями 8 и 12). Взятые вместе, результаты авторов настоящего изобретения по связыванию при использовании очищенных белков NRR, а также экспрессии на клеточной поверхности полноразмерных рецепторов, демонстрируют, что антитело против NRR1 специфично связывается с NRR1 Notch1, но не с NRR Notch2, и аналогично, что антитело против NRR2 специфично связывается с NRR Notch2, но не с NRR Notch1. Эта специфичность далее подтверждена рядом структурных и функциональных исследований, описанных ниже.

2. Функционирование антитела против NRR1 и антитела против NRR2 в качестве сильных и специфичных ингибиторов передачи сигнала Notch1 и Notch2 in vitro

Для оценки того, влияют ли антитела против NRR на передачу сигнала Notch, авторы настоящего изобретения сначала использовали анализ совместной культуры, в котором использовали клеточные линии NIH-3Т3, сконструированные для экспрессии Jag1, в качестве лиганда Notch, или либо Notch1 (фигура 10А), либо Notch2 (фигура 10В) в качестве рецептора Notch. Анализы точно отражали передачу сигнала Notch, поскольку сильный сигнал репортера Notch (люцифераза светляка) зависел от присутствия как клеток, экспрессирующих лиганд, так и клеток, экспрессирующих рецептор (фигуры 10А и В, сравнить -Jag1 с +Jag1), и уровень репортера снижался до фонового уровня, когда был включен GSI (ингибитор γ -секретазы) (фигуры 10А и В, сравнить DMSO с DAPT).

Добавление возрастающих количеств антитела против NRR1 ингибировало передачу сигнала в клетках Notch1, причем полное ингибирование наблюдалось при концентрации антитела между 80 и 400 нг/мл (фигура 10А). Контрольное антитело человека не ингибировало передачу сигнала (фигура 10А, сравнить титрование α -gD с α -NRR1), так

же как и многочисленные другие антитела, направленные против антигенов, отличных от Notch1 (данные не представлены). Для дальнейшего тестирования того, отражает ли эта ингибиторная активность связывание NRR1, авторы настоящего изобретения решили установить, восстанавливает ли добавление очищенного антигена NRR1 передачу сигнала в присутствии ингибиторной концентрации (80 нг/мл) антитела против NRR1, путем конкуренции за связывание антитела с Notch1, экспрессируемым на передающих сигнал клетках. Добавление антигена NRR1, но не NRR2 (который оказался активным и надлежащим образом свернутым в других анализах; см. фигура 10B) восстановило передачу сигнала до контрольных уровней (фигура 10A, сравнить 80 нг/мл α -NRR1 + NRR1 с 80 нг/мл α -NRR1 отдельно и 80 нг/мл α -NRR1 + NRR2). В качестве контроля, ни антиген NRR1, ни антиген NRR2, не влияли на передачу сигнала в совместных культурах, которые содержали контрольное антитело, подтверждая, что фрагменты NRR сами по себе не оказывают прямого эффекта на передачу сигнала Notch (фигура 10A, α -gD+NRR1 и α -gD+NRR2). С использованием клеток, экспрессирующих Notch2, для анализа активности против NRR2, авторы настоящего изобретения получили сходные результаты для ингибирования антителом против NRR2 передачи сигнала Notch2 (фигура 10B). Оба антитела ингибировали передачу сигнала, индуцируемую всеми из лигандов Notch, которые авторы настоящего изобретения протестировали, а именно Jag1, Jag2, Dll1 и Dll4 (фигура 16 и данные не представлены). Взятые вместе, эти результаты демонстрируют, что антитело против NRR1 и антитело против NRR2 являются сильными паралог-специфическими ингибиторами передачи сигнала Notch1 и Notch2, соответственно.

3. Антитело против NRR1 ингибирует передачу сигнала через оба основных класса мутантных рецепторов, встречающихся при T-ALL

Одним из механизмов, посредством которых, как было показано, передача сигнала Notch прямо влияет на онкогенез, является механизм через мутационную активацию передачи сигнала Notch1 при T-ALL. В частности, активирующие Notch1 мутации при T-ALL относятся к двум широким категориям: (1) мутации, которые укорачивают домен PEST, таким образом, стабилизируя ICD и повышая передачу сигнала лиганд-зависимым образом, и (2) мутации, которые дестабилизируют NRR, таким образом, обеспечивая расщепление ADAM и стимуляцию передачи сигнала независимым от лиганда образом. Для тестирования того, может ли антитело против NRR1 прекратить передачу сигнала через такие мутантные рецепторы, авторы настоящего изобретения модифицировали анализ совместной культуры для экспрессии Notch1-WT (Notch1 дикого типа), Notch1- Δ PEST (Notch1, лишенный домена PEST), или Notch1-L1594P (Notch1, имеющий мутацию L1594P в домене гетеродимеризации (HD) NRR). Как было выявлено для передачи сигнала Notch1 дикого типа (фигура 10C, верхняя панель), антитело против NRR1 полностью ингибировало зависимую от лиганда и независимую от лиганда передачу сигнала через Notch1- Δ PEST и Notch1-L1594P (фигура 10C, средняя и нижняя панели). Таким образом, антитело против NRR1 осуществляет антагонизм передачи сигнала через оба класса мутантных рецепторов, включая мутацию L1594P, которая находится в том же домене, на который нацелено антитело, и дестабилизирует его.

4. Антитело против NRR1 и антитело против NRR2 функционируют в качестве сильных и специфичных ингибиторов передачи сигнала Notch1 и Notch2 in vivo

Для определения того, функционирует ли антитело против NRR1 и антитело против NRR2 как специфичные к рецептору ингибиторы *in vivo*, авторы настоящего изобретения исследовали, каким образом антитела влияли на определение участи клеток, роль в котором генетическими способами была установлена для Notch1 или Notch2. Конкретно,

зависимая от условий инактивация Notch1 или Notch2 ранее показала, что Notch1 является ключевым для определения участи Т-клеток относительно В-клеток в ходе развития лимфоидной системы, в то время как Notch2 требуется для образования В-клеток маргинальной зоны (МЗВ) селезенки. В соответствии с функцией Notch1 в развитии Т-клеток, авторы настоящего изобретения открыли, что введение мышам антитела против NRR1, но не антитела против NRR2, значительно снижало массу тимуса (фигуры 11А и В). Аналогично, антитело против NRR1, но не антитело против NRR2, значительно снижало общее число клеток в тимусе (фигура 11В) и практически полностью ингибировало образование двойных положительных CD4+/CD8+ Т-клеток (фигура 11С).

Напротив, эффекты антител были обратными, когда исследовали клетки МЗВ. Введение антитела против NRR2 практически устраняло клетки МЗВ (0,97+/-0,45 по сравнению с контрольным значением, составляющим 6,61+/-0,25), снижая популяцию в еще более высокой степени, чем очищенный рекомбинантный слитый белок рецептор лимфотоксина-β (LTβR)-Fc слитый белок (3,48+/-0,06), который служил в качестве положительного контроля (фигура 11D). Этот ингибиторный эффект был специфичным к антителу против NRR2, поскольку антитело против NRR1 не снижало в значительной степени популяцию МЗВ (6,00+/-0,44) относительно контрольного антитела против gD (6,61+/-0,25; фигура 11D). Взятые вместе, эти исследования *in vivo* указывают на то, что оба антитела являются сильными ингибиторами их соответствующих мишеней, которые могут индуцировать биологически значимые изменения в определении участи клеток; более того, поскольку антитело против NRR1 влияет на образование Т-клеток, но не МЗВ-клеток, в то время как антитело против NRR2 влияет на образование МЗВ-клеток, но не Т-клеток, каждое антитело функционирует специфично в отношении мишени, для которой оно предназначено, *in vivo*.

5. Совместная кристаллическая структура показала, что антитело против NRR1 связывается с доменами LNR и HD-C и, вероятно, стабилизирует конформацию "off" NRR

Для установления специфичности антитела против NRR1 и антитела против NRR2 и повышения механистического понимания антагонистической активности антитела, авторы настоящего изобретения протестировали связывание обоих антител с рядом химерных белков NRR. Конкретно, авторы настоящего изобретения получили химерные NRR путем обмена каждого из субдоменов NRR (LNR-A, LNR-B, LNR-C, HD-N и HD-C) между Notch1 и Notch2, экспрессировали эти химеры в качестве секретируемых белков, слитых с щелочной фосфатазой для простоты детекции и анализировали связывание нормализованных количеств каждого химерного NRR с антителом против NRR1 или антителом против NRR2. Из 26 химерных NRR, которые экспрессировали авторы изобретения 17 эффективно выявлялись в качестве секретируемых белков (фигура 12А), 7 плохо поддавались детекции и 2 не поддавались детекции выше фонового уровня (фигура 17), указывая на то, что большинство, но не все, из химерных NRR экспрессировались, сворачивались надлежащим образом и секретировались. Обмен единичного домена LNR-A из NRR2 в каркас NRR1 нарушал связывание антитела против NRR1 (фигура 12А, химера BC.Hd и все другие с LNR-A из NRR2), указывая на то, что контакт антитела против NRR1 с субдоменом LNR-A в NRR1 является необходимым для связывания. Напротив, обмен доменами LNR-C и/или HD-N из NRR2 в NRR1 не повлиял на связывание антитела против NRR1 (фигура 12А, химеры AB.Hd, ABC.Hc и AB.Hc), демонстрируя, что ни один из этих доменов не является необходимым для специфичности связывания. Наконец, AB.Hc представлял собой химеру с

наименьшим количеством доменов NRR1, которая, тем не менее, поддерживала полное связывание антитела против NRR1 (хотя с химерой АВ наблюдали слабое связывание), указывая на то, что большинство, и, возможно, все, из участков контакта, требуемых для специфичности связывания антитела против NRR1, содержатся в доменах LNR-A, LNR-B и HD-C.

Характеризация антитела против NRR2 показала паттерн связывания, сходный с паттерном, определенным для антитела против NRR1, хотя и с некоторыми отчетливыми отличиями. Обмен доменом LNR-A из NRR1 в каркас NRR2 полностью нарушал связывание антитела против NRR2, в то время как обмен LNR-B или LNR-C не имел эффекта; таким образом, как было в случае антитела против NRR1, связывание антитела против NRR2 требует субдомена LNR-A из Notch2. Аналогично также был необходим домен HD-C из Notch2. Две различных химеры (С.Нп и ВС) только с тремя субдоменами из NRR2 поддерживали полное связывание в этом анализе; обе из этих химер имели общие субдомены LNR-A и HD-C из NRR2 и, в соответствии с этими данными, химера, которая содержала только субдомены LNR-A и HD-C из NRR2 поддерживала слабое, но поддающееся детекции связывание с антителом против NRR2. Таким образом, при определении субдоменов, которые определяют специфичность связывания антитела против NRR2, эксперименты по обмену доменами: (а) показали, что LNR-A и HD-C являются наиболее важными (необходимыми и частично достаточными для специфичности связывания) и (b) указали на то, что участки контакта антитело-NRR2 в LNR-B и HD-N также могут играть роль.

Для лучшего понимания молекулярной основы антагонистической активности антитела против NRR1, авторы настоящего изобретения определили $2,2 \text{ \AA}^2$ кристаллическую структуру Fab-фрагмента антитела, связанного с NRR1 человека. Эта структура показала, что NRR1 формирует компактную структуру, очень сходную со структурой NRR2 человека, где три связывающих Ca^{2+} модуля LNR обернуты вокруг центрального домена HD (фигуры 12B и C). Структура показала, что кажущимся эффектом связывания Fab является стабилизация взаимодействий LNR-HD, так чтобы S2 не был доступен для расщепления, таким образом, поддерживая каскад передачи сигнала Notch1 в состоянии покоя. Эта интерпретация подтверждается данными, что Fab не прямо закрывает участок S2, а вместо этого, связывается на поверхности контакта между доменами HD, LNR-A и LNR-B (фигура 12D), что согласуется с экспериментами по обмену доменами (фигура 12A). В этой поверхности контакта погружено $\sim 2000 \text{ \AA}^2$ доступной для растворителя площади поверхности, равно распределенной между fab и NRR1. Тяжелая цепь Fab контактирует с LNR-B, конечной спиралью в домене HD-C и периферией LNR-A. CDR H3 располагается в поверхности контакта между LNR-B и HD. В частности, R99 из H3 образует водородную связь с карбонилем Phe1501 основной цепи LNR-A, в то время как алифатическая часть боковой цепи взаимодействует с L1710 из домена HD. Легкая цепь составляет $\sim 40\%$ погруженной площади поверхности, обеспечиваемой Fab, и контактирует с соединительной петлей перед конечной спиралью в домене HD, а также LNR-A.

Эта структура также раскрывает основу Fab-специфичности для Notch1 относительно Notch2. Несмотря на $\sim 45\%$ идентичность последовательностей между доменами NRR Notch1 и Notch2, большинство из остатков, вовлеченных в поверхность контакта, отличаются между двумя белками. Например, из 21 остатка NRR, которые погружают по меньшей мере 25% доступной для растворителя площади поверхности при связывании с Fab, только шесть идентичны в Notch1 и Notch2. Эти шесть остатков вносят вклад менее чем в четверть площади поверхности в эпитопе Fab и распределены по всему

эпителию (фигуры 12D и 18).

6. Селективное ингибирование передачи сигнала *Notch1* нарушает регуляцию ангиогенеза

Чтобы начать исследование специфичных к рецептору Notch антител в целях определения функциональной значимости отдельных рецепторов *in vivo*, авторы изобретения сначала решили установить, нарушает ли селективное блокирование передачи сигнала Notch1 антителом против NRR1 ангиогенез у млекопитающих. Многочисленные сообщения указывают на то, что каскад Notch функционирует ниже сосудисто-эндотелиального фактора роста (VEGF) и играет ключевую роль в ангиогенезе путем регуляции определения участи эндотелиальных клеток между концевыми клетками и клетками трубки. Эксперименты с использованием различных генетических и биохимических инструментов, включая специфичные к Dll4 блокирующие антитела, установили Dll4 в качестве ключевого лиганда Notch, вовлеченного в ангиогенную передачу сигнала Notch, хотя в ангиогенез в качестве рецепторов Dll4 вовлечены два рецептора Notch, Notch1 и Notch4.

Сначала авторы изобретения протестировали, влияет ли селективное ингибирование Notch1 на ветвление эндотелиальных клеток *in vitro*. Эндотелиальные клетки пупочной вены человека (HUVEC), совместно культивированные с фибробластами кожи человека, образуют ветвления со структурами, подобными просвету. В соответствии с предшествующей работой, авторы настоящего изобретения выявили, что общее ингибирование Notch с использованием DBZ, ингибитора γ -секретазы, а также селективного антитела, блокирующего Dll4, повышало как количество, так и длину ветвлений эндотелиальных клеток. Важно, что селективное блокирование передачи сигнала Notch1 с использованием антитела против NRR1 привело к сходному фенотипу (фигуры 13A и 13B).

Для определения того, влияет ли антитело против NRR1 на ангиогенез *in vivo*, авторы настоящего изобретения использовали модель, основанную на развитии сосудов сетчатки у новорожденных мышей. Системная доставка антитела против NRR1 в значительной степени нарушала развитие сосудов сетчатки у новорожденных мышей, которым проводили введение (фигура 13C). Относительно введения контрольного антитела против агглютинаина амброзии, введение против NRR1 приводило к плотной, компактной и на вид запутанной сосудистой сети (фигура 13C, сравнить панели I и III с панелями II и IV, соответственно). Это повышенное накопление эндотелиальных клеток коррелировало с повышенной пролиферацией, оцениваемой по мечению маркером пролиферации Ki67 (фигура 13C, сравнить панели V и VI). Все эти данные, включая повышенную плотность сосудов, накопление эндотелиальных клеток и повышенную пролиферацию, близко имитируют данные, выявленные после ингибирования Dll4 или γ -секретазы с использованием этой модели на новорожденных (данные не представлены) и согласуется с результатами других исследований, включая анализ сосудов опухоли (фигуры 13D и 13E) и анализ кармана роговицы у мышей (данные не представлены). Результаты, полученные авторами настоящего изобретения, демонстрируют не только то, что антитело против NRR1 обладает высокой биологической активностью, но то, что ингибирование Notch1 отдельно в противоположность Notch4 или комбинации Notch1 и Notch4, является достаточным для выраженного нарушения ангиогенеза у млекопитающих.

7. Селективное блокирование антителом *Notch1* ингибирует рост опухоли в доклинических моделях

Для определения того, является ли достаточным селективное блокирование Notch1

с использованием антитела против NRR1 для ингибирования роста опухоли, авторы настоящего изобретения использовали доклинические модели опухоли и сравнивали рост установившихся опухолей после введения антитела против NRR1, антитела против VEGF или антитела против агглютинаина амброзии. В обеих моделях на Calu6 и HM7, группы, в которых вводили антитело против NRR1, продемонстрировали значимое снижение размера опухоли относительно контрольных групп, даже в первые исследованные моменты времени, от трех до четырех суток после начальной дозы (фигуры 13A-C). В модели Calu6 группа антитела против NRR1 продемонстрировала снижение размера опухоли от приблизительно 250 мм³ до менее чем 100 мм³, аналогично снижению, наблюдаемому в группе антитела против VEGF; напротив, опухоли в контрольной группе антитела против агглютинаина амброзии росли до размера более 400 мм (фигура 14A). Авторы настоящего изобретения наблюдали сходные результаты при использовании агрессивных растущих HM7; введение антитела против NRR1 приводило к тому, что размер опухоли оставался неизменным (фигура 14B) или практически неизменным (фигура 14C) в течение 12-13 суток, что значительно отличается от роста в течение шести суток от 250 мм³ до более чем 900 мм³, наблюдаемого в контрольной группе (фигуры 14B и 5C). Авторы настоящего изобретения наблюдали сходное ингибирование роста опухоли с использованием ряда концентраций доз антитела против NRR1, между 20 мг/кг и 2,5 мг/кг, хотя группы 10 и 20 мг/кг продемонстрировали тенденцию в отношении более сильного ингибирования относительно групп 2,5 и 5 мг/кг (фигура 14C).

Авторы настоящего изобретения исследовали модели опухолей Calu6 или HM7, поскольку их ответ на антиангиогенные средства документально подтвержден. Для прямого тестирования того, нарушает ли антитело против NRR1 ангиогенез в модели Calu6, авторы настоящего изобретения исследовали сосуды в репрезентативных срезах опухолей от мышей в трех группах введения. Путем нормализации окрашивания на CD31, маркер эндотелиальных клеток, к окрашиванию ДНК, с использованием DAPI, авторы настоящего изобретения открыли, что антитело против NRR1 значимо повышало окрашивание на CD31 относительно других групп (фигура 14D). Это повышение было статистически значимым ($p < 0,01$), и постоянно выявлялось на множестве изображений (фигура 14E). В противоположность этому и как ожидалось, антитело против VEGF вызывало уменьшение окрашивания на CD31 (фигуры 14D и 14E). Таким образом, результаты селективного блокирования Notch1 отражают результаты, описанные для селективного блокирования Dll4, которое аналогично приводит к повышению окрашивания опухоли на CD31, а также к обеспечению плохого функционирования сосудов опухоли. Взяты вместе, эти результаты указывают на то, что противоопухолевые эффекты, оказываемые антителом против NRR1 в моделях Calu6 и HM7, главным образом, отражают нарушение ангиогенеза опухоли.

8. Ингибирование антителом как Notch1, так и Notch2, имело выраженные эффекты на часть клеток кишечника

Ингибиторы гамма-секретазы (GSI), которые представляют собой общие ингибиторы Notch, которые ингибируют множество рецепторов Notch, вызывают снижение массы тела и метаплазию бокаловидных клеток кишечника, отражая роль, которую Notch играет в определении участи клетки путем поддержания пролиферации клеток-предшественников крипт кишечника и препятствования дифференцировке в секреторные клетки. (См. van Es et al., Nature 435:959-963 (2005).) Более того, генетические исследования с использованием мышей с зависимым от условий нокаутом Notch указывают на то, что для обеспечения метаплазии бокаловидных клеток кишечника требуется нарушение

как Notch1, так и Notch2. (См. Riccio et al., EMBO Rep. 9:377-383 (2008).) Авторы настоящего изобретения использовали антитело против NRR1 и антитело против NRR2 для определения эффектов селективного ингибирования Notch1 или Notch2, или обоих из них, на снижение массы тела и дифференцировку клеток кишечника.

5 Мыши, которым вводили антитело против NRR1, имели небольшое снижение общей массы тела в ходе дозирования антител. В первом эксперименте, прямо сравнивающем антитело против NRR1 и антитело против NRR2, авторы настоящего изобретения выявили, что антитело против NRR1 приводило к 5% снижению общей массы тела, в противоположность повышению массы тела, наблюдаемому в случае антитела против
10 NRR2, а также контрольных групп антитела против gD и антитела против LT β R-Fc (фигура 15A). Во втором эксперименте селективное ингибирование Notch1 или Notch2 с использованием антитела против NRR1 или антитела против NRR2, соответственно, приводило небольшому эффекту на массу или отсутствию этого эффекта. Результаты этого эксперимента представлены на фигуре 24A, где мышам вводили 5 мг/кг антитела
15 против NRR1 (квадраты), антитела против NRR2 (треугольники) или контрольного антитела (" α -gD", ромбы) на сутки, указанные стрелками. Однако у мышей, которым вводили антитело против NRR1 и антитело против NRR2 ("X" на фигуре 24A), масса тела снижалась практически на 20% от исходной уже на 7 сутки.

Авторы настоящего изобретения исследовали то, отражает ли небольшое снижение
20 массы тела вследствие введения антитела против NRR1 отдельно или более значительное снижение массы тела вследствие введения как антитела против NRR1, так и антитела против NRR2, изменения в определении участи клеток кишечника. После дозирования мышам антитела против NRR1 или антитела против gD или DBZ в качестве контролей, срезы толстого (фигура 19) и тонкого кишечника анализировали на 2 сутки (фигура
25 20) и 7 сутки (фигура 15B) с использованием различных гистохимических красок. DBZ имел те же эффекты, которые описаны ранее для GSI (фигура 15B, столбец DBZ): ингибирование экспрессии Hes1 коррелировало со снижением пролиферации клеток-предшественников (как показано с помощью окрашивания на Ki-67) и с выраженной экспансией популяции бокаловидных клеток (как показано с помощью окрашивания
30 на муцин альциановым синим). Окрашивание на лизоцим также показало, что DBZ повышал количество и/или активность клеток Панета, популяцию вторичных секреторных клеток (фигура 15B), и это предположение было далее подтверждено с использованием окрашивания азуром А-эозином В на гранулы клеток Панета (данные не представлены). Антитело против NRR1 в концентрации 10 мг/кг индуцировало
35 изменения в кишечнике, неотличимые от изменений, индуцируемых DBZ (фигура 15 A, сравнить DBZ, 30 мкмоль/кг, с α -NRR1, 10 мг/кг). Эти изменения кишечника зависели от концентрации антитела против NRR1, так что наблюдали значительные изменения участи клеток при применении 10 мг/кг и 2,0 мг/кг но небольшие, при их наличии, заметные изменения наблюдали при применении 0,4 мг/кг. Толстый кишечник отвечал
40 на введение DBZ и антитела против NRR1 сходным образом: введение обоих из них снижало передачу сигнала Notch (фигура 19, окрашивание Hes1), блокировало пролиферацию клеток-предшественников (фигура 19, Ki-67) и повышало количество бокаловидных клеток (фигура 19, альциановый синий и H&E). Изменение участи клеток в кишечнике только слабо поддавалось детекции в ранний момент времени на 2 сутки этого исследования (фигура 20; следует отметить небольшие, но поддающиеся детекции изменения, вызываемые как DBZ, так и антителом против NRR1, наблюдаемые при
45 окрашивании на Ki-67 и альциановым синим).

