



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **101671** (13) **C2**
(51) МПК (2013.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

<p>(21) Номер заявки: а 2011 01441</p> <p>(22) Дата подання заявки: 08.07.2009</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 25.04.2013</p> <p>(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 61/079,095, 61/112,701, 61/112,699</p> <p>(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 08.07.2008, 07.11.2008, 07.11.2008</p> <p>(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: US, US, US</p> <p>(41) Публікація відомостей про заявку: 12.03.2012, Бюл.№ 5</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.04.2013, Бюл.№ 8</p> <p>(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: PCT/US2009/003994, 08.07.2009</p>	<p>(72) Винахідник(и): Герні Остін Л. (US), Геуй Тімоті Чарльз (US), Хтун ван дер Хорст Едвард Тайн (US), Сато Аарон Кен (US), Лю Юань Чінг (US), Брунс Морін Фітч (US), Льюїкі Джон А. (US)</p> <p>(73) Власник(и): ОНКОМЕД ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ІНК., 800 Chesapeake Drive, Redwood City, CA 94063, United States of America (US)</p> <p>(74) Представник: Міхашина Людмила Михайлівна, реєстр. №14</p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: US 20080131434 A1, 05.06.2008 US 20060030694 A1, 09.02.2006 WO 2007/145840 A2, 21.12.2007 WO 2008/076960 A2, 26.06.2008 LI KANG ET AL: "Modulation of Notch signaling by antibodies specific for the extracellular negative regulatory region of NOTCH3", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, THE AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, INC, US, vol. 283, no. 12, 21 March 2008 (2008-03-21), pages 8046-8054, XP002481515 JURYNCZYK MACIEJ ET AL: "Notch3 inhibition in myelin-reactive T cells down-regulates protein kinase C theta and attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis", JOURNAL OF IMMUNOLOGY, AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGISTS, US, vol. 180, no. 4, 15 February 2008 (2008-02-15), pages 2634-2640, XP002481516 MASAHIKO TANAKA ET AL: "Asymmetric localization of Notch2 on the microvillous surface in choroid plexus epithelial cells", HISTOCHEMISTRY AND CELL BIOLOGY, vol. 127, no. 4, 7 March 2007 (2007-03-07), pages 449-456, XP55029262</p>
--	---

(54) NOTCH-ЗВ'ЯЗУЮЧІ АГЕНТИ Й АНТАГОНІСТИ ТА СПОСОБИ ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ

(57) Реферат:

UA 101671 C2

Винахід стосується виділеного антитіла, яке специфічно зв'язує незв'язуючу ліганд область позаклітинного домену Notch2 і/або Notch3 людини, яке містить:

(a) CDR1 важкого ланцюга, що містить SSSGMS (SEQ ID NO:5), CDR2 важкого ланцюга, що містить VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6), і CDR3 важкого ланцюга, що містить SIFYTT (SEQ ID NO:51) або GIFFAI (SEQ ID NO:7); та

(b) CDR1 легкого ланцюга, що містить RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:8), CDR2 легкого ланцюга, що містить GASSRAT (SEQ ID NO:9), і CDR3 легкого ланцюга, що містить QQYSNFPI (SEQ ID NO:10).

Галузь техніки, до якої належить винахід

Даний винахід стосується композицій, що містять агент, який зв'язує Notch-рецептор людини, і способів застосування цих композицій для лікування раку та інших захворювань. Конкретніше, даний винахід забезпечує, наприклад, антитіла, які специфічно зв'язуються з незв'язуючою ліганд областю позаклітинного домену Notch-рецептора людини та інгібує зростання пухлини. Даний винахід забезпечує також способи лікування раку, причому такий спосіб введення терапевтично ефективною кількості антитіла, яке специфічно зв'язується з незв'язуючою ліганд областю позаклітинного домену білка й інгібує зростання пухлини.

Рівень техніки

Шлях передачі сигналу Notch є одним з декількох критичних регуляторів формування ембріонального патерну, підтримки постембріональної тканини й біології стоволових клітин. Конкретніше, передача сигналу Notch бере участь у процесі латерального інгібування між долями сусідніх клітин і грає важливу роль у визначенні доль клітин під час асиметричних ділень клітин. Нерегульована передача сигналу Notch асоційована з множинними типами раку людини, де вона може змінювати долю розвитку пухлинних клітин для підтримки їх у недиференційованому й проліферативному стані (Brennan and Brown, 2003, *Breast Cancer Res.* 5:69). Таким чином, канцерогенез може відбуватися за допомогою узурпації гомеостатичних механізмів, регулюючих нормальний розвиток і репарацію тканин популяціями стоволових клітин (Beachy et al., 2004, *Nature* 432:324).

Notch-рецептор був спочатку ідентифікований у мутантах *Drosophila* з гаплонедостатністю, що приводить до вирізок (notches) в краю крила, тоді як мутація із втратою функції виробляє ембріональний летальний "нейрогенний" фенотип, у якому клітини епідермісу перемикають шлях до формування нервових клітин (Moohr, 1919, *Genet.* 4:252; Poulson, 1937, *PNAS* 23:133; Poulson, 1940, *J. Exp. Zool.* 83:271). Notch-рецептор є трансмембранним рецептором односпрямованого проходження, що містить багаточисельні тандемні повтори, подібні до епідермального чинника зростання (EGF), і три багатих цистеїном повтори Notch/LIN-12 у великому позаклітинному домені (Wharton et al., 1985, *Cell* 43:567; Kidd et al., 1986, *Mol. Cell Biol.* 6:3094; у огляді Artavanis et al., 1999, *Science* 284:770). Були ідентифіковані чотири білки Notch ссавців (Notch1, Notch2, Notch3 і Notch4), і мутації в цих рецепторах незмінно приводять до аномалій розвитку й патологій у людини, що включають декілька типів раку, як описано детально нижче (Gridley, 1997, *Mol. Cell Neurosci* 9:103; Joutel & Tournier-Lasserre, 1998, *Seminl.* 9:619-25).

Notch-рецептори активуються трансмембранними лігандами односпрямованого проходження сімейства Delta, Serrated, Lag-2 (DSL). У ссавців є п'ять відомих лігандів Notch: Delta-подібний 1 (DLL1), Delta-подібний 3 (DLL3), Delta-подібний 4 (DLL4), Jagged 1 (JAG1) і Jagged 2 (JAG2), що характеризуються доменом DSL і тандемними EGF-подібними повторами в позаклітинному домені. Позаклітинний домен Notch-рецептора взаємодіє з позаклітинним доменом його лігандів, зазвичай на сусідніх клітинах, приводячи до двох протеолітичних розщеплювань Notch, одного позаклітинного розщеплювання, опосередкованого протеазою ADAM (дезинтегрин і металопротеаза) й одного розщеплювання, опосередкованого гамма-секретазою. Це останнє розщеплювання генерує внутрішньоклітинний домен Notch (ICD), який потім входить у ядро, де він активує CBF1, супресор Hairless [Su(H)], сімейство Lag-2 (CSL) чинників транскрипції як основні наступні ефектори для збільшення транскрипції ядерних основних чинників транскрипції спіраль-петля-спіраль сімейства Hairy and Enhancer of Split [E(sp)] (Artavanis et al., 1999, *Science* 284:770; Brennan and Brown, 2003, *Breast Cancer Res.* 5:69; Iso et al., 2003, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23:543). У ссавців можуть існувати також альтернативні внутрішньоклітинні шляхи, що включають цитоплазматичний білок Deltex, ідентифікований у *Drosophila* (Martinez et al., 2002, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12:524-33), і цей Deltex-залежний шлях може діяти за допомогою супресії генів-мішеней Wnt (Brennan et al., 1999, *Curr. Biol.* 9:707-710; Lawrence et al., 2001, *Curr. Biol.* 11:375-85).

Notch-рецептори ссавців піддаються розщеплюванню з утворенням зрілого рецептора, а також подальшим зв'язуванням ліганду для активації подальшої передачі сигналу. Фурин-подібна протеаза розщеплює Notch-рецептори під час дозрівання з утворенням навколосмембранних гетеродимерів, які містять нековалентно асоційовану позаклітинну субодиницю й трансмембранну субодиницю, що утримуються разом в ауто-інгібованому стані. Зв'язування ліганду полегшує це інгібування й індукує розщеплювання Notch-рецептора металопротеазою типу ADAM і гамма-секретазою, причому остання вивільняє внутрішньоклітинний домен (ICD) у цитоплазму, дозволяючи йому переміщатися в ядро для активації транскрипції генів. Розщеплювання за допомогою ADAM відбувається в домені, що не зв'язує ліганд, у межах проксимальної відносно мембрани негативної регуляторної області.

Гемопоетичні ствові клітини (HSC) є найбільш вивченими ствовими клітинами в організмі, й, мабуть, передача сигналу Notch бере участь в їх нормальній підтримці, а також у лейкозному перетворенні (Korper & Hajdu, 2004, *Pathol. Oncol. Res.* 10:69-73). HSC є рідкою популяцією клітин, яка займає стромальну нішу в зрілому кістковому мозку. Ці клітини характеризуються як унікальним профілем експресії генів, так і здатністю виробляти більше диференційованих клітин-попередників для відтворення всієї гемопоетичної системи. Конститутивна активація передачі сигналу Notch в HSC і клітинах-попередниках встановлює іморталізовані клітинні лінії, які генерують як лімфоїдні, так і мієлоїдні клітини *in vitro* і в довгострокових аналізах відтворення (Varnum-Finney et al., 2000, *Nat. Med.* 6:1278-81), і присутність Jagged1 збільшує щеплення популяцій кісткового мозку людини, збагачених HSC (Karanu et al., 2000, *J. Exp. Med.* 192:1365-72). Більш недавно була продемонстрована передача сигналу Notch у HSC *in vivo*, і було показано, що вона бере участь в інгібуванні диференціювання HSC. Крім того, передача сигналу Notch, напевне, є необхідною для Wnt-опосередкованого самовідновлення HSC (Duncan et al., 2005, *Nat. Immunol.* 6:314).

Шлях передачі сигналу Notch також грає центральну роль у підтримці нервових ствових клітин і ймовірно бере участь у їх нормальній підтримці, а також у разі раку головного мозку (Korper & Hajdu, 2004, *Pathol. Oncol. Res.* 10:69-73; Purow et al., 2005, *Cancer Res.* 65:2353-63; Hallahan et al., 2004, *Cancer Res.* 64:7794-800). Нервові ствові клітини дають початок всім нейронним і гліальним клітинам у нервовій системі людини під час розвитку, й більш недавно були ідентифіковані в зрілому головному мозку (Gage, 2000, *Science* 287:1433-8). Миші, дефектні відносно Notch1; генів-мішеней Notch Hes1, 3 і 5 і регулятора передачі сигналу Notch пресиніліну 1 (PS1) виявляють зменшені кількості ембріональних нервових ствових клітин. Крім того, зрілі нервові ствові клітини зменшувалися в кількості в головному мозку гетерозиготних мишей PS1 (Nakamura et al., 2000, *J. Neurosci.* 20:283-93; Hitoshi et al., 2002, *Genes Dev.* 16:846-58). Це зменшення в кількості нервових ствових клітин, мабуть, походить з їх передчасного диференціювання в нейрони (Hatakeyama et al., 2004, *Dev.* 131:5539-50), що дозволяє передбачити, що передача сигналу Notch регулює диференціювання й самовідновлення нервових ствових клітин.

