



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102170909 B

(45) 授权公告日 2015. 11. 25

(21) 申请号 200980139202. 1

(22) 申请日 2009. 09. 30

(30) 优先权数据

61/101, 917 2008. 10. 01 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2011. 04. 01

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2009/059028 2009. 09. 30

(87) PCT国际申请的公布数据

W02010/039832 EN 2010. 04. 08

(73) 专利权人 霍夫曼-拉罗奇有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 克里斯蒂安·W·西贝尔 吴岩

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任

公司 11021

代理人 程金山

(51) Int. Cl.

A61K 39/395(2006. 01)

A61P 35/00(2006. 01)

C07K 16/28(2006. 01)

(56) 对比文件

W0 2007145840 A2 , 2007. 12. 21,

W0 2008057144 A2 , 2008. 05. 15,

W0 2008091641 A2 , 2008. 07. 31,

Kang Li 等. Modulation of Notch

Signaling by Antibodies Specific for the Extracellular Negative Regulatory Region

of NOTCH3. 《THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY》. 2008, 第 283 卷 (第 12 期),

Wendy R Gordon 等. Structural basis for autoinhibition of Notch. 《NATURE STRUCTURAL & MOLECULAR BIOLOGY》. 2007, 第 14 卷 (第 4 期),

审查员 王宽

权利要求书1页 说明书78页

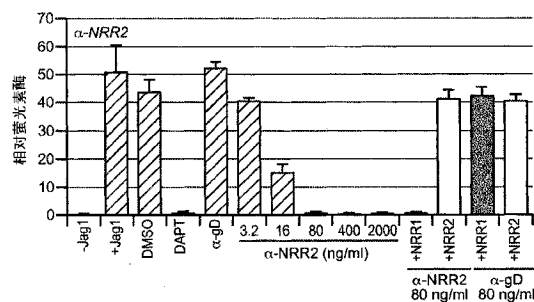
序列表33页 附图36页

(54) 发明名称

抗 -NOTCH2 抗体和使用方法

(57) 摘要

本发明提供抗 -Notch 抗体, 并且具体地, 结合 Notch2NRR 的抗体, 以及使用所述抗体的方法。



1. 一种单克隆抗体,其结合 Notch2 负调节区 (NRR) 的 Lin12/Notch 重复序列 (LNR)-A 结构域和异二聚体结构域 (HD)-C 结构域并抑制 Notch2 活性,其中所述抗体以 $\leq 10\text{nM}$ 的 Kd 结合人和小鼠 Notch2NRR,其中所述抗体包含:

氨基酸序列为 SEQ ID NO:1 的 HVR-H1,氨基酸序列为 SEQ ID NO:4 的 HVR-H2,氨基酸序列为 SEQ ID NO:5 的 HVR-H3,氨基酸序列为 SEQ ID NO:6 的 HVR-L1,氨基酸序列为 SEQ ID NO:11 的 HVR-L2,和氨基酸序列为 SEQ ID NO:15 的 HVR-L3;

氨基酸序列为 SEQ ID NO:2 的 HVR-H1,氨基酸序列为 SEQ ID NO:4 的 HVR-H2,氨基酸序列为 SEQ ID NO:5 的 HVR-H3,氨基酸序列为 SEQ ID NO:7 的 HVR-L1,氨基酸序列为 SEQ ID NO:11 的 HVR-L2,和氨基酸序列为 SEQ ID NO:16 的 HVR-L3;

氨基酸序列为 SEQ ID NO:2 的 HVR-H1,氨基酸序列为 SEQ ID NO:4 的 HVR-H2,氨基酸序列为 SEQ ID NO:5 的 HVR-H3,氨基酸序列为 SEQ ID NO:8 的 HVR-L1,氨基酸序列为 SEQ ID NO:12 的 HVR-L2,和氨基酸序列为 SEQ ID NO:17 的 HVR-L3;或

氨基酸序列为 SEQ ID NO:2 的 HVR-H1,氨基酸序列为 SEQ ID NO:4 的 HVR-H2,氨基酸序列为 SEQ ID NO:5 的 HVR-H3,氨基酸序列为 SEQ ID NO:9 的 HVR-L1,氨基酸序列为 SEQ ID NO:13 的 HVR-L2,和氨基酸序列为 SEQ ID NO:18 的 HVR-L3。

2. 权利要求 1 的抗体,其中所述抗体不显著结合除了 Notch2 之外的 Notch 家族成员。

3. 权利要求 1 的抗体,其还包含选自人重链 (VH) 接纳体 2 构架和人轻链 (VL) κ 亚组 I 共有构架的至少一个构架。

4. 权利要求 1 的抗体,其中重链可变结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO:20 所示,并且轻链可变结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO:22 所示。

5. 权利要求 1 的抗体,其中重链可变结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO:21 所示,并且轻链可变结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NOs:23-25 中任一个所示。

6. 权利要求 1-5 中任一项的抗体,其中所述抗体是选自 Fab, Fab'-SH, Fv, scFv, 或 (Fab')₂ 片段的抗体片段。

7. 权利要求 1-5 中任一项的抗体,其中所述抗体是人抗体、人源化的抗体或嵌合的抗体。

8. 权利要求 1-7 中任一项的抗体用于制备抑制 Notch2 活性的药物的应用,其中所述抗体用于暴露于表达 Notch2 的细胞。

9. 权利要求 1-7 中任一项的抗体用于制备治疗与 Notch2 增加的表达或活性相关的疾病的药物的应用。

10. 权利要求 1-7 中任一项的抗体用于制备治疗 B- 细胞恶性肿瘤的药物的应用。

11. 权利要求 1-7 中任一项的抗体用于制备治疗黑素瘤的药物的应用。

12. 权利要求 1-5 中任一项的抗体,其用作药物。

13. 权利要求 1-5 中任一项的抗体,其用于治疗与 Notch2 增加的表达或活性相关的疾病。

14. 权利要求 1-5 中任一项的抗体,其用于治疗 B 细胞恶性肿瘤。

15. 权利要求 1-5 中任一项的抗体,其用于治疗黑素瘤。

抗 -NOTCH2 抗体和使用方法

[0001] 对相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求提交于 2008 年 10 月 1 日的美国临时申请号 61/101,917 的利益,将其公开内容完全结合在本文作为参考。

发明领域

[0003] 本发明一般涉及分子生物学领域。更具体地,本发明涉及抗 -Notch 抗体,包括抗 -Notch2 负调节区 (NRR) 抗体,及其应用。还提供了抗 -Notch1NRR 抗体和使用方法。

[0004] 背景

[0005] Notch 受体家族是一类进化上保守的跨膜受体,其传递影响广至海胆和人的生物的发育的信号。Notch 受体和它们的配体, δ 和 Serrate (在哺乳动物中已知为 Jagged) 是跨膜蛋白,其具有包含表皮生长因子 (EGF) 样重复序列的大的细胞外结构域。Notch 同源物 (paralogue) 的数目在不同的物种之间不同。例如,在哺乳动物中存在四种 Notch 受体 (Notch1-Notch4),在秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 中存在两种 (LIN-12 和 GLP-1),并且在黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 中存在一种 (Notch)。Notch 受体在运输到细胞表面的过程中,通过弗林蛋白酶样蛋白酶在跨膜结构域的 N 端侧的位点 S1 进行蛋白水解处理,产生细胞外 Notch (ECN) 亚基和 Notch 跨膜亚基 (NTM)。这两个亚基保持非共价缔合并构成成熟的异二聚体细胞表面受体。Notch 受体和 Notch 信号传导途径的综述例如见于 Aster 等, *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 3 :587-613, 2008, 和 Bolos 等, *内分泌学综述 (Endocrine Reviews)* 28 :339-363, 2007。

[0006] Notch2ECN 亚基包含 36 个 N-端 EGF-样重复序列,后接三个在 S1 位点之前的串联重复的 Lin 12/Notch 重复序列 (LNR) 组件。每个 LNR 组件包含三个二硫键和一组预期与钙离子配位的保守的酸性和极性残基。在 EGF 重复序列区域中,存在关于激活配体的结合位点。

[0007] Notch2NTM 包含细胞外区域 (其携有 S2 裂解位点),跨膜区段 (其携有 S3 裂解位点),和包含 RAM23 结构域,6 个锚蛋白重复序列,反式激活结构域和羧基端 PEST 序列的较大细胞内部分。ECN 和 NTM 亚基的稳定的缔合取决于异二聚体结构域 (HD),所述异二聚体结构域包含 ECN 的羧基末端 (术语 HD-N) 和 NTM 的细胞外氨基末端 (术语 HD-C)。在配体诱导的激活前,Notch 通过负调节区 (NRR) 以休眠构象维持,所述负调节区 (NRR) 包含三个 LNRs 和 HD 结构域。Notch2NRR 的晶体结构在 Gordon 等, (2007) *自然结构分子生物学 (Nature Structural & Molecular Biology)* 14 :295-300, 2007 中进行报道。

[0008] Notch 配体与 ECN 亚基的结合起始两个通过调节的膜内蛋白水解发生的连续的蛋白水解裂解。在位点 S2 由金属蛋白酶 (ADAM17) 进行的第一次裂解使 Notch 跨膜亚基对接近于质膜的内小叶 (inner leaflet) 的位点 S3 的第二次裂解敏感。位点 S3 的裂解,由包含早老蛋白和呆蛋白并促进 γ -分泌酶活性的多蛋白复合物催化,释放 Notch 跨膜亚基的细胞内部分,使其移动到细胞核并激活靶基因的转录 (关于 Notch 的蛋白水解裂解的综述,见例如 Sisodia 等, *神经科学的自然综述 (Nat. Rev. Neurosci.)* 3 :281-290, 2002.)。

[0009] 已经在人中鉴定了 5 种 Jagged 和 δ -样类 Notch 配体 (Jagged1 (也称为 Serrate1), Jagged2 (也称为 Serrate2), δ -样 1 (也称为 DLL1), δ -样 3 (也称为 DLL3), 和 δ -样 4 (也称为 DLL4))。每种配体是一种单向 (single-pass) 跨膜蛋白, 其具有对于结合 Notch 是必需的保守 N-端 δ , Serrate, LAG-2 (DSL) 基序。在 DSL 基序 C 端的一系列 EGF 样组件在跨膜区段之前。不象 Notch 受体, 配体在 C 端具有 70-215 个氨基酸的短细胞质尾。此外, 已经报道了其它类型的配体 (例如, DNER, NB3, 和 F3/ 接触蛋白)。关于 Notch 配体和配体介导的 Notch 激活的综述例如见 D' Souza 等, 癌基因 (Oncogene) 27 :5148-5167, 2008)

[0010] Notch 途径在两翼昆虫 (flies) 和脊椎动物中的包括影响神经发生的那些的广泛发育和生理过程中发挥功能。一般地, Notch 信号传导涉及侧抑制、谱系确定以及在细胞的组之间建立边界 (见, 例如 Bray, 分子细胞生物学 (Molecular Cell Biology) 7 :678-679, 2006)。已经显示多种人疾病, 包括癌症和神经变性疾病, 由编码 Notch 受体或其配体的基因中的突变导致 (见, 例如, Nam 等, Curr. Opin. Chem. Biol. 6 :501-509, 2002)。当在人急性淋巴母细胞白血病 (acute lymphoblastic leukemias) (T-ALL) 的子集中鉴定产生人 Notch1 的截短的, 组成性活性的变体的复发的 t(7 ;9) (q34 ;q34.3) 染色体易位时, 首次识别在不可抑制的 Notch 信号传导和恶性肿瘤之间的关联 (见, 例如, Aster 等, Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis. 3 :587-613, 2008)。在小鼠模型中, 已经显示 Notch1 信号传导对于 T 细胞发育是必需的并且 Notch1-介导的信号在损害 B 细胞发育的情况下促进 T 细胞发育 (见, 例如, Wilson 等, J. Exp. Med. 194 :1003-1012, 2001)。

[0011] Notch2 还涉及某些癌症。特别地, Notch2 在 B-细胞慢性淋巴细胞性白血病 (chronic lymphocytic leukemia) (B-CLL) 中过量表达, 这又导致了 CD23, 即一种 B-CLL 细胞标记的过量表达。(见 Hubmann 等, 血液 (Blood) 99 :3742-3747, 2002.)。两种 Notch1 和 Notch2 在多发性骨髓瘤 (multiple myeloma) 细胞 (癌性血浆 B 细胞) 中高度表达, 并且用配体的刺激强烈增加肿瘤细胞生长 (见 Jundt 等, 血液 (Blood) 103 :3511-3515, 2004.)。Notch2 和下游效应物在黑素瘤中过量表达 (见 Hoek 等, 癌症研究 (Cancer Res). 64 :5270-5282, 2004 ;Seykora 等, Am J Dermatopathol 25 :6-11, 2003), 和 Notch2 基因座重复地在黑素瘤细胞系中扩增 (Jonsson 等, 癌基因 (Oncogene), 26 :4738-4748, 2007)。此外, 许多研究将异常的 Notch2 信号传导与乳腺癌和其它实体瘤相关联 (由 Leong 和 Karsay, 血液 (Blood) 107 :2223-2233, 2006 综述)。Notch2 对于边缘区 B 细胞发育也是需要的 (见 Pillai 等, Annu. Rev. Immunol. 23 :161-196, 2005.)。

[0012] 考虑到 Notch 信号传导涉及多种多样的人类疾病, 因此显然继续存在对于调节 Notch 信号传导和具有有利于发育的临床品质的作为治疗剂的药剂的需要。本文描述的本发明满足这一需要, 并且提供其它的益处。

[0013] 本文引用的所有参考文献, 包括专利申请和出版物, 全部内容结合在本文作为参考。

[0014] 发明简述

[0015] 本发明提供抗 -Notch 抗体和使用所述抗体的方法。

[0016] 在一个方面中, 提供结合 Notch2NRR 的单克隆抗体。在一个实施方案中, 所述抗体抑制 Notch2 活性。在另一个实施方案中, 抗体不显著结合除了 Notch2 之外的 Notch 家族

成员。在另一个实施方案中,抗体结合小鼠 Notch2NRR 和人 Notch2NRR。在另一个实施方案中,抗体以 $\leq 10\text{nM}$ 的 K_d 结合 Notch2NRR。

[0017] 在另一个实施方案中,提供结合 Notch2NRR 的单克隆抗体,其中所述抗体包含:

[0018] (a)HVR-H1,其包含符合 SEQ ID NO :3 的共有序列的氨基酸序列;

[0019] (b)HVR-H2,其包含 SEQ ID NO :4 的氨基酸序列;

[0020] (c)HVR-H3,其包含 SEQ ID NO :5 的氨基酸序列;

[0021] (d)HVR-L1,其包含符合 SEQ ID NO :10 的共有序列的氨基酸序列;

[0022] (e)HVR-L2,其包含符合 SEQ ID NO :14 的共有序列的氨基酸序列;和

[0023] (f)HVR-L3,其包含符合 SEQ ID NO :19 的共有序列的氨基酸序列。

[0024] 在一个这样的实施方案中,抗体包含含有选自 SEQ ID NOs :1-2 的氨基酸序列的 HVR-H1 ;含有选自 SEQ ID NOs :6-9 的氨基酸序列的 HVR-L1 ;含有选自 SEQ ID NOs :11-13 的氨基酸序列的 HVR-L2 ;和含有选自 SEQ ID NOs :15-18 的氨基酸序列的 HVR-L3。在一个这样的实施方案中,HVR-H1 含有 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列,HVR-L1 含有 SEQ ID NO :6 的氨基酸序列,HVR-L2 含有 SEQ ID NO :11 的氨基酸序列,并且 HVR-L3 含有 SEQ ID NO :15 的氨基酸序列。在另一个这样的实施方案中,HVR-H1 含有 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列,HVR-L1 含有 SEQ ID NO :7 的氨基酸序列,HVR-L2 含有 SEQ ID NO :11 的氨基酸序列,并且 HVR-L3 含有 SEQ ID NO :16 的氨基酸序列。在另一个这样的实施方案中,HVR-H1 含有 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列,HVR-L1 含有 SEQ ID NO :8 的氨基酸序列,HVR-L2 含有 SEQ ID NO :12 的氨基酸序列,HVR-L3 含有 SEQ ID NO :17 的氨基酸序列。在另一个所述实施方案中,HVR-H1 含有 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列,HVR-L1 含有 SEQ ID NO :9 的氨基酸序列,HVR-L2 含有 SEQ ID NO :13 的氨基酸序列,HVR-L3 含有 SEQ ID NO :18 的氨基酸序列。在上述实施方案之一,抗体还包含选自人 VH 接纳体 2 构架和人 VL κ 亚组 I 共有构架的至少一个构架。

[0025] 在另一个方面中,提供结合 Notch2NRR 的单克隆抗体,其中所述抗体包含与选自 SEQ ID NO :20-21 的氨基酸序列具有至少 90% 序列同一性的重链可变结构域和与选自 SEQ ID NO :22-25 的氨基酸序列具有至少 90% 序列同一性的轻链可变结构域。在一个实施方案中,抗体包含与 SEQ ID NO :20 的氨基酸序列具有至少 90% 序列同一性的重链可变结构域和与 SEQ ID NO :22 的氨基酸序列具有至少 90% 序列同一性的轻链可变结构域。在一个这样的实施方案中,所述重链可变结构域含有 SEQ ID NO :20 的氨基酸序列,并且轻链可变结构域含有 SEQ ID NO :22 的氨基酸序列。在另一个实施方案中,所述抗体含有与 SEQ ID NO :21 的氨基酸序列具有至少 90% 序列同一性的重链可变结构域,以及与选自 SEQ ID NOs :23-25 的氨基酸序列具有至少 90% 序列同一性的轻链可变结构域。在一个这样的实施方案中,重链可变结构域含有 SEQ ID NO :21 的氨基酸序列,并且轻链可变结构域含有选自 SEQ ID NOs :23-25 的氨基酸序列。

[0026] 在另一个方面中,提供这样的分离的抗体,所述抗体结合与选自抗体 D、抗体 D-1、抗体 D-2 或抗体 D-3 的抗体相同的表位。在另一个方面中,提供这样的分离的抗体,所述抗体结合 Notch2 的 LNR-A 结构域和 HD-C 结构域。

[0027] 在另一个方面中,抗 -Notch2NRR 抗体是选自 Fab, Fab' -SH, Fv, scFv, 或 (Fab')₂ 片段的抗体片段。在另一个方面中,抗 -Notch2NRR 抗体是人源化的、嵌合的或人抗体。

[0028] 上述实施方案的任一个可以是单独的或组合的。

[0029] 在另一个方面中,提供抑制 Notch2 活性的方法,所述方法包括使表达 Notch2 的细胞暴露于上述实施方案中任一项的抗体。在另一个方面中,提供治疗与 Notch2 增加的表达或活性相关的疾病的方法,所述方法包括向需要其的受试者施用有效量的上述实施方案中任一项的抗体。在另一个方面中,提供治疗 B- 细胞恶性肿瘤的方法,所述方法包括向需要其的受试者施用有效量的上述实施方案中任一项的抗体。在另一个方面中,提供治疗黑色素瘤的方法,所述方法包括向需要其的受试者施用有效量的上述实施方案中任一项的抗体。

[0030] 在另一个方面中,提供治疗与 Notch1 增加的表达或活性相关的疾病的方法,所述方法包括向需要其的受试者共同施用有效量的抗 -Notch1NRR 抗体和选自地塞米松(dexamethasone) 和他莫昔芬(tamoxifen) 的治疗剂,其中所述治疗剂减少由所述抗体导致的改变的肠细胞分化。在一个这样的实施方案中,所述疾病是 T 细胞恶性肿瘤。

[0031] 附图简述

[0032] 图 1 显示被称为抗体 D, 抗体 D-1, 抗体 D-2, 和抗体 D-3 的抗 -Notch2NRR 单克隆抗体的 H1, H2, 和 H3 重链高变区(HVR) 序列,如在实施例 B(1) 中所述。氨基酸位置按照 Kabat 编号系统进行编号,如下所述。

[0033] 图 2 显示被称为抗体 D, 抗体 D-1, 抗体 D-2, 和抗体 D-3 的抗 -Notch2NRR 单克隆抗体的 L1, L2, 和 L3 轻链 HVR 序列,如在实施例 B(1) 中所述。氨基酸位置按照 Kabat 编号系统进行编号,如下所述。

[0034] 图 3 显示抗体 D、抗体 D-1、抗体 D-2 和抗体 D-3 的重链可变区序列的比对。在盒中附上 HVRs,如在实施例 B(1) 中所述。

[0035] 图 4 显示抗体 D、抗体 D-1、抗体 D-2 和抗体 D-3 的轻链可变区序列的比对。在盒中附上 HVRs。

[0036] 图 5A 和 5B 显示用于实施本发明的示例性接纳体人可变重链(VH) 共有构架序列。序列标识符如下:

[0037] - 人 VH 亚组 I 共有构架“A”减去 Kabat CDRs (SEQ ID NOs :32, 33, 34, 35)。

[0038] - 人 VH 亚组 I 共有构架“B,” “C,” 和“D”减去延伸的高变区 (SEQ ID NOs :36, 37, 34, 35 ;SEQ ID NOs :36, 37, 38, 35 ;和 SEQ ID NOs :36, 37, 39, 35)。

[0039] - 人 VH 亚组 II 共有构架“A”减去 Kabat CDRs (SEQ ID NOs :40, 41, 42, 35)。

[0040] - 人 VH 亚组 II 共有构架“B,” “C,” 和“D”减去延伸的高变区 (SEQ ID NOs :43, 44, 42, 35 ;SEQ ID NOs :43, 44, 45, 35 ;和 SEQ ID NOs :43, 44, 46, 和 35)。

[0041] - 人 VH 亚组 III 共有构架“A”减去 Kabat CDRs (SEQ ID NOs :47, 48, 49, 35)。

[0042] - 人 VH 亚组 III 共有构架“B,” “C,” 和“D”减去延伸的高变区 (SEQ ID NOs :50, 51, 49, 35 ;SEQ ID NOs :50, 51, 52, 35 ;和 SEQ ID NOs :50, 51, 53, 35)。

[0043] - 人 VH 接纳体构架“A”减去 Kabat CDRs (SEQ ID NOs :54, 48, 55, 35)。

[0044] - 人 VH 接纳体构架“B”和“C”减去延伸的高变区 (SEQ ID NOs :50, 51, 55, 35 ;和 SEQ ID NOs :50, 51, 56, 35)。

[0045] - 人 VH 接纳体 2 构架“A”减去 Kabat CDRs (SEQ ID NOs :54, 48, 57, 35)。

[0046] - 人 VH 接纳体 2 构架“B,” “C,” 和“D”减去延伸的高变区 (SEQ ID NOs :50, 51, 57, 35 ;SEQ ID NOs :50, 51, 58, 35 ;和 SEQ ID NOs :50, 51, 59, 35)。

[0047] 图 6 显示用于实施本发明的示例性接纳体人可变轻链(VL) 共有构架序列。序列

标识符如下：

[0048] - 人 VL κ 亚组 I 共有构架 (κ v1) :SEQ ID NOs :60,61,62,63

[0049] - 人 VL κ 亚组 II 共有构架 (κ v2) :SEQ ID NOs :64,65,66,63

[0050] - 人 VL κ 亚组 III 共有构架 (κ v3) :SEQ ID NOs :67,68,69,63

[0051] - 人 VL κ 亚组 IV 共有构架 (κ v4) :SEQ ID NOs :70,71,72,63

[0052] 图 7 显示 huMAb4D5-8 轻链和重链的构架序列。以上标 / 粗体表示的数字指示根据 Kabat 的氨基酸位置。

[0053] 图 8 显示具有指定的修饰的 huMAb4D5-8 轻链和重链的构架序列。以上标 / 粗体表示的数字指示根据 Kabat 的氨基酸位置。

[0054] 图 9A 和 9B 显示特异性结合它们的关联受体的抗 -NRR1 和抗 -NRR2 抗体,如在实施例 B(1) 中所述。(A)ELISA 测定法,其测量抗 -NRR1(左图)和抗 -NRR2(右图)与来自四种人(h)和鼠(m)Notch 受体的每种的纯化的 NRR 蛋白片段的结合。将在 y 轴上以 A_{560} 描述的结合针对抗 -NRR1 或抗 -NRR2 的滴定进行作图。(B)FACS 测定法,其测量抗 -NRR1(组图 1-6)或抗 -NRR2(组图 7-12)与未转染的 K1-CHO 细胞(组图 1,4,7 和 10),稳定转染了 N-myc-Notch1 的 K1-CHO 细胞(组图 2,5,8 和 11)或稳定转染了 N-myc-Notch2 的 K1-CHO 细胞(组图 3,6,9 和 12)的结合。N-myc-Notch 转基因在可诱导的 tet 启动子的控制下表达;底部的行,在缺乏用多西环素(doxycycline)诱导的情况下的对照表达(-Dox);顶部的行,在添加多西环素后诱导的表达(+Dox);注意,K1-CHO 系内源表达 Notch2,其在存在和不存在多西环素的情况下由抗 -NRR2 检测(例如,比较组图 7 和 10)。

[0055] 图 10A-C 显示抗 -NRR1 和抗 -NRR2 特异性抑制来自它们的靶向受体的信号传导,所述靶向的受体包括携带激活的突变的受体,如在实施例 B(2) 和 B(3) 中所述。(A) 共同培养测定法,其测量 Notch1 信号传导的抗 -NRR1 抑制。将稳定转染 Jag1 的 NIH-3T3 细胞用于诱导稳定转染了 Notch1 的 NIH-3T3 细胞中的 Notch 信号传导(除了“-Jag1”,其使用未转染的 NIH-3T3 细胞取代表达 Jag1 的细胞)。使用 Notch 报道基因(CSL- 依赖性启动子驱动的萤火虫萤光素酶的表达)测量 Notch 信号传导并且相对于根据 DAPT 条件标准化的对照基因表达(组成型启动子驱动的 Renilla 萤光素酶的表达)(定义为 1 的值)来表达所述 Notch 信号传导。+Jag1,标准的共培养测定法;DMSO,单独的 DAPT 赋形剂;在 DMSO 中的 5 μ M DAPT; α -gD,2000ng/ml 的同种型对照抗体; α -NRR1,在指定浓度的抗 -NRR1 抗体;最后四次测定法包括 80ng/ml 的 α -NRR1 或 α -gD 加纯化的 Notch1 或 Notch2NRR 蛋白片段,如所指定(+NRR1 或 +NRR2)。(B) 共同培养测定法,其测量 Notch2 信号传导的抗 -NRR2 抑制。将稳定转染了 Jag1 的 NIH-3T3 细胞用于诱导在表达高水平的 Notch2 的 U87MG 细胞中的 Notch 信号传导。如在(A)中所述进行测定法。(C) 共同培养测定法,其测量来自野生型或突变体 Notch1 受体的 Notch1 信号传导的抗 -NRR1 抑制。如在(A)中所述进行该测定法,除了通过瞬时转染表达指定的 Notch1 受体的质粒产生表达受体的细胞。WT,野生型 Notch1; Δ PEST,缺乏 PEST 结构域的 Notch1;L1594P,携带指定的组成型激活的点突变的 Notch1;E25,625ng/ml 同种型对照抗体; α -NRR1,625ng/ml 抗 -NRR1 抗体;DMSO,单独的 GSI 赋形剂;在 DMSO 中的 5 μ M DAPT;CmpE,在 DMSO 中的 1 μ M 化合物 E。

[0056] 图 11A-D 显示抗 -NRR1 和抗 -NRR2 作为受体特异性抑制剂在体内发挥功能,如在实施例 B(4) 中所述。将 Balb/c 小鼠以 5mg/kg 的 α -gD 同种型对照、 α -NRR1 或 α -NRR2

每四天四次地注射,并且在第四次给药后一天,即在第 13 天将细胞从胸腺或脾中收集。(A) 胸腺重量测量。相对于总的体重(以 g 表示)表示胸腺重量(以 mg 表示)。值表示关于每组三只小鼠的平均值加标准偏差。(B) 胸腺细胞计数。(C) CD4 和 CD8FACS,以鉴定 CD4⁺/CD8⁺ 双阳性 T 细胞。数字表示在双阴性、单阳性和双阳性群体中的胸腺细胞的百分比。相对于抗 -gD 对照 (77.5%),抗 -NRR1 显著减少了细胞在 CD4⁺/CD8⁺ 群体中的百分比 (5.89%),而抗 -NRR2 (80%) 没有明显的作用。(D) CD21 和 CD23FACS,来鉴定边缘区 B 细胞。数字表示在 MZB 门控 (gate) 中的细胞的平均百分比 $\pm$ 标准偏差 (来自三只动物),其以框表示;还注释 p 值;对来自每组的三只动物之一的代表点图进行作图。相对于抗 -gD 对照 (6.61%),抗 -NRR2 几乎消除了 MZB 细胞 (0.97%),而抗 -NRR1 (6%) 不具有显著作用。

[0057] 在图 12A-D 中,抗 -NRR1Fab/NRR1 共晶体的 2.2Å 结构显示抗 -NRR1 同时接触 LNR-A, LNR-B 和 HD-C 结构域,如在实施例 B(5) 中所述。(A) 表总结了 α -NRR1 或 α -NRR2 与 Notch1-NRR 或 Notch2NRR 嵌合蛋白片段的结合。指定的 NRR 蛋白片段(深蓝, Notch1 序列;浅蓝, Notch2 序列)作为融合于碱性磷酸酶的分泌的蛋白表达从而使抗体结合能够在基于板的测定法中快速测量。在使用碱性磷酸酶活性对 NRR 表达和分泌进行标准化后,将包含指定的 NRR 嵌合蛋白的培养基加入已经用 α -NRR1, α -NRR2 或同种型对照抗体(用于评估背景结合,未显示)包被的 96 孔板中。通过测量与所述板保持结合的碱性磷酸酶活性来评估抗体结合。Y, 强结合;N, 没有观察到结合;W, 观察到的较弱结合。(B) 人 Notch NRR1 的结构。将 NRR1 显示为 C- α 草图 (cartoon)。将在 LNR 基序中的三个钙离子显示为球体。S2 裂解位点的位置用箭头标记。(C) 基于结构上保守的原子的 NRR1 在 NRR2(来自 pdb 编码 2004 的链 A) 上的叠加。将 NRR1(阴影)和 NRR2(白色)显示为 C- α 踪迹。(D) 在 NRR1(左)和 α -NRR1Fab(右,在重链和轻链之间的边界,显示为黑色虚线)之间的界面的清楚视图。显示溶剂可及的表面区域被复合物形成包埋 (buried) 的程度。标记被包埋至少 50% 的残基,其中将在 Notch1 和 Notch2 中相同的 NRR 残基以黑色字体标记(还见图 18)。

[0058] 图 13A-C 显示抗 -NRR1 导致内皮细胞高度芽生 (hypersprouting),如在实施例 B(6) 中所述。(A) 体外内皮细胞芽生测定法。HUVECs 被包被在 Cytodex 珠上并且与皮肤成纤维细胞共同培养。将培养物进行模拟处理(对照)或用 1 μ M 的 DBZ, 5 μ g/ml 的 α -NRR1 或 5 μ g/ml 的 α -D114 进行处理。棒 = 100 μ m。(B) 从在 (A) 中的培养物进行的芽长度测量。(C) 关于内皮细胞芽生和血管发生进行的新生小鼠视网膜测定。将新生小鼠在 P1 和 P3 用指定的抗体进行注射,并且在 P5 制备视网膜从而观察增殖的同工凝集素或 Ki67 标记的灌注。组图 I 和 II,棒 = 1mm。组图 III-VI 表示组图 I 和 II 的部分的增大,棒 = 0.2mm。

[0059] 图 14A-E 显示 Notch1 信号传导的选择性抗体封闭破坏肿瘤血管发生并且抑制肿瘤生长,如在实施例 B(7) 中所述。在用指定的抗体: α -豚草(阴性对照), α -VEGF 或 α -NRR1 处理后,关于三种肿瘤异种移植模型显示肿瘤体积(平均值 $\pm$ SEM) 对比时间的图表。关于 α -豚草对比 α -NRR1 比较显示 P 值。(A) Calu6 模型。(B) HM7 模型。(C) 关于 α -NRR1 剂量滴定的 HM7 模型。(D) 来自显示在 (A) 中的 Calu6 模型的代表性肿瘤切片的内皮细胞染色。在顶部显示在异种移植模型中所用的抗体。将 DAPI 和 α -CD31 分别用于对 DNA 和内皮细胞染色。板的底排显示合并的图像。棒 = 50 μ m。(E) CD31 染色的量化显示在 (D) 中。使用图像 J 来量化图像中的 CD31 和 DAPI 染色,类似于在 (D) 中显示的那些,

将相对 CD31 染色（被标准化为 DAPI 染色的 CD31 染色）关于三种抗体处理的每种，相对于 α -豚草对照（将其设定为 1 的值）进行作图；数据表示在 8 个图像域内的平均值 $\pm$ 标准偏差。

[0060] 图 15A-C 显示 Notch1 的选择性抗体封闭足以改变小肠中的细胞命运 (fate)，如在实施例 B(8) 中所述。(A) 总的体重变化（平均值 $\pm$ 标准偏差）对比时间。将小鼠如图 11 所述，用抗 -gD 同种型对照、LT β R-Fc、抗 -NRR1 或抗 -NRR2 进行处理。箭头标记给药天数。(B) 小肠的免疫组化分析。将小鼠用指定浓度的抗 -gD 同种型对照、DBZ 或抗 -NRR1 在第 0、2 和 6 天进行处理，并且在第 7 天制备小肠用于免疫组化分析。在指定的每排，显示关于苏木精和曙红 (H&E)，关于黏蛋白并且标记分泌杯形细胞的爱茜蓝，标记帕内特细胞的溶菌酶，关于增殖的 Ki-67 和作为 Notch 下游靶标的 Hes1 的染色。见图 19 和 20 分别关于在第 7 天的大肠和在第 2 天的小肠的分析。棒 = 40 μ m。(C) 关于小肠细胞分化比较 Notch1- 对比 Notch2- 的特异性抑制。在用指定的 α -gD, α -NRR1 或 α -NRR2 的最后一次给药后 1 天，关于爱茜蓝和 Ki-67 制备在 (A) 中所述的研究的小肠。棒 = 50 μ m。

[0061] 图 16 显示抗 -NRR1 是由多种配体诱导的 Notch1 信号传导的潜在抑制剂，如在实施例 B(2) 中所述。如在图 10A 中所述进行 Notch1 信号传导的共同培养测定，除了表达指定的 Jag1, Jag2 或 D111 的配体表达细胞之外。

[0062] 图 17 显示低产率的 Notch1NRR/Notch2NRR 嵌合蛋白构建体，如在实施例 B(5) 中所述。表补充图 12A，列举了产生较少或无分泌的碱性磷酸酶活性的 NRR 嵌合蛋白，提示嵌合体错折叠或是不稳定的。对于产生较弱但是可检测的碱性磷酸酶活性的那些片段，总结 α -NRR1 或 α -NRR2 的结合。---，无表达和不可测试的结合；N，无表达或结合；W，较弱的表达或结合。

[0063] 图 18 显示与抗 -NRR1 接触的 NRR1 残基的保守性，如在实施例 B(1) 和 B(5) 中所述。人 Notch1NRR 结构域 (SEQ ID NO:26)，小鼠 Notch1NRR 结构域 (SEQ ID NO:27)，人 Notch2NRR 结构域 (SEQ ID NO:28) 和小鼠 Notch2NRR 结构域 (SEQ ID NO:29) 的氨基酸序列比对，其中在右侧显示亚结构域边界。将人 Notch1NRR 列举为参照序列，并且将与在人 Notch1 中的那些相同的其它 NRR 序列中的残基以粗体字体显示。概括了至少 25% 包埋抗 -NRR1-Fab/Notch1-NRR 结构 (图 12) 中的残基，其中实线对比虚线反映了残基包埋的增加的程度。在至少 25% 包埋在人 Notch1 序列中的 21 个氨基酸中，在小鼠 Notch1 序列中的所有 21 个是相同的，但是仅 6 个在人和小鼠 Notch2 序列中是相同的（加上 T 取代在人 Notch1S1712 的 S 的第 7 个保守性差异）；在 Notch2 序列中的这些相同和“包埋”的残基中，没有在 > 75% 包埋类别中的。这种序列比较与 (a) 和人与小鼠 Notch1 的强烈抗 -NRR1 结合（约相同的亲和性）以及 (b) 缺乏抗 -NRR1 与人和小鼠 Notch2 的结合一致。而且，包埋的残基都位于 LNR-A, LNR-B 和 HD-C 中，与在图 11A 和 17 中显示的结构域交换实验一致。

[0064] 图 19 显示 Notch1 的选择性抗体封闭足以改变在大肠中的细胞命运，如在实施例 B(8) 中所述。来自在图 15B 中所述实验的在第 7 天取的大肠样品的组织病理学分析。

[0065] 图 20 显示在封闭 Notch1 后 2 天的小肠细胞命运变化发展，如在实施例 B(8) 中所述。来自在图 15B 所述实验的在第 2 天取的小肠样品的组织病理学分析，其显示在第 7 天取的样品。

[0066] 图 21 显示抗 -NRR1 并没有体外封闭 Notch2- 诱导的信号传导，如在实施例 B(2) 中

所述。在 U87MG 细胞中的共培养测定法,如在图 10B 中所述。尽管抗 -NRR1 在体外(图 10A)和在体内(图 11A-C)有效抑制 Notch1 信号传导,但其没有影响 Notch2 信号传导,甚至当以高于 IC_{50} 100 倍以上的浓度(1000ng/ml)使用时也是如此。该结果同抗 -NRR1 与 Notch1 的特异性结合(图 9 和 12)以及 Notch2 的抗 -NRR1 抑制在体内的缺乏相一致(图 11D)。

[0067] 图 22 显示抗 -NRR1 和抗 -NRR2 对小肠细胞分化的可能的协同作用,如在实施例 B8 中所述。

[0068] 图 23 显示地塞米松至少部分地拯救由抗 -NRR1 导致的小肠表型,如在实施例 B(9)中所述。

[0069] 图 24A 和 B 显示 Notch1 或 Notch2 的选择性封闭使与 pan-Notch 抑制相关的杯形细胞化生最小化或避免这样的杯形细胞化生,而封闭 Notch1 和 Notch2 导致严重的杯形细胞化生。(A)如在实施例 B8 中所述,将小鼠用 5mg/kg 的抗 -NRR1,抗 -NRR2,或两者,或阴性对照抗体抗 -gD 在用箭头标记的当天进行给药;显示总的体重变化(平均值 $\pm$ 标准偏差)对比时间。(B)对在(A)中处理的小鼠的小肠的免疫组化分析,使用关于黏蛋白的爱茜蓝来标记分泌性杯形细胞。

[0070] 图 25A 和 25B 显示抗 -NRR2(称为“抗 -N2”)在体外抑制人黑素瘤细胞系 SK23 和 LOX-IMVI 的生长,如在实施例 B(10)中所述。

[0071] 图 26 显示抗 -NRR2(被称为“抗 -Notch2”)对五种扩散的大 B-细胞淋巴瘤(DLBCL)细胞系(在右侧列举)的作用。如在实施例 B(11)中所述,细胞系之一,“DB,”的生长强烈地通过用抗 -NRR2 处理而被抑制。

[0072] 图 27 显示抗 -NRR2(被称为“抗 -Notch2”)随时间对 DB DLBCL 细胞系的生长的作用,如在实施例 B(11)中所述。

[0073] 本发明实施方案详述

[0074] 本发明提供结合 Notch 的分离的抗体和使用所述抗体的方法,例如用于诊断或治疗与 Notch 的表达或活性相关的疾病。

[0075] I. 一般技术

[0076] 本文所述或参考的技术和方法通常是充分了解的,并且由本领域技术人员使用常规方法一般应用,如例如,在下述参考文献中所述广泛使用的方法: Sambrook 等., 分子克隆:实验室手册(Molecular Cloning: A Laboratory Manual), 第 3 版(2001) 冷泉港实验室出版社,冷泉港, N. Y. 在分子生物学中目前使用的方法(CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY)(F. M. Ausubel, 等. 编辑, (2003)); 酶学方法(Methods IN ENZYMOLOGY)系列(学术出版社公司): PCR 2: 实用方法(PCR 2: A PRACTICAL APPROACH)(M. J. MacPherson, B. D. Hames 和 G. R. Taylor 编辑(1995)), Harlow 和 Lane, 编辑(1988) 抗体, 实验室手册, 和动物细胞培养(ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, and ANIMAL CELL CULTURE)(R. I. Freshney, 编辑(1987)); 寡核苷酸合成(Oligonucleotide Synthesis)(M. J. Gait, 编辑, 1984); 分子生物学方法(Methods in Molecular Biology), Humana 出版社; 细胞生物学: 实验室笔记(Cell Biology: A Laboratory Notebook)(J. E. Cellis, 编辑, 1998) 学术出版社; 动物细胞培养(Animal Cell Culture)(R. I. Freshney), 编辑, 1987); 细胞和组织培养介绍(Introduction to Cell and Tissue Culture)(J. P. Mather 和 P. E. Roberts, 1998) Plenum 出版社; 细胞和组织培养: 实验室方法(Cell and Tissue Culture: Laboratory

Procedures) (A. Doyle, J. B. Griffiths, 和 D. G. Newell, 编辑, 1993-8) J. Wiley 和 Sons ; 实验室免疫学手册 (Handbook of Experimental Immunology) (D. M. Weir 和 C. C. Blackwell, 编辑) ; 哺乳动物细胞基因转移载体 (Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells) (J. M. Miller 和 M. P. Calos, 编辑, 1987) ; PCR : 聚合酶链式反应 (PCR : The Polymerase Chain Reaction), (Mullis 等., 编辑, 1994) ; 免疫学目前使用的方法 (Current Protocols in Immunology) (J. E. Coligan 等., 编辑, 1991) ; 分子生物学中的简便方法 (Short Protocols in Molecular Biology) (Wiley 和 Sons, 1999) ; 免疫生物学 (Immunobiology) (C. A. Janeway 和 P. Travers, 1997) ; 抗体 (Antibodies) (P. Finch, 1997) ; 抗体 : 实用方法 (Antibodies : A Practical Approach) (D. Catty., 编辑, IRL 出版社, 1988-1989) ; 单克隆抗体 : 实用方法 (Monoclonal Antibodies : A Practical Approach) (P. Shepherd 和 C. Dean, 编辑, 牛津大学出版社, 2000) ; 使用抗体 : 实验室手册 (Using Antibodies : A Laboratory Manual) (E. Harlow 和 D. Lane (冷泉港实验室出版社, 1999) ; 抗体 (The Antibodies) (M. Zanetti 和 J. D. Capra, 编辑, Harwood 学术出版社, 1995) ; 和癌症 : 肿瘤学的原理和实践 (Cancer : Principles and Practice of Oncology) (V. T. DeVita 等., 编辑, J. B. Lippincott 公司, 1993)。

[0077] II. 定义

[0078] 出于解释本说明书的目的, 应用下面的定义, 并且只要适合, 以单数使用的术语也包括复数形式, 并且反之亦然。当在下面提出的任何定义与作为参考结合在本文中的任何文献冲突时, 以下面的定义为准。

[0079] 术语“抗体”在本文以最广义使用, 具体地涵盖单克隆抗体、多克隆抗体、由至少两种完整抗体形成的多特异性抗体 (例如双特异性抗体)、及抗体片段, 只要它们展现出期望的生物学活性。

[0080] “分离的抗体”指已经鉴定且与其天然环境的成分分离和 / 或从其回收的抗体。抗体的天然环境的污染性成分指将会干扰其研究、诊断或治疗用途的物质, 可包括酶、激素、和其它蛋白质性质或非蛋白质性质的溶质。在某些实施方案中, 将抗体纯化至 (1) 通过例如 Lowry 法的测定, 超过 95 重量%的抗体, 并且在一些实施方案中, 纯化至超过 99 重量%的抗体, (2) 足以通过使用例如转杯式测序仪 (spinning cup sequenator) 获得至少 15 个残基的 N- 末端或内部氨基酸序列的程度, 或 (3) 通过使用例如考马斯蓝或银染色在还原性或非还原性条件下的 SDS-PAGE, 达到同质。既然抗体的天然环境的至少一种成分不会存在, 那么分离的抗体包括重组细胞内的原位抗体。然而, 分离的抗体通常通过至少一个纯化步骤来制备。

[0081] “天然抗体”通常是约 150, 000 道尔顿的异四聚体糖蛋白, 所述糖蛋白由两条相同的轻链 (L) 和两条相同的重链 (H) 组成。将每条轻链通过一个共价二硫键连接于重链, 而二硫键的数目在不同的免疫球蛋白同种型的重链之间变化。每条重链和轻链也具有规则间隔的链内二硫键。每条重链在一端具有可变结构域 (V_H), 其后是许多恒定结构域。每条轻链在一端具有可变结构域 (V_L) 并且在其另一端具有恒定结构域; 将轻链的恒定结构域与重链的第一恒定结构域比对, 而将轻链可变结构域与重链可变结构域进行比对。认为特定氨基酸残基形成轻链和重链可变结构域之间的界面。

[0082] 术语“抗-Notch1NRR 抗体”或“结合 Notch1NRR 的抗体”指能够以足够的亲和性

结合 Notch1NRR 从而使抗体可以用作靶向 Notch1 的诊断剂和 / 或治疗剂的抗体。优选地, 抗 -Notch1NRR 抗体与不相关的非 Notch 蛋白结合的程度少于如通过例如放射性免疫测定法 (RIA) 测量的抗体与 Notch1NRR 结合的约 10%。在某些实施方案中, 结合 Notch1NRR 的抗体具有 $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100\text{nM}$, $\leq 10\text{nM}$, $\leq 1\text{nM}$, 或 $\leq 0.1\text{nM}$ 的解离常数 (Kd)。在某些实施方案中, 抗 -Notch1NRR 抗体结合这样的 Notch 的表位, 其在来自不同物种, 例如啮齿动物 (小鼠, 大鼠) 和灵长类动物的 Notch 中是保守的。

[0083] 术语“抗 -Notch2NRR 抗体”或“结合 Notch2NRR 的抗体”指能够以足够的亲和性结合 Notch2NRR 从而使抗体可以用作靶向 Notch2 的诊断剂和 / 或治疗剂的抗体。优选地, 抗 -Notch2NRR 抗体与不相关的非 Notch 蛋白结合的程度少于如通过例如放射性免疫测定法 (RIA) 测量的抗体与 Notch2NRR 结合的约 10%。在某些实施方案中, 结合 Notch2NRR 的抗体具有 $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100\text{nM}$, $\leq 10\text{nM}$, $\leq 1\text{nM}$, 或 $\leq 0.1\text{nM}$ 的解离常数 (Kd)。在某些实施方案中, 抗 -Notch2NRR 抗体结合这样的 Notch 的表位, 其在来自不同物种, 例如啮齿动物 (小鼠, 大鼠) 和灵长类动物的 Notch 中是保守的。

[0084] 抗体的“可变区”或“可变结构域”指抗体的重链或轻链的氨基端结构域。重链的可变结构域可以称为“VH”。轻链的可变结构域可以称为“VL”。这些结构域通常是抗体最可变的并且包含抗原结合位点。

[0085] 术语“可变的”指可变结构域中的某些部分在抗体间序列差异广泛且用于每种特定抗体对其特定抗原的结合和特异性的事实。然而, 变异性并非均匀分布于抗体的整个可变结构域。它集中于轻链和重链可变结构域中称作高变区 (HVRs) 的三个区段。可变结构域中更加高度保守的部分被称作构架区 (FR)。天然重链和轻链的可变结构域各自包含四个 FR 区, 它们大多采取 β -折叠构象, 通过形成环状连接且在有些情况中形成 β -折叠结构一部分的三个 HVRs 连接。每条链中的 HVRs 通过 FR 区非常接近的保持在一起, 并与另一条链的 HVRs 一起促成抗体的抗原结合位点的形成 (参见 Kabat 等, 免疫目的蛋白序列 (Sequences of Proteins of Immunological Interest), 第 5 版, 国家健康研究所 (National Institute of Health), Bethesda, MD. (1991))。恒定结构域不直接参与抗体与抗原的结合, 但展现出多种效应子功能, 诸如抗体在抗体依赖性细胞毒性中的参与。

[0086] 基于它们恒定结构域的氨基酸序列, 可以将来自任何脊椎动物物种的抗体 (免疫球蛋白) 的“轻链”分为两种清楚区分的类型之一, 称为 kappa (κ) 和 lambda (λ)。

[0087] 取决于它们重链的恒定结构域的氨基酸序列, 可以将抗体 (免疫球蛋白) 分为不同的种类。存在五种主要的免疫球蛋白类别: IgA, IgD, IgE, IgG, 和 IgM, 并且这些中的一些可以进一步分为亚类 (同种型), 例如 IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, 和 IgA₂。对应于不同类别的免疫球蛋白的重链恒定结构域分别被称为 α , δ , ϵ , γ , 和 μ 。不同类别的免疫球蛋白的亚基结构和三维构型是众所周知的, 并且通常描述在例如 Abbas 等细胞和分子免疫学 (Cellular and Mol. Immunology) 第 4 版 (W. B. Saunders, Co., 2000) 中。抗体可以是更大的融合分子的部分, 通过抗体与一种或多种其它蛋白或肽的共价或非共价缔合形成。

[0088] 术语“全长抗体,”“完整的抗体”和“完整抗体”在本文交替地用于指以其基本完整形式存在的抗体, 而非下文定义的抗体片段。术语特别指包含 Fc 区的重链的抗体。

[0089] 用于本文目的的“裸抗体”是未缀合于细胞毒性结构部分或放射性标记的抗体。

[0090] “抗体片段”包含完整抗体的一部分, 优选地包含其抗原结合区。抗体片段的实

例包括 Fab, Fab', F(ab')₂, 和 Fv 片段; 双抗体; 直链抗体; 单链抗体分子; 和由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0091] 抗体的木瓜蛋白酶消化产生两个相同的抗原结合片段, 称为“Fab”片段, 所述“Fab”片段每个具有单抗原结合位点, 以及残余的“Fc”片段, 其名称反映其容易结晶的能力。胃蛋白酶处理产生 F(ab')₂ 片段, 所述片段具有两个抗原组合位点, 并且仍旧能够交联抗原。

[0092] “Fv”是包含完整抗原结合位点的最小抗体片段。在一个实施方案中, 双链 Fv 种类由一个重链可变结构域和一个轻链可变结构域以紧密的, 非共价缔合的二聚体组成。在单链 Fv(scFv) 种类中, 一个重链可变结构域和一个轻链可变结构域可以通过柔性肽接头共价连接从而使轻链和重链可以以类似于双链 Fv 种类的“二聚体”结构缔合。在这种构型中, 每个可变结构域的三个 HVRs 相互作用从而限定在 VH-VL 二聚体的表面上的抗原结合位点。总而言之, 六个 HVRs 将抗原结合特异性赋予抗体。然而, 即使是单个可变结构域(或只包含对抗原特异的三个 HVRs 的半个 Fv) 也具有识别和结合抗原的能力, 然而亲和性低于完整结合位点。

[0093] Fab 片段包含重链可变结构域和轻链可变结构域并且还包含轻链的恒定结构域和重链的第一恒定结构域(CH1)。Fab' 片段与 Fab 片段的不同之处在于在重链 CH1 结构域的羧基端加入几个残基, 包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。Fab'-SH 是本文关于 Fab' 的名称, 其中恒定结构域的半胱氨酸残基具有游离巯基。F(ab')₂ 抗体片段最初作为在它们之间具有铰链半胱氨酸的 Fab' 片段对产生。还已知抗体片段的其它化学偶联。

[0094] “单链 Fv”或“scFv”抗体片段包含抗体的 VH 和 VL 结构域, 其中这些结构域以单多肽链存在。一般地, 所述 scFv 多肽在 VH 和 VL 结构域之间还包含多肽接头, 所述接头使 scFv 形成对于抗原结合需要的结构。关于 scFv 的综述参见例如 Pluckthün 于 The Pharmacology of Monoclonal Antibodies(单克隆抗体药理学), 卷 113, Rosenburg 和 Moore 编辑, (Springer-Verlag, New York, 1994), pp. 269-315 中。

[0095] 术语“双抗体(diabodies)”指具有两个抗原结合位点的抗体片段, 所述片段在相同的多肽链(VH-VL)中包含与轻链可变结构域(VL)连接的重链可变结构域(VH)。通过使用太短所以不能在相同链上的两个结构域之间配对的接头, 迫使所述结构域与另一条链的互补结构域配对从而产生两个抗原结合位点。双抗体可以是二价或双特异性的。双抗体更充分地描述于例如 EP 404, 097 ;WO 1993/01161 ;Hudson 等, Nat. Med. 9 :129-134(2003) ;和 Hollinger 等, 美国国家科学院学报 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 90 :6444-6448(1993) 中。三链抗体(triabodies)和四链抗体(tetrabodies)还在 Hudson 等, Nat. Med. 9 :129-134(2003) 中进行描述。

[0096] 术语“单克隆抗体”在用于本文时指从一群基本上同质的抗体获得的抗体, 即构成群体的各个抗体是相同的, 除了可以以极小量存在的可能突变(例如天然存在突变)外。因此, 修饰语“单克隆”表明抗体不是不同抗体混合物的特征。在某些实施方案中, 所述单克隆抗体典型地包括包含结合靶标的多肽序列的抗体, 其中靶标结合多肽序列是通过包括从众多多肽序列中选择单一靶标结合多肽序列在内的过程得到的。例如, 选择方法可以从众多克隆(诸如杂交瘤克隆、噬菌体克隆或重组 DNA 克隆的集合)中选择独特克隆。应当理解, 所选择的靶标结合序列可进一步改变, 例如为了提高对靶标的亲和性、将靶标结合

序列人源化、提高其在细胞培养物中的产量、降低其在体内的免疫原性、创建多特异性抗体等,而且包含改变后的靶标结合序列的抗体也是本发明的单克隆抗体。与典型地包含针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制备物不同,单克隆抗体制备物的每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。除它们的特异性之外,单克隆抗体制备物的优点在于它们典型地未受到其它免疫球蛋白的污染。

[0097] 修饰语“单克隆”表明抗体从基本上同质的抗体群获得的特征,不应解释为要求通过任何特定方法来生产抗体。例如,将依照本发明使用的单克隆抗体可通过多种技术来生成,包括例如杂交瘤法(例如 Kohler 和 Milstein,自然(Nature)256:495-97(1975); Hongo 等,杂交瘤(Hybridoma),14(3):253-260(1995);Harlow 等,抗体:实验室手册(Antibodies:A Laboratory Manual),(冷泉港实验室出版社,第2版.1988);Hammerling 等,于:单克隆抗体和T-细胞杂交瘤(Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas),563-681,Elsevier,N.Y.,1981)、重组DNA法(参见例如美国专利No. 4,816,567)、噬菌体展示技术(参见例如 Clackson 等,自然(Nature)352:624-628(1991);Marks 等,分子生物学杂志(J. Mol. Biol.)222:581-597(1992);Sidhu 等,分子生物学杂志(JMol. Biol.)338(2):299-310(2004);Lee 等,分子生物学杂志(J. Mol. Biol.)340(5):1073-1093(2004); Fellouse,美国国家科学院学报(Proc. Nat. Acad. Sci. USA)101(34):12467-12472(2004);及 Lee 等,免疫学方法杂志(J. Immunol. Methods)284(1-2):119-132(2004))、及用于在具有部分或整个人免疫球蛋白基因座或编码人免疫球蛋白序列的基因的动物中生成人或人样抗体的技术(参见例如WO 1998/24893;WO 1996/34096;WO 1996/33735;WO1991/10741; Jakobovits 等,美国国家科学院学报(Proc. Nat. Acad. Sci. USA)90:2551(1993); Jakobovits 等,自然(Nature)362:255-258(1993);Bruggemann 等,Year in Immuno. 7:33(1993);美国专利号5,545,807;5,545,806;5,569,825;5,625,126;5,633,425;5,661,016;Marks 等,生物/技术(Bio/Technology)10:779-783(1992);Lonberg 等,自然(Nature)368:856-859(1994);Morrison,自然(Nature)368:812-813(1994);Fishwild 等,自然生物技术(Nature Biotechnol.)14:845-851(1996);Neuberger,自然生物技术(Nature Biotechnol.)14:826(1996);及 Lonberg 和 Huszar,Intern. Rev. Immunol. 13:65-93(1995))。