Для определения того, может ли ингибирование передачи сигнала Notch2 сходным

образом влиять на определение участи клетки, авторы настоящего изобретения прямо сравнили эффекты антитела против NRR1 и антитела против NRR2 на толстый (данные не представлены) и тонкий кишечник (фигура 15C, где показано окрашивание альциановым синим и окрашивание на Ki-67, и фигура 24B, где показано окрашивание альциановым синим). В то время как антитело против NRR1 вызывало метаплазию бокаловидных клеток, которая совпадала со снижением экспрессии Ki-67 в предшественниках крипт, антитело против NRR2 не вызывало каких-либо поддающихся детекции эффектов (фигуры 15C и 24B, сравнить антитело против NRR2 с контролем против gD). Поскольку антитело против NRR1 и антитело против NRR2 функционируют в качестве сильных и специфических ингибиторов передачи сигнала Notch1 и Notch2, соответственно, как *in vivo* (фигура 11), так и *in vitro* (фигуры 9, 10 и 21), эти результаты убедительно подтверждают, что селективное ингибирование Notch1, но не Notch2, является достаточным для изменения определения участи клеток кишечника.

Также исследовали эффект ингибирования как Notch1, так и Notch2, на определение участи клеток кишечника. На фигуре 22 представлены синергичные эффекты антитела против NRR1 и антитела против NRR2 на измененную дифференцировку клеток кишечника. Самкам мышей Balb/c вводили 5 мг/кг антитела против NRR1, 5 мг/кг антитела против NRR2 или 5 мг/кг антитела против NRR1 вместе с 5 мг/кг антитела против NRR2 на 0, 4, 7 и 11 сутки. Кишечники извлекали и окрашивали H&E для установления морфологии крипт. Для мышей, которым вводили антитело против NRR1 или антитело против NRR2 отдельно, кишечники извлекали на 12 сутки; для мышей, которым вводили оба антитела вместе, кишечники извлекали на 6 сутки, поскольку у мышей в этой группе быстро снижалась масса тела. Анализ кишечников показал, что комбинация антител приводила к более тяжелому фенотипу по сравнению с фенотипом, наблюдаемым после введения антитела против NRR1 отдельно, указывая на то, что Notch1 и Notch2 функционируют совместно и отчасти чрезмерно в кишечнике млекопитающего. Дальнейшее экспериментирование подтвердило это наблюдение. Как показано на фигуре 24B, кишечники от мышей, которым вводили антитело против NRR1 и антитело против NRR2, продемонстрировали тяжелую метаплазию бокаловидных клеток. Хотя введение антитела против NRR1 отдельно было достаточным для индукции некоторой метаплазии бокаловидных клеток, эффект антитела против NRR1 отдельно был мягким относительно эффекта как антитела против NRR1, так и антитела против NRR2, в комбинации.

Взятые вместе, результаты указывают на то, что Notch1 и Notch2 функционируют чрезмерно при дифференцировке клеток кишечника, хотя существенное ингибирование Notch1, но не Notch2, является достаточным для выявления неполного фенотипа. Авторы настоящего изобретения предположили, что их способность выявить этот неполный фенотип, не описанный ранее в генетических исследованиях, отражает то, что антитело против NRR1 обеспечивает более единообразное и сильное ингибирование передачи сигнала Notch1 в клетках крипт, которое может быть достигнуто после зависящего от условий нокаута, который может быть неполным. Важно, что путем существенного снижения или устранения метаплазии бокаловидных клеток, которые являются признаками общего ингибирования Notch, специфические ингибиторы в виде антител против Notch1 и Notch2, описанные в настоящем документе, представляют собой очевидное достижение по сравнению с существующими общими ингибиторами Notch, такими как GSI.

9. Восстановление фенотипа кишечника, вызванного антителом против NRR1

На фигуре 23 показано, что дексаметазон по меньшей мере частично восстанавливает

фенотип кишечника, вызываемый антителом против NRR1. Антитела вводили внутрибрюшинно (IP) самкам мышей NCR.nude (три мыши на группу) следующим образом:

Группа А) комбинация носителей, МСТ, один раз в сутки, контрольное антитело против gD в количестве 4 мг/кг, раз в четверо суток (не показано на фигуре);

Группа В) дексаметазон, 90 мг/кг, раз в сутки (не показано на фигуре);

Группа С) антитело против NRR1, 4 мг/кг, раз в четверо суток;

Группа D) дексаметазон, 90 мг/кг, раз в сутки и антитело против NRR1, 4 мг/кг, раз в четверо суток. Носитель представлял собой 0,5% (масс./об.)

гидроксипропилметилцеллюлозу (Methocel E4M) и 0,1% (масс./об.) Tween 80 в воде (МСТ), которые, как показано ранее, не вызывают неблагоприятных клинических эффектов.

Кишечники извлекали на 9 сутки и окрашивали антителом против Ki67 (маркер пролиферации) и альциановым синим (на муцин). Этот эксперимент показал, что мыши, которым вводили комбинацию дексаметазона вместе с антителом против NRR1, проявляли более мягкий фенотип кишечника относительно мышей, которым вводили антитело против NRR1 отдельно, таким образом, указывая на то, что дексаметазон защищает кишечник от индуцируемых антителом против NRR1 изменений дифференцировки.

10. Антитело против NRR2 подавляет рост клеточных линий меланомы

Исследовали эффект антитела против NRR1 и антитела против NRR2 на рост клеточных линий меланомы. Клеточные линии меланомы человека SK23 и LOX-IMVI высевали в среду, содержащую 2% FBS при низкой плотности (4000 клеток/лунка для SK23, 2500 клеток/лунка для LOX-IMVI) в 96-луночных планшетах, на которые было нанесено покрытие без (-jag-1) или с лигандом Jagged-1 (+jag-1) (R&D Systems, Minneapolis, MN). В культуры добавляли антитело против NRR1 (20 мг/мл), антитело против NRR2 (20 мг/мл) или ингибитор гамма-секретазы (GSI) DAPT (5 мкм) и после этого повторно добавляли раз в двое суток. Равный объем DMSO служил в качестве контроля в виде носителя, в то время как равная концентрация фагового антитела против gD HuB6 служила в качестве изотипического контрольного антитела. Через шесть суток после посева проводили анализы титра клеток Glo (Promega, Madison, WI). Результаты представлены на фигурах 25А и 25В (антитело против NRR1 и антитело против NRR2 обозначены как "антитело против N1" и "антитело против N2"). На фигурах 25А и 25В, жизнеспособность клеток (ось y) выражена относительно значений для контрольных лунок с носителем DMSO, -jag-1. Обе меланомных клеточных линии продемонстрировали снижение жизнеспособности в ответ на введение GSI (особенно в присутствии лиганда Jag1) и введение антитела против NRR2, но не на введение антитела против NRR1.

11. Антитело против NRR2 подавляет рост диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы in vitro

Диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома (DLBCL) является наиболее распространенным типом неходжкинской лимфомы. Недавнее исследование злокачественных клеток от пациентов с DLBCL показало, что приблизительно 8% пациентов имеют мутацию в домене PEST Notch2, которая, как предполагают, продлевает передачу сигнала Notch2 после активации лиганда. (См. Lee et al., Cancer Sci. 100:920-926, 2009.) Однако то, как клетки DLBCL будут отвечать на ингибирование Notch2, не было известно. Таким образом, авторы исследовали эффект антитела против NRR2 на пять клеточных линий DLBCL. Линии DLBCL, приведенные справа на фигуре 26, выращивали с повторами в лунках 384-луночных планшетов в течение трех суток. Клеточные

культуры включали указанные концентрации антитела против NRR2 (обозначаемого как "антитело против Notch2" на фигурах 26 и 27), которые соответствовали трехкратным серийным разведениям, начиная с 10 мкг/мл. Рост оценивали с использованием анализов титра клеток Glo (Promega) и наносили на график как процент жизнеспособных клеток относительно введения изотипического контрольного антитела. Данные на фигуре 26 соответствуют средним величинам, полученным для отдельных лунок для каждой клеточной линии при указанных концентрациях антител. Как показано на фигуре 26, рост одной из клеточных линий, "DB", в значительной степени ингибировался при введении антитела против NRR2. На фигуре 27 показан рост клеточной линии DB с течением времени. Линию DB выращивали в ячейках 12-ячеечной чашки, и культуры обрабатывали DMSO, ингибитором гамма-секретазы DAPT, изотипическим контрольным антителом против gD или антителом против NRR2 в указанных концентрациях. Рост оценивали путем подсчета жизнеспособных клеток (Vi-CELL, Beckman Coulter, Fullerton, CA) на 2, 3 и 5 сутки после инокуляции и обработки культур. Величины соответствуют среднему значению для измерений в трех независимых культурах, плюс/минус стандартное отклонение. На фигуре 27 показано, что антитело против NRR2 подавляет рост клеточной линии DB DLBCL *in vitro*.

Хотя представленное выше изобретение описано с некоторыми деталями в качестве иллюстрации и примера для ясности понимания, описание и примеры не следует истолковывать как ограничивающие объем изобретения. Описание всей патентной и научной литературы, цитированной в настоящем документе, включено в настоящий документ в качестве ссылки в полном объеме.

Формула изобретения

1. Моноклональное антитело, которое специфически связывается с доменом Lin12/Notch Repeat (LNR)-A и доменом гетеродимеризации (HD)-C отрицательной регуляторной области (NRR) Notch2 и ингибирует передачу сигнала Notch2, где антитело связывается как с NRR Notch2 мыши, так и с NRR Notch2 человека с $K_d \leq 10$ нМ, и где антитело содержит:

(a) гипервариабельную область тяжелой цепи HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-2;

(b) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; (c) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; (d) гипервариабельную область легкой цепи HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 6-9; (e) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 11-13; и (f) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 15-18.

2. Антитело по п.1, где антитело снижает число В-клеток маргинальной зоны селезенки *in vivo*.

3. Антитело по п.2, где антитело снижает число В-клеток маргинальной зоны селезенки *in vivo* на $\geq 60\%$.

4. Антитело по п.1, где антитело снижает жизнеспособность клеток меланомы *in vitro*.

5. Антитело по п.1, где антитело подавляет рост клеток диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы *in vitro*.

6. Антитело по п.1, где антитело связывается с полипептидом, содержащим аминокислоты 1-44 и 188-256 последовательности SEQ ID NO: 28.

7. Моноклональное антитело, которое специфически связывается с доменом Lin12/

Notch Repeat (LNR)-А и доменом гетеродимеризации (HD)-С отрицательной регуляторной области (NRR) Notch2 и ингибирует передачу сигнала Notch2, где антитело связывается как с NRR Notch2 мыши, так и с NRR Notch2 человека с $K_d \leq 10$ нМ, и где антитело содержит: HVR-H1 содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1; HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6; HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11; и HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15.

8. Моноклональное антитело, которое специфически связывается с доменом Lin12/Notch Repeat (LNR)-А и доменом гетеродимеризации (HD)-С отрицательной регуляторной области (NRR) Notch2 и ингибирует передачу сигнала Notch2, где антитело связывается как с NRR Notch2 мыши, так и с NRR Notch2 человека с $K_d \leq 10$ нМ, и где антитело содержит: HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2; HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11; и HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

9. Моноклональное антитело, которое специфически связывается с доменом Lin12/Notch Repeat (LNR)-А и доменом гетеродимеризации (HD)-С отрицательной регуляторной области (NRR) Notch2 и ингибирует передачу сигнала Notch2, где антитело связывается как с NRR Notch2 мыши, так и с NRR Notch2 человека с $K_d \leq 10$ нМ, и где антитело содержит: HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2; HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12; и HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17.

10. Моноклональное антитело, которое специфически связывается с доменом Lin12/Notch Repeat (LNR)-А и доменом гетеродимеризации (HD)-С отрицательной регуляторной области (NRR) Notch2 и ингибирует передачу сигнала Notch2, где антитело связывается как с NRR Notch2 мыши, так и с NRR Notch2 человека с $K_d \leq 10$ нМ, и где антитело содержит: HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2; HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9; HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13; и HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18.

11. Антитело по п.1, содержащее каркасную область акцептора 2 переменных областей тяжелых цепей (VH) человека.

12. Антитело по п.1, содержащее консенсусную каркасную область переменных областей легких цепей (VL) каппа подгруппы I человека.

13. Моноклональное антитело, которое специфически связывается с доменом Lin12/Notch Repeat (LNR)-А и доменом гетеродимеризации (HD)-С отрицательной регуляторной области (NRR) Notch2 и ингибирует передачу сигнала Notch2, где антитело связывается как с NRR Notch2 мыши, так и с NRR Notch2 человека с $K_d \leq 10$ нМ, где антитело содержит переменный домен тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность,

выбранную из SEQ ID NO: 20-21, и вариабельный домен легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 22-25.

14. Антитело по п.13, где вариабельный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, и вариабельный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22.

15. Антитело по п.13, где антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, и вариабельный домен легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 23-25.

16. Антитело по п.15, где вариабельный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, и вариабельный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23.

17. Антитело по п.15, где вариабельный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, и вариабельный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24.

18. Антитело по п.15, где вариабельный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, и вариабельный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25.

19. Антитело по п.1, где антителом является IgG1 антитело.

20. Антитело по п. 1, где антитело представляет собой фрагмент антитела, выбранный из фрагментов Fab, Fab'-SH, Fv, scFv или (Fab')₂.

21. Антитело по п.1, где антитело представляет собой антитело человека, гуманизированное антитело или химерное антитело.

22. Антитело по п.1, где аффинность определяется с помощью анализа связывания меченного радиоактивной меткой антигена или анализа на основе иммуносорбента, связанного с ферментом.

23. Антитело по п.1, где аффинность определяется с помощью способа поверхностного плазмонного резонанса.

24. Антитело по п.1, где антитело связывается как с NRR Notch2 мыши, так и NRR Notch2 человека с Kd, равной 5 нМ.

25. Способ ингибирования передачи сигнала Notch2, включающий воздействие на клетку, которая экспрессирует Notch2, антителом по п.1.

26. Способ лечения нарушения, ассоциированного с повышенной экспрессией или передачей сигнала Notch2, включающий введение индивидууму, нуждающемуся в этом, эффективного количества антитела по п.1.

27. Способ по п.26, где нарушением, ассоциированным с повышенной экспрессией или передачей сигнала Notch2, является В-клеточная злокачественная опухоль.

28. Способ по п.26, где нарушением, ассоциированным с повышенной экспрессией или передачей сигнала Notch2, является меланома.

29. Способ по п.26, где нарушением является рак.

30. Способ по п.26, где антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи, имеющий по меньшей мере 90% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 21, и вариабельный домен легкой цепи, имеющий по меньшей мере 90% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 23-25.

31. Способ по п.30, где вариабельный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, и вариабельный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25.

32. Способ по п.26, где антитело вводят с по крайней мере одним терапевтическим средством.

33. Способ по п.32, где терапевтическим средством является химиотерапевтическое средство.

5 34. Способ по п.26, где антитело и терапевтическое средство вводят субъекту отдельно.

35. Применение антитела по любому из пп. 1-24 для получения лекарственного средства для лечения нарушения, ассоциированного с повышенной экспрессией или передачей сигнала Notch2.

10 36. Применение по п.35, где нарушением является В-клеточная злокачественная опухоль.

37. Применение по п.35, где нарушением является меланома.

38. Применение по п.35, где нарушением является рак.

15

20

25

30

35

40

45

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> GENENTECH, INC., et al.

<120> АНТИТЕЛА ПРОТИВ NOTCH2 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

<130> P4244R1 WO

<140>

<141> 2009-09-30

<150> 61/101,917

<151> 2008-10-01

<160> 75

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 10

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид HVR-H1 антитела D

<400> 1

Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Ser	Tyr	Gly	Met	Ser
1				5				10	

<210> 2

<211> 10

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид HVR-H1 антител D-1, D-2 и D-3

<400> 2

Gly	Tyr	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	Gly	Met	Ser
1				5				10	

<210> 3

<211> 10

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетическая консенсусная последовательность HVR-H1

<220>

<221> Модифицированный остаток

<222> (3) .. (3)

<223> Ser или Thr

<220>

<221> Модифицированный остаток

<222> (5) .. (5)

<223> Ser или Thr

<400> 3

Gly Tyr Xaa Phe Xaa Ser Tyr Gly Met Ser
1 5 10

<210> 4

<211> 18

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид HVR-H2
антител D-1, D-2 и D-3

<400> 4

Ser Tyr Ile Tyr Pro Tyr Ser Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 5

<211> 13

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид HVR-H3
антител D-1, D-2 и D-3

<400> 5

His Ser Gly Tyr Tyr Arg Ile Ser Ser Ala Met Asp Val
1 5 10

<210> 6

<211> 11

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид HVR-L1
антитела D

<400> 6

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 7

<211> 11

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид HVR-L1
антитела D-1

<400> 7

Arg Ala Ser Gln Ser Asn Arg Arg Phe Leu Ala

1

5

10

<210> 8

<211> 11

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид HVR-L1 антитела D-2

<400> 8

Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Phe Leu Ala

1

5

10

<210> 9

<211> 11

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид HVR-L1 антитела D-3

<400> 9

Arg Ala Ser Gln Asn Ile Lys Arg Phe Leu Ala

1

5

10

<210> 10

<211> 11

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетическая консенсусная последовательность HVR-L1

<220>

<221> Модифицированный остаток

<222> (5) .. (5)

<223> Ser или Asn

<220>

<221> Модифицированный остаток

<222> (6) .. (6)

<223> Ile, Asn или Val

<220>

<221> Модифицированный остаток

<222> (7) .. (7)

<223> Ser, Arg или Lys

<220>

<221> Модифицированный остаток

<222> (8) .. (8)

<223> Ser или Arg

<220>

<221> Модифицированный остаток

<222> (9) .. (9)

<223> Tyr или Phe

<400> 10

Arg Ala Ser Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Ala
1 5 10

<210> 11

<211> 7

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид HVR-L2
антител D и D-1

<400> 11

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Ser
1 5

<210> 12

<211> 7

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид HVR-L2
антитела D-2

<400> 12

Arg Ala Ser Ile Arg Ala Ser
1 5

<210> 13

<211> 7

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид HVR-L2
антитела D-3

<400> 13

Gly Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 14

<211> 7

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетическая консенсусная
последовательность HVR-L2

<220>

<221> Модифицированный остаток

<222> (1) .. (1)

<223> Gly или Arg

<220>
 <221> Модифицированный остаток
 <222> (4) .. (4)
 <223> Ser, Ile или Thr

<220>
 <221> Модифицированный остаток
 <222> (6) .. (6)
 <223> Ala или Glu

<400> 14
 Xaa Ala Ser Xaa Arg Xaa Ser
 1 5

<210> 15
 <211> 9
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид HVR-L3
 антитела D

<400> 15
 Gln Gln Tyr Tyr Ser Ser Pro Leu Thr
 1 5

<210> 16
 <211> 9
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид HVR-L3
 антитела D-1

<400> 16
 Gln Gln Tyr Tyr Ile Ser Pro Leu Thr
 1 5

<210> 17
 <211> 9
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид HVR-L3
 антитела D-2

<400> 17
 Gln Gln Tyr Tyr Ile Ser Pro Trp Thr
 1 5

<210> 18
 <211> 9
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид HVR-L3

антитела D-3

<400> 18

Gln Gln Tyr Tyr Arg Ser Pro His Thr
 1 5

<210> 19

<211> 9

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетическая консенсусная последовательность HVR-L3

<220>

<221> Модифицированный остаток

<222> (5)..(5)

<223> Ser, Ile или Arg

<220>

<221> Модифицированный остаток

<222> (8)..(8)

<223> Leu, Trp или His

<400> 19

Gln Gln Tyr Tyr Xaa Ser Pro Xaa Thr
 1 5

<210> 20

<211> 122

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид переменной области тяжелой цепи антитела D

<400> 20

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Tyr Ile Tyr Pro Tyr Ser Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg His Ser Gly Tyr Tyr Arg Ile Ser Ser Ala Met Asp Val Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115 120

<210> 21

<211> 122

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид
 вариабельной области тяжелой цепи антитела D-1, D-2 или D-3

<400> 21

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Tyr Ile Tyr Pro Tyr Ser Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg His Ser Gly Tyr Tyr Arg Ile Ser Ser Ala Met Asp Val Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115 120

<210> 22

<211> 108

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид
 вариабельной области легкой цепи антитела D

<400> 22

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Ser Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 23

<211> 108

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид
 переменной области легкой цепи антитела D-1

<400> 23

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Asn Arg Arg Phe
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ile Ser Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 24
 <211> 108
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид
 вариабельной области легкой цепи антитела D-2

<400> 24

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Phe
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Arg Ala Ser Ile Arg Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ile Ser Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 25
 <211> 108
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид
 вариабельной области легкой цепи антитела D-3

<400> 25

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Lys Arg Phe
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Arg Ser Pro His
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 26
<211> 288
<212> Белок
<213> Homo sapiens

<400> 26
Glu Glu Ala Cys Glu Leu Pro Glu Cys Gln Glu Asp Ala Gly Asn Lys
1 5 10 15

Val Cys Ser Leu Gln Cys Asn Asn His Ala Cys Gly Trp Asp Gly Gly
20 25 30

Asp Cys Ser Leu Asn Phe Asn Asp Pro Trp Lys Asn Cys Thr Gln Ser
35 40 45

Leu Gln Cys Trp Lys Tyr Phe Ser Asp Gly His Cys Asp Ser Gln Cys
50 55 60

Asn Ser Ala Gly Cys Leu Phe Asp Gly Phe Asp Cys Gln Arg Ala Glu
65 70 75 80

Gly Gln Cys Asn Pro Leu Tyr Asp Gln Tyr Cys Lys Asp His Phe Ser
85 90 95

Asp Gly His Cys Asp Gln Gly Cys Asn Ser Ala Glu Cys Glu Trp Asp
100 105 110

Gly Leu Asp Cys Ala Glu His Val Pro Glu Arg Leu Ala Ala Gly Thr
115 120 125

Leu Val Val Val Val Leu Met Pro Pro Glu Gln Leu Arg Asn Ser Ser
130 135 140

Phe His Phe Leu Arg Glu Leu Ser Arg Val Leu His Thr Asn Val Val
145 150 155 160

Phe Lys Arg Asp Ala His Gly Gln Gln Met Ile Phe Pro Tyr Tyr Gly
165 170 175

Arg Glu Glu Glu Leu Arg Lys His Pro Ile Lys Arg Ala Ala Glu Gly
180 185 190

Trp Ala Ala Pro Asp Ala Leu Leu Gly Gln Val Lys Ala Ser Leu Leu
 195 200 205

Pro Gly Gly Ser Glu Gly Gly Arg Arg Arg Arg Glu Leu Asp Pro Met
 210 215 220

Asp Val Arg Gly Ser Ile Val Tyr Leu Glu Ile Asp Asn Arg Gln Cys
 225 230 235 240

Val Gln Ala Ser Ser Gln Cys Phe Gln Ser Ala Thr Asp Val Ala Ala
 245 250 255

Phe Leu Gly Ala Leu Ala Ser Leu Gly Ser Leu Asn Ile Pro Tyr Lys
 260 265 270

Ile Glu Ala Val Gln Ser Glu Thr Val Glu Pro Pro Pro Pro Ala Gln
 275 280 285

<210> 27
 <211> 278
 <212> Белок
 <213> Mus sp.