Передбачається, що аберантна передача сигналу Notch бере участь у ряді ракових захворювань людини. Ген Notch1 спочатку ідентифікували в субпопуляції Т-клітинних гострих лімфобластних лейкозів у вигляді переміщеного локуса, що приводить до активації Notch-шляху (Ellisen et al., 1991, *Cell* 66:649-61). Конститутивна активація передачі сигналу Notch у Т-клітинах у моделі миші так само генерує Т-клітинні лімфоми, що передбачає його причинну роль (Robey et al., 1996, *Cell* 87:483-92; Pear et al., 1996, *J. Exp. Med.* 183:2283-91; Yan et al., 2001, *Blood* 98:3793-9; Bellavia et al., 2000, *EMBO J.* 19:3337-48). Було виявлено, що точкові мутації, інерції й делеції, що виробляють аберантну передачу сигналу Notch1, часто присутні в Т-клітинних гострих лімфобластних лейкозах/лімфомах як дорослих, так і дітей (Pear & Aster, 2004, *Curr. Opin. Hematol.* 11:416-33).

Часте інсертування вірусу пухлини молочної залози миші як у локус Notch1, так і в локус Notch4 в пухлинах молочної залози й одержання активованих фрагментів білка Notch спочатку дозволило передбачити присутність передачі сигналу Notch у раку молочної залози (Gallahan & Callahan, 1987, *J. Virol.* 61:66-74; Brennan & Brown, 2003, *Breast Cancer Res.* 5:69; Politi et al., 2004, *Semin. Cancer Biol.* 14:341-7). Додаткові дослідження на трансгенних мишах підтвердили роль Notch у розгалуженні проток під час нормального розвитку молочної залози, і конститутивно активна форма Notch4 в епітеліальних клітинах молочної залози інгібує епітеліальне диференціювання й приводить до онкогенезу (Jhappan et al., 1992, *Genes & Dev.* 6:345-5; Gallahan et al., 1996, *Cancer Res.* 56:1775-85; Smith et al., 1995, *Cell Growth Differ.* 6:563-77; Soriano et al., 2000, *Int. J. Cancer* 86:652-9; Uyttendaele et al., 1998, *Dev. Biol.* 196:204-17; Politi et al., 2004, *Semin. Cancer Biol.* 14:341-7). Доказ ролі Notch у раку молочної залози людини забезпечується даними, що показують експресію Notch-рецепторів у разі раку молочної залози і їх кореляцію з клінічним результатом (Weijzen et al., 2002, *Nat. Med.* 8:979-86; Parr et al., 2004, *Int. J. Mol. Med.* 14:779-86). Крім того, надекспресію шляху Notch спостерігали в раках шийки матки (Zagouras et al., 1995, *PNAS* 92:6414-8), нирково-клітинних карцином (Rae et al., 2000, *Int. J. Cancer* 88:726-32), карцином голови й шиї (Leethanakul et al., 2000, *Oncogene* 19:3220-4), ендометріальних раків (Suzuki et al., 2000, *Int. J. Oncol.* 17:1131-9) і нейробластом (van Limpt et al., 2000, *Med. Pediatr. Oncol.* 35:554-8), що дозволяє передбачити роль Notch у розвитку ряду пухлин. Цікаво, що передача сигналу Notch може грати роль у підтримці недиференційованого стану Аре-мутантних неопластичних клітин ободової кишки (van Es & Clevers, 2005, *Trends in Mol. Med.* 11:496-502).

Шлях Notch бере участь також у множинних аспектах розвитку судин, що включають проліферацію, міграцію, диференціювання гладких м'язів, ангиогенез і артеріально-венозне диференціювання (Iso et al., 2003, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23:543). Наприклад, гомозиготні нуль-мутації в Notch1/4 і Jagged1, а також гетерозиготна втрата DLL4 приводять до важких, хоча й варіабельних дефектів у розвитку артерій і васкуляризації жовткового мішка. Крім того, DLL1-дефектні й Notch2-гіпоморфні ембріони мишей виявляють кровотечу, яка, мабуть, походить із слабкого розвитку васкулярних структур (Gale et al., 2004, *PNAS*, 101:15949-54; Krebs et al., 2000, *Genes Dev.* 14:1343-52; Xue et al., 1999, *Hum. Mol. Genet.* 8:723-30; Hrabe de Angelis et al., 1997, *Nature* 386:717-21; McCright et al., 2001, *Dev.* 128:491-502). У людей, мутації в Jagged1 асоційовані з синдромом Alagille, пороком розвитку, який включає васкулярні дефекти, й мутації в Notch3 є відповідальними за спадкову судинну деменцію (CADASIL), в якій гомеостаз судин є дефектним (Joutel et al., 1996, *Nature* 383:707-10).

Анти-Notch-антитіла і їх можливе застосування як протиракових терапевтичних речовин повідомлялися раніше. Див., наприклад, Публікацію заявки на патент США №2008/0131434, яка включена в даний опис як посилання в повному обсязі. Див. також Міжнародні Публікації з номерами WO 2008/057144 і WO 2008/076960, а також Публікації заявок на патент США з номерами 2008/0226621, 2008/0118520 і 2008/0131908.

СУТЬ ВИНАХОДУ

Даний винахід забезпечує нові Notch-зв'язуючі агенти й нові антагоністи одного або декількох Notch-рецепторів людини, а також способи застосування цих агентів і антагоністів. Крім того, даний винахід забезпечує нові поліпептиди, такі як антитіла, які зв'язують один або декілька Notch-рецепторів людини, фрагменти таких антитіл та інші поліпептиди, родинні таким антитілам. У деяких варіантах здійснення цей винахід забезпечує антагоністи Notch2 і/або Notch3 людини, у тому числі, але не лише, антитіла, які специфічно зв'язують Notch2 і/або Notch3 людини. У даному контексті, фраза "Notch2 і/або Notch3" позначає "Notch2", "Notch3" або "як Notch2, так і Notch3". У деяких варіантах здійснення, антитіла або інші антагоністи зв'язуються з областю Notch-рецептора, яка знаходиться зовні лігандзв'язуючого домену (наприклад, EGF10 Notch2 або EGF9 Notch3). У деяких варіантах здійснення, ці антитіла специфічно зв'язують Notch2 людини. В деяких варіантах здійснення, ці антитіла специфічно зв'язують Notch2 і Notch3 людини. В деяких варіантах здійснення, ці антитіла специфічно зв'язують Notch3 людини. Забезпечені також полінуклеотиди, що містять послідовності нуклеїнових кислот, що кодують ці поліпептиди, а також вектори, що містять ці полінуклеотиди. Додатково забезпечені клітини, що містять ці поліпептиди й/або полінуклеотиди цього винаходу. Забезпечені також композиції (наприклад, фармацевтичні композиції), що містять ці нові антагоністи Notch. Забезпечені також способи застосування цих антитіл і антагоністів, такі як способи застосування антагоністів Notch для інгібування зростання пухлини, зменшення онкогенності пухлин, інгібування ангиогенезу й/або лікування раку або інших захворювань, що асоціюються з ангиогенезом.

У одному аспекті, цей винахід забезпечує агент (наприклад, антитіло), який специфічно зв'язується з доменом EGF10 (або еквівалентом домену EGF10) одного або декількох Notch-рецепторів людини. В деяких варіантах здійснення, цим агентом є антитіло. У деяких варіантах здійснення, цим агентом є антагоніст. У деяких варіантах здійснення, цей агент специфічно зв'язується з EGF10 Notch2 людини і/або EGF9 Notch3 людини. EGF9 є EGF в Notch3 людини, яка є еквівалентом EGF10 в інших Notch-рецепторах людини, Notch1, Notch2 і Notch4. У деяких варіантах здійснення, цей агент специфічно зв'язується з EGF10 Notch2. У деяких варіантах здійснення, цей агент специфічно зв'язується з EGF10 Notch2 і з EGF9 Notch3. У деяких варіантах здійснення, цей агент специфічно зв'язується з EGF9 Notch3. У інших варіантах здійснення, цей агент зв'язується щонайменше з частиною послідовності HKGAL (SEQ ID NO:28) в EGF10 Notch2. У деяких варіантах здійснення, цей агент зв'язується щонайменше з частиною послідовності HEDA1 (SEQ ID NO:29) в EGF9 Notch3.

У деяких варіантах здійснення кожного з вищезазначених аспектів або варіантів, а також інших аспектів і варіантів, описаних тут у іншому місці, цей агент інгібує зв'язування ліганду з Notch2 і/або Notch3 людини. В деяких варіантах здійснення, цей агент інгібує зв'язування ліганду з Notch2 людини. В деяких варіантах здійснення, цей агент інгібує зв'язування ліганду з Notch2 і/або Notch3. У деяких варіантах здійснення, цим лігандом є DLL4, JAG1 або JAG2. У інших варіантах здійснення, цей агент інгібує передачу сигналу Notch2 і/або Notch3 людини. У деяких варіантах здійснення, цей агент інгібує передачу сигналу Notch2 і/або Notch3. У інших варіантах здійснення, цей агент інгібує передачу сигналу Notch3. У деяких варіантах здійснення, передача сигналу Notch2 і/або Notch3 індукується DLL4, JAG1 або JAG2. Забезпечені також

фармацевтичні композиції, що містять цей агент, і способи використання цього агента для таких застосувань, як інгібування ангиогенезу, інгібування зростання пухлини, зменшення онкогенності пухлини і/або лікування раку.