[0098] 单克隆抗体在本文中具体地包括“嵌合”抗体,其中重链和/或轻链的一部分与衍生自特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,而链的剩余部分与衍生自另一物种或属于另一抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,以及此类抗体的片段,只要它们展现出期望的生物学活性(见,例如美国专利号. 4,816,567 和 Morrison 等,美国国家科学院学报(Proc. Nat. Acad. Sci. USA)USA 81:6851-6855(1984))。嵌合抗体包括 **PRIMATIZED®** 抗体,其中抗体的抗原结合区来自通过例如用目的抗原免疫猕猴产生的抗体。

[0099] 非人(例如鼠)抗体的“人源化”形式是包含衍生自非人免疫球蛋白的最少序列的嵌合抗体。在一个实施方案中,人源化抗体指这样的人免疫球蛋白(受体抗体),其中受体的 HVR 残基用具有期望特异性、亲和性和/或能力的非人物种(供体抗体)(诸如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类动物)的 HVR 残基替换。在有些情况中,将人免疫球蛋白的 FR 残基用相应的非人残基替换。此外,人源化抗体可包含在受体抗体中或在供体抗体中

没有发现的残基。进行这些修饰是为了进一步改进抗体的性能。一般而言,人源化抗体将包含基本上全部的至少一个、典型地两个可变结构域,其中所有或基本上所有高变环对应于非人免疫球蛋白的高变环,且所有或基本上所有FR是人免疫球蛋白序列的FR。人源化抗体任选还将包含至少部分免疫球蛋白恒定区(Fc),典型地是人免疫球蛋白的恒定区。更多细节例如参见 Jones 等,自然(Nature)321:522-525(1986);Riechmann 等,自然(Nature)332:323-329(1988);及 Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596(1992)。还可参见例如 Vaswani 和 Hamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1:105-115(1998);Harris, Biochem. Soc. Transactions 23:1035-1038(1995);Hurle 和 Gross, Curr. Op. Biotech. 5:428-433(1994);及美国专利号 6,982,321 和 7,087,409。

[0100] “人抗体”指这样的抗体,其具有与由人生成的抗体的氨基酸序列对应的氨基酸序列和/或使用本文所公开的用于生成成人抗体的任何技术产生。人抗体的这种定义明确排除包含非人抗原结合残基的人源化抗体。人抗体可使用本领域已知的多种技术来生成,包括噬菌体展示文库。Hoogenboom 和 Winter, 分子生物学杂志(J. Mol. Biol.) 227:381(1991);Marks 等, 分子生物学杂志(J. Mol. Biol.) 222:581(1991)。关于制备人单克隆抗体的还可获得的方法是在 Cole 等, 单克隆抗体和癌症治疗(Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy), Alan R. Liss, p. 77(1985);Boerner 等, 免疫学杂志(J. Immunol.) 147(1):86-95(1991)中所述的方法。还见 van Dijk 和 van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol., 5:368-74(2001)。人抗体可以通过将抗原施用于已经被修饰从而响应于抗原激发产生所述抗体,但是其内源基因座已经失能的转基因动物进行制备,所述转基因动物例如被免疫的异种小鼠。(见,例如,美国专利号 6,075,181 和 6,150,584,关于 XENOMOUSE™技术)。还见,例如 Li 等,美国国家科学院学报(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 103:3557-3562(2006)关于通过人 B-细胞杂交瘤技术产生的人抗体。

[0101] 术语“高变区”、“HVR”或“HV”在用于本文时指抗体可变结构域中序列上高度可变和/或形成结构上定义的环的区域。通常,抗体包含六个 HVR:三个在 VH 中(H1、H2、H3),三个在 VL 中(L1、L2、L3)。在天然抗体中,H3 和 L3 展示这六个 HVR 的最大多样性,而且认为特别是 H3 在赋予抗体以精细特异性中发挥独特作用。参见例如 Xu 等免疫性(Immunity)13:37-45(2000);Johnson 和 Wu 于:分子生物学中的方法(Methods in Molecular Biology)248:1-25(Lo,编辑,Human 出版社,Totowa,NJ,2003)。事实上,仅由重链组成的天然存在骆驼科动物抗体(camelid antibody)在缺乏轻链时是有功能的且稳定的。参见例如 Hamers-Casterman 等,自然(Nature)363:446-448(1993);Sheriff 等,自然结构生物学(Nature Struct. Biol.) 3:733-736(1996)。

[0102] 本文中使用且涵盖许多 HVR 的叙述。Kabat 互补性决定区(CDR)是以序列变异性为基础的,而且是最常用的(Kabat 等,免疫目的蛋白序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest),第5版. 公众健康服务(Public Health Service),国家健康研究所(National Institutes of Health),Bethesda,MD.(1991))。Chothia 改为指结构环的位置(Chothia 和 Lesk 分子生物学杂志(J. Mol. Biol.) 196:901-917(1987))。AbM HVR 代表 Kabat HVR 与 Chothia 结构环之间的折衷,而且由 Oxford Molecular 的 AbM 抗体建模软件使用。“接触”HVR 是以对可获得的复合物晶体结构的分析为基础的。下文记录了这些 HVR 中每一个的残基。

[0103]

环	Kabat	AbM	Chothia	接 触
-----	-----	---	-----	-----
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
	(Kabat 编号)			
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
	(Chothia 编号)			
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

[0104] HVR 可包括如下“延伸的 HVR”:VL 中的 24-36 或 24-34(L1)、46-56 或 50-56(L2) 和 89-97 或 89-96(L3) 及 VH 中的 26-35(H1)、50-65 或 49-65(H2) 和 93-102、94-102 或 95-102(H3)。对于这些定义中的每一个,可变结构域残基是依照 Kabat 等,见上文编号的。

[0105] “构架”或“FR”残基指除本文中所定义的 HVR 残基之外的那些可变结构域残基。

[0106] 术语“依照 Kabat 的可变结构域残基编号”或“依照 Kabat 的氨基酸位置编号”及其变化形式指 Kabat 等,见上文中的用于抗体重链可变结构域或轻链可变结构域编辑的编号系统。使用此编号系统,实际的线性氨基酸序列可包含较少或另外的氨基酸,对应于可变结构域 FR 或 HVR 的缩短或插入。例如,重链可变结构域可包含 H2 残基 52 后的单一氨基酸插入(依照 Kabat 为残基 52a)及重链 FR 残基 82 后的插入残基(例如依照 Kabat 为残基 82a、82b 和 82c 等)。给定抗体的 Kabat 残基编号方式可通过将抗体序列与“标准”Kabat 编号序列对比同源区来确定。

[0107] Kabat 编号系统一般在提及可变结构域中的残基(大约是轻链的残基 1-107 和重链的残基 1-113)时使用(例如 Kabat 等,免疫目的序列(Sequences of Immunological Interest). 第 5 版. 公众健康服务(Public Health Service),国家健康研究所(National Institutes of Health),Bethesda, Md. (1991))。“EU 编号系统”或“EU 索引”一般在提及免疫球蛋白重链恒定区中的残基时使用(例如在 Kabat 等中报道的 EU 索引,见上文)。“如在 Kabat 中所述的 EU 索引”指人 IgG1EU 抗体的残基编号。除非本文中另有说明,提及抗体可变结构域中的残基编号指根据 Kabat 编号系统的残基编号方式。除非本文中另有说明,提及抗体恒定结构域中的残基编号指根据 EU 编号系统的残基编号方式(例如参见美国专利申请公开号 US2008/0181888A1, EU 编号方式的图)。

[0108] “亲和力成熟的”抗体指在抗体的一个或多个 HVRs 中具有一处或多处改变、导致该抗体对抗原的亲性和与没有这些改变的母体抗体相比有所提高的抗体。在一个实施方案中,亲和力成熟的抗体具有纳摩尔或甚至皮摩尔量级的对靶抗原的亲性和。亲和力成熟的抗体可使用一些本领域已知方法来生成。例如, Marks 等,生物/技术(Bio/Technology) 10: 779-783(1992) 记载了通过 VH 和 VL 结构域改组进行的亲和性成熟。例如以下文献记载了

HVR 和 / 或构架残基的随机诱变 ;Barbas 等,美国国家科学院学报 (Proc. Nat. Acad. Sci. USA) 91 :3809-3813(1994) ;Schier 等,基因 (Gene) 169 :147-155(1995) ;Yelton 等,免疫学杂志 (J. Immunol.) 155 :1994-2004(1995) ;Jackson 等,免疫学杂志 (J. Immunol.) 154(7) :3310-9(1995) ;及 Hawkins 等,分子生物学杂志 (J. Mol. Biol.) 226 :889-896(1992)。

[0109] “封闭”抗体或“拮抗剂”抗体是抑制或减少其结合的抗原的生物学活性的抗体。某些封闭抗体或拮抗剂抗体基本上或完全抑制抗原的生物学活性。

[0110] “激动剂抗体,”用于本文时,是部分或完全模拟目的多肽的至少一种功能活性的抗体。

[0111] “生长抑制”抗体是预防或减少这样的细胞的增殖的那些抗体,所述细胞表达抗体结合的抗原。例如,所述抗体可以防止或减少癌细胞在体外和 / 或体内的增殖。

[0112] “诱导凋亡”的抗体是诱导程序性细胞死亡的那些抗体,如通过标准凋亡测定法所确定的,如膜联蛋白 V 的结合,DNA 的片段化,细胞收缩,内质网的扩大,细胞片段化,和 / 或膜囊泡 (也称为凋亡小体) 的形成。

[0113] 抗体“效应子功能”指那些可归于抗体 Fc 区 (天然序列 Fc 区或氨基酸序列变体 Fc 区) 且随抗体同种型而变化的生物学活性。抗体效应子功能的实例包括 :C1q 结合和补体依赖性细胞毒性 (CDC) ;Fc 受体结合 ;抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) ;吞噬作用 ;细胞表面受体 (例如 B 细胞受体) 下调 ;和 B 细胞活化。

[0114] 术语“Fc 区”在本文用于定义免疫球蛋白重链的 C 端区,包括天然序列 Fc 区和变异 Fc 区。虽然免疫球蛋白重链 Fc 区的边界可以变化,但是人 IgG 重链 Fc 区通常定义为 Fc 区自 Cys226 位置或 Pro230 位置的氨基酸残基至羧基末端的区段。Fc 区的 C- 末端赖氨酸 (依照 EU 编号系统的残基 447) 可以例如在生产或纯化抗体的过程中去除,或者通过对编码抗体重链的核酸进行重组工程改造而去除。因而,完整抗体的组合物可包括所有 K447 残基都被去除的抗体群、无一 K447 残基被去除的抗体群、以及具有有和无 K447 残基的抗体混合物的抗体群。

[0115] “功能性 Fc 区”具有天然序列 Fc 区的“效应子功能”。例示性的“效应子功能”包括 C1q 结合、CDC、Fc 受体结合、ADCC、吞噬作用、细胞表面受体 (例如 B 细胞受体 ;BCR) 下调等。此类效应子功能一般要求 Fc 区与结合结构域 (例如抗体可变结构域) 结合,而且可使用如例如在本文的定义中公开的各种测定法进行评估。

[0116] “天然序列 Fc 区”包含与自然界中发现的 Fc 区的氨基酸序列相同的氨基酸序列。天然序列人 Fc 区包括天然序列人 IgG1Fc 区 (非 A 和 A 同种异型)、天然序列人 IgG2Fc 区、天然序列人 IgG3Fc 区、及天然序列人 IgG4Fc 区,及其天然存在变体。

[0117] “变体 Fc 区”包含由于至少一处氨基酸修饰 (优选地一个或多个氨基酸置换) 而与天然序列 Fc 区有所不同的氨基酸序列。优选地,变体 Fc 区具有与天然序列 Fc 区或与母体多肽的 Fc 区相比至少一处氨基酸置换,例如在天然序列 Fc 区中或在母体多肽的 Fc 区中具有约 1 处至约 10 处氨基酸置换,优选约 1 处至约 5 处氨基酸置换。本文的变体 Fc 区优选地将与天然序列 Fc 区和 / 或母体多肽的 Fc 区具有至少约 80% 同源性,和最优选地与其具有至少约 90% 同源性,更优选地与其具有至少约 95% 同源性。

[0118] “Fc 受体”或“FcR”描述结合抗体 Fc 区的受体。在有些实施方案中,FcR 是天然人 FcR。在有些实施方案中,FcR 是结合 IgG 抗体的 FcR (γ 受体),包括 Fc γ RI、Fc γ RII 和

Fc γ RIII 亚类的受体,包括那些受体的等位基因变体和可变剪接形式。Fc γ RII 受体包括 Fc γ RIIA(“活化受体”)和 Fc γ RIIB(“抑制受体”),它们具有相似的氨基酸序列,区别主要在于其胞质结构域。活化受体 Fc γ RIIA 在其胞质结构域中包含免疫受体基于酪氨酸的活化基序(ITAM)。抑制受体 Fc γ RIIB 在其胞质结构域中包含免疫受体基于酪氨酸的抑制基序(ITIM)(参见例如,Daëron,免疫学年评(Annu. Rev. Immunol.). 15:203-234(1997))。FcR 的综述参见例如 Ravetch 和 Kinet,免疫学年评(Annu. Rev. Immunol.) 9:457-92(1991); Capel 等,免疫方法(Immunomethods) 4:25-34(1994);及 de Haas 等,实验室临床医学杂志(J. Lab. Clin. Med.) 126:330-41(1995)。术语“FcR”在本文中涵盖其它 FcR,包括那些未来将会鉴定的。

[0119] 术语“Fc 受体”或“FcR”还包括新生儿受体, FcRn, 它负责将母体 IgG 转移给胎儿(Guyer 等,免疫学杂志(J. Immunol.) 117:587(1976)和 Kim 等,免疫学杂志(J. Immunol.) 24:249(1994))并调节免疫球蛋白的体内稳态。测量对 FcRn 的结合的方法是已知的(参见例如 Ghetie 和 Ward.,今日免疫学(Immunol. Today) 18(12):592-598(1997); Ghetie 等,自然生物技术(Nature Biotechnology), 15(7):637-640(1997);Hinton 等,生物化学杂志(J. Biol. Chem.) 279(8):6213-6216(2004);WO 2004/92219(Hinton 等))。

[0120] 可测定人 FcRn 高亲和性结合多肽与人 FcRn 的体内结合和血清半衰期,例如在表达人 FcRn 的转基因小鼠或经转染人细胞系中,或者在施用了具有变体 Fc 区的多肽的灵长类动物中。WO 2000/42072(Presta)记载了对 FcR 的结合提高或降低的抗体变体。还可参见例如 Shields 等,生物化学杂志(J. Biol. Chem.) 9(2):6591-6604(2001)。

[0121] “人效应细胞”指表达一种或多种 FcR 并行行使效应子功能的白细胞。在某些实施方案中,该细胞至少表达 Fc γ RIII 并行行使 ADCC 效应子功能。介导 ADCC 的人白细胞的实例包括外周血单个核细胞(PBMC)、天然杀伤(NK)细胞、单核细胞、细胞毒性 T 细胞和嗜中性粒细胞。效应细胞可以从其天然来源(例如从血液)分离。

[0122] “抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”或“ADCC”指其中结合到某些细胞毒性细胞(例如 NK 细胞、嗜中性粒细胞和巨噬细胞)上存在的 Fc 受体(FcR)上的分泌型 Ig 使得这些细胞毒性效应细胞能够特异性结合携带抗原的靶细胞,随后用细胞毒素杀死靶细胞的细胞毒性形式。介导 ADCC 的主要细胞即 NK 细胞只表达 Fc γ RIII,而单核细胞表达 Fc γ RI、Fc γ RII 和 Fc γ RIII。Ravetch 和 Kinet,免疫学年评(Annu. Rev. Immunol.) 9:457-92(1991)第 464 页表 3 总结了造血细胞上的 FcR 表达。为了评估感兴趣分子的 ADCC 活性,可进行体外 ADCC 测定法,诸如美国专利号 5,500,362 或 5,821,337 或美国专利号 6,737,056(Presta)中所记载的。可用于此类测定法的效应细胞包括 PBMC 和 NK 细胞。备选地或另外地,可在体内评估目的分子的 ADCC 活性,例如在动物模型中,诸如 Clynes 等,PNAS(USA) 95:652-656(1998)中所公开的。

[0123] “补体依赖性细胞毒性”或“CDC”指存在补体时对靶细胞的溶解。经典补体途径的激活是由补体系统第一组分(C1q)结合抗体(适宜亚类的)起始的,该抗体已结合至其关联抗原。为了评估补体激活,可进行 CDC 测定法,例如如 Gazzano-Santoro 等,免疫方法杂志(J. Immunol. Methods) 202:163(1996)中所记载的。具有更改的 Fc 区氨基酸序列(具有变体 Fc 区的多肽)及提高或降低的 C1q 结合能力的多肽变体记载于例如美国专利号 6,194,551B1 和 WO1999/51642。还可参见例如 Idusogie 等,免疫学杂志(J. Immunol.) 164:

4178-4184(2000)。

[0124] 术语“包含 Fc 区的抗体”是指包含 Fc 区的抗体。例如,在抗体纯化过程中或通过编码抗体的核酸的重组改造过程中,可以去除 Fc 区的 C 端赖氨酸(根据 EU 编号系统的残基 447)。因此,包含具有根据本发明的 Fc 区的抗体的组合物可以包含具有 K447 的抗体,具有所有 K447 被去除的抗体,或具有和不具有 K447 残基的抗体的混合物。

[0125] “结合亲和性”一般指在分子(例如抗体)的单个结合位点及其结合配偶体(例如抗原)之间的非共价相互作用的总和的强度。除非另外指出,用于本文时,“结合亲和性”指反映在结合对成员(例如抗体和抗原)之间 1 : 1 相互作用的固有结合亲和性。分子 X 关于其配偶体 Y 的亲和性通常可以用解离常数(Kd)表示。可以通过本领域已知的常规方法,包括在本文所述的那些测量亲和性。低亲和性抗体通常缓慢结合抗原并倾向于容易解离,而高亲和性抗体通常更快地结合抗原并且倾向于更长时间地保持结合。测量结合亲和性的多种方法是本领域已知的,其中任一种可以用于本发明的目的。下面描述用于测量结合亲和性的具体的例示性和示例性实施方案。

[0126] 在一个实施方案中,根据本发明的“Kd”或“Kd 值”通过用目的抗体的 Fab 形式和如下面测定法中所述的其抗原进行的放射性标记的抗原结合测定法(RIA)测量。Fabs 关于抗原的溶液结合亲和性通过在存在滴定系列的未标记抗原时,用最小浓度的(¹²⁵I)-标记的抗原平衡 Fab,接着用抗 -Fab 抗体-包被的板捕获结合的抗原进行测量(见,例如,Chen,等,分子生物学杂志(J. Mol. Biol.)293 :865-881(1999))。为了确定测定的条件,将 **MICROTITER**[®] 多孔板(Thermo Scientific)用 5 μg/ml 的在 50mM 碳酸钠(pH 9.6)中的捕获抗 -Fab 抗体(Cappel Labs)包被过夜,并随后用 PBS 中的 2% (w/v) 牛血清白蛋白在室温(约 23℃)封闭 2-5 小时。在非吸附板(Nunc#269620)中,将 100pM 或 26pM [¹²⁵I]-抗原与目的 Fab 的系列稀释物混合(例如与在 Presta 等,癌症研究(Cancer Res). 57 :4593-4599(1997)中的抗 -VEGF 抗体,Fab-12 的评估一致)。接着,将目的 Fab 温育过夜;然而温育可以持续更长的阶段(例如约 65 小时)从而确保达到平衡。随后,将混合物转移到捕获板中来在室温进行温育(例如进行 1 小时)。接着,去除溶液,并将所述板用在 PBS 中的 0.1% TWEEN-20[™]洗涤 8 次。当所述板已经干燥时,加入 150 μl/孔的闪烁剂(MICROSCINT-20[™];Packard),并将所述板在 TOPCOUNT[™] γ 计数器(Packard)上计数 10 分钟。选择提供少于或等于 20% 的最大结合的每种 Fab 的浓度用在竞争性结合测定法中。

[0127] 根据另一个实施方案,通过使用表面等离子共振测定法在 25℃用固定的抗原 CM5 芯片以~10 反应单位(RU)来测量 Kd 或 Kd 值,所述表面等离子共振测定法使用 **BIACORE**[®]-2000 或 **BIACORE**[®]-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)。简言之,将羧甲基化的葡聚糖生物传感器芯片(CM5, BIAcore, Inc.)用 N-乙基-N'-(3-二甲氨基丙基)-碳二亚胺盐酸盐(EDC)和 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)根据生产商的说明书进行活化。在以 5 μl/分钟的流速注射之前,将抗原用 10mM 乙酸钠, pH 4.8 稀释到 5 μg/ml (~0.2 μM)从而获得约 10 反应单位(RU)的偶联蛋白。在注射抗原后,注射 1M 乙醇胺以封闭未反应的基团。关于动力学测量,将 Fab 的两倍系列稀释物(0.78nM 到 500nM)在具有 0.05% TWEEN-20[™]表面活性剂(PBST)的 PBS 中,在 25℃,以约 25 μl/min 的流速进行注射。使用简单的一对一 Langmuir 结合模型(**BIACORE**[®]评估软件版本 3.2),通过同时拟合缔合和解离传感图来计算缔合速率(k_{on})和解离速率(k_{off})。将平衡解离常数(Kd)计算为

$k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ 的比率。见,例如,Chen等,分子生物学杂志(J.Mol.Biol.)293:865-881(1999)。如果缔合速率通过上述的表面等离子共振测定法确定超过 $10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$,那么缔合速率可以通过使用荧光猝灭技术来确定,所述荧光猝灭技术在 25°C ,在存在增加浓度的抗原时,测量 20nM 在PBS, $\text{pH}7.2$ 中的抗-抗原抗体(Fab形式)的荧光发射强度(激发= 295nm ;发射= 340nm , 16nm 带通)的增加或减少,如使用分光光度计,如滞流装备的分光光度计(stop-flow equipped spectrophotometer)(Aviv仪器),或具有搅拌的比色杯的8000-系列的SLM-AMINCO™分光光度计(ThermoSpectronic)进行测量的。

[0128] 根据本发明所述的“缔合速率”(“on-rate,”)“缔合速率”(“rate of association,”)“缔合速率”(“association rate,”)或“ k_{on} ”也可以如上使用BIACORE®-2000或BIACORE®-3000系统(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)进行确定。

[0129] 术语“基本类似”或“基本相同,”用于本文时,是指在两个数值(例如一个与本发明的抗体相关,而另一个与参照/比较抗体相关)之间的足够高程度的类似性,从而使本领域技术人员认为在通过所述值(例如, K_d 值)测量的生物学特征背景下,在两个值之间的差异是极低的或无生物学和/或统计学意义。在所述两个值之间的差异作为参照/比较值的函数例如少于约50%,少于约40%,少于约30%,少于约20%,和/或少于约10%。

[0130] 术语“基本减少”或“基本不同,”用于本文时,是指在两个数值(通常一个与分子相关,而另一个与参照/比较分子相关)之间的足够高程度的差异性,从而使本领域技术人员认为在通过所述值(例如, K_d 值)测量的生物学特征背景下,在两个值之间的差异是具有统计学意义的。在所述两个值之间的差异作为参照/比较分子的值的函数例如大于约10%,大于约20%,大于约30%,大于约40%,和/或大于约50%。

[0131] 用于本文目的的“接纳体人构架”或“人接纳体构架”是包含衍生自人免疫球蛋白构架或人共有构架的VL或VH构架的氨基酸序列的构架。接纳体人构架“衍生自”人免疫球蛋白构架或人共有构架可以包含其相同的氨基酸序列,或其可以包含预先存在的氨基酸序列的变化。在一些实施方案中,预先存在的氨基酸变化的数目是10以下,9以下,8以下,7以下,6以下,5以下,4以下,3以下或2以下。如果在VH中存在预先存在的氨基酸变化,优选地那些变化仅在位置71H,73H和78H的三个,两个或一个位置存在;例如,在那些位置的氨基酸残基可以是71A,73T和/或78A。在一个实施方案中,VL接纳体人构架的序列与VL人免疫球蛋白构架序列或人共有构架序列相同。

[0132] “人共有构架”是在人免疫球蛋白VL或VH构架序列的选择中代表最常见的氨基酸残基的构架。一般地,人免疫球蛋白VL或VH序列的选择物来自可变结构域序列的亚组。一般地,序列的亚组是在Kabat等中的亚组,见上文。在一个实施方案中,关于VL,亚组是如在Kabat等中的亚组 κ I,见上文。在一个实施方案中,关于VH,亚组是如在Kabat等中的亚组III,见上文。

[0133] “VH亚组III共有构架”包含获自在Kabat等(见上文)的可变重链亚组III中的氨基酸序列的共有序列。在一个实施方案中,人接纳体构架衍生自VH亚组III共有构架并且包含这样的氨基酸序列,所述氨基酸序列包含下列序列的每个的至少一部分或全部:(SEQ ID NO:50)-H1-(SEQ ID NO:51)-H2-(SEQ ID NO:57或59)-H3-(SEQ ID NO:35)。在一些实施方案中,SEQ ID NO:35的最后一个残基(S11)被丙氨酸所取代。

[0134] “VL 亚组 I 共有构架”包含获自在 Kabat 等（见上文）的可变轻链 κ 亚组 I 的氨基酸序列的共有序列。在一个实施方案中，VH 亚组 I 共有构架氨基酸序列包含下列序列的每个的至少一部分或全部：(SEQ ID NO :60)-L1-(SEQ ID NO :61)-L2-(SEQ ID NO :62)-L3-(SEQ ID NO :63)。

[0135] “纯化的”意为在样品中分子以包含其的样品的至少 95 重量%，或至少 98 重量% 的浓度存在。

[0136] “分离的”核酸分子是这样的核酸分子，其从至少一种其它核酸分子中分离，核酸分子与所述其它核酸分子在正常情况下，例如在其自然环境中缔合。分离的核酸分子还包括包含在正常表达核酸分子的细胞中的核酸分子，但是，所述核酸分子存在于染色体外或存在于不同于其天然的染色体定位的染色体位置。

[0137] 术语“载体”，用于本文时，意欲指能够转运其已经连接的另一种核酸的核酸分子。载体的一种类型是“质粒”，指可以在其中连接另外的 DNA 区段的环状双链 DNA。另一种类型的载体是噬菌体载体。另一种类型的载体是病毒载体，其中可以将另外的 DNA 区段连接到病毒基因组上。某些载体能够在引入它们的宿主细胞中自主复制（例如具有细菌复制起点的细菌载体和游离型哺乳动物载体）。可以将其他的载体（例如，非游离型哺乳动物载体）在引入宿主细胞后整合到宿主细胞的基因组上，并且由此与宿主基因组一起复制。而且，某些载体能够定向表达它们可操纵性连接的基因。这些载体在本文指“重组表达载体”，或简单地指“表达载体”。一般地，用于重组 DNA 技术的表达载体通常以质粒的形式存在。在本发明的说明书中，“质粒”和“载体”可以交互地使用，因为质粒是最常用的载体形式。

[0138] “多核苷酸，”或“核酸，”在本文交互使用，指任何长度的核苷酸的聚合物，并包括 DNA 和 RNA。核苷酸可以是脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、修饰的核苷酸或碱基和 / 或它们的类似物，或可以通过 DNA 或 RNA 聚合酶或通过合成反应结合到聚合物中的任何底物。多核苷酸可以包含修饰的核苷酸，如甲基化的核苷酸和它们的类似物。如果存在，可以在所述聚合物的装配之前或之后，对核苷酸结构进行修饰。核苷酸序列可以被非核苷酸成分中断。多核苷酸可以包含在合成后形成的修饰，如与标记的缀合。其它类型的修饰包括，例如“帽”，用类似物取代一个或多个天然存在的核苷酸，核苷酸之间的修饰如例如具有不带电荷的连接的那些（例如磷酸甲酯，磷酸三酯，亚磷酰胺 (phosphoamidate)，氨基甲酸酯等），和具有带电连接的那些（例如，硫代磷酸酯，二硫代硫酸酯等），包含侧结构部分 (pendant moieties) 的那些，如例如蛋白（例如，核酸酶、毒素、抗体、信号肽、聚 L- 赖氨酸等），具有嵌入剂（例如，吡啶、补骨脂素等）的那些，包含螯合剂（例如，金属、放射性金属、硼、氧化金属等）的那些，包含烷化剂的那些，具有修饰的连接（例如， α 异头核酸等）的那些，以及多核苷酸的未修饰形式。此外，任何通常存在于糖中的羟基基团可以被例如磷酸酯基团 (phosphonate groups)、磷酸酯基团 (phosphate group) 取代，被标准的保护基保护，或被激活以制备与另外的核苷酸的另外的连接物，或可以缀合于固体或半固体支持物。5' 和 3' 末端 OH 可以被磷酸化，或被 1-20 个碳原子的胺或有机加帽基团结构部分取代。还可以将其他的羟基衍生为标准的保护基。多核苷酸还可以包含核糖或脱氧核糖的类似形式，其通常是本领域中已知的，包括例如 2' -O- 甲基 -，' -O- 烯丙基 -，2' - 氟 - 或 2' - 叠氨基 - 核糖，碳环糖类似物， α - 异头糖，差向异构的糖如阿拉伯糖、木糖、或来苏糖、吡喃糖、呋喃糖、景天庚酮糖、无环类似物，和碱性核苷酸类似物如甲基核苷。一个或多个磷酸二酯连接可以

被备选的连接基团取代。这些备选的连接基团包括,但不限于:其中磷酸酯被 P(O)S(“硫酯(thioate)”),P(S)S(“二硫酯(dithioate)”), $(O)NR_2$ (“酰胺化物(amidate)”),P(O)R, P(O)OR', CO,或 CH₂(“formacetal”)取代的实施方案,其中每个 R 或 R' 独立地是 H 或是任选包含醚(-O-)连接的取代或未取代的烷基(1-20C)、芳基、烯基、环烷基、环烯基或 araldyl。在多核苷酸中不是所有的连接都需要是相同的。前面的描述可应用于本文提及的所有多核苷酸,包括 RNA 和 DNA。

[0139] “寡核苷酸,”用于本文时,一般指短的、一般为单链的,一般为合成的多核苷酸,其一般,但不是必需地少于约 200 个核苷酸的长度。术语“寡核苷酸”和“多核苷酸”不相互排斥。上面关于多核苷酸的描述等同地并且完全可应用于寡核苷酸。

[0140] 除非另外指出,术语“Notch,”用于本文时,指来自任何脊椎动物来源的任何天然 Notch(Notch1-4),所述脊椎动物包括哺乳动物如灵长类动物(例如人)和啮齿类动物(例如小鼠和大鼠)。术语涵盖“全长,”未处理的 Notch 以及由细胞中的处理所导致的任何形式的 Notch。术语还涵盖天然存在的 Notch 的变体,例如剪接变体或等位基因变体。

[0141] 除非另外指出,术语“Notch1,”用于本文时,指来自任何脊椎动物来源的任何天然 Notch1,所述脊椎动物包括哺乳动物如灵长类动物(例如人)和啮齿类动物(例如小鼠和大鼠)。术语涵盖“全长,”未处理的 Notch1 以及由细胞中的处理所导致的任何形式的 Notch1。术语还涵盖天然存在的 Notch1 的变体,例如剪接变体或等位基因变体。

[0142] 除非另外指出,术语“Notch2,”用于本文时,指来自任何脊椎动物来源的任何天然 Notch2,所述脊椎动物包括哺乳动物如灵长类动物(例如人)和啮齿类动物(例如小鼠和大鼠)。术语涵盖“全长,”未处理的 Notch2 以及由细胞中的处理所导致的任何形式的 Notch2。术语还涵盖天然存在的 Notch2 的变体,例如剪接变体或等位基因变体。

[0143] 术语“Notch2 活性”指 Notch2 信号传导。“抑制 Notch2 活性”的药剂(例如抗体)相对于在基本相同条件下在适合的对照中观察到的 Notch2 信号传导水平明显减少 Notch2 信号传导。在某些实施方案中,Notch2 活性可以通过适合的报道子测定法进行评估,如本文在实施例 B(2)中所述。在某些实施方案中,Notch2 活性可以通过测量边缘 B 区细胞的产生进行评估,如本文在实施例 B(4)中所述。在某些实施方案中,Notch2 信号传导的减少低于在对照中观察到的水平的至少 2-,3-,4-,5-,或 10- 倍。

[0144] 术语“Notch2NRR”指由三个 LNR 构件(LNR-A, LNR-B, 和 LNR-C)和 HD 结构域(HD-N 和 HD-C)组成的 Notch2 区域。将示例性的人和小鼠 Notch2NRR 序列显示在图 18 中(分别为 SEQ ID NOs :28 和 29)。Notch2NRR 可以由以下组成:非共价连接的片段,例如由在 S1 处理 Notch2 所形成的片段,以及单连续多肽序列。作为举例并且参照图 18,人 Notch2NRR 可以由人 Notch2 的氨基酸 1422-1677(SEQ ID NO :75)组成,或备选地,由非共价连接于 SEQ ID NO :75 的氨基酸 1609-1677 的 SEQ ID NO :75 的氨基酸 1422-1608 组成。

[0145] 关于参照多肽序列的“百分比(%)氨基酸序列同一性”,定义为将候选序列与参照多肽序列在进行序列比对(并在必要时导入空隙)以获取最大百分比序列同一性,且不将任何保守取代视为序列同一性的部分之后,候选序列中的氨基酸残基与参照多肽序列中的氨基酸残基相同的百分数。可使用本领域技术内的各种方法进行序列比对以便测定氨基酸序列同一性百分比,例如,使用公众可得到的计算机软件如 BLAST、BLAST-2、ALIGN 或 Megalign(DNASTAR)软件。本领域技术人员可以决定比对序列的适宜参数,包括对所比较的

序列全长获得最大比对所需的任何算法。然而,为此目的,氨基酸序列同一性%值使用序列比较计算机程序 ALIGN-2 产生。ALIGN-2 序列比对计算机程序的作者是 Genentech, Inc., 该源代码已经随用户文档提交至美国版权局 (Washington D.C., 20559), 其美国版权注册登记号为 TXU510087。公众可通过 Genentech, Inc. (South San Francisco, 加利福尼亚) 得到 ALIGN-2 程序, 或者可以从该源代码进行编译。ALIGN-2 程序应当为在 UNIX 操作系统, 优选在数字 UNIXV4.0D 上使用而进行编译。ALIGN-2 程序设定了所有序列比对参数并且不变。

[0146] 在 ALIGN-2 应用于氨基酸序列比较的情况中, 给定氨基酸序列 A 相对于 (to)、与 (with)、或针对 (against) 给定氨基酸序列 B 的氨基酸序列同一性% (或者说: 给定氨基酸序列 A 具有或含有相对于、与或针对给定氨基酸序列 B 的某一%氨基酸序列同一性) 如下计算:

[0147] X/Y 比值乘以 100,

[0148] 其中 X 是用序列比对程序 ALIGN-2 在该程序的 A 和 B 比对中评分为相同匹配的氨基酸残基数, 且其中 Y 是 B 中的氨基酸残基总数。可以理解, 当氨基酸序列 A 与氨基酸序列 B 的长度不相等时, A 相对于 B 的氨基酸序列同一性%将不等于 B 相对于 A 的氨基酸序列同一性%。除非另外特别指出, 如在紧前面的段落中所述, 使用 ALIGN-2 计算机程序获得在本文中所用的所有的%氨基酸序列同一性的值。

[0149] “疾病”是将从用本发明的组合物或方法进行治疗获益的任何病况或病症。这包括慢性和急性疾病, 包括那些使所述哺乳动物易感目的疾病的病理性状况。在本文将治疗的疾病的非限制性实例包括病况如癌症。

[0150] “B-细胞恶性肿瘤,”也称为“B-细胞肿瘤,”包括但不限于霍奇金氏病 (Hodgkin's disease) (例如, 淋巴细胞为主型霍奇金病 (lymphocyte predominant Hodgkin's disease) (LPHD)); 非霍奇金淋巴瘤 (non-Hodgkin's lymphoma) (NHL); 滤泡中央细胞 (FCC) 淋巴瘤 (follicular center cell (FCC) lymphomas); 急性淋巴细胞性白血病 (acute lymphocytic leukemia) (ALL, 也称为 B-ALL); 前体 B-成淋巴细胞性白血病 (precursor B-lymphoblastic leukemia); 慢性淋巴细胞性白血病 (chronic lymphocytic leukemia) (CLL, 也称为 B-CLL); 毛细胞性白血病 (Hairy cell leukemia); 边缘区 B-细胞淋巴瘤 (marginal zone B-cell lymphoma) (包括结节、MALT 和脾类型); 多发性骨髓瘤 (multiple myeloma) (浆细胞瘤 (plasmacytoma), 浆细胞骨髓瘤 (plasma cell myeloma)); 小无核裂细胞性淋巴瘤 (small non-cleaved cell lymphomas) (例如, 伯基特淋巴瘤 (Burkitt's lymphoma)); 大细胞淋巴瘤 (large cell lymphoma) (包括扩散性大细胞 (B-细胞) 性淋巴瘤, 扩散的混合细胞性淋巴瘤和免疫母细胞性淋巴瘤 (diffuse large cell (B-cell), diffuse mixed cell, and immunoblastic lymphoma)); 套细胞淋巴瘤 (mantle cell lymphoma); 小淋巴细胞性淋巴瘤 (small lymphocytic lymphoma); AIDS-相关的淋巴瘤和瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症 (Waldenstrom's Macroglobulinemia)。进展缓慢的淋巴瘤是缓慢发展的, 不可治愈的疾病, 其中在经历许多缓和和复发阶段后, 患者的平均存活时间是 6-10 年; 进行性淋巴瘤是快速发展的淋巴瘤形式, 其包括高级的 NHL 以及一些中级的 NHL 种类。

[0151] 术语“黑素瘤”指黑素细胞的恶性肿瘤, 其主要见于皮肤中, 但是也见于眼睛 (葡

葡萄膜黑色素瘤 (uveal melanoma)) 或见于小肠中。

[0152] 用于本文时,“治疗 (treatment)” (和变化如“治疗 (treat)”或“treating”) 指在尝试改变待治疗的个体或细胞的天然进程中的临床干预,并且可以为了预防或在临床病理学的进程中进行。治疗的理想效果包括防止疾病发生或复发,缓和症状,消除疾病的任何直接或间接病理学后果,预防转移,减少疾病进展速率,改善或减轻疾病状态,和症状缓解或改善的预后。在一些实施方案中,将本发明的抗体用于延缓疾病或病症的发展或减缓疾病或病症的进展。

[0153] “个体”“受试者,”或“患者”是脊椎动物。在某些实施方案中,所述脊椎动物是哺乳动物。哺乳动物包括,但不限于,家畜 (如牛)、竞技动物、宠物 (如猫、狗和马)、灵长类动物、小鼠和大鼠。在某些实施方案中,哺乳动物是人。

[0154] 术语“药物制剂”指这样的制剂,其以允许活性成分的生物学活性有效的形式存在,并且不包含对施用所述制剂的受试者具有不可接受的毒性的另外的成分。所述制剂可以是无菌的。

[0155] “无菌”制剂是灭菌的,或不含任何活的微生物以及它们的孢子。

[0156] “有效量”指在需要的剂量和时间阶段,有效获得需要的治疗或预防效果的量。

[0157] 本发明的物质 / 分子的“治疗有效量”可以根据因素如个体的疾病状态、年龄、性别和体重,以及所述物质 / 分子激发个体中需要的反应的能力而改变。治疗有效量涵盖这样的量,其中治疗有益作用超出所述物质 / 分子的任何毒性或有害作用。“预防有效量”是指在需要的剂量和时间阶段,有效获得需要的预防效果的量。典型地,但不是必需地,由于预防剂量在疾病发生之前或疾病的早期阶段用于受试者,因此预防有效量将小于治疗有效量。

[0158] 术语“细胞毒性药剂”用于本文时指抑制或阻止细胞功能和 / 或引起细胞死亡或破坏的物质。该术语意图包括放射性同位素 (例如 At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹²和 Lu 的放射性同位素)、化疗剂 (例如,甲氨蝶呤 (methotrexate),阿霉素 (adriamycin),长春花生物碱 (vinca alkaloids) (长春新碱 (vincristine),长春碱 (vinblastine),依托泊苷 (etoposide)),多柔比星 (doxorubicin),美法仑 (melphalan),丝裂霉素 (mitomycin)C,苯丁酸氮芥 (chlorambucil),柔红霉素 (daunorubicin) 或其它嵌入剂,酶及其片段如溶核酶,抗生素和毒素如小分子毒素或细菌、真菌、植物或动物起源的酶促活性毒素,包括其片段和 / 或变体,和下面公开的各种抗肿瘤或抗癌剂。在下面描述其它的细胞毒性药剂。杀肿瘤药剂导致肿瘤细胞的破坏。

[0159] “毒素”是对于细胞的生长或增殖能够具有有害效应的任何物质。

[0160] “化疗剂”指可用于治疗癌症的化合物。化疗剂的实例包括烷化剂类 (alkylating agents), 诸如塞替派 (thiotepa) 和环磷酰胺 (cyclophosphamide) (**CYTOXAN®**); 磺酸烷基酯类 (alkyl sulfonates), 诸如白消安 (busulfan)、英丙舒凡 (improsulfan) 和哌泊舒凡 (piposulfan); 氮丙啶类 (aziridines), 诸如苯佐替派 (benzodopa)、卡波醌 (carboquone)、美妥替派 (meturedopa) 和乌瑞替派 (uredopa); 乙撑亚胺类 (ethylenimines) 和甲基蜜胺类 (methylamelamines), 包括六甲蜜胺 (altretamine)、三乙撑蜜胺 (triethylenemelamine)、三乙撑磷酰胺 (triethylenephosphoramidate)、三乙撑硫代磷酰胺 (triethylenethiophosphoramidate) 和三羟甲蜜胺 (trimethylomelamine);

番荔枝内酯类 (acetogenins) (尤其是布拉他辛 (bullatacin) 和布拉他辛酮 (bullatacinone)); δ -9-四氢大麻酚 (tetrahydrocannabinol) (屈大麻酚 (dronabinol), **MARINOL®**); β -拉帕醌 (lapachone); 拉伯醇 (lapachol); 秋水仙素类 (colchicines); 白桦脂酸 (betulinic acid); 喜树碱 (camptothecin) (包括合成类似物托泊替康 (topotecan) (**HYCAMTIN®**), CPT-11 (伊立替康 (irinotecan), **CAMPTOSAR®**), 乙酰喜树碱 (acetylcamptothecin)、东莨菪亭 (scopolectin) 和 9-氨基喜树碱 (9-aminocamptothecin)); 苔藓抑素 (bryostatin); callystatin; CC-1065 (包括其阿多来新 (adozelesin)、卡折来新 (carzelesin) 和比折来新 (bizelesin) 合成类似物); 鬼臼毒素 (podophyllotoxin); 鬼臼酸 (podophyllinic acid); 替尼泊苷 (teniposide); 隐藻素类 (cryptophycins) (特别是隐藻素 1 和隐藻素 8); 多拉司他汀 (dolastatin); 倍癌霉素 (duocarmycin) (包括合成类似物, KW-2189 和 CB1-TM1); 艾榴塞洛素 (eleutherobin); pancratistatin; sarcodictyin; 海绵抑素 (spongistatin); 氮芥类 (nitrogen mustards), 诸如苯丁酸氮芥 (chlorambucil)、萘氮芥 (chlomaphazine)、胆磷酰胺 (chlorophosphamide)、雌莫司汀 (estramustine)、异环磷酰胺 (ifosfamide)、双氯乙基甲胺 (mechlorethamine)、盐酸氧氮芥 (mechlorethamine oxide hydrochloride)、美法仑 (melphalan)、新氮芥 (novembichin)、苯芥胆甾醇 (phenesterine)、泼尼莫司汀 (prednimustine)、曲磷胺 (trofosfamide)、尿嘧啶氮芥 (uracil mustard); 亚硝脲类 (nitrosoureas), 诸如卡莫司汀 (carmustine)、氯脲菌素 (chlorozotocin)、福莫司汀 (fotemustine)、洛莫司汀 (lomustine)、尼莫司汀 (nimustine) 和雷莫司汀 (ranimustine); 抗生素类, 诸如 enediyne 抗生素类 (例如加利车霉素 (calicheamicin), 尤其是加利车霉素 γ II 和加利车霉素 ω II (参见例如 Nicolaou 等, Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl. 33:183-186 (1994)); CDP323, 口服 α -4 整联蛋白抑制剂; 蒽环类抗生素 (dynemicin), 包括蒽环类抗生素 A (dynemicin A); 埃斯波霉素 (esperamicin); 以及新制癌素 (neocarzinostatin) 发色团和相关色蛋白 enediyne 抗生素发色团)、阿克拉霉素 (aclacinomysins)、放线菌素 (actinomycin)、氨茴霉素 (anthramycin)、偶氮丝氨酸 (azaserine)、博来霉素 (bleomycins)、放线菌素 C (cactinomycin)、carabycin、洋红霉素 (carminomycin)、嗜癌霉素 (carzinophilin)、色霉素 (chromomycins)、放线菌素 D (dactinomycin)、柔红霉素 (daunorubicin)、地托比星 (detorubicin)、6-重氮基-5-氧-L-正亮氨酸、多柔比星 (doxorubicin) (包括 **ADRIAMYCIN®**、吗啉代多柔比星 (morpholino-doxorubicin)、氰基吗啉代多柔比星 (cyanomorpholino-doxorubicin)、2-吡咯吗啉代多柔比星 (2-pyrrolino-doxorubicin)、盐酸多柔比星脂质体注射剂 (**DOXIL®**)、脂质体多柔比星 TLC D-99 (**MYOCET®**)、PEG 化的脂质体多柔比星 (**CAELYX®**) 和脱氧多柔比星 (deoxydoxorubicin)、表柔比星 (epirubicin)、依索比星 (esorubicin)、伊达比星 (idarubicin)、麻西罗霉素 (marcellomycin)、丝裂霉素类 (mitomycins) 诸如丝裂霉素 C、霉酚酸 (mycophenolic acid)、诺拉霉素 (nogalamycin)、橄榄霉素 (olivomycins)、培洛霉素 (peplomycin)、porfiromycin、嘌呤霉素 (puromycin)、三铁阿霉素 (quelamycin)、罗多比星 (rodorubicin)、链黑菌素 (streptonigrin)、链佐星 (streptozocin)、杀结核菌素 (tubercidin)、乌苯美司 (ubenimex)、净司他丁 (zinostatin)、佐柔比星 (zorubicin); 抗代谢物类, 诸如甲氨喋呤 (methotrexate)、吉

西他滨 (gemcitabine) (**GEMZAR®**)、替加氟 (tegafur) (**UFTORAL®**)、卡培他滨 (capecitabine) (**XELODA®**)、埃坡霉素 (epothilone) 和 5- 氟尿嘧啶 (5-FU) ; 叶酸类似物, 诸如二甲叶酸 (denopterin)、甲氨喋呤 (methotrexate)、蝶酰三谷氨酸 (pteropterin)、三甲曲沙 (trimetrexate) ; 嘌呤类似物, 诸如氟达拉滨 (fludarabine)、6- 巯基嘌呤 (mercaptopurine)、硫咪嘌呤 (thiamiprine)、硫鸟嘌呤 (thioguanine) ; 嘧啶类似物, 诸如安西他滨 (ancitabine)、阿扎胞苷 (azacitidine)、6- 氮尿苷 (azauridine)、卡莫氟 (carmofur)、阿糖胞苷 (cytarabine)、双脱氧尿苷 (dideoxyuridine)、去氧氟尿苷 (doxifluridine)、依诺他滨 (enocitabine)、氟尿苷 (floxuridine) ; 雄激素类, 诸如卡鲁甾酮 (calusterone)、丙酸屈他雄酮 (dromostanolone propionate)、表硫雄醇 (epitiostanol)、美雄烷 (mepitiostane)、睾内酯 (testolactone) ; 抗肾上腺类, 诸如氨鲁米特 (aminoglutethimide)、米托坦 (mitotane)、曲洛司坦 (trilostane) ; 叶酸补充剂, 诸如亚叶酸 (frolinic acid) ; 醋葡萄糖内酯 (aceglatone) ; 醛磷酸胺糖苷 (aldophosphamide glycoside) ; 氨基乙酰丙酸 (aminolevulinic acid) ; 恩尿嘧啶 (eniluracil) ; 安吡啶 (amsacrine) ; bestrabucil ; 比生群 (bisantrene) ; 依达曲沙 (edatraxate) ; defofamine ; 地美可辛 (demecolcine) ; 地吡醌 (diaziquone) ; elfornithine ; 依利醋铵 (elliptinium acetate) ; epothilone ; 依托格鲁 (etoglucid) ; 硝酸镓 (gallium nitrate) ; 羟脲 (hydroxyurea) ; 香菇多糖 (lentinan) ; 氯尼达明 (lonidainine) ; 美登木素生物碱类 (maytansinoids), 诸如美登素 (maytansine) 和安丝菌素 (ansamitocins) ; 米托胍脲 (mitoguazone) ; 米托蒽醌 (mitoxantrone) ; 莫哌达醇 (mopidanmol) ; 二胺硝吡啶 (nitraerine) ; 喷司他丁 (pentostatin) ; 蛋氨酸芥 (phenamet) ; 吡柔比星 (pirarubicin) ; 洛索蒽醌 (losoxantrone) ; 2- 乙基酰肼 (2-ethylhydrazide) ; 丙卡巴肼 (procarbazine) ; **PSK®** 多糖复合物 (JHS 天然产物, Eugene, OR) ; 雷佐生 (razoxane) ; 根霉素 (rhizoxin) ; 西佐喃 (sizofiran) ; 螺旋锗 (spirogermanium) ; 细交链孢菌酮酸 (tenuazonic acid) ; 三亚胺醌 (triaziquone) ; 2,2',2' - 三氯三乙胺 (2,2',2' - trichlorotriethylamine) ; 单端孢菌素类 (trichothecenes) (尤其是 T-2 毒素、疣孢菌素 (verracurin) A、杆孢菌素 (roridin) A 和蛇行菌素 (anguidine)) ; 乌拉坦 (urethan) ; 长春地辛 (vindesine) (**ELDISINE®**, **FILDESIN®**) ; 达卡巴嗪 (dacarbazine) ; 甘露莫司汀 (mannomustine) ; 二溴甘露醇 (mitobronitol) ; 二溴卫矛醇 (mitolactol) ; 哌泊溴烷 (pipobroman) ; gacytosine ; 阿糖胞苷 (arabinoside) (“Ara-C”) ; 塞替派 (thiotepa) ; 类紫杉醇类 (taxoid), 例如紫杉醇 (paclitaxel) (**TAXOL®**)、紫杉醇的清蛋白改造的纳米颗粒剂型 (ABRAXANE™) 和多西他塞 (docetaxel) (**TAXOTERE®**) ; 苯丁酸氮芥 (chloranbucil) ; 6- 硫鸟嘌呤 (thioguanine) ; 巯基嘌呤 (mercaptopurine) ; 甲氨喋呤 (methotrexate) ; 铂药剂, 诸如顺铂 (cisplatin)、奥沙利铂 (oxaliplatin) (例如 **ELOXATIN®**), 和卡铂 (carboplatin) ; 长春花药类 (vincas), 其防止微管蛋白聚合形成微管, 包括长春碱 (vinblastine) (**VELBAN®**), 长春新碱 (vincristine) (**ONCOVIN®**), 长春地辛 (vindesine) (**ELDISINE®**, **FILDESIN®**), 和长春瑞滨 (vinorelbine) (**NAVELBINE®**) ; 依托泊苷 (etoposide) (VP-16) ; 异环磷酰胺 (ifosfamide) ; 米托蒽醌 (mitoxantrone) ; 亚叶酸 (leucovorin) ; 能

灭瘤 (novantrone); 依达曲沙 (edatrexate); 道诺霉素 (daunomycin); 氨基蝶呤 (aminopterin); 伊本膦酸盐 (ibandronate); 拓扑异构酶抑制剂 RFS2000; 二氟甲基鸟氨酸 ((difluoromethylornithine)) (DMFO); 类视黄酸类 (retinoids), 诸如视黄酸 (retinoic acid); 包括贝沙罗汀 (bexarotene) (**TARGRETIN®**); 二膦酸盐 (bisphosphonates) 如氯膦酸盐 (clodronate) (例如, **BONEFOS®** 或 **OSTAC®**), 依替膦酸 (etidronate) (**DIDROCAL®**), NE-58095, 唑来膦酸 (zoledronic acid)/ 唑来膦酸 (zoledronate) (**ZOMETA®**), 阿伦膦酸盐 (alendronate) (**FOSAMAX®**), 帕米膦酸盐 (pamidronate) (**AREDIA®**), 替鲁膦酸盐 (tiludronate) (**SKELID®**), 或利塞膦酸盐 (risedronate) (**ACTONEL®**); 曲沙他滨 (troxacitabine) (1,3- 二氧戊环核苷胞嘧啶类似物); 反义寡核苷酸, 特别是在涉及异常细胞增殖的信号传导途径中抑制基因表达的那些, 如例如 PKC- α , Raf, H-Ras, 和表皮生长因子受体 (EGF-R); 疫苗如 **THERATOPE®** 疫苗和基因治疗疫苗, 例如 **ALLOVECTIN®** 疫苗, **LEUVECTIN®** 疫苗, 和 **VAXID®** 疫苗; 拓扑异构酶 1 抑制剂 (例如 **LURTOTECAN®**); rmRH (例如, **ABARELIX®**); BAY439006 (索拉非尼 (sorafenib); Bayer); SU-11248 (舒尼替尼 (sunitinib), **SUTENT®**, Pfizer); 哌立福辛 (perifosine), COX-2 抑制剂 (例如, 塞来考昔 (celecoxib) 或艾托考昔 (etoricoxib)), 蛋白酶体抑制剂 (例如, PS341); 硼替佐米 (bortezomib) (**VELCADE®**); CCI-779; 替匹法尼 (tipifarnib) (R11577); orafenib, ABT510; Bcl-2 抑制剂如奥利美生钠 (oblimersen sodium) (**GENASENSE®**); 匹蒽醌 (pixantrone); EGFR 抑制剂 (见下面的定义); 酪氨酸激酶抑制剂 (见下面的定义); 丝氨酸-苏氨酸激酶抑制剂如雷帕霉素 (rapamycin) (西罗莫司 (sirolimus), **RAPAMUNE®**); 法呢基转移酶抑制剂如氯那法尼 (lonafarnib) (SCH 6636, SARASAR™); 和任何上述物质的药用盐、酸或衍生物; 以及两种或更多上述物质的组合, 诸如 CHOP (环磷酰胺、多柔比星、长春新碱和泼尼松龙组合疗法的缩写) 和 FOLFOX (奥沙利铂 (ELOXATIN™) 组合 5-FU 和亚叶酸的治疗方案的缩写)。

[0161] 本文定义的化疗剂包括“抗激素剂”或“内分泌治疗剂”, 其作用为调节、降低、阻断或抑制可促进癌生长的激素效果。它们自身可以是激素。包括, 但不限于具有混合的激动剂/拮抗剂模式的抗雌激素类, 包括他莫昔芬 (tamoxifen) (**NOLVADEX®**), 4-羟基他莫昔芬, 托瑞米芬 (toremifene) (**FARESTON®**), 艾多昔芬 (idoxifene), 屈洛昔芬 (droloxifene), 雷洛昔芬 (raloxifene) (**EVISTA®**), 曲沃昔芬 (trioxifene), keoxifene, 和选择性雌激素受体调控物类 (SERM) 如 SERM3, 不具有激动剂性质的纯的抗雌激素类, 如氟维司群 (fulvestrant) (**FASLODEX®**), 和 EM800 (所述药剂可以封闭雌激素受体 (ER) 二聚化, 抑制 DNA 结合, 增加 ER 更新和 / 或抑制 ER 水平); 芳香酶抑制剂包括类固醇芳香酶抑制剂如福美坦 (formestane) 和益西美坦 (exemestane) (**AROMASIN®**), 和非类固醇芳香酶抑制剂如阿那曲唑 (anastrozole) (**ARIMIDEX®**), 来曲唑 (letrozole) (**FEMARA®**) 和氨基葡萄糖 (aminogluthetimide), 和其它芳香酶抑制剂包括伏氯唑 (vorozole) (**RIVISOR®**), 醋酸甲地孕酮 (megestrol acetate) (**MEGASE®**), 法偈唑 (fadrozole), 和 4(5)-咪唑; 促性腺激素释放激素激动剂, 包括亮丙立德 (leuprolide) (**LUPRON®** 和 **ELIGARD®**), 戈舍瑞林 (goserelin), 布舍瑞林