<400> 27
 Glu Glu Ala Cys Glu Leu Pro Glu Cys Gln Val Asp Ala Gly Asn Lys
 1 5 10 15

Val Cys Asn Leu Gln Cys Asn Asn His Ala Cys Gly Trp Asp Gly Gly
 20 25 30

Asp Cys Ser Leu Asn Phe Asn Asp Pro Trp Lys Asn Cys Thr Gln Ser
 35 40 45

Leu Gln Cys Trp Lys Tyr Phe Ser Asp Gly His Cys Asp Ser Gln Cys
 50 55 60

Asn Ser Ala Gly Cys Leu Phe Asp Gly Phe Asp Cys Gln Leu Thr Glu
 65 70 75 80

Gly Gln Cys Asn Pro Leu Tyr Asp Gln Tyr Cys Lys Asp His Phe Ser
 85 90 95

Asp Gly His Cys Asp Gln Gly Cys Asn Ser Ala Glu Cys Glu Trp Asp
 100 105 110

Gly Leu Asp Cys Ala Glu His Val Pro Glu Arg Leu Ala Ala Gly Thr
 115 120 125

Leu Val Leu Val Val Leu Leu Pro Pro Asp Gln Leu Arg Asn Asn Ser
 130 135 140
 Phe His Phe Leu Arg Glu Leu Ser His Val Leu His Thr Asn Val Val
 145 150 155 160
 Phe Lys Arg Asp Ala Gln Gly Gln Gln Met Ile Phe Pro Tyr Tyr Gly
 165 170 175
 His Glu Glu Glu Leu Arg Lys His Pro Ile Lys Arg Ser Thr Val Gly
 180 185 190
 Trp Ala Thr Ser Ser Leu Leu Pro Gly Thr Ser Gly Gly Arg Gln Arg
 195 200 205
 Arg Glu Leu Asp Pro Met Asp Ile Arg Gly Ser Ile Val Tyr Leu Glu
 210 215 220
 Ile Asp Asn Arg Gln Cys Val Gln Ser Ser Ser Gln Cys Phe Gln Ser
 225 230 235 240
 Ala Thr Asp Val Ala Ala Phe Leu Gly Ala Leu Ala Ser Leu Gly Ser
 245 250 255
 Leu Asn Ile Pro Tyr Lys Ile Glu Ala Val Lys Ser Glu Pro Val Glu
 260 265 270
 Pro Pro Leu Pro Ser Gln
 275
 <210> 28
 <211> 256
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens
 <400> 28
 Pro Ala Thr Cys Leu Ser Gln Tyr Cys Ala Asp Lys Ala Arg Asp Gly
 1 5 10 15
 Val Cys Asp Glu Ala Cys Asn Ser His Ala Cys Gln Trp Asp Gly Gly
 20 25 30
 Asp Cys Ser Leu Thr Met Glu Asn Pro Trp Ala Asn Cys Ser Ser Pro
 35 40 45
 Leu Pro Cys Trp Asp Tyr Ile Asn Asn Gln Cys Asp Glu Leu Cys Asn
 50 55 60
 Thr Val Glu Cys Leu Phe Asp Asn Phe Glu Cys Gln Gly Asn Ser Lys
 65 70 75 80

Thr Cys Lys Tyr Asp Lys Tyr Cys Ala Asp His Phe Lys Asp Asn His
 85 90 95
 Cys Asp Gln Gly Cys Asn Ser Glu Glu Cys Gly Trp Asp Gly Leu Asp
 100 105 110
 Cys Ala Ala Asp Gln Pro Glu Asn Leu Ala Glu Gly Thr Leu Val Ile
 115 120 125
 Val Val Leu Met Pro Pro Glu Gln Leu Leu Gln Asp Ala Arg Ser Phe
 130 135 140
 Leu Arg Ala Leu Gly Thr Leu Leu His Thr Asn Leu Arg Ile Lys Arg
 145 150 155 160
 Asp Ser Gln Gly Glu Leu Met Val Tyr Pro Tyr Tyr Gly Glu Lys Ser
 165 170 175
 Ala Ala Met Lys Lys Gln Arg Met Thr Arg Arg Ser Leu Pro Gly Glu
 180 185 190
 Gln Glu Gln Glu Val Ala Gly Ser Lys Val Phe Leu Glu Ile Asp Asn
 195 200 205
 Arg Gln Cys Val Gln Asp Ser Asp His Cys Phe Lys Asn Thr Asp Ala
 210 215 220
 Ala Ala Ala Leu Leu Ala Ser His Ala Ile Gln Gly Thr Leu Ser Tyr
 225 230 235 240
 Pro Leu Val Ser Val Val Ser Glu Ser Leu Thr Pro Glu Arg Thr Gln
 245 250 255
 <210> 29
 <211> 258
 <212> Белок
 <213> Mus sp.
 <400> 29
 Pro Ala Thr Cys Gln Ser Gln Tyr Cys Ala Asp Lys Ala Arg Asp Gly
 1 5 10 15
 Ile Cys Asp Glu Ala Cys Asn Ser His Ala Cys Gln Trp Asp Gly Gly
 20 25 30
 Asp Cys Ser Leu Thr Met Glu Asp Pro Trp Ala Asn Cys Thr Ser Thr
 35 40 45

Leu Arg Cys Trp Glu Tyr Ile Asn Asn Gln Cys Asp Glu Gln Cys Asn
 50 55 60

Thr Ala Glu Cys Leu Phe Asp Asn Phe Glu Cys Gln Arg Asn Ser Lys
 65 70 75 80

Thr Cys Lys Tyr Asp Lys Tyr Cys Ala Asp His Phe Lys Asp Asn His
 85 90 95

Cys Asp Gln Gly Cys Asn Ser Glu Glu Cys Gly Trp Asp Gly Leu Asp
 100 105 110

Cys Ala Ser Asp Gln Pro Glu Asn Leu Ala Glu Gly Thr Leu Ile Ile
 115 120 125

Val Val Leu Leu Pro Pro Glu Gln Leu Leu Gln Asp Ser Arg Ser Phe
 130 135 140

Leu Arg Ala Leu Gly Thr Leu Leu His Thr Asn Leu Arg Ile Lys Gln
 145 150 155 160

Asp Ser Gln Gly Ala Leu Met Val Tyr Pro Tyr Phe Gly Glu Lys Ser
 165 170 175

Ala Ala Met Lys Lys Gln Lys Met Thr Arg Arg Ser Leu Pro Glu Glu
 180 185 190

Gln Glu Gln Glu Gln Glu Val Ile Gly Ser Lys Ile Phe Leu Glu Ile
 195 200 205

Asp Asn Arg Gln Cys Val Gln Asp Ser Asp Gln Cys Phe Lys Asn Thr
 210 215 220

Asp Ala Ala Ala Ala Leu Leu Ala Ser His Ala Ile Gln Gly Thr Leu
 225 230 235 240

Ser Tyr Pro Leu Val Ser Val Phe Ser Glu Leu Glu Ser Pro Arg Asn
 245 250 255

Ala Gln

<210> 30
 <211> 32
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 30

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 31

<211> 10

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид
каркасной области 4

<400> 31

Phe Arg Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 32

<211> 30

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 32

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30

<210> 33

<211> 14

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 33

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10

<210> 34

<211> 32

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 34

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 35
 <211> 11
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 35
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 36
 <211> 25
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 36
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
 20 25

<210> 37
 <211> 13
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 37
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 1 5 10

<210> 38
 <211> 31
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 38
 Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 20 25 30

<210> 39
 <211> 30
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 39

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 40
 <211> 30
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 40

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser
 20 25 30

<210> 41
 <211> 14
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 41

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 1 5 10

<210> 42
 <211> 32
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 42

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 43
 <211> 25
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 43
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser
 20 25

<210> 44
 <211> 13
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 44
 Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 1 5 10

<210> 45
 <211> 31
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 45
 Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 20 25 30

<210> 46
 <211> 30
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 46
 Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 47
 <211> 30
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 47
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 20 25 30

<210> 48
 <211> 14
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 48
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
 1 5 10

<210> 49
 <211> 32
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 49
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 50
 <211> 25
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 50
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 20 25

<210> 51
 <211> 13
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 51
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 1 5 10

<210> 52
 <211> 31
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 52
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 20 25 30

<210> 53
 <211> 30
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 53
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 54
 <211> 30
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 54
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys
 20 25 30

<210> 55
 <211> 32
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 55

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg
 20 25 30

<210> 56
 <211> 31
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 56

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser
 20 25 30

<210> 57
 <211> 32
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 57

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 58
 <211> 31
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 58

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
20 25 30

<210> 59

<211> 30

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 59

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 60

<211> 23

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 60

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 61

<211> 15

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 61

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 62

<211> 32

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 62

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 63
<211> 10
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 63
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 64
<211> 23
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 64
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys
20

<210> 65
<211> 15
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 65
Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 66
<211> 32
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 66
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 67
 <211> 23
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 67
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
 20

<210> 68
 <211> 15
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 68
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 69
 <211> 32
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 69
 Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 70
 <211> 23
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 70
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys
 20

<210> 71
 <211> 15
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 71
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 72
 <211> 32
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 72
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 73
 <211> 396
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид меченного антигена NRR Notch2 человека

<400> 73
 Lys Asp Asp Asp Asp Lys Gly Ser Gly Asp Val Cys Pro Gln Met Pro
 1 5 10 15

Cys Leu Asn Gly Gly Thr Cys Ala Val Ala Ser Asn Met Pro Asp Gly
 20 25 30

Phe Ile Cys Arg Cys Pro Pro Gly Phe Ser Gly Ala Arg Cys Gln Ser
 35 40 45

Ser Cys Gly Gln Val Lys Cys Arg Lys Gly Glu Gln Cys Val His Thr
 50 55 60

Ala Ser Gly Pro Arg Cys Phe Cys Pro Ser Pro Arg Asp Cys Glu Ser
 65 70 75 80

Gly Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln His Gly Gly Ser Cys His Pro Gln
 85 90 95

Arg	Gln	Pro	Pro	Tyr	Tyr	Ser	Cys	Gln	Cys	Ala	Pro	Pro	Phe	Ser	Gly			
			100					105					110					
Ser	Arg	Cys	Glu	Leu	Tyr	Thr	Ala	Pro	Pro	Ser	Thr	Pro	Pro	Ala	Thr			
		115					120					125						
Cys	Leu	Ser	Gln	Tyr	Cys	Ala	Asp	Lys	Ala	Arg	Asp	Gly	Val	Cys	Asp			
	130					135					140							
Glu	Ala	Cys	Asn	Ser	His	Ala	Cys	Gln	Trp	Asp	Gly	Gly	Asp	Cys	Ser			
145					150					155					160			
Leu	Thr	Met	Glu	Asn	Pro	Trp	Ala	Asn	Cys	Ser	Ser	Pro	Leu	Pro	Cys			
				165					170					175				
Trp	Asp	Tyr	Ile	Asn	Asn	Gln	Cys	Asp	Glu	Leu	Cys	Asn	Thr	Val	Glu			
			180					185					190					
Cys	Leu	Phe	Asp	Asn	Phe	Glu	Cys	Gln	Gly	Asn	Ser	Lys	Thr	Cys	Lys			
		195					200					205						
Tyr	Asp	Lys	Tyr	Cys	Ala	Asp	His	Phe	Lys	Asp	Asn	His	Cys	Asn	Gln			
	210					215					220							
Gly	Cys	Asn	Ser	Glu	Glu	Cys	Gly	Trp	Asp	Gly	Leu	Asp	Cys	Ala	Ala			
225					230					235					240			
Asp	Gln	Pro	Glu	Asn	Leu	Ala	Glu	Gly	Thr	Leu	Val	Ile	Val	Val	Leu			
				245					250					255				
Met	Pro	Pro	Glu	Gln	Leu	Leu	Gln	Asp	Ala	Arg	Ser	Phe	Leu	Arg	Ala			
			260					265					270					
Leu	Gly	Thr	Leu	Leu	His	Thr	Asn	Leu	Arg	Ile	Lys	Arg	Asp	Ser	Gln			
		275					280					285						
Gly	Glu	Leu	Met	Val	Tyr	Pro	Tyr	Tyr	Gly	Glu	Lys	Ser	Ala	Ala	Met			
	290					295					300							
Lys	Lys	Gln	Arg	Met	Thr	Arg	Arg	Ser	Leu	Pro	Gly	Glu	Gln	Glu	Gln			
305					310					315					320			
Glu	Val	Ala	Gly	Ser	Lys	Val	Phe	Leu	Glu	Ile	Asp	Asn	Arg	Gln	Cys			
				325					330					335				
Val	Gln	Asp	Ser	Asp	His	Cys	Phe	Lys	Asn	Thr	Asp	Ala	Ala	Ala	Ala			
			340					345					350					

Leu Leu Ala Ser His Ala Ile Gln Gly Thr Leu Ser Tyr Pro Leu Val
355 360 365

Ser Val Val Ser Glu Ser Leu Thr Pro Glu Arg Thr Glu Phe Gly Leu
370 375 380

Val Pro Arg Gly Ser Gly His His His His His His
385 390 395

<210> 74

<211> 394

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид меченного антигена NRR Notch2 мыши

<400> 74

Ala Asp Val Cys Pro Gln Lys Pro Cys Leu Asn Gly Gly Thr Cys Ala
1 5 10 15

Val Ala Ser Asn Met Pro Asp Gly Phe Ile Cys Arg Cys Pro Pro Gly
20 25 30

Phe Ser Gly Ala Arg Cys Gln Ser Ser Cys Gly Gln Val Lys Cys Arg
35 40 45

Arg Gly Glu Gln Cys Ile His Thr Asp Ser Gly Pro Arg Cys Phe Cys
50 55 60

Leu Asn Pro Lys Asp Cys Glu Ser Gly Cys Ala Ser Asn Pro Cys Gln
65 70 75 80

His Gly Gly Thr Cys Tyr Pro Gln Arg Gln Pro Pro His Tyr Ser Cys
85 90 95

Arg Cys Pro Pro Ser Phe Gly Gly Ser His Cys Glu Leu Tyr Thr Ala
100 105 110

Pro Thr Ser Thr Pro Pro Ala Thr Cys Gln Ser Gln Tyr Cys Ala Asp
115 120 125

Lys Ala Arg Asp Gly Ile Cys Asp Glu Ala Cys Asn Ser His Ala Cys
130 135 140

Gln Trp Asp Gly Gly Asp Cys Ser Leu Thr Met Glu Asp Pro Trp Ala
145 150 155 160

Asn Cys Thr Ser Thr Leu Arg Cys Trp Glu Tyr Ile Asn Asn Gln Cys
165 170 175

Asp Glu Gln Cys Asn Thr Ala Glu Cys Leu Phe Asp Asn Phe Glu Cys
180 185 190

Gln Arg Asn Ser Lys Thr Cys Lys Tyr Asp Lys Tyr Cys Ala Asp His
195 200 205

Phe Lys Asp Asn His Cys Asp Gln Gly Cys Asn Ser Glu Glu Cys Gly
210 215 220

Trp Asp Gly Leu Asp Cys Ala Ser Asp Gln Pro Glu Asn Leu Ala Glu
225 230 235 240

Gly Thr Leu Ile Ile Val Val Leu Leu Pro Pro Glu Gln Leu Leu Gln
245 250 255

Asp Ser Arg Ser Phe Leu Arg Ala Leu Gly Thr Leu Leu His Thr Asn
260 265 270

Leu Arg Ile Lys Gln Asp Ser Gln Gly Ala Leu Met Val Tyr Pro Tyr
275 280 285

Phe Gly Glu Lys Ser Ala Ala Met Lys Lys Gln Lys Met Thr Arg Arg
290 295 300

Ser Leu Pro Glu Glu Gln Glu Gln Glu Gln Glu Val Ile Gly Ser Lys
305 310 315 320

Ile Phe Leu Glu Ile Asp Asn Arg Gln Cys Val Gln Asp Ser Asp Gln
325 330 335

Cys Phe Lys Asn Thr Asp Ala Ala Ala Ala Leu Leu Ala Ser His Ala
340 345 350

Ile Gln Gly Thr Leu Ser Tyr Pro Leu Val Ser Val Phe Ser Glu Leu
355 360 365

Glu Ser Pro Arg Asn Ala Arg Arg Ala Gly Ser Gly Asp Tyr Lys Asp
370 375 380

Asp Asp Asp Lys Glu Asn Leu Tyr Phe Gln
385 390

<210> 75
<211> 2471
<212> Белок
<213> Homo sapiens

<400> 75

Met Pro Ala Leu Arg Pro Ala Leu Leu Trp Ala Leu Leu Ala Leu Trp
 1 5 10 15

Leu Cys Cys Ala Ala Pro Ala His Ala Leu Gln Cys Arg Asp Gly Tyr
 20 25 30

Glu Pro Cys Val Asn Glu Gly Met Cys Val Thr Tyr His Asn Gly Thr
 35 40 45

Gly Tyr Cys Lys Cys Pro Glu Gly Phe Leu Gly Glu Tyr Cys Gln His
 50 55 60

Arg Asp Pro Cys Glu Lys Asn Arg Cys Gln Asn Gly Gly Thr Cys Val
 65 70 75 80

Ala Gln Ala Met Leu Gly Lys Ala Thr Cys Arg Cys Ala Ser Gly Phe
 85 90 95

Thr Gly Glu Asp Cys Gln Tyr Ser Thr Ser His Pro Cys Phe Val Ser
 100 105 110

Arg Pro Cys Leu Asn Gly Gly Thr Cys His Met Leu Ser Arg Asp Thr
 115 120 125

Tyr Glu Cys Thr Cys Gln Val Gly Phe Thr Gly Lys Glu Cys Gln Trp
 130 135 140

Thr Asp Ala Cys Leu Ser His Pro Cys Ala Asn Gly Ser Thr Cys Thr
 145 150 155 160

Thr Val Ala Asn Gln Phe Ser Cys Lys Cys Leu Thr Gly Phe Thr Gly
 165 170 175

Gln Lys Cys Glu Thr Asp Val Asn Glu Cys Asp Ile Pro Gly His Cys
 180 185 190

Gln His Gly Gly Thr Cys Leu Asn Leu Pro Gly Ser Tyr Gln Cys Gln
 195 200 205

Cys Pro Gln Gly Phe Thr Gly Gln Tyr Cys Asp Ser Leu Tyr Val Pro
 210 215 220

Cys Ala Pro Ser Pro Cys Val Asn Gly Gly Thr Cys Arg Gln Thr Gly
 225 230 235 240

Asp Phe Thr Phe Glu Cys Asn Cys Leu Pro Gly Phe Glu Gly Ser Thr
 245 250 255

Cys Glu Arg Asn Ile Asp Asp Cys Pro Asn His Arg Cys Gln Asn Gly
 260 265 270

Gly Val Cys Val Asp Gly Val Asn Thr Tyr Asn Cys Arg Cys Pro Pro
 275 280 285

Gln Trp Thr Gly Gln Phe Cys Thr Glu Asp Val Asp Glu Cys Leu Leu
 290 295 300

Gln Pro Asn Ala Cys Gln Asn Gly Gly Thr Cys Ala Asn Arg Asn Gly
 305 310 315 320

Gly Tyr Gly Cys Val Cys Val Asn Gly Trp Ser Gly Asp Asp Cys Ser
 325 330 335

Glu Asn Ile Asp Asp Cys Ala Phe Ala Ser Cys Thr Pro Gly Ser Thr
 340 345 350

Cys Ile Asp Arg Val Ala Ser Phe Ser Cys Met Cys Pro Glu Gly Lys
 355 360 365

Ala Gly Leu Leu Cys His Leu Asp Asp Ala Cys Ile Ser Asn Pro Cys
 370 375 380

His Lys Gly Ala Leu Cys Asp Thr Asn Pro Leu Asn Gly Gln Tyr Ile
 385 390 395 400

Cys Thr Cys Pro Gln Gly Tyr Lys Gly Ala Asp Cys Thr Glu Asp Val
 405 410 415

Asp Glu Cys Ala Met Ala Asn Ser Asn Pro Cys Glu His Ala Gly Lys
 420 425 430

Cys Val Asn Thr Asp Gly Ala Phe His Cys Glu Cys Leu Lys Gly Tyr
 435 440 445

Ala Gly Pro Arg Cys Glu Met Asp Ile Asn Glu Cys His Ser Asp Pro
 450 455 460

Cys Gln Asn Asp Ala Thr Cys Leu Asp Lys Ile Gly Gly Phe Thr Cys
 465 470 475 480

Leu Cys Met Pro Gly Phe Lys Gly Val His Cys Glu Leu Glu Ile Asn
 485 490 495

Glu Cys Gln Ser Asn Pro Cys Val Asn Asn Gly Gln Cys Val Asp Lys
 500 505 510

Val Asn Arg Phe Gln Cys Leu Cys Pro Pro Gly Phe Thr Gly Pro Val
 515 520 525

Cys Gln Ile Asp Ile Asp Asp Cys Ser Ser Thr Pro Cys Leu Asn Gly
 530 535 540

Ala Lys Cys Ile Asp His Pro Asn Gly Tyr Glu Cys Gln Cys Ala Thr
 545 550 555 560

Gly Phe Thr Gly Val Leu Cys Glu Glu Asn Ile Asp Asn Cys Asp Pro
 565 570 575

Asp Pro Cys His His Gly Gln Cys Gln Asp Gly Ile Asp Ser Tyr Thr
 580 585 590

Cys Ile Cys Asn Pro Gly Tyr Met Gly Ala Ile Cys Ser Asp Gln Ile
 595 600 605

Asp Glu Cys Tyr Ser Ser Pro Cys Leu Asn Asp Gly Arg Cys Ile Asp
 610 615 620

Leu Val Asn Gly Tyr Gln Cys Asn Cys Gln Pro Gly Thr Ser Gly Val
 625 630 635 640

Asn Cys Glu Ile Asn Phe Asp Asp Cys Ala Ser Asn Pro Cys Ile His
 645 650 655

Gly Ile Cys Met Asp Gly Ile Asn Arg Tyr Ser Cys Val Cys Ser Pro
 660 665 670

Gly Phe Thr Gly Gln Arg Cys Asn Ile Asp Ile Asp Glu Cys Ala Ser
 675 680 685

Asn Pro Cys Arg Lys Gly Ala Thr Cys Ile Asn Gly Val Asn Gly Phe
 690 695 700

Arg Cys Ile Cys Pro Glu Gly Pro His His Pro Ser Cys Tyr Ser Gln
 705 710 715 720

Val Asn Glu Cys Leu Ser Asn Pro Cys Ile His Gly Asn Cys Thr Gly
 725 730 735

Gly Leu Ser Gly Tyr Lys Cys Leu Cys Asp Ala Gly Trp Val Gly Ile
 740 745 750

Asn Cys Glu Val Asp Lys Asn Glu Cys Leu Ser Asn Pro Cys Gln Asn
 755 760 765

Gly Gly Thr Cys Asp Asn Leu Val Asn Gly Tyr Arg Cys Thr Cys Lys
 770 775 780

Lys Gly Phe Lys Gly Tyr Asn Cys Gln Val Asn Ile Asp Glu Cys Ala
 785 790 795 800

Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gln Gly Thr Cys Phe Asp Asp Ile Ser Gly
 805 810 815

Tyr Thr Cys His Cys Val Leu Pro Tyr Thr Gly Lys Asn Cys Gln Thr
 820 825 830

Val Leu Ala Pro Cys Ser Pro Asn Pro Cys Glu Asn Ala Ala Val Cys
 835 840 845

Lys Glu Ser Pro Asn Phe Glu Ser Tyr Thr Cys Leu Cys Ala Pro Gly
 850 855 860

Trp Gln Gly Gln Arg Cys Thr Ile Asp Ile Asp Glu Cys Ile Ser Lys
 865 870 875 880

Pro Cys Met Asn His Gly Leu Cys His Asn Thr Gln Gly Ser Tyr Met
 885 890 895

Cys Glu Cys Pro Pro Gly Phe Ser Gly Met Asp Cys Glu Glu Asp Ile
 900 905 910

Asp Asp Cys Leu Ala Asn Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Met Asp
 915 920 925