У наступному аспекті, цей винахід забезпечує антитіло, яке специфічно зв'язує Notch2 і/або Notch3 людини, де це антитіло містить (а) CDR1 важкого ланцюга, що містить SSSGMS (SEQ ID NO:5), CDR2 важкого ланцюга, що містить VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6), і/або CDR3 важкого ланцюга, що містить SIFYTT (SEQ ID NO:51); і/або (b) CDR1 легкого ланцюга, що містить RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:8), CDR2 легкого ланцюга, що містить GASSRAT (SEQ ID NO:9) і/або CDR3 легкого ланцюга, що містить QQYSNFPI (SEQ ID NO:10). У деяких варіантах здійснення, це антитіло містить (а) CDR1 важкого ланцюга, що містить SSSGMS (SEQ ID NO:5) або його варіант, що містить 1, 2, 3 або 4 консервативних амінокислотних заміни; CDR2 важкого ланцюга, що містить VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6), або його варіант, що містить 1, 2, 3 або 4 консервативних амінокислотних заміни; і/або CDR3 важкого ланцюга, що містить SIFYTT (SEQ ID NO:51), або його варіант, що містить 1, 2, 3 або 4 консервативних амінокислотних заміни; і/або (b) CDR1 легкого ланцюга, що містить RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO: 8), або його варіант, що містить 1, 2, 3 або 4 консервативних амінокислотних заміни; CDR2 легкого ланцюга, що містить GASSRAT (SEQ ID NO:9), або його варіант, що містить 1, 2, 3 або 4 консервативних амінокислотних заміни; і/або CDR3 легкого ланцюга, що містить QQYSNFPI (SEQ ID NO:10), або його варіант, що містить 1, 2, 3 або 4 консервативних амінокислотних заміни. Забезпечені також фармацевтичні композиції, що містять цей агент, і способи використання цього агента для таких застосувань, як інгібування ангиогенезу, інгібування зростання пухлини, зменшення онкогенності пухлини і/або лікування раку.

У наступному аспекті, цей винахід забезпечує антитіло, яке специфічно зв'язує Notch2 і/або Notch3 людини, де це антитіло містить (а) CDR1 важкого ланцюга, що містить SSSGMS (SEQ ID NO:5), CDR2 важкого ланцюга, що містить VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6), і/або CDR3 важкого ланцюга, що містить GIFFAI (SEQ ID NO:7); і/або (b) CDR1 легкого ланцюга, що містить RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:8), CDR2 легкого ланцюга, що містить GASSRAT (SEQ ID NO:9), і/або CDR3 легкого ланцюга, що містить QQYSNFPI (SEQ ID NO:10). У деяких варіантах здійснення, це антитіло специфічно зв'язує Notch2. У деяких варіантах здійснення, це антитіло містить (а) CDR1 важкого ланцюга, що містить SSSGMS (SEQ ID NO:5), або його варіант, що містить 1, 2, 3 і 4 консервативних амінокислотних заміни; CDR2 важкого ланцюга, що містить VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6), або його варіант, що містить 1, 2, 3 або 4 консервативних амінокислотних заміни; і/або CDR3 важкого ланцюга, що містить GIFFAI (SEQ ID NO:7), або його варіант, що містить утримує 1, 2, 3 або 4 консервативних амінокислотних заміни; і/або (b) CDR1 легкого ланцюга, що містить RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:8), або його варіант, що містить 1, 2, 3 або 4 консервативних амінокислотних заміни; CDR2 легкого ланцюга, що містить GASSRAT (SEQ ID NO:9), або його варіант, що містить 1, 2, 3 або 4 консервативних амінокислотних заміни; і/або CDR3 легкого ланцюга, що містить QQYSNFPI (SEQ ID NO:10), або його варіант, що містить 1, 2, 3 або 4 консервативних амінокислотних заміни. Забезпечені також фармацевтичні композиції, що містять це антитіло, і способи використання цього антитіла для таких застосувань, як інгібування ангиогенезу, інгібування зростання пухлини, зменшення онкогенності пухлини і/або лікування раку.

В іншому аспекті, цей винахід забезпечує антитіло, яке специфічно зв'язує Notch2 і/або Notch3, де це антитіло містить (а) CDR1 важкого ланцюга, що містить SSSGMS (SEQ ID NO:5), CDR2 важкого ланцюга, що містить VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6), і/або CDR3 важкого ланцюга, що містить (G/S)(F/S)F(F/Y)(A/P)(I/T/S/N) (SEQ ID NO:30); і/або (b) CDR1 легкого ланцюга, що містить RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:8), CDR2 легкого ланцюга, що містить GASSRAT (SEQ ID NO:9), і/або CDR3 легкого ланцюга, що містить QQYSNFPI (SEQ ID NO:10). У деяких варіантах здійснення, це антитіло містить CDR3 важкого ланцюга, що містить SIFYPT (SEQ ID NO:22). У деяких варіантах здійснення, це антитіло містить CDR3 важкого ланцюга, що містить SSSFFAS (SEQ ID NO:23). У деяких варіантах здійснення, це антитіло містить CDR3 важкого ланцюга, що містить SSFYAS (SEQ ID NO:24). У деяких варіантах здійснення, це антитіло містить CDR3 важкого ланцюга, що містить SSFFAT (SEQ ID NO:25). У деяких варіантах здійснення, це антитіло містить CDR3 важкого ланцюга, що містить SIFYPS (SEQ ID NO:26). У інших варіантах здійснення, це антитіло містить CDR3 важкого ланцюга, що містить SSFFAN (SEQ ID NO:27). Забезпечені також фармацевтичні композиції, що містять це антитіло, й способи використання цього антитіла для таких застосувань, як інгібування ангиогенезу, інгібування зростання пухлини, зменшення онкогенності пухлини і/або лікування раку.

У іншому аспекті, цей винахід забезпечує поліпептид, який містить: (а) поліпептид (наприклад, варіабельну область важкого ланцюга), що має щонайменше приблизно 80 %

ідентичність послідовності з SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57 або SEQ ID NO:20 (з сигнальною послідовністю або без сигнальної послідовності); і/або (b) поліпептид (наприклад, варіабельну область легкого ланцюга), що має щонайменше приблизно 80 % ідентичність послідовності з SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:19 або SEQ ID NO:39 (з сигнальною послідовністю або без сигнальної послідовності). В деяких варіантах здійснення, цим поліпептидом є антитіло. В деяких варіантах здійснення, цей поліпептид специфічно зв'язується з Notch2 і/або Notch3 людини. В деяких варіантах здійснення, цей поліпептид зв'язується з Notch2 людини. В деяких варіантах здійснення, цей поліпептид зв'язується з Notch2 і Notch3. У інших варіантах здійснення, цей поліпептид зв'язується з Notch3. У деяких варіантах здійснення, цей поліпептид містить поліпептид, що має щонайменше приблизно 85 %, щонайменше приблизно 90 %, щонайменше приблизно 95 %, щонайменше приблизно 98 % або приблизно 100 % ідентичність послідовності з SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:13 або SEQ ID NO:50. Забезпечені також фармацевтичні композиції, що містять цей поліпептид, і способи використання цього поліпептиду для таких застосувань, як інгібування ангиогенезу, інгібування зростання пухлини, зменшення онкогенності пухлини і/або лікування раку.

Ще в одному аспекті, цей винахід забезпечує поліпептид (наприклад, антитіло або важкий ланцюг або легкий ланцюг антитіла), що містить: (a) поліпептид, що має щонайменше приблизно 80 % ідентичність послідовності з SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:16 або SEQ ID NO:2 (з сигнальною послідовністю або без сигнальної послідовності); і/або (b) поліпептид, що має щонайменше приблизно 80 % ідентичність послідовності з SEQ ID NO:18 або SEQ ID NO:4 (з сигнальною послідовністю або без сигнальної послідовності). В деяких варіантах здійснення, цей поліпептид містить поліпептид, що має щонайменше приблизно 85 %, щонайменше приблизно 90 %, щонайменше приблизно 95 %, щонайменше приблизно 98 % або приблизно 100 % ідентичність послідовності з SEQ ID NO:39 або SEQ ID NO:40. Забезпечені також фармацевтичні композиції, що містять ці антитіла, і способи лікування раку, що передбачають введення терапевтично ефективних кількостей цих антитіл.

У іншому аспекті, цей винахід забезпечує поліпептид (наприклад, антитіло або важкий ланцюг або легкий ланцюг антитіла), що містить: (a) поліпептид, що має щонайменше приблизно 80 % ідентичність послідовності з SEQ ID NO:50; і/або (b) поліпептид, що має щонайменше приблизно 80 % ідентичність послідовності з SEQ ID NO:13. У деяких варіантах здійснення, цей поліпептид містить поліпептид, що має щонайменше приблизно 85 %, щонайменше приблизно 90 %, щонайменше приблизно 95 %, щонайменше приблизно 98 % або приблизно 100 % ідентичність послідовності з SEQ ID NO:50 або SEQ ID NO:13. У деяких варіантах здійснення, цей поліпептид є антитілом, яке зв'язує Notch2 людини і/або Notch3 людини. Забезпечені також фармацевтичні композиції, що містять ці антитіла, й способи лікування раку, що передбачають введення терапевтично ефективних кількостей цих антитіл.

У іншому аспекті, цей винахід забезпечує антитіло, яке містить антитіло IgG2 59R1 або складається або по суті складається з антитіла IgG2 59R1, що містить важкий ланцюг і легкий ланцюг SEQ ID NO:16 і 18 (з сигнальною послідовністю або без сигнальної послідовності), відповідно, або кодується ДНК, депонованою в Американській Колекції Типових культур (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA, USA, згідно з умовами Будапештського Договору 15 жовтня 2008 року, що отримала присвоєний номер PTA-9547. Забезпечені також фармацевтичні композиції, що містять це антитіло, і способи використання цього антитіла для таких застосувань, як інгібування ангиогенезу, інгібування зростання пухлини, зменшення онкогенності пухлини і/або лікування раку.

У одному додатковому аспекті, цей винахід забезпечує антитіло, яке містить антитіло IgG2 59R5 або складається або по суті складається з антитіла IgG2 59R5, що містить важкий ланцюг і легкий ланцюг SEQ ID NO:49 і SEQ ID NO:18 (з сигнальною послідовністю або без сигнальної послідовності), відповідно, або кодується ДНК, депонованою в ATCC 6 липня 2009 року й що отримала присвоєний номер PTA-10170. Забезпечені також фармацевтичні композиції, що містять це антитіло, й способи використання цього антитіла для таких застосувань, як інгібування ангиогенезу, інгібування зростання пухлини, зменшення онкогенності пухлини і/або лікування раку.

У іншому аспекті, цей винахід забезпечує антитіло, яке конкурує за специфічне зв'язування з Notch2 і/або Notch3 людини з антитілом, що містить варіабельну область важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO:14, і варіабельну область легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO:13. У деяких варіантах здійснення, це антитіло конкурує за специфічне зв'язування з антитілом IgG2 59R1, що містить важкий ланцюг і легкий ланцюг SEQ ID NO:16 і 18 (з сигнальною послідовністю або без сигнальної послідовності), відповідно, або кодується ДНК, депонованою в ATCC 15

жовтня 2008 року і що отримала присвоєний номер РТА-9547. У деяких варіантах здійснення, це антитіло конкурує за зв'язування з Notch2 людини. В деяких варіантах здійснення, це антитіло конкурує за зв'язування з Notch2 і Notch3 людини. У інших варіантах здійснення, це антитіло конкурує за зв'язування з Notch3 людини. Забезпечені також фармацевтичні композиції, що містять це антитіло, й способи використання цього антитіла для таких застосувань, як інгібування ангиогенезу, інгібування зростання пухлини, зменшення онкогенності пухлини і/або лікування раку.