(buserelin), 和曲普瑞林 (tripterelin); 性类固醇, 包括黄体酮 (progestines) 如醋酸甲地孕酮 (megestrol acetate) 和醋酸甲羟孕酮 (medroxyprogesterone acetate), 雌激素如己烯雌酚 (diethylstilbestrol) 和普罗马林 (premarin), 和雄激素 / 类视黄醇如氟甲睾酮 (fluoxymesterone), 所有的反式视黄酸 (transretinoic acid) 和芬维 A 胺 (fenretinide); 奥那司酮 (onapristone); 抗黄体酮 (anti-progesterones); 雌激素受体下调剂 (ERDs); 抗雄激素如氟他胺 (flutamide), 尼鲁米特 (nilutamide) 和比卡鲁胺 (bicalutamide); 上述任一种的药用盐、酸或衍生物, 以及上述两种以上的组合。

[0162] “生长抑制剂”用于本文时指在体外或在体内抑制细胞 (如表达 Notch 的细胞) 生长的化合物或组合物。因此, 生长抑制剂可以是显著降低处于 S 期的细胞 (如表达 Notch 的细胞) 百分比的药剂。生长抑制剂的实例包括阻断细胞周期行进 (处于 S 期以外的位置) 的药剂, 诸如诱导 G1 停滞和 M 期停滞的药剂。经典的 M 期阻断剂包括长春花药类 (vincas) (长春新碱 (vincristine) 和长春碱 (vinblastine))、紫杉烷类 (taxanes)、和 II 型拓扑异构酶抑制剂, 诸如多柔比星 (doxorubicin)、表柔比星 (epirubicin)、柔红霉素 (daunorubicin)、依托泊苷 (etoposide) 和博来霉素 (bleomycin)。那些阻滞 G1 的药剂也溢出进入 S 期停滞, 例如 DNA 烷化剂类, 诸如他莫昔芬 (tamoxifen)、泼尼松 (prednisone)、达卡巴嗪 (dacarbazine)、双氯乙基甲胺 (mechlorethamine)、顺铂 (cisplatin)、甲氨喋呤 (methotrexate)、5- 氟尿嘧啶 (5-fluorouracil) 和阿糖胞苷 (ara-C)。更多信息可参见 Mendelsohn 和 Israel 编, 癌症的分子基础 (The Molecular Basis of Cancer), 第 1 章, 题为“细胞周期调节、致癌基因和抗肿瘤药物 (Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs)”, Murakami 等 (WB Saunders, Philadelphia(1995)), 例如第 13 页。紫杉烷类 (taxanes) (紫杉醇 (paclitaxel) 和多西他赛 (docetaxel)) 都是来自紫杉树的抗癌药物。多西他赛 (Docetaxel) (**TAXOTERE®**, Rhone-Poulenc Rorer), 来自欧洲紫杉树, 是紫杉醇 (paclitaxel) (**TAXOL®**, Bristol-Myers Squibb) 的半合成类似物。紫杉醇 (paclitaxel) 和多西他赛 (docetaxel) 促进微管蛋白二聚体组装为微管并且通过防止解聚稳定微管, 这又导致抑制了细胞中的有丝分裂。

[0163] III. 组合物和方法

[0164] 本发明部分基于 Notch 结合药剂, 例如抗体及其片段的鉴定。在具体的实施方案中, 本发明涉及 Notch2 负调节区 (NRR) 结合药剂, 如结合 Notch2NRR 的分离的抗体及其片段。所述抗体有效用于例如诊断或治疗与 Notch2 的表达和 / 或活性相关 (例如增加的表达或活性) 的疾病。在具体的实施方案中, 抗 -Notch2NRR 抗体有效用于诊断或治疗癌症, 例如 B- 细胞恶性肿瘤和黑素瘤。因此, 本发明提供涉及 Notch2NRR 结合的方法、组合物、试剂盒和制品。

[0165] A. 抗 -Notch2NRR 抗体

[0166] 1. 示例性的噬菌体文库来源的抗体

[0167] 在本文提供来自噬菌体文库的示例性单克隆抗体, 如在实施例 B 中所述。分离了结合 Notch2NRR 被称为“抗体 D”的抗体。对该抗体进行亲和力成熟以产生被称为抗体 D-1, 抗体 D-2, 和抗体 D-3 的抗体。将抗体 D、抗体 D-1、抗体 D-2、和抗体 D-3 的重链和轻链高变区 (HVRs) 的序列显示在图 1 和 2 中。抗体 D、抗体 D-1、抗体 D-2、和抗体 D-3 的重链和轻链可变结构域的序列显示在图 3 和 4 中。如下提供抗 -Notch2NRR 抗体的另外的实施方案。

[0168] 在一个方面中,提供特异性结合 Notch2NRR 的抗体,其中所述抗体包含选自下列的至少一个、两个、三个、四个、五个或六个 HVRs:

[0169] (a)HVR-H1,其包含符合 SEQ ID NO:3 的共有序列的氨基酸序列;

[0170] (b)HVR-H2,其包含 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列;

[0171] (c)HVR-H3,其包含 SEQ ID NO:5 的氨基酸序列;

[0172] (d)HVR-L1,其包含符合 SEQ ID NO:10 的共有序列的氨基酸序列;

[0173] (e)HVR-L2,其包含符合 SEQ ID NO:14 的共有序列的氨基酸序列;和

[0174] (f)HVR-L3,其包含符合 SEQ ID NO:19 的共有序列的氨基酸序列。

[0175] 在另一个方面中,所述抗体包含含有 SEQ ID NO:5 的氨基酸序列的 HVR-H3 和选自上述 (a), (b), (d), (e), 和 (f) 的至少一个、两个、三个、四个或五个 HVRs。在另一个方面中,抗体包含上述 (a), (b), (c), (d), (e), 和 (f)。关于 (a), (d), (e), 和 (f),预期下列实施方案的任何一个或多个。HVR-H1 包含选自 SEQ ID NOs:1-2 的氨基酸序列;HVR-L1 包含选自 SEQ ID NOs:6-9 的氨基酸序列;HVR-L2 包含选自 SEQ ID NOs:11-13 的氨基酸序列;并且 HVR-L3 包含选自 SEQ ID NOs:15-18 的氨基酸序列。

[0176] 在另一个方面中,提供特异性结合 Notch2NRR 的抗体,其中所述抗体包含 HVR-H1(该 HVR-H1 含有符合 SEQ ID NO:3 的共有序列的氨基酸序列),含有 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列的 HVR-H2,和含有 SEQ ID NO:5 的氨基酸序列的 HVR-H3。在一个实施方案中,HVR-H1 包含选自 SEQ ID NOs:1-2 的氨基酸序列。

[0177] 在另一个方面中,提供特异性结合 Notch2NRR 的抗体,其中所述抗体包含 HVR-L1(该 HVR-L1 含有符合 SEQ ID NO:10 的共有序列的氨基酸序列),含有符合 SEQ ID NO:14 的共有序列的氨基酸序列的 HVR-L2,和含有符合 SEQ ID NO:19 的共有序列的氨基酸序列的 HVR-L3。预期以任何组合的下面的实施方案:HVR-L1 包含选自 SEQ ID NOs:6-9 的氨基酸序列;HVR-L2 包含选自 SEQ ID NOs:11-13 的氨基酸序列;和 HVR-L3 包含选自 SEQ ID NOs:15-18 的氨基酸序列。在一个实施方案中,结合 Notch2NRR 的抗体包含含有 SEQ ID NO:6 的氨基酸序列的 HVR-L1,含有 SEQ ID NO:11 的氨基酸序列的 HVR-L2;和含有 SEQ ID NO:15 的氨基酸序列的 HVR-L3。在另一个实施方案中,结合 Notch2NRR 的抗体包含含有 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列的 HVR-L1;含有 SEQ ID NO:11 的氨基酸序列的 HVR-L2;和含有 SEQ ID NO:16 的氨基酸序列的 HVR-L3。在另一个实施方案中,结合 Notch2NRR 的抗体包含含有 SEQ ID NO:8 的氨基酸序列的 HVR-L1;含有 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列的 HVR-L2;和含有 SEQ ID NO:17 的氨基酸序列的 HVR-L3。在另一个实施方案中,结合 Notch2NRR 的抗体包含含有 SEQ ID NO:9 的氨基酸序列的 HVR-L1;含有 SEQ ID NO:13 的氨基酸序列的 HVR-L2;和含有 SEQ ID NO:18 的氨基酸序列的 HVR-L3。

[0178] 在一个实施方案中,提供特异性结合 Notch2NRR 的抗体,其中所述抗体包含:

[0179] (a) 含有 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列的 HVR-H1;

[0180] (b) 含有 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列的 HVR-H2;

[0181] (c) 含有 SEQ ID NO:5 的氨基酸序列的 HVR-H3;

[0182] (d) 含有 SEQ ID NO:6 的氨基酸序列的 HVR-L1;

[0183] (e) 含有 SEQ ID NO:11 的氨基酸序列的 HVR-L2;和

[0184] (f) 含有 SEQ ID NO:15 的氨基酸序列的 HVR-L3。

[0185] 在另一个实施方案中,提供特异性结合 Notch2NRR 的抗体,其中所述抗体包含:

- [0186] (a) 含有 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列的 HVR-H1;
- [0187] (b) 含有 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列的 HVR-H2;
- [0188] (c) 含有 SEQ ID NO:5 的氨基酸序列的 HVR-H3;
- [0189] (d) 含有 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列的 HVR-L1;
- [0190] (e) 含有 SEQ ID NO:11 的氨基酸序列的 HVR-L2;和
- [0191] (f) 含有 SEQ ID NO:16 的氨基酸序列的 HVR-L3。

[0192] 在另一个实施方案中,提供特异性结合 Notch2NRR 的抗体,其中所述抗体包含:

- [0193] (a) 含有 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列的 HVR-H1;
- [0194] (b) 含有 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列的 HVR-H2;
- [0195] (c) 含有 SEQ ID NO:5 的氨基酸序列的 HVR-H3;
- [0196] (d) 含有 SEQ ID NO:8 的氨基酸序列的 HVR-L1;
- [0197] (e) 含有 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列的 HVR-L2;和
- [0198] (f) 含有 SEQ ID NO:17 的氨基酸序列的 HVR-L3。

[0199] 在另一个实施方案中,提供特异性结合 Notch2NRR 的抗体,其中所述抗体包含:

- [0200] (a) 含有 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列的 HVR-H1;
- [0201] (b) 含有 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列的 HVR-H2;
- [0202] (c) 含有 SEQ ID NO:5 的氨基酸序列的 HVR-H3;
- [0203] (d) 含有 SEQ ID NO:9 的氨基酸序列的 HVR-L1;
- [0204] (e) 含有 SEQ ID NO:13 的氨基酸序列的 HVR-L2;和
- [0205] (f) 含有 SEQ ID NO:18 的氨基酸序列的 HVR-L3。

[0206] 在某些实施方案中,上述抗体中任一项还包含选自 VH 亚组 III 共有构架和 VL 亚组 I 共有构架的至少一个构架。

[0207] 在某些实施方案中,对抗 -Notch2NRR 抗体进行亲和力成熟。例如,可以以任何组合进行在指定的 HVR 位置 (Kabat 编号) 的下列取代的任何一个或多个:

- [0208] - 在 HVR-H1 (SEQ ID NO:1) 中:S28T;T30S;
- [0209] - 在 HVR-L1 (SEQ ID NO:6) 中:S28N;I29N 或 V;S30R 或 K;S31R;Y32F
- [0210] - 在 HVR-L2 (SEQ ID NO:11) 中:G50R;S53I 或 T;A55E
- [0211] - 在 HVR-L3 (SEQ ID NO:15) 中:S93I 或 R;L96W 或 H

[0212] 在本文公开的具体抗体,即抗体 D 以及抗体 D 的亲和力成熟形式 (D-1, D-2, 和 D-3) 可以进行进一步的亲和力成熟。因此,提供本文所述的任一种抗体的亲和力成熟形式。

[0213] 在某些实施方案中,具有任一种上述 HVR 序列的抗 -Notch2NRR 抗体还可以包含任何适合的构架可变结构域序列,条件是充分保持对 Notch2NRR 的结合活性。在某些实施方案中,抗 -Notch2NRR 抗体包含人可变重链 (VH) 共有构架序列,如显示于图 5A 和 5B 中的任一种 VH 共有构架序列。在一个实施方案中,VH 共有构架序列包含人亚组 III 重链构架共有序列,例如如在图 5A 和 5B 中显示。在另一个实施方案中,VH 共有构架序列包含“接纳体 2”构架序列,例如如显示在图 5A 和 5B 中。在具体的实施方案中,VH 构架共有序列包含接纳体 2B 或接纳体 2D 的 FR1-FR4,其中 FR4 包含 SEQ ID NO:35 (图 5A 和 5B),其中 SEQ ID NO:35 的最后一个残基 (S11) 任选地被丙氨酸取代。在另一个具体的实施方案中,VH 构架

共有序列包含 SEQ ID NOs :50 ;51 ;57 或 59 ;和 35 的序列,其中 SEQ ID NO :35 的 S11 任选地被丙氨酸取代。

[0214] 在某些实施方案中,具有任一种上述 HVR 序列的抗-Notch2NRR 抗体还可以包含人可变轻链 (VL) 共有构架序列,如在图 6A 和 6B 中显示。在一个实施方案中,VL 共有构架序列包含人 VL κ 亚组 I 共有构架 (κ v1) 序列,例如如显示在图 6A 和 6B 中。在另一个实施方案中,VL 构架共有序列包含 huMAb4D5-8 的 FR1-FR4,如在图 7 或 8 中显示。在具体的实施方案中,VL 构架共有序列包含 SEQ ID NOs :60,61,62,和 63 的序列。

[0215] 在另一个方面中,抗-Notch2NRR 抗体包含这样的重链可变结构域 (VH) 序列,其与选自 SEQ ID NOs :20-21 的氨基酸序列具有至少 90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%,或 100% 序列同一性。在某些实施方案中,具有至少 90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,或 99% 同一性的 VH 序列包含相对于参照序列的取代 (例如保守性取代),插入或缺失,但是包含该序列的抗-Notch2NRR 抗体保持与 Notch2NRR 结合的能力。在某些实施方案中,在选自 SEQ ID NOs :20-21 的氨基酸序列中已经取代、插入和 / 或缺失共 1-10 个氨基酸。在某些实施方案中,在 HVRs 外的区域 (即,在 FRs 中) 存在取代、插入或缺失。在具体的实施方案中,VH 包含选自下列的一个、两个或三个 HVRs : (a) 含有符合 SEQ ID NO :3 的共有序列的氨基酸序列的 HVR-H1, (b) 含有 SEQ ID NO :4 的氨基酸序列的 HVR-H2,和 (c) 含有 SEQ ID NO :5 的氨基酸序列的 HVR-H3。在一个这样的实施方案中,HVR-H1 包含选自 SEQ ID NOs :1-2 的氨基酸序列。

[0216] 在另一个方面中,提供特异性结合 Notch2NRR 的抗体,其中抗体包含与选自 SEQ ID NOs :22-25 的氨基酸序列具有至少 90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%,或 100% 序列同一性的轻链可变结构域 (VL)。在某些实施方案中,具有至少 90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,或 99% 的同一性的 VL 序列包含相对于参照序列的取代 (例如保守性取代),插入或缺失,但是包含该序列的抗-Notch2NRR 抗体保持对 Notch2NRR 结合的能力。在某些实施方案中,在选自 SEQ ID NOs :22-25 的氨基酸序列中已经取代、插入和 / 或缺失共 1-10 个氨基酸。在某些实施方案中,在 HVRs 外的区域 (即,在 FRs 中) 存在取代、插入或缺失。在具体的实施方案中,所述 VL 包含选自下列的一个、两个或三个 HVRs : (a) 含有符合 SEQ ID NO :10 的共有序列的氨基酸序列的 HVR-L1 ; (b) 含有符合 SEQ ID NO :14 的共有序列的氨基酸序列的 HVR-L2 ;和 (c) 含有符合 SEQ ID NO :19 的共有序列的氨基酸序列的 HVR-L3。在一个这样的实施方案中,VL 包含选自 (a) 含有选自 SEQ ID NOs :6-9 的氨基酸序列的 HVR-L1 ; (b) 含有选自 SEQ ID NOs :11-13 的氨基酸序列的 HVR-L2 ;和 (c) 含有选自 SEQ ID NOs :15-18 的氨基酸序列的 HVR-L3 的一个、两个或三个 HVRs。在一个这样的实施方案中,VL 包含选自 (a) 含有 SEQ ID NO :6 的氨基酸序列的 HVR-L1 ; (b) 含有 SEQ ID NO :11 的氨基酸序列的 HVR-L2 ;和 (c) 含有 SEQ ID NO :15 的氨基酸序列的 HVR-L3 的一个,两个或三个 HVRs。在另一个这样的实施方案中,VL 包含选自 (a) 含有 SEQ ID NO :7 的氨基酸序列的 HVR-L1 ; (b) 含有 SEQ ID NO :11 的氨基酸序列的 HVR-L2 ;和 (c) 含有 SEQ ID NO :16 的氨基酸序列的 HVR-L3 的一个,两个或三个 HVRs。在另一个这样的实施方案中,VL 包含选自 (a) 含有 SEQ ID NO :8 的氨基酸序列的 HVR-L1 ; (b) 含有 SEQ ID NO :12 的氨基酸序列的 HVR-L2 ;和 (c) 含有 SEQ ID NO :17 的氨基酸序列的 HVR-L3 的一个,两个或三个 HVRs。在另一个这样的实施方案中,VL 包含选自下列的一个、两个或三个

HVRs : (a) 含有 SEQ ID NO :9 的氨基酸序列的 HVR-L1 ; (b) 含有 SEQ ID NO :13 的氨基酸序列的 HVR-L2 ; 和 (c) 含有 SEQ ID NO :18 的氨基酸序列的 HVR-L3。

[0217] 在上述提供的变体 VH 和 VL 序列的某些实施方案中, 取代、插入或缺失可以在 HVRs 中发生。在这样的实施方案中, 取代、插入或缺失可以在一个或多个 HVRs 中存在, 只要所述改变实质上没有减少抗体结合抗原的能力。例如, 可以在 HVRs 中形成没有实质上减少结合亲和性的保守性改变。在某些情形中, 在 HVRs 中的改变可以实际上提高抗体的亲和性。这样的改变可以在 HVR “热点” (即由在体细胞成熟过程中经历高频突变的密码子编码的残基) 中形成从而增加抗体亲和性。(见, 例如, Chowdhury, 分子生物学方法 (Methods Mol. Biol). 207 :179-196, 2008.)。在上述提供的变体 VH 和 VL 序列的某些实施方案中, 每个 HVR 是保守的 (未改变的), 或仅包含单氨基酸取代、插入或缺失。

[0218] 在另一个方面中, 提供特异性结合 Notch2NRR 的抗体, 其中抗体包含在上述提供的任一个实施方案中的 VH, 以及在上列提供的任一个实施方案中的 VL。在一个实施方案中, 抗体包含与 SEQ ID NO :20 的氨基酸序列具有至少 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 或 100% 序列同一性的 VH 和与 SEQ ID NO :22 的氨基酸序列具有至少 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 或 100% 序列同一性的 VL。在一个这样的实施方案中, VH 包含选自下列的一个、两个或三个 HVRs : (a) 含有 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列的 HVR-H1, (b) 含有 SEQ ID NO :4 的氨基酸序列的 HVR-H2 ; 和 (c) 含有 SEQ ID NO :5 的氨基酸序列的 HVR-H3, 并且 VL 包含选自下列的一个、两个或三个 HVRs : (a) 含有 SEQ ID NO :6 的氨基酸序列的 HVR-L1 ; (b) 含有 SEQ ID NO :11 的氨基酸序列的 HVR-L2 ; 和 (c) 含有 SEQ ID NO :15 的氨基酸序列的 HVR-L3。在具体的实施方案中, 抗体包含含有 SEQ ID NO :20 的氨基酸序列的 VH, 和含有 SEQ ID NO :22 的氨基酸序列的 VL。

[0219] 在另一个实施方案中, 特异性结合 Notch2NRR 的抗-Notch2NRR 抗体包含与 SEQ ID NO :21 的氨基酸序列具有至少 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 或 100% 序列同一性的 VH, 和与选自 SEQ ID NOs :23-25 的氨基酸序列具有至少 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 或 100% 序列同一性的 VL。在一个这样的实施方案中, VH 包含选自下列的一个、两个或三个 HVRs : (a) 含有 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列的 HVR-H1, (b) 含有 SEQ ID NO :4 的氨基酸序列的 HVR-H2, 和 (c) 含有 SEQ ID NO :5 的氨基酸序列的 HVR-H3, 并且 VL 包含选自下列的一个、两个或三个 HVRs : (a) 包含选自 SEQ ID NOs :7-9 的氨基酸序列的 HVR-L1 ; (b) 包含选自 SEQ ID NOs :11-13 的氨基酸序列的 HVR-L2 ; 和 (c) 包含选自 SEQ ID NOs :16-18 的氨基酸序列的 HVR-L3。在具体的实施方案中, 抗体包含含有 SEQ ID NO :21 的氨基酸序列的 VH, 和含有选自 SEQ ID NOs :23-25 的氨基酸序列的 VL。

[0220] 在某些实施方案中, 提供任一种上述抗体的亲和力成熟形式。在另一个实施方案中, 提供特异性结合 Notch2NRR 的重组蛋白, 其中所述重组蛋白包含任一种上述抗体的抗原结合位点。在一个这样的实施方案中, 重组蛋白包含上述提供的 HVRs 的任何一种或多种。

[0221] 在某些实施方案中, 提供编码任一种上述抗体的多核苷酸。在一个实施方案中, 提供包含所述多核苷酸的载体。在一个实施方案中, 提供包含所述载体的宿主细胞。在一个实施方案中, 所述宿主细胞是真核生物细胞。在一个实施方案中, 所述宿主细胞是 CHO 细胞。

在一个实施方案中,提供制备抗 -Notch2NRR 抗体的方法,其中所述方法包括在适合表达编码抗体的多核苷酸的条件培养所述宿主细胞,并且分离所述抗体。

[0222] 2. 另外的示例性抗体

[0223] 在一个实施方案中,本发明提供抑制 Notch2 活性的分离的抗 -Notch2NRR 抗体。例如,本发明的抗体可以调节 Notch2 信号传导的一个或多个方面,包括破坏任何生物学相关的 Notch2 信号传导途径。

[0224] 在另一个实施方案中,本发明提供以 $\leq 100\text{nM}$ 的 K_d 结合 Notch2NRR 的分离的抗 -Notch2NRR 抗体。在某些实施方案中,抗 -Notch2NRR 抗体以 $\leq 10\text{nM}$, $\leq 1\text{nM}$, 或 $\leq 0.1\text{nM}$ 的 K_d 结合 Notch2NRR。如在本文的实施例中所述,示例性噬菌体抗体 D-3 以 5nM 的 K_d 结合。如在本领域中充分确定的,可以使用多种测定法的任一种确定配体与其受体的结合亲和性,并且所述结合亲和性以多种量化值表示。因此,在一个实施方案中,将结合亲和性表示为 K_d 值,并且其反映固有的结合亲和性(例如,具有最小化的抗体亲抗原性作用)。一般地并且优选地,将结合亲和性在体外测量,而不管是在无细胞还是在细胞相关的设置中进行测量的。可以将本领域中已知的许多测定法中的任一种,包括本文所述的那些用于获得结合亲和性测量,包括,例如 Biacore,放射性免疫测定(RIA),和 ELISA。

[0225] 在另一个实施方案中,提供结合 Notch2NRR 的分离的抗体,其中抗体没有显著结合除了 Notch2 之外的 Notch 家族成员(即,在哺乳动物中的 Notch1,3,和 4)。所述抗体可以使用在实施例 B(1) 中提供的测定法进行鉴定。在一个实施方案中,所述抗体结合人 Notch2NRR 和来自至少一种其它非人物种例如小鼠的 Notch2NRR。

[0226] 在另一个实施方案中,提供这样的分离的抗体,其结合与本文提供的抗体相同的表位。在一个实施方案中,提供这样的分离的抗 -Notch2NRR 抗体,其与选自抗体 D、抗体 D-1、抗体 D-2 和抗体 D-3 的抗体结合相同的表位。在另一个实施方案中,本发明提供与选自抗体 D、抗体 D-1、抗体 D-2、和抗体 D-3 的抗体竞争的抗 -Notch2NRR 抗体。在另一个实施方案中,提供结合选自 Notch2 的 LNR-A 结构域和 HD-C 结构域的至少一种结构域的分离的抗体。在一个这样的实施方案中,抗体结合 LNR-A 结构域和 HD-C 结构域。在另一个这样的实施方案中,所述抗体还结合 LNR-B 和 / 或 HD-N 结构域。那些结构域描述在图 18 中。

[0227] 上述抗 -Notch2NRR 抗体的实施方案可以单独或以任何组合存在。另外,在本文描述的任何抗 -Notch2NRR 抗体可以具有下列特征的任何一种或多种:在某些实施方案中,抗 -Notch2NRR 抗体是单克隆抗体。在某些实施方案中,抗 -Notch2NRR 抗体是选自 Fab, Fab' -SH, Fv, scFv, 或 $(\text{Fab}')_2$ 片段的抗体片段。在另一个实施方案中,抗 -Notch2NRR 抗体是人源化抗体,人抗体或嵌合抗体。

[0228] 3. 抗体片段

[0229] 本发明涵盖抗体片段。抗体片段可以通过传统方法,如酶促消化,或通过重组技术产生。在某些情形中,存在使用抗体片段,而不是使用完整抗体的益处。更小的片段大小容许快速清除,并且可以导致提高的对实体瘤的接近。关于某些抗体片段的综述,见 Hudson 等 (2003) Nat. Med. 9 :129-134。

[0230] 已经开发了用于生成抗体片段的多种技术。传统上,通过蛋白水解消化完整抗体来衍生这些片段(参见例如 Morimoto 等,生物化学和生物物理方法杂志 (Journal of Biochemical and Biophysical Methods) 24 :107-117 (1992); 和 Brennan 等,科学

(Science) 229 :81(1985))。然而,现在可直接由重组宿主细胞生成这些片段。Fab, Fv 和 ScFv 抗体片段都可以在大肠杆菌中表达并且分泌,由此导致容易产生大量的这些片段。可从上文讨论的抗体噬菌体文库中分离抗体片段。或者,可直接从大肠杆菌回收 Fab'-SH 片段并化学偶联以形成 F(ab')₂ 片段 (Carter 等, 生物 / 技术 (Bio/Technology) 10 : 163-167(1992))。根据另一种方法,可以直接从宿主细胞培养物中分离 F(ab')₂ 片段。包含补救受体结合表位残基具有增加的体内半衰期的 Fab 和 F(ab')₂ 片段在美国专利号 5,869,046 中描述。用于生成抗体片段的其它技术对于熟练从业人员将是显而易见的。在某些实施方案中,抗体是单链 Fv 片段 (scFv)。参见 W093/16185 ;美国专利号 5,571,894 ; 及 5,587,458。Fv 和 scFv 是具有完整结合位点、缺少恒定区的唯一类型 ;如此,它们可以适于在体内使用时降低非特异性结合。可构建 scFv 融合蛋白以产生效应器蛋白质在 scFv 的氨基或羧基末端的融合。参见抗体改造 (Antibody Engineering), Borrebaeck 编,见上文。抗体片段还可以是“线性抗体”,例如如美国专利号 5,641,870 中所记载的。此类线性抗体片段可以是单特异性的或双特异性的。

[0231] 4. 人源化的抗体

[0232] 本发明涵盖人源化抗体。在本领域中已知用于人源化非人抗体的各种方法。例如,人源化抗体可以具有一个或多个从非人来源引入的氨基酸残基。这些非人氨基酸残基常常称作“输入”残基,它们典型的取自“输入”可变结构域。人源化可基本上遵循 Winter 及其同事的方法 (Jones 等, (1986) 自然 (Nature) 321 :522-525 ;Riechmann 等 (1988), 自然 (Nature) 332 :323-327 ;Verhoeyen 等 (1988), 科学 (Science) 239 :1534-1536), 通过用高变区序列取代相应的人抗体序列而进行。因而,此类“人源化”抗体是嵌合抗体 (美国专利号 4,816,567), 其中基本上少于整个人可变结构域用来自非人物种的相应序列置换。在实践中,人源化抗体典型的是其中一些高变区残基和可能的一些 FR 残基用来自啮齿类抗体中类似位点的残基置换的人抗体。

[0233] 用于构建人源化抗体的人可变结构域 (包括轻链和重链二者) 的选择对于降低抗原性非常重要。依照所谓的“最适”(best-fit) 方法,用啮齿类抗体的可变结构域序列对已知的人可变结构域序列的整个文库进行筛选。然后接受与啮齿类最接近的人序列作为人源化抗体的人构架。见例如 Sims 等 (1993), 免疫学杂志 (J. Immunol.) 151 :2296 ;Chothia 等 (1987), 分子生物学杂志 (J. Mol. Biol.) 196 :901)。另一种方法使用由特定轻链或重链亚组的所有人抗体的共有序列衍生的特定构架。同一构架可用于数种不同的人源化抗体。见例如, Carter 等 (1992), 美国国家科学院学报 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 89 :4285 ;Presta 等 (1993), 免疫学杂志 (J. Immunol.) 151 :2623。

[0234] 通常更为理想的是,抗体在人源化后保持对抗原的高亲和性及其它有利的生物学特性。为了实现这一目标,依照一种方法,通过使用母体和人源化序列的三维模型分析母体序列和各种概念性人源化产物的方法来制备人源化抗体。三维免疫球蛋白模型是公众可获得的,且为本领域技术人员所熟悉。可获得图解和显示所选候选免疫球蛋白序列的可能三维构象结构的计算机程序。检查这些显示图像容许分析残基在候选免疫球蛋白序列行使功能中的可能作用,即分析影响候选免疫球蛋白结合其抗原的能力的残基。这样,可从受体和输入序列中选出 FR 残基并进行组合,从而获得期望抗体特征,如对于靶抗原增加的亲和性。一般而言,高变区残基直接且最实质的参与影响对抗原的结合。

[0235] 5. 人抗体

[0236] 本发明的人抗体可以通过组合选自人来源的噬菌体展示文库的 Fv 克隆可变结构域序列和如上所述的已知人恒定结构域序列构建。备选地,本发明的人单克隆抗体可以通过杂交瘤方法制备。用于产生人单克隆抗体的人骨髓瘤和小鼠-人异骨髓瘤(heteromyeloma)细胞系已经在例如 Kozbor 免疫学杂志(J. Immunol.),133:3001(1984); Brodeur 等,单克隆产生技术和应用(Monoclonal Production Techniques and Applications),第 51-63 页(Marcel Dekker, Inc.,纽约,1987);和 Boerner 等,免疫学杂志(J. Immunol.),147:86(1991)中进行描述。

[0237] 现在有可能产生在缺乏内源免疫球蛋白生成的情况下能够在免疫后生成抗体完整全集的转基因动物(例如小鼠)。例如,已经记载了嵌合和种系突变小鼠中抗体重链连接区(J_H)基因的纯合缺失导致内源抗体生成的完全抑制。在此类种系突变小鼠中转移人种系免疫球蛋白基因阵列将导致在抗原攻击后生成抗体。参见例如 Jakobovits 等,美国国家科学院学报(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)90:2551(1993);Jakobovits 等,自然(Nature)362:255-258(1993);Bruggermann 等.,Year in Immuno.7:33(1993)。

[0238] 还可以将基因改组用于从非人,例如啮齿类动物抗体衍生人抗体,其中人抗体具有与起始的非人抗体相似的亲和性和特异性。根据该方法,其也称为“表位印刻(epitope imprinting)”,将通过如本文所述的噬菌体展示技术获得的非人抗体片段的重链或轻链可变区用人 V 结构域基因的所有组成部分取代,产生非人链/人链 scFv 或 Fab 嵌合体的群体。用抗原进行选择导致非人链/人链嵌合 scFv 或 Fab 的分离,其中在初级噬菌体展示克隆中去除了相应的非人链之后,人链恢复了被破坏的抗原结合位点,即表位支配(印刻)人链配偶体的选择。当重复所述方法从而取代余下的非人链时,获得人抗体(见在 1993 年 4 月 1 日公开的 PCT WO 93/06213)。不像通过 CDR 移植对非人抗体进行的传统人源化,这种技术提供完整的人抗体,其不具有非人来源的 FR 或 CDR 残基。

[0239] 6. 双特异性抗体

[0240] 双特异性抗体是对于至少两种不同的抗原具有结合特异性的单克隆抗体。在某些实施方案中,双特异性抗体是人或人源化抗体。在某些实施方案中,结合特异性的一种关于 Notch2,而另一种关于任何其它抗原。在某些实施方案中,双特异性抗体可以结合 Notch2 的两种不同的表位。还可以将双特异性抗体用于将细胞毒性药剂定位到表达 Notch2 的细胞。这些抗体具有 Notch2-结合臂和结合细胞毒性药剂的臂,所述细胞毒性药剂如例如,肥皂草毒蛋白(saporin)、抗-干扰素- α 、长春花生物碱、蓖麻毒蛋白 A 链、甲氨蝶呤或放射性同位素半抗原。可以将双特异性抗体制备为全长抗体或抗体片段(例如,F(ab')₂双特异性抗体)。

[0241] 用于生成双特异性抗体的方法是本领域已知的。传统上,双特异性抗体的重组生产基于两对免疫球蛋白重链-轻链的共表达,其中两条重链具有不同的特异性(Milstein 和 Cuello,自然(Nature)305:537(1983))。由于免疫球蛋白重链和轻链的随机分配,这些杂交瘤(四源杂交瘤(quadroma))生成 10 种不同抗体分子的潜在混合物,其中只有一种具有正确的双特异性结构。通常通过亲和层析步骤进行的正确分子的纯化相当麻烦且产物产量低。类似的方法披露于在 1993 年 5 月 13 日公开的 W093/08829 及 Traunecker 等,EMBO J. 10:3655(1991)。

[0242] 依照一种不同的方法,将具有期望结合特异性(抗体-抗原结合位点)的抗体可变结构域与免疫球蛋白恒定结构域序列融合。例如,与包含至少部分铰链部、CH2 和 CH3 区的免疫球蛋白重链恒定结构域进行融合。在某些实施方案中,在至少一种融合物中存在包含轻链结合所必需的位点的第一重链恒定区(CH1)。将编码免疫球蛋白重链融合物和需要时的免疫球蛋白轻链的 DNA 插入分开的表达载体,并共转染入合适的宿主生物体。在用于构建的三种多肽链比例不等时提供最佳产量的实施方案中,这为调整三种多肽片段的相互比例提供了很大的灵活性。然而,在至少两种多肽链以相同比例表达导致高产量时或在该比例没有特别意义时,有可能将两种或所有三种多肽链的编码序列插入一个表达载体。

[0243] 在该方法的一个实施方案中,双特异性抗体由一个臂上具有第一结合特异性的杂合免疫球蛋白重链,和另一个臂上的杂合免疫球蛋白重链-轻链对(提供第二结合特异性)构成。由于免疫球蛋白轻链仅在半双特异性分子中的存在提供了便利的分离途径,因此发现这种不对称结构便于将想要的双特异性化合物与不想要的免疫球蛋白链组合分开。该方法披露于 W094/04690。关于生成双特异性抗体的进一步详情参见例如 Suresh 等,酶学方法(Methods in Enzymology)121:210(1986)。

[0244] 依照另一种方法,可改造一对抗体分子间的界面,以将从重组细胞培养物回收的异二聚体的百分比最大化。该界面包含抗体恒定结构域的至少部分 C_H3 结构域。在该方法中,将第一抗体分子界面的一个或多个小氨基酸侧链用较大侧链(例如酪氨酸或色氨酸)置换。通过将大氨基酸侧链用较小氨基酸侧链(例如丙氨酸或苏氨酸)置换,在第二抗体分子的界面上产生与大侧链大小相同或相似的补偿性“空腔”。这提供了较之其它不想要的终产物,诸如同二聚体提高异二聚体产量的机制。

[0245] 双特异性抗体包括交联的或“异源偶联”抗体。例如,在异源偶联抗体中的一种抗体可以与抗生物素蛋白偶联,另一种抗体可以与生物素偶联。所述抗体已经例如被提议靶向免疫系统细胞到不想要的细胞(美国专利号 4,676,980),并且用于治疗 HIV 感染(WO 91/00360,WO 92/00373,和 EP 03089)。可以使用任何便利的交联方法制备异源偶联抗体。适合的交联试剂是本领域中公知的,并且连同许多交联技术在美国专利号 4,676,980,中公开。

[0246] 文献中还记载了由抗体片段生成双特异性抗体的技术。例如,可使用化学连接来制备双特异性抗体。Brennan 等,科学(Science)229:81(1985)记载了通过蛋白水解切割完整抗体以生成 F(ab')₂片段的方法。将这些片段在存在二硫醇络合剂亚砷酸钠时还原,以稳定邻近的二硫醇并防止分子间二硫键的形成。然后将产生的 Fab' 片段转变为硫代硝基苯甲酸酯(TNB)衍生物。然后将 Fab'-TNB 衍生物之一通过巯基乙胺的还原重新恢复成 Fab'-硫醇,并与等摩尔量的另一种 Fab'-TNB 衍生物混合,以形成双特异性抗体。产生的双特异性抗体可用作酶的选择性固定化试剂。

[0247] 最新的进展便于从大肠杆菌直接回收 Fab'-SH 片段,这些片段可化学偶联以形成双特异性抗体。Shalaby 等,J. Exp. Med. 175:217-225(1992)记载了完全人源化的双特异性抗体 F(ab')₂分子的生成。由大肠杆菌分别分泌每种 Fab' 片段,并在体外进行定向化学偶联以形成双特异性抗体。如此形成的双特异性抗体能够结合过表达 HER2 受体的细胞和正常人 T 细胞,以及触发人细胞毒性淋巴细胞针对人乳癌靶标的溶解活性。

[0248] 还记载了从重组细胞培养物直接生成和分离双特异性抗体片段的多种技术。例

如,已使用亮氨酸拉链生成双特异性抗体。Kostelny 等,免疫学杂志 (J. Immunol.) 148(5): 1547-1553(1992)。将来自 Fos 和 Jun 蛋白的亮氨酸拉链肽通过基因融合与两种不同抗体的 Fab' 部分连接。抗体同型二聚体在铰链区还原以形成单体,然后重新氧化以形成抗体异二聚体。这种方法也可用于生成抗体同型二聚体。Hollinger 等,美国国家科学院学报 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 90:6444-6448(1993) 记载的“双抗体”技术提供了生成双特异性抗体片段的替代机制。该片段包含通过接头相连的重链可变结构域 (V_H) 和轻链可变结构域 (V_L),所述接头太短使得同一条链上的两个结构域之间不能配对。因而,迫使一个片段上的 V_H 和 V_L 结构域与另一个片段上的互补 V_L 和 V_H 结构域配对,由此形成两个抗原结合位点。还报道了通过使用单链 Fv (sFv) 二聚体生成双特异性抗体片段的另一种策略。参见 Gruber 等,免疫学杂志 (J. Immunol.) 152:5368(1994)。

[0249] 涵盖具有超过两种效价的抗体。例如,可制备三特异性抗体。Tutt 等,免疫学杂志 (J. Immunol.) 147:60(1991)。

[0250] 7. 多价抗体

[0251] 多价抗体可以比二价抗体更快的受到表达该抗体所结合抗原的细胞的内在化 (和 / 或异化 (catabolized))。本发明的抗体可以是可容易的通过重组表达编码抗体多肽链的核酸而生成的、具有三个或更多抗原结合位点 (例如四价抗体) 的多价抗体 (IgM 类别以外的)。多价抗体可包含二聚化结构域和三个或更多抗原结合位点。在某些实施方案中,二聚化结构域包含 (或由其组成) Fc 区或铰链区。在这种情况下,抗体将包含 Fc 区及 Fc 区氨基末端的三个或更多抗原结合位点。在一些实施方案中,多价抗体包含 (或由其组成) 三个至约八个抗原结合位点。在一个所述实施方案中,多价抗体包含 (或由其组成) 四个抗原结合位点。多价抗体包含至少一条多肽链 (例如,两条多肽链),其中所述多肽链包含两个或更多可变结构域。例如,多肽链可包含 $VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc$, 其中 $VD1$ 是第一可变结构域, $VD2$ 是第二可变结构域, Fc 是 Fc 区的一条多肽链, $X1$ 和 $X2$ 代表氨基酸或多肽,而 n 是 0 或 1。例如,多肽链可包含: $VH-CH1-$ 柔性接头 $-VH-CH1-Fc$ 区链;或 $VH-CH1-VH-CH1-Fc$ 区链。本文中的多价抗体可以进一步包含至少两条 (优选四条) 轻链可变结构域多肽。本文中的多价抗体可包含例如约两条至约八条轻链可变结构域多肽。本文涵盖的轻链可变结构域多肽包含轻链可变结构域,且任选进一步包含 CL 结构域。

[0252] 8. 单结构域抗体

[0253] 在一些实施方案中,本发明的抗体是单结构域抗体。单结构域抗体是包含抗体的重链可变结构域的全部或部分或抗体的轻链可变结构域的全部或部分的单多肽链。在某些实施方案中,单结构域抗体是人单结构域抗体 (Domantis, Inc., Waltham, MA; 见,例如,美国专利号 6,248,516B1)。在一个实施方案中,单结构域抗体由抗体的重链可变结构域的全部或部分组成。

[0254] 9. 抗体变体

[0255] 在一些实施方案中,预期本文所述的抗体的氨基酸序列修饰。例如,可能需要提高抗体的结合亲和性和 / 或其它生物学性质。可以通过将适合的变化引入编码抗体的核苷酸序列或通过肽合成来制备抗体的氨基酸序列变体。所述修饰包括,例如在抗体的氨基酸序列中缺失残基和 / 或插入残基,和 / 或取代残基。可以进行缺失、插入和取代的任何组合从而得到最终的构建体,条件是最终的构建体具有需要的特征。在制备该序列时,可以将氨基

酸改变引入目标抗体氨基酸序列。

[0256] 用于鉴定对于突变发生是优选位置的抗体的某些残基或区域的有用方法被称为“丙氨酸分区诱变法”，如 Cunningham 和 Wells(1989) 科学 (Science), 244 :1081-1085 所述。在此处，鉴定了一种残基或一组靶残基（例如带电荷的残基如 arg, asp, his, lys, 和 glu），并且用中性或带负电荷氨基酸（例如丙氨酸或聚丙氨酸）取代从而影响氨基酸与抗原的相互作用。然后，通过在或关于取代位点引入另外的或其它变体来精选显示对取代的功能敏感性的那些氨基酸位置。因此，当预先确定引入氨基酸序列变化的位点时，突变本身的性质不需要被预先确定。例如，为了分析突变在给定位点的性能，在靶密码子或靶区进行丙氨酸分区诱变或随机诱变并且关于需要的活性筛选表达的免疫球蛋白。

[0257] 氨基酸序列插入包括氨基和 / 或羧基端融合，长度范围在 1 个残基到包含一百以上残基的多肽，以及单一氨基酸残基或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的实例包括具有 N- 端甲硫氨酰残基的抗体。抗体分子的其它插入变体包括抗体的 N 端或 C 端与增加抗体的血清半衰期的酶（例如关于 ADEPT）或多肽的融合。

[0258] 在某些实施方案中，改变本发明的抗体从而增加或减少抗体被糖基化的程度。多肽的糖基化典型地是 N- 连接或 O- 连接的。N- 连接指碳水化合物结构部分与天冬酰胺残基的侧链的连接。其中 X 是除了脯氨酸之外的任何氨基酸的三肽序列天冬酰胺 -X- 丝氨酸和天冬酰胺 -X- 苏氨酸，是关于将碳水化合物结构部分酶促连接于天冬酰胺侧链的识别序列。因此，在多肽中这些三肽序列的存在产生可能的糖基化位点。O- 连接的糖基化指将糖 N- 乙酰基半乳糖胺、半乳糖或木糖之一连接于羟基氨基酸，最常见连接于丝氨酸或苏氨酸，尽管也可以使用 5- 羟基脯氨酸或 5- 羟基赖氨酸。

[0259] 常规情况下，在抗体上加入或删除糖基化位点通过改变氨基酸序列完成从而产生或去除一个或多个上述三肽序列（关于 N- 连接的糖基化位点）。还可以通过将一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基在起始抗体序列加入、缺失或取代进行改变（关于 O- 连接的糖基化位点）。

[0260] 如果抗体包含 Fc 区，那么可以改变其连接的碳水化合物。由哺乳动物细胞产生的天然抗体典型地包含支化的，双触角寡糖，其通常通过 N- 连接连接于 Fc 区的 CH2 结构域的 Asn297。见，例如，Wright 等 (1997) TIBTECH 15 :26-32。寡糖可以包括各种碳水化合物，例如甘露糖、N- 乙酰基葡萄糖胺 (GlcNAc)、半乳糖和唾液酸，以及在双触角的寡糖结构的“茎”中连接于 GlcNAc 的岩藻糖。在一些实施方案中，可以在本发明的抗体中修饰寡糖从而产生具有一定提高性质的抗体变体。

[0261] 例如，提供具有这样的碳水化合物结构的抗体变体，所述碳水化合物结构缺乏连接（直接或间接）于 Fc 区的岩藻糖。所述变体可以具有提高的 ADCC 功能。见例如，美国专利公开号 US 2003/0157108 (Presta, L.) ; US2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd)。与“去岩藻糖基化 (defucosylated)”或“岩藻糖缺陷的”抗体变体相关的出版物的实例包括 US 2003/0157108 ; WO 2000/61739 ; WO 2001/29246 ; US 2003/0115614 ; US2002/0164328 ; US 2004/0093621 ; US 2004/0132140 ; US 2004/0110704 ; US2004/0110282 ; US 2004/0109865 ; WO 2003/085119 ; WO 2003/084570 ; WO2005/035586 ; WO 2005/035778 ; WO2005/053742 ; WO2002/031140 ; Okazaki 等，分子生物学杂志 (J. Mol. Biol.) 336 :1239-1249 (2004) ; Yamane-Ohnuki 等，生物技术生物工程 (Biotech. Bioeng.) 87 :614 (2004)。能够产生去岩

藻糖基化的抗体的细胞系的实例包括缺乏蛋白岩藻糖基化的 Lec13CHO 细胞 (Ripka 等生物化学生物物理进展 (Arch. Biochem. Biophys.) 249 :533-545(1986) ;美国专利申请号 US 2003/0157108A1, Presta, L ;和 W02004/056312A1, Adams 等,尤其在实施例 11 中),和敲除细胞系,如 α -1,6-岩藻糖基转移酶基因, FUT8,敲除 CHO 细胞(见,例如, Yamane-Ohnuki 等生物技术生物工程 (Biotech. Bioeng). 87 :614(2004) ;Kanda, Y. 等,生物技术生物工程 (Biotechnol. Bioeng.), 94(4) :680-688(2006) ;和 W02003/085107)。

[0262] 还提供具有等分寡糖的抗体变体,例如其中连接于抗体的 Fc 区的双触角寡糖被 GlcNAc 等分。所述抗体变体可以具有减少的岩藻糖基化和 / 或可以具有提高的 ADCC 功能。所述抗体变体的实例例如在 W02003/011878(Jean-Mairet 等) ;美国专利号 6,602,684(Umana 等) ;和 US2005/0123546(Umana 等) 中进行描述。还提供在连接于 Fc 区的寡糖中具有至少一个半乳糖残基的抗体变体。所述抗体变体可以具有提高的 CDC 功能。例如在 W0 1997/30087(Patel 等) ;W0 1998/58964(Raju, S.) ;和 W01999/22764(Raju, S.) 中描述所述抗体变体。

[0263] 在某些实施方案中,抗体变体包含进一步提高 ADCC 的具有一个或多个氨基酸取代的 Fc 区,例如,在 Fc 区的位置 298,333,和 / 或 334 的取代(残基的 Eu 编号方式)。所述取代可以与上述任一种变化组合发生。

[0264] 在某些实施方案中,本发明预期具有一些但不是全部的效应子功能的抗体变体,所述效应子功能使所述抗体变体成为对于许多应用需要的候选物,其中抗体在体内的半衰期是重要的,而某些效应子功能(如补体和 ADCC)是不必要的或有害的。在某些实施方案中,测量抗体的 Fc 活性从而确保仅维持需要的性质。可以进行体外和 / 或体内细胞毒性测定法从而证实 CDC 和 / 或 ADCC 活性的减少 / 消耗。例如,可以进行 Fc 受体 (FcR) 结合测定法从而确保抗体缺乏 Fc γ R 结合(因此可能缺乏 ADCC 活性),但是维持 FcRn 结合能力。用于介导 ADCC 的主要细胞,即 NK 细胞仅表达 Fc γ RIII,而单核细胞表达 Fc γ RI, Fc γ RII 和 Fc γ RIII。在 Ravetch 和 Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9 :457-92(1991) 的第 464 页上的表 3 中总结在造血细胞上的 FcR 表达。评估目的分子的 ADCC 活性的体外测定法的非限制性实例描述在美国专利号 5,500,362 中(见例如 Hellstrom, I., 等美国国家科学院学报 (Proc. Nat' l Acad. Sci. USA) 83 :7059-7063(1986)) 和 Hellstrom, I 等, Proc. Nat' l Acad. Sci. USA 82 :1499-1502(1985) ;5,821,337(见 Bruggemann, M. 等, J. Exp. Med. 166 :1351-1361(1987)) 中。备选地,可以使用非放射性测定法(见,例如用于流式细胞术的 ACT1™非放射性细胞毒性测定法 (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA ;和 CytoTox 96®非放射性细胞毒性测定法 (Promega, Madison, WI)。用于所述测定法的有用效应细胞包括外周血单核细胞 (PBMC) 和天然杀伤 (NK) 细胞。备选地或另外地,目的分子的 ADCC 活性可以在体内评估,例如在 Clynes 等 Proc. Nat' l Acad. Sci. USA 95 :652-656(1998) 中公开的动物模型中评估。还可以进行 C1q 结合测定法从而证实抗体不能结合 C1q 并且因此缺乏 CDC 活性。为了评估补体激活,可以进行 CDC 测定法(见,例如, Gazzano-Santoro 等, 免疫学方法杂志 (J. Immunol. Methods) 202 :163(1996) ;Cragg, M. S. 等, 血液 (Blood) 101 :1045-1052(2003) ;和 Cragg, M. S. 和 M. J. Glennie, 血液 (Blood) 103 :2738-2743(2004))。还可以使用本领域已知的方法进行 FcRn 结合和体内清除 / 半衰期测定(见,例如, Petkova, S. B. 等, Int' l. Immunol. 18(12) :1759-1769(2006))。

[0265] 提供具有一个或多个氨基酸取代的其它抗体变体。用于取代突变发生的位点包括高变区,但是也预期 FR 改变。保守性取代在“优选的取代”的标题下在表 1 中显示。更多实质性的改变,显示在表 1 中的“示例性取代”中,或在下面参照氨基酸类别进一步描述。可以将氨基酸取代引入目的抗体和例如关于需要的活性(如提高的抗原结合,减少的免疫原性,提高的 ADCC 或 CDC 等)筛选的产物中。

[0266] 表 1

[0267]	起始残基	示例性取代	优选的取代
	Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
	Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys

起始残基	示例性取代	优选的取代
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; 正亮氨酸	Leu
[0268] Leu (L)	正亮氨酸; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	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; 正亮氨酸	Leu

[0269] 在抗体的生物学性质中的修饰可以通过选择这样的取代来进行,所述取代影响 (a) 在取代区域中的多肽主链的结构,例如,作为折叠或螺旋构象,(b) 在靶位点的分子的电荷或疏水性,或 (c) 侧链的体积。可以根据它们的侧链性质中的类似性对氨基酸进行分组(在 A. L. Lehninger, 在生物化学 (Biochemistry), 第二版., 73-75 页, Worth Publishers, 纽约 (1975) 中):

[0270] (1) 非极性 :Ala(A), Val(V), Leu(L), Ile(I), Pro(P), Phe(F), Trp(W), Met(M)

[0271] (2) 不带电荷的极性 :Gly(G), Ser(S), Thr(T), Cys(C), Tyr(Y), Asn(N), Gln(Q)

[0272] (3) 酸性 :Asp(D), Glu(E)

[0273] (4) 碱性 :Lys(K), Arg(R), His(H)

[0274] 备选地,可以将天然存在的残基基于常见的侧链性质分为数组:

[0275] (1) 疏水 :正亮氨酸, Met, Ala, Val, Leu, Ile ;

[0276] (2) 中性亲水性 :Cys, Ser, Thr, Asn, Gln ;

[0277] (3) 酸性 :Asp, Glu ;

[0278] (4) 碱性 :His, Lys, Arg ;

[0279] (5) 影响链取向的残基 :Gly, Pro ;

[0280] (6) 芳香 :Trp, Tyr, Phe。

[0281] 非保守性取代需要将这些类别中的之一的成员与另一类交换。所述取代的残基还可以被引入保守性取代位点,或引入保留(非保守)位点。

[0282] 一种类型的取代变体包括取代母体抗体(例如人源化或人抗体)的一个或多个高变区残基。一般地,关于进一步发展所选择的得到的变体相对于它们产生自其中的母体抗体具有修饰的(例如提高的)生物学性质。示例性取代变体是亲和力成熟的抗体,其可以使用基于噬菌体展示的亲和性成熟技术方便地产生。简言之,对一些高变区位点(例如,6-7个位点)突变从而在每个位点产生所有可能的氨基酸取代。从丝状噬菌体颗粒展示由此产生的抗体,所述抗体作为与在每个颗粒中包装的噬菌体外壳蛋白(例如,M13的基因III产物)的至少一部分的融合物展示。接着关于噬菌体展示变体的生物学活性(例如结合亲和性)对其进行筛选。为了鉴定用于修饰的候选高变区位点,可以进行分区诱变法(例如,丙氨酸分区)从而鉴定对抗原结合有显著贡献的高变区残基。备选地,或另外地,分析抗原-抗体复合物的晶体结构从而鉴定抗体和抗原之间的接触点可以是有益的。根据本领域已知的技术,所述接触残基和邻近残基是取代的候选物,包括在本文中阐释的那些。一旦产生了所述变体,变体组使用本领域中已知的技术进行筛选,包括在本文中所述的那些,并且可以对在一个或多个相关测定法中具有优越性质的变体进行选择以用于进一步发展。

[0283] 编码抗体的氨基酸序列变体的核酸分子通过本领域已知的多种方法进行制备。这些方法包括,但不限于:从自然来源分离(在天然存在的氨基酸变体的情形中)或通过早期制备的抗体的变体或非变体形式的寡核苷酸-介导(或位点定向)诱变,PCR诱变,和盒诱变进行制备。

[0284] 可能需要将一个或多个氨基酸修饰引入本发明抗体的Fc区,由此产生Fc区变体。所述Fc区变体可以包含人Fc区序列(例如人IgG1,IgG2,IgG3或IgG4Fc区),所述Fc区序列在一个或多个氨基酸位置包含氨基酸修饰(例如取代),包含铰链部半胱氨酸的氨基酸修饰。

[0285] 根据该说明书以及本领域的教导,预期在一些实施方案中,本发明的抗体与野生型对应体抗体比较可以包含一个或多个改变,例如在Fc区中包含一个或多个改变。然而,这些抗体仍旧基本保留与它们的野生型对应体比较对于治疗应用所需要的相同的特征。例如,认为可以在Fc区中进行某些改变,所述改变将导致改变的(即,提高的或减少的)C1q结合和/或补体依赖性细胞毒性(CDC),例如如在W099/51642中所述。还见Duncan&Winter,自然(Nature)322:738-40(1988);美国专利号5,648,260;美国专利号5,624,821;和W094/29351,其涉及Fc区变体的其它实例。W000/42072(Presta)和W02004/056312(Lowman)描述了具有提高的或减少的与FcRs结合的抗体变体。这些专利出版物的内容特别通过参考结合在本文中。还见,Shields等,生物化学杂志(J.Biol.Chem.)9(2):6591-6604(2001)。在US2005/0014934A1(Hinton等)中描述了具有增加