Gly Val Asn Thr Phe Ser Cys Leu Cys Leu Pro Gly Phe Thr Gly Asp
 930 935 940

Lys Cys Gln Thr Asp Met Asn Glu Cys Leu Ser Glu Pro Cys Lys Asn
 945 950 955 960

Gly Gly Thr Cys Ser Asp Tyr Val Asn Ser Tyr Thr Cys Lys Cys Gln
 965 970 975

Ala Gly Phe Asp Gly Val His Cys Glu Asn Asn Ile Asn Glu Cys Thr
 980 985 990

Glu Ser Ser Cys Phe Asn Gly Gly Thr Cys Val Asp Gly Ile Asn Ser
 995 1000 1005

Phe Ser Cys Leu Cys Pro Val Gly Phe Thr Gly Ser Phe Cys Leu
 1010 1015 1020

His	Glu	Ile	Asn	Glu	Cys	Ser	Ser	His	Pro	Cys	Leu	Asn	Glu	Gly
1025						1030					1035			
Thr	Cys	Val	Asp	Gly	Leu	Gly	Thr	Tyr	Arg	Cys	Ser	Cys	Pro	Leu
1040						1045					1050			
Gly	Tyr	Thr	Gly	Lys	Asn	Cys	Gln	Thr	Leu	Val	Asn	Leu	Cys	Ser
1055						1060					1065			
Arg	Ser	Pro	Cys	Lys	Asn	Lys	Gly	Thr	Cys	Val	Gln	Lys	Lys	Ala
1070						1075					1080			
Glu	Ser	Gln	Cys	Leu	Cys	Pro	Ser	Gly	Trp	Ala	Gly	Ala	Tyr	Cys
1085						1090					1095			
Asp	Val	Pro	Asn	Val	Ser	Cys	Asp	Ile	Ala	Ala	Ser	Arg	Arg	Gly
1100						1105					1110			
Val	Leu	Val	Glu	His	Leu	Cys	Gln	His	Ser	Gly	Val	Cys	Ile	Asn
1115						1120					1125			
Ala	Gly	Asn	Thr	His	Tyr	Cys	Gln	Cys	Pro	Leu	Gly	Tyr	Thr	Gly
1130						1135					1140			
Ser	Tyr	Cys	Glu	Glu	Gln	Leu	Asp	Glu	Cys	Ala	Ser	Asn	Pro	Cys
1145						1150					1155			
Gln	His	Gly	Ala	Thr	Cys	Ser	Asp	Phe	Ile	Gly	Gly	Tyr	Arg	Cys
1160						1165					1170			
Glu	Cys	Val	Pro	Gly	Tyr	Gln	Gly	Val	Asn	Cys	Glu	Tyr	Glu	Val
1175						1180					1185			
Asp	Glu	Cys	Gln	Asn	Gln	Pro	Cys	Gln	Asn	Gly	Gly	Thr	Cys	Ile
1190						1195					1200			
Asp	Leu	Val	Asn	His	Phe	Lys	Cys	Ser	Cys	Pro	Pro	Gly	Thr	Arg
1205						1210					1215			
Gly	Leu	Leu	Cys	Glu	Glu	Asn	Ile	Asp	Asp	Cys	Ala	Arg	Gly	Pro
1220						1225					1230			
His	Cys	Leu	Asn	Gly	Gly	Gln	Cys	Met	Asp	Arg	Ile	Gly	Gly	Tyr
1235						1240					1245			
Ser	Cys	Arg	Cys	Leu	Pro	Gly	Phe	Ala	Gly	Glu	Arg	Cys	Glu	Gly
1250						1255					1260			

Asp	Ile	Asn	Glu	Cys	Leu	Ser	Asn	Pro	Cys	Ser	Ser	Glu	Gly	Ser
1265						1270					1275			
Leu	Asp	Cys	Ile	Gln	Leu	Thr	Asn	Asp	Tyr	Leu	Cys	Val	Cys	Arg
1280						1285					1290			
Ser	Ala	Phe	Thr	Gly	Arg	His	Cys	Glu	Thr	Phe	Val	Asp	Val	Cys
1295						1300					1305			
Pro	Gln	Met	Pro	Cys	Leu	Asn	Gly	Gly	Thr	Cys	Ala	Val	Ala	Ser
1310						1315					1320			
Asn	Met	Pro	Asp	Gly	Phe	Ile	Cys	Arg	Cys	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser
1325						1330					1335			
Gly	Ala	Arg	Cys	Gln	Ser	Ser	Cys	Gly	Gln	Val	Lys	Cys	Arg	Lys
1340						1345					1350			
Gly	Glu	Gln	Cys	Val	His	Thr	Ala	Ser	Gly	Pro	Arg	Cys	Phe	Cys
1355						1360					1365			
Pro	Ser	Pro	Arg	Asp	Cys	Glu	Ser	Gly	Cys	Ala	Ser	Ser	Pro	Cys
1370						1375					1380			
Gln	His	Gly	Gly	Ser	Cys	His	Pro	Gln	Arg	Gln	Pro	Pro	Tyr	Tyr
1385						1390					1395			
Ser	Cys	Gln	Cys	Ala	Pro	Pro	Phe	Ser	Gly	Ser	Arg	Cys	Glu	Leu
1400						1405					1410			
Tyr	Thr	Ala	Pro	Pro	Ser	Thr	Pro	Pro	Ala	Thr	Cys	Leu	Ser	Gln
1415						1420					1425			
Tyr	Cys	Ala	Asp	Lys	Ala	Arg	Asp	Gly	Val	Cys	Asp	Glu	Ala	Cys
1430						1435					1440			
Asn	Ser	His	Ala	Cys	Gln	Trp	Asp	Gly	Gly	Asp	Cys	Ser	Leu	Thr
1445						1450					1455			
Met	Glu	Asn	Pro	Trp	Ala	Asn	Cys	Ser	Ser	Pro	Leu	Pro	Cys	Trp
1460						1465					1470			
Asp	Tyr	Ile	Asn	Asn	Gln	Cys	Asp	Glu	Leu	Cys	Asn	Thr	Val	Glu
1475						1480					1485			
Cys	Leu	Phe	Asp	Asn	Phe	Glu	Cys	Gln	Gly	Asn	Ser	Lys	Thr	Cys
1490						1495					1500			

Lys	Tyr	Asp	Lys	Tyr	Cys	Ala	Asp	His	Phe	Lys	Asp	Asn	His	Cys
1505						1510					1515			
Asp	Gln	Gly	Cys	Asn	Ser	Glu	Glu	Cys	Gly	Trp	Asp	Gly	Leu	Asp
1520						1525					1530			
Cys	Ala	Ala	Asp	Gln	Pro	Glu	Asn	Leu	Ala	Glu	Gly	Thr	Leu	Val
1535						1540					1545			
Ile	Val	Val	Leu	Met	Pro	Pro	Glu	Gln	Leu	Leu	Gln	Asp	Ala	Arg
1550						1555					1560			
Ser	Phe	Leu	Arg	Ala	Leu	Gly	Thr	Leu	Leu	His	Thr	Asn	Leu	Arg
1565						1570					1575			
Ile	Lys	Arg	Asp	Ser	Gln	Gly	Glu	Leu	Met	Val	Tyr	Pro	Tyr	Tyr
1580						1585					1590			
Gly	Glu	Lys	Ser	Ala	Ala	Met	Lys	Lys	Gln	Arg	Met	Thr	Arg	Arg
1595						1600					1605			
Ser	Leu	Pro	Gly	Glu	Gln	Glu	Gln	Glu	Val	Ala	Gly	Ser	Lys	Val
1610						1615					1620			
Phe	Leu	Glu	Ile	Asp	Asn	Arg	Gln	Cys	Val	Gln	Asp	Ser	Asp	His
1625						1630					1635			
Cys	Phe	Lys	Asn	Thr	Asp	Ala	Ala	Ala	Ala	Leu	Leu	Ala	Ser	His
1640						1645					1650			
Ala	Ile	Gln	Gly	Thr	Leu	Ser	Tyr	Pro	Leu	Val	Ser	Val	Val	Ser
1655						1660					1665			
Glu	Ser	Leu	Thr	Pro	Glu	Arg	Thr	Gln	Leu	Leu	Tyr	Leu	Leu	Ala
1670						1675					1680			
Val	Ala	Val	Val	Ile	Ile	Leu	Phe	Ile	Ile	Leu	Leu	Gly	Val	Ile
1685						1690					1695			
Met	Ala	Lys	Arg	Lys	Arg	Lys	His	Gly	Ser	Leu	Trp	Leu	Pro	Glu
1700						1705					1710			
Gly	Phe	Thr	Leu	Arg	Arg	Asp	Ala	Ser	Asn	His	Lys	Arg	Arg	Glu
1715						1720					1725			
Pro	Val	Gly	Gln	Asp	Ala	Val	Gly	Leu	Lys	Asn	Leu	Ser	Val	Gln
1730						1735					1740			

Val	Ser	Glu	Ala	Asn	Leu	Ile	Gly	Thr	Gly	Thr	Ser	Glu	His	Trp
1745						1750					1755			
Val	Asp	Asp	Glu	Gly	Pro	Gln	Pro	Lys	Lys	Val	Lys	Ala	Glu	Asp
1760						1765					1770			
Glu	Ala	Leu	Leu	Ser	Glu	Glu	Asp	Asp	Pro	Ile	Asp	Arg	Arg	Pro
1775						1780					1785			
Trp	Thr	Gln	Gln	His	Leu	Glu	Ala	Ala	Asp	Ile	Arg	Arg	Thr	Pro
1790						1795					1800			
Ser	Leu	Ala	Leu	Thr	Pro	Pro	Gln	Ala	Glu	Gln	Glu	Val	Asp	Val
1805						1810					1815			
Leu	Asp	Val	Asn	Val	Arg	Gly	Pro	Asp	Gly	Cys	Thr	Pro	Leu	Met
1820						1825					1830			
Leu	Ala	Ser	Leu	Arg	Gly	Gly	Ser	Ser	Asp	Leu	Ser	Asp	Glu	Asp
1835						1840					1845			
Glu	Asp	Ala	Glu	Asp	Ser	Ser	Ala	Asn	Ile	Ile	Thr	Asp	Leu	Val
1850						1855					1860			
Tyr	Gln	Gly	Ala	Ser	Leu	Gln	Ala	Gln	Thr	Asp	Arg	Thr	Gly	Glu
1865						1870					1875			
Met	Ala	Leu	His	Leu	Ala	Ala	Arg	Tyr	Ser	Arg	Ala	Asp	Ala	Ala
1880						1885					1890			
Lys	Arg	Leu	Leu	Asp	Ala	Gly	Ala	Asp	Ala	Asn	Ala	Gln	Asp	Asn
1895						1900					1905			
Met	Gly	Arg	Cys	Pro	Leu	His	Ala	Ala	Val	Ala	Ala	Asp	Ala	Gln
1910						1915					1920			
Gly	Val	Phe	Gln	Ile	Leu	Ile	Arg	Asn	Arg	Val	Thr	Asp	Leu	Asp
1925						1930					1935			
Ala	Arg	Met	Asn	Asp	Gly	Thr	Thr	Pro	Leu	Ile	Leu	Ala	Ala	Arg
1940						1945					1950			
Leu	Ala	Val	Glu	Gly	Met	Val	Ala	Glu	Leu	Ile	Asn	Cys	Gln	Ala
1955						1960					1965			
Asp	Val	Asn	Ala	Val	Asp	Asp	His	Gly	Lys	Ser	Ala	Leu	His	Trp
1970						1975					1980			

Ala	Ala	Ala	Val	Asn	Asn	Val	Glu	Ala	Thr	Leu	Leu	Leu	Leu	Lys
1985						1990					1995			
Asn	Gly	Ala	Asn	Arg	Asp	Met	Gln	Asp	Asn	Lys	Glu	Glu	Thr	Pro
2000						2005					2010			
Leu	Phe	Leu	Ala	Ala	Arg	Glu	Gly	Ser	Tyr	Glu	Ala	Ala	Lys	Ile
2015						2020					2025			
Leu	Leu	Asp	His	Phe	Ala	Asn	Arg	Asp	Ile	Thr	Asp	His	Met	Asp
2030						2035					2040			
Arg	Leu	Pro	Arg	Asp	Val	Ala	Arg	Asp	Arg	Met	His	His	Asp	Ile
2045						2050					2055			
Val	Arg	Leu	Leu	Asp	Glu	Tyr	Asn	Val	Thr	Pro	Ser	Pro	Pro	Gly
2060						2065					2070			
Thr	Val	Leu	Thr	Ser	Ala	Leu	Ser	Pro	Val	Ile	Cys	Gly	Pro	Asn
2075						2080					2085			
Arg	Ser	Phe	Leu	Ser	Leu	Lys	His	Thr	Pro	Met	Gly	Lys	Lys	Ser
2090						2095					2100			
Arg	Arg	Pro	Ser	Ala	Lys	Ser	Thr	Met	Pro	Thr	Ser	Leu	Pro	Asn
2105						2110					2115			
Leu	Ala	Lys	Glu	Ala	Lys	Asp	Ala	Lys	Gly	Ser	Arg	Arg	Lys	Lys
2120						2125					2130			
Ser	Leu	Ser	Glu	Lys	Val	Gln	Leu	Ser	Glu	Ser	Ser	Val	Thr	Leu
2135						2140					2145			
Ser	Pro	Val	Asp	Ser	Leu	Glu	Ser	Pro	His	Thr	Tyr	Val	Ser	Asp
2150						2155					2160			
Thr	Thr	Ser	Ser	Pro	Met	Ile	Thr	Ser	Pro	Gly	Ile	Leu	Gln	Ala
2165						2170					2175			
Ser	Pro	Asn	Pro	Met	Leu	Ala	Thr	Ala	Ala	Pro	Pro	Ala	Pro	Val
2180						2185					2190			
His	Ala	Gln	His	Ala	Leu	Ser	Phe	Ser	Asn	Leu	His	Glu	Met	Gln
2195						2200					2205			
Pro	Leu	Ala	His	Gly	Ala	Ser	Thr	Val	Leu	Pro	Ser	Val	Ser	Gln
2210						2215					2220			

RU 2580 029 C2

Leu	Leu	Ser	His	His	His	Ile	Val	Ser	Pro	Gly	Ser	Gly	Ser	Ala
2225						2230					2235			
Gly	Ser	Leu	Ser	Arg	Leu	His	Pro	Val	Pro	Val	Pro	Ala	Asp	Trp
2240						2245					2250			
Met	Asn	Arg	Met	Glu	Val	Asn	Glu	Thr	Gln	Tyr	Asn	Glu	Met	Phe
2255						2260					2265			
Gly	Met	Val	Leu	Ala	Pro	Ala	Glu	Gly	Thr	His	Pro	Gly	Ile	Ala
2270						2275					2280			
Pro	Gln	Ser	Arg	Pro	Pro	Glu	Gly	Lys	His	Ile	Thr	Thr	Pro	Arg
2285						2290					2295			
Glu	Pro	Leu	Pro	Pro	Ile	Val	Thr	Phe	Gln	Leu	Ile	Pro	Lys	Gly
2300						2305					2310			
Ser	Ile	Ala	Gln	Pro	Ala	Gly	Ala	Pro	Gln	Pro	Gln	Ser	Thr	Cys
2315						2320					2325			
Pro	Pro	Ala	Val	Ala	Gly	Pro	Leu	Pro	Thr	Met	Tyr	Gln	Ile	Pro
2330						2335					2340			
Glu	Met	Ala	Arg	Leu	Pro	Ser	Val	Ala	Phe	Pro	Thr	Ala	Met	Met
2345						2350					2355			
Pro	Gln	Gln	Asp	Gly	Gln	Val	Ala	Gln	Thr	Ile	Leu	Pro	Ala	Tyr
2360						2365					2370			
His	Pro	Phe	Pro	Ala	Ser	Val	Gly	Lys	Tyr	Pro	Thr	Pro	Pro	Ser
2375						2380					2385			
Gln	His	Ser	Tyr	Ala	Ser	Ser	Asn	Ala	Ala	Glu	Arg	Thr	Pro	Ser
2390						2395					2400			
His	Ser	Gly	His	Leu	Gln	Gly	Glu	His	Pro	Tyr	Leu	Thr	Pro	Ser
2405						2410					2415			
Pro	Glu	Ser	Pro	Asp	Gln	Trp	Ser	Ser	Ser	Ser	Pro	His	Ser	Ala
2420						2425					2430			
Ser	Asp	Trp	Ser	Asp	Val	Thr	Thr	Ser	Pro	Thr	Pro	Gly	Gly	Ala
2435						2440					2445			
Gly	Gly	Gly	Gln	Arg	Gly	Pro	Gly	Thr	His	Met	Ser	Glu	Pro	Pro
2450						2455					2460			
His	Asn	Asn	Met	Gln	Val	Tyr	Ala							
2465						2470								

Последовательности HVR-H1 - Антитело D и подвергнутые созреванию аффинности антитела, происходящие из антитела D

		Номер по Kabat									
№ антитела	SEQ ID NO:	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
D	1	G	Y	S	F	T	S	Y	G	M	S
D-1, D-2, D-3	2	G	Y	T	F	S	S	Y	G	M	S
Консенсусная последовательность	3	G	Y	S/T	F	S/T	S	Y	G	M	S

Последовательность HVR-H2 - Антитело D и подвергнутые созреванию аффинности антитела, происходящие из антитела D

		Номер по Kabat																	
№ антитела	SEQ ID NO:	49	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
D, D-1, D-2, D-3	4	S	Y	I	Y	P	Y	S	G	A	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G

Последовательность HVR-H3 - Антитело D и подвергнутые созреванию аффинности антитела, происходящие из антитела D

		Номер по Kabat												
№ антитела	SEQ ID NO:	95	96	97	98	99	100	100A	100B	100C	100D	100K	101	102
D, D-1, D-2, D-3	5	H	S	G	Y	Y	R	I	S	S	A	M	D	V

Фиг. 1

Последовательности HVR-L1 - Антитело D и подвергнутые созреванию аффинности антитела, происходящие из антитела D

		Номер по Kabat											
№ антитела	SEQ ID NO:	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	
D	6	R	A	S	Q	S	I	S	S	Y	L	A	
D-1	7	R	A	S	Q	S	N	R	R	F	L	A	
D-2	8	R	A	S	Q	S	V	R	S	F	L	A	
D-3	9	R	A	S	Q	N	I	K	R	F	L	A	
Консенсусная последовательность	10	R	A	S	Q	S/N	I/N/V	S/R/K	S/R	Y/F	L	A	

Последовательности HVR-L2 - Антитело D и подвергнутые созреванию аффинности антитела, происходящие из антитела D

№ антитела	SEQ ID NO:	Номер по Kabat						
		50	51	52	53	54	55	56
D, D-1	11	G	A	S	S	R	A	S
D-2	12	R	A	S	I	R	A	S
D-3	13	G	A	S	T	R	E	S
Консенсусная последовательность	14	G/R	A	S	S/I/T	R	A/E	S

Последовательности HVR-L3 - Антитело D и подвергнутые созреванию аффинности антитела, происходящие из антитела D

		Номер по Kabat									
№ клона	SEQ ID NO:	89	90	91	92	93	94	95	96	97	
D	15	Q	Q	Y	Y	S	S	P	L	T	
D-1	16	Q	Q	Y	Y	I	S	P	L	T	
D-2	17	Q	Q	Y	Y	I	S	P	W	T	
D-3	18	Q	Q	Y	Y	R	S	P	H	T	
Консенсусная последовательность	19	Q	Q	Y	Y	S/I/R	S	P	L/W/H	T	

Фиг. 2

№ по Kabat	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	35A	35B	36	37	38	39	40	41	42	43								
Антитело D	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	<div></div>										W	V	R	Q	A	P	G	K										
Антитело D-1	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S											G	Y	T	F	S	S	Y	G	M	S	W	V	R	Q	A	P	G	K
Антитело D-2	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S											G	Y	T	F	S	S	Y	G	M	S	W	V	R	Q	A	P	G	K
Антитело D-3	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S											G	Y	T	F	S	S	Y	G	M	S	W	V	R	Q	A	P	G	K

№ по Kabat	44	45	46	47	48	49	50	51	52	A	B	C	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	A
Антитело D	G	L	E	N	V	S	Y	I	Y	P			Y	S	G	A	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	L	Q	M	N
Антитело D-1	G	L	E	N	V	S	Y	I	Y	P			Y	S	G	A	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	L	Q	M	N
Антитело D-2	G	L	E	N	V	S	Y	I	Y	P			Y	S	G	A	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	L	Q	M	N
Антитело D-3	G	L	E	N	V	S	Y	I	Y	P			Y	S	G	A	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	L	Q	M	N

№ по Kabat	B	C	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	
Антитело D	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	H	S	G	Y	Y	R	I	S	S	A							M	D	V	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	A	SEQ ID NO: 20
Антитело D-1	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	H	S	G	Y	Y	R	I	S	S	A						M	D	V	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	A	SEQ ID NO: 21	
Антитело D-2	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	H	S	G	Y	Y	R	I	S	S	A						M	D	V	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	A	SEQ ID NO: 21	
Антитело D-3	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	H	S	G	Y	Y	R	I	S	S	A						M	D	V	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	A	SEQ ID NO: 21	

Фиг. 3

№ по Kabat	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	A	B	C	D	E	F	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
Антитело D	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q							S	I	S	S	Y	L	A	W	Y	Q
Антитело D-1	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q							S	N	R	R	F	L	A	W	Y	Q
Антитело D-2	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q							S	V	R	S	F	L	A	W	Y	Q
Антитело D-3	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q							N	I	K	R	F	L	A	W	Y	Q

№ по Kabat	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
Антитело D	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	G	A	S	S	R	A	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P
Антитело D-1	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	G	A	S	S	R	A	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P
Антитело D-2	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	R	A	S	I	R	A	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P
Антитело D-3	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	G	A	S	T	R	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P

№ по Kabat	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	A	B	C	D	E	F	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108
Антитело D	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	Y	S	S	P					L	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	SEQ ID NO: 22	
Антитело D-1	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	Y	I	S	P					L	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	SEQ ID NO: 23	
Антитело D-2	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	Y	I	S	P					W	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	SEQ ID NO: 24	
Антитело D-3	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	Y	R	S	P					H	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	SEQ ID NO: 25	

Фиг. 4

	FR1		FR2	
I				
A	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT	-H1-	WVRQAPGQGLEWMG	-H2-
B	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS	-H1-	WVRQAPGQGLEWM	-H2-
C	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS	-H1-	WVRQAPGQGLEWM	-H2-
D	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS	-H1-	WVRQAPGQGLEWM	-H2-
II				
A	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSVS	-H1-	WIRQPPGKGLEWIG	-H2-
B	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSG	-H1-	WIRQPPGKGLEWI	-H2-
C	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSG	-H1-	WIRQPPGKGLEWI	-H2-
D	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSG	-H1-	WIRQPPGKGLEWI	-H2-
III				
A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	-H1-	WVRQAPGKGLEWVS	-H2-
B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-
C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-
D	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-
Акцептор - 1				
A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK	-H1-	WVRQAPGKGLEWVS	-H2-
B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-
C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-
Акцептор - 2				
A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK	-H1-	WVRQAPGKGLEWVS	-H2-
B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-
C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-
D	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-

Фиг. 5A

	FR3		FR4	SEQ ID NO FR1, FR2, FR3, FR4
I				
A	ADTSTSTAYMELSSLRSEDТАVYYCAR	-H3-	WGQGTЛVTVSS	SEQ ID NO.: 32, 33, 34, 35
B	ADTSTSTAYMELSSLRSEDТАVYYCAR	-H3-	WGQGTЛVTVSS	SEQ ID NO.: 36, 37, 34, 35
C	ADTSTSTAYMELSSLRSEDТАVYYCA	-H3-	WGQGTЛVTVSS	SEQ ID NO.: 36, 37, 38, 35
D	ADTSTSTAYMELSSLRSEDТАVYYC	-H3-	WGQGTЛVTVSS	SEQ ID NO.: 36, 37, 39, 35
II				
A	VDTSKNQFSLKLSSVTAADТАVYYCAR	-H3-	WGQGTЛVTVSS	SEQ ID NO.: 40, 41, 42, 35
B	VDTSKNQFSLKLSSVTAADТАVYYCAR	-H3-	WGQGTЛVTVSS	SEQ ID NO.: 43, 44, 42, 35
C	VDTSKNQFSLKLSSVTAADТАVYYCA	-H3-	WGQGTЛVTVSS	SEQ ID NO.: 43, 44, 45, 35
D	VDTSKNQFSLKLSSVTAADТАVYYC	-H3-	WGQGTЛVTVSS	SEQ ID NO.: 43, 44, 46, 35
III				
A	RDNSKNTLYLQMNSLRAEDТАVYYCAR	-H3-	WGQGTЛVTVSS	SEQ ID NO.: 47, 48, 49, 35
B	RDNSKNTLYLQMNSLRAEDТАVYYCAR	-H3-	WGQGTЛVTVSS	SEQ ID NO.: 50, 51, 49, 35
C	RDNSKNTLYLQMNSLRAEDТАVYYCA	-H3-	WGQGTЛVTVSS	SEQ ID NO.: 50, 51, 52, 35
D	RDNSKNTLYLQMNSLRAEDТАVYYC	-H3-	WGQGTЛVTVSS	SEQ ID NO.: 50, 51, 53, 35
Акцептор - 1				
A	ADTSKNTAYLQMNSLRAEDТАVYYCSR	-H3-	WGQGTЛVTVSS	SEQ ID NO.: 54, 48, 55, 35
B	ADTSKNTAYLQMNSLRAEDТАVYYCSR	-H3-	WGQGTЛVTVSS	SEQ ID NO.: 50, 51, 55, 35
C	ADTSKNTAYLQMNSLRAEDТАVYYCS	-H3-	WGQGTЛVTVSS	SEQ ID NO.: 50, 51, 56, 35
Акцептор - 2				
A	ADTSKNTAYLQMNSLRAEDТАVYYCAR	-H3-	WGQGTЛVTVSS	SEQ ID NO.: 54, 48, 57, 35
B	ADTSKNTAYLQMNSLRAEDТАVYYCAR	-H3-	WGQGTЛVTVSS	SEQ ID NO.: 50, 51, 57, 35
C	ADTSKNTAYLQMNSLRAEDТАVYYCA	-H3-	WGQGTЛVTVSS	SEQ ID NO.: 50, 51, 58, 35
D	ADTSKNTAYLQMNSLRAEDТАVYYC	-H3-	WGQGTЛVTVSS	SEQ ID NO.: 50, 51, 59, 35