У наступному аспекті це антитіло конкурує за специфічне зв'язування з Notch2 і/або Notch3 людини з антитілом, що містить варіабельну область важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO:50, і варіабельну область легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO:13. У деяких варіантах здійснення, це антитіло конкурує за специфічне зв'язування з антитілом 59R5, що містить важкий ланцюг і легкий ланцюг SEQ ID NO:49 і 18, відповідно, або кодується ДНК, депонованою в ATCC 6 липня 2009 року і що отримала присвоєний номер РТА-10170. У деяких варіантах здійснення, це антитіло конкурує за зв'язування з Notch2 і Notch3 людини. У інших варіантах здійснення, це антитіло конкурує за зв'язування з Notch3 людини. Забезпечені також фармацевтичні композиції, що містять це антитіло, й способи використання цього антитіла для таких застосувань, як інгібування ангиогенезу, інгібування зростання пухлини, зменшення онкогенності пухлини і/або лікування раку.

У деяких інших аспектах, цей винахід забезпечує поліпептид (з сигнальною послідовністю або без сигнальної послідовності), що містить послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56 і SEQ ID NO:57, а також полінуклеотид, що кодує такий поліпептид. У деяких варіантах здійснення, цей поліпептид є антитілом. У деяких варіантах здійснення це антитіло специфічно зв'язується з Notch2 людини і/або Notch3 людини. У деяких варіантах здійснення, це антитіло специфічно зв'язується з Notch2 людини. У деяких варіантах здійснення, це антитіло специфічно зв'язується з Notch2 людини і Notch3 людини. В деяких варіантах здійснення, це антитіло специфічно зв'язується з Notch3 людини. У іншому аспекті, цей винахід забезпечує полінуклеотид, що містить послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:59 і SEQ ID NO:60.

У іншому аспекті, цей винахід забезпечує спосіб модуляції функції перицитів і/або клітин гладких м'язів судин у суб'єкта (наприклад, у ділянці пухлини або іншому аберантному ангиогенезі у суб'єкта). В деяких варіантах здійснення, цей спосіб передбачає введення ефективної кількості агента, який специфічно зв'язує Notch2 людини і/або Notch3 людини, цьому суб'єктові. В деяких варіантах здійснення, цей агент є антитілом. У деяких варіантах здійснення, цей агент є антитілом, описаним у будь-якому з вищезазначених аспектів і/або варіантів, а також в інших аспектах і/або варіантах, описаних тут. У деяких варіантах здійснення, цей агент є антагоністом. У деяких варіантах здійснення, цей агент специфічно зв'язується з Notch3 людини і є антагоністом Notch3 людини. У деяких варіантах здійснення, модуляція функції перицитів і/або клітин гладких м'язів судин приводить до інгібування ангиогенезу і/або зростання пухлини.

Ще в одному аспекті, цей винахід забезпечує спосіб інгібування ангиогенезу (наприклад, ангиогенезу пухлини) у суб'єкта. В деяких варіантах здійснення, цей спосіб передбачає введення суб'єктові ефективної кількості агента, який специфічно зв'язує Notch2 людини і/або Notch3 людини. У деяких варіантах здійснення, цей агент є антагоністом. У деяких варіантах здійснення, цей агент специфічно зв'язується з Notch2 людини і є антагоністом Notch2 людини. В деяких варіантах здійснення, цей агент специфічно зв'язується з Notch3 людини і є антагоністом Notch3 людини. У деяких варіантах здійснення, цей агент є антагоністом як Notch2, так і Notch3. У деяких варіантах здійснення, цей агент є антитілом. У деяких варіантах здійснення, цей агент є антитілом, описаним у будь-якому з вищезазначених аспектів і/або варіантів, а також в інших аспектах і/або варіантах, описаних тут. У деяких варіантах здійснення, цей антагоніст не є антитілом. У деяких варіантах здійснення, спосіб інгібування ангиогенезу додатково передбачає введення цьому суб'єктові антагоніста ендотеліального чинника зростання судин (VEGF) або ретора VEGF. У деяких варіантах здійснення, цей спосіб є способом інгібування ангиогенезу модуляцією функції перицитів і/або клітин гладких м'язів судин.

У одному додатковому аспекті, цей винахід забезпечує спосіб інгібування зростання пухлини у суб'єкта. В деяких варіантах здійснення, цей спосіб передбачає введення цьому суб'єктові терапевтично ефективної кількості антагоніста Notch2 людини і/або Notch3 людини. У деяких

варіантах здійснення, цей антагоніст є антитілом, яке специфічно зв'язує Notch2 людини. В деяких варіантах здійснення, цей антагоніст є антитілом, яке специфічно зв'язує як Notch2 людини, так і Notch3 людини. У деяких варіантах здійснення, цей антагоніст є антитілом, яке специфічно зв'язує Notch3 людини. У деяких варіантах здійснення, цей антагоніст є антитілом, описаним у будь-якому з вищезазначених аспектів і/або варіантом, а також в інших аспектах і/або варіантах, описаних тут. У деяких варіантах здійснення, пухлина містить делецію або іншу мутацію в гені гомолога фосфатази й тензину (PTEN). У деяких варіантах здійснення, ця пухлина є пухлиною молочної залози.

Ще в одному аспекті, цей винахід забезпечує спосіб вибору суб'єкта для лікування антагоністом Notch2 людини і/або Notch3 людини. У деяких варіантах здійснення, цей спосіб передбачає (а) визначення, чи містить ця пухлина делецію або мутацію в гені гомолога фосфатази й тензину (PTEN); і (b) вибір суб'єкта для лікування антагоністом Notch2 і/або Notch3, якщо ця пухлина містить цю делецію або мутацію. В деяких варіантах здійснення, цього суб'єкта лікують антагоністом Notch2. У деяких варіантах здійснення, цього суб'єкта лікують антагоністом Notch2 і Notch3. У деяких варіантах здійснення, цього суб'єкта лікують антагоністом Notch3. У деяких варіантах здійснення, цей антагоніст є антитілом. У деяких варіантах здійснення, ця пухлина є пухлиною молочної залози.

У іншому аспекті, цей винахід забезпечує антитіло, яке специфічно зв'язується з незв'язуючою ліганд областю позаклітинного домену щонайменше одного Notch-рецептора людини (наприклад, 1, 2, 3 або 4 Notch-рецепторів). У деяких варіантах здійснення, ця незв'язуюча ліганд область містить EGF-повтор 10 Notch-рецептора людини або складається з EGF-повтору 10 Notch-рецептора людини (або містить еквівалент EGF10, такий як EGF9 Notch3 людини, або складається з еквіваленту EGF10, такого як EGF9 Notch3 людини). У деяких варіантах здійснення, це антитіло інгібує зростання пухлини. В деяких варіантах здійснення, це антитіло інгібує зв'язування ліганду з Notch-рецептором. В деяких варіантах здійснення, це антитіло інгібує передачу сигналу Notch-рецептором. У деяких варіантах здійснення, цей Notch-рецептор є рецептором Notch людини, Notch1, Notch2, Notch3 або Notch4. У деяких варіантах здійснення, це антитіло специфічно зв'язується з Notch2 (наприклад, з EGF10 Notch2). У деяких варіантах здійснення, це антитіло специфічно зв'язується з Notch2 і щонайменше одним додатковим Notch-рецептором. У деяких варіантах здійснення, додатковим Notch-рецептором є Notch3. Забезпечені також фармацевтичні композиції, що містять ці антитіла, і способи лікування раку, що передбачають введення терапевтично ефективних кількостей цих антитіл.

У додатковому аспекті, цей винахід забезпечує антитіло, яке специфічно зв'язується з двома або більш (тобто щонайменше з двома або двома, трьома або чотирма) Notch-рецепторами людини. У деяких варіантах здійснення, це антитіло специфічно зв'язується з незв'язуючою ліганд областю позаклітинного домену двох або більше Notch-рецепторів людини. У деяких варіантах здійснення, якщо ці два або більше Notch-рецептори людини містять Notch1, Notch2 або Notch4, це антитіло зв'язується з EGF10 Notch1, Notch2 або Notch4, і, якщо ці два або більше Notch-рецептори людини містять Notch3, це антитіло зв'язується з EGF9 Notch3. У деяких варіантах здійснення, незв'язуюча ліганд область не є EGF4. У деяких варіантах здійснення, ці два або більше Notch-рецептори людини містять Notch2. У деяких варіантах здійснення ці два або більше Notch-рецептори людини містять Notch3. У додаткових варіантах здійснення, ці два або більше Notch-рецептори людини містять Notch2 і Notch3. У деяких варіантах здійснення, це антитіло є антагоністом цих двох або більше Notch-рецепторів людини. У деяких варіантах здійснення, це антитіло інгібує зростання пухлини. Забезпечені також фармацевтичні композиції, що містять ці антитіла, і способи лікування раку, що передбачають введення терапевтично ефективних кількостей цих антитіл.

Ще в одному аспекті, цей винахід забезпечує виділене антитіло, яке специфічно зв'язується з незв'язуючою лігандізою областю позаклітинного домену Notch2-рецептора людини і інгібує зростання пухлини, де ця незв'язуюча ліганд область містить EGF-повтор 10 Notch2-рецептора людини або складається з нього (наприклад, SEQ ID NO:36). У деяких варіантах здійснення, це антитіло не зв'язується з жодною областю Notch2 людини поза EGF-повтором 10. У деяких варіантах здійснення, це антитіло також зв'язується специфічно з EGF-повтором 10 (або його еквівалентом) щонайменше одного додаткового Notch-рецептора людини (наприклад, EGF9 Notch3). У деяких варіантах здійснення, це антитіло зв'язується з EGF10 Notch2 людини і EGF9 Notch3. Забезпечені також фармацевтичні композиції, що містять ці антитіла, й способи лікування раку, що передбачають введення терапевтично ефективних кількостей цих антитіл.

Ще в одному аспекті, цей винахід забезпечує виділене антитіло, яке специфічно зв'язується з незв'язуючою ліганд областю позаклітинного домену Notch3-рецептора людини й інгібує зростання пухлини, де ця незв'язуюча ліганд область містить EGF-повтор 9 Notch3-рецептора

людини або складається з нього (еквівалент EGF10 в інших Notch-рецепторах). У деяких варіантах здійснення, це антитіло не зв'язується з жодною областю Notch3 людини поза EGF-повтором 9. У деяких варіантах здійснення, це антитіло також зв'язується специфічно з EGF-повтором 10 щонайменше одного додаткового Notch-рецептора людини. У деяких варіантах здійснення, це антитіло зв'язується з EGF9 Notch3 людини і EGF10 Notch2. Забезпечені також фармацевтичні композиції, що містять ці антитіла, й способи лікування раку, що передбачають введення терапевтично ефективних кількостей цих антитіл.