的半衰期并且对于新生儿 Fc 受体 (FcRn) 具有提高的结合的抗体,其负责将母体 IgGs 转移给胎儿 (Guyer 等,免疫学杂志 (J. Immunol)117:587(1976) 和 Kim 等,免疫学杂志 (J. Immunol.)24:249(1994))。这些抗体包含在其中具有一个或多个取代的 Fc 区,所述取代提高 Fc 区与 FcRn 的结合。在美国专利号 6,194,551B1, W099/51642 中描述了具有改变的 Fc 区氨基酸序列和增加的或减少的 C1q 结合能力的多肽变体。将这些专利出版物的内容特别结合在本文作为参考。还见, Idusogie 等,免疫学杂志 (J. Immunol.)164:4178-4184(2000)。

[0286] 在另一个方面中,本发明提供在包含 Fc 区的 Fc 多肽的界面中的修饰的抗体,其中修饰有利于和 / 或促进异二聚化。这些修饰包括将突出物引入第一 Fc 多肽中,并且将空腔引入第二 Fc 多肽中,其中突出物可定位 (positionable) 在空腔中从而促进第一和第二 Fc 多肽的复合。产生具有这些修饰的抗体的方法是本领域中已知的,例如如在美国专利号 5,731,168 中所述。

[0287] 在另一个方面中,可能需要产生半胱氨酸改造的抗体,例如“thioMAbs”,其中抗体的一个或多个残基被半胱氨酸残基置换。在具体的实施方案中,在抗体可及的位点存在置换的残基。通过用半胱氨酸置换那些残基,反应性硫醇基由此定位在抗体的可及位点,并且可以用于将抗体缀合于其它结构部分,如药物结构部分或接头-药物结构部分,如本文进一步所述。在某些实施方案中,下面的残基的任何一个或多个可以用半胱氨酸置换:轻链的 V205(Kabat 编号);重链的 A118(EU 编号);和重链 Fc 区的 S400(EU 编号)。

[0288] 10. 抗体衍生物

[0289] 可以对本发明的抗体进一步修饰以包含本领域已知并且容易获得的另外的非蛋白质性的结构部分。优选地,适合抗体的衍生作用的结构部分是水溶性聚合物。水溶性聚合物的非限制性实例包括,但不限于:聚乙二醇 (PEG),乙二醇/丙二醇的共聚物,羧甲基纤维素,葡聚糖,聚乙烯醇,聚乙烯吡咯烷酮,聚-1,3-二噁烷,聚-1,3,6-三噁烷,乙烯/马来酸酐共聚物,聚氨基酸(同聚物或随机共聚物),和葡聚糖或聚(正乙烯基吡咯烷酮)聚乙二醇,丙二醇同聚物,聚环氧丙烷/氧化乙烯共聚物,聚氧乙基化的多元醇(例如甘油),聚乙烯醇及其混合物。由于其在水中的稳定性,聚乙二醇丙醛可以在生产中具有优势。聚合物可以具有任何分子量,并且可以是分支或不分支的。与抗体连接的聚合物的数目可以变化,并且如果连接多于一个聚合物,它们可以是相同或不同的分子。一般地,用于衍生化的聚合物的数目和 / 或类型可以基于这样的考虑来确定,包括,但不限于,待提高的抗体的具体性质或功能,抗体衍生物是否将在限定的条件下用于治疗中,等。

[0290] 在另一个实施方案中,提供可以通过暴露于辐射而被选择性加热的抗体和非蛋白质性结构部分的缀合物。在一个实施方案中,非蛋白质性的结构部分是碳纳米管 (nanotube) (Kam 等,美国国家科学院学报 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)102:11600-11605(2005))。辐射可以以任何波长进行,并且包括,但不限于这样的波长,所述波长不伤害正常细胞,但是其将非蛋白质性结构部分加热到杀死接近抗体-非蛋白质性结构部分的细胞的温度。

[0291] B. 制备抗体的某些方法

[0292] 1. 某些基于杂交瘤的方法

[0293] 本发明的单克隆抗体可以使用由 Kohler 等,自然 (Nature),256:495(1975) 首

次描述的杂交瘤方法制备,并且进一步描述在例如 Hongo 等,杂交瘤 (Hybridoma),14(3):253-260(1995),Harlow 等,抗体:实验室手册 (Antibodies:A Laboratory Manual),(冷泉港实验室出版社,第2版,1988);Hammerling 等,在单克隆抗体和 T 细胞杂交瘤 (Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas)563-681(Elsevier, N.Y.,1981),和关于人-人杂交瘤的 Ni,Xiandai Mianyixue,26(4):265-268(2006)中。另外的方法包括例如在美国专利号 7,189,826 中描述的那些,所述美国专利号 7,189,826 涉及从杂交瘤细胞系中生产单克隆人天然 IgM 抗体。人杂交瘤技术 (Trioma 技术 (Trioma technology)) 在 Vollmers 和 Brandlein,组织学和组织病理学 (Histology and Histopathology),20(3):927-937(2005) 和 Vollmers 和 Brandlein,在实验和临床药理学中的方法和发现 (Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology),27(3):185-91(2005)中。

[0294] 关于各种其他杂交瘤技术,见,例如,US 2006/258841;US 2006/183887(完全人抗体),US 2006/059575;US 2005/287149;US 2005/100546;US2005/026229;和美国专利号 7,078,492 和 7,153,507。使用杂交瘤方法生产单克隆抗体的示例性流程如下所述。在一个实施方案中,对小鼠或其它适合的宿主动物,如仓鼠进行免疫以激发这样的淋巴细胞,其产生或能够产生特异性结合用于免疫的蛋白的抗体。通过对动物进行多次皮下 (sc) 或腹膜内 (ip) 注射包含 Notch2 或其片段 (例如,Notch2NRR) 的多肽和佐剂来在动物中激发抗体,所述佐剂如单磷酸基脂质 A(MPL)/海藻糖二霉菌酸 (trehalose dicrynomycolate) (TDM) (Ribi 免疫化学研究公司 (Ribi Immunochem. Research, Inc.), Hamilton, MT)。可以使用本领域公知的方法制备包含 Notch2 或其片段的多肽,所述方法如重组方法,其中一些是本文进一步所述的。对来自免疫的动物的血清测定抗-Notch2 抗体,并且任选地施用加强免疫 (booster immunizations)。分离来自产生抗-Notch2 抗体的动物的淋巴细胞。备选地,可以在体外免疫淋巴细胞。

[0295] 接着,使用适合的融合剂 (如聚乙二醇) 来融合淋巴细胞和骨髓瘤细胞,以形成杂交瘤细胞。见,例如,Goding,单克隆抗体:原理和实践 (Monoclonal Antibodies: Principles and Practice),第 59-103 页 (学术出版社,1986)。可以使用这样的骨髓瘤细胞,其有效融合,支持产生选定抗体的细胞的稳定高水平的抗体生产,并且对于培养基,如 HAT 培养基敏感。示例性骨髓瘤细胞包括,但不限于,鼠骨髓瘤系,如衍生自 MOPC-21 和 MPC-11 小鼠肿瘤的那些 (可获自 Salk 研究所细胞分配中心 (Salk Institute Cell Distribution Center), San Diego, California USA), 和获自美国培养物保藏中心 (American Type Culture Collection, Rockville, Maryland USA) 的 SP-2 或 X63-Ag8-653 细胞。也已经描述人骨髓瘤和小鼠-人异骨髓瘤细胞系用于生产人单克隆抗体 (Kozbor, 免疫学杂志 (J. Immunol)., 133:3001(1984);Brodeur 等,单克隆抗体生产技术和应用 (Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications),第 51-63 页 (Marcel Dekker, Inc., 纽约,1987))。

[0296] 将由此制备的杂交瘤细胞接种并培养在适合的培养基上,例如包含抑制未融合的母体骨髓瘤细胞的生长或存活的一种或多种物质的培养基。例如,如果母体骨髓瘤细胞缺乏酶次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶 (HGPRT 或 HPRT),用于杂交瘤的培养基典型地包含次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸苷 (HAT 培养基),所述物质阻止 HGPRT- 缺陷细胞的生长。优选地,将无血清杂交瘤细胞培养方法用于减少动物来源的血清如胎牛血清的应用,如例如在 Even

等,生物技术趋势 (Trends in Biotechnology),24(3),105-108(2006) 中所述。

[0297] 在 Franek,单克隆抗体研究趋势 (Trends in Monoclonal Antibody Research),111-122(2005) 中描述作为提高杂交瘤细胞培养物的生产力工具的寡肽。具体地,用某些氨基酸(丙氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、脯氨酸),或用蛋白水解产物级分富集标准培养基,并且可以由合成寡肽(由 3-6 个氨基酸残基组成)明显抑制凋亡。所述肽以毫摩尔或更高的浓度存在。

[0298] 可以对其中培养杂交瘤细胞的培养基测定生产结合 Notch2 的单克隆抗体。可以通过免疫沉淀或通过体外结合测定法,如放射性免疫测定法(RIA)或酶联免疫吸附测定法(ELISA)来确定由杂交瘤细胞生产的单克隆抗体的结合特异性。可以例如通过斯卡查德分析(Scatchard analysis)确定单克隆抗体的结合亲和性。见,例如,Munson 等,Anal. Biochem.,107:220(1980)。

[0299] 在鉴定了产生具有需要的特异性、亲和性和/或活性的抗体的杂交瘤细胞后,可以将克隆通过有限稀释方法进行亚克隆并且通过标准方法培养。见,例如,Goding,见上文。用于该目的的适合的培养基包括,例如 D-MEM 或 RPMI-1640 培养基。此外,可以在动物中在体内作为腹水肿瘤培养杂交瘤细胞。将由所述亚克隆分泌的单克隆抗体适当地从培养基、腹水或血清中通过常规免疫球蛋白纯化方法如例如蛋白 A-琼脂糖,羟磷灰石层析法,凝胶电泳,透析,或亲和层析法分离。在 US 2005/176122 和美国专利号 6,919,436 中描述从杂交瘤细胞中分离蛋白的一种方法。所述方法包括在结合过程中使用最少量的盐,如感胶离子盐(lyotropic salts),并且优选地还在洗脱过程中使用小量的有机溶剂。

[0300] 2. 某些文库筛选方法

[0301] 可以通过使用组合文库筛选具有需要的一种或多种活性的抗体从而制备本发明的抗体。例如,在本领域中已知多种方法用于产生噬菌体展示文库并且对所述文库筛选具有需要的结合特征的抗体。所述方法通常在 Hoogenboom 等,在分子生物学方法(Methods in Molecular Biology)178:1-37(O'Brien 等,编辑,Human Press,Totowa,NJ,2001)中进行描述。例如,产生目的抗体的一种方法是通过使用如在 Lee 等,分子生物学杂志(J. Mol. Biol.) (2004),340(5):1073-93 中所述的噬菌体抗体文库进行的。

[0302] 原则上,通过筛选包含这样的噬菌体的噬菌体文库来选择合成的抗体克隆,所述噬菌体展示融合于噬菌体外壳蛋白的抗体可变区(Fv)的各种片段。所述噬菌体文库通过针对需要的抗原的亲和层析法进行淘选。将表达能够结合需要的抗原的 Fv 片段的克隆吸附到抗原上,并且由此与在文库中未结合的克隆分离。结合克隆接着从抗原上洗脱,并且可以进一步通过另外的抗原吸附/洗脱周期富集。本发明的任一种抗体可以通过下列步骤获得:设计适合抗原筛选方法以选择目的噬菌体克隆,随后使用来自目的噬菌体克隆和如在 Kabat 等,目的免疫蛋白序列(Sequence of Proteins of Immunological Interest),第 5 版,NIH 出版物 91-3242, Bethesda MD(1991),卷 1-3 中所述的适合的恒定区(Fc)序列的 Fv 序列构建全长抗体克隆。

[0303] 在某些实施方案中,抗体的抗原结合结构域从约 110 个氨基酸的两个可变(V)区形成,每个分别来自轻链(VL)和重链(VH),并且都具有三个高变环(HVRs)或互补性决定区(CDRs)。可变结构域可以功能上展示在噬菌体上,或者作为单链 Fv(scFv)片段展示,其中 VH 和 VL 通过短的柔性肽共价连接,或作为 Fab 片段展示,其中它们分别融合于恒定结

构域并且非共价地相互作用,如在 Winter 等, *Ann. Rev. Immunol.*, 12 :433-455 (1994) 中所述。用于本文时,编码噬菌体克隆的 scFv 和编码噬菌体克隆的 Fab 统称为“Fv 噬菌体克隆”或“Fv 克隆”。

[0304] VH 和 VL 基因的所有组成成分可以通过聚合酶链式反应 (PCR) 单独克隆并且随机重组在噬菌体文库中,其接着可以关于抗原结合克隆被检索,如在 Winter 等, *Ann. Rev. Immunol.*, 12 :433-455 (1994) 中所述。来自免疫来源的文库提供针对免疫原的高亲和性抗体,而不需要构建杂交瘤。备选地,可以克隆天然的所有组成成分从而提供针对广泛范围的非自体抗原和此外无需任何免疫的自体抗原的人抗体的单一来源,如在 Griffiths 等, *EMBO J.*, 12 :725-734 (1993) 中所述。最终,还可以通过从干细胞克隆未重排的 V- 基因区段,并使用包含随机序列的 PCR 引物来编码高度可变的 CDR3 区并实现体外重排来合成天然文库,如由 Hoogenboom 和 Winter, *分子生物学杂志 (J. Mol. Biol.)*, 227 :381-388 (1992) 所述。

[0305] 在某些实施方案中,将丝状噬菌体用于通过融合于较小的外壳蛋白 pIII 来展示抗体片段。所述抗体片段可以作为单链 Fv 片段展示,其中 VH 和 VL 结构域在相同的多肽链上通过柔性多肽间隔臂连接,例如如由 Marks 等, *分子生物学杂志 (J. Mol. Biol.)*, 222 :581-597 (1991) 所述,或作为 Fab 片段展示,其中一条链融合于 pIII,而另一条链分泌到细菌宿主细胞周质中,其中组装 Fab- 外壳蛋白结构,其通过取代一些野生型外壳蛋白而展示在噬菌体表面上,如在 Hoogenboom 等, *核酸研究 (Nucl. Acids Res.)*, 19 :4133-4137 (1991) 中所述。

[0306] 一般地,编码抗体基因片段的核酸获自从人或动物中收集的免疫细胞。如果需要偏向有利于抗 -Notch2 克隆 (例如,抗 -Notch2NRR 克隆) 的文库,用 Notch2 (或 Notch2NRR) 来免疫受试者从而产生抗体反应,并且回收脾细胞和 / 或循环 B 细胞,其它的外周血淋巴细胞 (PBLs) 用于文库构建。在一个优选的实施方案中,在携带功能性人免疫球蛋白基因阵列 (并且缺乏功能性内源抗体生产系统) 的转基因小鼠中通过产生抗 -Notch2 抗体反应来获得偏向有利于抗 -Notch2 克隆的人抗体基因片段文库,从而使 Notch2 免疫提供产生针对 Notch2 的人抗体的 B 细胞。在下面描述生产人抗体的转基因小鼠的产生。

[0307] 可以通过使用适合的筛选方法来分离表达 Notch2- 特异性膜结合抗体的 B 细胞来获得对抗 -Notch2 反应性细胞群体的另外的富集,例如通过使用 Notch2 亲和层析法分离细胞或将细胞吸附到荧光染料标记的 Notch2,随后进行流式激活的细胞分选 (flow-activated cell sorting) (FACS)。

[0308] 备选地,应用来自未被免疫的供体的脾细胞和 / 或 B 细胞或其它 PBLs 提供可能的抗体所有组成成分的更好的呈现,并且还允许使用任何其中 Notch2 不是抗原性的动物 (人或非人) 物种来构建抗体文库。对于体外结合抗体基因的文库构建,从受试者中收集干细胞从而提供编码未重排的抗体基因区段的核酸。可以从多种动物物种,如人、小鼠、大鼠、兔类、luprine、犬、猫、猪、牛、马和禽类物种等获得目的免疫细胞。

[0309] 从目的细胞中回收编码抗体可变基因区段 (包括 VH 和 VL 区段) 的核酸,并且进行扩增。在重排的 VH 和 VL 基因文库中,可以通过从淋巴细胞中分离基因组 DNA 或 mRNA,随后用匹配重排 VH 和 VL 基因的 5' 和 3' 端的引物进行聚合酶链式反应 (PCR) 来获得需要的 DNA,如在 Orlandi 等, *美国国家科学院学报 (Proc. Natl. Acad. Sci. (USA))*, 86 :3833-3837 (1989) 中所述,由此使多样的 V 基因所有组成成分进行表达。可以从 cDNA 和基

基因组 DNA 扩增 V 基因,其中反向引物 (back primers) 在编码成熟 V- 结构域的外显子 5' 端,而正向引物基于 J- 区段中,如在 Orlandi 等 (1989) 和 Ward 等,自然 (Nature),341:544-546(1989) 中所述。然而对于从 cDNA 中扩增,反向引物也可以基于前导外显子中,如在 Jones 等,生物技术 (Biotechnol.),9:88-89(1991) 中所述,而正向引物在恒定区内,如在 Sastry 等,美国国家科学院学报 (Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)),86:5728-5732(1989) 中所述。为了使互补性最大化,可以将简并性结合在引物中,如在 Orlandi 等 (1989) 或 Sastry 等 (1989) 中所述。在某些实施方案中,通过使用靶向每个 V 基因家族的 PCR 引物以扩增在免疫细胞核酸样品中存在的所有可获得的 VH 和 VL 排列来使文库多样性最大化,例如在 Marks 等,分子生物学杂志 (J. Mol. Biol.),222:581-597(1991) 的方法中所述,或如在 Orum 等,核酸研究 (Nucleic Acids Res.),21:4491-4498(1993) 的方法中所述。关于将扩增的 DNA 克隆到表达载体中,可以将稀有限制性酶切位点作为在一端的标记引入 PCR 引物中,如在 Orlandi 等 (1989) 中所述,或通过用标记的引物进一步进行 PCR 扩增,如在 Clackson 等,自然 (Nature),352:624-628(1991) 中所述。

[0310] 以合成方式重排的 V 基因的所有组成成分可以在体外来自 V 基因区段。已经对大部分的人 VH- 基因区段进行克隆和测序 (在 Tomlinson 等,分子生物学杂志 (J. Mol. Biol.),227:776-798(1992) 中报道),并进行作图 (在 Matsuda 等, Nature Genet.,3:88-94(1993) 中报道);可以将这些克隆的区段 (包括 H1 和 H2 环的所有主要的构象) 用于用编码多样序列和长度的 H3 环的 PCR 引物产生多样的 VH 基因的所有组成成分,如在 Hoogenboom 和 Winter,分子生物学杂志 (J. Mol. Biol.),227:381-388(1992) 中所述。VH 所有组成成分还可以用集中在单一长度的长 H3 环中的所有的序列多样性进行制备,如在 Barbas 等,美国国家科学院学报 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA),89:4457-4461(1992) 中所述。已经对人 V κ 和 V λ 区段进行克隆和测序 (在 Williams 和 Winter,欧洲免疫杂志 (Eur. J. Immunol.),23:1456-1461(1993) 中报道),并且可以用于制备合成的轻链所有组成成分。基于一系列 (a range of) VH 和 VL 折叠,和 L3 和 H3 长度的合成的 V 基因所有组成成分将编码具有相当多结构多样性的抗体。在扩增编码 V- 基因的 DNA 后,可以根据 Hoogenboom 和 Winter,分子生物学杂志 (J. Mol. Biol.),227:381-388(1992) 的方法,将种系 V- 基因区段在体外进行重排。

[0311] 抗体片段的所有组成成分可以通过将 VH 和 VL 基因的所有组成成分以数种方式组合在一起而构建。每个所有组成成分可以在不同的载体中产生,所述载体可以在体外再组合,例如如在 Hogrefe 等,基因 (Gene),128:119-126(1993) 中所述,或可以通过组合感染在体内再组合,例如在 Waterhouse 等,核酸研究 (Nucl. Acids Res.),21:2265-2266(1993) 中所述的 loxP 系统。体内重组方法应用 Fab 片段的双链性质来克服由大肠杆菌转化效率对文库大小所施加的限制。将天然 VH 和 VL 所有组成成分单独克隆,一个克隆到噬菌粒中,并且另一个克隆到噬菌体载体中。接着将两种文库通过对包含噬菌粒的细菌的噬菌体感染进行组合从而使每个细胞包含不同的组合,并且仅通过存在的细胞数量限制文库大小 (约 10^{12} 个克隆)。两种载体体内包含重组信号从而可以将 VH 和 VL 基因重组到单一复制子上并且共同包装到噬菌体病毒体中。这些巨大的文库提供大量的具有良好亲和性的多种抗体 (K_d 约为 10^{-8} M)。

[0312] 备选地,可以将所有组成成分顺序克隆到相同的载体中,例如如在 Barbas 等,

美国国家科学院学报 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA,) 88 :7978-7982(1991) 中所述, 或通过 PCR 装配在一起, 并且接着进行克隆, 例如如在 Clackson 等, 自然 (Nature), 352 : 624-628(1991) 中所述。还可以将 PCR 装配 (PCR assembly) 用于将 VH 和 VL DNA 与编码柔性肽间隔臂的 DNA 连接在一起形成单链 Fv(scFv) 所有组成成分。在其它的技术中, 将“在细胞中的 PCR 装配 (in cell PCR assembly)”用于将 VH 和 VL 基因通过 PCR 组合在淋巴细胞中, 并且接着克隆连接的基因的所有组成成分, 如在 Embleton 等, 核酸研究 (Nucl. Acids Res.), 20 :3831-3837(1992) 中所述。

[0313] 由天然文库 (自然的或合成的) 产生的抗体可以具有中度亲和性 (K_d 为约 10^6 到 $10^7 M^{-1}$), 但是亲和力成熟也可以通过构建次级文库并且再次从所述文库中选择来在体外进行模拟, 如在 Winter 等 (1994), 见上文中所述。例如, 可以在 Hawkins 等, 分子生物学杂志 (J. Mol. Biol.), 226 :889-896(1992) 的方法或 Gram 等, 美国国家科学院学报 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 89 :3576-3580(1992) 的方法中使用易错聚合酶 (在 Leung 等, 技术 (Technique), 1 :11-15(1989) 中报道) 将突变在体外随机引入。另外可以如下进行亲和力成熟: 例如使用引物 (携带跨越目的 CDR 的随机序列) 的 PCR 在选定的个体 Fv 克隆中随机突变一个或多个 CDR, 并且筛选具有更高亲和性的克隆。WO 9607754 (公开于 1996 年 3 月 14 日) 描述了一种在免疫球蛋白轻链的互补性决定区中诱导突变发生从而产生轻链基因的文库的方法。另一种有效方法是将通过噬菌体展示选择的 VH 或 VL 结构域与获自未免疫的供体的天然存在的 V 结构域变体的所有组成成分重组并且在数轮链改组中关于更高的亲和性进行筛选, 如在 Marks 等, 生物技术 (Biotechnol.), 10 :779-783(1992) 中所述。该技术允许用约 $10^9 M$ 以下的亲和性产生抗体和抗体片段。

[0314] 可以通过本领域已知的各种技术来完成对文库的筛选。例如, 可以将 Notch2 (或 Notch2NRR) 用于包被吸附板的孔, 并且在粘附于吸附板的宿主细胞上表达或用于细胞分选, 或缀合于生物素从而用链霉抗生物素蛋白包被的珠进行捕获, 或用在任何对噬菌体展示文库进行淘选的方法中。

[0315] 在适合将噬菌体颗粒的至少一部分与吸附剂结合的条件下, 将噬菌体文库样品与固定的 Notch2 接触。在正常情况下, 选择所述条件, 包括 pH, 离子强度, 温度等来模拟生理条件。对结合于固相的噬菌体进行洗涤并且接着用酸洗脱, 例如如在 Barbas 等, 美国国家科学院学报 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 88 :7978-7982(1991) 中所述, 或用碱洗脱, 例如如在 Marks 等, 分子生物学杂志 (J. Mol. Biol.), 222 :581-597(1991) 中所述, 或通过 Notch2 抗原竞争洗脱, 例如以类似于 Clackson 等, 自然 (Nature), 352 :624-628(1991) 的抗原竞争方法的方法进行。可以将噬菌体在单轮选择中富集 20-1,000 倍。而且可以将富集的噬菌体培养在细菌培养物中并且进行另一轮的选择。

[0316] 选择的效率取决于许多因素, 包括在洗涤过程中解离的动力学, 以及在单个噬菌体上的多种抗体片段是否可以同时与抗原结合 (engage)。可以通过使用短暂洗涤, 多价噬菌体展示以及抗原在固相中的高度包被密度保持具有快速解离动力学 (以及弱的结合亲和性) 的抗体。高密度不仅通过多价相互作用稳定所述噬菌体, 而且有利于解离的噬菌体的再次结合。可以通过使用长时间洗涤, 和如在 Bass 等, 蛋白质 (Proteins), 8 : 309-314(1990) 和在 WO 92/09690 中所述的单价噬菌体展示, 以及在 Marks 等, 生物技术 (Biotechnol.), 10 :779-783(1992) 中所述的低包被密度的抗原来促进对具有缓慢解离动

力学（和良好结合亲和性）的抗体的选择。

[0317] 可以在对于 Notch2 具有不同亲和性（甚至具有稍稍不同的亲和性）的噬菌体抗体之间进行选择。然而，选定的抗体的随机突变（例如，如在一些亲和力成熟技术中进行的）可能产生了许多突变体，大部分与抗原结合，并且其中一些具有更高的亲和性。以 Notch2 为限制条件，只有极少的高亲和性噬菌体可以竞争胜出。为了保留所有的更高亲和性的突变体，噬菌体可以与过量的生物素化的 Notch2 温育，但是所述生物素化的 Notch2 以低于关于 Notch2 的靶摩尔亲和性常数的摩尔浓度的浓度存在。接着，所述高亲和性结合的噬菌体被链霉抗生物素蛋白包被的顺磁珠（paramagnetic beads）捕获。所述“平衡捕获”允许抗体根据它们的结合亲和性进行选择，其敏感性允许从大量过量的具有较低亲和性的噬菌体中分离少至两倍更高亲和性的突变体克隆。还可以对在结合于固相的洗涤噬菌体中的条件进行操作以基于解离动力学进行区分。

[0318] 可以基于活性来选择抗 -Notch2 克隆。在某些实施方案中，本发明提供这样的抗 -Notch2 抗体，其结合天然表达 Notch2 的活细胞。在一个实施方案中，本发明提供这样的抗 -Notch2 抗体，其封闭 Notch2 配体和 Notch2 之间的结合，但是不封闭 Notch2 配体与第二蛋白之间的结合。可以通过下述来选择相应于所述抗 -Notch2 抗体的 Fv 克隆：(1) 从如上所述的噬菌体文库中分离抗 -Notch2 克隆，并且任选地通过在适合的细菌宿主中增殖所述群体扩增分离的噬菌体克隆群体；(2) 选择针对其分别需要封闭和不封闭活性的 Notch2 和第二蛋白；(3) 将抗 -Notch2 噬菌体克隆吸附于固定的 Notch2；(4) 使用过量的第二蛋白洗脱任何识别这样的 Notch2- 结合决定簇的不需要的克隆，所述决定簇与第二蛋白的结合决定簇重叠或共享；和 (5) 在步骤 (4) 之后，洗脱保持被吸附的克隆。任选地，可以通过重复本文所述的选择方法一次或多次来进一步富集具有需要的封闭 / 不封闭性质的克隆。

[0319] 编码本发明的杂交瘤来源的单克隆抗体或噬菌体展示 Fv 克隆的 DNA 容易使用常规方法进行分离和测序（例如通过使用设计用来特异性扩增来自杂交瘤或噬菌体 DNA 模板的目的重链和轻链编码区的寡核苷酸引物）。一旦分离，可以将所述 DNA 置于表达载体中，将其接着转染到宿主细胞如大肠杆菌（*E. coli*）细胞中，猿猴 COS 细胞中，中国仓鼠卵巢（CHO）细胞中，或不另外产生免疫球蛋白的骨髓瘤细胞，从而在重组宿主细胞中获得需要的单克隆抗体的合成。关于在细菌中重组表达编码抗体的 DNA 的综述文献包括 Skerra 等，*Curr. Opinion in Immunol.*, 5:256(1993) 和 Pluckthun, 免疫学综述（*Immunol. Revs*），130:151(1992)。

[0320] 可以将编码本发明的 Fv 克隆的 DNA 与编码重链和 / 或轻链恒定区的已知 DNA 序列（例如可以获自 Kabat 等，见上文的适合 DNA 序列）组合从而形成编码全长或部分长度的重链和 / 或轻链的克隆。要理解的是，任何同种型的恒定区可以用于该目的，包括 IgG, IgM, IgA, IgD, 和 IgE 恒定区，并且所述恒定区可以获自任何人或动物物种。用于本文时，在“嵌合体”和“杂合”抗体的定义中包含来自一种动物（如人）物种的可变结构域 DNA 并接着与另一种动物物种的恒定区 DNA 融合从而形成关于“杂合”全长重链和 / 或轻链的编码序列的 Fv 克隆。在某些实施方案中，将衍生自人可变 DNA 的 Fv 克隆与人恒定区 DNA 融合从而形成关于全长或部分长度人重链和 / 或轻链的编码序列。

[0321] 例如，还可以通过用人重链和轻链恒定结构域的编码序列取代来自杂交瘤克隆的同源鼠序列来修饰衍生自本发明的杂交瘤的编码抗 -Notch2 抗体的 DNA（例如，如在

Morrison 等,美国国家科学院学报 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 81 :6851-6855 (1984) 的方法中)。可以通过将免疫球蛋白编码序列共价连接于非免疫球蛋白多肽的全部或部分编码序列来进一步修饰编码杂交瘤或 Fv 克隆来源的抗体或片段的 DNA。以这种方式,制备这样的“嵌合”或“杂合”抗体,其具有本发明的 Fv 克隆或杂交瘤克隆衍生的抗体的结合特异性。

[0322] 3. 载体、宿主细胞和重组方法

[0323] 抗体也可以使用重组方法生产。为了重组生产抗 -Notch2 抗体,分离编码所述抗体的核酸,并插入可复制载体,用于进一步克隆 (DNA 扩增) 或表达。编码所述抗体的 DNA 易于使用常规规程分离和测序 (例如通过使用能够与编码抗体重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针进行)。可以获得许多载体。载体构件通常包括但不限于下列的一种或多种:信号序列、复制起点、一种或多种标志基因、增强子元件、启动子和转录终止序列。

[0324] a) 信号序列构件

[0325] 本发明的抗体不仅可以直接重组生产,而且可以作为与异源多肽的融合多肽生产,所述异源多肽优选的是成熟蛋白质或多肽的 N-末端处的信号序列或具有特异性切割位点的其它多肽。所选择的异源信号序列优选的是受到宿主细胞识别并加工 (即受到信号肽酶切割) 的。对于不识别和加工天然抗体信号序列的原核宿主细胞,所述信号序列用例如选自下组的原核信号序列替代:碱性磷酸酶、青霉素酶、lpp 或热稳定肠毒素 II 前导序列。对于酵母分泌,天然信号序列可以用例如酵母转化酶前导序列、 α 因子前导序列 (包括酵母属 (*Saccharomyces*) 和克鲁维氏酵母属 (*Kluyveromyces*) α 因子前导序列)、或酸性磷酸酶前导序列、白色假丝酵母 (*C. albicans*) 葡萄糖淀粉酶前导序列、或 WO 90/13646 中记载的信号替代。在哺乳动物细胞表达中,可以利用哺乳动物信号序列以及病毒分泌前导序列,例如单纯疱疹 gD 信号。

[0326] b) 复制起点

[0327] 表达和克隆载体都包含能够使载体在一种或多种所选择的宿主细胞中复制的核酸序列。通常,在克隆载体中,这种序列是能够使载体不依赖于宿主染色体 DNA 而复制的序列,包括复制起点或自主复制序列。众所周知多种细菌、酵母和病毒的此类序列。来自质粒 pBR322 的复制起点适合于大多数革兰氏阴性细菌,2 μ 质粒起点适合于酵母,而各种病毒起点 (SV40、多瘤病毒、腺病毒、VSV 或 BPV) 可用于哺乳动物细胞中的克隆载体。一般而言,哺乳动物表达载体不需要复制起点构件 (SV40 起点的使用通常可能只是因为它包含早期启动子)。

[0328] c) 选择基因构件

[0329] 表达和克隆载体可包含选择基因,也称为可选择标志。典型的选择基因编码如下蛋白质:(a) 赋予对抗生素或其它毒素的抗性,例如氨苄青霉素、新霉素、甲氨蝶呤或四环素;(b) 补足营养缺陷型的缺陷;或 (c) 提供不能由复合培养基获得的必需营养物,例如用于芽孢杆菌 (*Bacilli*) 的编码 D-丙氨酸消旋酶的基因。

[0330] 选择方案的一个实例利用药物来阻滞宿主细胞的生长。用异源基因成功转化的那些细胞生成赋予药物抗性的蛋白质,因而幸免于选择方案。此类显性选择的实例使用药物新霉素 (neomycin)、霉酚酸 (mycophenolic acid) 和潮霉素 (hygromycin)。

[0331] 适于哺乳动物细胞的可选择标志的另一个实例是那些能够鉴定有能力摄取编码抗体的核酸的细胞的可选择标志,诸如 DHFR、谷氨酰胺合成酶 (GS)、胸苷激酶、金属硫蛋

白 -I 和 -II (优选的是灵长类动物金属硫蛋白基因)、腺苷脱氨酶、鸟氨酸脱羧酶等。

[0332] 例如,通过将转化子在含有甲氨蝶呤 (Mtx) (DHFR 的一种竞争性拮抗剂) 的培养基中进行培养来鉴定经 DHFR 基因转化的细胞。在这些条件下,将 DHFR 基因与任一种其它共同转化的核酸一起扩增。可以使用内源 DHFR 活性缺陷的中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞系 (例如 ATCC CRL-9096)。

[0333] 备选地,通过在包含 L- 甲硫氨酸 sulfoximine (Msx) (一种 GS 的抑制剂) 的培养基中培养转化子来鉴定用 GS 基因转化的细胞。在这些条件下,将 GS 基因与任何其它共同转化的核酸一起扩增。可以将 GS 选择 / 扩增系统与如上所述的 DHFR 选择 / 扩增系统组合使用。

[0334] 或者,可以通过细胞在含有针对可选择标志的选择剂 (诸如氨基糖苷抗生素例如卡那霉素、新霉素或 G418) 的培养基中的生长来选择编码目的抗体、野生型 DHFR 基因和另一种可选择标志 (诸如氨基糖苷 3' - 磷酸转移酶 (APH)) 的 DNA 序列转化或共转化的宿主细胞 (特别是包含内源 DHFR 的野生型宿主)。参阅美国专利号 4,965,199。

[0335] 适用于酵母的选择基因是存在于酵母质粒 YRp7 中的 trp1 基因 (Stinchcomb 等, 自然 (Nature) 282 :39 (1979))。trp1 基因因为缺乏在色氨酸中生长能力的酵母突变株 (例如 ATCC No. 44076 或 PEP4-1) 提供了选择标志。Jones, 遗传学 (Genetics) 85 :12 (1977)。酵母宿主细胞基因组中存在 trp1 损伤随之提供了用于通过在缺乏色氨酸时的生长来检测转化的有效环境。类似的,用携带 Leu2 基因的已知质粒补足 Leu2 缺陷型酵母菌株 (ATCC20, 622 或 38,626)。

[0336] 此外,衍生自 1.6 μ m 环状质粒 pKD1 的载体可用于转化克鲁维氏酵母属 (*Kluyveromyces*) 酵母。或者,报导了用于在乳酸克鲁维氏酵母 (*K. lactis*) 中大规模生产重组小牛凝乳酶的表达系统。Van den Berg, 生物 / 技术 (Bio/Technology) 8 :135 (1990)。还披露了用于由克鲁维氏酵母属的工业用菌株分泌成熟重组人血清清蛋白的稳定多拷贝表达载体。Fleer 等, 生物 / 技术 (Bio/Technology) 9 :968-975 (1991)。

[0337] d) 启动子构件

[0338] 表达和克隆载体通常包含受到宿主生物体识别的启动子,而且它与编码抗体的核酸可操作连接。适用于原核宿主的启动子包括 phoA 启动子、 β - 内酰胺酶和乳糖启动子系统、碱性磷酸酶启动子、色氨酸 (trp) 启动子系统、和杂合启动子 (诸如 tac 启动子)。然而,其它已知的细菌启动子也是合适的。用于细菌系统的启动子还将包含与编码抗体的 DNA 可操作连接的 Shine-Dalgarno (S. D.) 序列。

[0339] 已知真核生物的启动子序列。事实上,所有真核基因都具有富含 AT 区,它位于起始转录的位点上游大约 25 至 30 个碱基处。在许多基因的转录起点上游 70 至 80 个碱基处找到的另一种序列是 CNCAAT 区,其中 N 可以是任何核苷酸。在大多数真核基因的 3' 端是 AATAAA 序列,它可能是向编码序列的 3' 端添加 polyA 尾的信号。所有这些序列适合插入真核表达载体。

[0340] 适用于酵母宿主的启动子序列的实例包括 3- 磷酸甘油酸激酶或其它糖酵解酶的启动子,诸如烯醇酶、甘油醛 -3- 磷酸脱氢酶、己糖激酶、丙酮酸脱羧酶、磷酸果糖激酶、葡萄糖 -6- 磷酸异构酶、3- 磷酸甘油酸变位酶、丙酮酸激酶、磷酸丙糖异构酶、磷酸葡萄糖异构酶和葡糖激酶。

[0341] 作为具有通过生长条件控制转录的额外优点的诱导型启动子的其它酵母启动子是醇脱氢酶 2、异细胞色素 C、酸性磷酸酶、与氮代谢有关的降解酶、金属硫蛋白、甘油醛-3-磷酸脱氢酶、及负责麦芽糖和半乳糖利用的酶的启动子区。适用于酵母表达的载体和启动子进一步记载于 EP73, 657。酵母增强子也可以有利地与酵母启动子一起使用。

[0342] 在哺乳动物宿主细胞中由载体转录抗体受到例如从病毒（诸如多瘤病毒、禽痘病毒、腺病毒（诸如腺病毒 2）、牛乳头瘤病毒、禽肉瘤病毒、巨细胞病毒、逆转录病毒、乙肝病毒、猿猴病毒 40 (SV40)）基因组、异源哺乳动物启动子（例如肌动蛋白启动子或免疫球蛋白启动子）、及热休克启动子获得的启动子的控制，倘若此类启动子与宿主细胞系统相容的话。

[0343] 方便地以 SV40 限制性片段的形式获得 SV40 病毒的早期和晚期启动子，该片段还包含 SV40 病毒复制起点。方便地以 HindIII E 限制性片段的形式获得人巨细胞病毒的立即早期启动子。美国专利号 4, 419, 446 中披露了使用牛乳头瘤病毒作为载体在哺乳动物宿主中表达 DNA 的系统。美国专利号 4, 601, 978 中记载了该系统的一种改良。关于在小鼠细胞中在来自单纯疱疹病毒的胸苷激酶启动子的控制下表达人 β -干扰素 cDNA 还可参见 Reyes 等，自然 (Nature) 297 :598-601 (1982)。或者，可以使用劳氏肉瘤病毒长末端重复序列作为启动子。

[0344] e) 增强子元件构件

[0345] 常常通过将增强子序列插入载体来提高高等真核生物对编码本发明抗体的 DNA 的转录。现在知道来自哺乳动物基因（球蛋白、弹性蛋白酶、清蛋白、甲胎蛋白和胰岛素）的许多增强子序列。然而，典型地使用来自真核细胞病毒的增强子。实例包括 SV40 复制起点晚期一侧 (late side) 的增强子 (bp100-270)、巨细胞病毒早期启动子增强子、多瘤病毒复制起点晚期一侧的增强子、和腺病毒增强子。关于激活真核启动子的增强元件还可参见 Yaniv, 自然 (Nature) 297 :17-18 (1982)。可以将增强子剪接入载体，位于抗体编码序列的 5' 或 3' 位置，但是优选的位于启动子的 5' 位点。

[0346] f) 转录终止构件

[0347] 用于真核宿主细胞（酵母、真菌、昆虫、植物、动物、人或来自其它多细胞生物体的有核细胞）的表达载体还将包含终止转录和稳定 mRNA 所必需的序列。此类序列通常可以从真核或病毒 DNA 或 cDNA 非翻译区的 5' 端和偶尔的 3' 端获得。这些区域包含在编码抗体的 mRNA 的非翻译部分中转录成聚腺苷酸化片段的核苷酸区段。一种有用的转录终止构件是牛生长激素聚腺苷酸化区。参见 W094/11026 及其中披露的表达载体。

[0348] g) 宿主细胞的选择和转化

[0349] 适于克隆或表达本文载体中的 DNA 的宿主细胞是上文描述的原核生物、酵母或高等真核生物细胞。适于此目的的原核生物包括真细菌，诸如革兰氏阴性或革兰氏阳性生物体，例如肠杆菌科 (Enterobacteriaceae)，诸如埃希氏菌属 (Escherichia) 例如大肠杆菌 (E. coli)、肠杆菌属 (Enterobacter)、欧文氏菌属 (Erwinia)、克雷伯氏菌属 (Klebsiella)、变形菌属 (Proteus)、沙门氏菌属 (Salmonella) 例如鼠伤寒沙门氏菌 (Salmonella typhimurium)、沙雷氏菌属 (Serratia) 例如粘质沙雷氏菌 (Serratia marcescans)、和志贺氏菌属 (Shigella)、以及芽孢杆菌属 (Bacilli) 诸如枯草芽孢杆菌 (B. subtilis) 和地衣芽孢杆菌 (B. licheniformis)（例如 1989 年 4 月 12 日公布的

DD266, 710 中披露的地衣芽孢杆菌 41P)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 诸如铜绿假单胞菌 (*P. aeruginosa*)、和链霉菌属 (*Streptomyces*)。一种优选的大肠杆菌克隆宿主是大肠杆菌 294 (ATCC31, 446), 尽管其它菌株诸如大肠杆菌 B、大肠杆菌 X1776 (ATCC31, 537) 和大肠杆菌 W3110 (ATCC27, 325) 也是合适的。这些实例是例示性的, 而不是限制性的。

[0350] 可以将全长抗体、抗体融合蛋白和抗体片段在细菌中生产, 特别当不需要糖基化和 Fc 效应子功能时, 如当将治疗性抗体与本身显示在肿瘤细胞破坏中的有效性的细胞毒性药剂 (例如毒素) 缀合时。全长抗体具有更大的循环半衰期。在大肠杆菌中的生产是更快和更经济有效的。对于抗体片段和多肽在细菌中的表达, 见, 例如, U. S. 5, 648, 237 (Carter 等), U. S. 5, 789, 199 (Joly 等), U. S. 5, 840, 523 (Simmons 等), 其描述优化表达和分泌的转录起始区 (TIR) 和信号序列。还见 Charlton, 分子生物学中的方法 (Methods in Molecular Biology), 卷 248 (B. K. C. Lo, 编辑, Humana 出版社, Totowa, NJ, 2003), 第 245-254 页, 描述抗体片段在大肠杆菌中的表达。在表达后, 抗体可以从可溶级分中的大肠杆菌细胞糊状物分离, 并且可以根据同种型通过例如蛋白 A 或 G 柱进行纯化。可以以类似于纯化例如在 CHO 细胞中表达的抗体的方法进行最后的纯化。

[0351] 除了原核生物以外, 真核微生物, 诸如丝状真菌或酵母也是关于编码抗体的载体的合适克隆或表达宿主。酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 或常用的面包酵母最常用于低等真核宿主微生物之中。然而, 通常可获得许多其它属、种和菌株并可用于本发明, 诸如栗酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*); 克鲁维酵母属 (*Kluyveromyces*) 宿主, 诸如例如乳酸克鲁维酵母 (*K. lactis*)、脆壁克鲁维酵母 (*K. fragilis*) (ATCC 12, 424)、保加利亚克鲁维酵母 (*K. bulgaricus*) (ATCC16, 045)、威克克鲁维酵母 (*K. wickerhamii*) (ATCC 24, 178)、*K. waltii* (ATCC 56, 500)、果蝇克鲁维酵母 (*K. drosophilum*) (ATCC 36, 906)、耐热克鲁维酵母 (*K. thermotolerans*) 和马克思克鲁维酵母 (*K. marxianus*); 亚罗酵母属 (*Yarrowia*) (EP 402, 226); 巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) (EP 183, 070); 假丝酵母属 (*Candida*); 瑞氏木霉 (*Trichoderma reesia*) (EP 244, 234); 粗糙脉孢菌 (*Neurospora crassa*); 许旺酵母属 (*Schwanniomyces*), 诸如 *Schwanniomyces occidentalis*; 和丝状真菌, 诸如例如脉孢菌属 (*Neurospora*)、青霉属 (*Penicillium*)、弯颈霉属 (*Tolypocladium*)、和曲霉属 (*Aspergillus*) 宿主诸如构巢曲霉 (*A. nidulans*) 和黑曲霉 (*A. niger*)。讨论生产治疗性蛋白的酵母和丝状真菌的应用的综述见, 例如 Gerngross, Nat. Biotech. 22: 1409-1414 (2004)。

[0352] 可以选择某些真菌和酵母菌株, 其中对糖基化途径进行“人源化”, 导致生产具有部分或完全人糖基化模式的抗体。见, 例如, Li 等, Nat. Biotech. 24: 210-215 (2006) (描述在巴斯德毕赤酵母中的糖基化途径的人源化); 和 Gerngross 等, 见上文。

[0353] 适于表达糖基化抗体的宿主细胞也衍生自多细胞生物体 (无脊椎动物和脊椎动物)。无脊椎动物细胞的实例包括植物和昆虫细胞。已经鉴定了许多杆状病毒株和变体及相应的许可的昆虫宿主细胞, 它们来自诸如草地夜蛾 (*Spodoptera rugiperda*) (毛虫)、埃及伊蚊 (*Aedes aegypti*) (蚊子)、白纹伊蚊 (*Aedes albopictus*) (蚊子)、黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) (果蝇) 和家蚕 (*Bombyx mori*) 等宿主。公众可获得多种病毒株用于转染, 例如苜蓿尺蠖 (*Autographa californica*) NPV 的 L-1 变体和家蚕 NPV 的 Bm-5 株, 而且此类病毒可依照本发明用作本文中的病毒, 特别是用于转染草地夜蛾细胞。

[0354] 还可利用棉、玉米、马铃薯、大豆、矮牵牛、番茄、浮萍 (Lemnaceae)、苜蓿 (*M. truncatula*) 和烟草的植物细胞培养物作为宿主。见, 例如, 美国专利号 5, 959, 177, 6, 040, 498, 6, 420, 548, 7, 125, 978, 和 6, 417, 429 (描述在转基因植物中生产抗体的 PLANTIBODIES™ 技术)。

[0355] 可以将脊椎动物细胞用作宿主, 并且在培养 (组织培养) 物中脊椎动物细胞的繁殖已经成为常规流程。有用哺乳动物宿主细胞系的实例是用 SV40 转化的猴肾 CV1 系 (COS-7, ATCC CRL 1651); 人胚肾系 (293 或为了在悬浮培养中生长而亚克隆的 293 细胞, Graham 等, 遗传病毒学杂志 (J. Gen. Virol.) 36 :59 (1977)); 幼仓鼠肾细胞 (BHK, ATCC CCL 10); 小鼠塞托利 (sertoli) 细胞 (TM4, Mather, 生物繁殖 (Biol. Reprod.) 23 : 243-251 (1980)); 猴肾细胞 (CV1, ATCC CCL 70); 非洲绿猴肾细胞 (VERO-76, ATCC CRL-1587); 人宫颈癌细胞 (HELA, ATCC CCL2); 犬肾细胞 (MDCK, ATCC CCL 34); 牛鼠 (buffalo rat) 肝细胞 (BRL 3A, ATCC CRL 1442); 人肺细胞 (W138, ATCC CCL 75); 人肝细胞 (Hep G2, HB8065); 小鼠乳瘤 (MMT 060562, ATCC CCL 51); TRI 细胞 (Mather 等, Annals N. Y. Acad. Sci. 383 :44-68 (1982)); MRC5 细胞; FS4 细胞; 和人肝瘤系 (Hep G2)。其它有用的哺乳动物宿主细胞系包括中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞, 包括 DHFR CHO 细胞 (Urlaub 等, 美国国家科学院学报 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 77 :4216 (1980)); 和骨髓瘤细胞系如 NS0 和 Sp2/0。关于适合生产抗体的某些哺乳动物宿主细胞系的综述见例如 Yazaki 和 Wu, 在分子生物学中的方法 (Methods in Molecular Biology), 卷 248 (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), 第 255-268 页。

[0356] 用上文所述用于生产抗体的表达或克隆载体转化宿主细胞, 并在为了诱导启动子、选择转化子或扩增编码期望序列的基因而适当更改的常规营养培养基中进行培养。

[0357] h) 培养宿主细胞

[0358] 可以在多种培养基中培养用于生产本发明抗体的宿主细胞。商品化培养基诸如 Ham 氏 F10 (西格玛 (Sigma))、极限必需培养基 (MEM, 西格玛 (Sigma))、RPMI-1640 (西格玛 (Sigma))、和 Dulbecco 氏改良的 Eagle 氏培养基 (DMEM, 西格玛 (Sigma)) 适于培养宿主细胞。另外, 可以使用下列文献中记载的任何培养基作为宿主细胞的培养基: Ham 等, Meth. Enz. 58 :44 (1979); Barnes 等, Anal. Biochem. 102 :255 (1980); 美国专利号 4, 767, 704; 4, 657, 866; 4, 927, 762; 4, 560, 655; 或 5, 122, 469; WO 90/03430; WO 87/00195; 或美国专利 Re. 30, 985。任何这些培养基可以根据需要补充激素和 / 或其它生长因子 (诸如胰岛素、运铁蛋白或表皮生长因子)、盐 (诸如氯化钠、钙、镁和磷酸盐)、缓冲剂 (诸如 HEPES)、核苷酸 (诸如腺苷和胸苷)、抗生素 (诸如 GENTAMYCIN™ 药物)、痕量元素 (定义为通常以微摩尔范围的终浓度存在的无机化合物)、和葡萄糖或等效能源。还可以以适宜浓度包含本领域技术人员知道的任何其它必需补充物。培养条件 (诸如温度、pH 等) 就是先前为表达而选择用于宿主细胞的, 这对于普通技术人员而言是显而易见的。

[0359] i) 抗体纯化

[0360] 当使用重组技术时, 抗体可以在细胞内产生, 在周质空间中产生, 或直接分泌到培养基中。如果抗体在细胞内产生, 作为第一个步骤, 例如通过离心或超滤去除颗粒碎片, 宿主细胞或裂解的片段。Carter 等, 生物 / 技术 (Bio/Technology) 10 :163-167 (1992) 描述了用于分离被分泌到大肠杆菌的周质空间中的抗体的方法。简言之, 将细胞糊状物在约 30 分

钟内,在存在乙酸钠 (pH 3.5)、EDTA 和苯基甲基磺酰氟 (PMSF) 的情况下冻融。将细胞碎片通过离心去除。如果抗体被分泌到培养基中,那么通常首先使用商购的蛋白浓缩滤器(例如 Amicon 或 Millipore Pellicon 超滤装置)将来自所述表达系统的上清液进行浓缩。可以将蛋白酶抑制剂如 PMSF 包含在任一个前述步骤中来抑制蛋白水解,并且可以包含抗生素来防止偶然的污染物的生长。

[0361] 例如,可以使用例如羟磷灰石层析、疏水相互作用层析、凝胶电泳、透析和亲和层析来纯化由细胞制备的抗体组合物,亲和层析是一种典型地优选纯化步骤。蛋白 A 作为亲和配体的适宜性取决于抗体中存在的任何免疫球蛋白 Fc 结构域的种类和同种型。蛋白 A 可用于纯化基于人 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 或 $\gamma 4$ 重链的抗体 (Lindmark 等,免疫学方法杂志 (J. Immunol. Meth.) 62 :1-13(1983))。蛋白 G 被推荐用于所有小鼠同种型和人 $\gamma 3$ (Guss 等, EMBOJ. 5 : 1567-1575(1986))。亲和配体所附着的基质最常用的是琼脂糖,但是可以使用其它基质。物理稳定的基质,诸如可控孔径玻璃或聚(苯乙烯二乙烯)苯,容许获得比琼脂糖更快的流速和更短的加工时间。如果抗体包含 $C_{\mu}3$ 结构域,则可使用 Bakerbond ABX™ 树脂 (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) 进行纯化。根据待回收的抗体,也可使用其它蛋白质纯化技术如在离子交换柱上的分级;乙醇沉淀;反相 HPLC;硅土上的层析,肝素 SEPHAROSE™ 上的层析,阴离子或阳离子交换树脂(诸如聚天冬氨酸柱、DEAE 等)上的层析;层析聚焦;SDS-PAGE;和硫酸铵沉淀。

[0362] 在任何的初级纯化步骤后,可以对包含目的抗体和污染物的混合物进行使用在约 2.5-4.5 的 pH 的洗脱缓冲液的低 pH 疏水相互作用层析法,优选地在低盐浓度(例如约 0-0.25M 的盐)进行。

[0363] 一般地,在本领域中充分建立制备在研究、测试和临床中所用的抗体的各种方法,这与上述方法一致和/或关于特定的目的抗体本领域技术人员认为是合适的。

[0364] C. 免疫缀合物

[0365] 本发明还提供包含缀合至一种或多种细胞毒性药剂的抗体的免疫缀合物(在本文交互地称为“抗体-药物缀合物”或“ADCs”),所述细胞毒性药剂诸如化疗剂、药物、生长抑制剂、毒素(例如蛋白毒素,细菌、真菌、植物或动物起源的酶活性毒素或其片段)或放射性同位素(即放射缀合物)。

[0366] 已经将免疫缀合物用于在治疗癌症中局部递送细胞毒性药剂,即杀死或抑制细胞的生长或增殖的药物 (Lambert, J. (2005) 目前的药理学观点 (Curr. Opinion in Pharmacology) 5 :543-549;Wu 等 (2005) 自然生物技术 (Nature Biotechnology) 23(9) : 1137-1146;Payne, G. (2003) i 3 :207-212;Syrigos 和 Epenetos(1999) 抗癌研究 (Anticancer Research) 19 :605-614;Niculescu-Duvaz 和 Springer(1997) Adv. Drug Deliv. Rev. 26 :151-172;美国专利号 4,975,278)。免疫缀合物允许将药物结构部分靶向递送到肿瘤,并且在其中进行细胞内累积,其中系统施用未缀合的药物可以向正常细胞以及寻求被消除的肿瘤细胞导致不可接受的毒性水平 (Baldwin 等, Lancet(1986 年 3 月 15 日) 第 603-05 页;Thorpe(1985) "在癌症治疗中的细胞毒性药剂的抗体载体:综述 (Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy :A Review), " 在单克隆抗体' 84:生物和临床应用中 (in Monoclonal Antibody' 84:Biological And Clinical Applications) (A. Pinchera 等,编辑) 第 475-506 页。已经报道了两种多克隆抗体和单克

隆抗体用于这些策略中 (Rowland 等, (1986) *Cancer Immunol. Immunother.* 21 :183-87)。用于这些方法中的药物包括柔红霉素 (daunomycin), 多柔比星 (doxorubicin), 甲氨蝶呤 (methotrexate) 和长春地辛 (vindesine) (Rowland 等, (1986) 见上文)。用于抗体-毒素缀合物的毒素包括细菌毒素如白喉毒素, 植物毒素如蓖麻毒蛋白, 小分子毒素如格尔德霉素 (geldanamycin) (Mandler 等 (2000) *J. Nat. Cancer Inst.* 92(19) :1573-1581 ;Mandler 等 (2000) *Bioorganic&Med. Chem. Letters* 10 :1025-1028 ;Mandler 等 (2002) *生物缀合物化学 (Bioconjugate Chem.)* 13 :786-791), 美坦生类化合物 (maytansinoids) (EP 1391213 ;Liu 等, (1996) *美国国家科学院学报 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)* 93 :8618-8623), 和加利车霉素 (Calicheamicin) (Lode 等 (1998) *癌症动究 (Cancer Res.)* 58 :2928 ;Hinman 等 (1993) *癌症研究 (Cancer Res.)* 53 :3336-3342)。毒素可以通过包括微管结合、DNA 结合, 或拓扑异构酶抑制发挥它们的细胞毒性作用。当与较大的抗体或蛋白受体配体缀合时, 一些细胞毒性药物倾向于失活或活性降低。