Фиг. 5B

	FR1		FR2		FR3
kv1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC	-L1-	WYQQKPGKAPKLLIY	-L2-	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP
kv2	DIVMTQSPFLSLPVTTPGEPASISC	-L1-	WYLQKPGQSPQLLIY	-L2-	GVPDRFSGSGSGTDFTLTKISRVEA
kv3	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC	-L1-	WYQQKPGQAPRLLIY	-L2-	GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEP
kv4	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC	-L1-	WYQQKPGQPPKLLIY	-L2-	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQA

	FR4	SEQ ID NO FR1, FR2, FR3, FR4
EDFATYYC	-L3- FGQGTKVEIK	SEQ ID NO.: 60, 61, 62, 63
EDVGYYC	-L3- FGQGTKVEIK	SEQ ID NO.: 64, 65, 66, 63
EDFAVYYC	-L3- FGQGTKVEIK	SEQ ID NO.: 67, 68, 69, 63
EDVAVYYC	-L3- FGQGTKVEIK	SEQ ID NO.: 70, 71, 72, 63

Фиг. 6

Последовательности каркасных областей переменного домена легкой цепи huMAb4D5-8

- LC-FR1 ¹Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys²³ (SEQ ID NO: 60)
- LC-FR2 ³⁵Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr⁴⁹
(SEQ ID NO: 61)
- LC-FR3 ⁵⁷Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys⁸⁸
(SEQ ID NO: 30)
- LC-FR4 ⁹⁸Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys¹⁰⁷ (SEQ ID NO: 63)

Последовательности каркасных областей переменного домена тяжелой цепи huMAb4D5-8

- HC-FR1 ¹Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser²⁵ (SEQ ID NO: 50)
- HC-FR2 ³⁶Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val⁴⁸
(SEQ ID NO: 51)
- HC-FR3 ⁶⁶Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
Met Asn⁸³ Ser^{83a} Leu^{83b} Arg^{83c} Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys⁹²
(SEQ ID NO: 59)
- HC-FR4 ¹⁰³Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser¹¹³ (SEQ ID NO: 35)

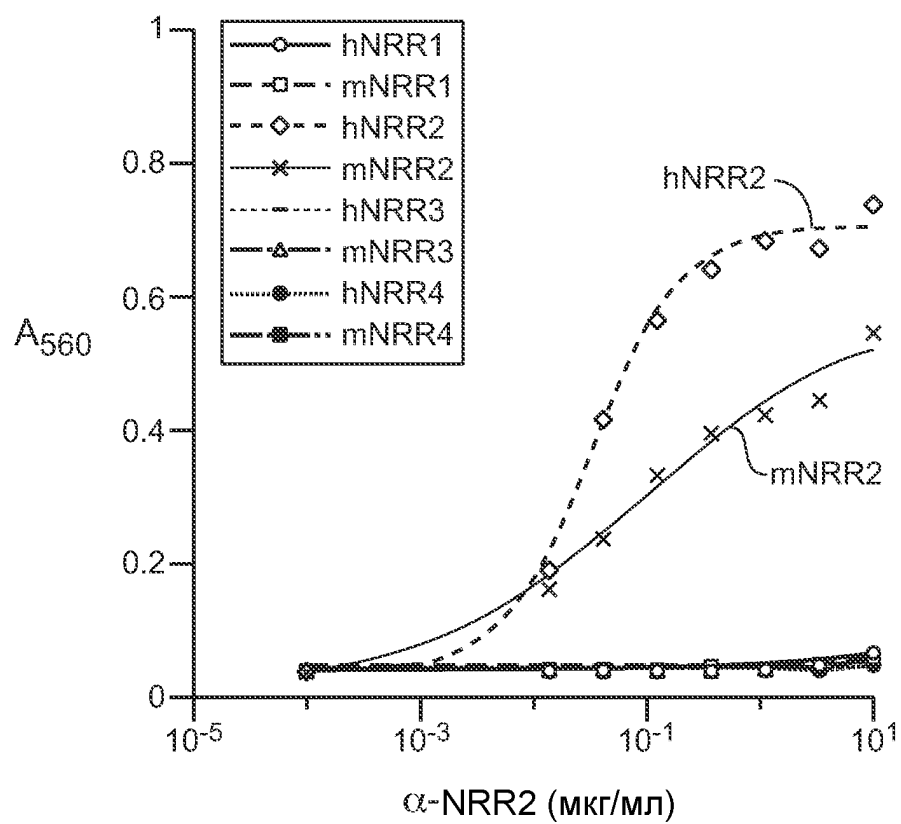
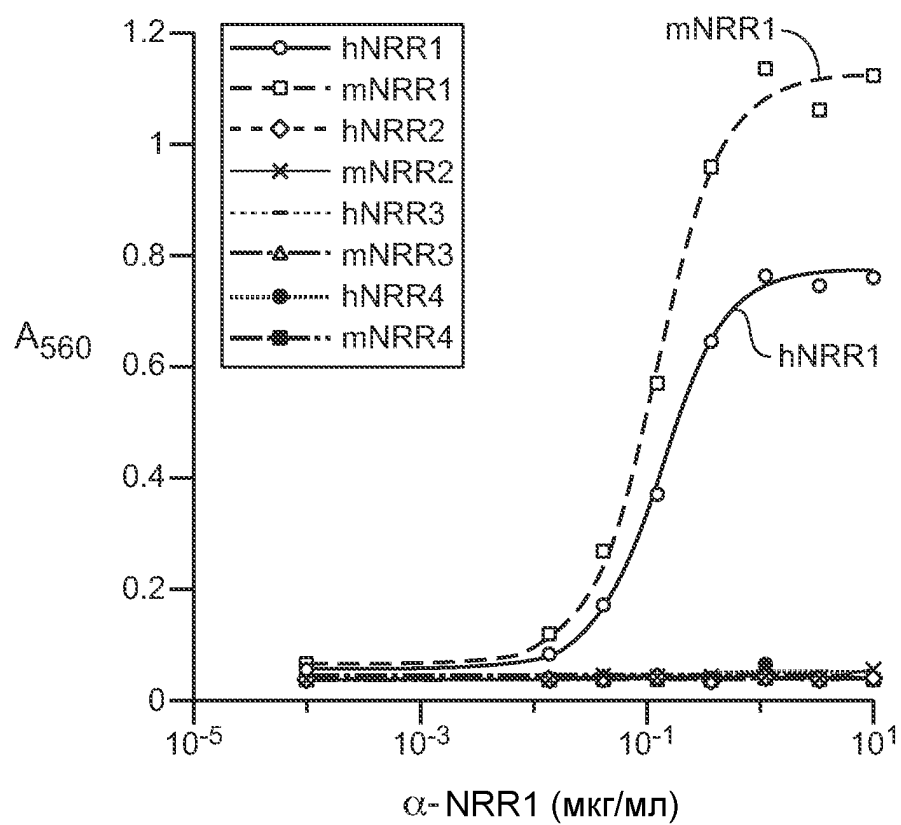
Фиг. 7Последовательности каркасных областей переменного домена легкой цепи huMAb4D5-8, модифицированные в положениях 66 и 99 (подчеркнуты)

- LC-FR1 ¹Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys²³ (SEQ ID NO: 60)
- LC-FR2 ³⁵Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr⁴⁹
(SEQ ID NO: 61)
- LC-FR3 ⁵⁷Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys⁸⁸
(SEQ ID NO: 62)
- LC-FR4 ⁹⁸Phe Arg Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys¹⁰⁷ (SEQ ID NO: 31)

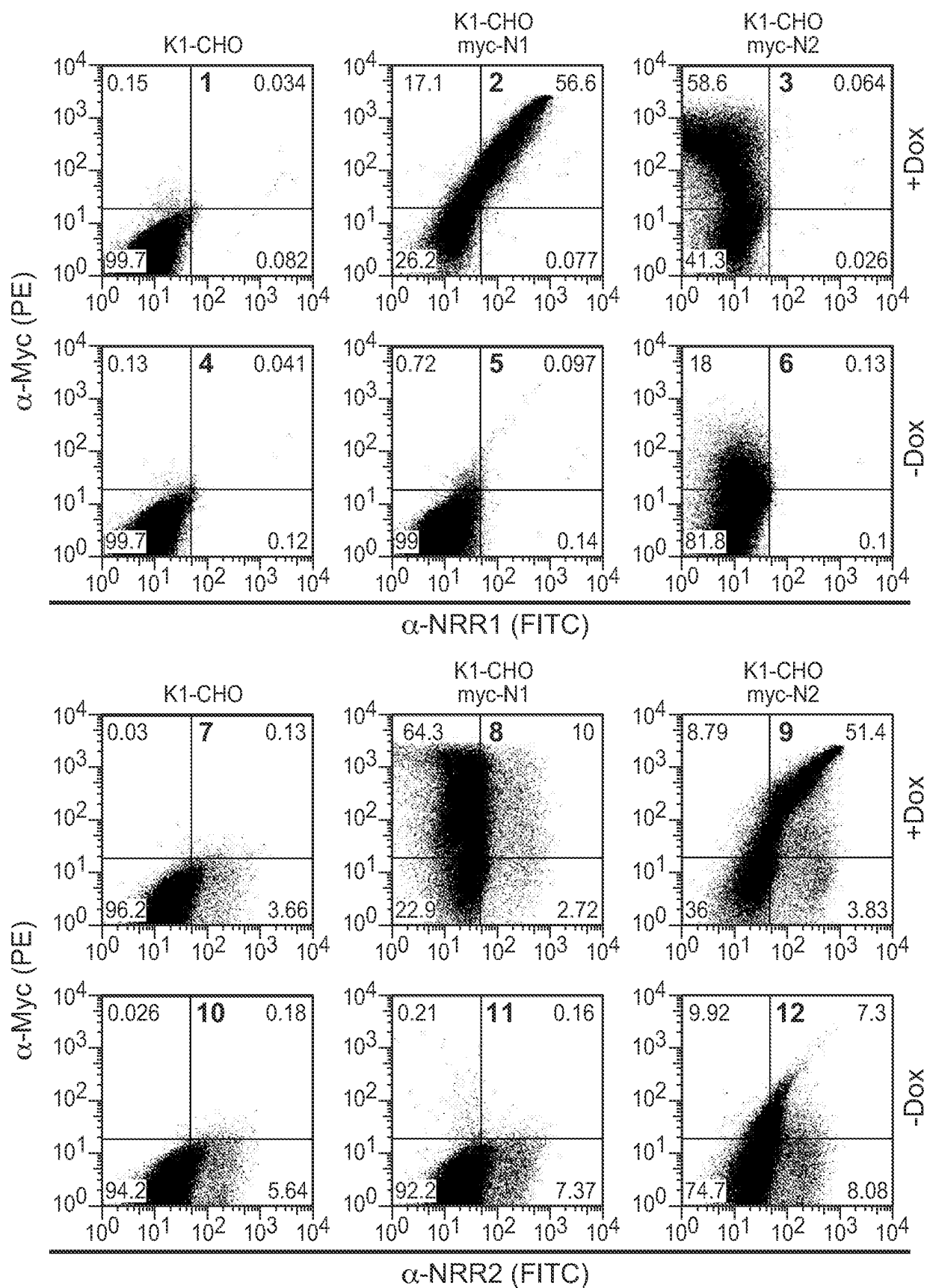
Последовательности каркасных областей переменного домена тяжелой цепи huMAb4D5-8, модифицированные в положениях 71, 73 и 78 (подчеркнуты)

- HC-FR1 ¹Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser²⁵ (SEQ ID NO: 50)
- HC-FR2 ³⁶Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val⁴⁸
(SEQ ID NO: 51)
- HC-FR3 ⁶⁶Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
Met Asn⁸³ Ser^{83a} Leu^{83b} Arg^{83c} Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
Cys⁹² (SEQ ID NO: 53)
- HC-FR4 ¹⁰³Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser¹¹³ (SEQ ID NO: 35)