Ще в одному аспекті, цей винахід забезпечує антитіло, яке зв'язує незв'язуюча ліганд область позаклітинного домену Notch-рецептора людини, і містить: (а) CDR1 важкого ланцюга, що містить SSSGMS (SEQ ID NO:5), CDR2 важкого ланцюга, що містить VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6) утримує, і/або CDR3 важкого ланцюга, що містить GIFFAI (SEQ ID NO:7); і/або (b) CDR1 легкого ланцюга, що містить RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:8), CDR2 легкого ланцюга, що містить GASSRAT (SEQ ID NO:9), і/або CDR3 легкого ланцюга, що містить QQYSNFPI (SEQ ID NO:10). У деяких варіантах здійснення, Notch-рецептор людини є Notch2. У деяких варіантах здійснення, це антитіло зв'язується зі з EGF10 Notch2-рецептора людини і/або EGF9 Notch3-рецептора людини. У одному додатковому аспекті, цей винахід забезпечує антитіло, яке конкурує з таким антитілом за специфічне зв'язування з незв'язуючою ліганд областю позаклітинного домену Notch2 в аналізі конкурентного зв'язування. Забезпечені також фармацевтичні композиції, що містять ці антитіла, і способи лікування раку, що передбачають введення терапевтично ефективних кількостей цих антитіл.

У іншому аспекті, цей винахід забезпечує антитіло, яке зв'язує незв'язуюча ліганд область позаклітинного домену Notch-рецептора людини і містить: (а) CDR1 важкого ланцюга, що містить SSSGMS (SEQ ID NO:5), CDR2 важкого ланцюга, що містить VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6), і/або CDR3, що містить SIFYTT (SEQ ID NO:51); і/або (b) CDR1 легкого ланцюга, що містить RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:8), CDR2 легкого ланцюга, що містить GASSRAT (SEQ ID NO:9), і/або CDR3 легкого ланцюга, що містить QQYSNFPI (SEQ ID NO:10). У деяких варіантах здійснення, Notch-рецептор людини є Notch2. У деяких варіантах здійснення, це антитіло зв'язується з рецепторами Notch2 і Notch3 людини. У деяких варіантах здійснення, це антитіло зв'язується з EGF10 Notch2-рецептора людини і EGF9 Notch3-рецептора людини. У іншому варіанті здійснення, цей винахід забезпечує антитіло, яке конкурує з таким антитілом за специфічне зв'язування з незв'язуючою ліганд областю позаклітинного домену Notch2 в аналізі конкурентного зв'язування. Забезпечені також фармацевтичні композиції, що містять ці антитіла, і способи лікування раку, що передбачають введення терапевтично ефективних кількостей цих антитіл. Забезпечені також способи інгібування ангиогенезу, що передбачають введення цих композицій.

У деяких варіантах здійснення кожного з вищезазначених аспектів або варіантів, а також інших аспектів і/або варіантів, описаних тут у іншому місці, це антитіло специфічно зв'язується як з Notch2 людини, так і Notch3 людини.

У деяких варіантах здійснення кожного з вищезазначених аспектів або варіантів, а також інших аспектів і/або варіантів, описаних у іншому місці тут, це антитіло є рекомбінантним антитілом. У деяких варіантах здійснення, це антитіло є моноклональним антитілом. У деяких варіантах здійснення, це антитіло є химерним антитілом. У деяких варіантах здійснення, це антитіло є гуманізованим антитілом. У деяких варіантах здійснення, це антитіло є антитілом людини. У деяких варіантах здійснення, це антитіло є моновалентним, бівалентним або мультівалентним. У деяких варіантах здійснення, це антитіло є моноспецифічним антитілом. У деяких варіантах здійснення, окремий антигензв'язуючий сайт цього антитіла зв'язує (або здатний зв'язувати) незв'язуюча ліганд область позаклітинного домену більш ніж одного Notch-рецептора людини (наприклад, Notch 2 і Notch3). У деяких альтернативних варіантах здійснення, це антитіло є біспецифічним антитілом. У деяких варіантах здійснення, це антитіло є IgG1-антитілом. У деяких варіантах здійснення, це антитіло є IgG2-антитілом. У деяких варіантах здійснення, це антитіло кон'юговано з цитотоксичною частиною. В деяких варіантах здійснення, це антитіло є виділеним. У додаткових варіантах здійснення, це антитіло є по суті чистим.

У деяких варіантах здійснення кожного з вищезазначених аспектів або варіантів, а також інших аспектів і/або варіантів, описаних у іншому місці тут, рак або пухлина, які лікують цим антитілом, є раком або пухлиною молочної залози, колоректальним раком або пухлиною, раком або пухлиною легенів, підшлункової залози, передміхурової залози або голови й шиї. У деяких варіантах здійснення, ці рак або пухлина є меланомаю. В деяких варіантах здійснення, ці рак або пухлина є раком або пухлиною молочної залози. В деяких варіантах здійснення, ці рак або пухлина є колоректальним раком або колоректальною пухлиною. В деяких варіантах

здійснення, ці рак або пухлина є раком або пухлиною підшлункової залози. В деяких варіантах здійснення, ці рак або пухлина є раком або пухлиною передміхурової залози.

В деяких варіантах здійснення кожного з вищезазначених аспектів або варіантів, а також інших аспектів і/або варіантів, описаних у іншому місці тут, способи лікування раку включають інгібування зростання пухлини. В деяких варіантах здійснення, способи лікування раку передбачають зменшення онкогенності пухлин (наприклад, зменшенням випадків (частоти) ракових стоволових клітин у цій пухлині).

У деяких варіантах здійснення кожного з вищезазначених аспектів або варіантів, а також інших аспектів і/або варіантів, описаних у іншому місці тут, ці антагоніст або антитіло вводять у комбінації з додатковою терапією раку. В деяких варіантах здійснення, ця додаткова терапія раку включає променеву терапію, хіміотерапію і/або додаткове терапевтичне антитіло. В деяких варіантах здійснення, ця додаткова терапія для раку включає хіміотерапевтичний агент. У деяких варіантах здійснення, цей хіміотерапевтичний агент включає паклітаксел (наприклад, ТАКСОЛ), іринотекан, гемцитабін і оксаліплатин. У деяких варіантах здійснення, додаткове терапевтичне антитіло є антитілом, яке специфічно зв'язує Notch-рецептор людини (наприклад, Notch1, 2, 3 або 4), або ліганд Notch-рецептора людини (наприклад, DLL4 або JAG1). У деяких варіантах здійснення, це додаткове терапевтичне антитіло є анти-DLL4-антитілом. У деяких варіантах здійснення, додаткове терапевтичне антитіло є антитілом, яке специфічно зв'язує ендотеліальний чинник зростання судин (VEGF). У деяких варіантах здійснення, це додаткове терапевтичне антитіло зв'язує рецептор VEGF.

У деяких варіантах здійснення кожного з вищезазначених аспектів або варіантів, а також інших аспектів і/або варіантів, описаних у іншому місці тут, це антитіло вводять суб'єктові в комбінації з другим терапевтичним агентом, який є антиангіогенним агентом.

Крім того, цей винахід забезпечує клітинні лінії (наприклад, гібридомні клітинні лінії), що містять або продукують антитіла або інші поліпептиди, описані тут. Забезпечені також полінуклеотиди (наприклад, вектори), що включають полінуклеотиди, що кодують поліпептиди або варіабельні області легкого ланцюга або варіабельні області важкого ланцюга описаних тут антитіл, а також клітинні лінії, що містять такі полінуклеотиди.

У деяких варіантах здійснення, даний винахід забезпечує спосіб лікування раку, де цей рак містить ракові ствові клітини, що передбачає введення цьому суб'єктові терапевтично ефективною кількості антитіла, яке зв'язує Notch-рецептор. У конкретнішому аспекті, даний винахід забезпечує спосіб лікування раку, де цей рак містить ствові клітини, експресуючі один або декілька членів сімейства Notch-рецепторів, що передбачає введення цьому суб'єктові терапевтично ефективною кількості антитіла, яке зв'язує ці члени сімейства Notch-рецепторів. Даний винахід забезпечує антитіла, які зв'язуються з незв'язуючою ліганд областю позаклітинного домену Notch-рецептора людини і є терапевтично ефективними проти раку. Таким чином, у деяких варіантах здійснення, даний винахід забезпечує антитіло, яке специфічно зв'язується з незв'язуючою ліганд областю позаклітинного домену Notch-рецептора людини і яке інгібує зростання пухлини. У деяких варіантах здійснення, даний винахід додатково забезпечує спосіб лікування раку, причому цей спосіб передбачає введення терапевтично ефективною кількості антитіла, яке специфічно зв'язується з незв'язуючою ліганд областю позаклітинного домену білка Notch-рецептора людини й інгібує зростання пухлини.

Тут обговорюються різні переваги використання антитіла, яке зв'язує члени сімейства Notch-рецепторів або ліганди до цих Notch-рецепторів для лікування таких ракових захворювань. У деяких варіантах здійснення, деякі Notch-рецептори високо експресуються в певних солідних пухлинах, наприклад, молочної залози й ободової кишки, й це забезпечує вмістище для активного лікарського засобу, де цей лікарський засіб зв'язується з Notch-рецептором. Зрозуміло, що антитіла, які зв'язують надекспресовані Notch-рецептори, мають кращий профіль безпеки, ніж існуючі доступні хіміотерапевтичні лікарські засоби.

Далі, цей винахід забезпечує спосіб лікування раку в людини, що має рак, що містить ракові ствові клітини, не характеризується надекспресією раковою ствовою клітиною одного або декількох Notch-рецепторів, що передбачає введення цій людині терапевтично ефективною кількості антитіла, яке зв'язується з Notch-рецептором і блокує активацію лігандом Notch-рецептора.

Цей винахід додатково забезпечує спосіб лікування раку в людини, що передбачає введення цій людині терапевтично ефективних кількостей (а) першого антитіла, яке зв'язує Notch-рецептор і інгібує зростання або проліферацію ракових ствових клітин, які надекспресують Notch-рецептори; і (b) другого антитіла, яке зв'язує Notch-рецептор і блокує активацію лігандом Notch-рецептора.

Цей винахід забезпечує також спосіб лікування раку, де цей рак вибраний з групи, що складається з раку молочної залози, раку ободової кишки, ректального й колоректального раку, що передбачає введення терапевтично ефективної кількості антитіла, яке зв'язує Notch. Цей винахід забезпечує також інший спосіб лікування раку, де цей рак вибраний з групи, що складається з раку молочної залози, раку ободової кишки, підшлункової залози, передміхурової залози, легені, ректального й колоректального раку, що передбачає введення терапевтично ефективної кількості антитіла, яке блокує активацію лігандом Notch-рецептора. Цей винахід забезпечує також ще один спосіб лікування раку, де цей рак вибраний з групи, що складається з раку молочної залози, ободової кишки, підшлункової залози, передміхурової залози, легені, ректального й колоректального раку, що передбачає введення терапевтично ефективної кількості антитіла, яке зв'язує Notch, і антитіла, яке блокує активацію лігандом Notch-рецептора.