[0367] **ZEVALIN®** (替伊莫单抗 (ibritumomab tiuxetan), Biogen/Idex) 是一种抗体-放射性同位素缀合物, 其由针对在正常和恶性 B 淋巴细胞表面上的 CD20 抗原的鼠 IgG1 κ 单克隆抗体和由硫脲接头-螯合剂结合的 ^{111}In 或 ^{90}Y 放射性同位素组成 (Wiseman 等 (2000) *Eur. Jour. Nucl. Med.* 27(7) :766-77 ;Wiseman 等 (2002) *血液 (Blood)* 99(12) :4336-42 ;Witzig 等 (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(10) :2453-63 ;Witzig 等 (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(15) :3262-69)。尽管 ZEVALIN 具有针对 B- 细胞非霍奇金氏淋巴瘤 (NHL) 的活性, 在大多数患者中施用导致严重和延长的血细胞减少症。MYLOTARG™ (吉姆单抗奥佐米星 (gemtuzumab ozogamicin), Wyeth Pharmaceuticals), 一种抗体-药物缀合物, 其由连接于加利车霉素的 huCD33 抗体组成, 在 2000 年被批准用于通过注射治疗急性骨髓性白血病 (未来药物 (Drugs of the Future) (2000) 25(7) :686 ;美国专利号 4970198 ;5079233 ;5585089 ;5606040 ;5693762 ;5739116 ;5767285 ;5773001)。美坎珠单抗 (Cantuzumab mertansine) (Immunogen, Inc.), 一种抗体-药物缀合物, 由通过二硫键接头 SPP 与美坦生类化合物药物结构部分, DM1 连接的 huC242 抗体组成, 其进入 II 期实验用于治疗表达 CanAg 的癌症, 如结肠癌、胰腺癌、胃癌和其它癌症。MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.), 一种由与美坦生类化合物药物结构部分, DM1 连接的抗-前列腺特异性膜抗原 (PSMA) 单克隆抗体组成的抗体-药物缀合物, 其被开发用于有效治疗前列腺肿瘤。将 auristatin 肽、auristatin E (AE) 和单甲基 auristatin (MMAE), 多拉司他汀的合成类似物, 缀合于嵌合单克隆抗体 cBR96 (特异于癌上的 Lewis Y) 和 cAC10 (特异于血液学恶性肿瘤的 CD30) (Doronina 等 (2003) *自然生物技术 (Nature Biotechnol.)* 21(7) :778-784), 并且处于治疗开发下。

[0368] 在某些实施方案中, 免疫缀合物包含抗体和化疗剂或其它毒素。用于产生免疫缀合物的化疗剂如本文所述 (例如, 上述)。可使用的酶活性毒素及其片段包括白喉毒素 A 链、白喉毒素的非结合性活性片段、外毒素 A 链 (来自铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*))、蓖麻毒蛋白 (ricin) A 链、相思豆毒蛋白 (abrin) A 链、蒴莲根毒蛋白 (modeccin) A 链、 α - 帚曲霉素 (sarcin)、油桐 (*Aleurites. fordii*) 蛋白、香石竹毒蛋白 (dianthin protein)、美洲商陆 (*Phytolacca americana*) 蛋白 (PAPI, PAPII 和 PAP-S)、苦瓜 (*Momordica charantia*) 抑制剂、麻疯树毒蛋白 (curcin)、巴豆毒蛋白 (crotonin)、肥皂

草 (*sapaonaria officinalis*) 抑制剂、白树毒蛋白 (gelonin)、丝林霉素 (mitogellin)、局限曲菌素 (restrictocin)、酚霉素 (phenomycin)、新霉素 (neomycin) 和单端孢菌素 (tricothecenes)。参见例如 1993 年 10 月 28 日公布的 W0 93/21232。可使用多种放射性核素生产放射性缀合的抗体。实例包括 ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y , 和 ^{186}Re 。可使用多种双功能蛋白质偶联剂来制备抗体和细胞毒性药剂的缀合物, 诸如 N-琥珀酰亚氨基-3-(2-吡啶基二硫代) 丙酸酯 (SPDP), 亚氨基硫烷 (iminothiolane) (IT), 亚氨酸酯 (诸如盐酸二甲基己二亚酰胺化物)、活性酯类 (诸如辛二酸二琥珀酰亚氨基酯)、醛类 (诸如戊二醛)、双叠氮化合物 (诸如双 (对叠氮苯甲酰基) 己二胺)、双-重氮衍生物 (诸如双 (对-重氮苯甲酰基)-乙二胺)、二异硫氰酸酯 (诸如甲苯 2,6-二异氰酸酯) 和双活性氟化合物 (诸如 1,5-二氟-2,4-二硝基苯) 的双功能衍生物。例如, 可以如 Vitetta 等, 科学 (Science) 238 : 1098 (1987) 中所记载的制备蓖麻毒素免疫毒素。碳-14 标记的 1-异硫氰酸苯甲基-3-甲基二亚乙基三胺五乙酸 (MX-DTPA) 是用于将放射性核苷酸与抗体缀合的例示性螯合剂。参见 W094/11026。

[0369] 本文还预期抗体与一种或多种小分子毒素的缀合物, 所述毒素如加利车霉素、美坦生类化合物、多拉司他汀、aurostatins、单端孢菌素类和 CC1065, 和具有毒素活性的这些毒素的衍生物。

[0370] 1. 美坦生 (Maytansine) 和美坦生类化合物 (Maytansinoids)

[0371] 在一些实施方案中, 免疫缀合物包含与一种或多种美坦生类化合物分子缀合的抗体 (全长或片段)。

[0372] 美坦生类化合物是通过抑制微管蛋白聚合来起作用的有丝分裂抑制剂。美坦生最初从东非灌木齿叶美登木 (*Maytenus serrata*) 分离到 (美国专利号 3,896,111)。随后发现某些微生物也产生美坦生类化合物, 诸如美登醇和 C-3 美登醇酯 (美国专利号 4,151,042)。合成的美登醇及其衍生物和类似物披露于例如美国专利号 .4,137,230 ; 4,248,870 ; 4,256,746 ; 4,260,608 ; 4,265,814 ; 4,294,757 ; 4,307,016 ; 4,308,268 ; 4,308,269 ; 4,309,428 ; 4,313,946 ; 4,315,929 ; 4,317,821 ; 4,322,348 ; 4,331,598 ; 4,361,650 ; 4,364,866 ; 4,424,219 ; 4,450,254 ; 4,362,663 ; 及 4,371,533 中。

[0373] 美坦生类化合物药物结构部分是在抗体药物缀合物中有吸引力的药物结构部分, 因为它们 (i) 相对容易地通过发酵或化学修饰、发酵产物的衍生作用制备, (ii) 易于通过用适合通过非二硫键接头缀合于抗体的官能团进行衍生化, (iii) 在血浆中稳定, 和 (iv) 针对多种肿瘤细胞系是有效的。

[0374] 在例如美国专利号 5,208,020, 5,416,064 和欧洲专利 EP 0425235B1 中公开包含美坦生类化合物的免疫缀合物、制备其的方法、和它们的治疗应用, 将其公开内容特此清楚地结合在本文作为参考。Liu 等, 美国国家科学院学报 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 93 : 8618-8623 (1996) 描述这样的免疫缀合物, 其包含被称为 DM1 的美坦生类化合物, 及其连接的针对人结肠直肠癌的单克隆抗体 C242。发现所述缀合物针对培养的结肠癌细胞具有高度细胞毒性, 并且在体内肿瘤生长测定法中显示抗肿瘤活性。Chari 等, 癌症研究 (Cancer Research) 52 : 127-131 (1992) 描述这样的免疫缀合物, 其中将美坦生类化合物通过二硫键接头缀合于结合在人结肠癌细胞系上的抗原的鼠抗体 A7, 或缀合于结合 HER-2/neu 癌基因的另一鼠单克隆抗体 TA.1。在体外, 在人乳腺癌细胞系 SK-BR-3 上测试 TA.1-美坦生类

化合物缀合物的细胞毒性,所述人乳腺癌细胞系 SK-BR-3 每个细胞表达 3×10^5 HER-2 表面抗原。所述药物缀合物获得类似于游离美坦生类化合物药物的细胞毒性程度,这可以通过增加每抗体分子美坦生类化合物分子的数量来增加。所述 A7- 美坦生类化合物缀合物在小鼠中显示较低的系统细胞毒性。

[0375] 抗体-美坦生类化合物缀合物通过将抗体化学连接于美坦生类化合物分子而制备,并且未显著削弱抗体或美坦生类化合物分子的生物学活性。见,例如,美国专利号 5,208,020 (将其公开内容特此清楚地结合在本文作为参考)。每个抗体分子缀合平均 3-4 个美坦生类化合物分子在增强针对靶细胞的细胞毒性中显示出功效,且对抗体的功能或溶解度没有负面影响,尽管预计甚至一个分子的毒素/抗体也将较之裸抗体的使用增强细胞毒性。美坦生类化合物在本领域是众所周知的,而且可通过已知技术合成或从天然来源分离。例如美国专利号 5,208,020 及上文提及的其它专利和非专利出版物中披露了合适的美坦生类化合物。优选的美坦生类化合物是美登醇和美登醇分子的芳香环或其它位置经过修饰的美登醇类似物,诸如各种美登醇酯。

[0376] 本领域知道许多连接基团可用于生成抗体-美坦生类化合物缀合物,包括例如美国专利号 5,208,020 或欧洲专利 0425235B1 及 Chari 等,癌症研究 (Cancer Research) 52: 127-131 (1992) 和美国专利申请公开号 US2005/016993A1 中所披露的那些,将其公开内容特此清楚地结合在本文作为参考。可以如在 US 2005/016993A1 中所述制备包含接头成分 SMCC 的抗体-美坦生类化合物缀合物。连接基团包括二硫化物基团、硫醚基团、酸不稳定基团、光不稳定基团、肽酶不稳定基团或酯酶不稳定基团,正如上述专利中所披露的,优选二硫化物和硫醚基团。在本文中描述和例示其它连接基团。

[0377] 可使用多种双功能蛋白质偶联剂来制备抗体与美坦生类化合物的缀合物,诸如 N-琥珀酰亚氨基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯 (SPDP),琥珀酰亚氨基-4-(N-马来酰亚氨基甲基)环己烷-1-羧酸酯 (SMCC),亚氨基硫烷 (iminothiolane) (IT),亚氨酸酯(诸如盐酸二甲基己二亚酰胺化物)、活性酯类(诸如辛二酸二琥珀酰亚氨基酯)、醛类(诸如戊二醛)、双叠氮化合物(诸如双(对叠氮苯甲酰基)己二胺)、双-重氮衍生物(诸如双(对-重氮苯甲酰基)-乙二胺)、二异硫氰酸酯(诸如甲苯 2,6-二异氰酸酯)和双活性氟化合物(诸如 1,5-二氟-2,4-二硝基苯)的双功能衍生物。特别优选的偶联剂包括 N-琥珀酰亚氨基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯 (SPDP) (Carlsson 等,生物化学杂志 (Biochem. J.) 173:723-737 (1978)) 和 N-琥珀酰亚氨基-4-(2-吡啶基硫代)戊酸酯 (SPP),以提供二硫键。

[0378] 根据连接的类型,可将接头附着于美坦生类化合物分子的多个位置。例如,可使用常规偶联技术通过与羟基的反应来形成酯连接。反应可发生在具有羟基的 C-3 位置、用羟甲基修饰的 C-14 位置、用羟基修饰的 C-15 位置和具有羟基的 C-20 位置。在一个优选的实施方案中,在美登醇或美登醇类似物的 C-3 位置形成连接。

[0379] 2. Auristatins 和多拉司他汀 (dolastatins)

[0380] 在一些实施方案中,免疫缀合物包含抗体,其缀合于多拉司他汀或多拉司他汀 (dolostatin) 肽类似物和衍生物,auristatins (美国专利号 5635483;5780588)。已经显示多拉司他汀和 auristatins 干扰微管动力学, GTP 水解,和核和细胞分裂 (Woyke 等 (2001) 抗微生物剂和化学治疗 (Antimicrob. Agents and Chemother.) 45(12):

3580-3584) 并且具有抗癌 (US 5663149) 和抗真菌活性 (Pettit 等 (1998) 抗微生物剂和化学治疗 (Antimicrob. Agents and Chemother.) 42:2961-2965)。可以将多拉司他汀或 auristatin 药物结构部分通过肽药物结构部分的 N(氨基) 端或 C(羧基) 端连接于抗体 (W002/088172)。

[0381] 示例性 auristatin 实施方案包括 N-端连接的单甲基 auristatin 药物结构部分 DE 和 DF, 其在 2004 年 11 月 5 日提交的美国系列号 10/983, 340, “能够缀合于配体的单甲基缬氨酸化合物 (Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands)”, 将其公开内容完整地清除地结合在本文作为参考。

[0382] 典型地, 基于肽的药物结构部分可以通过在两种以上的氨基酸和 / 或肽片段之间形成肽键来制备。所述肽键可以例如根据在肽化学领域中公知的液相合成方法制备 (见 E. **Schröder** 和 K. Lübke, “肽 (The Peptides)”, 卷 1, 第 76-136 页, 1965, 学术出版社)。所述 auristatin/ 多拉司他汀药物结构部分可以根据下列所述的方法进行制备: US 5635483; US 5780588; Pettit 等 (1989) J. Am. Chem. Soc. 111:5463-5465; Pettit 等 (1998) 抗癌药物设计 (Anti-Cancer Drug Design) 13:243-277; Pettit, G. R., 等合成 (Synthesis), 1996, 719-725; 和 Pettit 等 (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 15: 859-863。还见 Doronina (2003) 自然生物技术 (Nat Biotechnol) 21(7):778-784; 提交于 2004 年 11 月 5 日的美国系列号 10/983, 340, “能够缀合于配体的单甲基缬氨酸化合物 (Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligand)”, 将其全部内容结合作为参考 (公开例如制备单甲基缬氨酸化合物如 MMAE 和缀合于接头的 MMAF 的接头和方法)。

[0383] 3. 加利车霉素 (Calicheamicin)

[0384] 在其它实施方案中, 免疫缀合物包含与一个或多个加利车霉素分子缀合的抗体。加利车霉素抗生素家族能够在亚皮摩尔浓度产生双链 DNA 断裂。关于加利车霉素家族缀合物的制备参见美国专利 5, 712, 374; 5, 714, 586; 5, 739, 116; 5, 767, 285; 5, 770, 701; 5, 770, 710; 5, 773, 001; 5, 877, 296 (都属于美国 Cyanamid 公司)。可使用的加利车霉素结构类似物包括, 但不限于 γ_1 I、 α_2 I、 α_3 I、N-乙酰基- γ_1 I、PSAG 和 θ I₁ (Hinman 等, 癌症研究 (Cancer Research) 53:3336-3342 (1993); Lode 等, 癌症研究 (Cancer Research) 58:2925-2928 (1998); 及上述授予美国 Cyanamid 公司的美国专利)。可以与抗体偶联的另一种抗肿瘤药物是 QFA, 它是一种抗叶酸药物。加利车霉素和 QFA 都具有胞内作用位点, 且不易穿过质膜。因此, 这些药剂经由抗体介导的内在化的细胞摄取大大增强了它们的细胞毒性效果。

[0385] 4. 其它细胞毒性药剂

[0386] 可以缀合于抗体的其它抗肿瘤药剂包括 BCNU、链佐星 (streptozocin)、长春新碱 (vincristine) 和 5-氟尿嘧啶, 在美国专利 5, 053, 394, 5, 770, 710 中所述的统称为 LL-E33288 复合物的药剂家族以及埃斯波霉素类 (esperamicins) (美国专利 5, 877, 296) 等。

[0387] 可使用的酶活性毒素及其片段包括白喉毒素 A 链、白喉毒素的非结合性活性片段、外毒素 A 链 (来自铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*))、蓖麻毒蛋白 (ricin) A 链、相思豆毒蛋白 (abrin) A 链、蒴莲根毒蛋白 (modeccin) A 链、 α -帚曲霉素 (sarcin)、油

桐 (*Aleurites fordii*) 蛋白、香石竹毒蛋白 (dianthin protein)、美洲商陆 (*Phytolacca americana*) 蛋白 (PAPI、PAPII 和 PAP-S)、苦瓜 (*Momordica charantia*) 抑制剂、麻疯树毒蛋白 (curcin)、巴豆毒蛋白 (croton)、肥皂草 (*saponaire officinalis*) 抑制剂、白树毒蛋白 (gelonin)、丝林霉素 (mitogellin)、局限曲菌素 (restrictocin)、酚霉素 (phenomycin)、新霉素 (neomycin) 和单端孢菌素 (trichothecenes)。参见例如 1993 年 10 月 28 日公布的 WO 93/21232。

[0388] 本发明还预期在抗体和具有溶核活性的化合物 (例如, 核糖核酸酶或 DNA 核酸内切酶如脱氧核糖核酸酶; DNA 酶) 之间形成的免疫缀合物。

[0389] 为了选择性破坏肿瘤, 所述抗体可以包含高度的放射性原子。可以将多种放射性同位素用于生产放射性缀合的抗体。实例包括 At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} 和 Lu 的放射性同位素。当将所述缀合物用于检测时, 其可以包含用于闪烁照相研究的放射性原子, 例如 ^{99m}Tc 或 ^{112}In , 或用于核磁共振 (NMR) 成像 (也称为磁共振成像, MRI) 的自旋标记, 如再如碘 -123, 碘 -131, 铟 -111, 氟 -19, 碳 -13, 氮 -15, 氧 -17, 钆, 锰或铁。

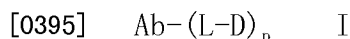
[0390] 可以将放射性或其它标记以已知方式结合在所述缀合物中。例如, 肽可以生物合成, 或可以通过使用适合的氨基酸前体的化学氨基酸合成进行合成, 所述氨基酸前体包括, 例如用氟 -19 取代氢。可以通过半胱氨酸残基将标记如 ^{99m}Tc 或 ^{123}I , Re^{186} , Re^{188} 和 In^{111} 连接在肽中。钇 -90 可以通过赖氨酸残基连接。可以将 IODOGEN 方法 (Fraker 等 (1978) 生物化学生物物理研究通讯 (Biochem. Biophys. Res. Commun). 80 :49-57) 用于结合碘 -123, " 在免疫闪烁照相法中的单克隆抗体 (Monoclonal antibody in Immunoscintigraphy) " (Chatal, CRC Press 1989) 详细描述了其他方法。

[0391] 可使用多种双功能蛋白质偶联剂来制备抗体和细胞毒性药剂的缀合物, 诸如 N- 琥珀酰亚氨基 -3-(2- 吡啶基二硫代) 丙酸酯 (SPDP), 琥珀酰亚氨基 -4-(N- 马来酰亚氨基甲基) 环己烷 -1- 羧酸酯 (SMCC), 亚氨基硫烷 (iminothiolane) (IT), 亚氨酸酯 (诸如盐酸二甲基己二亚酰胺化物)、活性酯类 (诸如辛二酸二琥珀酰亚氨基酯)、醛类 (诸如戊二醛)、双叠氮化合物 (诸如双 (对叠氮苯甲酰基) 己二胺)、双 - 重氮衍生物 (诸如双 (对 - 重氮苯甲酰基) - 乙二胺)、二异硫氰酸酯 (诸如甲苯 2,6- 二异氰酸酯) 和双活性氟化合物 (诸如 1,5- 二氟 -2,4- 二硝基苯) 的双功能衍生物。例如, 可以如 Vitetta 等, 科学 (Science) 238 :1098 (1987) 中所记载的制备蓖麻毒素免疫毒素。碳 -14 标记的 1- 异硫氰酸苯甲基 -3- 甲基二亚乙基三胺五乙酸 (MX-DTPA) 是用于将放射性核苷酸与抗体缀合的示例性螯合剂。参见 W094/11026。接头可以是有利于在细胞中释放细胞毒性药物的“可裂解接头”。例如, 可以使用酸不稳定接头、肽酶敏感的接头、光不稳定的接头、二甲基接头或含二硫化物的接头 (Chari 等, 癌症研究 (Cancer Research) 52 :127-131 (1992); 美国专利号 5,208,020)。

[0392] 所述化合物清楚地涵盖, 但不限于: 用下列交联剂制备的 ADC: 可商购 (例如来自 Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U. S. A) 的 BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, 磺基 -EMCS, 磺基 -GMBS, 磺基 -KMUS, 磺基 -MBS, 磺基 -SIAB, 磺基 -SMCC, 和磺基 -SMPB, 和 SVSB (琥珀酰亚氨基 - (4- 乙烯基砜) 苯甲酸酯)。见第 467-498 页, 2003-2004 申请手册和目录。

[0393] 5. 抗体药物缀合物的制备

[0394] 在抗体药物缀合物 (ADC) 中,将抗体 (Ab) 通过接头 (L) 与一种或多种药物结构部分 (D) 缀合,例如约 1 到约 20 个药物结构部分 / 抗体。式 I 的 ADC 可以通过数种途径进行制备,使用本领域技术人员已知的有机化学反应,条件和试剂:包括 (1) 使抗体的亲核基团与二价接头试剂反应从而通过共价键形成 Ab-L,随后与药物结构部分 D 进行反应;和 (2) 药物结构部分的亲核基团与二价接头试剂反应从而通过共价键形成 D-L,随后进行与抗体的亲核基团的反应。在本文描述另外的制备 ADC 的方法。



[0396] 所述接头可以由一个或多个接头成分构件组成。示例性的接头构件包括 6- 马来酰亚氨基己酰基 (“MC”), 马来酰亚氨基丙酰基 (“MP”), 缬氨酸 - 瓜氨酸 (citrulline) (“val-cit”), 丙氨酸 - 苯丙氨酸 (“ala-phe”), 对 - 氨基苄氧基羰基 (“PAB”), N- 琥珀酰亚氨基 4-(2- 吡啶基硫代) 戊酸酯 (“SPP”), N- 琥珀酰亚氨基 4-(N- 马来酰亚氨基甲基) 环己烷 -1 羧酸酯 (“SMCC”), 和 N- 琥珀酰亚氨基 (4- 碘 - 乙酰基) 氨基苯甲酸酯 (“SIAB”)。本领域中已知另外的接头构件并且在本文描述了一些。还见 2004 年 11 月 5 日提交的美国系列号 10/983, 340 “能够缀合于配体的单甲基缬氨酸化合物 (Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligand)”, 将其全部内容特此结合在本文作为参考。

[0397] 在一些实施方案中,所述接头可以包含氨基酸残基。示例性氨基酸接头构件包括二肽、三肽、四肽或五肽。示例性二肽包括:缬氨酸 - 瓜氨酸 (vc 或 val-cit), 丙氨酸 - 苯丙氨酸 (af 或 ala-phe)。示例性三肽包括:甘氨酸 - 缬氨酸 - 瓜氨酸 (gly-val-cit) 和甘氨酸 - 甘氨酸 - 甘氨酸 (gly-gly-gly)。包含氨基酸接头构件的氨基酸残基包括天然存在的那些,以及小的氨基酸和非天然存在的氨基酸类似物,如瓜氨酸。可以关于它们对被特定酶酶促裂解的选择性设计氨基酸接头构件并优化,所述酶例如肿瘤相关的蛋白酶,组织蛋白酶 B、C 和 D 或纤维蛋白溶酶蛋白酶。

[0398] 在抗体上的亲核基团包括,但不限于:(i) N- 端胺基团, (ii) 侧链胺基团,例如赖氨酸, (iii) 侧链硫醇基,例如半胱氨酸和 (iv) 糖羟基或氨基,其中抗体被糖基化。胺、硫醇和羟基是亲核的并且能够反应以与接头结构部分和接头试剂上的亲电子基团形成共价键,所述亲电子基团包括:(i) 活性酯如 NHS 酯, HOBt 酯, 卤甲酸酯和酰基卤;(ii) 烷基和苄基卤化物如卤代乙酰胺;(iii) 醛类、酮类、羧基和马来酰亚胺基。某些抗体具有可还原的链间二硫键,即半胱氨酸桥键。通过用还原剂如 DTT (二硫苏糖醇) 处理,抗体可以形成对于与接头试剂缀合的反应性。理论上每个半胱氨酸桥由此形成两个反应性硫醇亲核基团。可以将另外的亲核基团通过赖氨酸与 2- 亚氨基硫烷 (Traut's 试剂) 的反应引入抗体,导致胺向硫醇的转化。可以将反应性硫醇基通过引入一个、两个、三个、四个或更多半胱氨酸残基引入抗体 (或其片段) (例如,制备包含一个或多个非天然半胱氨酸氨基酸残基的突变体抗体)。

[0399] 还可以通过修饰抗体引入亲电子结构部分来产生抗体药物缀合物,所述亲电子结构部分可以与接头试剂或药物上的亲核取代基反应。可以例如用高碘酸氧化剂氧化糖基化抗体的糖从而形成醛或酮基团,其可以与接头试剂或药物结构部分的胺基团反应。得到的亚胺席夫碱基团可以形成稳定的连接,或可以被例如硼氢化物试剂还原从而形成稳定

的胺连接。在一个实施方案中,糖基化的抗体的碳水化合物部分与半乳糖 (glactose) 氧化酶或偏高碘酸钠的反应可以产生蛋白中的羰基 (醛和酮) 基团,所述羰基可以与药物上的适合的基团反应 (Hermanson, Bioconjugate Techniques)。在另一个实施方案中,包含 N- 端丝氨酸或苏氨酸残基的蛋白可以与偏高碘酸钠反应,导致产生取代第一个氨基酸的醛 (Geoghegan&Stroh, (1992) 生物缀合物化学 (Bioconjugate Chem). 3 :138-146 ;US 5362852)。所述醛可以与药物结构部分或接头亲核基团反应。

[0400] 同样地,在药物结构部分上的亲核基团包括,但不限于,能够反应以与在接头结构部分和接头试剂上的亲电子基团形成共价键的胺、硫醇、羟基、酰肼、肟、肟、缩氨基硫脲、肟羧酸酯和芳基酰肼基团,所述亲电子基团包括 (i) 活性酯如 NHS 酯, HOBt 酯, 卤甲酸酯, 和酰基卤 ;(ii) 烷基和苄基卤化物如卤代乙酰胺 ;(iii) 醛、酮、羧基和马来酰亚胺基团。

[0401] 备选地,可以例如通过重组技术或肽合成制备包含抗体和细胞毒性药剂的融合蛋白。DNA 的长度可以包含分别编码缀合物的两个部分的各个区,所述各个区彼此邻近或由编码接头肽的区域分离,所述接头肽不会破坏所述缀合物需要的性质。

[0402] 在又一个实施方案中,可以将抗体缀合于“受体”(如链霉抗生物素蛋白)进行肿瘤的预先靶向,其中将所述抗体-受体缀合物施用于患者,随后使用清除剂从循环中去除未结合的缀合物,并接着施用缀合于细胞毒性药剂(例如,放射性核素)的“配体”(例如抗生物素蛋白)。

[0403] D. 方法

[0404] 1. 诊断方法和检测方法

[0405] 在一个方面中,本发明的抗体用于检测生物样品中的 Notch2 的存在。术语“检测”,用于本文时包括定量或定性检测。在某些实施方案中,生物样品包含细胞或组织,如癌性组织。

[0406] 在一个方面中,本发明提供检测 Notch2 在生物样品中存在的方法。在某些实施方案中,所述方法包括使生物样品与抗 -Notch2 抗体(例如,抗 -Notch2NRR 抗体)在允许抗 -Notch2 抗体与 Notch2 结合的条件下接触,并检测是否在抗 -Notch2 抗体和 Notch2 之间形成复合物。

[0407] 在一个方面中,本发明提供诊断与 Notch2 的增加的表达相关的疾病的方法。在某些实施方案中,所述方法包括使测试细胞与抗 -Notch2 抗体接触;通过检测抗 -Notch2 抗体与 Notch2 的结合确定测试细胞表达 Notch2 的水平(定量地或定性地);并且比较测试细胞表达 Notch2 的水平与对照细胞(例如,与测试细胞相同组织起源的正常细胞,或以与所述正常细胞相当的水平或在多个对照细胞中表达的平均水平表达 Notch2 的细胞)表达 Notch2 的水平,其中测试细胞与对照细胞比较更高水平地表达 Notch2 显示与 Notch2 的增加的表达相关的疾病的存在。在某些实施方案中,从怀疑患有与 Notch2 的增加的表达相关的疾病的个体获得测试细胞。在某些实施方案中,所述疾病是细胞增殖性疾病,如癌症或肿瘤。

[0408] 可以使用本发明的抗体诊断的示例性疾病包括癌症,例如 B- 细胞恶性肿瘤、黑色素瘤、T 细胞恶性肿瘤(例如, T-ALL)、乳腺癌、脑癌、宫颈癌、结肠癌,和前列腺癌。

[0409] 可以将某些其他方法用于检测抗体与 Notch2 的结合。所述方法包括,但不限于,在本领域中公知的抗原结合测定法,如蛋白质印迹法、放射性免疫测定法,ELISA(酶联免疫

吸附测定法)、“夹心式”免疫测定法、免疫沉淀测定法、荧光免疫测定法、蛋白 A 免疫测定法和免疫组化 (IHC)。

[0410] 在某些实施方案中,标记抗体。标记包括,但不限于:直接检测(如荧光、发色团、高电子密度的、化学发光的和放射性标记)的标记或结构部分,以及间接检测(例如通过酶促反应或分子相互作用)的结构部分,如酶或配体。示例性标记包括,但不限于:放射性同位素 ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H , 和 ^{131}I , 荧光团如稀土螯合物、或荧光素及其衍生物、罗丹明及其衍生物、丹酰、伞形酮、萤光素酶,例如萤火虫萤光素酶和细菌萤光素酶(美国专利号 4,737,456)、萤光素,2,3-二氢二氮杂萘二酮 (2,3-dihydrophthalazinedione)、辣根过氧化物酶 (HRP)、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、葡糖淀粉酶、溶菌酶、糖氧化酶如葡糖氧化酶、半乳糖氧化酶和 6-磷酸葡糖脱氢酶、杂环氧化酶如尿酸酶和黄嘌呤氧化酶,其与使用过氧化氢氧化染料前体的酶偶联,所述酶如 HRP、乳过氧化物酶、或微过氧化物酶、生物素/抗生物素蛋白、自旋标记、噬菌体标记、稳定的游离基团等。

[0411] 在某些实施方案中,将抗体固定在不可溶的基质上。固定可能需要将抗 -Notch2 抗体从在溶液中保持游离的任何 Notch2 分离。这常规地通过在测定方法开始前不溶抗 -Notch2 抗体来实现,如通过吸附于不溶于水的基质或表面 (Bennich 等., U. S. 3,720,760) 来实现,或通过共价偶联(例如,使用戊二醛交联),或在抗 -Notch2 抗体和 Notch2 之间形成复合物后使抗 -Notch2 抗体不溶,例如通过免疫沉淀来实现。

[0412] 要理解任何上述诊断或检测实施方案可以使用本发明的免疫缀合物取代或另外加入抗 -Notch2 抗体进行。

[0413] 2. 治疗方法

[0414] 可以将本发明的抗体用于例如体外,离体和体内治疗方法中。在一个方面中,本发明提供体内或体外抑制 Notch2 活性,即 Notch2 信号传导的方法,所述方法包括使细胞在允许抗体与 Notch2 结合的条件下暴露于本发明的抗 -Notch2NRR 抗体。在某些实施方案中,细胞是癌细胞,例如癌性 B 细胞或黑素瘤细胞。在一个实施方案中,可以将本发明的抗 -Notch2NRR 抗体用于抑制 Notch2 活性,所述方法包括使 Notch2 暴露于本发明的抗 -Notch2NRR 抗体从而使 Notch2 活性受到抑制。

[0415] 可以使用本发明的抗 -Notch2NRR 抗体,例如用于治疗与 Notch2 的表达和/或活性相关的疾病,例如与 Notch2 的增加的表达或活性相关的疾病,或其中 Notch2 的表达或活性贡献于病理状态的疾病。“与 Notch2 的增加的表达或活性相关的疾病”指其中 Notch2 表达或活性显著高于正常的疾病。

[0416] 在一个方面中,将本发明的抗体用于治疗或预防癌症,例如 B-细胞恶性肿瘤、黑素瘤、T-细胞恶性肿瘤(例如, T-ALL)、乳腺癌、脑癌、宫颈癌、结肠癌和前列腺癌。在某些实施方案中,将抗 -Notch2NRR 抗体用于治疗癌症,如乳腺癌、B 细胞恶性肿瘤或黑素瘤。

[0417] 在另一个方面中,将本发明的抗体用于治疗或预防癌症,具体地包含癌症干细胞的实体瘤。癌症干细胞能够增殖从而产生另外的癌症干细胞,以及其他的肿瘤细胞群体。见 Al-Hajj 等,美国国家科学院学报 (Proc. Nat' l Acad. Sci. USA 100):3983-3988(2003)。认为癌症干细胞有利于癌症的复发,以及癌症对于药物疗法的抗性。已经将 Notch 受体鉴定为癌症干细胞标志并且作为消除负责实体瘤形成和复发的癌症干细胞的靶标。见 W02008/091641。所述实体瘤包括,但不限于乳腺癌、结肠癌、胰腺癌、前列腺癌、肺癌、头颈

癌、直肠癌和结肠直肠癌。

[0418] 在一个方面中,本发明提供治疗癌症的方法,所述方法包括向需要其的个体施用有效量的本发明的抗体。在某些实施方案中,用于治疗癌症的方法包括向需要其的个体施用有效量的包含本发明的抗体和任选地至少一种另外的治疗剂,如下面提供的那些的药物制剂。

[0419] 本发明的抗体可以单独或其它治疗中的组合物组合使用。例如,本发明的抗体可以与至少一种另外的治疗剂和 / 或佐剂共同施用。在某些实施方案中,将抗 -Notch1 抗体 (例如,抗 -Notch1NRR 抗体) 与另一种治疗剂施用,所述另外的治疗剂抑制或减少将另外被所述抗 -Notch1 抗体诱导的改变的肠细胞分化。在某些实施方案中,所述另外的治疗剂是地塞米松或他莫昔芬。所述组合疗法可以用于例如治疗生血管疾病,包括肿瘤相关的血管发生,和癌症。在某些实施方案中,将抗 -Notch2 抗体 (例如,抗 -Notch2NRR 抗体) 与另外的治疗剂,例如化疗剂一起施用。所述组合疗法将用于例如治疗癌症、如 B- 细胞恶性肿瘤和黑素瘤。

[0420] 上述组合疗法包括组合施用 (其中将两种以上的治疗剂包含在相同或不同的制剂中), 和单独施用,在所述情形中,本发明的抗体可以在另外的治疗剂和 / 或佐剂施用之前、同时和 / 或之后进行施用。还可以将本发明的抗体用于与放射疗法的组合中。

[0421] 在一个方面中,至少一些本发明的抗体可以结合来自除了人之外的物种的 Notch2。因此,可以将本发明的抗体用于结合 Notch2,例如在表达内源或重组 Notch2 的哺乳动物细胞培养物中的 Notch2,在人中,或在具有本发明的抗体与之交叉反应的 Notch2 的其它哺乳动物 (例如,黑猩猩 (chimpanzee), 狒狒 (baboon), 狨猴 (marmoset), 食蟹猴 (cynomolgus) 和恒河猴 (rhesus), 猪, 大鼠, 或小鼠) 中。

[0422] 在一个实施方案中,将本发明的抗体用于在患有与增加的 Notch2 表达和 / 或活性相关的疾病的个体中结合 Notch2 的方法中,所述方法包括向所述个体施用抗体从而结合所述个体中的 Notch2。在一个实施方案中,所述 Notch2 是人 Notch2,所述个体是人个体。备选地,所述个体可以是表达本发明的抗体所结合的 Notch2 的哺乳动物。另外,所述个体可以是已经引入 Notch2 的哺乳动物 (例如通过施用 Notch2 或通过表达编码 Notch2 的转基因)。

[0423] 可以将本发明的抗体施用于人用于治疗目的。而且,可以将本发明的抗体施用于表达抗体针对其交叉反应的 Notch2 的非人哺乳动物 (例如灵长类动物、猪、大鼠或小鼠) 用于兽医目的或作为人疾病的动物模型。关于后者,可以将所述动物模型用于评估本发明抗体的治疗功效 (例如,测试施用的剂量和时程)。

[0424] 可以将本发明的抗体 (和任何另外的治疗剂或佐剂) 通过任何适合的方式进行施用,所述方式包括肠胃外、皮下、腹膜内、肺内和鼻内,并且如果需要用于局部治疗,病灶内施用。肠胃外输注包括肌内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下施用。此外,通过脉动输注,特别是用下降剂量的抗体适当地施用所述抗体。可以通过任何适合的路径,例如通过注射,如静脉内或皮下注射来给药,这部分取决于所述施用是否是短时间或是持续的。

[0425] 在制备和施用所述抗体中可以考虑本发明抗体的结合靶标的定位。当所述结合靶标是细胞内分子时,本发明的某些实施方案提供抗体或其抗原结合片段,其将被引入结合靶标所定位的细胞中。在一个实施方案中,可以将本发明的抗体在细胞内作为细胞内抗

体表达。术语“细胞内抗体，”用于本文时，指在细胞内表达的并且能够选择性结合靶分子的抗体或其抗原结合部分，如在下列中所述：例如，Marasco，基因疗法 (Gene Therapy) 4 : 11-15 (1997) ;Kontermann, 方法 (Methods) 34 :163-170 (2004) ;美国专利号 6,004,940 和 6,329,173 ;美国专利申请公开号 2003/0104402, 和 PCT 公开号 W02003/077945。还见例如在 1996 年 3 月 14 日公开的 W096/07321, 其关于应用基因疗法来产生细胞内抗体。

[0426] 细胞内抗体的细胞内表达可以通过将编码需要的抗体或其抗原结合部分的核酸（缺乏通常与编码抗体或抗原结合片段的基因相关的野生型前导序列和分泌信号）引入靶细胞来实现。可以递送编码本发明的抗体的全部或部分一种或多种核酸以靶向细胞，从而表达这样的一种或多种细胞内抗体，所述细胞内抗体能够结合细胞内靶多肽并调节靶多肽的活性。可以使用将核酸引入细胞的任何标准方法，所述方法包括，但不限于：显微注射、弹道注射 (ballistic injection)、电穿孔、磷酸钙沉淀、脂质体和用逆转录病毒、腺病毒、腺伴随病毒以及携带目的核酸的牛痘载体转染。

[0427] 在某些实施方案中，可以将核酸（任选地包含在载体中）通过体内和离体方法引入患者的细胞中。在体内递送的一个实例中，将核酸直接注射到患者中，例如在需要治疗干预的位点注射。在体内递送的另一个实例中，使用用病毒载体（如腺病毒、单纯疱疹病毒 I 或腺伴随病毒）转染和基于脂质的系统（用于基因的脂质介导的转移的有用脂质例如是 DOTMA, DOPE 和 DC-Chol）来将核酸引入细胞。关于某些基因标记和基因疗法流程的综述，见 Anderson 等，科学 (Science) 256 :808-813 (1992)，和 W0 93/25673 以及其中引用的参考文献。在离体治疗的实例中，将患者的细胞去除，并将核酸引入那些分离的细胞中，并且将修饰的细胞直接施用于患者，或例如包载在植入患者的多孔膜中（见，例如，美国专利号 4,892,538 和 5,283,187）。用于离体递送核酸的常用载体是逆转录病毒载体。

[0428] 在另一个实施方案中，提供内在化抗体。抗体可以具有增强抗体递送到细胞中的某些特征，或可以被修饰从而具有所述特征。用于实现该目的的技术是本领域已知的。例如，已知抗体的阳离子化有利于其摄取到细胞中（见，例如，美国专利号 6,703,019）。还可以将脂转染或脂质体用于将抗体递送到细胞中。如果使用抗体片段，特异性结合靶蛋白的最小的抑制片段可以是有利的。例如，基于抗体的可变区序列，可以设计这样的肽分子，其保留结合靶蛋白序列的能力。可以通过化学合成和 / 或重组 DNA 技术产生所述肽。见，例如，Marasco 等，美国国家科学院学报 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA,) 90 :7889-7893 (1993)。

[0429] 抗体进入靶细胞中可以通过本领域已知的其它方法增强。例如，某些序列，如来自 HIV Tat 或触角足同源域蛋白的那些能够直接有效地通过细胞膜摄取异源蛋白。见，例如，Chen 等，美国国家科学院学报 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) (1999), 96 :4325-4329。

[0430] 当将抗体的结合靶标定位在脑中时，本发明的某些实施方案提供穿过血脑屏障的抗体。关于穿过血脑屏障运输分子存在一些本领域已知的方法，所述方法包括，但不限于：物理方法，基于脂质的方法，基于干细胞的方法和基于受体和通道的方法。

[0431] 将抗体穿过血脑屏障运输的物理方法包括，但不限于：完全避开 (circumventing) 血脑屏障，或通过在血脑屏障中产生开口。避开方法包括，但不限于：直接注射到脑中（见，例如，Papanastassiou 等，基因疗法 (Gene Therapy) 9 :398-406 (2002)），间质输注 / 对流 (convection) 增强的递送（见，例如，Bobo 等，美国国家科学院学报 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 91 :2076-2080 (1994)），和将递送装置植入脑中（见，例如，Gill 等，Nature Med. 9 :

589-595(2003) ; 和 Gliadel Wafers™, Guildford 药物 (Guildford Pharmaceutical))。在所述屏障中产生开口的方法包括,但不限于:超声波(见,例如,美国专利公开号 2002/0038086),渗透压(例如,通过施用高渗甘露醇 (Neuwelt, E. A., 血脑屏障的涉及及其操作 (Implication of the Blood-Brain Barrier and its Manipulation), 卷 1&2, Plenum Press, N. Y. (1989)), 通过例如缓激肽或渗透剂 A-7 进行渗透(见,例如,美国专利号 5, 112, 596, 5, 268, 164, 5, 506, 206, 和 5, 686, 416), 和用包含编码所述抗体的基因的载体转染跨越血脑屏障的神经元(见,例如,美国专利公开号 2003/0083299)。

[0432] 用于将抗体穿过血脑屏障运输的基于脂质的方法包括,但不限于:将抗体包封在脂质体中,所述脂质体与结合在血脑屏障的血管内皮上的受体的抗体结合片段偶联(见,例如,美国专利申请公开号 20020025313), 并将抗体包被在低密度脂蛋白颗粒(见,例如,美国专利申请公开号 20040204354) 或载脂蛋白 E 中(见,例如,美国专利申请公开号 20040131692)。

[0433] 将抗体穿过血脑屏障运输的基于干细胞的方法需要遗传改造神经前体细胞 (NPCs) 以表达目的抗体,并接着将干细胞植入待治疗的个体的脑中。见 Behrstock 等 (2005) 基因治疗 (Gene Ther). 2005 年 12 月 15 日早期在线公开物(报告被遗传改造以表达神经营养因子 GDNF 的 NPCs 被植入啮齿类动物和灵长类动物模型的脑中时,减少帕金森病的症状)。

[0434] 将抗体穿过血脑屏障运输的基于受体和通道的方法,包括,但不限于,使用增加血脑屏障的渗透性的糖皮质激素封阻剂(见,例如,美国专利申请公开号 2002/0065259, 2003/0162695, 和 2005/0124533); 激活钾通道(见,例如,美国专利申请公开号 2005/0089473), 抑制 ABC 药物转运蛋白(见,例如,美国专利申请公开号 2003/0073713); 用转铁蛋白包被抗体并调节一种或多种转铁蛋白受体的活性(见,例如,美国专利申请公开号 2003/0129186), 和使所述抗体阳离子化(见,例如,美国专利号 5, 004, 697)。

[0435] 可以与优良医学实践一致的方式配制、剂量给药和施用本发明的抗体。在此背景下考虑的因素包括所治疗的具体疾病、所治疗的具体哺乳动物、患者个体的临床状况、疾病的起因、递送药剂的部位、施药的方法、施药的日程安排、和医学从业人员知道的其它因素。所述抗体不需要,但是任选地与一种或多种目前用于预防或治疗目的疾病的药剂一起配制。此类其它药剂的有效量取决于制剂中存在的抗体的量、病症或治疗的类型、和上文讨论的其它因素。这些通常以与上文所用相同剂量和施用途径使用,或是本文所用剂量的大约 1-99%,或以经验/临床上确定是合适的任何剂量和任何途径使用。

[0436] 对于疾病的预防或治疗,本发明抗体的适宜剂量(当单独使用或与一种或多种其它另外的治疗剂组合使用)取决于待治疗疾病的类型、抗体的类型、疾病的严重程度和病程、施用抗体是用于预防还是治疗目的、先前的疗法、患者的临床史和对抗体的响应、及主治医师的判断。将抗体一次性或者在一系列治疗中适当的施用于患者。根据疾病的类型和严重程度,大约 1 μ g/kg 到 15mg/kg(例如 0.1mg/kg-10mg/kg) 抗体可以是施用于患者的初始候选剂量,无论是例如通过一次或多次分开施用,或者是通过连续输注。一个典型每日剂量的范围可以为大约 1 μ g/kg 到 100mg/kg 或者更多,取决于上述因素。对于持续数天或更长时间的重复给药,根据疾患,治疗通常维持到直至发生期望的疾病症状抑制。抗体的一个示例性剂量在约 0.05mg/kg 到约 10mg/kg 的范围内。因此,可以将一剂或多剂的约 0.5mg/

kg, 2.0mg/kg, 4.0mg/kg 或 10mg/kg (或其任何组合) 的剂量施用于患者。所述剂量可以间歇地施用, 例如每周或每三周施用 (例如从而使患者接受约 2 到约 20, 或例如约 6 个剂量的抗体)。可以施用起始更高的负载剂量, 随后施用一剂或多剂更低的剂量。一个示例性的给药方案包含施用约 4mg/kg 的起始负载剂量, 随后施用约 2mg/kg 的抗体的每周维持剂量。然而, 其它剂量方案可能也是有用的。可以通过常规技术和测定法来容易地监测本发明疗法的进展。

[0437] 要理解可以使用本发明的免疫缀合物取代抗-Notch2 抗体或与所述抗-Notch2 抗体一起进行上述任一种治疗方法。

[0438] 3. 测定法

[0439] 可以通过本领域已知的各种测定法对本发明的抗-Notch2NRR 抗体关于它们的物理/化学性质和/或生物学活性进行表征。

[0440] a) 活性测定法

[0441] 在一个方面中, 提供测定法用于鉴定具有生物学活性的抗-Notch2 抗体 (例如, 抗-Notch2NRR 抗体)。生物学活性可以包括, 例如抑制或减少 Notch2 活性, 例如 Notch2 信号传导。还提供具有所述体内生物学活性和/或体外生物学活性的抗体。

[0442] 在某些实施方案中, 对本发明的抗-Notch2NRR 抗体测试其抑制边缘区 B 细胞产生的能力。在实施例中提供示例性测定法。在某些其他实施方案中, 对本发明的抗体测试其抑制报道基因表达的能力, 所述报道基因对 Notch2 信号传导具有响应性。在实施例中提供示例性测定法。

[0443] b) 结合测定法和其他测定法

[0444] 在一个方面中, 测试本发明的抗体的抗原结合活性, 例如通过已知的方法如 ELISA, 蛋白质印迹法等进行。在另一个方面中, 可以将竞争测定法用于鉴定与本发明的抗体竞争的抗体 (例如单克隆抗体)。在一个实施方案中, 抗体与抗体 D, 抗体 D-1, 抗体 D-2, 或抗体 D-3 竞争结合于 Notch2。在一个这样的实施方案中, 竞争抗体结合由抗体 D, 抗体 D-1, 抗体 D-2, 或抗体 D-3 结合的相同表位 (例如, 线性或构象表位)。在另一个实施方案中, 竞争抗体与由抗-NRR1 结合的相同的表位 (例如线性或构象表位) 结合, 如在实施例 B(5) 中所述, 即包含 Notch1NRR 的 LNR-A, LNR-B 和 HD-C 结构域的表位。示例性竞争测试法包括, 但不限于, 常规测试法, 如由 Harlow 和 Lane(1988) 抗体: 实验室手册 (Antibodies: A Laboratory Manual) ch. 14 (冷泉港实验室, 冷泉港, NY) 提供的那些。用于对抗体结合的表位进行作图的详细示例性方法在 Morris(1996) “表位作图方法 (Epitope Mapping Protocols),” 在分子生物学的方法 (Methods in Molecular Biology) 卷 66 (Humana Press, Totowa, NJ) 中提供。如果两种抗体的每种封闭另一种抗体的结合的 50% 以上, 那么认为所述两种抗体 “结合相同的表位”。

[0445] 在一个示例性的竞争测试法中, 将固定的 Notch2NRR 在包含结合 Notch2NRR 的第一标记抗体 (例如, 抗体 D, 抗体 D-1, 抗体 D-2, 或抗体 D-3) 和关于其与第一抗体竞争结合 Notch2NRR 的能力被测试的第二未标记抗体的溶液中进行温育。第二抗体可以在杂交瘤上清液中存在。作为对照, 将固定的 Notch2NRR 在包含第一标记的抗体, 但是不包含第二未标记的抗体的溶液中温育。在允许第一抗体与 Notch2NRR 结合的条件下温育后, 去除过量的未结合抗体, 并且测量与固定的 Notch2NRR 相关的标记的量。如果在测试样品中与固定的

Notch2NRR 相关的标记的量相对于对照样品大大减少,那么说明第二抗体与第一抗体竞争结合于 Notch2NRR。

[0446] 在一个方面中,可以通过一系列测定法进一步表征本发明的抗体,所述测定法包括,但不限于,N 端测序,氨基酸分析,非变性尺寸排阻高压液相色谱 (HPLC),质谱,离子交换色谱法和木瓜蛋白酶消化。

[0447] 要理解可以使用本发明的缀合物取代抗 -Notch2NRR 抗体或与抗 -Notch2NRR 抗体一起进行上述任一种测定法。

[0448] E. 制品

[0449] 在本发明的另一个方面中,提供了包含可用于治疗、预防和 / 或诊断上文所述疾病的物质的制品。所述制品包括容器和标签或在容器上或与其相关的包装插页。合适的容器包括例如瓶 (bottle)、药瓶 (vial)、注射器等。所述容器可以用多种材料制成,诸如玻璃或塑料。所述容器装有组合物,其本身存在或与另一种有效治疗、预防和 / 或诊断所述病况的组合物组合,可以具有无菌存取口 (例如所述容器可以是带有皮下注射针可刺穿的塞子的静脉内溶液袋或药瓶)。在所述组合物中的至少一种活性剂是本发明的抗体或免疫缀合物。

[0450] 标签或包装插页指明该组合物用于治疗所选择的病况。而且,所述制品可以包含 (a) 具有包含在其中的组合物的第一容器,其中组合物包含本发明的抗体或免疫缀合物;和 (b) 具有包含在其中的组合物的第二容器,其中组合物包含另外的细胞毒性药剂或另外的治疗剂。在本发明的该实施方案中的制品还可以包含包装插页,其说明可以将组合物用于治疗特定病况。备选地,或另外地,所述制品还可以包含第二 (或第三) 容器,其包含药用缓冲液,如用于注射的抑菌水 (BWF1)、磷酸缓冲盐溶液、林格氏溶液和右旋糖溶液。本发明的制品可进一步包括从商业和用户立场出发需要的其它物质,包括其它缓冲剂、稀释剂、滤器、针头和注射器。

实施例

[0451] 下述是本发明的方法和组合物的实例。应当理解考虑上文提供的一般描述可以实施多种其它实施方案。

[0452] A. 材料和方法

[0453] 1. 产生抗 -Notch2NRR 抗体

[0454] 文库分选和筛选以鉴定抗 -Notch2NRR 抗体

[0455] 在选定互补决定区 (H1, H2, H3, L3) 具有合成多样性的人噬菌体抗体文库 (模拟了人 IgG 库的天然多样性) 用于淘洗 (panning)。Fab 片段二价地展示在 M13 噬菌体颗粒的表面上 (参见 Lee 等人, J. Mol. Biol. (分子生物学杂志) 340 :1073-1093 (2004).)。使用杆状病毒表达载体系统或 293T 细胞将 Notch2NRR 片段表达为融合到表位标签 (FLAG 或 6xHis) 的分泌蛋白,使用亲和色谱法纯化到 > 90% 的纯度并使用光散射测试其无聚集。Notch2NRR 抗原的序列如下:

[0456] FLAG- 人 -Notch2-NRR-6xHis:

[0457] KDDDDKSGSDVCPQMPCLNGGTCAVASNMPDGFICRCPPGFSGARCQSSCGQVKCRKGEQCVHTASGPR
CFCPSPRDCESGCASSPCQHGGSCHPQRQPPYYSCQCAPPFSGSRCELYTAPPSTPPATCLSQYCADKARDGVCDEA

CNSHACQWDGGDCSLTMENPWANCSSPLPCWDYINNQCDELNTVECLFDNFECQGNSKTCYDKYCADHFKNHCN
QGCNSEECGWDGLDCAADQPENLAEGTLVIVVLLMPPEQLLQDARSFLRALGTLHTNLRIKRDSQGELMVYPYYGEK
SAAMKKQRMTRRSLPGEQEVEVAGSKVFLEIDNRQCVQSDHCFKNTDAAAALLASHAIQGTLSPVSVVSESLTP
ERTEFGLVPRGSGHHHHHHH (SEQ ID NO :73)

[0458] 小鼠 Notch2-NRR-FLAG :

[0459] ADVCPQKPLNGGTCAVASNMPDGFICRCPGFGSARCQSSCGQVKCRRGEQCIHTDSGPRCFCLNPKD
CESGCASNPCQHGGTCYPQRQPPHYSCRCPPSFGGSHCELYTAPTSTPPATCQSQYCADKARDGICDEACNSHACQW
DGGDCSLTMEDPWANCTSTLRCWEYINNQCDEQCNTECLFDNFECQRNSKTCYDKYCADHFKNHCDQGCNSEEC
GWDGLDCASDQPENLAEGTLIIVVLLPPEQLLQDSRSFLRALGTLHTNLRIKQDSQGALMVYPYFGEKSAAMKKQK
MTRRSLPEEQEQEQEVIGSKIFLEIDNRQCVQSDQCFKNTDAAAALLASHAIQGTLSPVSVFSELESPRNARRA
GSGDYKDDDDKENLYFQ (SEQ ID NO :74)

[0460] Nunc 96 孔 Maxisorp 免疫板在 4℃ 用靶标抗原 (10 μg/ml) 包被过夜,并用噬菌体
封闭缓冲液 PBST (磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 和 1% (w/v) 牛血清白蛋白 (BSA) 和 0.05% (v/v)
Tween-20) 在室温封闭 1 小时。抗体噬菌体文库 VH (参见如 Lee 等人, J. Immunol. Meth. (免
疫学方法杂志) 284 :119-132, 2004) 和 VH/VL (参见 Liang 等人, J. Mol. Biol. 366 :815-829,
2007) 单独添加至抗原板并在室温下孵育过夜。下一天抗原包被的板用 PBT (含有 0.05%
Tween-20 的 PBS) 洗涤十次,结合的噬菌体用 50mM HCl 和 500mM NaCl 洗脱 30 分钟并用等
体积的 1M Tris 碱 (pH7.5) 中和。回收的噬菌体在大肠杆菌 (E. coli) XL-1Blue 细胞中扩
增。在随后的选择轮次中,抗体噬菌体与抗原包被的板的孵育降至 2-3 小时,板洗涤的严格
性逐渐升高。

[0461] 4 轮淘洗之后,观察到显著的富集。从 VH 和 VH/VL 每个文库分选中挑选 96 个克隆
以确定它们是否特异性结合至人和鼠 Notch2NRR 两者。这些克隆的可变区通过 PCR 测序以
鉴定独特序列克隆。