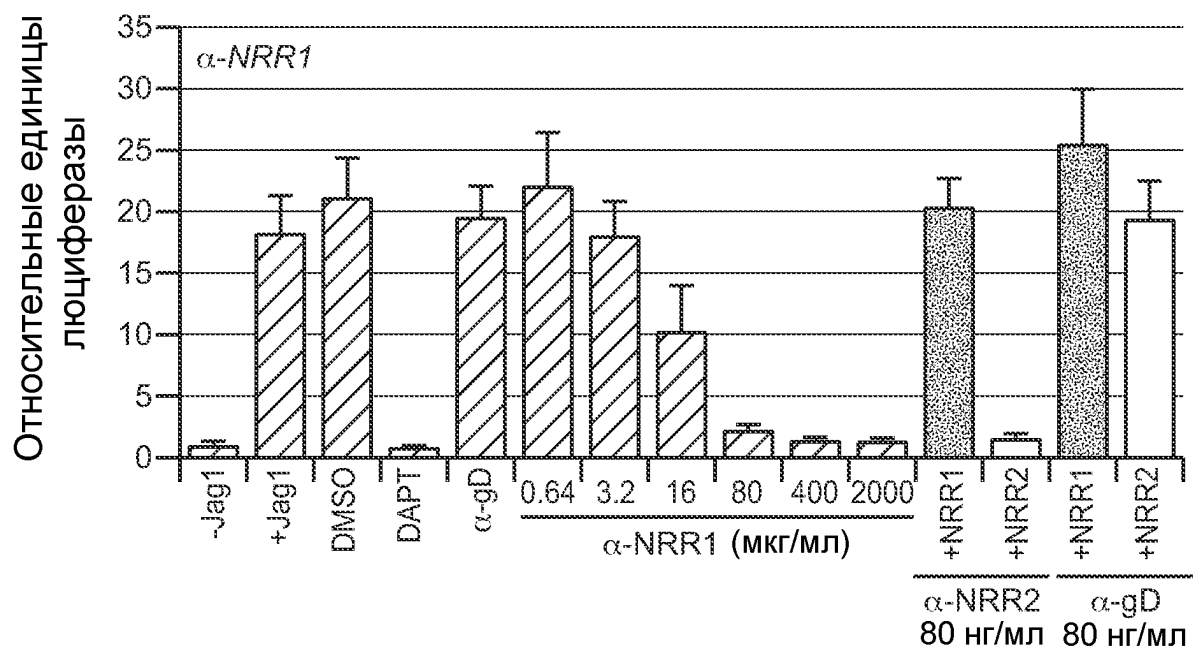
Фиг. 8



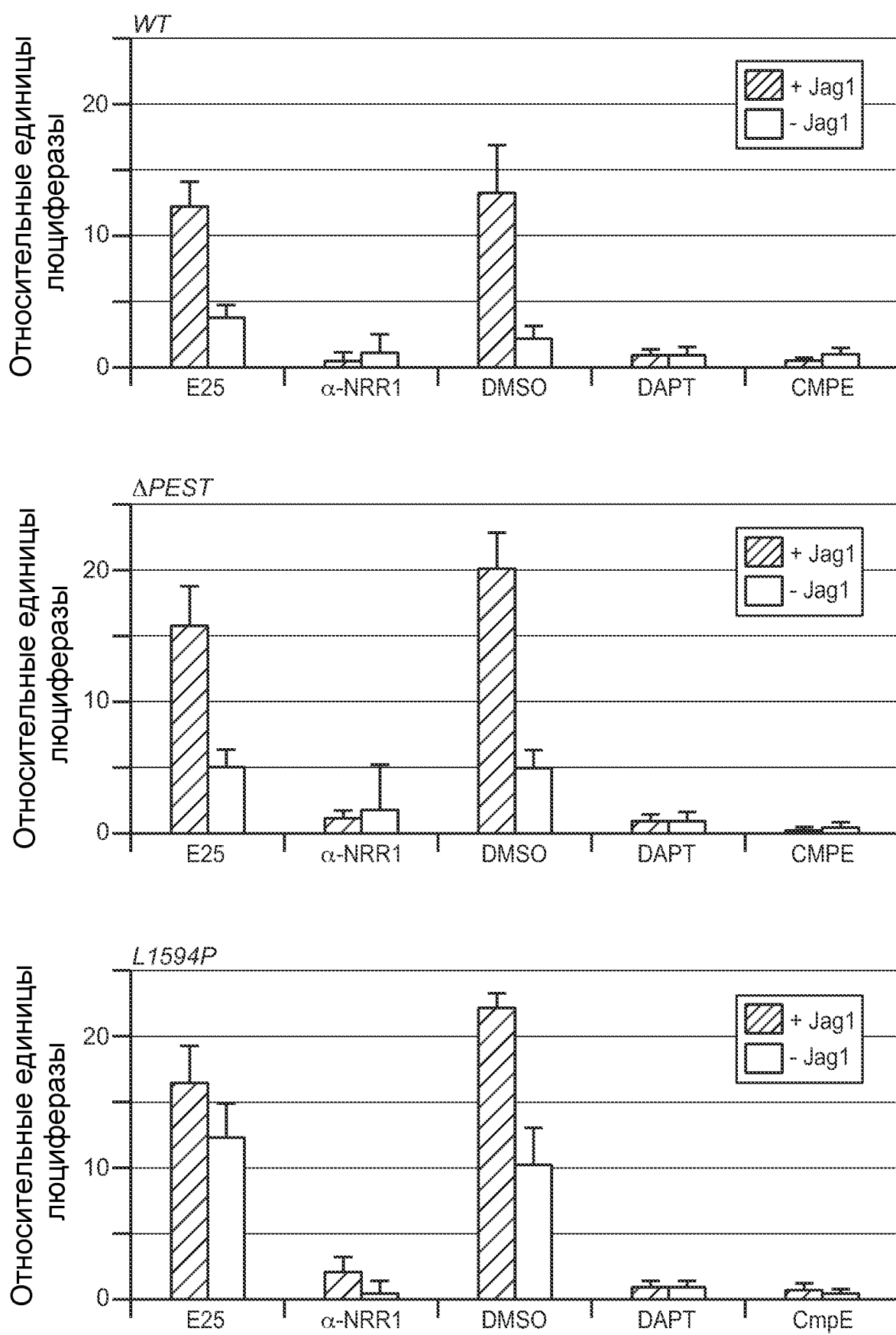
Фиг. 9А



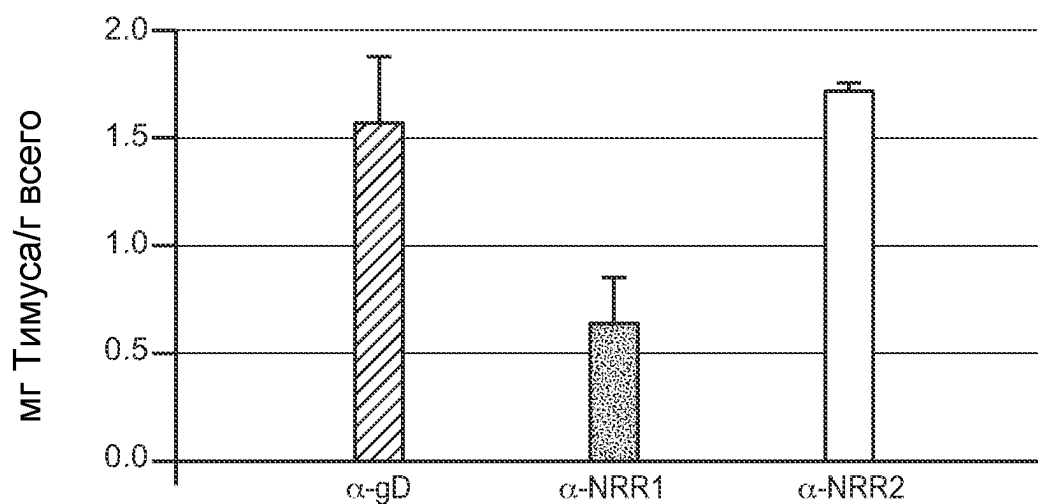
Фиг. 9В



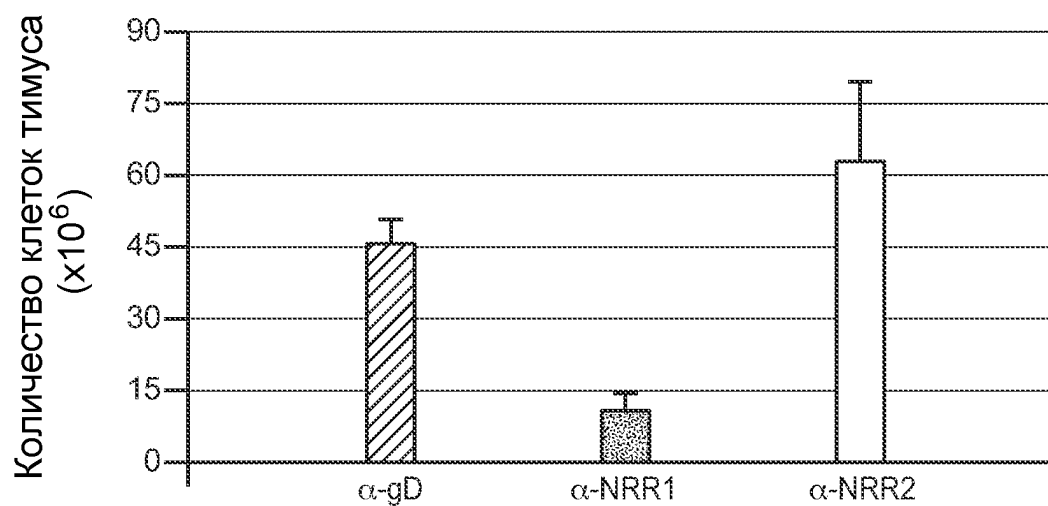
Фиг. 10А



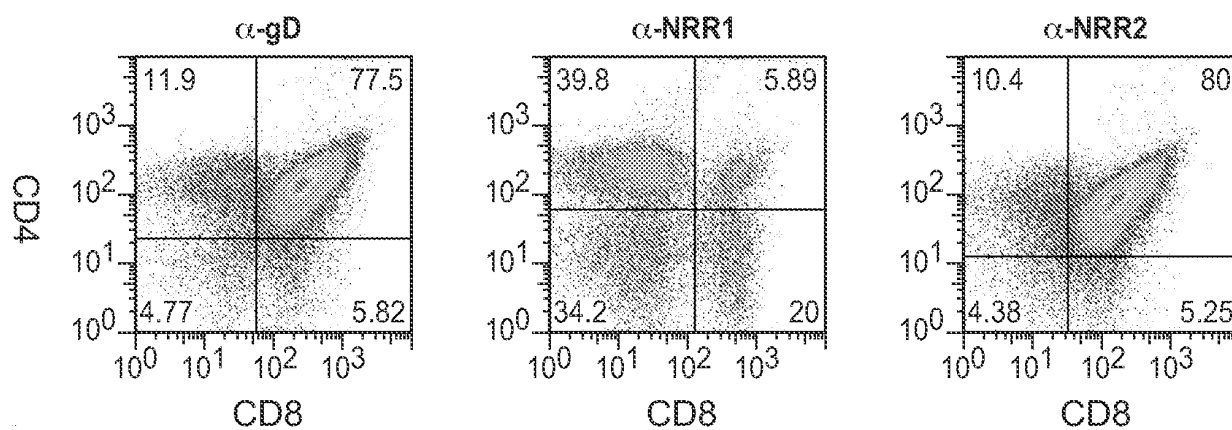
Фиг. 10С



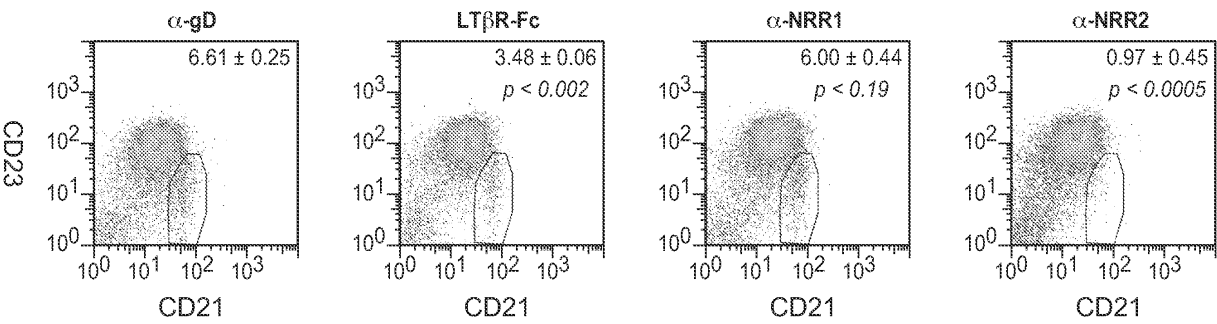
Фиг. 11А



Фиг. 11В

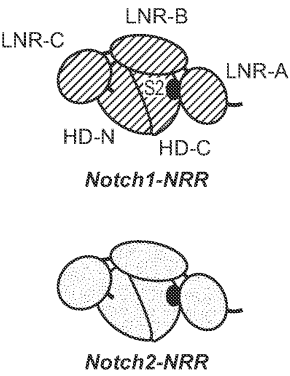


Фиг. 11С

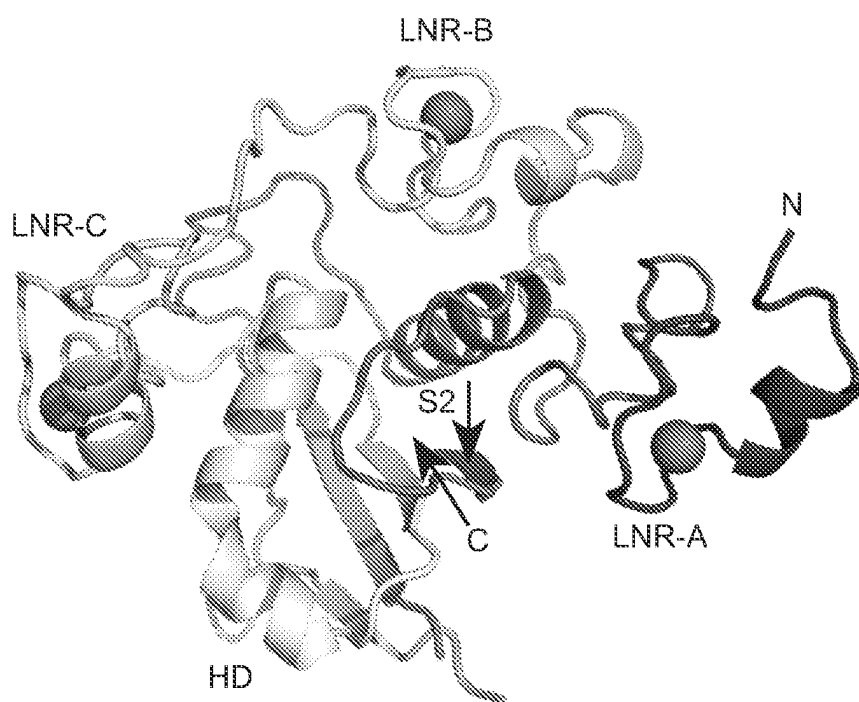


Фиг. 11D

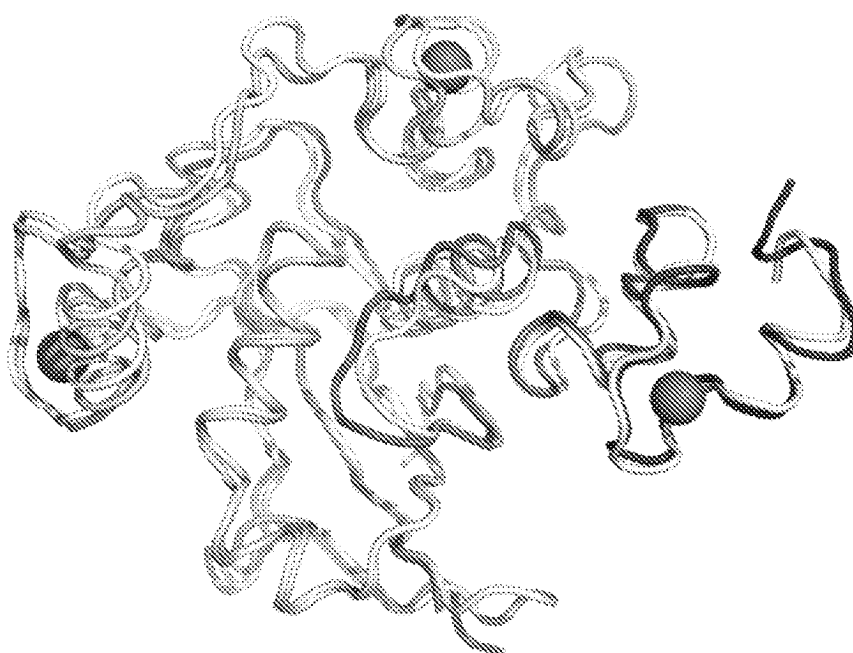
Химерный белок AP	Связывает α-NRR1	Связывает α-NRR2	Химерный белок AP	Связывает α-NRR1	Связывает α-NRR2
Notch1	Y	N	Notch2	N	Y
BC.Hd	N	N	A	N	N
AB.Hd	Y	N	B	N	Y
ABC.Hc	Y	N	C	N	Y
AB.Hc	Y	N	HDc	N	N
AB	W	N	C.Hn	N	Y
Hd	N	N	BC.Hn	N	W
B.Hc	N	N	BC	N	Y
B.Hd	N	N			