У наступних варіантах здійснення, цей винахід забезпечує промислові вироби для застосування (серед іншого) у вищеприказаних способах. Наприклад, цей винахід забезпечує промисловий виріб, що містить контейнер і композицію, що міститься в ньому, де ця композиція містить антитіло, яке зв'язує Notch, і додатково містить вкладиш упаковки, який вказує, що ця композиція може бути використана для лікування раку, що містить ракові ствольні клітини. У деяких варіантах здійснення, цей винахід забезпечує промисловий виріб, що містить контейнер і композицію, що міститься в ньому, де ця композиція містить антитіло, яке зв'язує Notch, і додатково містить вкладиш упаковки, який вказує, що ця композиція може бути використана для лікування раку, що містить ракові ствольні клітини, які експресують один або декілька Notch-рецепторів.

У деяких варіантах здійснення, цей винахід відноситься до промислового виробу, що містить контейнер і композицію, що міститься в ньому, де ця композиція містить антитіло, яке зв'язує Notch-рецептор і блокує активацію лігандом Notch-рецептора, й додатково містить вкладиш упаковки, який вказує, що ця композиція може бути використана для лікування раку, де цей рак містить ракові ствольні клітини, які не характеризуються надекспресією Notch-рецептора.

У деяких варіантах здійснення забезпечений промисловий виріб, який містить (а) перший контейнер з композицією, що міститься в ньому, де ця композиція містить перше антитіло, яке зв'язує Notch-рецептор та інгібує зростання ракових клітин, що містять ракові ствольні клітини, надекспресуючі Notch; і (b) другий контейнер з композицією, що міститься в ньому, де ця композиція містить друге антитіло, яке зв'язує Notch і блокує активацію лігандом Notch-рецептора.

У деяких варіантах здійснення, забезпечений наступний промисловий виріб, який містить контейнер і композицію, що міститься в ньому, де ця композиція містить антитіло, яке зв'язує Notch і блокує активацію лігандом Notch-рецептора, і, крім того, містить вкладиш упаковки, який вказує, що ця композиція може бути використана для лікування раку, вибраного з групи, що складається з раку ободової кишки, підшлункової залози, передміхурової залози, легені й колоректального раку.

Цей винахід додатково забезпечує: антитіло (наприклад, антитіло людини або гуманізоване антитіло), яке зв'язує Notch і блокує активацію лігандом Notch-рецептора; композицію, що містить це антитіло й фармацевтично прийнятний носій; і імунокон'югат, що містить це антитіло, кон'юговане з цитотоксичним агентом.

У одному аспекті, цей винахід забезпечує виділений полінуклеотид, що кодує будь-яке з антитіл або поліпептидів вищезазначених аспектів або варіантів здійснення, а також інших аспектів і/або варіантів здійснення, описаних у іншому місці тут. У деяких варіантах здійснення, цей винахід забезпечує вектор, що містить цей полінуклеотид. У деяких варіантах здійснення, клітина-хазяїн містить цей полінуклеотид або цей вектор. У інших варіантах здійснення, спосіб одержання цього антитіла передбачає культивування клітини-хазяїна, що містить цей полінуклеотид, так що цей полінуклеотид експресується і, необов'язково, додатково передбачає витягання цього антитіла з культури клітини-хазяїна (наприклад, з культурального середовища клітини-хазяїна).

Крім того, цей винахід забезпечує виділений полінуклеотид, що кодує гуманізоване антитіло або антитіло людини, як описано у вищезазначених варіантах здійснення або аспектах, а також описаних у іншому місці тут; вектор, що містить цей полінуклеотид; клітину-хазяїна, що містить цей полінуклеотид або вектор; а також спосіб одержання цього антитіла, що передбачає культивування клітини-хазяїна, що містить цей полінуклеотид, так що цей полінуклеотид експресується, і що необов'язково передбачає додаткове витягання цього антитіла з культури клітини-хазяїна (наприклад, з культурального середовища клітини-хазяїна).

Цей винахід додатково відноситься до імунокон'югату, що містить антитіло, яке зв'язує Notch, кон'югованого з однією або декількома молекулами каліхеаміцину, і застосування таких

кон'югатів для лікування Notch-експресуючого раку, наприклад, раку, в якому ракові ствольні клітини надекспресують Notch.

Коли аспекти або варіанти цього винаходу описуються у вигляді формули Маркуша або іншого групування альтернатив, у тому числі, але не лише, груп альтернатив, розділених за допомогою "і/або" або "або", даний винахід включає не лише всю цю групу, перераховану в цілому, але й кожен член цієї групи окремо й усі можливі підгрупи цієї основної групи, а також основну групу, в якій відсутні один або декілька членів цієї групи. Даний винахід передбачає також певне виключення одного або декількох членів цієї групи в заявленому винаході. Наприклад, такий вираз, як "X і/або Y", включає "X" окремо, "Y" окремо, а також "X" і "Y" разом.

КОРОТКИЙ ОПИС ІЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРІАЛУ/ФІГУР

Фігура 1. Антитіла й варіанти 59R1 зв'язують Notch2 людини і блокують зв'язування ліганду. (A) FACS-аналіз зв'язування фрагмента Fab 59R1 з Notch2 людини. "Клон 1" є Fab 59R1, який, як було показано, зв'язує Notch2 людини на стабільно трансфікованих клітинах HEK293. "Клон 5" є Fab іншого клона, виділеного з фагової бібліотеки, який не зв'язує Notch2. (B) FACS-аналіз блокування зв'язування ліганду (JAG1) фрагментом Fab 59R1. "Клон 1" є Fab 59R1, який, як було показано, блокує зв'язування злиття hJagged1 ECD-Fc з Notch2 людини на стабільно трансфікованих клітинах HEK293. "Клон 5" є Fab іншого клона, виділеного з фагової бібліотеки, який не блокував зв'язування ліганду в цьому аналізі. (C) FACS-аналіз зв'язування антитіла IgG2 59R1 IgG2 з Notch2 людини на стабільно трансфікованих клітинах HEK293. (D) FACS-аналіз блокування зв'язування ліганду (DLL4) антитілом IgG2 59R1. Було показано, що антитіло IgG2 59R1 блокує зв'язування злиття hDLL4 ECD-Fc з Notch2 людини на стабільно трансфікованих клітинах HEK293. (E) Стратегія дозрівання афінності для CDR3 важкого ланцюга 59R1. Вихідна послідовність CDR3 важкого ланцюга показана у вигляді боксу. Зміни залишків, що допускаються, показані нижче за цю вихідну послідовність на цій фігурі. (F) Скринінг послідовностей 59R1 із зрілою афінністю на здатність блокування JAG1. Покращувані варіанти вказані стрілками.

Фігура 2. FACS-аналіз перехресної реактивності антитіла IgG2 59R1 з чотирма гомологами Notch людини. Було виявлено, що 59R1 зв'язує hNotch2 і hNotch3 на транзитивно трансфікованих клітинах HEK-293, але не було виявлено, що він виявляє значиме зв'язування з hNotch1 і hNotch4 на тих самих клітинах.

Фігура 3. Картування епітопів антитіла 59R1. (A) Анти-Notch2/3-антитіло 59R1 зв'язується з EGF-повтором 10 Notch2 людини. Супернатант з клітин HEK-293, експресуючих рекомбінантні злиті білки Notch2-Fc з указаними EGF-повторами Notch2 між 1 і 12 (x-вісь), використовували в ELISA з анти-Notch2/3-антитілом 59R1. OD (y-вісь) показала зв'язування антитіла (заштриховані стовпці) лише зі злитими білками Notch2, що містять EGF-повтор 10. (Ця фігура показує дані, отримані з двох окремих експериментів, які показані окремо у верхній і нижній діаграмах). (B) EGF-повтори 11 і 12 не беруть участь у зв'язуванні анти-Notch2/3-антитіла 59R1 з повнорозмірним hNotch2. FACS-аналіз клітин HEK-293, трансфікованих лише зеленим флуоресцентним білком (GFP) (x-вісь) (вгорі зліва) або котрансфікованих GFP і або повнорозмірним інтактним Notch2, або повнорозмірним Notch 2 з делетованим EGF-повтором 11 (ΔEGF11), або з делетованим EGF-повтором 12 (ΔEGF12). Зв'язування 59R1 показано вздовж y-осі (PE) зі всіма трьома білками Notch2 в GFP-експресуючих клітинах. (C) EGF-повтор 10 бере участь у зв'язуванні анти-Notch2/3-антитіла 59R1 з повнорозмірним hNotch2, але не у зв'язуванні ліганду. Зв'язування анти-Notch2-антитілом 59M70, яке зв'язується з EGF 1-4 hNotch2, вказано як "анти-Notch2-зв'язування". Зв'язування DLL4 вказане як "зв'язування ліганду".

Фігура 4. Анти-Notch2/3-антитіло 59R1 інгібує передачу сигналу Notch2 в аналізах з люциферазою як репортер. (A) 59R1 блокує hDLL4-індуковану репортерну активність Notch2. (B) 59R1 блокує hJAG1-індуковану репортерну активність Notch2. (C) 59R1 блокує hJAG2-індуковану репортерну активність Notch2.