[0462] 噬菌体抗体的亲和力使用样点竞争 ELISA (spot competition ELISA) 评级。使用
竞争性噬菌体结合 ELISA (competitive phage-binding ELISA) 进一步确定噬菌体抗体的
IC₅₀ 值。选择结合人和鼠 Notch2NRR 两者的独特噬菌体抗体并重新格式化 (reformatted)
成全长 IgG 用于在体外细胞测定中评价。

[0463] 通过将单个克隆的 V_L 和 V_H 区分别克隆至 LPG3 和 LPG4 载体,在哺乳动物 CHO 细胞
中瞬时表达,并通过蛋白 A 柱纯化将感兴趣的克隆重新格式化成 IgG。

[0464] 构建用于抗体 D 的新和力改善的文库

[0465] 噬菌粒 pW0703 (衍生自噬菌粒 pV0350-2b (Lee 等人, J. Mol. Biol (分子生物学杂
志) 340, 1073-1093 (2004)), 在 M13 噬菌体表面上展示单价 Fab) 用作文库模板,用于从 VH/
VL 文库移植抗体 D 的轻链 (V_L) 和重链 (V_H) 可变结构域以用于亲和力成熟。然后在文库模
板的 CDR-L3 中并入终止密码子。使用软性随机化 (soft randomization) 策略进行亲和力
成熟,其通过使用有毒寡核苷酸策略 (poisoned oligonucleotide strategy) 在选定的位
点引入大约 50% 的突变率,其中 70-10-10-10 的碱基混合物支持野生型核苷酸 (Gallop 等
人, Journal of Medicinal Chemistry (医学化学杂志) 37 :1233-1251 (1994))。具体地,
位置在 CDR-L1 的 28-32, CDR-L2 的 50 和 53-55, CDR-L3 的 91-94 和 96, CDR-H1 的 28-35,
CDR-H2 的 50-58, CDR-H3 的 95-100 的残基被靶向。也构建了具有不同组合的软性随机化

CDR 环 (L1/L2/L3、L3/H1/H2 和 L3/H3) 的三种不同文库。

[0466] 产生亲和力改善的噬菌体分选策略

[0467] 对于亲和力改善选择,对噬菌体文库进行第一轮板分选,然后进行五轮溶液分选。该文库各自针对人和鼠 Notch2NRR 进行分选。在第一轮板分选,三种文库用在 1% BSA 和 0.05% Tween 20 中大约 30. D./ml 的噬菌体输入针对靶标包被板 (NUNC Maxisorp plate) 在室温下各自分选 2 小时。对于随后轮次的溶液分选,由第一轮板分选繁殖的 10. D./ml 的噬菌体与 50nM 生物素化的靶标蛋白 (浓度基于亲本克隆噬菌体的 IC50 值) 在含有 1% Superblock (Pierce Biotechnology) 和 0.05% Tween20 的 100 μ l 缓冲液中室温下一起孵育 30 分钟。混合物进一步用 1% Superblock 稀释 10X,施用 100 μ l/孔至 neutravidin-包被的孔中 (5 μ g/ml) 在室温下温和振荡 15 分钟以便捕获结合噬菌体的生物素化的靶标。然后,该孔用 PBS-0.05% Tween 20 洗涤十次。为确定背景结合,含有具有未生物素化的靶标的噬菌体的对照孔在 neutravidin-包被的板上捕获。结合的噬菌体用 0.1N HCl 洗脱 20 分钟,用 1/10 体积的 1M Tris pH11 中和、滴定并繁殖以用于下一轮。此后,通过两种方法增加选择严格性一起进行另外 4 轮的溶液分选。其中第一轮是结合-速率 (on-rate) 选择,其通过将生物素化靶标蛋白的浓度从 10nM 降低至 0.5nM 进行,其中第二轮是解离-速率 (off-rate) 选择,其通过添加过量的非生物素化靶标蛋白 (多 100 ~ 500 倍) 以将较弱的结合物竞争下来,均在室温下进行。另外,降低噬菌体的输入 (0.1 ~ 0.50. D./ml) 以降低背景噬菌体的结合。

[0468] 高通量亲和力筛选 ELISA (单样点竞争)

[0469] 从第六轮分选中挑选菌落并在 37°C 于含 50 μ g/ml 羧苄青霉素和 1E10/ml K07 的 500 μ l/孔的 2YT 培养基在 96-孔板 (Falcon) 中生长过夜。从相同的板中,挑选 XL-1 感染的亲本噬菌体的菌落作为对照。96-孔 NuncMaxisorp 板用 100 μ l/孔的人和鼠 Notch2NRR 蛋白 (1 μ g/ml) 各自于 PBS 在 4°C 下包被过夜或在室温下包被 2 小时。该板用 65 μ l 的 1% BSA 封闭 30 分钟并用 40 μ l 的 1% Tween 20 封闭另外 30 分钟。

[0470] 噬菌体上清在 100 μ l 总体积中在含有或不含有 10nM 靶标蛋白的 ELISA (酶联免疫吸附测定) 缓冲液 (含 0.5% BSA, 0.05% Tween20 的 PBS) 中以 1 : 5 稀释,在室温下于 F 板 (NUNC) 中孵育至少 1 小时。75 μ l 的含有或不含有靶标蛋白的混合物并排转移至靶标蛋白包被的板上。该板温和振荡 15 分钟以允许将未结合的噬菌体捕获至靶标蛋白包被的板上。该板用 PBS-0.05% Tween 20 洗涤至少五次。结合通过将辣根过氧化物酶 (HRP)-缀合的抗-M13 抗体加入至 ELISA 缓冲液 (1 : 5000) 中并于室温孵育 30 分钟进行定量。该板用 PBS-0.05% Tween 20 洗涤至少五次。此后,将 100 μ l/孔的 1 : 1 比率的 3,3',5,5' - 四甲基联苯胺 (TMB) 过氧化物酶底物和过氧化物酶溶液 B (H₂O₂) (Kirkegaard-Perry Laboratories (Gaithersburg, MD)) 加入至孔中并在室温下孵育 5 分钟。通过添加 100 μ l 1M 磷酸 (H₃PO₄) 至每孔并允许在室温下孵育 5 分钟终止反应。使用标准 ELISA 板读数器在 450nm 确定每孔中黄色的 OD (吸光度)。通过下述方程计算 OD 的降低 (%)。

[0471] $OD_{450nm} \text{降低}(\%) = [(\text{含竞争物的孔的 } OD_{450nm}) / (\text{无竞争物的孔的 } OD_{450nm})] * 100$

[0472] 与亲本噬菌体的孔的 OD_{450nm} 降低 (%) (100%) 相比,挑选对人和鼠靶标两者具有低于 50% 的 OD_{450nm} 降低 (%) 的克隆进行序列分析。对噬菌体制备物选择独特克隆以通过与亲本克隆的比较来确定对于人和鼠 Notch2NRR 两者的结合亲和力 (噬菌体 IC50)。将亲

和力最改善的克隆重新格式化成人 IgG1 并在哺乳动物细胞中表达。

[0473] 表征抗 -Notch2NRR 抗体 (Biacore)

[0474] 抗 -Notch2NRR 抗体的结合亲和力通过表面等离子共振 (Surface Plasmon Resonance, SRP) 使用 BIAcore™-3000 仪器测量。抗 -Notch2NRR 人 IgG 通过包被于 CM5 传感器芯片上的小鼠抗人 IgG 捕获以获得大约 200 应答单位 (response units, RU)。对于动力学测量,人和鼠 Notch2NRR 的两倍连续稀释液 (3.9nM 至 500nM) 在 25℃ 以 30 μ l/min 的流速注入 PBT 缓冲液 (含 0.05% Tween 20 的 PBS) 中。使用简单一对一 Langmuir 结合模型 (BIAcore 评价软件 3.2 版 (BIAcore Evaluation Software version 3.2)) 计算结合速率 (k_{on}) 和解离速率 (k_{off})。平衡解离常数 (K_D) 以比率 k_{off}/k_{on} 计算。

[0475] 2. 产生抗 -Notch1NRR 抗体

[0476] 以前已经描述了某些抗 -Notch1NRR 抗体的产生和表征。参见美国专利申请公开 No. US 2009/0081238A1。

[0477] 3. ELISA

[0478] 抗 -Flag 抗体用于在有黑色壁的高度结合板 (Greiner) 中从所有四种 Notch 受体中捕获有 Flag- 标签的 NRR 蛋白。NRR 抗体和 E25 对照抗体结合 NRR 蛋白并用 PBS 洗掉。碱性磷酸盐缀合的抗 -人 (H+L) 次级抗体 (Jackson ImmunoResearch) 用于检测结合的抗 -NRR 和 E25。未结合的次级抗体被洗掉并且用 PNPP 底物 (Pierce) 检测 AP。

[0479] 4. FACS

[0480] 制备表达质粒,其中 Notch1 或 Notch2 细胞外结构域和跨膜结构域在 N- 末端加上 myc- 标签,并在最小 CMV 立即早期启动子上游的四环素反应元件 (TRE) 的控制下表达。这些质粒稳定地转染到 CHO-K1 细胞 (Clonetech) 中,该细胞是工程化细胞从而在结合并激活转染的质粒中的 TRE 的多西环素存在下表达反式作用因子蛋白。细胞用 1mg/mL 的多西环素或赋形剂 (vehicle) 处理 48 小时,然后用抗 -NRR、抗 -myc (9E10, Millipore) 或 E25 对照抗体以及山羊抗 -人 Alexa 488 或 Alexa 647 次级抗体 (Invitrogen) 中的一种进行染色。染色后,细胞在 FACScalibur 机器 (BD Biosciences) 上运行,并且收集 15000 事件 (event) 并设定范围开关 (range gate) 来评价阳性或隐性染色的群体。

[0481] 5. Notch 报道分子测定

[0482] 稳定转染 Notch1 或瞬时转染含有其他 Notch 受体质粒的 NIH-3T3 细胞与 Notch- 反应性 TP-1 (12X CSL) 萤火虫荧光素酶报道分子和控制转染效率的组成型活性的 Renilla 荧光素酶报道分子 (pRL-CMV, Promega) 共转染。从 6 小时到过夜允许从转染中回收细胞。对抗体和稳定转染配体的 NIH-3T3 细胞进行处理用于激活受体细胞。20 小时后,萤火虫和 Renilla 荧光素酶通过 Dual Glo 荧光素酶测定系统 (Promega) 进行测量。对于每种条件通过用萤火虫信号除以用于控制转染效率的 Renilla 信号分析 8 个重复。计算均值和标准差并对数值根据通过无配体转染的 NIH-3T3 细胞刺激的共培养物计算的数值进行标准化。

[0483] 6. 表位作图

[0484] 设计合成的 Notch1 和 Notch2NRR 序列,其在 NRR 的五个结构域 (LNR-A; LNR-B; LNR-C; HD-N; 和 HD-C) 之间的结合处具有独特的限制性位点,并通过 Blue Heron Technology (Bothell, WA) 产生。使用工程化的限制性位点在两条合成的序列之间交换不

同结构域,产生嵌合 NRR 蛋白。嵌合克隆在修饰的 pUC19 载体中组装并转染到用于表达的含 SEAP 的载体 (pCSC-AP)。通过转染 293T 细胞产生有 AP- 标签的 NRR 蛋白。72 小时培养后,收集条件培养基,通过离心清除并使用 Phospha-Light System(Applied Biosystems, Bedford, MA) 测试 AP 活性。对每种样品中的 AP 活性进行标准化并实施 ELISA 以测试 α -NRR1 或 α -NRR2 结合嵌合的 NRR 蛋白的能力。ELISA 如下实施: α -NRR1 或 α -NRR2 通过 96- 孔格式中结合于板的 α -Fc 抗体捕获并与条件培养基孵育过夜。洗涤板以去除未结合的蛋白,使用 Phospha-Light System 测试捕获蛋白的 AP 活性。所获得的 AP 活性用于定量每种 α -NRR 抗体结合特异性嵌合蛋白的能力并推断用于结合的重要表位。

[0485] 7. HUVEC 纤维蛋白胶珠测定 (Fibrin Gel Bead Assay)

[0486] 如以前的描述,HUVEC 细胞在纤维蛋白胶珠上生长 (Nakatsu 等人,2003)。Cytodex 3 珠子 (Amersham Pharmacia Biotech) 在 2ml EGM-2 培养基 (Clonetics) 中每珠包被 350-400HUVEC。约 200HUVEC 包被的珠子植入 12- 孔组织培养板中一个孔的纤维蛋白凝块中。 6×10^4 Detroit 551 成纤维细胞置于凝块和含有 5ug/ml 抗 -NRR1,5ug/ml 抗 -DLL4,1uM DBZ 或赋形剂对照的培养基上面。每两天更换培养基。7 至 9 天后,然后纤维蛋白胶用 4% 多聚甲醛固定并且内皮细胞用抗 -CD31 (R&D Systems AF806) 染色使用 FITC- 缀合的次级抗体进行检测。

[0487] 8. 新生动物视网膜体内测定

[0488] CD1 新生动物在 P1 和 P3 用 10mg/kg 的豚草对照或 20mg/kg 的 Notch-1 进行 i. p. 注射。在 P5 收获眼睛并用 4% PFA 固定。剥离视网膜,封闭 (5% BSA,0.5% Triton X-100) 一小时,随之用 1M 柠檬酸钠处理 10 分钟。然后视网膜与生物素化的同工凝集素 B4 (Sigma) 和 Ki67 抗体 (NeoMarkers) 在 4°C 孵育过夜。随后洗涤视网膜并用链霉抗生物素蛋白 Alexa 488 和山羊抗 - 兔 Cy3 在 1% BSA,0.5% Triton X-100 中染色。铺平视网膜并使用 epifluorescence 显微镜照相。

[0489] 9. 体内肿瘤研究

[0490] 人肿瘤细胞系 Calu-6 和 HM7 在 Ham's F12, 补充了 10% v/v FBS,1% v/v 青霉素 / 链霉素,2mM L-Gln 和 1 μ g/ml FungizoneTM (InvitrogenTM, CA) 的低葡萄糖 DMEM 1 : 1 中生长。细胞在 95% 空气 / 5% CO₂ 的大气中在 37°C 孵育。对于小鼠异种移植实验,肿瘤细胞以浓度 1×10^8 或 1×10^9 细胞 / ml 悬浮并皮下注射 (100 μ l / 小鼠) 到 Balb-c 裸鼠 (Harlan Sprague Dawley, IN) 的背侧。当肿瘤达到体积 400mm³ 时,随机选择一群 (n = 10) 作为第 0 天的对照。剩余小鼠分成 10 只小鼠的组,并且以剂量 10mg/kg 每周两次 i. p. 施用噬菌体抗体抗 -Notch1。移植的肿瘤每周两次沿最长轴和垂直的轴如描述的一样测量。在测量肿瘤的每一天,计算每只小鼠的肿瘤体积,并且来自于每种对照抗体 (抗 -豚草)、抗 -VEGF 组的肿瘤体积均值与抗 -Notch1- 处理的小鼠的肿瘤体积均值进行比较,该比较通过 JMPTM 统计分析系统 (用于 Windows 的 5.1 版 ;SAS Institute, Cary, NC) 中的工具 Dunnett' st 检验进行,水平为 P < 0.05。当肿瘤体积达到 2,000mm³ 时杀死小鼠。通过恒冷切片机将肿瘤切成 7 微米的切片,用丙酮固定并用 DAPI (Invitrogen)、仓鼠抗 -CD31 (Serotech, Inc.) 和抗 - 仓鼠 Cy3 次级抗体 (Jackson Immunolabs) 染色。玻片用 Fluorescent Mounting Medium (Dako) 封固。用 Zeiss Axioskop2 显微镜照相并通过 ImageJ 对 DAPI 染色和 Cy3 染色的面积进行分析。Cy3 染色除以 DAPI 染色的面积以对存在的细胞数目进行标准化,并且

数值根据抗-豚草处理的肿瘤进行标准化。所有动物研究根据实验动物使用与管理委员会 (Institutional Animal Care and Use Committee) 批准的方案进行。

[0491] 10. 缘区 B 细胞分析

[0492] 12 周龄 Balb-c 小鼠 (Jackson) 用 5mg/kg 的抗-gD, 抗-NRR1 或抗-NRR2 每周两次进行 IP 注射, 持续两周。从小鼠分离脾细胞并用 B220-PerCP, CD23-PE 和 CD21-FITC (BD Biosciences) 如以前的描述 (Saito, 等人, Immunity (免疫), Vol. 18, 675-685, May 2003) 进行 FACS 染色。

[0493] 11. 小鼠肠组织的组织学和免疫组织化学

[0494] 向六组每组六只、10 周龄 C57BL/6 小鼠 (Jackson) 每隔一天施用 MCT、每隔一天施用 30umol/kg 的 DBZ、在第 0、2 和 6 天施用 10、2 或 0.4mg/kg 的抗-NRR1 或者 10mg/kg 的抗-gD 对照 (HSV-1); 或者如所示的其它方式施用。福尔马林-固定且石蜡-包埋的小鼠小肠组织以 3 微米的厚度切片。肠细胞类型的组织化学鉴定用爱茜蓝根据制造商 (PolyScientific) 的推荐进行。对于抗-Ki67 染色, 切片用 Target Retrieval 溶液 (S1700, DAKO) 预处理, 并与兔抗-Ki67 (1 : 200, 克隆 SP6, Neomarkers) 一起孵育。7.5 μg/ml 的第二山羊抗-兔抗体 (Vector labs) 用 Vectastain ABC Elite 试剂盒 (Vector labs) 检测。Ki67 染色的切片用 Mayer's 苏木精进行复染。对于抗-溶菌酶染色, 切片在 Discovery XT 平台 (Ventana Medical Systems, Inc.) 上使用 CC1m 表位回收条件、OmniMap-兔检测和 Ventana 苏木精 II/用上蓝剂 (bluing) 复染进行加工。对于 HES-1 染色, 抗-大鼠 HES-1 (克隆 NM1, MBL, International) 随后进行 TSA-HRP。

[0495] B. 结果

[0496] 1. 产生特异性靶向 Notch1 和 Notch2 负调节区的合成抗体

[0497] 为能够在人和小鼠中独立拮抗 Notch1 和 Notch2 的信号传导, 我们使用噬菌体展示来靶向 NRR 并选择具有下述性质的合成的人抗体。首先, 选择每种抗体来强烈抑制其相关靶标 -Notch1 或 Notch2- 但不抑制其它 Notch 受体。其次, 选择结合人靶标序列从而能够进行治疗性靶向的抗体。第三, 为发现体内系统抑制 Notch1 或 Notch2 的生物学序列 (consequences) 并研究这些受体在小鼠模型中的功能, 对结合直向同源小鼠序列的抗体进行共选择。第四, 为避免人抗-抗体免疫应答, 将互补决定区克隆到人免疫球蛋白框架中。

[0498] 通过这种方法, 我们成功地分离了具有每种这些期望性质的抗-Notch1NRR 和抗-Notch2NRR 抗体。这些抗体相对于靶向多种 Notch 受体 (如 γ-分泌酶抑制剂) 的“泛-Notch (pan-Notch)”抑制剂具有数种优点。因为这些抗体分辨个体 Notch 受体, 它们能够将那些个体受体的不同功能分开。另外, 泛-Notch 抑制剂由于对 Notch1 和 Notch2 两者的双重抑制而在体内显示出潜在的不想要的副作用, 因此对于治疗目的对 Notch1 或 Notch2 有选择性的抗体可能是更具有吸引力的候选物。根据上述方法分离的抗-Notch1NRR 和抗-Notch2NRR 抗体在下文进一步详细描述和表征:

[0499] 在美国专利申请公开 No. US 2009/0081238A1 中讨论了抗-NotchNRR1 抗体的分离和表征。该申请中公开的抗体之一, “抗体 A-2”对其结构和某些生物学活性进行了表征。本文中概述了该申请中讨论的某些研究。为方便起见, 美国专利申请公开 No. US 2009/0081238A1 的“抗体 A-2”在本文中称为“抗-NRR1”。

[0500] 本文描述了抗-Notch2NRR 抗体的分离和表征。分离了抗-Notch2NRR 抗体 (称为

“抗体 D”)。该抗体如上文所述进行亲和力成熟,产生抗体 D-1、抗体 D-2 和抗体 D-3。图 1 显示了抗体 D、抗体 D-1、抗体 D-2 和抗体 D-3 的 HVR-H1、HVR-H2 和 HVR-H3 序列。图 2 显示了抗体 D、抗体 D-1、抗体 D-2 和抗体 D-3 的 HVR-L1、HVR-L2 和 HVR-L3 序列。图 3 显示了抗体 D、抗体 D-1、抗体 D-2 和抗体 D-3 的重链可变区序列。图 4 显示了抗体 D、抗体 D-1、抗体 D-2 和抗体 D-3 的轻链可变区序列。为方便起见,抗体 D-3 在本文称作“抗 -NRR2”。

[0501] 使用表面等离子共振 (SPR) 测量的结合亲和力揭示抗 -NRR1 以相似并且高亲和力 ($K_d = 3\text{nM}$) 地结合小鼠或人序列的纯化的 NRR1 蛋白。我们在抗 -NRR2 测试中观察到对 NRR2 抗原相似的亲和力 ($K_d = 5\text{nM}$)。两种抗体的结合对相关受体都显示出高度特异性;使用多种技术(包括 SPR、酶联免疫吸附测定 (ELISA) 和荧光激活细胞分选术 (FACS)) 对于抗 -NRR1 或抗 -NRR2 都未检测到对其它三种非 - 靶向受体中任何一种的人或小鼠序列的结合(图 9 和数据未显示)。例如 ELISA 结果显示抗 -NRR1 与纯化的人和小鼠 Notch1-NRR 蛋白结合同样良好,在抗体浓度大约 $0.1\text{ }\mu\text{g/ml}$ 观察到半数 - 最大结合。即使在所测试的最高抗体浓度,也不能检测到抗 -NRR1 对纯化的人或小鼠 Notch2NRR、Notch3-NRR 或 Notch4-NRR 蛋白的结合(图 9A,左图),尽管事实是人 Notch1-NRR 和人 Notch2NRR 序列是 45% 同一性的(图 18)。对于抗 -NRR2 我们观察到相似结果,其特异性结合 Notch2NRR 蛋白但不结合来自于其它 Notch 受体的 NRR 蛋白(图 9A,右图)。

[0502] 为确定抗 -NRR1 和抗 -NRR2 是否也特异性结合在细胞表面上表达的全长受体,我们使用了荧光激活细胞分选术 (FACS)。我们评价了对 Notch1 或 Notch2 的结合,每种在 N- 末端带有 myc 表位标签以便将转基因 Notch 受体与来自于内源表达的 Notch 受体(特别是被 K1-CHO 细胞表达的 Notch2) 相区别。在 K1-CHO 细胞中诱导受体的表达,该细胞是未转染的(图 9B,组图 1,4,7 和 10)、用 myc-Notch1 转染的(图 9B,组图 2,5,8 和 11)或用 myc-Notch2 转染的(图 9B,组图 3,6,9 和 12)。在 myc-N1 细胞中观察到抗 -NRR1 与 myc- 阳性细胞的结合(图 9B,组图 2),但在 K1-CHO 亲本细胞中未观察到(图 9B,组图 1)并且仅在诱导后观察到(图 9B,比较组图 2 和 5),表明抗 -NRR1 特异性结合 Notch1。相比之下,尽管在 myc-N2 细胞中清楚地诱导了 myc-Notch2 表达(图 9B,比较组图 3 和 6),抗 -NRR1 不结合 myc-Notch2(图 9B,比较组图 2 和 3)。我们使用抗 -NRR2 进行了相似的分析(图 9B,组图 7-12),尽管这种分析被复杂化了,该复杂化是没有诱导的情况下 myc-Notch2 的遗漏表达(leaky expression)(图 9B,组图 6 和 12)和 K1-CHO 系中仓鼠 Notch2 的内源表达(图 9B,比较组图 7 和 10 与组图 1 和 4)导致的。尽管如此,抗 -NRR2 仅显著结合诱导后表达 myc-Notch2 的细胞,与特异性结合 Notch2 是一致的(图 9B,比较组图 9 与组图 8 和 12)。总之,我们使用纯化的 NRR 蛋白和细胞表面表达全长受体的结合结果证明抗 -NRR1 特异性结合 Notch1-NRR1,不结合 Notch2NRR,同样,抗 -NRR2 特异性结合 Notch2NRR,不结合 Notch1-NRR。这种特异性得到下文描述的大量结构和功能研究的进一步支持。

[0503] 2. 抗 -NRR1 和抗 -NRR2 作为 Notch1 和 Notch2 体外信号传导的有效且特异性抑制剂发挥功能

[0504] 为评价抗 -NRR 是否影响 Notch 信号传导,我们首先使用了利用 NIH-3T3 细胞系的共培养测定,该细胞系被工程化用来表达 Jag1(作为 Notch 配体)或 Notch1(图 10A)或 Notch2(图 10B)(作为 Notch 受体)。该测定精确反映了 Notch 信号传导,因为强的 Notch 报道信号(萤火虫荧光素酶)依赖于配体 - 和受体 - 表达细胞两者的存在(图 10A 和 B,比

较 -Jag1 与 +Jag1), 并且当 GSI (γ -分泌酶抑制剂) 被诱导时报道分子的水平降低到背景水平 (图 10A 和 B, 比较 DMSO 与 DAPT)。

[0505] 添加增加量的抗 -NRR1 抑制 Notch1 细胞中的信号传导, 在抗体浓度在 80 和 400ng/ml 之间时观察到完全抑制 (图 10A)。对照抗体未抑制信号传导 (图 10A, 比较 α -gD 与 α -NRR1 滴定), 与针对不是 Notch1 的抗原的许多其他抗体相同 (数据未显示)。为进一步测试这种抑制活性是否反映抗 -NRR1 结合, 我们提出以下问题: 添加纯化的 NRR1 抗原是否拯救存在抑制浓度 (80ng/ml) 的抗 -NRR1 抗体时的信号传导, 这是通过与表达在信号传导细胞上的 Notch1 结合的抗体进行竞争来完成。添加 NRR1 而非 NRR2 抗原 (在其他测定中显示为有活性且正确折叠的, 参见图 10B) 将信号传导恢复到对照水平 (图 10A, 比较 80ng/ml α -NRR1+NRR1 与仅有 80ng/ml α -NRR1 和 80ng/ml α -NRR1+NRR2)。作为对照, NRR1 或 NRR2 抗原都不影响含有对照抗体的共培养物中的信号传导, 确认了 NRR 片段本身对 Notch 信号传导无直接影响 (图 10A, α -gD+NRR1 和 α -gD+NRR2)。使用 Notch2 表达细胞测定抗 -NRR2 活性, 我们观察到抗 -NRR2 抑制 Notch2 信号传导的相似结果 (图 10B)。两种抗体都抑制我们已经测试的所有 Notch 配体 (即 Jag1, Jag2, D111 和 D114) 诱导的信号传导 (图 16 和数据未显示)。总之, 这些结果证明抗 -NRR1 和抗 -NRR2 分别是 Notch1 和 Notch2 信号传导的强烈的旁系同源物 (paralog)-特异性的抑制剂。

[0506] 3. 抗 -NRR1 通过 T-ALL 中发现的两种主要种类的突变受体抑制信号传导

[0507] 已经显示 Notch 信号传导直接影响肿瘤生成的一种机制是通过在 T-ALL 中突变激活 Notch1 信号传导。特别地, T-ALL 中激活 Notch1 的突变有两大类: (1) 截短 PEST 结构域, 从而稳定 ICD 并以配体-依赖性方式增加信号传导的那些, 和 (2) 使 NRR 不稳定, 从而使 ADAM 切割并以配体-非依赖性方式刺激信号传导的那些。为测试抗 -NRR1 是否能通过此类突变受体使信号传导失活, 我们对共培养测定进行了修改以表达 Notch1-WT (Notch1 野生型)、Notch1- Δ PEST (缺少 PEST 结构域的 Notch1), 或 Notch1-L1594P (在 NRR 的异二聚化 (HD) 结构域中带有 L1594P 突变的 Notch1)。如在野生型 Notch1 信号传导中所观察到的 (图 10C, 顶部组图), 抗 -NRR1 通过 Notch1- Δ PEST 和 Notch1-L1594P 完全抑制配体-依赖性和-非依赖性信号传导 (图 10C, 中部和底部组图)。因此, 抗 -NRR1 通过两种种类的突变受体拮抗信号传导, 该突变受体包括落入与该抗体靶向的结构域相同结构域并使该结构域不稳定的 L1594P 突变。

[0508] 4. 抗 -NRR1 和抗 -NRR2 作为 Notch1 和 Notch2 体内信号传导的有效且特异性的抑制剂发挥功能

[0509] 为确定抗 -NRR1 和抗 -NRR2 是否在体内作为受体特异性抑制剂发挥功能, 我们研究了对于遗传技术已经确定了作用的 Notch1 或 Notch2, 抗体如何影响细胞命运的决定。具体而言, 以前条件性灭活 Notch1 或 Notch2 已经揭示 Notch1 在淋巴发育过程中是决定 T 对 (versus) B 细胞命运的关键, 而 Notch2 在产生脾缘区 B (marginal zone B, MZB) 细胞中是必需的。与 Notch1 在 T 细胞发育中的重要功能一致, 我们发现用抗 -NRR1 而非抗 -NRR2 处理小鼠显著降低胸腺重量 (图 11A 和 B)。同样, 抗 -NRR1 而非抗 -NRR2 显著降低胸腺中总细胞数目 (图 11B) 并且几乎完全抑制 CD4⁺/CD8⁺ 双阳性 T 细胞的产生 (图 11C)。

[0510] 相比之下, 当检查 MZB 细胞时抗体的效应是相反的。用抗 -NRR2 处理几乎清除 MZB 细胞 (与对照值 6.61 $\pm$ 0.25 相比为 0.97 $\pm$ 0.45), 甚至比纯化的、重组的淋巴细胞

毒素- β 受体 (LT β R)-Fc 融合蛋白 (其用作阳性对照) 降低的群体 (3.48 $\pm$ 0.06) 更显著 (图 11D)。这种抑制效应是抗-NRR2 特异性的, 因为抗-NRR1 不显著降低 MZB 群体 (6.00 $\pm$ 0.44), 相对于抗-gD 对照抗体 (6.61 $\pm$ 0.25; 图 11D) 而言。总之, 这些体内研究表明两种抗体都是其各自靶标的有效抑制剂, 其靶标可诱导细胞命运决定中生物学显著变化; 此外, 因为抗-NRR1 影响 T 但不影响 MZB 细胞产生, 而抗-NRR2 影响 MZB 而不影响 T 细胞产生, 每种抗体对于体内目的靶标都特异性地发挥功能。

[0511] 5. 共-晶体结构 (co-crystal structure) 揭示抗-NRR1 桥接 LNR 和 HD-C 结构域并似乎稳定 NRR “关闭 (off)” 构象

[0512] 为阐明抗-NRR1 和抗-NRR2 的结合特异性并获得该抗体拮抗活性的机制的 (mechanistic) 理解, 我们测试了两种抗体对一系列嵌合 NRR 蛋白的结合。具体而言, 我们通过在 Notch1 和 Notch2 之间交换每种 NRR 亚结构域 (LNR-A, LNR-B, LNR-C, HD-N 和 HD-C) 制备了嵌合的 NRR, 为便于检测将这些嵌合体表达为融合到碱性磷酸酶的分泌蛋白, 并测定标准化量的每种嵌合的 NRR 与抗-NRR1 或抗-NRR2 的结合。在我们表达的 26 个嵌合的 NRR 中, 17 个有效检测为分泌蛋白 (图 12A), 7 个检测较弱以及 2 个未检测到高于背景 (图 17), 表明大部分但不是所有嵌合的 NRR 得到表达、正确折叠和分泌。将来自于 NRR2 的单个 LNR-A 结构域交换到 NRR1 骨架中破坏了抗-NRR1 的结合 (图 12A, 嵌合体 BC. Hd 和所有具有来自于 NRR2 的 LNR-A 的那些), 表明抗-NRR1 与 NRR1 的 LNR-A 亚结构域的接触对结合是必需的。相比之下, 将来自于 NRR2 的 LNR-C 和 / 或 HD-N 结构域交换到 NRR1 中不影响抗-NRR1 的结合 (图 12A, 嵌合体 AB. Hd, ABC. Hc 和 AB. Hc), 证明这些结构域对于结合特异性都不是必需的。最后, AB. Hc 是具有最少 NRR1 亚结构域但仍能支持完全抗-NRR1 结合的嵌合体 (尽管对于 AB 嵌合体观察到较弱的结合), 表明大部分, 并且可能所有抗-NRR1 结合特异性必需的接触包含于 LNR-A, LNR-B 和 HD-C 结构域中。

[0513] 对抗-NRR2 的表征揭示与抗-NRR1 中确定的相似的结合模式, 尽管有一些明显的不同。将 NRR1 的 LNR-A 结构域交换到 NRR2 骨架中完全破坏抗-NRR2 的结合, 而交换 LNR-B 或 LNR-C 无影响; 因此, 如在抗-NRR1 中的情况相同, 抗-NRR2 结合需要来自于 Notch2 的 LNR-A 亚结构域。同样, 来自于 Notch2 的 HD-C 结构域也是必需的。在这种测定中, 两种仅具有来自于 NRR2 的三个亚结构域的不同嵌合体 (C. Hn 和 BC) 支持完全结合; 这两种嵌合体共有来自于 NRR2 的 LNR-A 和 HD-C 亚结构域并且, 与这种观察一致, 仅含有来自于 NRR2 的 LNR-A 和 HD-C 亚结构域的嵌合体支持弱的但可检测到的与抗-NRR2 的结合。因此, 在确定决定抗-NRR2 结合特异性的亚结构域中, 结构域交换实验: (a) 揭示 LNR-A 和 HD-C 最重要 (对结合特异性是必需的并且是部分地足够的) 和 (b) 表明抗体-NRR2 在 LNR-B 和 HD-N 中的接触也可能有作用。

[0514] 为更好理解抗-NRR1 拮抗活性的分子基础, 我们确定了该抗体 Fab 片段结合人 NRR1 的 2.2 Å 晶体结构。这种结构揭示 NRR1 形成与人 NRR2 非常相似的紧密结构, 三个 Ca²⁺ 结合 LNR 组件包裹在核心 HD 结构域周围 (图 12B 和 C)。该结构揭示 Fab 结合的明显影响是稳定 LNR-HD 相互作用从而 S2 切割是不易接近的, 由此使得 Notch1 信号传导级联静止。这种解释得到如下观察的支持, Fab 不直接关闭 S2 位点反而结合在 HD, LNR-A 和 LNR-B 结构域之间的界面 (图 12D), 与结构域交换实验一致 (图 12A)。这个界面覆盖了 ~ 2000 Å² 的溶剂-可接触表面积, 在 fab 和 NRR1 之间平分。Fab 重链接触 LNR-B、HD-C 结构域的最

后的螺旋和 LNR-A 的外周。CDR H3 安置到 LNR-B 和 HD 之间的界面中。特别地,来自于 H3 的 R99 与来自于 LNR-A 的 Phe1501 的骨架羰基形成氢键,而侧链的脂肪族部分与来自于 HD 结构域的 L1710 相互作用。轻链占 Fab 贡献的覆盖表面积的~40%,并接触 HD 结构域中最后螺旋之前的连接环和 LNR-A。

[0515] 这种结构也揭示相对于 Notch2, Fab 对 Notch1 的特异性的基础。尽管 Notch1 和 Notch2 的 NRR 结构域之间有~45%的序列同一性,界面中涉及的大部分残基在两种蛋白之间是不同的。例如在 21 个覆盖结合 Fab 的溶剂可接触表面积至少 25%的 NRR 残基中,仅有六个在 Notch1 和 Notch2 中是相同的。这六个残基贡献低于 Fab 表位中四分之一的表面积并分布在整個表位中(图 12D 和 18)。

[0516] 6. 选择性抑制 Notch1 信号传导解除对血管生成的调节

[0517] 为开始开发 Notch 受体-特异性抗体以确定体内个体受体的功能重要性,我们首先提出了这样的问题:用抗-NRR1 选择性阻断 Notch1 信号传导是否将破坏哺乳动物血管生成。大量报道表明 Notch 途径在血管内皮细胞生长因子(VEGF)下游发挥功能并通过调节内皮细胞在顶端细胞和柄细胞之间的命运选择在血管生成中发挥关键作用。使用多种遗传和生化工具(包括 D114-特异性阻断抗体)的实验已经确立 D114 作为关键 Notch 配体参与 Notch 血管生成信号传导,尽管已经涉及两种 Notch 受体(Notch1 和 Notch4)作为 D114 在血管生成中的受体。

[0518] 我们首先测试选择性抑制 Notch1 是否影响体外内皮萌发。人脐静脉内皮细胞(HUVECs)与人皮肤成纤维细胞共培养产生具有腔-样结构的萌芽。与以前的工作一致,我们发现使用 DBZ(一种 γ -分泌酶抑制剂)抑制泛-Notch 以及选择性抗体阻断 D114 增加了内皮细胞萌芽的数目和长度。重要地,使用抗-NRR1 选择性阻断 Notch1 信号传导产生相似的表型(图 13A 和 13B)。

[0519] 为确定抗-NRR1 是否影响体内血管生成,我们使用基于小鼠新生动物中视网膜脉管系统发育的模型。系统性递送抗-NRR1 显著破坏受处理新生小鼠中视网膜脉管系统的发育(图 13C)。相对于用对照抗-豚草抗体的处理,抗-NRR1 处理产生致密、紧密并且看起来混乱的脉管网络(图 13C,分别比较组图 I 和 III 与组图 II 和 IV)。这种增加积累的内皮细胞与增加的增殖相关,如通过用 Ki67 增殖标志物标记所评价的(图 13C,比较组图 V 与 VI)。这些观察(包括增加的血管密度、内皮细胞积累和增加的增殖)都接近模拟使用该相同新生动物模型通过抑制 D114 或 γ -分泌酶发现的那些(数据未显示)并与其它研究的结果一致,包括肿瘤脉管系统分析(图 13D 和 13E)和小鼠角膜囊袋测定(corneal pocket assay)(数据未显示)。我们的结果证明不仅抗-NRR1 具有有效的生物学活性,而且仅抑制 Notch1(与 Notch4 相比或与 Notch1 和 Notch4 的组合相比)足以显著破坏哺乳动物血管生成。

[0520] 7. 选择性抗体阻断 Notch1 抑制临床前模型中的肿瘤生长

[0521] 为确定使用抗-NRR1 选择性阻断 Notch1 是否足以抑制肿瘤生长,我们使用临床前肿瘤模型并比较在用抗-NRR1、抗-VEGF 或抗-豚草抗体处理后确定的肿瘤生长。在 Calu6 和 HM7 模型中,用抗-NRR1 处理的组都显示相对于对照组的显著的肿瘤大小的降低,甚至在检查的第一时间点,第一次给药后的三到四天(图 13A-C)。在 Calu6 模型中,抗-NRR1 组显示肿瘤大小的降低,从约 250mm³到低于 100mm³,与在抗-VEGF 组观察到的降低相似;相比之

下,抗-豚草对照组的肿瘤生长到大小大于 400mm^3 (图 14A)。我们使用侵袭性生长 HM7 模型观察到相似的结果;抗-NRR1 处理导致肿瘤大小在 12-13 天中保持静止(图 14B)或几乎保持静止(图 14C),相对于在对照组观察到的六天从 250mm^3 生长到大于 900mm^3 (图 14B 和 5C) 有显著不同。在使用抗-NRR1 给药浓度范围 20mg/kg 和 2.5mg/kg 之间我们观察到相似的肿瘤生长抑制,尽管 10 和 20mg/kg 组显示相对于 2.5 和 5mg/kg 组更强抑制的趋势(图 14C)。

[0522] 我们研究了 Calu6 或 HM7 肿瘤模型,因为大量文献已经研究了它们对抗-血管生成剂的反应。为直接测试抗-NRR1 是否破坏 Calu6 模型中的血管生成,我们在来自于三种处理组的小鼠的代表性肿瘤切片中检查了脉管系统。通过根据 DNA 染色(使用 DAPI)进行标准化的 CD31(内皮细胞标志物)染色,我们发现相对于其它组,抗-NRR1 显著增加的 CD31 染色(图 14D)。这种增加是统计显著性的($p < 0.01$),并且与在多个图中观察的一致(图 14E)。相比之下并且如所预料的,抗-VEGF 导致 CD31 染色的降低(图 14D 和 14E)。因此选择性阻断 Notch1 的结果反应了选择性阻断 D114 所报道的那些结果,其相似地导致肿瘤 CD31 染色的增加以及产生功能很差的肿瘤脉管系统。总之,这些结果表明抗-NRR1 在 Calu6 和 HM7 模型中发挥的抗-肿瘤效应主要反应在肿瘤血管生成中的破坏。

[0523] 8. 抗体抑制 Notch1 和 Notch2 两者对肠细胞命运有显著效应

[0524] γ -分泌酶抑制剂(GSIs),其是泛-Notch 抑制剂,抑制多种 Notch 受体,导致体重减轻和肠杯状细胞化生,反应了 Notch 通过维持肠隐窝祖细胞的增殖和阻止其分化成分泌细胞命运在确定细胞命运中的作用(参见 van Es 等人, *Nature* (自然) 435: 959-963 (2005).)。另外,使用条件 Notch 敲除小鼠的遗传研究表明 Notch1 和 Notch2 两者的破坏是导致肠杯状细胞化生必需的(参见 Riccio 等人, *EMBO Rep.* (欧洲分子生物学组织报道) 9: 377-383 (2008).)。我们使用抗-NRR1 和抗-NRR2 来确定选择性抑制 Notch1 或 Notch2,或两者都抑制对于体重减轻和肠细胞分化的效应。

[0525] 在抗体给药过程中抗-NRR1 处理的小鼠显示总体重的轻度降低。在第一实验中直接比较抗-NRR1 和抗-NRR2,我们发现抗-NRR1 导致总体重 5% 的降低,相反,在抗-NRR2 以及抗-gD 和抗-LT β R-Fc 对照组中观察到体重增加(图 15A)。在第二实验中,使用抗-NRR1 或抗-NRR2 分别选择性抑制 Notch1 或 Notch2,对体重产生小的效应或无效应。该实验的结果在图 24A 中描述,其中在箭头所示的天数对小鼠给药 5mg/kg 抗-NRR1(正方形),抗-NRR2(三角形)或对照抗体("α-gD",菱形)。然而,在早至 7 天时抗-NRR1 和抗-NRR2 两者处理的小鼠(图 24A 中"X")丧失其起始体重的几乎 20%。

[0526] 我们研究了由于抗-NRR1 单独处理导致的轻微体重减轻,或者由于抗-NRR1 和抗-NRR2 两者的处理导致的更显著的体重减轻是否反映了肠细胞命运决定中的变化。在对小鼠给药抗-NRR1 或抗-gD 或 DBZ(作为对照)后,在第 2 天(图 20)和第 7 天(图 15B)使用多种组织化学染色分析大肠(图 19)和小肠切片。DBZ 具有如以前对于 GSI 所描述的相同效应(图 15B, DBZ 柱):Hes1 表达的抑制与祖细胞增殖的降低(如 Ki-67 染色所示)和杯形细胞群体的显著膨胀(如粘蛋白的爱茜蓝染色所示)相关。溶菌酶染色也显示 DBZ 增加了 Paneth 细胞(第二分泌细胞群体)的数目和/或活性(图 15B),该结果得到使用 Azure A-Eosin B 对 Paneth 细胞颗粒染色的进一步支持(数据未显示)。10mg/kg 的抗-NRR1 诱导的肠变化与 DBZ 诱导的那些不可区分(图 15A,比较 DBZ $30\mu\text{mol/kg}$ 与 α-NRR1 10mg/kg)。

这些肠变化依赖于抗-NRR1 的浓度,从而使用 10mg/kg 和 2.0mg/kg 观察到显著的细胞命运变化,但是使用 0.4mg/kg 观察到很少(如果有的话)明显的变化。大肠对 DBZ 和抗-NRR1 处理的反应相似:两种处理都显著降低 Notch 信号传导(图 19, Hes1 染色),阻断祖细胞增殖(图 19, Ki-67)并增加杯形细胞数目(图 19, 爱茜蓝和 H&E)。在早期时间点(本研究中第 2 天)仅能微弱检测到肠细胞命运变化(图 20;注意轻微但可检测的变化,由 DBZ 和抗-NRR1 两者产生,在 Ki-67 和爱茜蓝染色中观察)。

[0527] 为确定 Notch2 信号的抑制是否可能相似地影响肠细胞命运确定,我们直接比较了抗-NRR1 和抗-NRR2 对大肠(数据未显示)和小肠(图 15C,显示爱茜蓝和 Ki-67 染色,和图 24B,显示爱茜蓝染色)的效应。尽管抗-NRR1 导致与 Ki-67 在隐窝祖细胞中表达降低一致的杯形细胞化生,抗-NRR2 未导致任何可检测的效应(图 15C 和 24B,比较抗-NRR2 与抗-gD 对照)。因为抗-NRR1 和抗-NRR2 分别作为 Notch1 和 Notch2 信号传导的有效且特异性抑制剂发挥功能,无论体内(图 11)还是体外(图 9, 10 和 21),这些结果强烈表明选择性抑制 Notch1 而非 Notch2 足以改变肠细胞命运确定。

[0528] 还研究了抑制 Notch1 和 Notch2 两者对肠细胞命运确定的效应。图 22 显示抗-NRR1 和抗-NRR2 对改变的肠细胞分化的协同效应。在第 0, 4, 7 和 11 天用 5mg/kg 抗-NRR1, 5mg/kg 抗-NRR2 或 5mg/kg 抗-NRR1 加 5mg/kg 抗-NRR2 对雌性 Balb/c 小鼠给药。收获肠并用 H&E 染色以揭示隐窝形态学。对于用抗-NRR1 或抗-NRR2 单独处理的小鼠,在第 12 天收获肠;对两种抗体一起处理的小鼠,在第 6 天收获肠,因为这组小鼠迅速体重减轻。肠分析表明抗体组合导致比用抗-NRR1 单独处理后观察到的更严重的表型,表明 Notch1 和 Notch2 在哺乳动物肠中共同发挥功能并部分地冗余。进一步的实验确认了这种观察。如图 24B 所示,用抗-NRR1 和抗-NRR2 处理的小鼠的肠显示严重的杯形细胞化生。尽管用抗-NRR1 单独处理足以诱导一些杯形细胞化生,相对于抗-NRR1 和抗-NRR2 组合的效应,单独的抗-NRR1 效应是轻微的。

[0529] 总之,结果表明 Notch1 和 Notch2 在肠细胞分化中相互冗余地发挥功能,尽管有效抑制 Notch1 而非 Notch2 足以产生部分表型。我们假设我们检测这种部分表型(在以前的遗传研究中未报道)的能力反应了在全部隐窝细胞中抗-NRR1 提供了比通过可能是不完全的条件性基因敲除所获得的更一致且有效的 Notch1 信号传导的抑制。重要地,通过显著降低或避免杯形细胞化生(这是一般 Notch 抑制的标志),本文报道的 Notch1- 和 Notch2- 特异性抗体抑制剂代表了相对于现有泛-Notch 抑制剂(如 GSI)清楚的突破。

[0530] 9. 拯救抗-NRR1 肠表型

[0531] 图 23 显示地塞米松至少部分地拯救抗-NRR1 导致的肠表型。抗体如下腹膜内施用(IP)到雌性 NCR. 裸鼠(每组三只小鼠):

[0532] 组 A) 赋形剂组合, MCT, 每天一次, 4mg/kg 抗-gD 对照抗体, 每第四天(图中未显示);

[0533] 组 B) 地塞米松, 90mg/kg, 每天(图中未显示);

[0534] 组 C) 抗-NRR1, 4mg/kg, 每第四天;

[0535] 组 D) 地塞米松, 90mg/kg, 每天, 和抗-NRR1, 4mg/kg, 每第四天。

[0536] 赋形剂是 0.5% (w/v) 羟丙基甲基纤维素 (Methocel E4M) 和 0.1% (w/v) Tween 80 水溶液 (MCT), 以前显示未导致临床副作用。

[0537] 在第 9 天收获肠并用抗 -Ki67 (增殖标志物) 和爱茜蓝 (染色粘蛋白) 染色。这一实验揭示地塞米松加抗 -NRR1 组合处理的小鼠相对于单独抗 -NRR1 处理的小鼠显示更轻微的肠表型, 因此表明地塞米松保护肠免于抗 -NRR1- 诱导的分化变化。

[0538] 10. 抗 -NRR2 抑制黑素瘤细胞系的生长

[0539] 研究了抗 -NRR1 和抗 -NRR2 对黑素瘤细胞系生长的影响。人黑素瘤细胞系 SK23 和 LOX-IMVI 在含有 2% FBS 的培养基中以低密度 (对于 SK23, 4000 细胞 / 孔, 对于 LOX-IMVI 2500 细胞 / 孔) 铺在 96 孔板上, 该 96 孔板不用 (-jag-1) 或用 Jagged-1 配体 (+jag-1) (R&D Systems, Minneapolis, MN) 包被。抗 -NRR1 (20mg/ml), 抗 -NRR2 (20mg/ml), 或 γ -分泌酶抑制剂 (GSI) DAPT (5 μ M) 添加到培养物中, 并且其后每隔一天再次添加。等体积的 DMSO 用作赋形剂对照, 而等浓度的抗 -gD HuB6 噬菌体抗体用作同种型对照抗体。铺板后六天进行 Cell Titer Glo 测定 (Promega, Madison, WI)。结果显示于图 25A 和 25B (抗 -NRR1 和抗 -NRR2 称作“抗 -N1”和“抗 -N2”)。在图 25A 和 25B 中, 细胞活力 (y-轴) 相对于来自于 DMSO 赋形剂、-jag-1 对照孔的数值来表示。两种黑素瘤细胞系对于 GSI 处理 (尤其是在 Jag1 配体存在下) 和抗 -NRR2 处理都显示活力的降低, 但对于抗 -NRR1 处理则没有。

[0540] 11. 抗 -NRR2 抑制弥漫性大 B 细胞淋巴瘤 (Diffuse Large B-Cell Lymphoma) 的体外生长

[0541] 弥漫性大 B 细胞淋巴瘤 (DLBCL) 是非 - 霍奇金淋巴瘤 (non-Hodgkin's lymphoma) 最常见的类型。对患有 DLBCL 患者癌细胞最近的研究表明约 8% 的患者 Notch2 中带有 PEST 结构域突变, 该突变预测在配体激活后延长 Notch2 信号传导 (参见 Lee 等人, Cancer Sci. (肿瘤科学) 100:920-926, 2009.)。然而, 对 DLBCL 细胞对 Notch2 抑制将如何反应是未知的。因此, 我们研究了抗 -NRR2 对五种 DLBCL 细胞系的效应。图 26 右侧列举的 DLBCL 系 (重复一份) 在 384-孔板中生长三天。细胞培养物包括所示浓度的抗 -NRR2 (在图 26 和 27 中称作“抗 -Notch2”), 其对应于以 10 μ g/ml 起始的三倍系列稀释。使用 Cell Titer Glo 测定 (Promega) 评价生长, 以相对于用同种型对照抗体处理的细胞活力百分数作图。图 26 中的数据点代表对于每个细胞系在所示抗体浓度从个体细胞孔获得的平均值。如图 26 所示, 一种细胞系 (“DB”) 的生长被抗 -NRR2 处理强烈抑制。图 27 显示 DB 细胞系随时间的生长。DB 系在 12-孔板的孔中生长, 培养物用 DMSO、 γ -分泌酶抑制剂 DAPT、抗 -gD 同种型对照抗体或抗 -NRR2 以所示的浓度处理。生长通过在接种和对培养物处理后第 2, 3 和 5 天时计数存活细胞 (Vi-CELL, Beckman Coulter, Fullerton, CA) 来评价。数值代表三个独立培养物测量的均值加 / 减标准差。图 27 显示抗 -NRR2 抑制 DB DLBCL 细胞系的体外生长。

[0542] 尽管为清楚理解的目的前述发明已经以示例的方式对一些细节和实例进行描述, 该描述和实例不应当解释为限制本发明的范围。本文引用的所有专利和科学文献的内容全文通过引用明确并入本文。

[0001]

序列表

<110> 健泰科有限公司等
<120> 抗-NOTCH2抗体和使用方法
<130> P4244R1 W0
<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> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的抗体D肽的HVR-H1

<400> 1
Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Gly Met Ser
1 5 10

<210> 2
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的抗体D-1, D-2和D-3肽的HVR-H1

<400> 2
Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met Ser
1 5 10

<210> 3
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的HVR-H1共有序列

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> Ser 或 Thr

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> Ser 或 Thr

<400> 3
Gly Tyr Xaa Phe Xaa Ser Tyr Gly Met Ser
1 5 10

<210> 4
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

[0002]

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的抗体D，D-1，D-2和D-3肽的HVR-H2

<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> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的抗体D，D-1，D-2和D-3肽的HVR-H3

<400> 5

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

<210> 6

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的抗体D肽的HVR-L1

<400> 6

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

<210> 7

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的抗体D-1肽的HVR-L1

<400> 7

Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Asn	Arg	Arg	Phe	Leu	Ala
1				5					10	

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的抗体D-2肽的HVR-L1

<400> 8

Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Arg	Ser	Phe	Leu	Ala
1				5					10	

<210> 9

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

[0003]

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的抗体D-3肽的HVR-L1

<400> 9
Arg Ala Ser Gln Asn Ile Lys Arg Phe Leu Ala
1 5 10

<210> 10
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的HVR-L1共有序列

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> Ser 或 Asn

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> Ile, Asn 或 Val

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> Ser, Arg 或 Lys

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> Ser 或 Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (9)..(9)
<223> Tyr 或 Phe

<400> 10
Arg Ala Ser Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Ala
1 5 10

<210> 11
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的抗体D和D-1肽的HVR-L2

<400> 11
Gly Ala Ser Ser Arg Ala Ser
1 5

<210> 12
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的抗体D-2肽的HVR-L2

<400> 12
Arg Ala Ser Ile Arg Ala Ser
1 5

[0004]

<210> 13
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的抗体D-3肽的HVR-L2

<400> 13
Gly Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 14
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的HVR-L2共有序列

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Gly 或 Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> Ser, Ile 或 Thr

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> Ala 或 Glu

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

<210> 15
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的抗体D肽的HVR-L3

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

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的抗体D-1肽的HVR-L3

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

<210> 17

[0005]

<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的抗体D-2肽的HVR-L3

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

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的抗体D-3肽的HVR-L3

<400> 18
Gln Gln Tyr Tyr Arg Ser Pro His Thr
1 5

<210> 19
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的HVR-L3共有序列

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> Ser, Ile 或 Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> Leu, Trp 或 His

<400> 19
Gln Gln Tyr Tyr Xaa Ser Pro Xaa Thr
1 5

<210> 20
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的抗体D多肽的重链可变区

<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

[0006]

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> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人工序列的描述: 合成的抗体D-1、D-2和D-3多肽的重链可变区		
<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> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人工序列的描述: 合成的抗体D多肽的轻链可变区		
<400> 22		
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
1	5	10 15

[0007]

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> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成的抗体D-1多肽的轻链可变区

<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> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成的抗体D-2多肽的轻链可变区

<400> 24

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

[0008]

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> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的抗体D-3多肽的轻链可变区

<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> PRT
<213> 人(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

[0009]

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> PRT		
<213> 鼠物种 (Mus. sp)		
<400> 27		
Glu Glu Ala Cys Glu Leu Pro Glu Cys Gln Val Asp Ala Gly Asn Lys 1 5 10 15		

[0010]

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> PRT
 <213> 人(homo sapiens)

[0011]

<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> PRT
 <213> 鼠物种 (Mus. sp)
 <400> 29
 Pro Ala Thr Cys Gln Ser Gln Tyr Cys Ala Asp Lys Ala Arg Asp Gly
 1 5 10 15

[0012]

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> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的多肽

<400> 30
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

[0013]

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

<210> 31
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的构架区4肽

<400> 31
Phe Arg Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 32
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的多肽

<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> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的肽

<400> 33
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10

<210> 34
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的多肽

<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> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的肽

[0014]