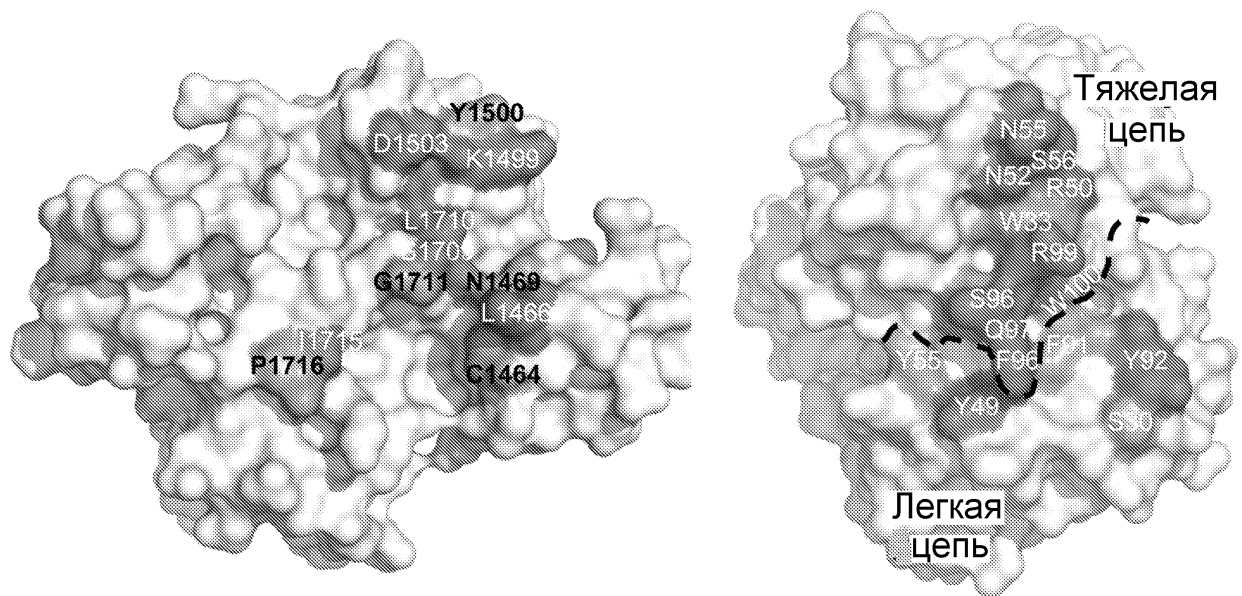
Фиг. 12A



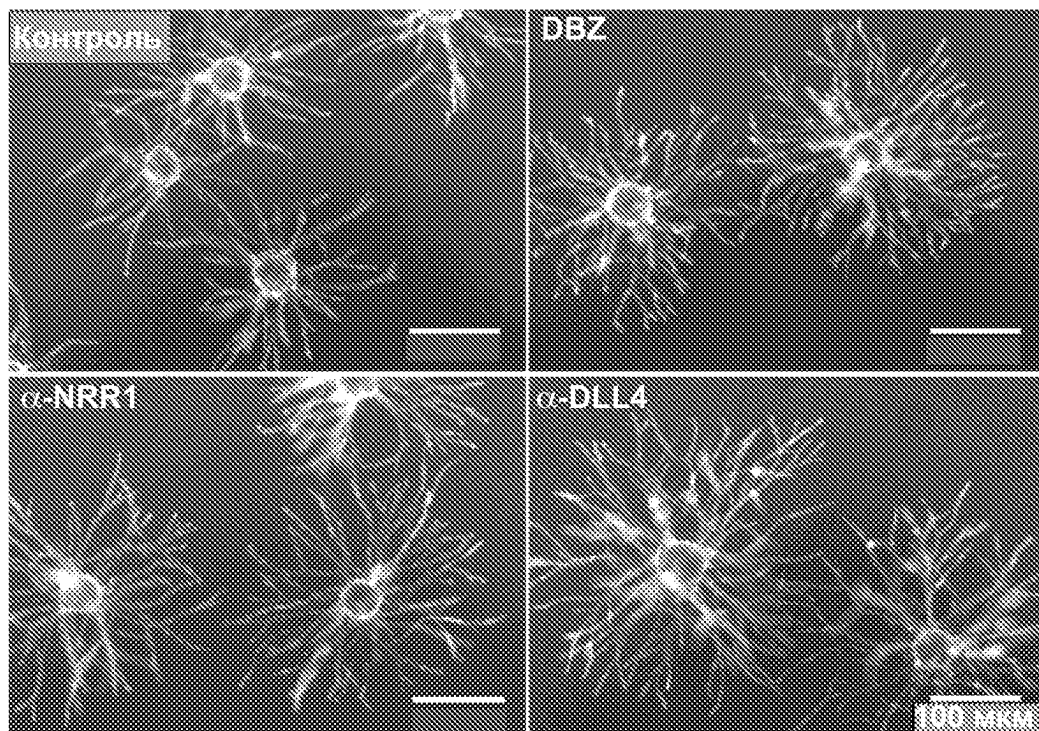
Фиг. 12В



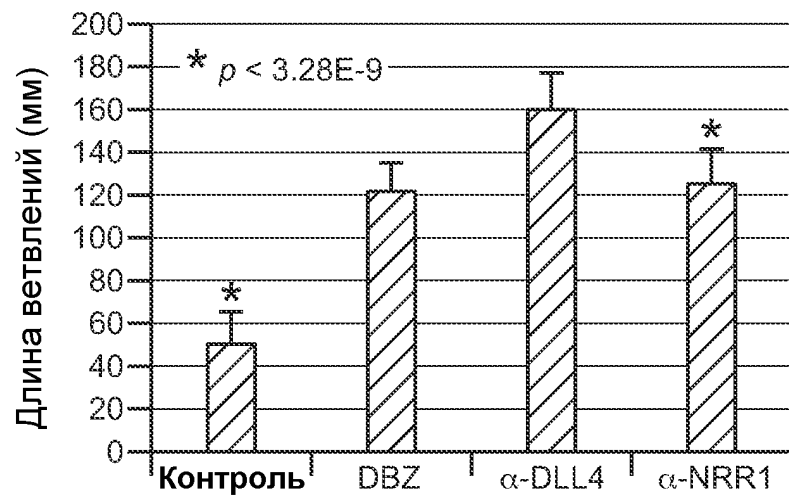
Фиг. 12С



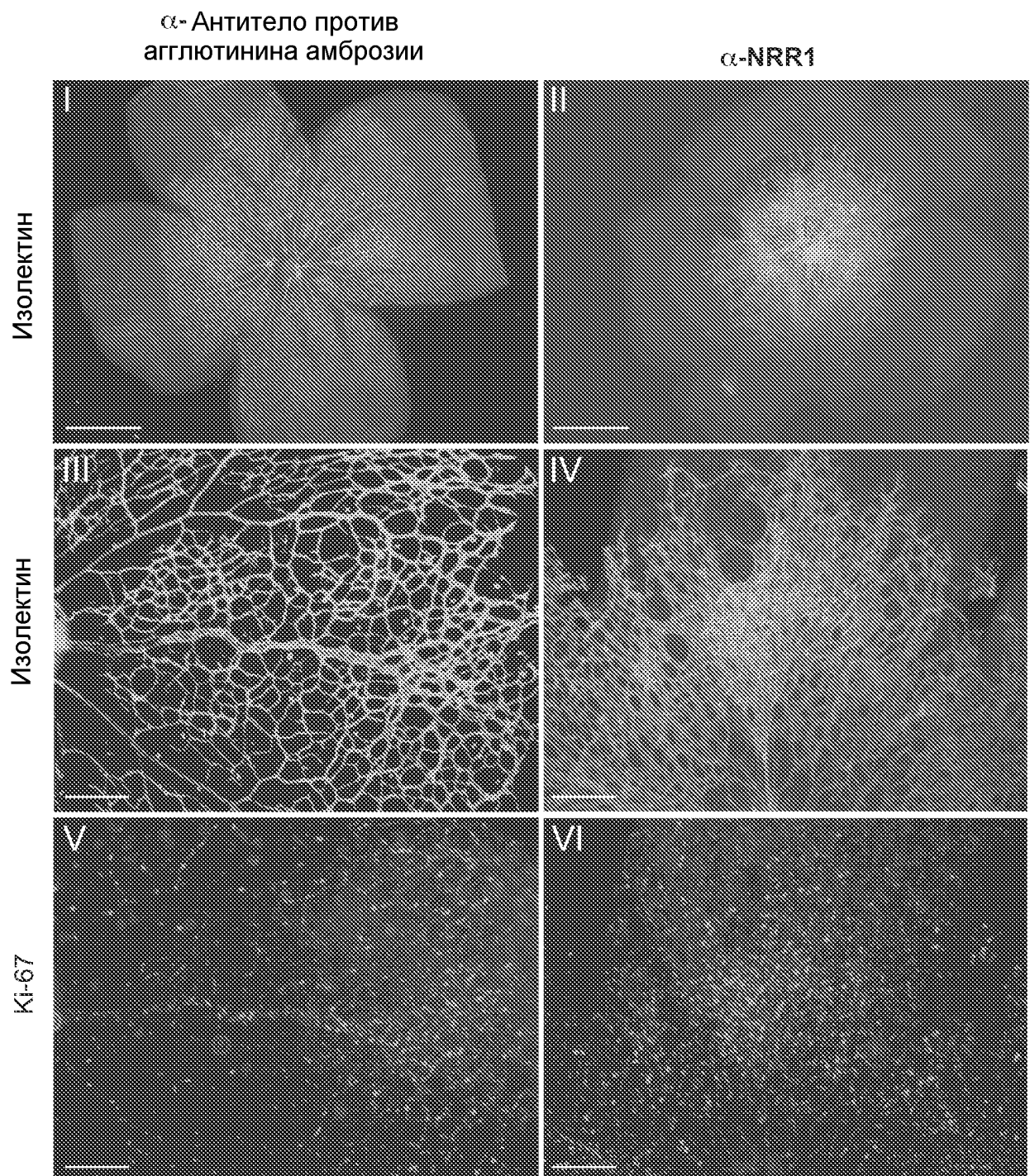
Фиг. 12D



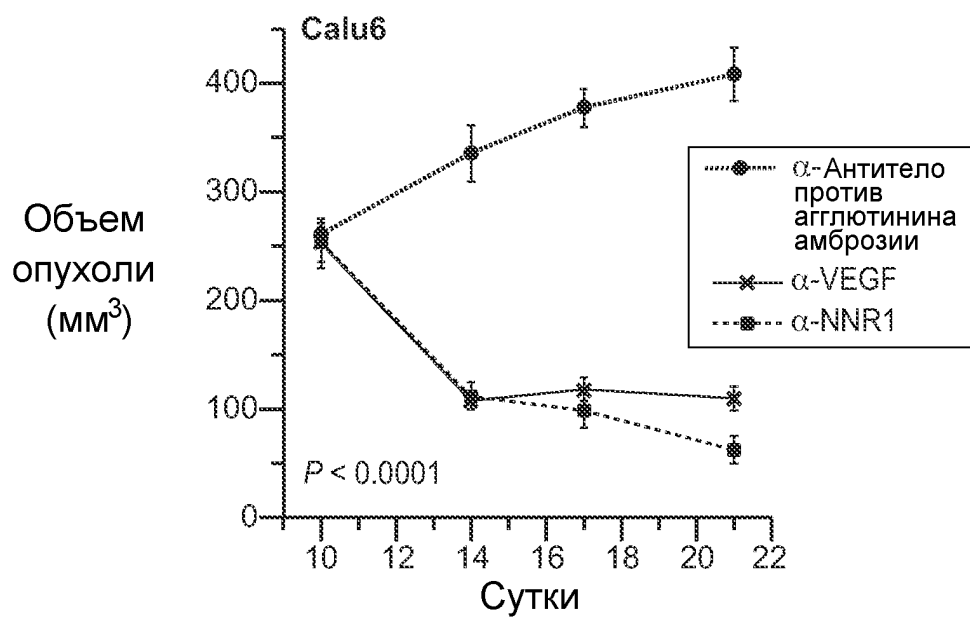
Фиг. 13A



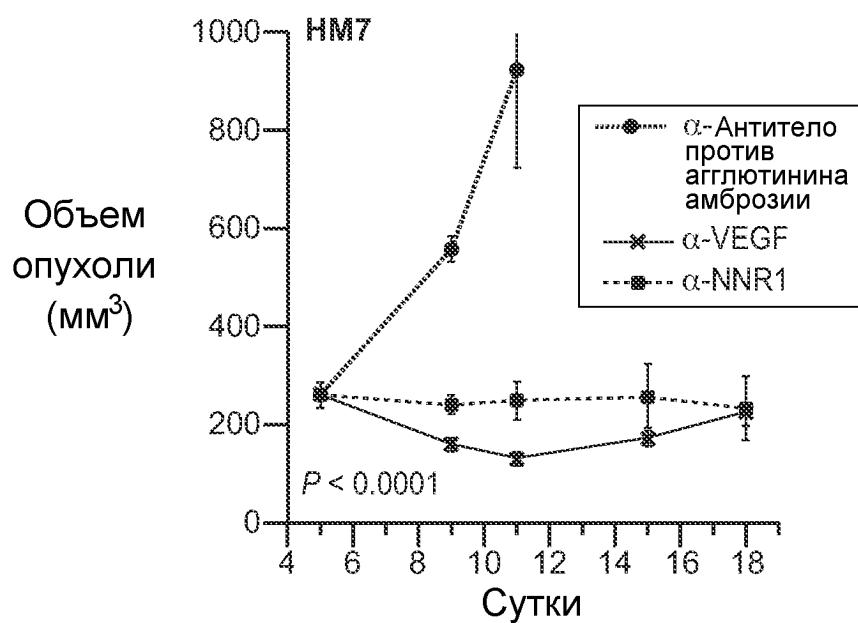
Фиг. 13В



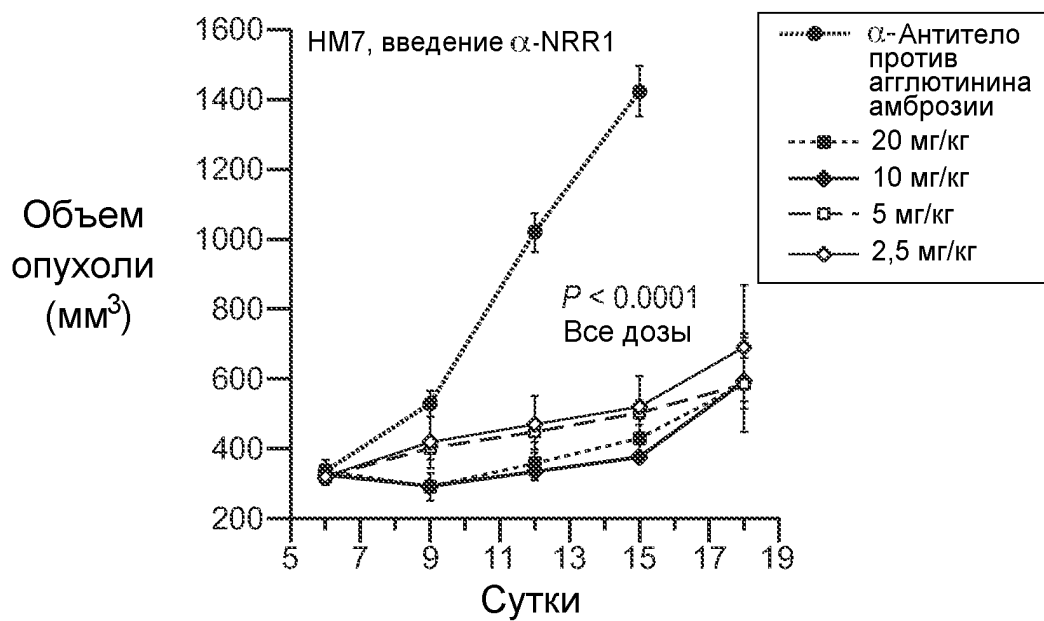
Фиг. 13С



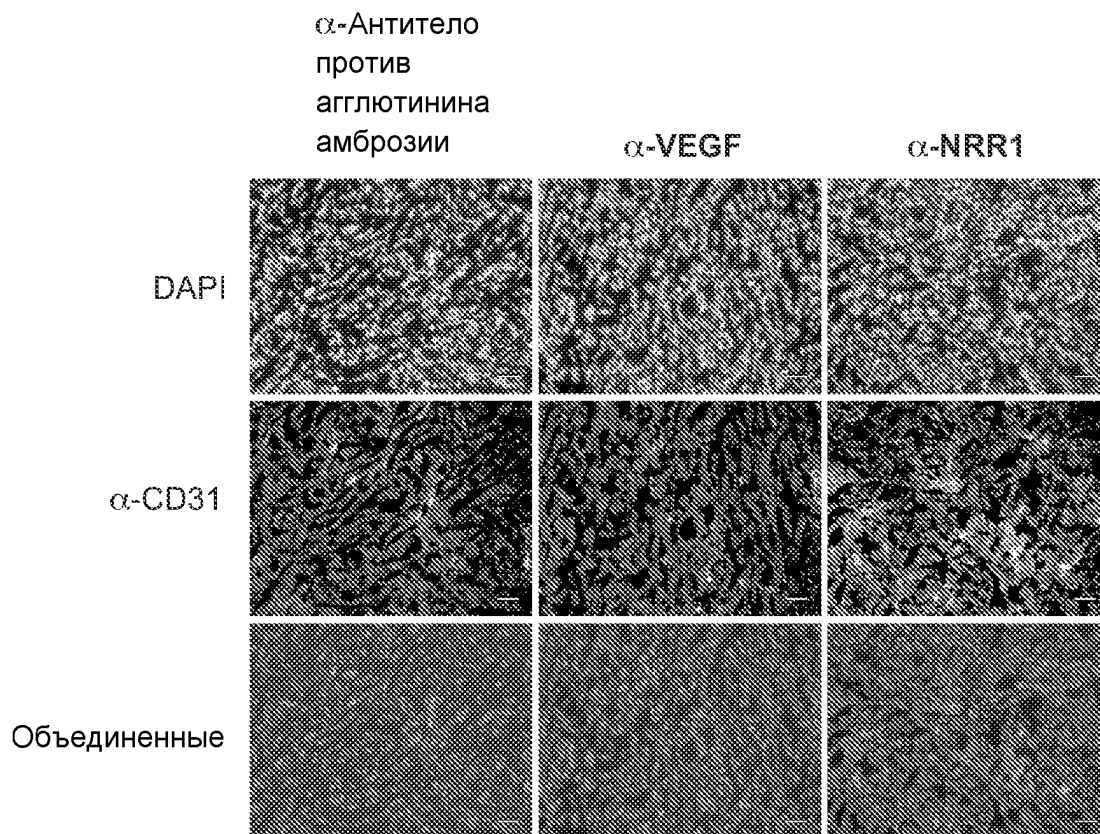
Фиг. 14А



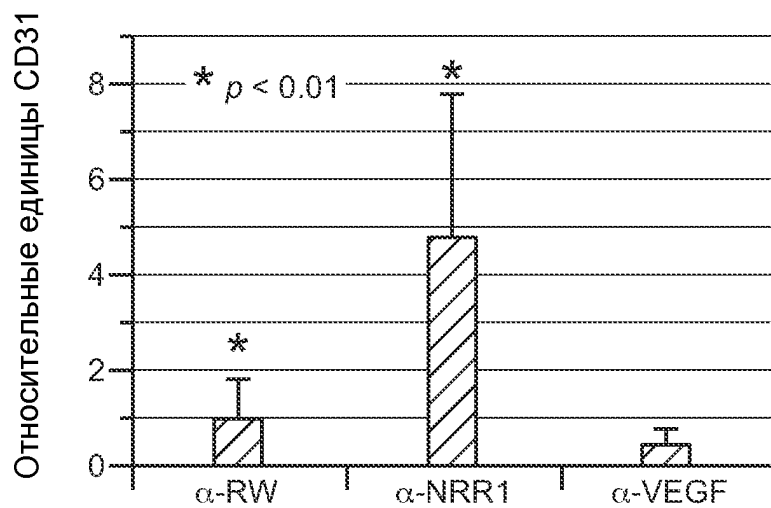
Фиг. 14В



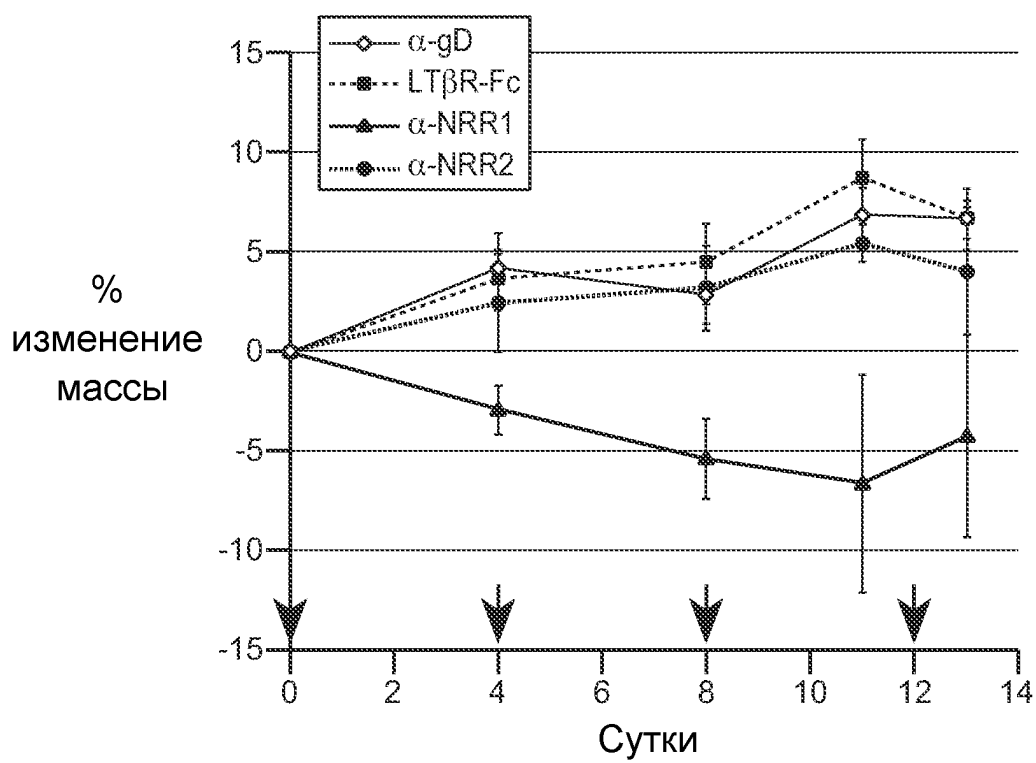
Фиг. 14С



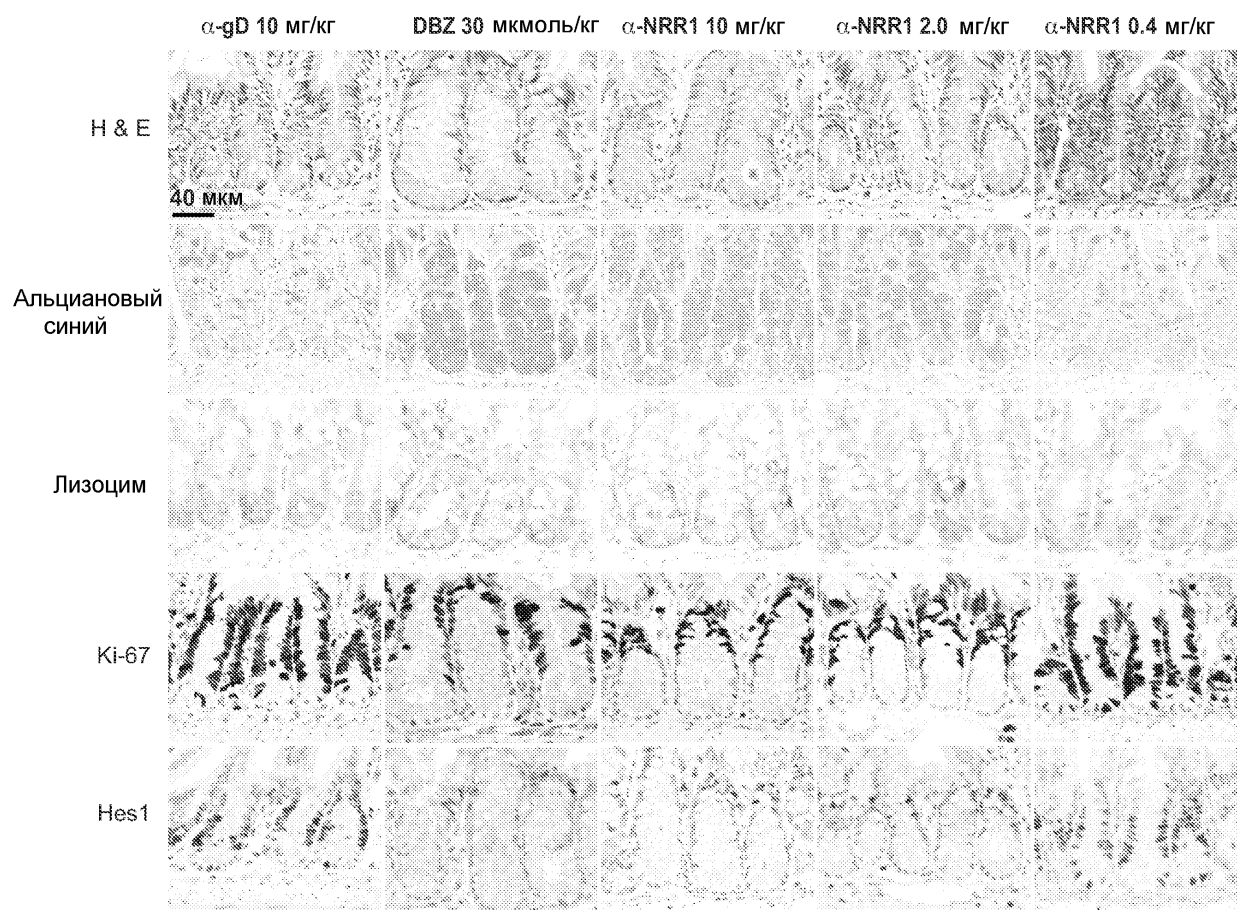
Фиг. 14D



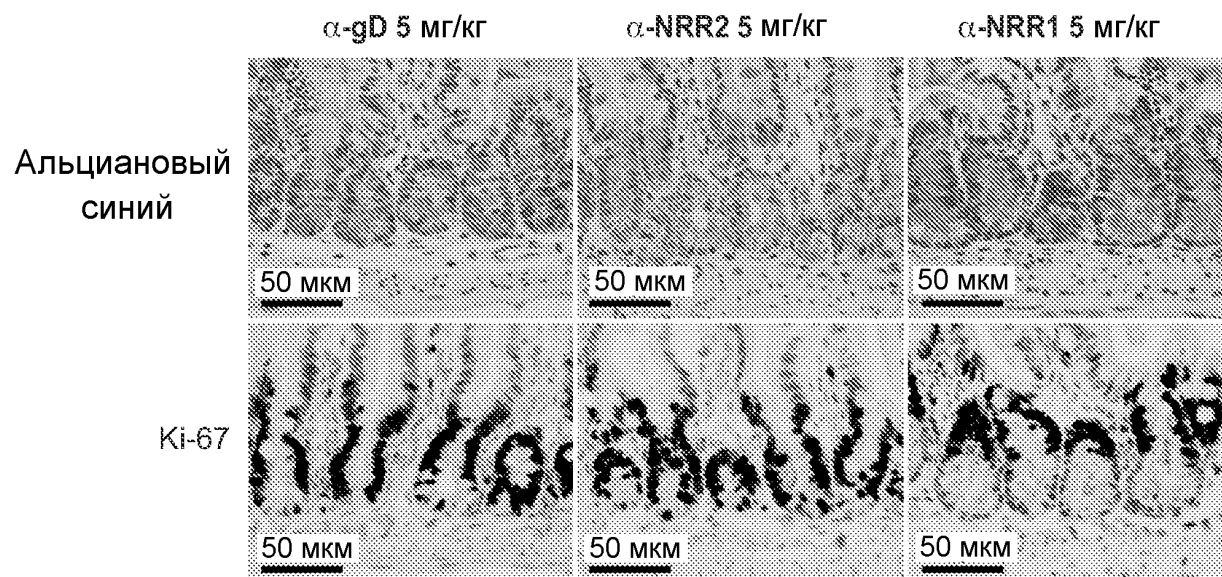
Фиг. 14Е



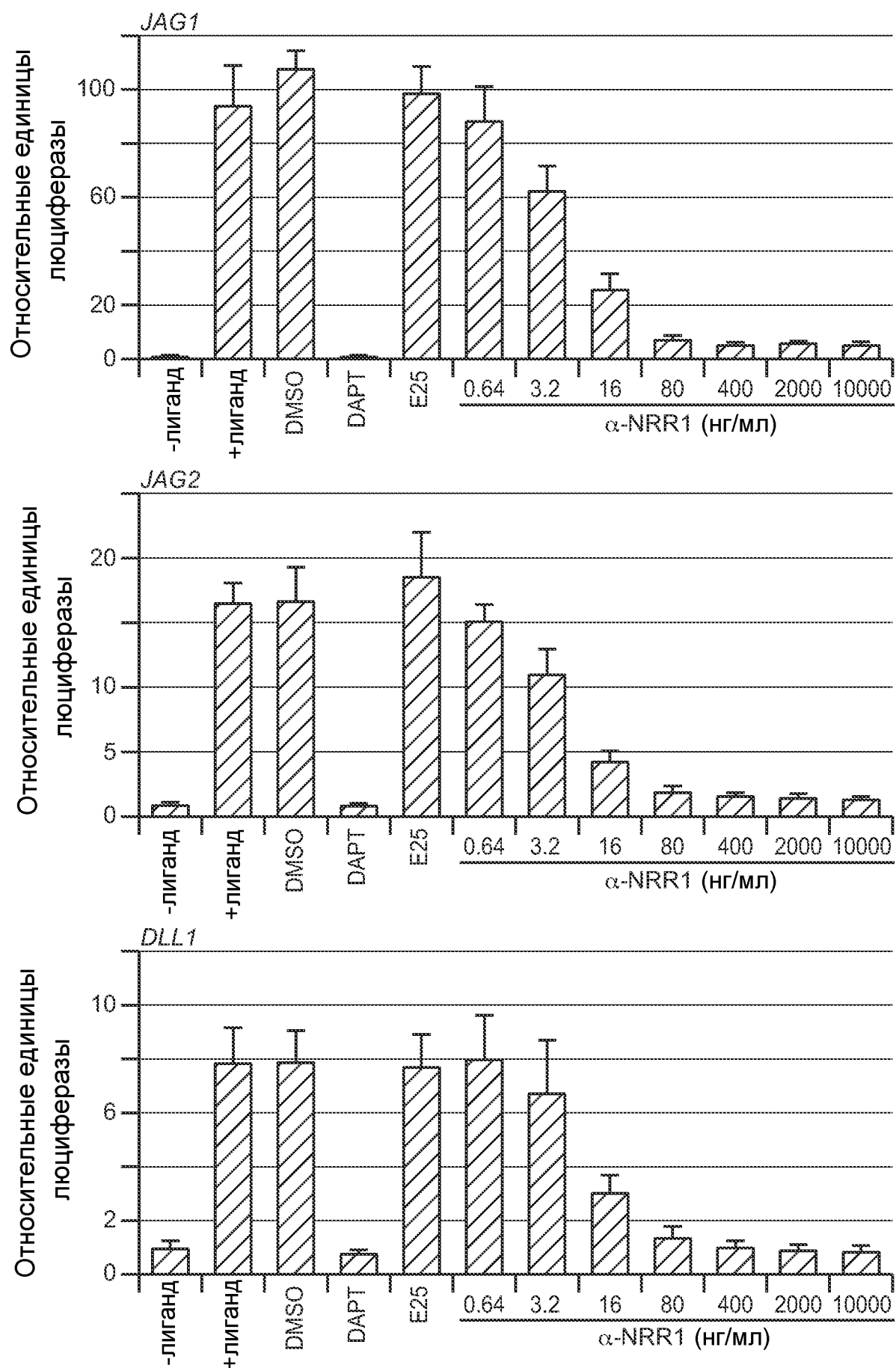
Фиг. 15А












Фиг. 15В



Фиг. 15С



Фиг. 16

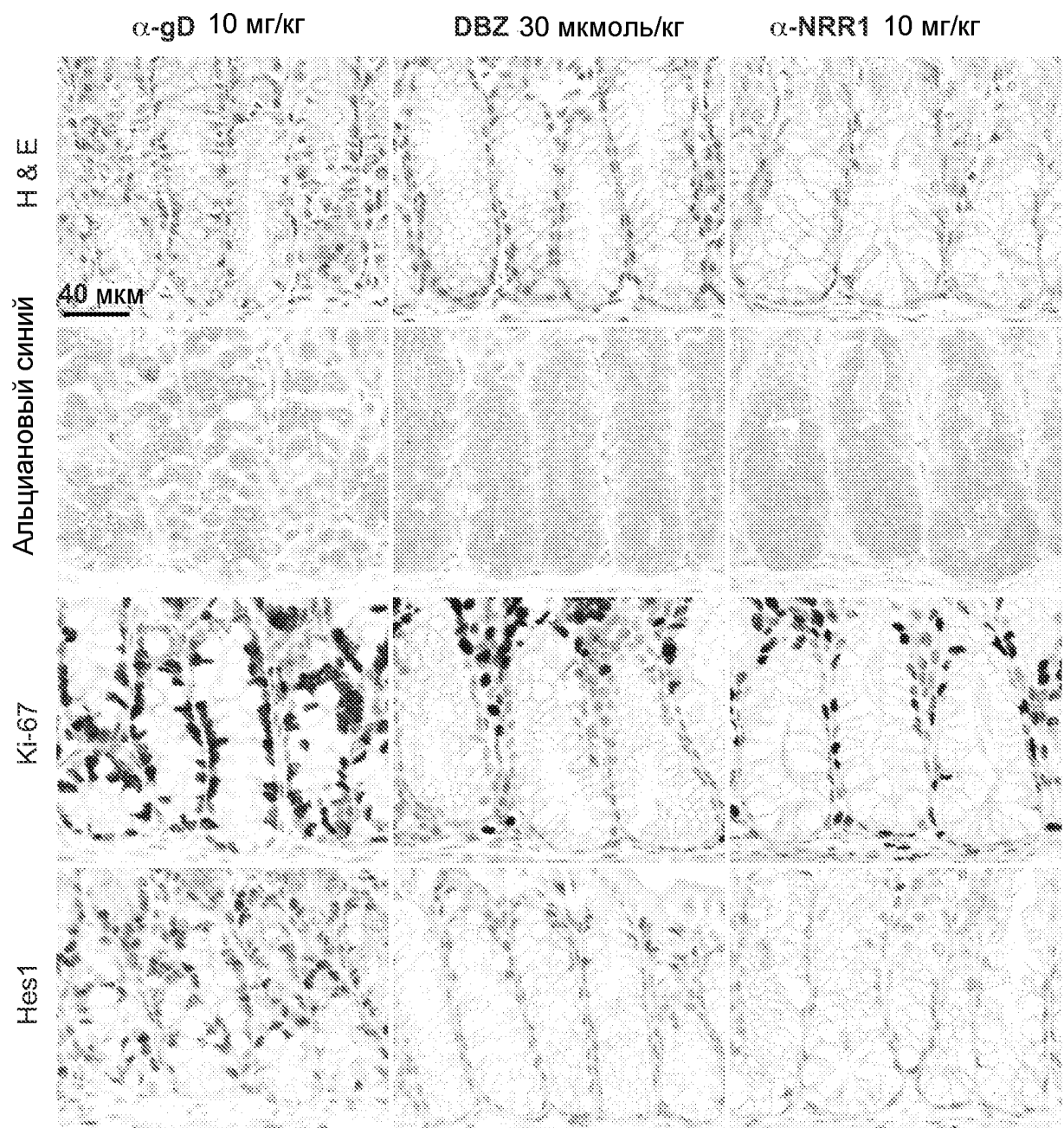
Химерный белок AP	Экспрессия AP	Связывает α -NRR1	Связывает α -NRR2
 AC.Hd	N	---	---
 ABC.Hn	W	N	N
 Hn	N	---	---
 C.Hd	W	N	N
 ABC	W	W	N
 A.Hc	W	W	N
 A.Hd	W	W	N
 AC.Hn	W	N	N
 AC	W	N	N

Фиг. 17

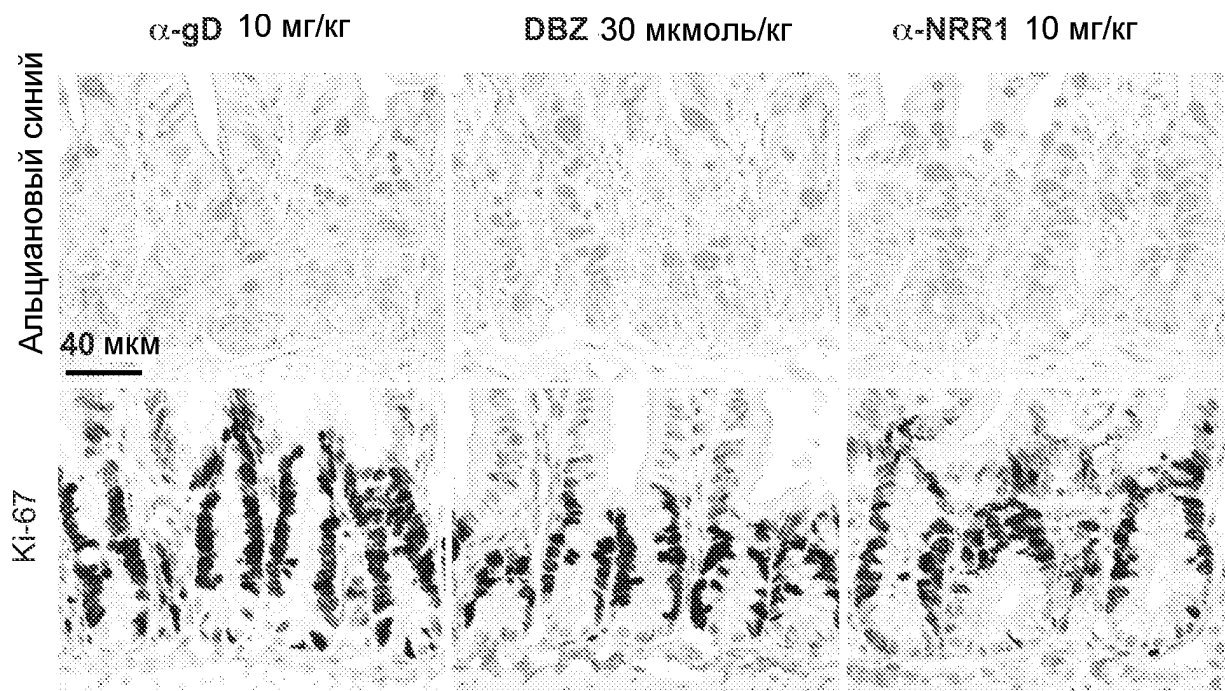
Notch1 человека	E1447	EEACELPECQEDAGNKVC	SLQCNHACGWDGGDCSLNFNDPWKN N1490	LNR-A
Notch1 мыши	E1446	EEACELPECQVDAGNKVC	SLQCNHACGWDGGDCSLNFNDPWKN N1489	
Notch2 человека	P1422	PATCLSQYCADKARDGVC	DEACNSHACQWDGGDCSLTMENPWAN N1465	LNR-B
Notch2 мыши	P1420	PATCQSQYCADKARDGIC	DEACNSHACQWDGGDCSLTMEDPWAN N1463	
Notch1 человека	C1491	CTQSLQCWKVFS	SDGHCDSCNSAGCLFDGFDQRAEGQ Q1528	LNR-B
Notch1 мыши	C1490	CTQSLQCWKVFS	SDGHCDSCNSAGCLFDGFDQLTEGQ Q1527	
Notch2 человека	C1466	CSSPLPCWDY	-INNQCDELICNTVECLFDNFECQGNST T1502	LNR-C
Notch2 мыши	C1464	CTSTLRCEWY	-INNQCDEQCNTAECLFDNFECQRNST T1500	
Notch1 человека	C1529	CNPLYDQYCKDHFSDGHCDQGCNSAECEWDGLDC	C1562	LNR-C
Notch1 мыши	C1528	CNPLYDQYCKDHFSDGHCDQGCNSAECEWDGLDC	C1561	
Notch2 человека	C1503	CK--YDKYCADHFKDNHCDQGCNSEECGWDGLDC	C1534	LNR-C
Notch2 мыши	C1501	CK--YDKYCADHFKDNHCDQGCNSEECGWDGLDC	C1532	
Notch1 человека	A1563	A-EHVPERLAAGTLVVVVLMPPEQLRNSSFHFLRELSRVLHTNVVFKRDAHG		HD-N
Notch1 мыши	A1562	A-EHVPERLAAGTLVLVLLPPDQLRNNSFHFLRELSHVLHTNVVFKRDAQG		
Notch2 человека	A1535	AAD-QPENLAEGTLVIVVVLMPPEQLLQDARSFLRALGTLHTNLRIKRDSQG		HD-N
Notch2 мыши	A1533	ASD-QPENLAEGTLIIVVLLPPEQLLQDSRSFLRALGTLHTNLRIKQDSQG		
		QQMIFPYYGHEEELRKHPKRAAEGWAAPDALLGQVKASLLPGGSEGGRRRR R1665		HD-N
		QQMIFPYYGHEEELRKHPKIRSTVGWAT-----SLLPGTS-GGRQRR R1654		
		ELMVYPYYGEKSAAMKKQRM-----TRR R1608		HD-N
		ALMVYPYFGEKSAAMKKQKM-----TRR R1606		
Notch1 человека	E1666	-----ELDPMDVRGSIVYLEIDNRQCVQASSQCFQSATD-VAAFLGALASL-		HD-C
Notch1 мыши	E1665	-----ELDPMDIRGSIVYLEIDNRQCVQSSSQCFQSATD-VAAFLGALASL-		
Notch2 человека	S1609	SLP--GEQEQEVAGSKVFLEIDNRQCVQSDHCFKN-TDAAAALL-ASHAIQ		HD-C
Notch2 мыши	S1607	SLPEEQEQEQEVIGSKI FLEIDNRQCVQSDQCFKN-TDAAAALL-ASHAIQ		
		GSLNIPYKIEAVQSETVEPPPPAQ Q1734		HD-C
		GSLNIPYKIEAVKSEPVEPPLPSQ Q1723		
		GTLSP--LVSVVSESL-TPERTQ Q1677		HD-C
		GTLSP--LVSVFSE-LESPRNAQ Q1677		