<400> 35

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 36

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成的肽

<400> 36

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
20 25

<210> 37

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成的肽

<400> 37

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

<210> 38

<211> 31

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成的多肽

<400> 38

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
20 25 30

<210> 39

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成的多肽

<400> 39

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 40

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

[0015]

<223> 人工序列的描述: 合成的多肽

<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> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成的肽

<400> 41

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

<210> 42

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成的多肽

<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> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成的肽

<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> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成的肽

<400> 44

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

<210> 45

<211> 31

<212> PRT

<213> 人工序列

[0016]

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的多肽

<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> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的多肽

<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> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的多肽

<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> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的肽

<400> 48
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
1 5 10
Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 49
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的多肽

<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

[0017]

<210> 50
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的肽

<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> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的肽

<400> 51
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
1 5 10

<210> 52
<211> 31
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的多肽

<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> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的多肽

<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> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的多肽

<400> 54

[0018]

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> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成的多肽

<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> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成的多肽

<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> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成的多肽

<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> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成的多肽

<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

[0019]

<210> 59
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的多肽

<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> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的肽

<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> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的肽

<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> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的多肽

<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> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的肽

<400> 63
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

[0020]

1 5 10

<210> 64
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的肽

<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> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的肽

<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> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的多肽

<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> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的肽

<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> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的肽

[0021]

<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> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成的多肽

<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> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成的肽

<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> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成的肽

<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> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成的多肽

<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> PRT

<213> 人工序列

<220>

[0022]