S2

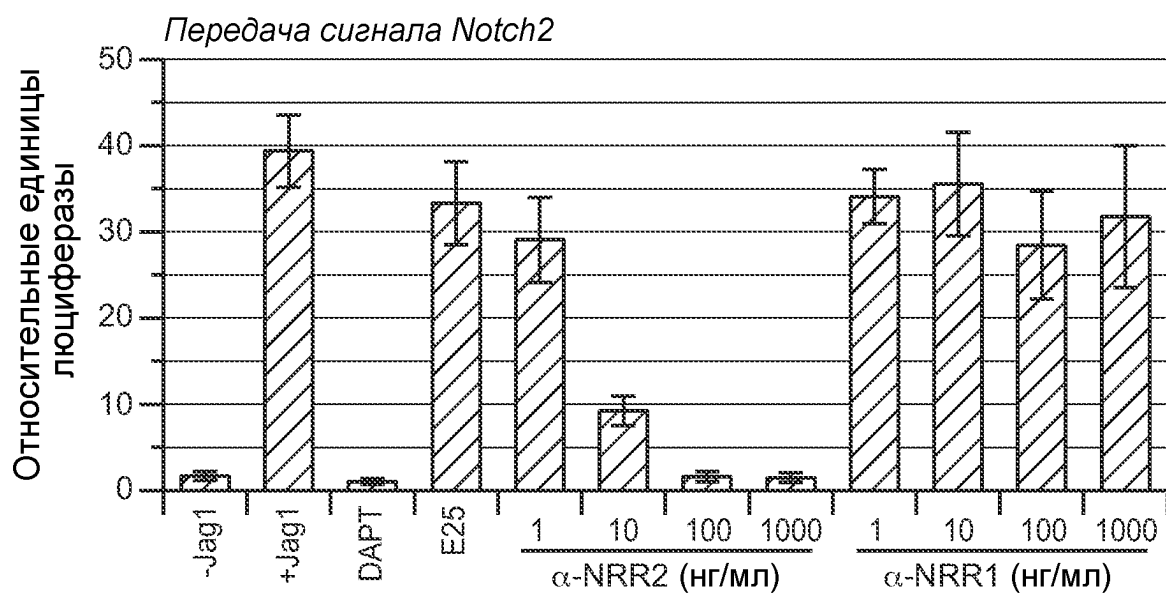
Фиг. 18



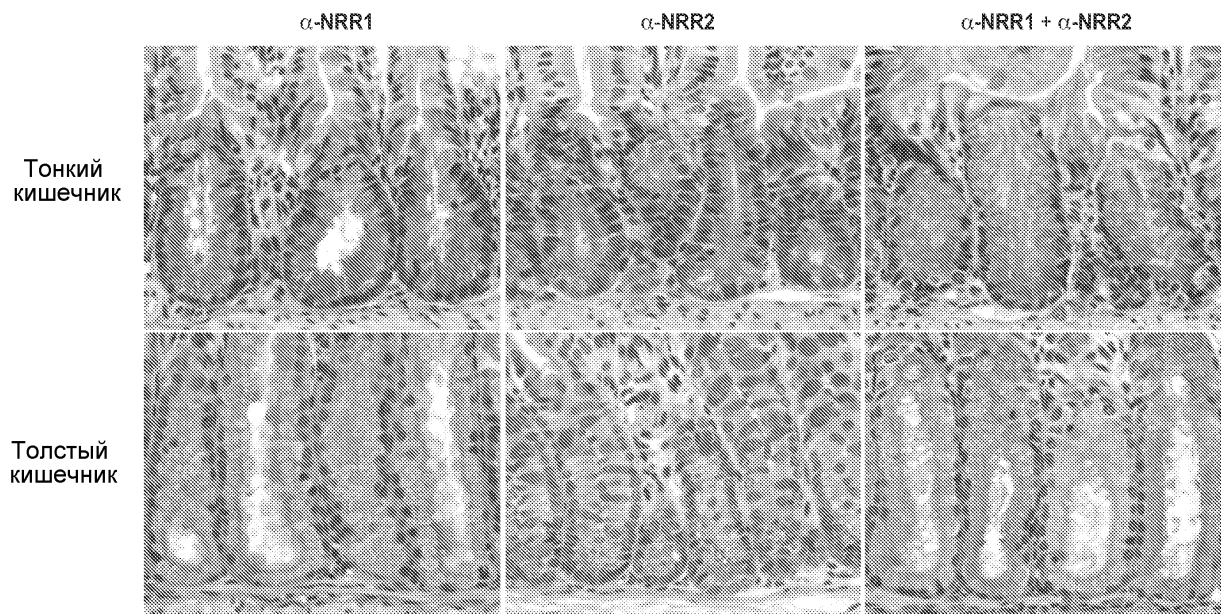
Фиг. 19



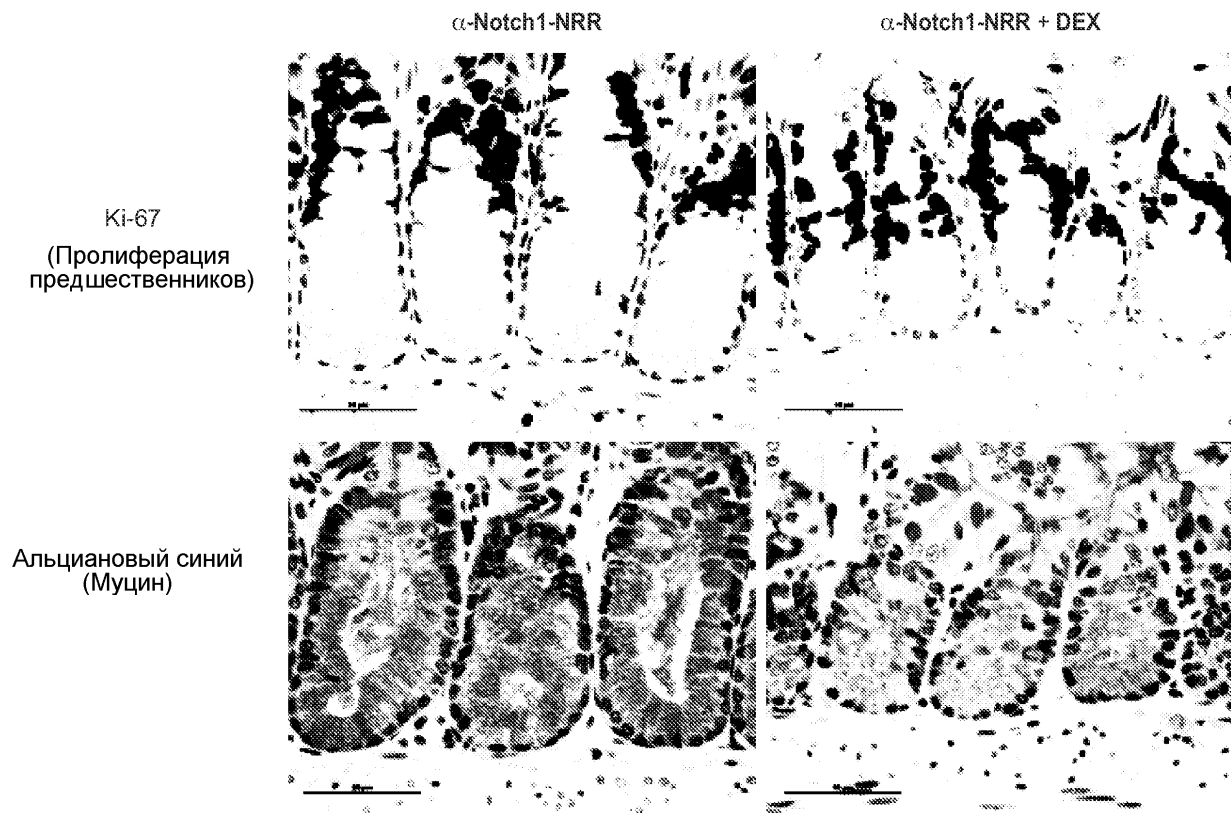
Фиг. 20



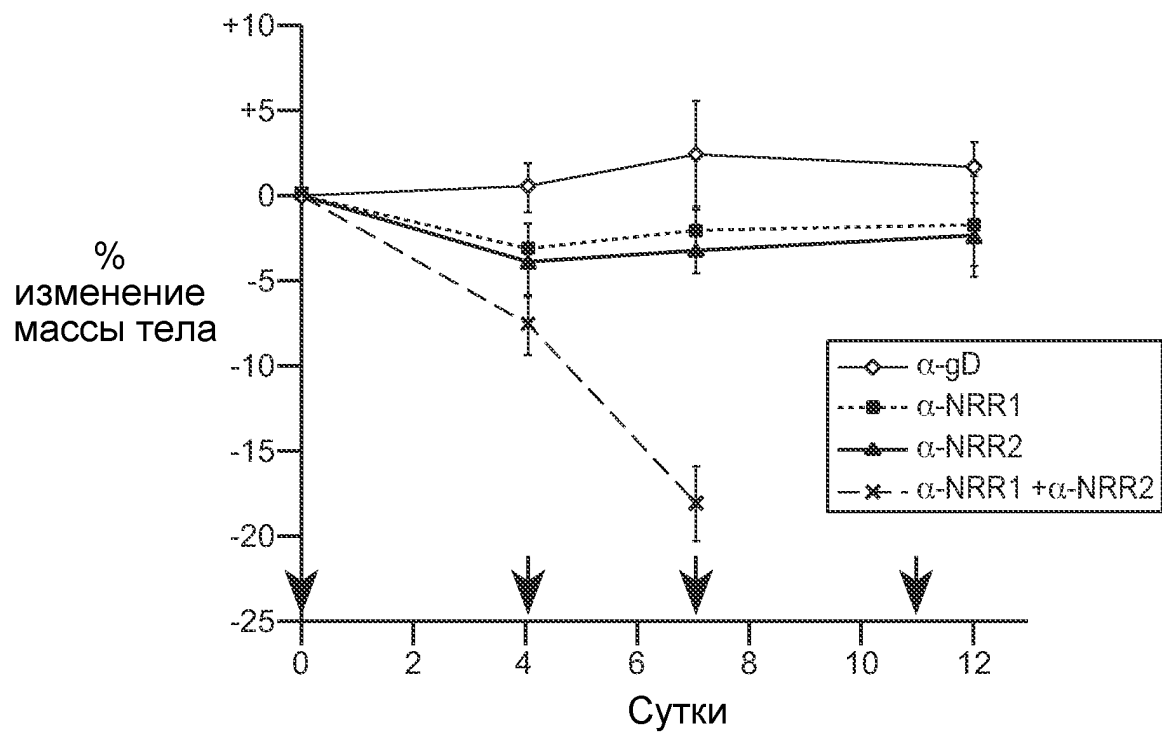
Фиг. 21



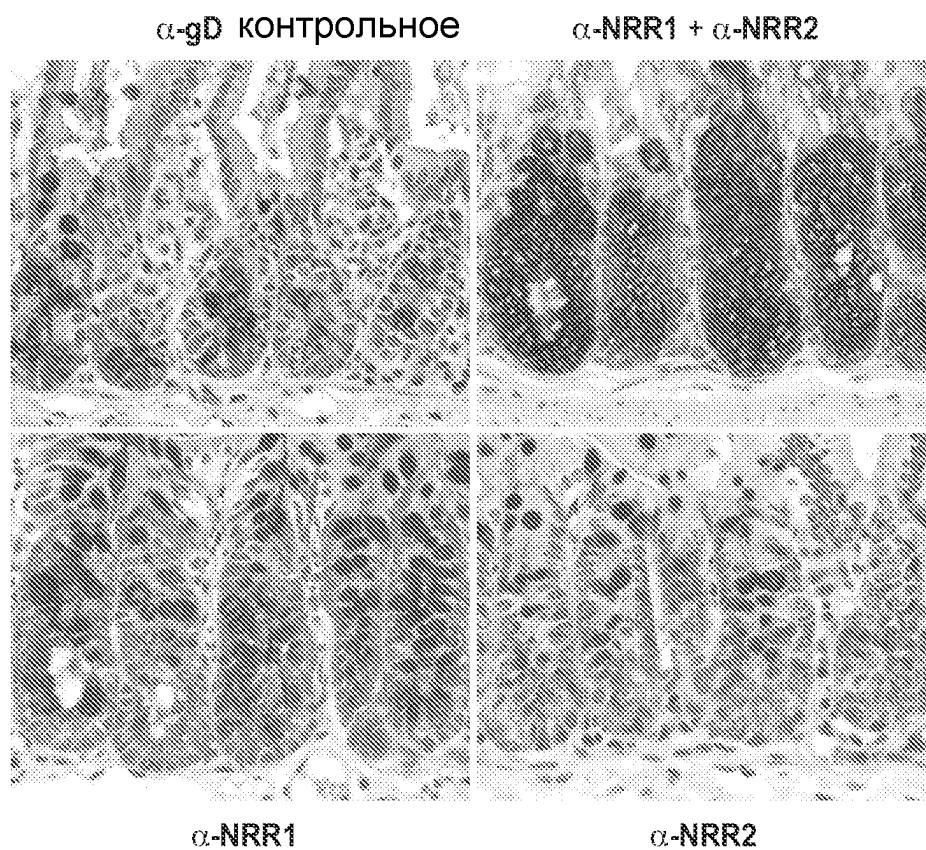
Фиг. 22



Фиг. 23

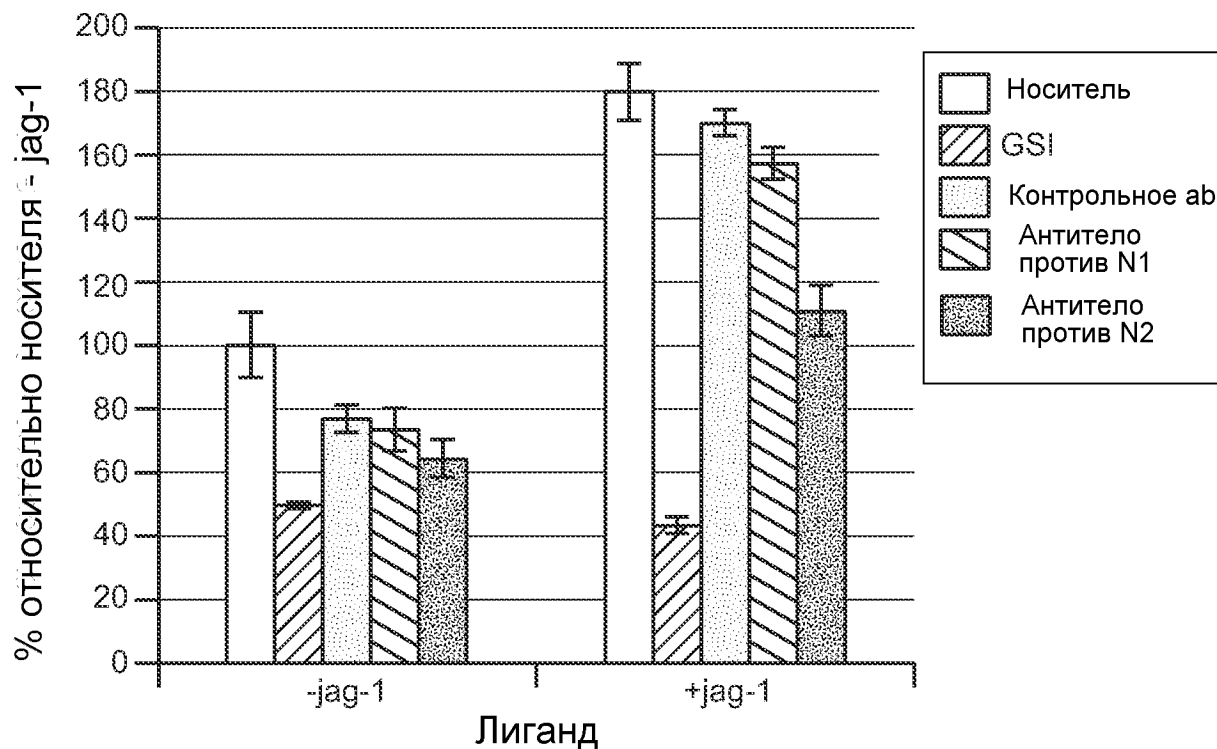


ФИГ. 24А



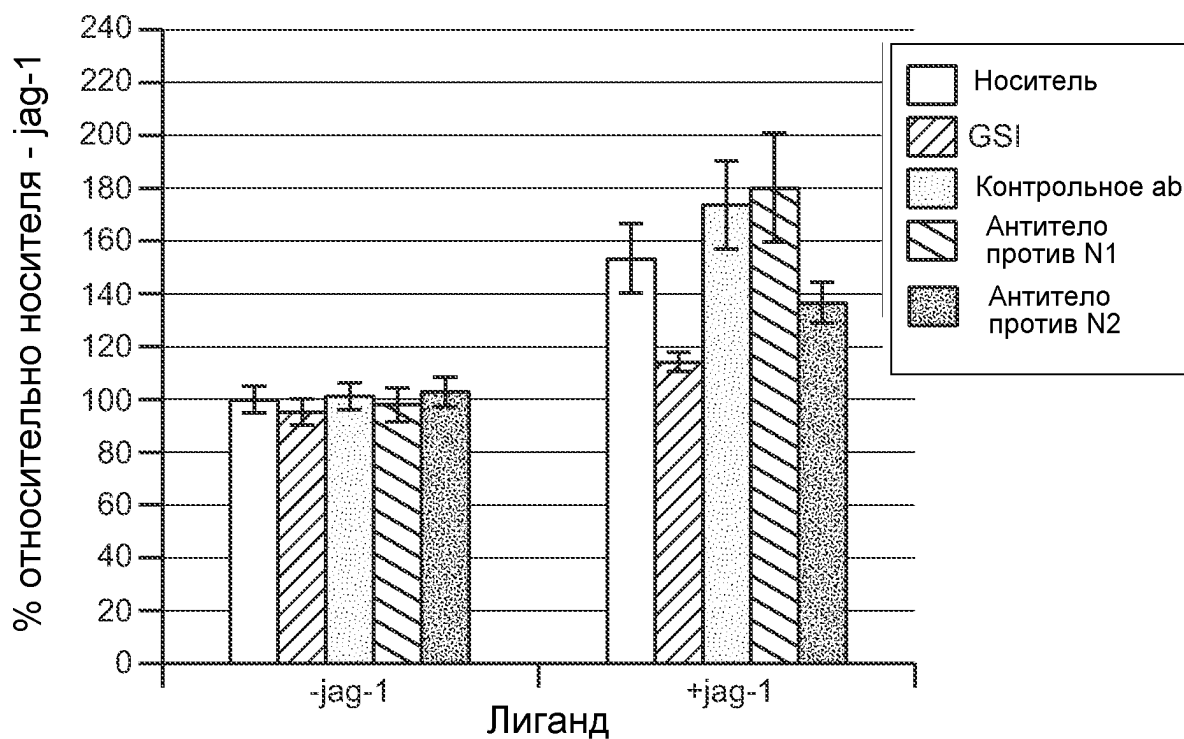
ФИГ. 24В

Жизнеспособность SK23 в ответ на ингибирование Notch

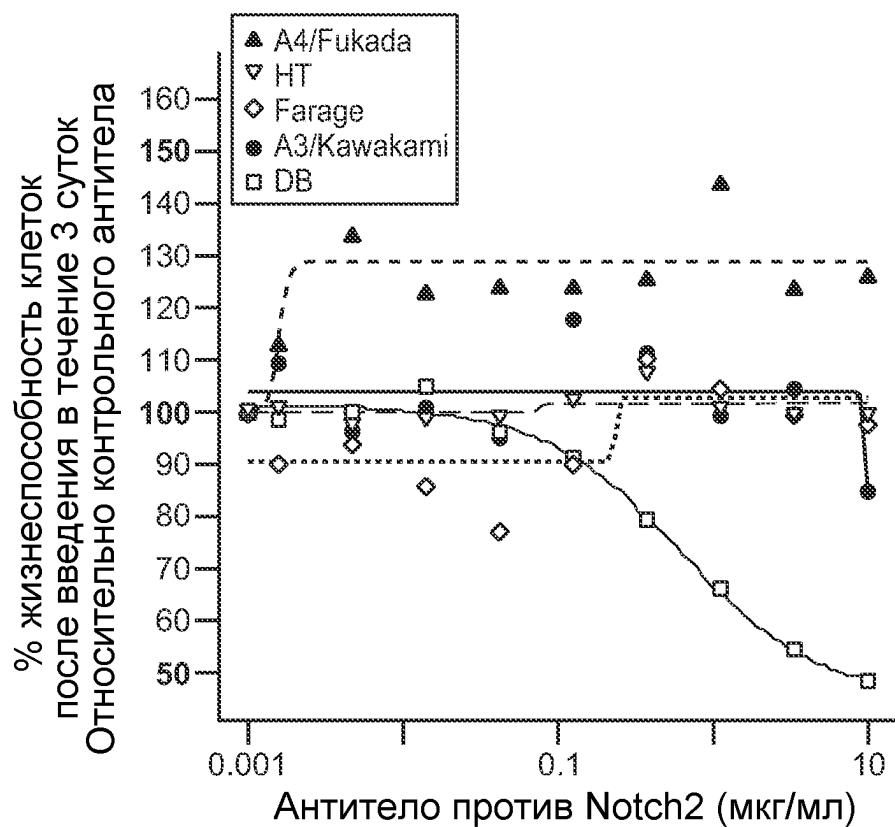


ФИГ. 25А

Жизнеспособность LOX-IMVI в ответ на ингибирование Notch

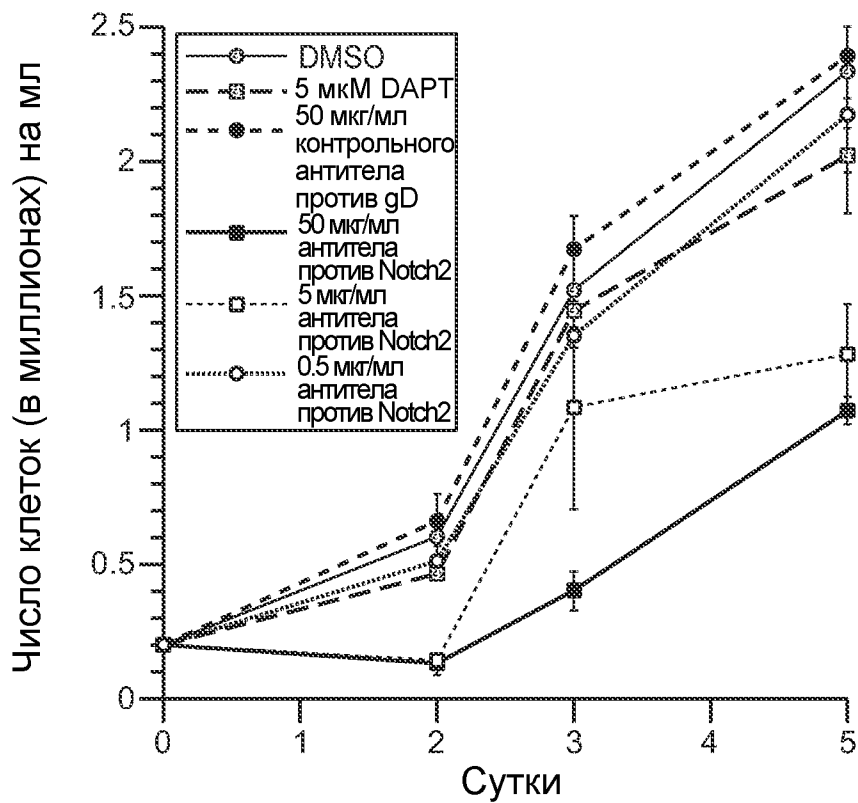


ФИГ. 25В



ФИГ. 26

Рост DLBCL in vitro
Клеточная линия DB



ФИГ. 27