<223> 人工序列的描述：合成的标记人Notch2 NRR抗原多肽

<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

```

[0023]

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> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的标记小鼠Notch2 NRR抗原多肽
 <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

[0024]

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> PRT
 <213> 人(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

[0025]

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
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
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
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

[0026]

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

[0027]

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

[0028]

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

[0029]

1205	1210	1215
Gly Leu Leu Cys Glu Glu Asn 1220	Ile Asp Asp Cys Ala 1225	Arg Gly Pro 1230
His Cys Leu Asn Gly Gly Gln 1235	Cys Met Asp Arg Ile 1240	Gly Gly Tyr 1245
Ser Cys Arg Cys Leu Pro Gly 1250	Phe Ala Gly Glu Arg 1255	Cys Glu Gly 1260
Asp Ile Asn Glu Cys Leu Ser 1265	Asn Pro Cys Ser Ser 1270	Glu Gly Ser 1275
Leu Asp Cys Ile Gln Leu Thr 1280	Asn Asp Tyr Leu Cys 1285	Val Cys Arg 1290
Ser Ala Phe Thr Gly Arg His 1295	Cys Glu Thr Phe Val 1300	Asp Val Cys 1305
Pro Gln Met Pro Cys Leu Asn 1310	Gly Gly Thr Cys Ala 1315	Val Ala Ser 1320
Asn Met Pro Asp Gly Phe Ile 1325	Cys Arg Cys Pro Pro 1330	Gly Phe Ser 1335
Gly Ala Arg Cys Gln Ser Ser 1340	Cys Gly Gln Val Lys 1345	Cys Arg Lys 1350
Gly Glu Gln Cys Val His Thr 1355	Ala Ser Gly Pro Arg 1360	Cys Phe Cys 1365
Pro Ser Pro Arg Asp Cys Glu 1370	Ser Gly Cys Ala Ser 1375	Ser Pro Cys 1380
Gln His Gly Gly Ser Cys His 1385	Pro Gln Arg Gln Pro 1390	Pro Tyr Tyr 1395
Ser Cys Gln Cys Ala Pro Pro 1400	Phe Ser Gly Ser Arg 1405	Cys Glu Leu 1410
Tyr Thr Ala Pro Pro Ser Thr 1415	Pro Pro Ala Thr Cys 1420	Leu Ser Gln 1425
Tyr Cys Ala Asp Lys Ala Arg 1430	Asp Gly Val Cys Asp 1435	Glu Ala Cys 1440
Asn Ser His Ala Cys Gln Trp 1445	Asp Gly Gly Asp Cys 1450	Ser Leu Thr 1455
Met Glu Asn Pro Trp Ala Asn 1460	Cys Ser Ser Pro Leu 1465	Pro Cys Trp 1470
Asp Tyr Ile Asn Asn Gln Cys 1475	Asp Glu Leu Cys Asn 1480	Thr Val Glu 1485

[0030]

Cys 1490	Leu	Phe	Asp	Asn	Phe	Glu 1495	Cys	Gln	Gly	Asn	Ser 1500	Lys	Thr	Cys
Lys 1505	Tyr	Asp	Lys	Tyr	Cys	Ala 1510	Asp	His	Phe	Lys	Asp 1515	Asn	His	Cys
Asp 1520	Gln	Gly	Cys	Asn	Ser	Glu 1525	Glu	Cys	Gly	Trp	Asp 1530	Gly	Leu	Asp
Cys 1535	Ala	Ala	Asp	Gln	Pro	Glu 1540	Asn	Leu	Ala	Glu	Gly 1545	Thr	Leu	Val
Ile 1550	Val	Val	Leu	Met	Pro	Pro 1555	Glu	Gln	Leu	Leu	Gln 1560	Asp	Ala	Arg
Ser 1565	Phe	Leu	Arg	Ala	Leu	Gly 1570	Thr	Leu	Leu	His	Thr 1575	Asn	Leu	Arg
Ile 1580	Lys	Arg	Asp	Ser	Gln	Gly 1585	Glu	Leu	Met	Val	Tyr 1590	Pro	Tyr	Tyr
Gly 1595	Glu	Lys	Ser	Ala	Ala	Met 1600	Lys	Lys	Gln	Arg	Met 1605	Thr	Arg	Arg
Ser 1610	Leu	Pro	Gly	Glu	Gln	Glu 1615	Gln	Glu	Val	Ala	Gly 1620	Ser	Lys	Val
Phe 1625	Leu	Glu	Ile	Asp	Asn	Arg 1630	Gln	Cys	Val	Gln	Asp 1635	Ser	Asp	His
Cys 1640	Phe	Lys	Asn	Thr	Asp	Ala 1645	Ala	Ala	Ala	Leu	Leu 1650	Ala	Ser	His
Ala 1655	Ile	Gln	Gly	Thr	Leu	Ser 1660	Tyr	Pro	Leu	Val	Ser 1665	Val	Val	Ser
Glu 1670	Ser	Leu	Thr	Pro	Glu	Arg 1675	Thr	Gln	Leu	Leu	Tyr 1680	Leu	Leu	Ala
Val 1685	Ala	Val	Val	Ile	Ile	Leu 1690	Phe	Ile	Ile	Leu	Leu 1695	Gly	Val	Ile
Met 1700	Ala	Lys	Arg	Lys	Arg	Lys 1705	His	Gly	Ser	Leu	Trp 1710	Leu	Pro	Glu
Gly 1715	Phe	Thr	Leu	Arg	Arg	Asp 1720	Ala	Ser	Asn	His	Lys 1725	Arg	Arg	Glu
Pro 1730	Val	Gly	Gln	Asp	Ala	Val 1735	Gly	Leu	Lys	Asn	Leu 1740	Ser	Val	Gln
Val 1745	Ser	Glu	Ala	Asn	Leu	Ile 1750	Gly	Thr	Gly	Thr	Ser 1755	Glu	His	Trp
Val 1760	Asp	Asp	Glu	Gly	Pro	Gln 1765	Pro	Lys	Lys	Val	Lys 1770	Ala	Glu	Asp

[0031]

Glu 1775	Ala	Leu	Leu	Ser	Glu	Glu	Asp	Asp	Pro	Ile	Asp	Arg	Arg	Pro
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		

[0032]

Val 2060	Arg	Leu	Leu	Asp	Glu	Tyr 2065	Asn	Val	Thr	Pro	Ser 2070	Pro	Pro	Gly
Thr 2075	Val	Leu	Thr	Ser	Ala	Leu 2080	Ser	Pro	Val	Ile	Cys 2085	Gly	Pro	Asn
Arg 2090	Ser	Phe	Leu	Ser	Leu	Lys 2095	His	Thr	Pro	Met	Gly 2100	Lys	Lys	Ser
Arg 2105	Arg	Pro	Ser	Ala	Lys	Ser 2110	Thr	Met	Pro	Thr	Ser 2115	Leu	Pro	Asn
Leu 2120	Ala	Lys	Glu	Ala	Lys	Asp 2125	Ala	Lys	Gly	Ser	Arg 2130	Arg	Lys	Lys
Ser 2135	Leu	Ser	Glu	Lys	Val	Gln 2140	Leu	Ser	Glu	Ser	Ser 2145	Val	Thr	Leu
Ser 2150	Pro	Val	Asp	Ser	Leu	Glu 2155	Ser	Pro	His	Thr	Tyr 2160	Val	Ser	Asp
Thr 2165	Thr	Ser	Ser	Pro	Met	Ile 2170	Thr	Ser	Pro	Gly	Ile 2175	Leu	Gln	Ala
Ser 2180	Pro	Asn	Pro	Met	Leu	Ala 2185	Thr	Ala	Ala	Pro	Pro 2190	Ala	Pro	Val
His 2195	Ala	Gln	His	Ala	Leu	Ser 2200	Phe	Ser	Asn	Leu	His 2205	Glu	Met	Gln
Pro 2210	Leu	Ala	His	Gly	Ala	Ser 2215	Thr	Val	Leu	Pro	Ser 2220	Val	Ser	Gln
Leu 2225	Leu	Ser	His	His	His	Ile 2230	Val	Ser	Pro	Gly	Ser 2235	Gly	Ser	Ala
Gly 2240	Ser	Leu	Ser	Arg	Leu	His 2245	Pro	Val	Pro	Val	Pro 2250	Ala	Asp	Trp
Met 2255	Asn	Arg	Met	Glu	Val	Asn 2260	Glu	Thr	Gln	Tyr	Asn 2265	Glu	Met	Phe
Gly 2270	Met	Val	Leu	Ala	Pro	Ala 2275	Glu	Gly	Thr	His	Pro 2280	Gly	Ile	Ala
Pro 2285	Gln	Ser	Arg	Pro	Pro	Glu 2290	Gly	Lys	His	Ile	Thr 2295	Thr	Pro	Arg
Glu 2300	Pro	Leu	Pro	Pro	Ile	Val 2305	Thr	Phe	Gln	Leu	Ile 2310	Pro	Lys	Gly
Ser 2315	Ile	Ala	Gln	Pro	Ala	Gly 2320	Ala	Pro	Gln	Pro	Gln 2325	Ser	Thr	Cys
Pro	Pro	Ala	Val	Ala	Gly	Pro	Leu	Pro	Thr	Met	Tyr	Gln	Ile	Pro

[0033]

2330	2335	2340
Glu Met 2345	Ala Arg Leu Pro Ser 2350	Val Ala Phe Pro Thr 2355
Pro Gln 2360	Gln Asp Gly Gln Val 2365	Ala Gln Thr Ile Leu 2370
His Pro 2375	Phe Pro Ala Ser Val 2380	Gly Lys Tyr Pro Thr 2385
Gln His 2390	Ser Tyr Ala Ser Ser 2395	Asn Ala Ala Glu Arg 2400
His Ser 2405	Gly His Leu Gln Gly 2410	Glu His Pro Tyr Leu 2415
Pro Glu 2420	Ser Pro Asp Gln Trp 2425	Ser Ser Ser Ser Pro 2430
Ser Asp 2435	Trp Ser Asp Val Thr 2440	Thr Ser Pro Thr Pro 2445
Gly Gly 2450	Gly Gln Arg Gly Pro 2455	Gly Thr His Met Ser 2460
His Asn 2465	Asn Met Gln Val Tyr 2470	Ala

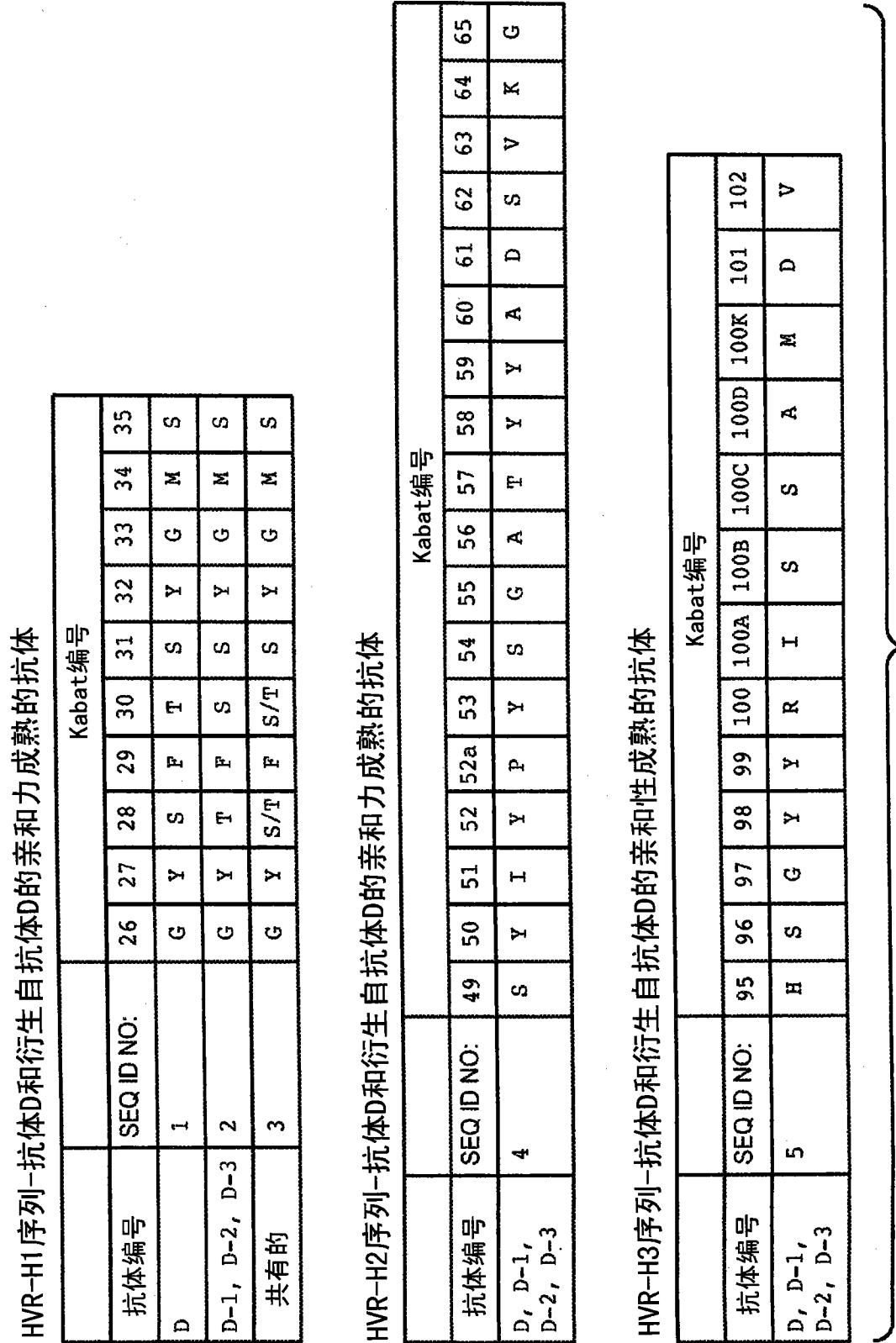


图 1

HVR-L1序列-抗体D和衍生自抗体D的亲合力成熟的抗体													
		Kabat编号											
抗体编号	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	
共有的	10	R	A	S	Q	S/N	I/N/V	S/R/K	S/R	Y/F	L	A	

HVR-L2序列-抗体D和衍生自抗体D的亲合力成熟的抗体													
		Kabat编号											
抗体编号	SEQ ID NO:	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					
共有的	14	G/R	A	S	S/I/T	R	A/E	S					

HVR-L3序列-抗体D和衍生自抗体D的亲合力成熟的抗体													
		Kabat编号											
克隆编号	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			
共有的	19	Q	Q	Y	Y	S/I/R	S	P	L/W/H	T			

图 2

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	
抗体 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	G	Y	S	F	T	S	Y	G	M	S											
抗体 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											
抗体 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											
抗体 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											

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
抗体 D	G	L	E	W	V	S	Y	I	Y	P	Y	S	G	A	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	L	Q	M	N	
抗体 D-1	G	L	E	W	V	S	Y	I	Y	P	Y	S	G	A	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	L	Q	M	N	
抗体 D-2	G	L	E	W	V	S	Y	I	Y	P	Y	S	G	A	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	L	Q	M	N	
抗体 D-3	G	L	E	W	V	S	Y	I	Y	P	Y	S	G	A	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	L	Q	M	N	

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				
抗体 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																					
抗体 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																					
抗体 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																					
抗体 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																					

图 3

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
抗体 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
抗体 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
抗体 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
抗体 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

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
抗体 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
抗体 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
抗体 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
抗体 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

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	SEQ ID NO: 22
抗体 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	
抗体 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
抗体 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
抗体 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

图 4

	FR1	FR2	
I			
A	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT	-H1-	WVRQAPGQGLEWMG
B	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS	-H1-	WVRQAPGQGLEWM
C	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS	-H1-	WVRQAPGQGLEWM
D	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS	-H1-	WVRQAPGQGLEWM
II			
A	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSVS	-H1-	WIRQPPGKGLEWIG
B	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVS	-H1-	WIRQPPGKGLEWI
C	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVS	-H1-	WIRQPPGKGLEWI
D	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVS	-H1-	WIRQPPGKGLEWI
III			
A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	-H1-	WVRQAPGKGLEWVS
B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV
C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV
D	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV
接纳体 - 1			
A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK	-H1-	WVRQAPGKGLEWVS
B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV
C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV
接纳体 - 2			
A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK	-H1-	WVRQAPGKGLEWVS
B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV
C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV
D	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV

图 5A

FR3		FR4		FR1, FR2, FR3, FR4 的SEQ ID NOS	
I					
A	ADTSTSTAYMELSSLRSSEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 32, 33, 34, 35	
B	ADTSTSTAYMELSSLRSSEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 36, 37, 34, 35	
C	ADTSTSTAYMELSSLRSSEDTAVYYCA	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 36, 37, 38, 35	
D	ADTSTSTAYMELSSLRSSEDTAVYYC	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 36, 37, 39, 35	
II					
A	VDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAR	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 40, 41, 42, 35	
B	VDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAR	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 43, 44, 42, 35	
C	VDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCA	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 43, 44, 45, 35	
D	VDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYC	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 43, 44, 46, 35	
III					
A	RDNSKNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 47, 48, 49, 35	
B	RDNSKNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 50, 51, 49, 35	
C	RDNSKNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCA	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 50, 51, 52, 35	
D	RDNSKNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYC	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 50, 51, 53, 35	
接纳体 -1					
A	ADTSKNTAYLQMNLSLRAEDTAVYYCSR	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 54, 48, 55, 35	
B	ADTSKNTAYLQMNLSLRAEDTAVYYCSR	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 50, 51, 55, 35	
C	ADTSKNTAYLQMNLSLRAEDTAVYYCS	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 50, 51, 56, 35	
接纳体 -2					
A	ADTSKNTAYLQMNLSLRAEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 54, 48, 57, 35	
B	ADTSKNTAYLQMNLSLRAEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 50, 51, 57, 35	
C	ADTSKNTAYLQMNLSLRAEDTAVYYCA	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 50, 51, 58, 35	
D	ADTSKNTAYLQMNLSLRAEDTAVYYC	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 50, 51, 59, 35	

图 5B

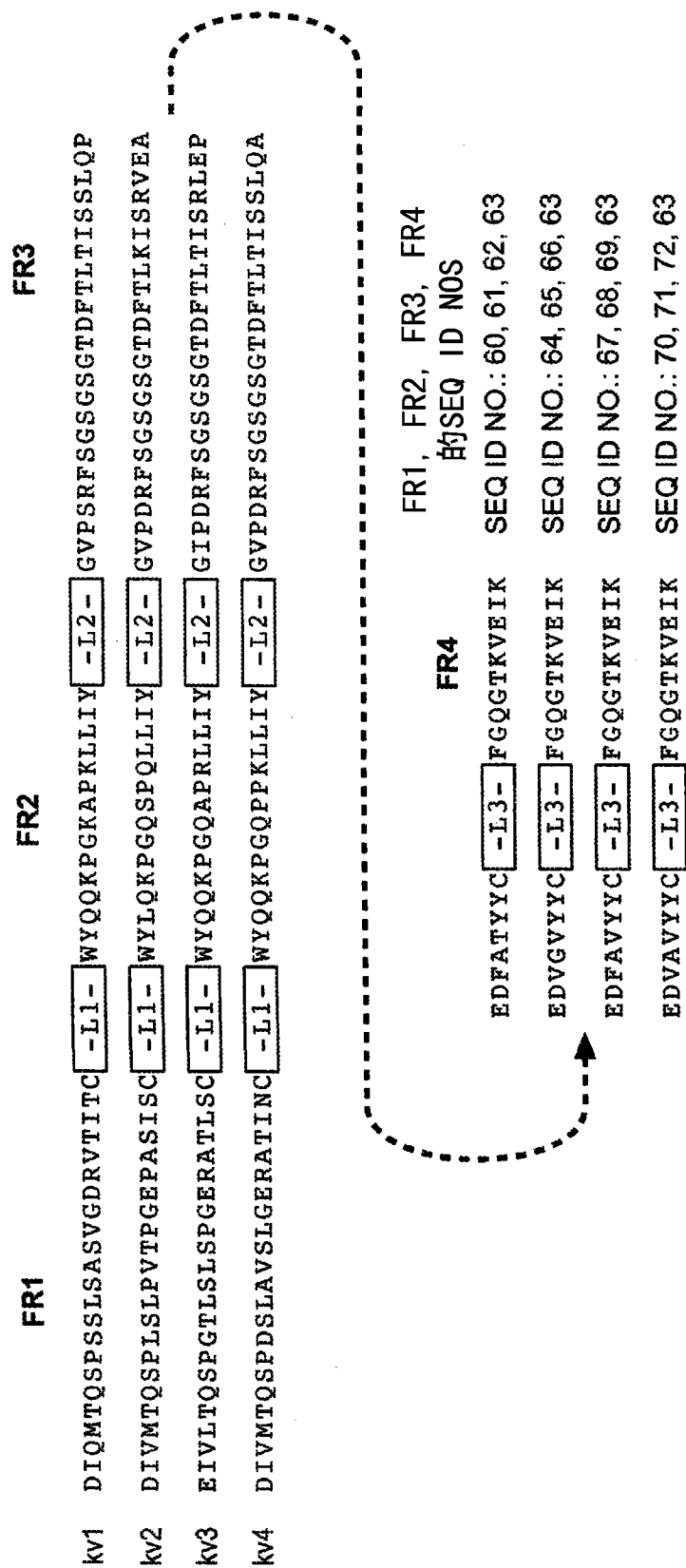


图 6

huMAb4D5-8轻链可变结构域的构架序列

- 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)

huMAb4D5-8重链可变结构域的构架序列

- 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)

图 7

在位置66和99(下划线的)修饰的huMAb4D5-8轻链可变结构域的构架序列

- 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)

在位置71、73和78(下划线的)修饰的huMAb4D5-8重链可变结构域的构架序列

- 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)

图 8

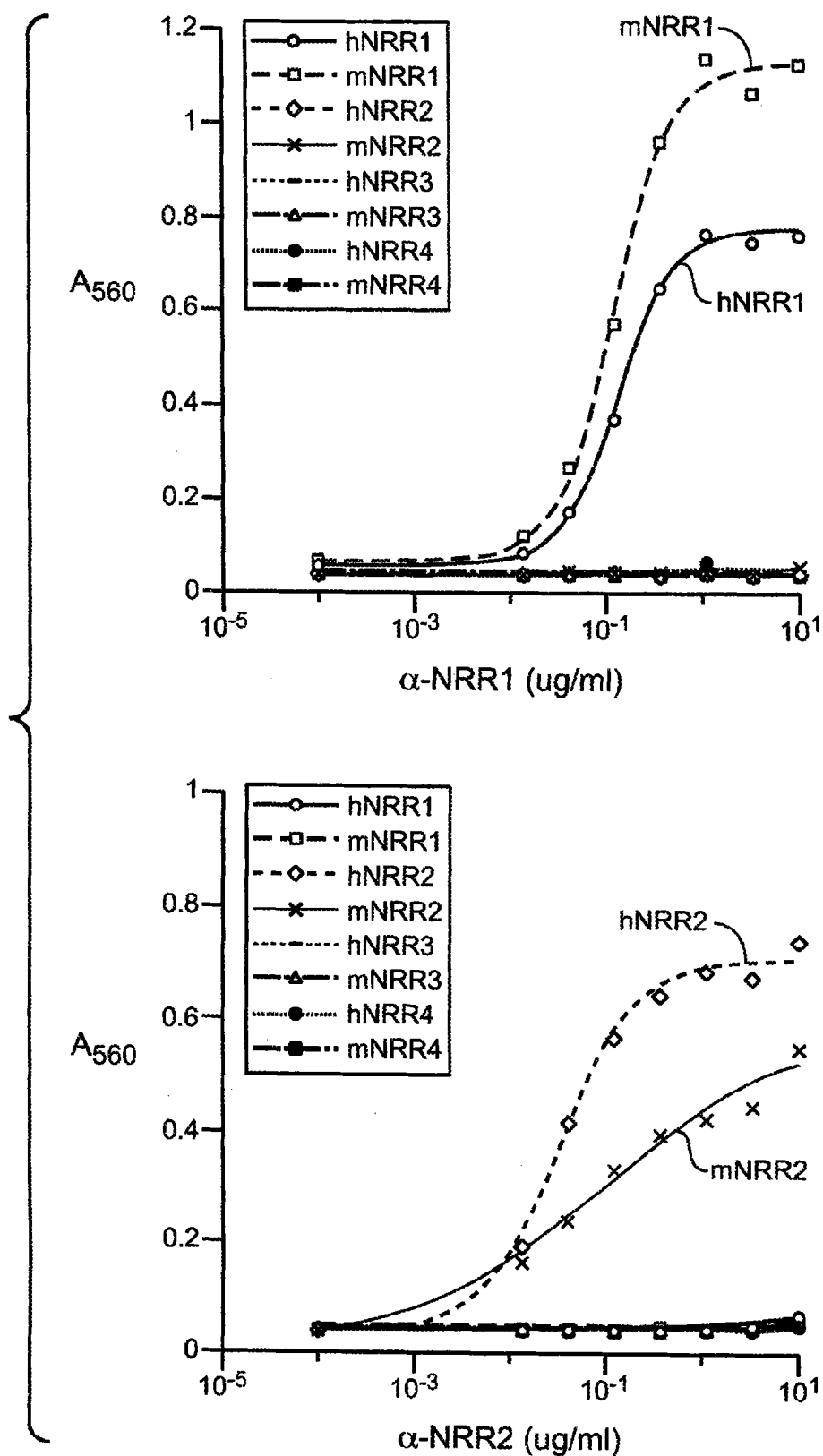


图 9A

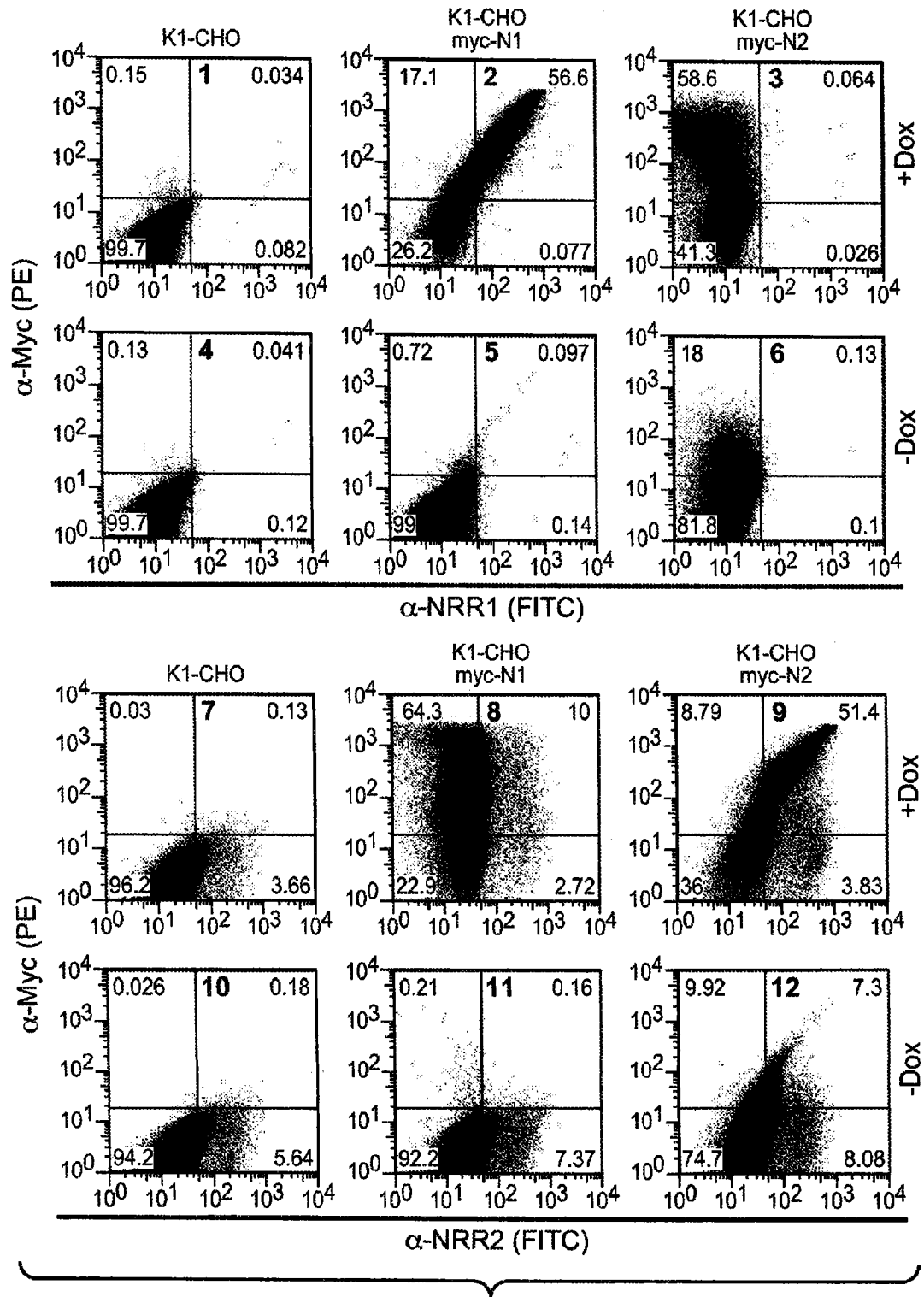


图 9B

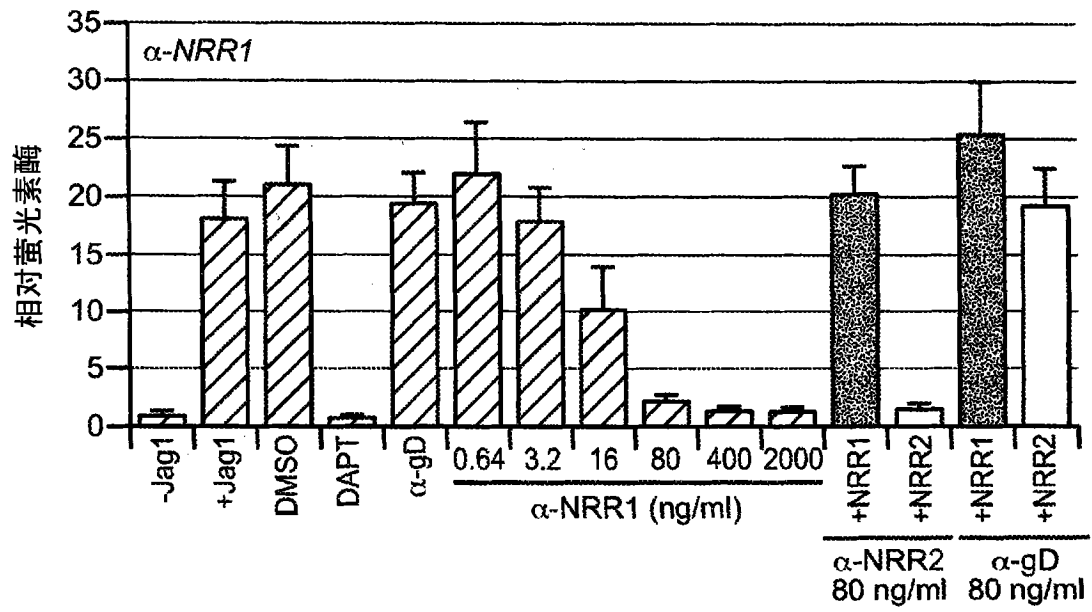


图 10A

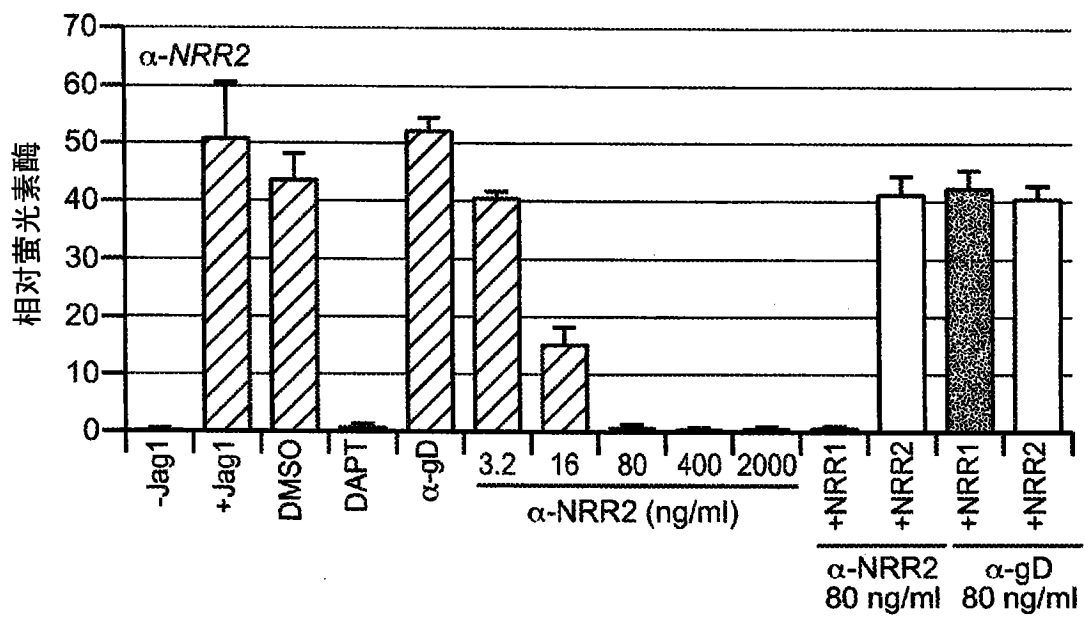


图 10B

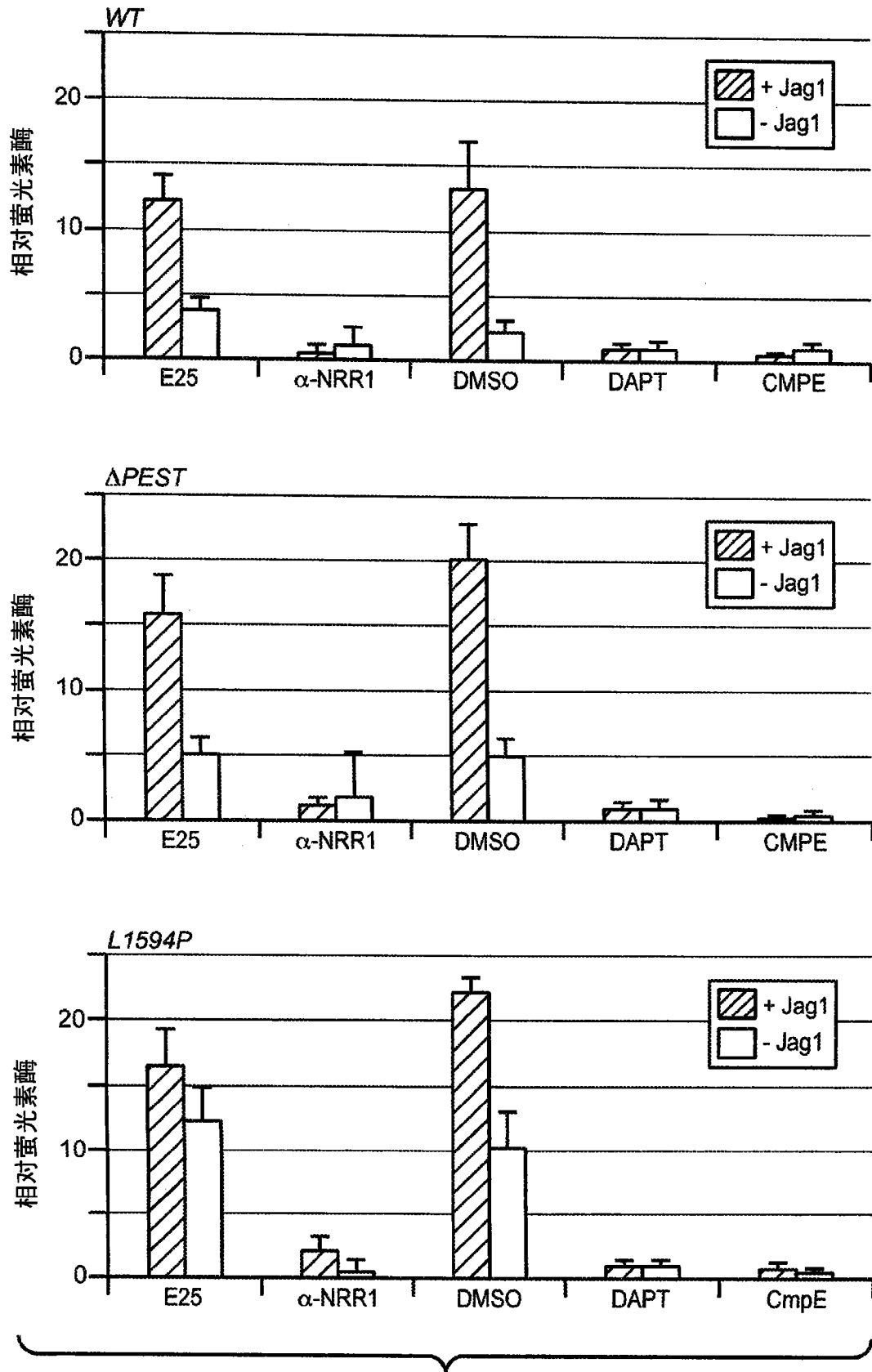


图 10C

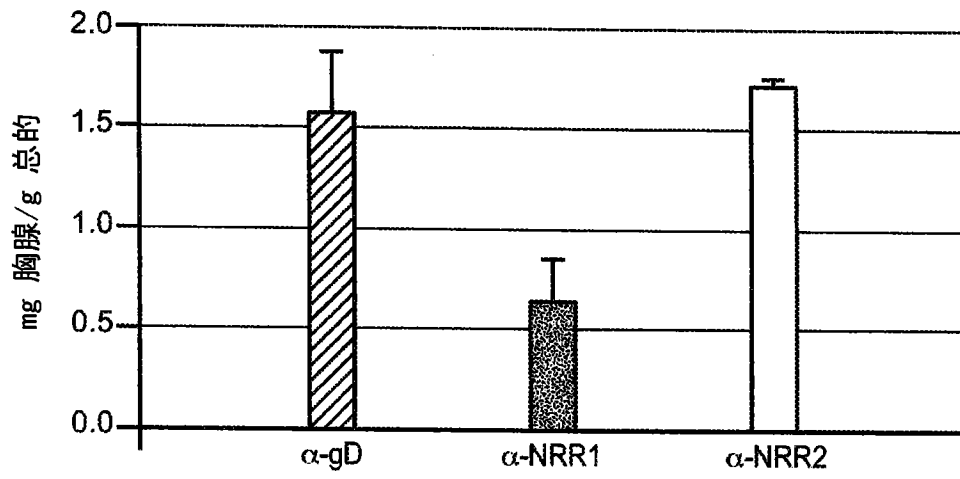


图 11A

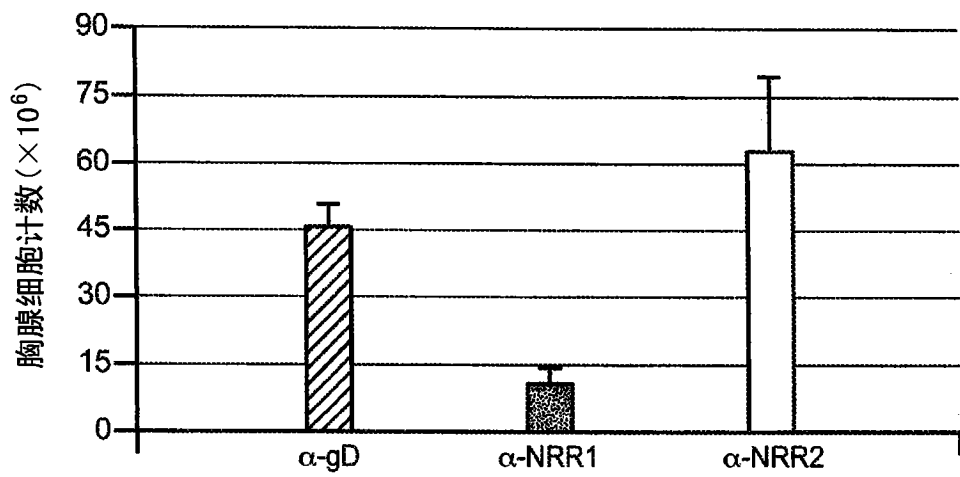


图 11B

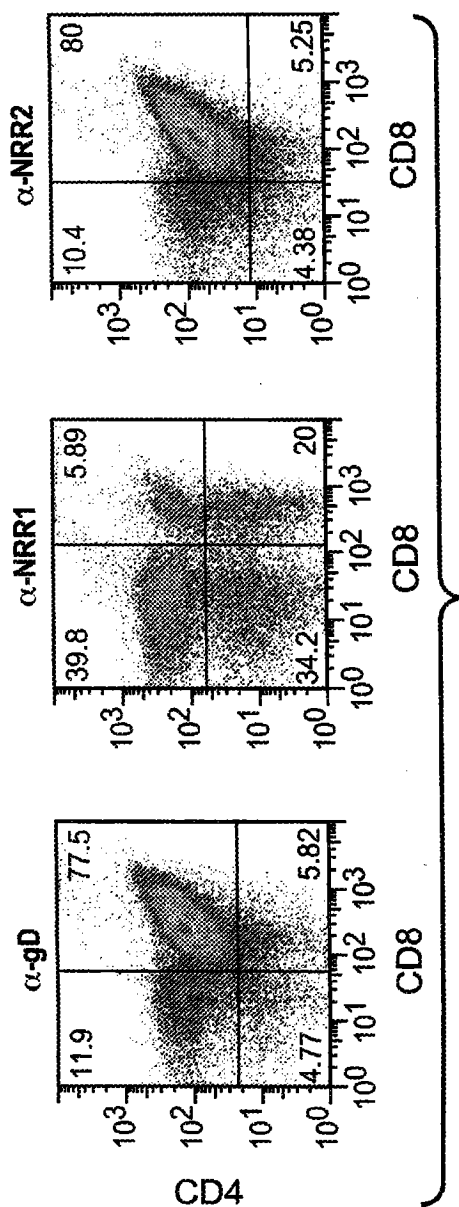


图 11C

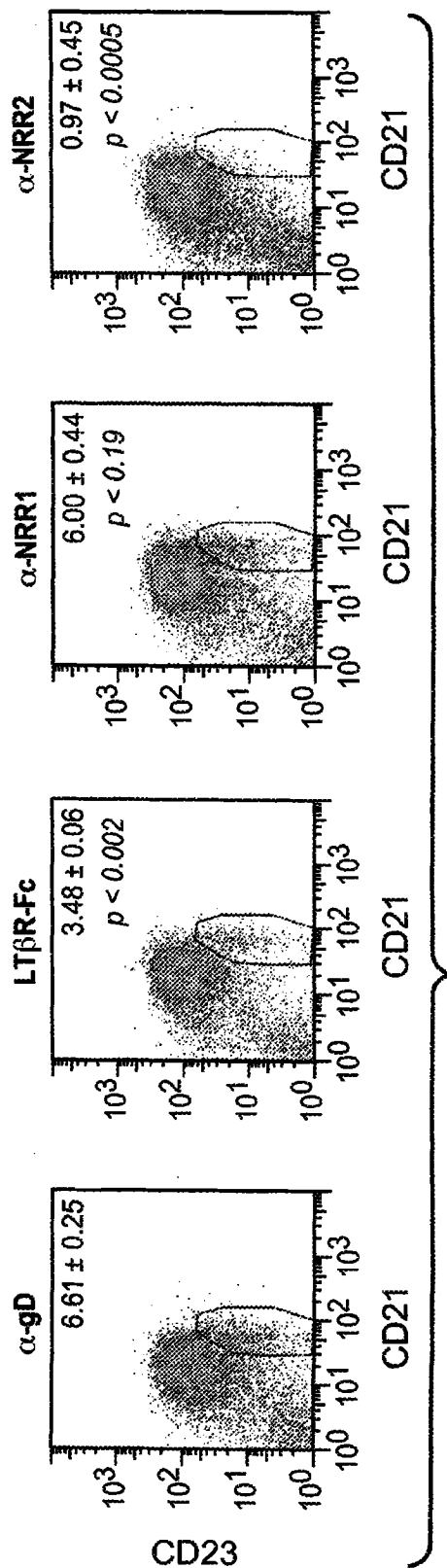


图 11D

嵌合AP蛋白	结合 α -NRR1	结合 α -NRR2	嵌合AP蛋白	结合 α -NRR1	结合 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			

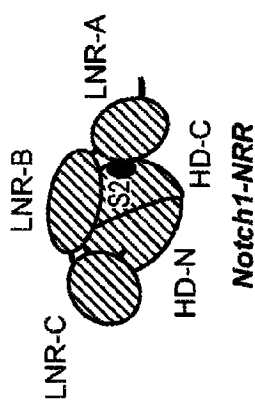
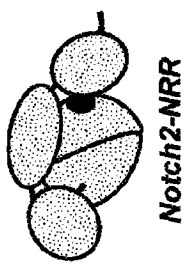



图 12A

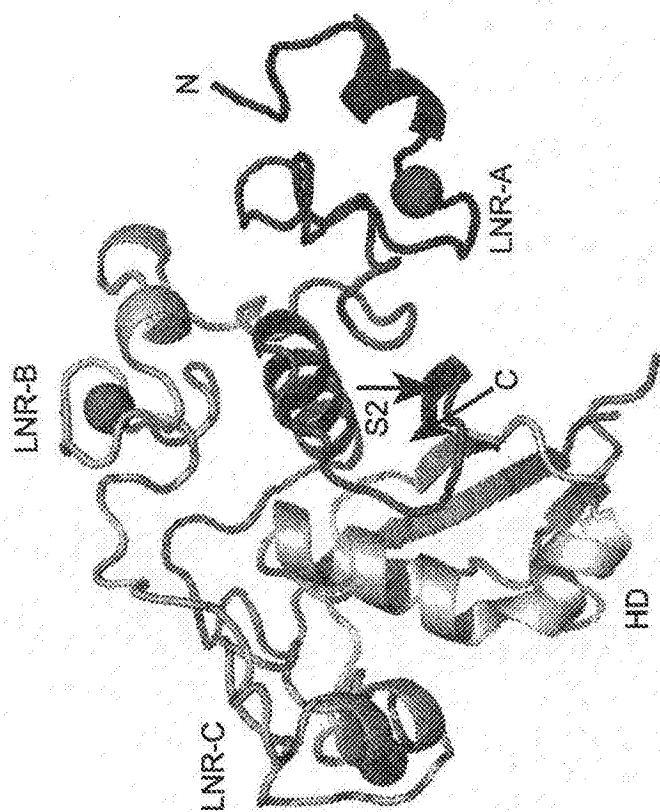


图 12B

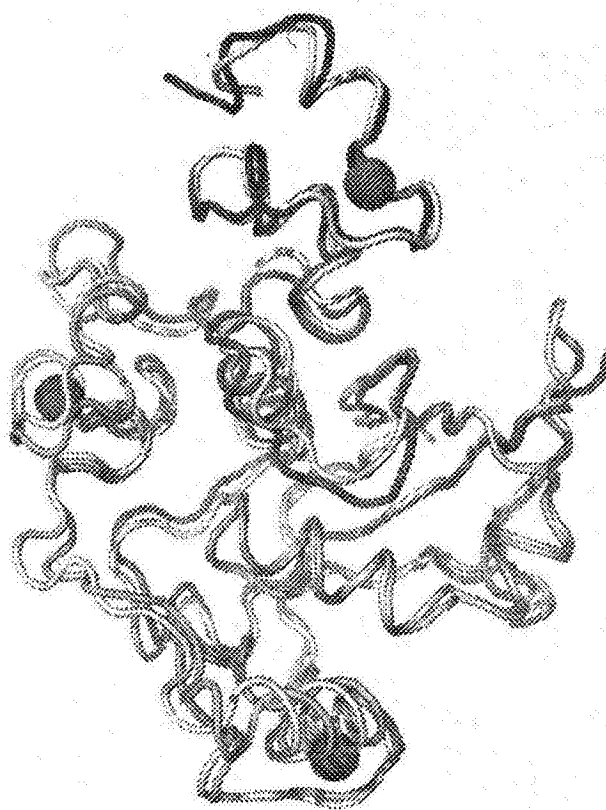


图 12C

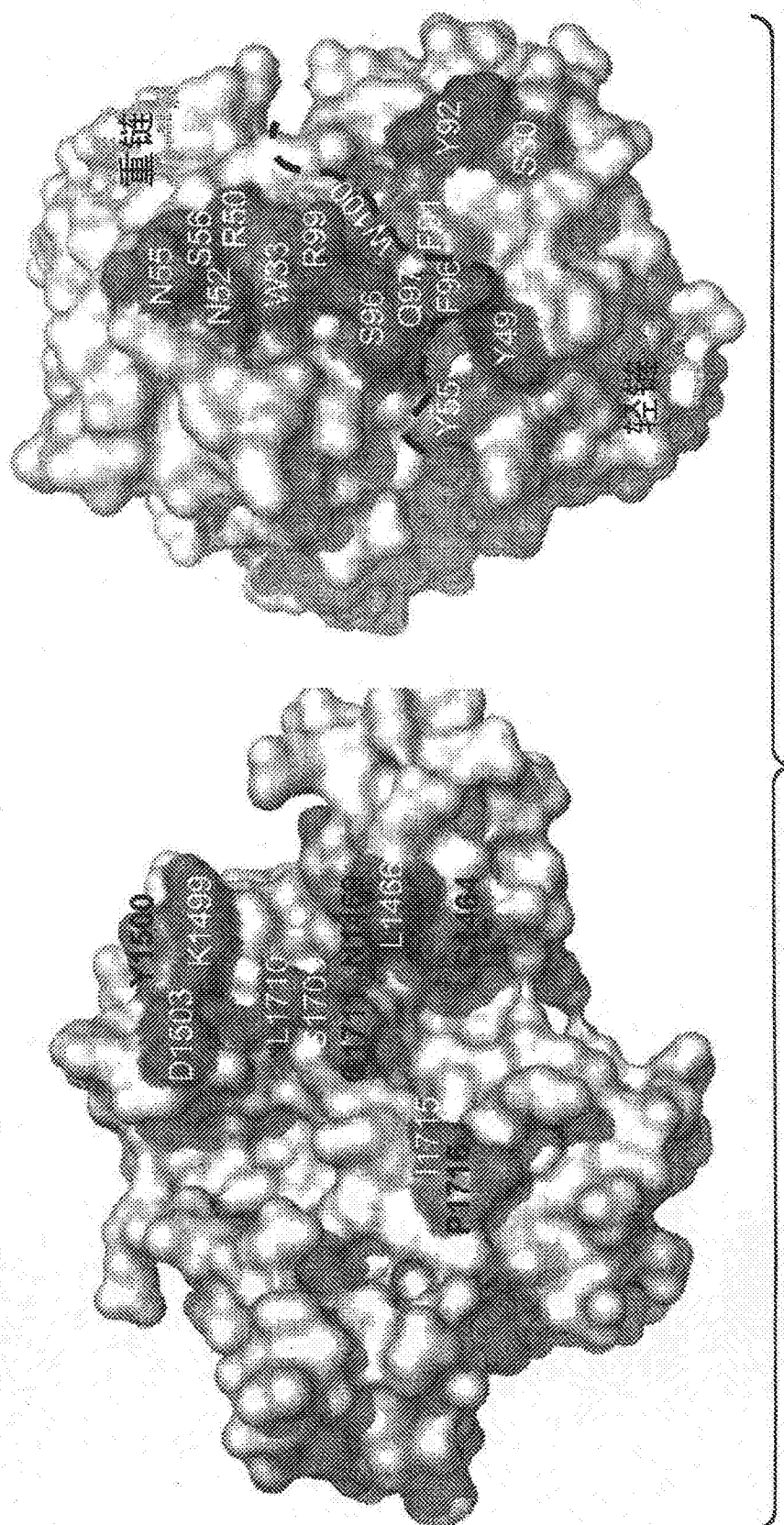


图 12D

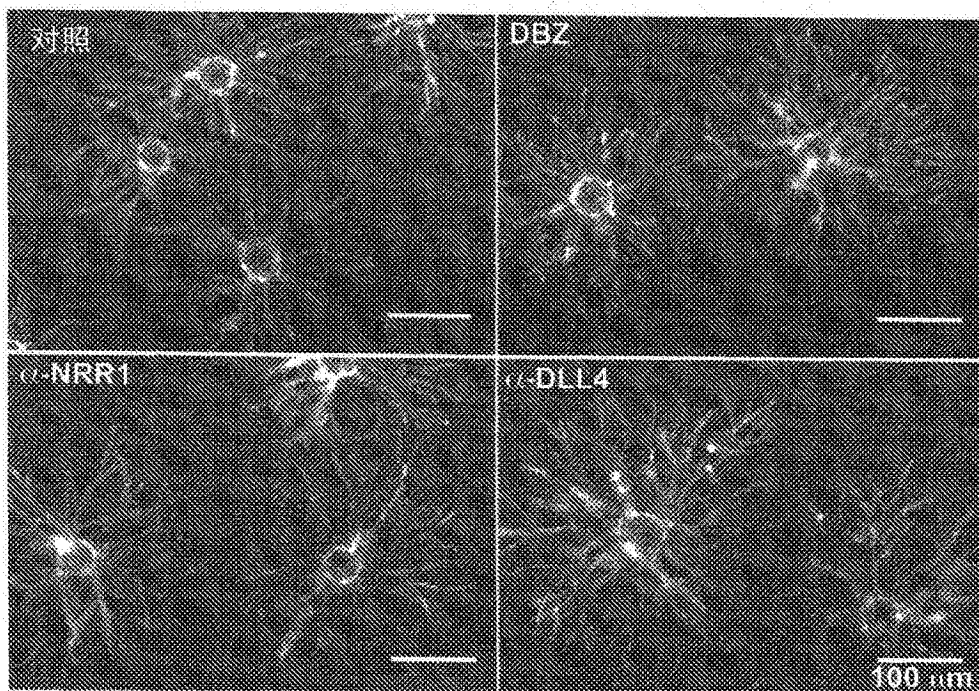


图 13A

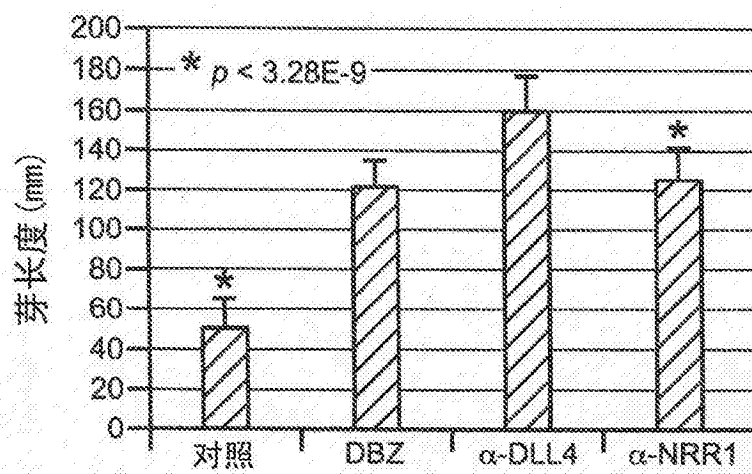


图 13B

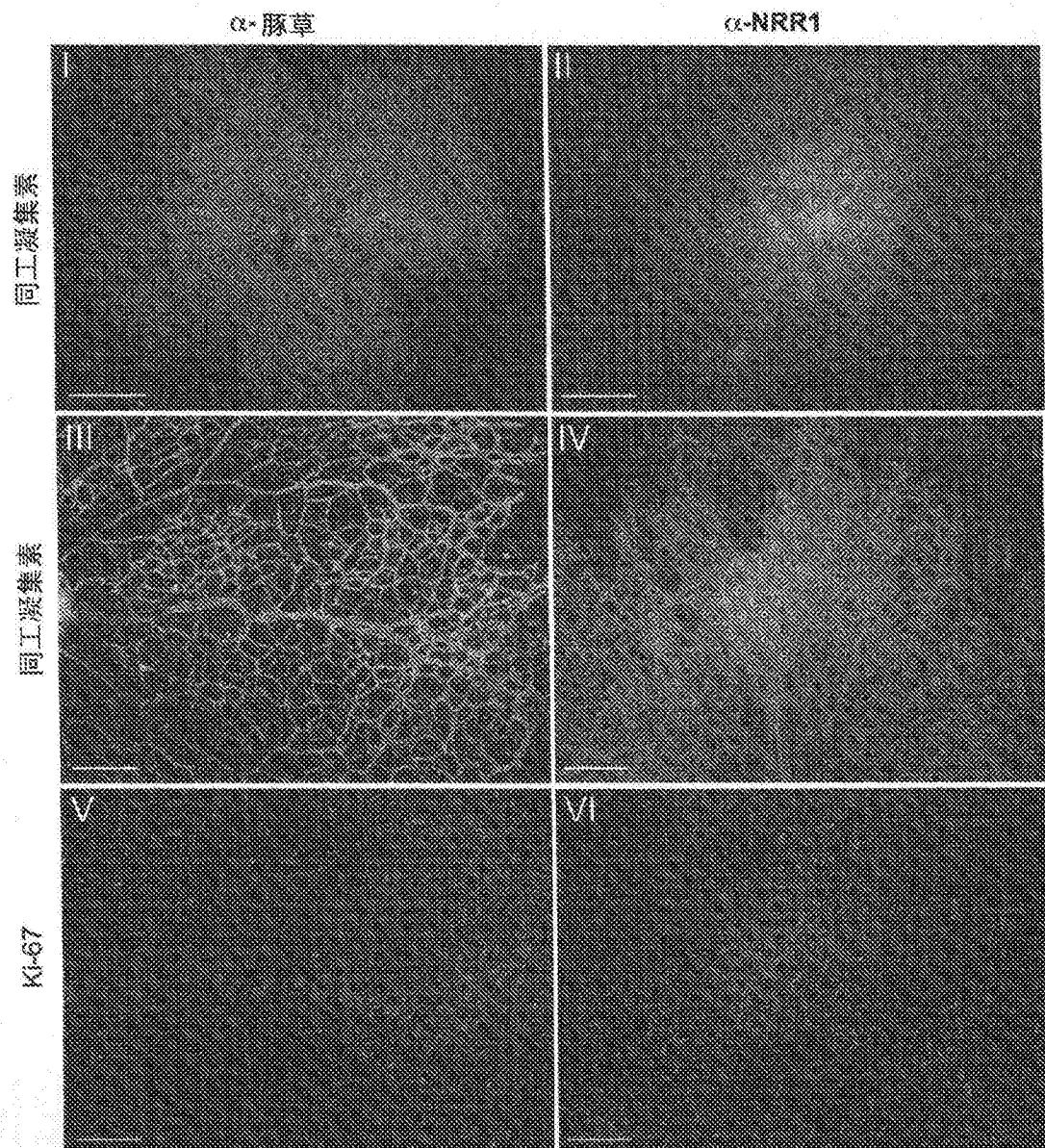


图 13C

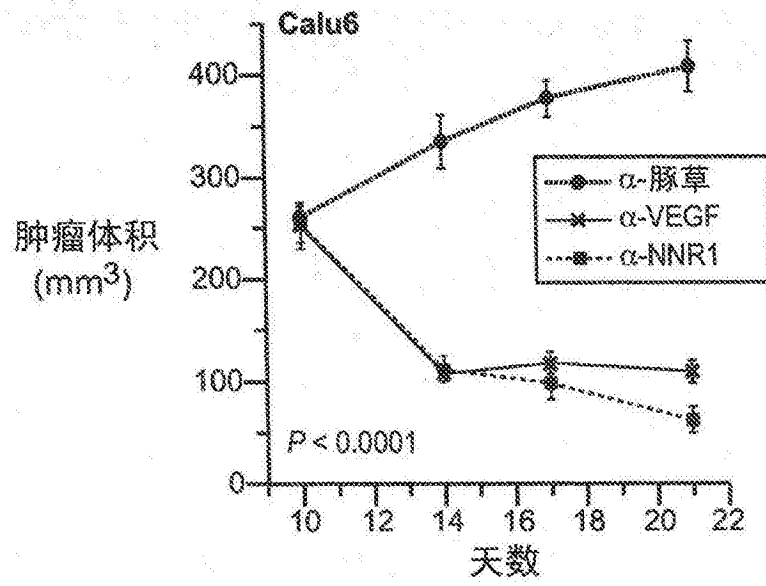


图 14A

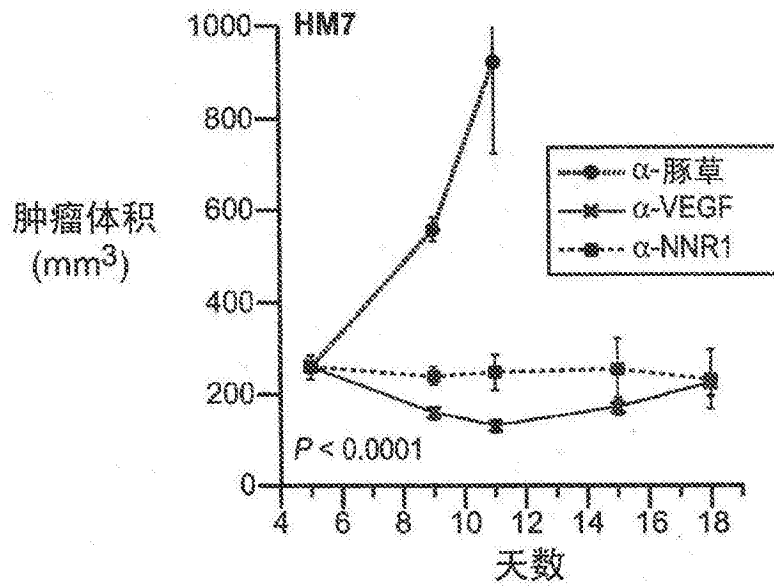


图 14B

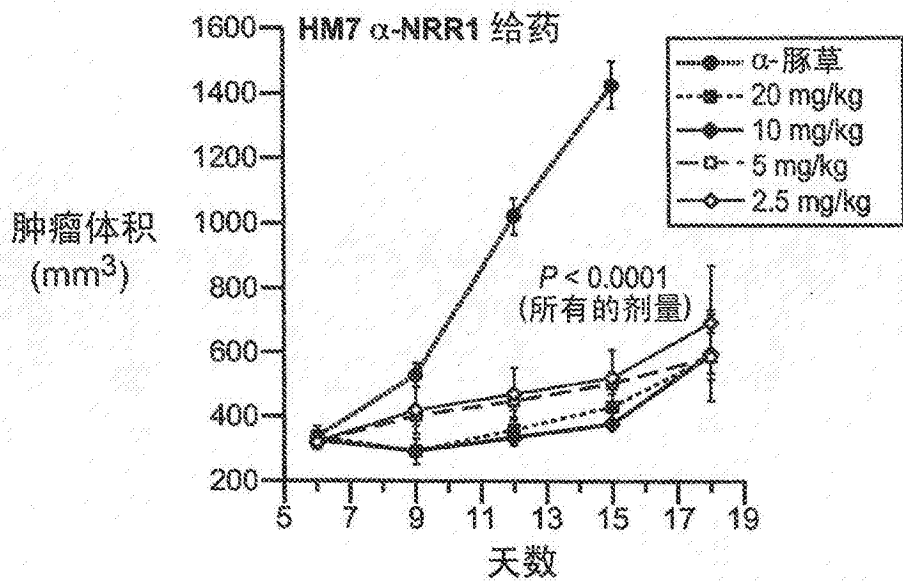


图 14C

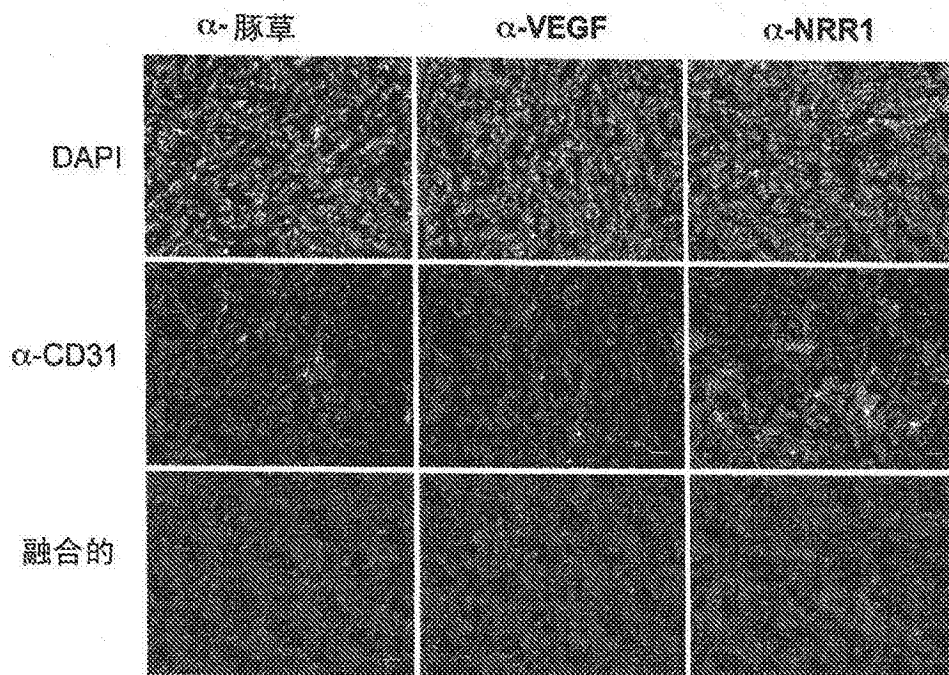


图 14D

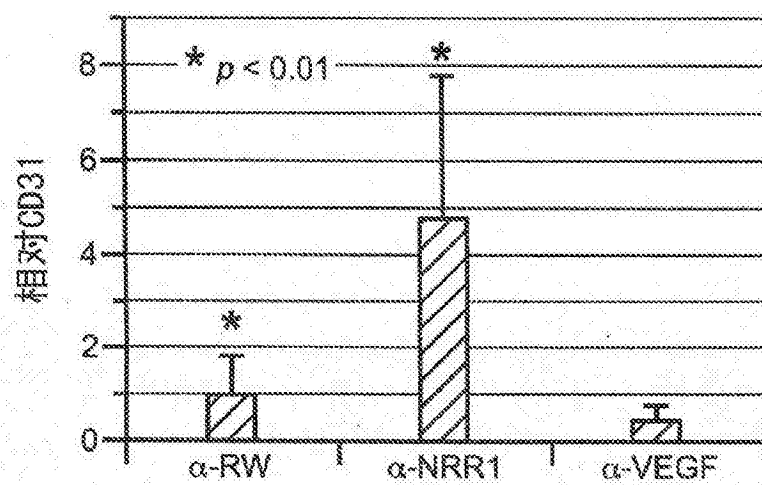


图 14E

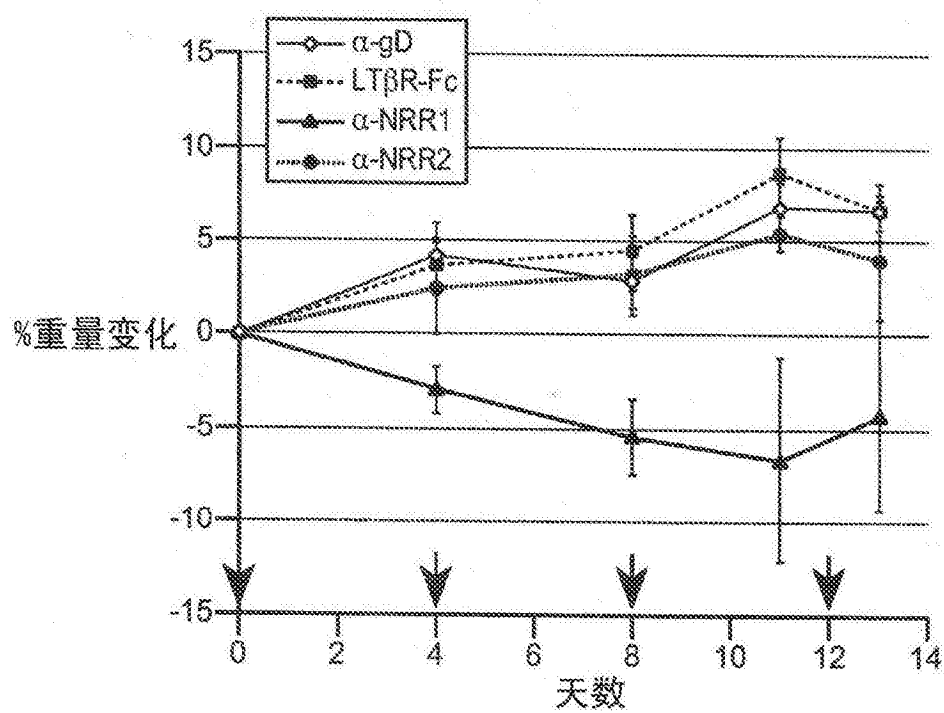


图 15A

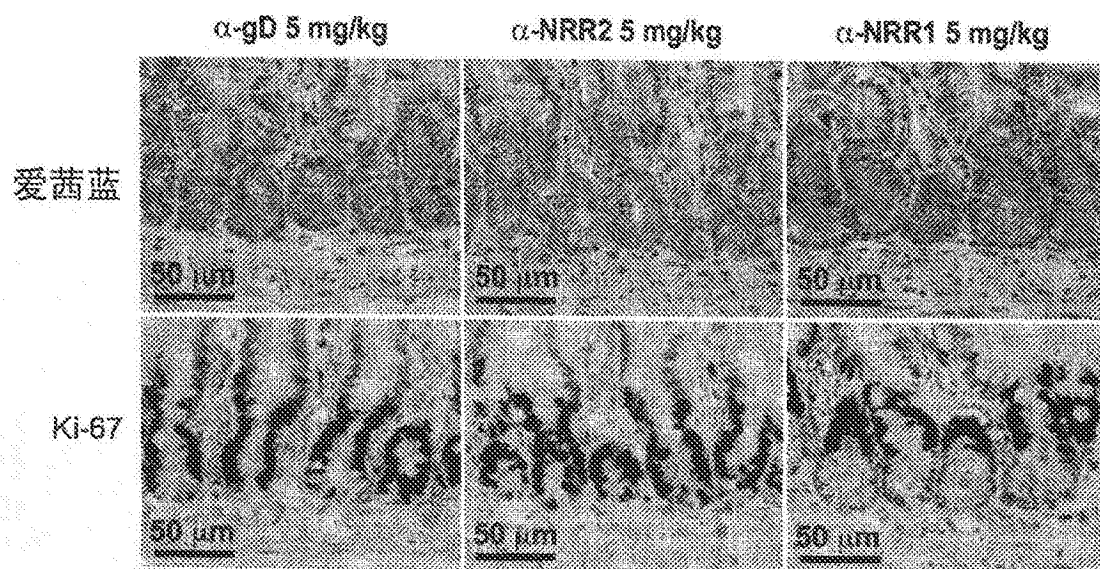


图 15C

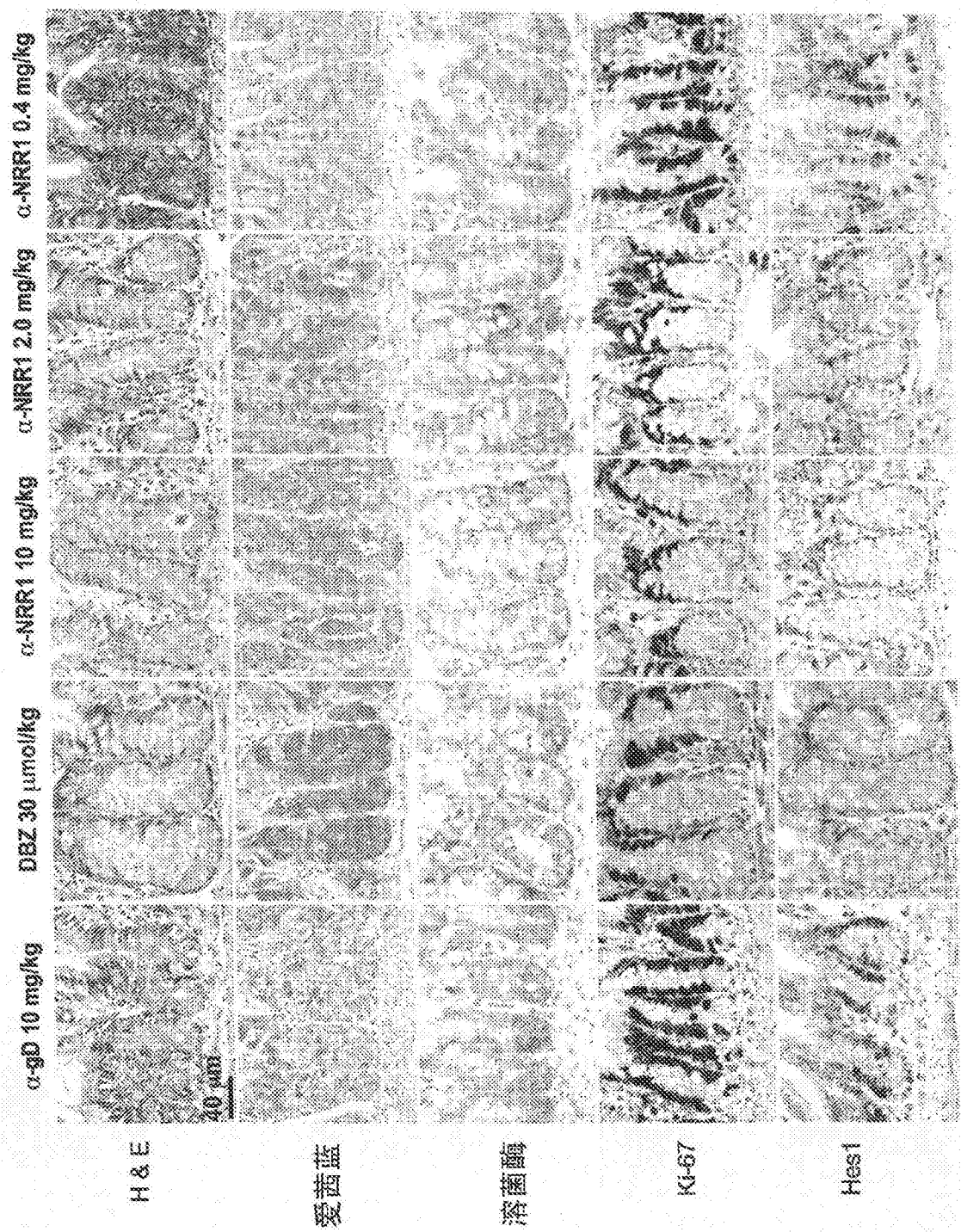


图 15B

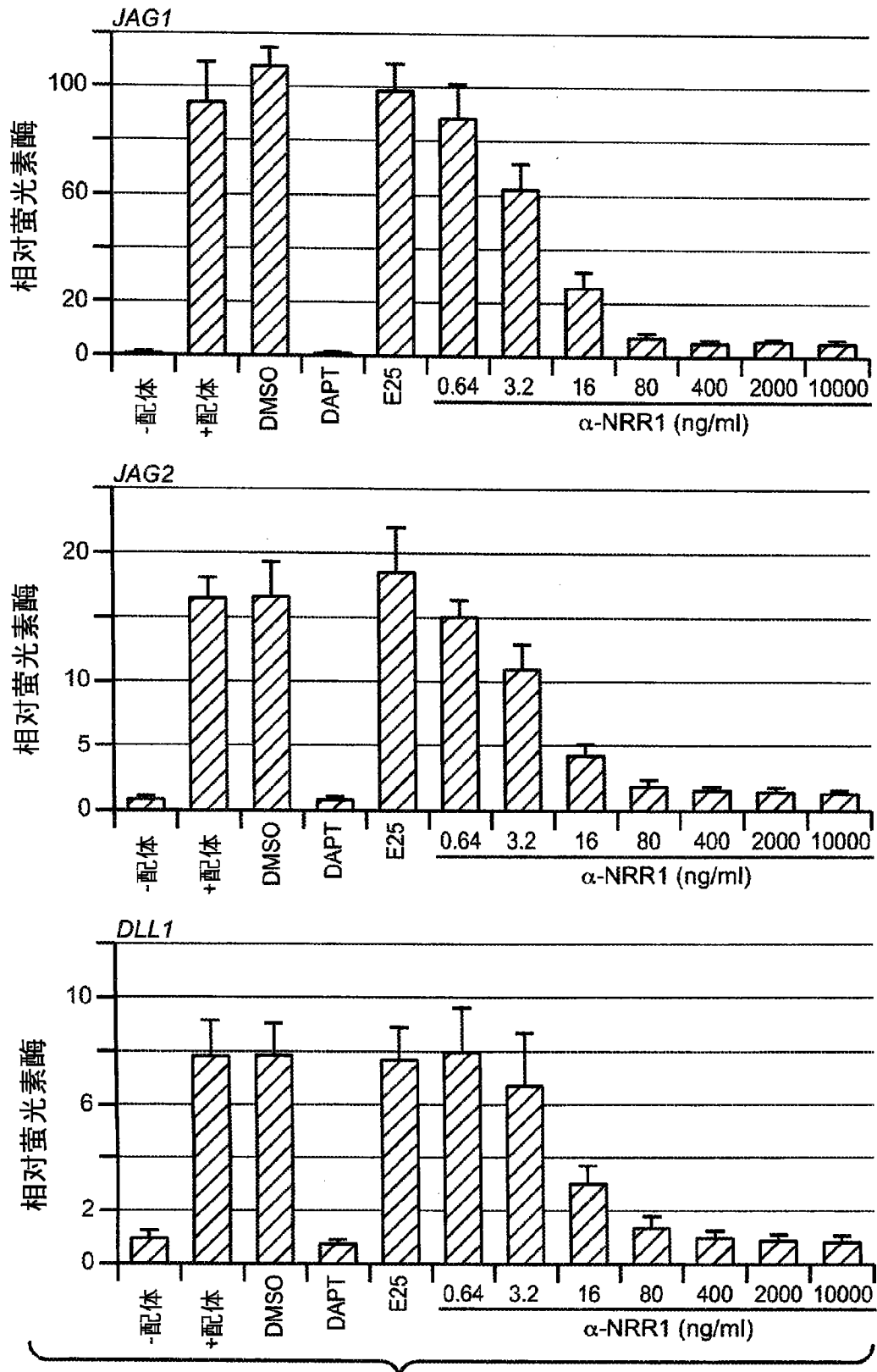


图 16

嵌合的AP蛋白	AP表达	结合 α -NRR1	结合 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

图 17

人 Notch1	E1447	EEACELPECEQEDAGNKVCSIQCMNHACGWDGGDCSLNFNDPWKN	N1490	LNR-A
小鼠 Notch1	E1446	EEACELPECEQVDAGNKVCNLSQCMNHACGWDGGDCSLNFNDPWKN	N1489	
人 Notch2	P1422	PATCLSQYCADKARDGVCDDEACMSHACQWDGGDCSLTMENPWAN	N1465	
小鼠 Notch2	P1420	PATCSQYCADKARDGICDEACMSHACQWDGGDCSLTMEDPWAN	N1463	
人 Notch1	C1491	CTQSLQCWKYFSDGHCHDSQCNSAGCLFDGFDCCQRAEGQ	Q1528	LNR-B
小鼠 Notch1	C1490	CTQSLQCWKYFSDGHCHDSQCNSAGCLFDGFDCLTEGQ	Q1527	
人 Notch2	C1466	CSSPLPCWDYI-INNOCDDELNTVECLFDNFECQGNST	T1502	
小鼠 Notch2	C1464	CTSTLRCWEYI-INNOCDDELNTVECLFDNFECQGNST	T1500	
人 Notch1	C1529	CNPLYDQYCKDHFSDFSDGHCHDSQCNSAECEWDGLDC	C1562	LNR-C
小鼠 Notch1	C1528	CNPLYDQYCKDHFSDFSDGHCHDSQCNSAECEWDGLDC	C1561	
人 Notch2	C1503	CK--YDKYCADHFKDNHCDQGCNSEECGWDGLDC	C1534	
小鼠 Notch2	C1501	CK--YDKYCADHFKDNHCDQGCNSEECGWDGLDC	C1532	
人 Notch1	A1563	A-EHVPERLAAGTLVVVVLMPPEQLRNSSFFHLREL	SVLHTNVVFKRDAHG	
小鼠 Notch1	A1562	A-EHVPERLAAGTLVLVLLPPDQLRNNSFFHLREL	SVLHTNVVFKRDAQG	
人 Notch2	A1535	AAD-QPENLAEGTLVIIVLLMPPEQLLQDARSFLRALGTL	LLHTNLRIKRDSQG	
小鼠 Notch2	A1533	ASD-QPENLAEGTLIIIVLLMPPEQLLQDARSFLRALGTL	LLHTNLRIKQDSQG	HD-N
		QQMIFFYYGHEEELRKHPIKRAAEGWAA	PDALLQGVKASLLPGGSEGGRRRR	R1665
		QQMIFFYYGHEEELRKHPIKRRSTVGWAT	-----SSLLPGTS-GGRQRR	R1654
		ELMVYPYFGEKSAAMKKQRM	-----TRR	R1608
		ALMVYPYFGEKSAAMKKQKM	-----TRR	R1606
人 Notch1	E1666	-----ELDPMDVRSIVYLEIDNRQCVQASSQCFSATD	-VAAFGLGALASL-	HD-C
小鼠 Notch1	E1665	-----ELDPMDIRGSIVYLEIDNRQCVQSSSQCFQSATD	-VAAFGLGALASL-	
人 Notch2	S1609	SLP--GEQEQEVAGSKVFLEIDNRQCVQDSDHCFKN	-TDAAAALL-ASHAIQ	
小鼠 Notch2	S1607	SLPEEQEQEVIGSKIFLEIDNRQCVQDSDQCFKN	-TDAAAALL-ASHAIQ	
		GSLNIPYKIEAVQSETEVEPPPPAQ	Q1734	
		GSLNIPYKIEAVKSEPEVEPLPSQ	Q1723	
		GTLSYP--LVSVVSESL-TPERTQ	Q1677	
		GTLSYP--LVSVVFSE-LESRRNAQ	Q1677	

S2

图 18

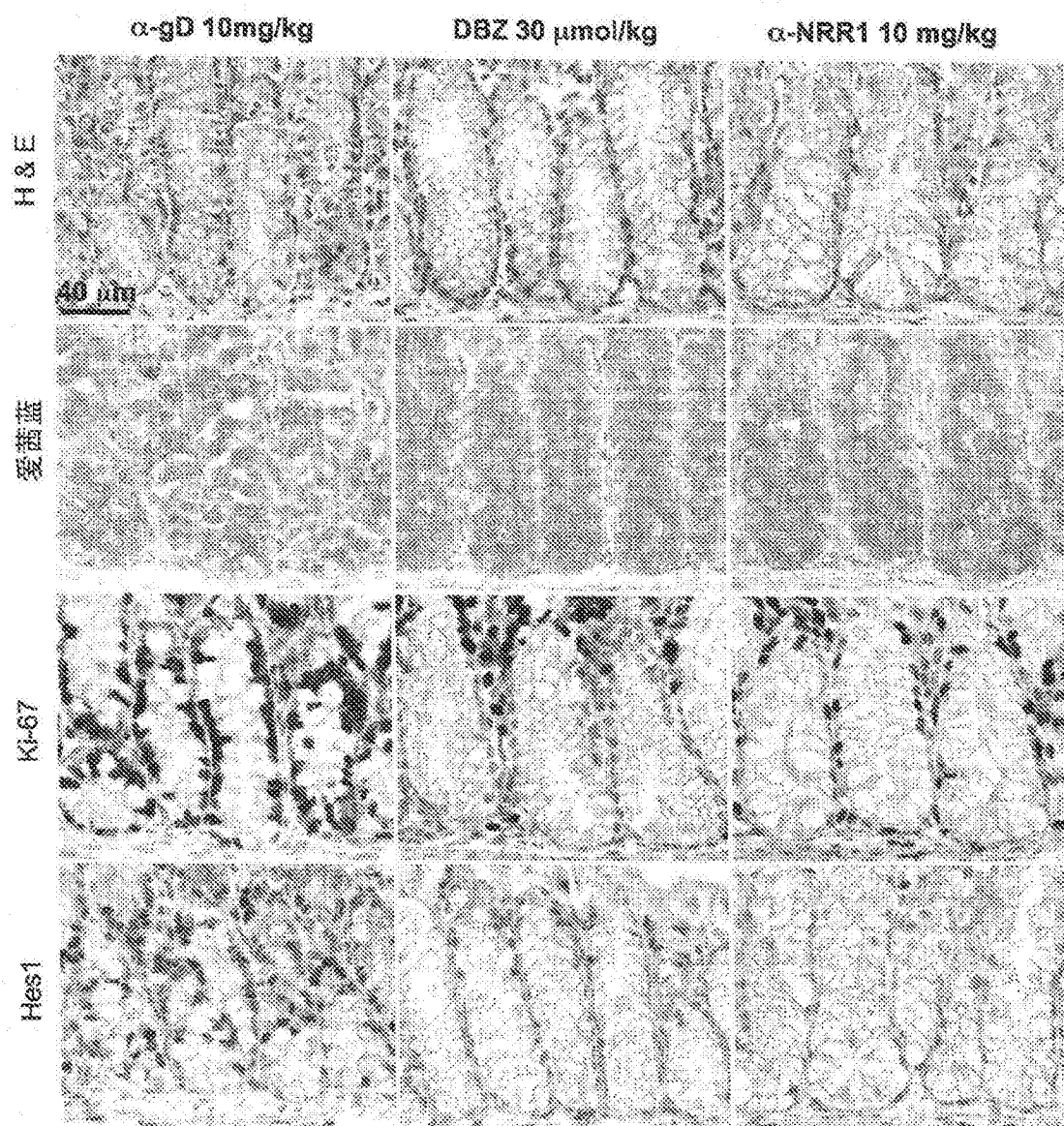


图 19

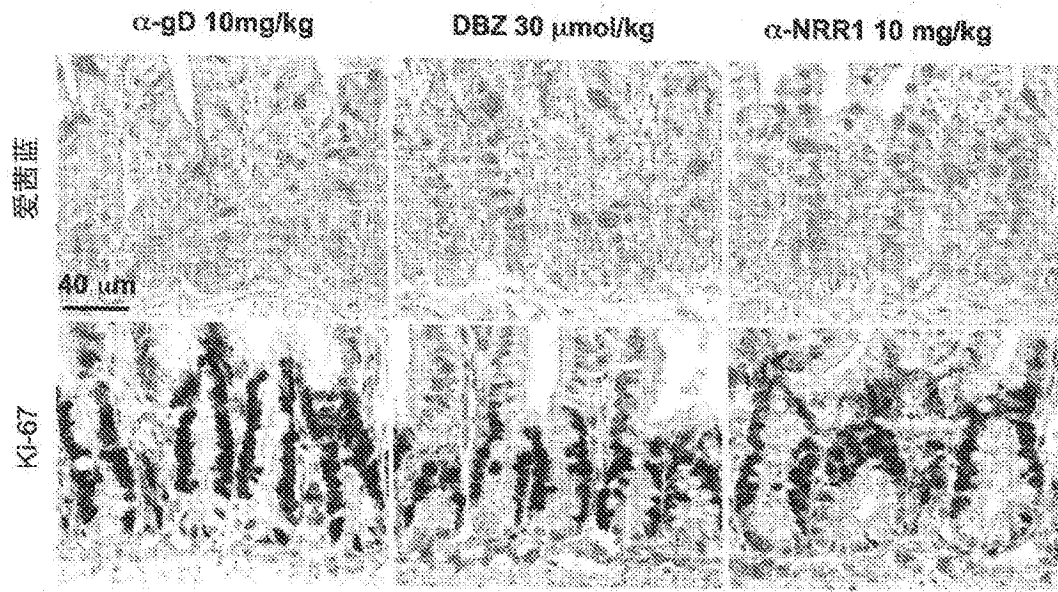


图 20

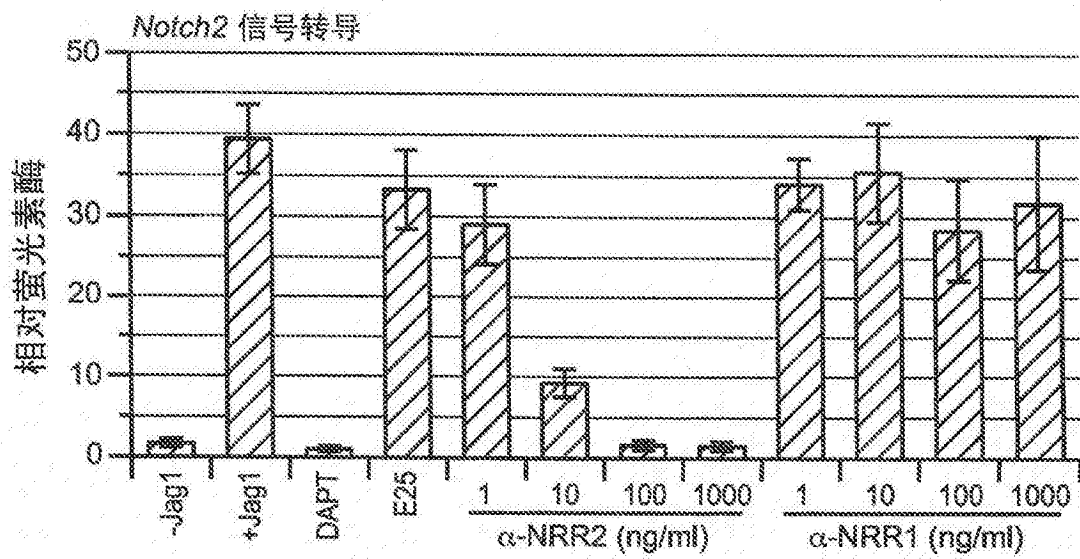


图 21

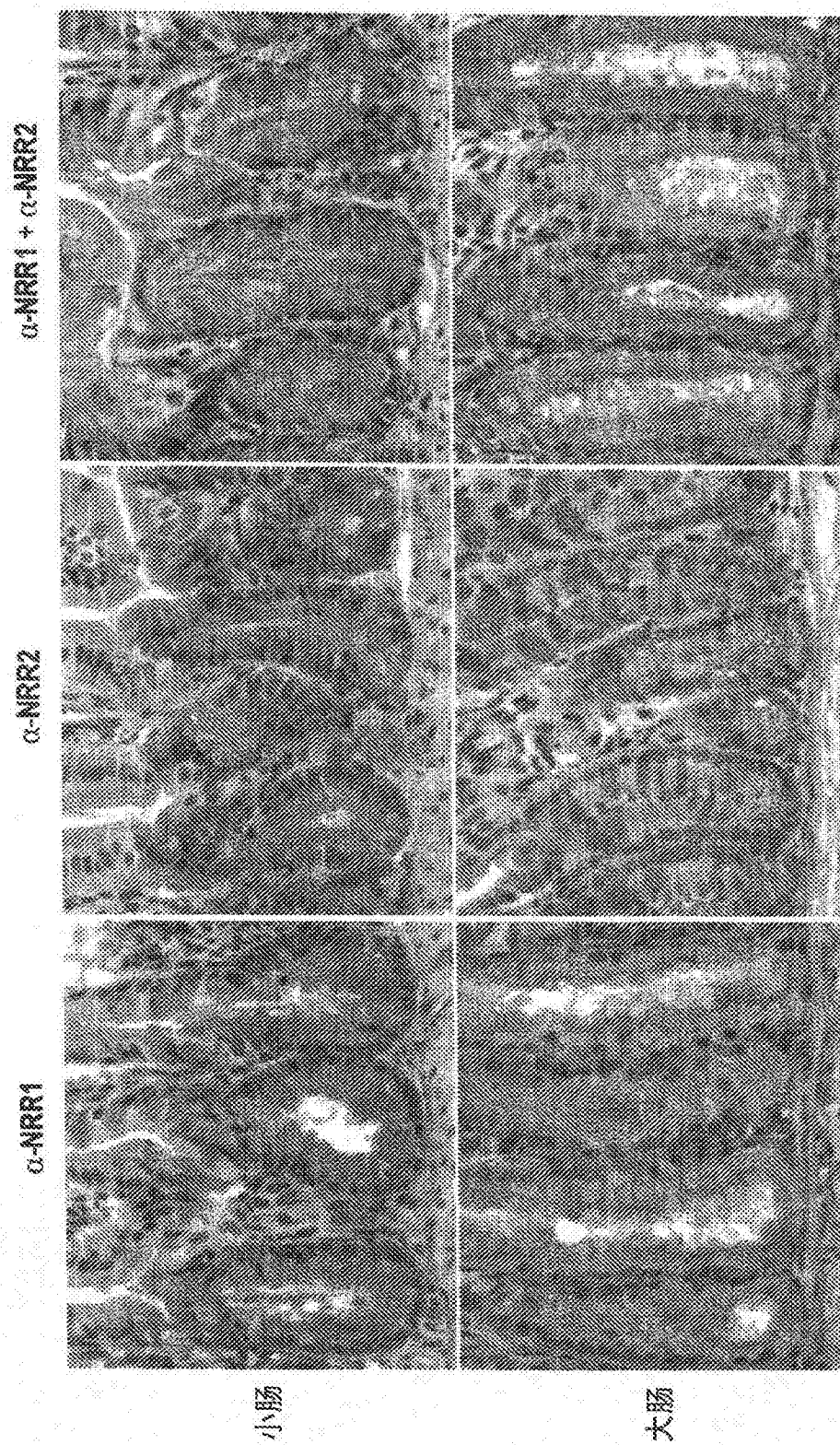


图 22

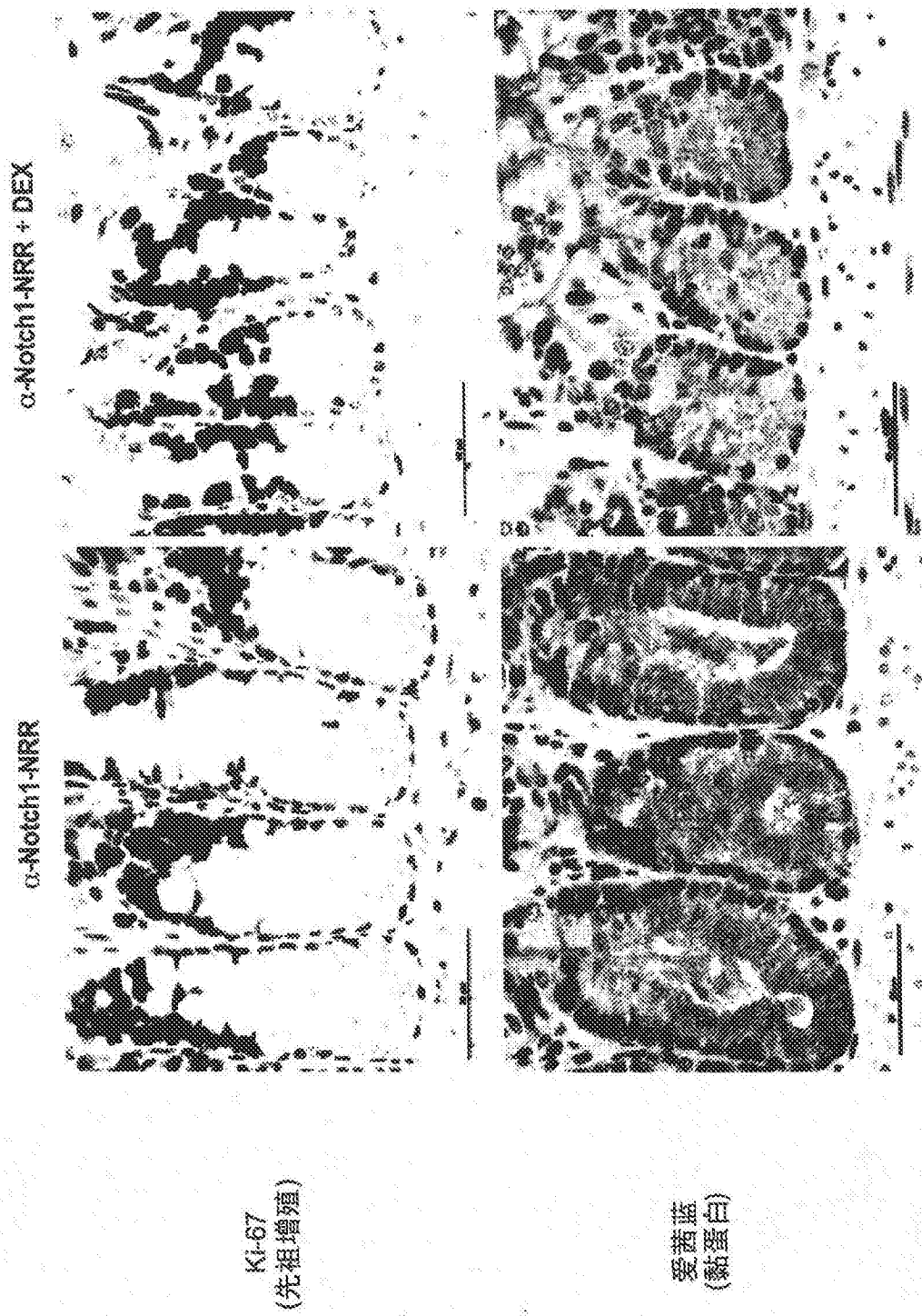


图 23

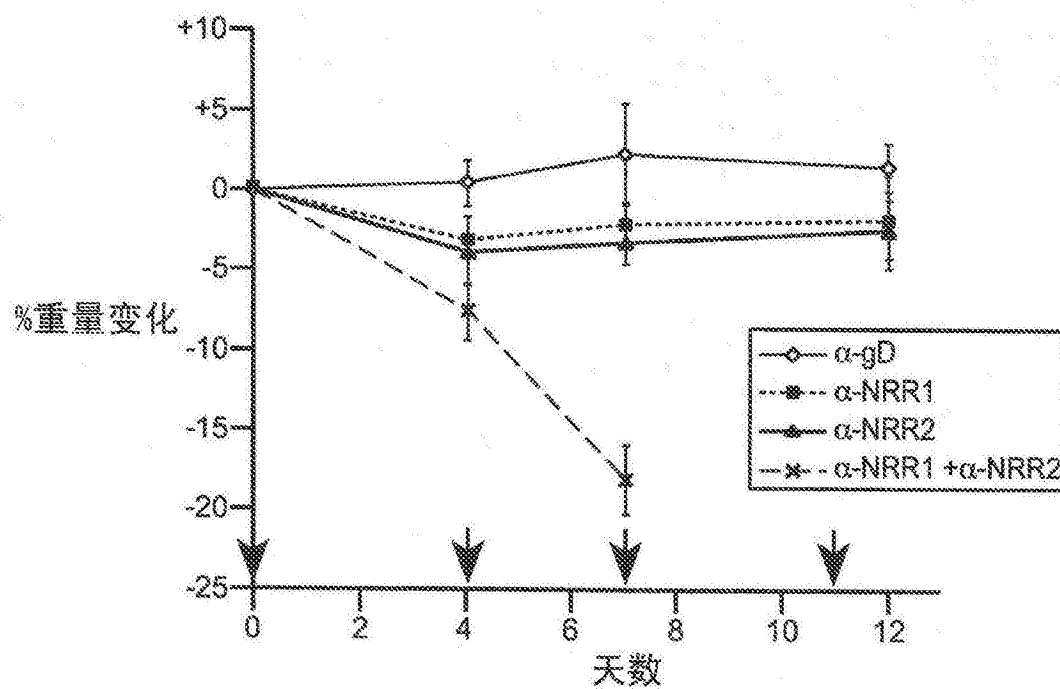


图 24A

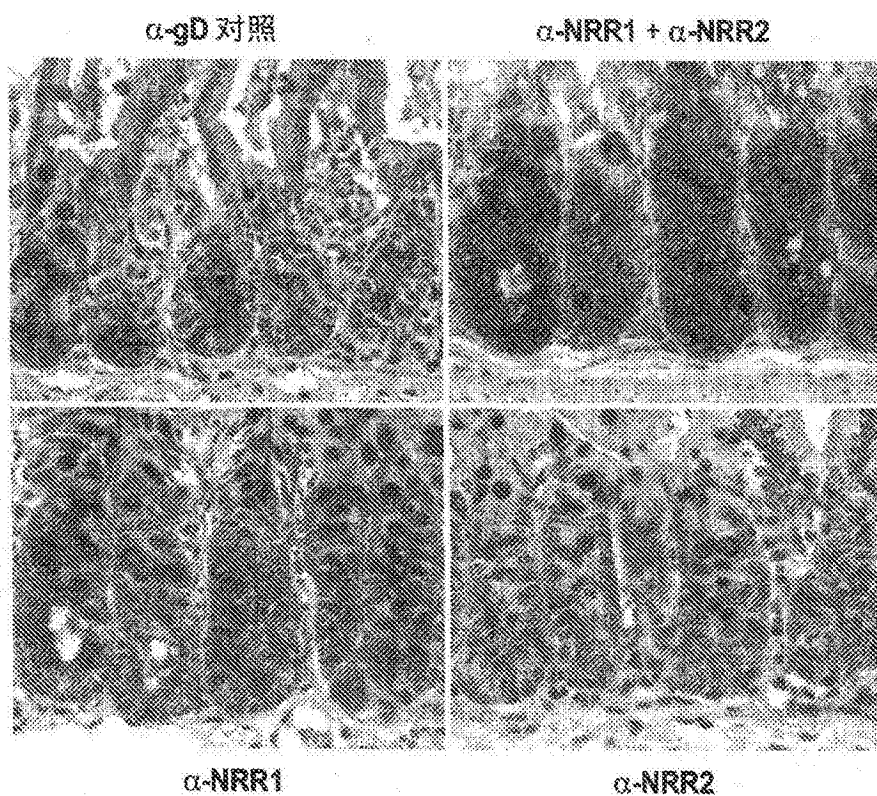


图 24B

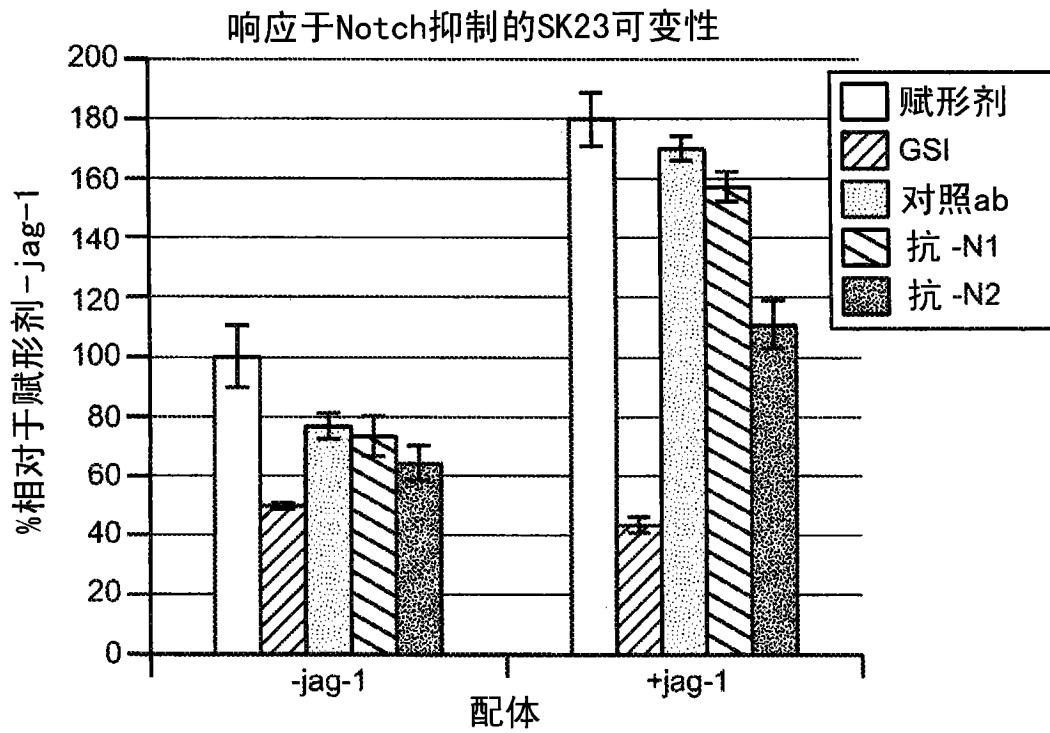


图 25A

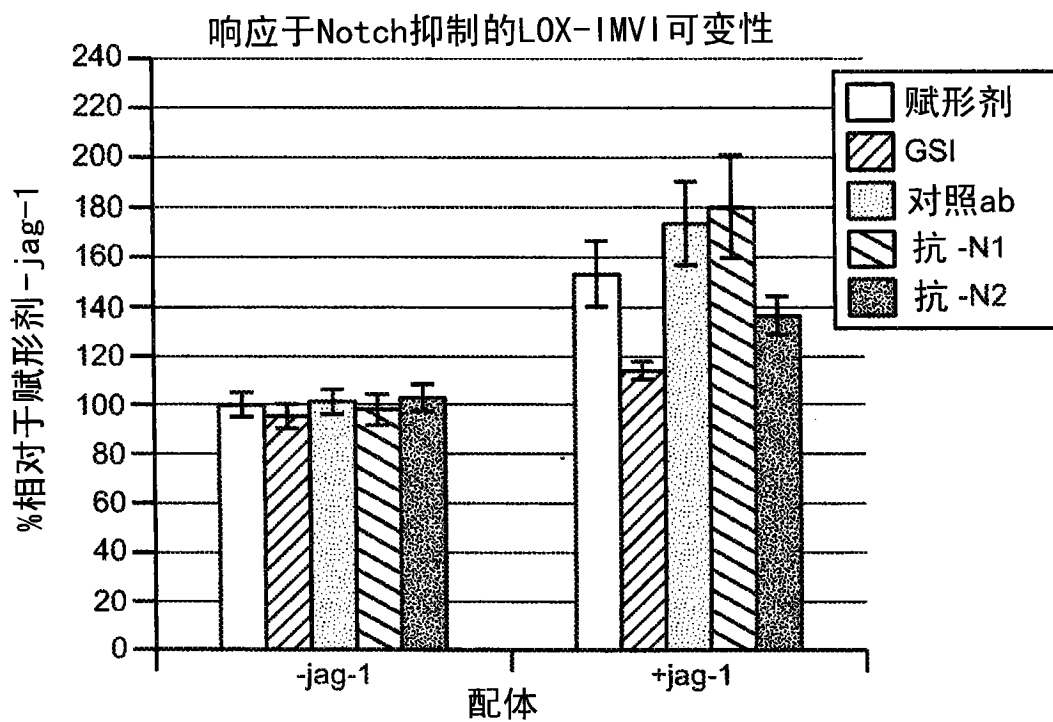


图 25B

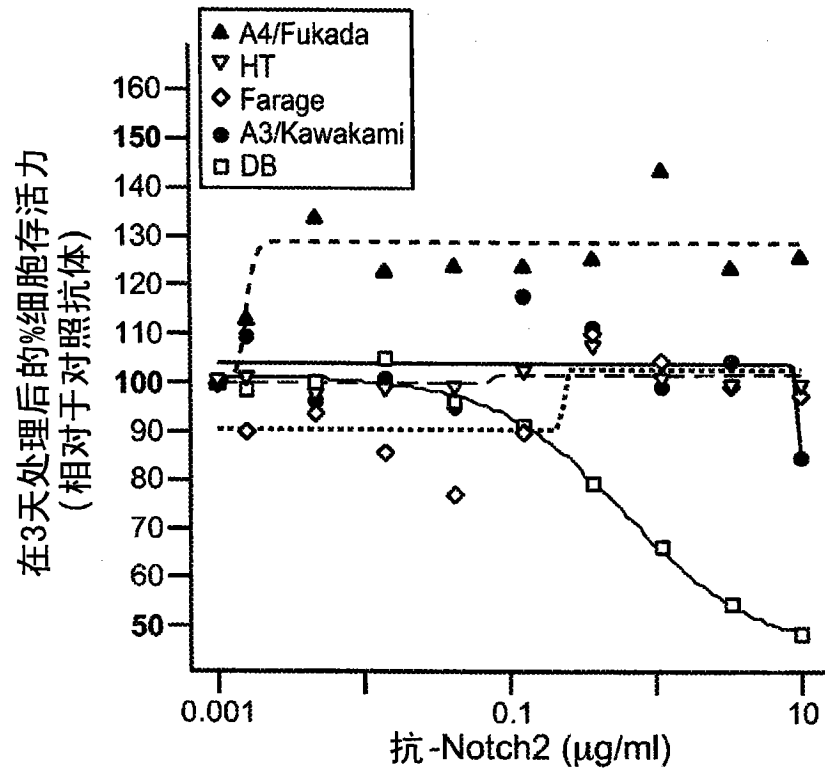


图 26

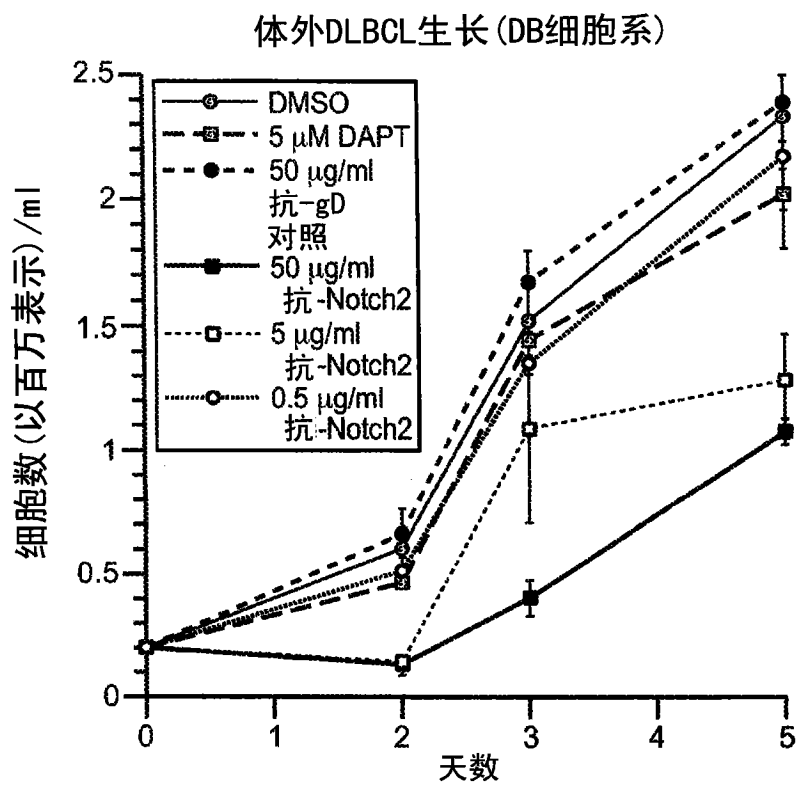


图 27