Фігура 5. Антитіло 59R1 проти Notch2/3-рецепторів інгібує утворення пухлини і зростання пухлини in vivo. (A) Анти-Notch2/3 (59R1) інгібує утворення пухлин молочної залози Pe13. Мишей NOD/SCID, ін'єктованих пухлинними клітинами молочної залози PE13, обробляли контрольним антитілом (квадрати) або анти-Notch2/3-антитілом 59R1 (білі трикутники) через два дні після ін'єкції клітин і об'єм пухлини (y-вісь, мм³) вимірювали впродовж часу (x-вісь, дні після ін'єкції клітин). Обробка антитілами 59R1 значимо інгібувала утворення пухлин порівняно з контролем (p < 0,001). (B) Анти-Notch2/3 (59R1) інгібує утворення пухлин молочної залози T3. Мишей NOD/SCID, ін'єктованих пухлинними клітинами молочної залози T3, обробляли контрольним антитілом (квадрати) або анти-Notch2/3-антитілом 59R1 (білі трикутники) через два дні після ін'єкції клітин і об'єм пухлини (y-вісь, мм³) вимірювали впродовж часу (x-вісь, дні

після ін'єкції клітин). Обробка антитілами 59R1 значимо інгібувала утворення пухлин порівняно з контролем ($p < 0,001$). (C) Анти-Notch2/3 (59R1) інгібує зростання пухлини ободової кишки Colo-205. 6-8-тижневих імунodefіцитних самок мишей bg/nu XID на фенотипі Swiss CD-1, ін'єктованих контрольним антитілом (квадрати) або анти-Notch2/3-антитілом 59R1 (ромби) після того, як об'єм пухлин досягав розміру 65-200 мм³. Середній розмір пухлин (у-вісь, мм³) вимірювали впродовж часу (х-вісь, дні після ін'єкції клітин). Обробка антитілами 59R1 інгібувала утворення пухлин порівняно з контролем ($***p < 0,01$ після дня 40). (D) Анти-Notch2/3 (59R1) інгібує зростання пухлини підшлункової залози PN4. Мишей NOD/SCID, ін'єктованих пухлинними клітинами підшлункової залози PN4, обробляли контрольним антитілом (квадрати) або анти-Notch2/3-антитілом 59R1 (ромби) після того, як об'єм пухлин досягав розміру 65-200 мм³. Середній розмір пухлин (у-вісь, мм³) вимірювали впродовж часу (х-вісь, дні після ін'єкції клітин). Обробка антитілами 59R1 інгібувала утворення пухлин порівняно з контролем ($***p < 0,001$ після дня 70). (E) Анти-notch2/3 (59R1) інгібує зростання пухлини молочної залози PE13. Мишей NOD/SCID, ін'єктованих пухлинними клітинами молочної залози PE13, обробляли контрольним антитілом (квадрати) або анти-Notch2/3-антитілом 59R1 (ромби) після того, як об'єм пухлин досягав розміру 65-200 мм³. Середній розмір пухлин (у-вісь, мм³) вимірювали впродовж часу (х-вісь, дні після ін'єкції клітин). Обробка антитілами 59R1 інгібувала утворення пухлин порівняно з контролем ($*p < 0,05$ після дня 57). (F) Анти-Notch2/3 (59R1) інгібує зростання пухлини молочної залози PE13. Мишей NOD/SCID, ін'єктованих пухлинними клітинами молочної залози T3, обробляли контрольним антитілом (чорні стовпці) або анти-Notch2/3-антитілом 59R1 (білі стовпці) після того, як об'єм пухлин досягав розміру 65-200 мм³. Середній розмір пухлин (у-вісь, мм³) вимірювали в дні 18, 25, 39 і 42 після ін'єкції клітин). Обробка антитілами 59R1 інгібувала зростання пухлин порівняно з контролем ($***p < 0,001$ на день 42).

Фігура 6. Анти-Notch2/3-антитіло 59R1 затримує рецидив пухлини молочної залози B51 після обробки паклітакселом.

Фігура 7. Анти-Notch2/3-антитіло 59R1 зменшує стрівальність ракових стовлових клітин в пухлині молочної залози B51.

Фігура 8. У комбінації з гемцитабіном, анти-Notch2/3-антитіло 59R1 інгібує зростання пухлини підшлункової залози PN4.

Фігура 9. Анти-Notch2/3-антитіло 59R1 інгібує зростання пухлини в моделі ксенотрансплантату меланоми M4.

Фігура 10. Анти-Notch2/3-антитіло 59R1 інгібує зростання пухлини ободової кишки C28 окремо й у комбінації з іринотеканом.

Фігура 11. IgG2-антитіло 59R1 значимо інгібує зростання встановлених пухлинних ксенотрансплантатів людини in vivo. Встановлені пухлини Colo-205 (A), C8 (B), PN8 (C), B34 (D), B39 (E), B44 (F), PE-13 (G) і T1 (H) (s.c, n=10 на одну групу) обробляли при 15 мг/кг один раз на тиждень указаними антитілами (контрольне антитіло 1B711, LZ-1, чорні квадрати; 59R1, чорні трикутники; AVASTIN, чорні кола; AVASTIN+59R1, чорні ромби). Об'єм пухлини (х-вісь) побудований упродовж часу (у-вісь). У моделі ксенотрансплантату Colo-205, комбінована терапія 59R1 з AVASTIN була значимо ефективнішою, ніж у разі окремої обробки кожним антитілом. На фігурах 11B-11H, зірочки вказують значиме значуще інгібування зростання пухлини в указаний день: *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$, t-критерій Стьюдента; символи, середнє; стрижні помилок, SEM.

Фігура 12. Відносні рівні експресії вибраних генів значимо регулюються обробкою 59R1 в різних моделях пухлинних ксенотрансплантатів. Рівні експресії HEYL (A), Notch3 (B), RGS5 (C), ANGPT1 (D) і ANGPT2 (E) окремо тестували за допомогою TaqMan®-аналізу з тестованих раніше моделей ксенотрансплантатів. Примітно, що відсутність естрогену (ne) усуває дію 59R1 у зменшенні експресії ANGPT1 і ANGPT2 в стромі хазяїв T1-несучих мишей. Білі кола відповідають індивідуальним аналізованим пухлинам. Горизонтальна лінія, середнє.

Фігура 13. Ген-супресор пухлини PTEN делетований у багатьох пухлинах молочної залози, в яких 59R1 виявляв протипухлинну ефективність. Показані екзон PTEN, розподіл зонда Affymetrix і делеції в гені PTEN у хромосомі 10. Товсті й тонкі сірі стрижні показують гомозиготні й гетерозиготні делеції фрагментів хромосоми, відповідно.

Фігура 14. Картування епітопів антитіла 59R1. (A) Зіставлення білків гомологів Notch людини. Зіставлення виконували з використанням програмного забезпечення Clone Manager. Показані EGF10-повтор Notch1, Notch2 і Notch4 і еквівалентний EGF у Notch3 людини, EGF9. Ділянка в боксі показує область, що містить одну або декілька амінокислот, які складають щонайменше частину епітопа 59R1, як визначено FACS-зв'язуванням антитіла IgG2 59R1 з мутантом hNotch2 H385N AL 388-89 SN (фігура 14B) і з конструкцією hNotch1, в якій амінокислоти (aa) 382-386 були мutowані для відповідності з послідовністю hNotch2 (фігура 14C). (B) Антитіло IgG2 59R1

зв'язується зі з hNotch2, але не з мутантом hNotch2, в якому деякі залишки EGF10 були мutowані в залишки hNotch1 (H385N AL 388-89 SN). (C) Антитіло IgG2 59R1 не зв'язується з hNotch1, але зв'язується з мутантом hNotch1, у якому деякі залишки EGF10 (aa 382-387) були мutowані для відповідності із залишками hNotch2 385-389.

5 Фігура 15. In vitro характеристика 59R5. (A) Фігура 15A показує, що антитіло 59R5 здатне блокувати ліганд-індуковану передачу сигналу Notch2 і Notch3. Пухлинні клітини PC3 транзитивно трансфікували Notch-рецептором людини або миші (hN2, Notch2 людини; mN2, мишачий Notch2; hN3, Notch3 людини; mN3, мишачий Notch3) і GFP-індукованою репортерною конструкцією. Трансфіковані клітини інкубували з різними концентраціями антитіла 59R1 і 59R5 у присутності пасивно іммобілізованого DLL4 Fc. (B) Фігура 15B показує, що 59R5 зв'язується з епітопом, схожим з епітопом, з яким зв'язується 59R1. Клітини HEK-293 транзитивно трансфікували експресуючими векторами, кодуєчими Notch2 людини, Notch1 людини або Notch1 людини із залишками 382-386, мutowаними у відповідні залишки Notch2 людини. Клітини котрансфікували також з плазмідною, що кодує зелений флуоресцентний білок (GFP), для маркування клітин, які отримали трансфіковану плазмиду. Клітини інкубували з 59R1 або 59R5 і флуоресцентним вторинним антитілом і потім випробовували за допомогою FACS. Області, виділені боксами, дозволяють передбачити, що клітини, трансфіковані вказаним експресуючим Notch вектором, були здатні зв'язуватися з 59R1 або 59R5.

Фігура 16. Анти-Notch-рецептор-антитіло 59R5 інгібує утворення й зростання пухлин in vivo. 20 Фігура 16A показує обробку in vivo клітин пухлини молочної залози P13 антитілом 59R5. Фігура 16 показує обробку in vivo клітин ободової кишки C28 антитілом 59R5. Фігура 16C показує обробку in vivo клітин ободової кишки Colo205 антитілом 59R5.

Фігура 17. Обробка in vivo пухлин з використанням Notch2/3-антитіла 59R5 в комбінованій терапії. (A) Мишей ін'єктували пухлинними клітинами підшлункової залози PN8. Пухлинам давали зростати протягом 33 днів, поки вони не досягали середнього об'єму 120 мм³. Цих тварин лікували гемцитабіном при 20 мг/кг один раз на тиждень протягом чотирьох тижнів у комбінації або з контрольним Ab (квадрати), 59R1 (трикутники), або 59R5 (кола). (B) Мишей ін'єктували пухлинними клітинами молочної залози Pe13. Пухлинам давали зростати протягом 40 днів перед початком терапії. Тварин лікували ТАКСОЛОМ при 15 мг/кг двічі на тиждень протягом 5 тижнів, плюс або контрольним антитілом (квадрати), або 59R5 (кола). Через 5 тижнів, лікування ТАКСОЛОМ припиняли, а лікування антитілом продовжували.

Фігура 18. Регуляція експресії генів у пухлинах після лікування антитілом 59R5. Фігура 18 показує рівні експресії вибраних генів у стромальних клітинах і вибраних генів людини в пухлинних клітинах Pe13 після лікування 59R1, 59R5 або контрольним антитілом.

35 Фігура 19. Зменшення стрівальності стоволових клітин раку молочної залози Pe13 з використанням 59R1. (A) Встановлені пухлини обробляли контрольним антитілом, таксоллом плюс контрольним антитілом, 59R1, або таксоллом плюс 59R1. Пухлини збирали після трьох тижнів обробки, обробляли, і серійні розведення клітин людини з кожної з цих чотирьох груп обробки трансплантували в нову партію мишей (n=10 на дозу клітин). Швидкість зростання пухлини визначали через 75 днів. Швидкість росту пухлини після 75 днів зростання використовували для розрахунку стрівальності (частоти) CSC з використанням програми L-calc (Stem Cell Technologies, Inc.). (B) Стрівальність (частота) ракових стоволових клітин у пухлинах молочної залози Pe13 після обробки 59R1 і/або таксоллом. (C) Стрівальність (частота) ракових стоволових клітин у пухлинах підшлункової залози PN4 після обробки 59R1 і/або гемцитабіном. 45 (D) Стрівальність (частота) ракових стоволових клітин у пухлинах молочної залози Pe13 після обробки 59R5 і/або таксоллом. Єдина зірочка вказує статистично значиму відмінність (p<0,05) порівняно з обробленою контрольним антитілом групою й подвійна зірочка вказує значиму відмінність порівняно з обробленою таксоллом і контрольним антитілом групою.

ДЕТАЛЬНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

50 Даний винахід забезпечує нові агенти, але не обмежується поліпептидами, такими як антитіла, які зв'язуються з одним або декількома Notch-рецепторами людини, такими як Notch2 і/або Notch3. Ці Notch-зв'язуючі агенти включають антагоністи Notch-рецептора (Notch-рецепторів) людини. Забезпечені також родинні поліпептиди й полінуклеотиди, композиції, що містять Notch-зв'язуючі агенти, і способи одержання цих Notch-зв'язуючих агентів. Крім того, 55 забезпечені способи застосування цих нових Notch-зв'язуючих агентів, такі як способи інгібування зростання пухлини, інгібування ангиогенезу й/або лікування раку або іншого пов'язаного з ангиогенезом захворювання.

Далі, даний винахід ідентифікує молекули (наприклад, антитіла), які специфічно зв'язуються із незв'язуючою ліганд областю позаклітинного домену Notch-рецептора людини, та інгібує 60 зростання пухлини in vivo. Лігандзв'язуюча область Notch, яка є необхідною і достатньою для

зв'язування ліганду, була ідентифікована як EGF-повтори 11 і 12, що дозволяє передбачити, що ця область Notch-реципієнта є важливою в передачі сигналу Notch й онкогенезі (Rebay et al., 1991, Cell 67:687; Lei et al., 2003, Dev. 130:6411; Hambleton et al., 2004, Structure 12:2173). Несподівано було виявлено, що антитіла, які зв'язують Notch-рецептор людини зовні

лігандзв'язуючого домену, інгібують зростання пухлинних клітин *in vivo* (див. Публікацію патенту США № 2008/0131434, включену в даний опис як посилання в повному обсязі). Таким чином, антитіла, які зв'язують зовні лігандзв'язуючого домену позаклітинного домену один або декілька з Notch-рецепторів людини, - Notch1, Notch2, Notch3 і Notch4 - є важливими як потенційні терапевтичні агенти проти раку.

Тепер було ідентифіковано антитіло, яке специфічно зв'язується епітопом, що містить залишки в EGF-повторі 10 Notch2 людини (приклади 1 і 3 і фігури 3A-3C). Це антитіло, 59R1, інгібуює зв'язування ліганду з Notch2 (приклад 1 і фігури 1A-1D) і інгібуює індуковану лігандом передачу сигналу Notch2 (приклад 4 і фігура 4A-4C), попри зв'язування з Notch2 в області поза зв'язуючим ліганд районом. 59R1 специфічно зв'язує також Notch3 людини (приклад 2 і фігура 2). Було виявлено, що це антитіло запобігає або інгібуює зростання пухлини *in vivo* в різних моделях ксенотрансплантатів, або окремо, або в комбінації з другим протираковим агентом (приклади 5, 6, 7 і 9 і фігури 5A-F, 6, 8-10 і 11A-H). Було також показано, що це антитіло зменшує онкогенність пухлини *in vivo* в множинних моделях ксенотрансплантатів зменшенням стривальності (частоти) ракових стоволових клітин (приклади 8 і 23 і фігури 7 і 19A-C). Крім того, було виявлено, що обробка 59R1 знижуючим чином регулює експресію RGS5 (маркера для перицитів і/або клітин гладких м'язів судин), Notch3 і HEYL в стромі різних пухлин (приклад 10 і фігури 12A-E) і підвищуючим чином регулює гіпоксію в разі раку молочної залози й раку ободової кишки (приклад 11). Без зв'язування себе з якою-небудь теорією, автори винаходу вважають, що ці дані вказують на те, що антитіло 59R1 надає інгібуючу дію на ангиогенез пухлини, яка обумовлена, щонайменше частково, на модуляції функції перицитів і/або клітин гладких м'язів судин. Було виявлено також, що обробка 59R1 регулює також додаткові гени в пухлинах молочної залози. Було виявлено, що шляхи генів клітинного циклу, тус-активуючих генів і декілька наборів генів стоволових клітин знижуючим чином регулюються 59R1 (приклад 22).

Було досліджено також додаткове антитіло людини, 59R5. 59R5 має властивості, які схожі з властивостями 59R1, такі як схожа афінність зв'язування з Notch2 і Notch3 і схожість або перекривання в їх епітопах (приклад 13 і фігура 15B). Було показано, що антитіло 59R5 має схожу активність з активністю 59R1 в блокуванні передачі сигналу Notch2 і Notch3 (приклад 13 і фігура 15A). Було також показано, що антитіло 59R5 інгібуює зростання пухлини *in vivo* в декількох моделях ксенотрансплантатів, або окремо, або в комбінації з другим протираковим агентом (приклади 14 і 15 і фігури 16A-C і 17A-B). Крім того, було виявлено, що обробка 59R5, подібне 59R1, знижуючим чином регулює експресію RGS5, Notch3 і HeyL у стромі різних пухлин, і було виявлено, що 59R5 регулює експресію генів людини ID4, EDNRA і EGLN3 в пухлинних клітинах в мірі, схожій з мірою, що виявляється 59R1 (приклад 16). Крім того, було показано, що 59R5 зменшує онкогенність *in vivo* в моделі ксенотрансплантату зменшенням стривальності (частоти) ракових стоволових клітин (приклад 23 і 19D).

Визначення

"Антагоніст" Notch-рецептора є терміном, який включає будь-яку молекулу, яка частково або повністю блокує, інгібуює або нейтралізує біологічну активність шляху Notch. Відповідні молекули антагоністів включають конкретно антитіла-антагоністи або фрагменти антитіл-антагоністів.

Термін "антитіло" позначає молекулу імуноглобуліну, яка розпізнає мішень і специфічно зв'язується з мішенню, як-от білок, поліпептид, пептид, вуглевод, полінуклеотид, ліпід або їх комбінації, за допомогою щонайменше одного сайту розпізнавання антигену у варіабельній області цієї молекули імуноглобуліну. В даному контексті цей термін включає інтактні поліклональні антитіла, інтактні моноклональні антитіла, фрагменти антитіл (такі як фрагменти Fab, Fab', F(ab')₂ і Fv), одноланцюгові мутанти Fv (scFv), мультиспецифічні антитіла, такі як біспецифічні антитіла, що генеруються щонайменше з двох інтактних антитіл, злиті білки, що містять частину, яка є антитілом, і будь-яку іншу модифіковану молекулу імуноглобуліну, що містить сайт розпізнавання антитіла, поки ці антитіла виявляють бажану біологічну активність. Антитіло може бути антитілом будь-якого з п'яти основних класів імуноглобулінів: IgA, IgD, IgE, IgG і IgM, або їх підкласів (ізотипів) (наприклад, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 і IgA2), на основі ідентичності їхніх константних доменів важкого ланцюга, названих альфа, дельта, епсилон, гамма і мю, відповідно. Ці різні класи імуноглобулінів мають різні й добре відомі субодиничні структури і тривимірні конфігурації. Антитіла можуть бути голими або можуть бути кон'юговані з іншими молекулами, такими як токсини, радіоізотопи тощо.

У даному контексті, термін "фрагмент антитіла" означає частину інтактного антитіла й відноситься до антигеновизначних варіабельною областю інтактного антитіла. Приклади фрагментів антитіл включають, але не обмежуються ними, фрагменти Fab, Fab', F(ab')₂ і Fv, лінійні антитіла, одноланцюгові антитіла й мультиспецифічні антитіла, утворені з фрагментів антитіл.

"Fv-антитілом" називають мінімальний фрагмент антитіла, який містить повний сайт розпізнавання і зв'язування антигену або у вигляді двох ланцюгів, у яких один варіабельний домен важкого ланцюга й одна варіабельна область легкого ланцюга утворюють нековалентний димер, або у вигляді єдиного ланцюга (scFv), в якому один варіабельний домен важкого ланцюга й одна варіабельна область легкого ланцюга ковалентно зв'язані за допомогою гнучкого пептидного лінкера, так що ці два ланцюги асоціюються в схожій димірній структурі. В цій конфігурації визначальні комплементарність області (CDR) кожного варіабельного домену взаємодіють з визначенням антигензв'язуючої специфічності цього Fv-димеру. Альтернативно, єдиний варіабельний домен (або половина Fv) може бути використаний для розпізнавання й зв'язування антигена, хоча зазвичай з нижчою афінністю.

"Моноклональним антитілом" називають у даному контексті гомогенну популяцію антитіл, що беруть участь у високоспецифічному розпізнаванні й зв'язуванні єдиної антигенної детермінанти, або епітопа. Це знаходиться в протиріччі з поліклональними антитілами, які зазвичай включають різні антитіла, спрямовані проти різних антигенних детермінант. Термін "моноклональне антитіло" включає як інтактні, так і повнорозмірні моноклональні антитіла, а також фрагменти антитіл (такі як Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), одноланцюгові мутанти (scFv), злиті білки, що містять частину, яка є антитілом, і будь-яку іншу модифіковану молекулу імуноглобуліну, що містить сайт розпізнавання антитіла. Крім того, "моноклональним антитілом" називають такі антитіла, отримані будь-яким з ряду способів, у тому числі, але не лише, з використанням гібридом, фагового відбору, рекомбінантної експресії й трансгенних тварин.

У даному контексті, термін "гуманізоване антитіло" стосується форм антитіл не людини (наприклад, мишастих), які є конкретними ланцюгами імуноглобулінів, химерними імуноглобулінами або їхніми фрагментами, які містять мінімальні послідовності не людини. Зазвичай, гуманізовані антитіла є імуноглобулінами людини, в яких залишки з визначальної комплементарності області (CDR) замінені залишками з CDR виду, що не є людиною (наприклад, миші, щура, кролика, хом'яка тощо), які мають бажані специфічність, афінність і потенційну ефективність. У деяких варіантах здійснення, залишки каркасної області Fv (FR) імуноглобуліну людини замінують відповідними залишками в антитілі з виду не людини, які мають бажані специфічність, афінність і потенційну ефективність. Це гуманізоване антитіло може бути додатково модифіковане заміною додаткового залишку або в каркасній області Fv, і/або в заміненіх залишках не людини для очищення й оптимізації специфічності, афінності й/або потенційної ефективності (здатності зв'язування) антитіла. Зазвичай, гуманізоване антитіло міститиме по суті всі з по меншій мірі одного й зазвичай двох або трьох варіабельних доменів, що містять всі або по суті все з CDR-районів, які відповідають імуноглобуліну не людини, тоді як всі або по суті всі з FR-районів є FR-районами консенсусної послідовності імуноглобуліну людини. Це гуманізоване антитіло може містити також щонайменше частину константної області або домену імуноглобуліну Fc, зазвичай частину імуноглобуліну людини. Приклади способів, використовуваних для продукування гуманізованих антитіл, описані в Патенті США № 5225539, включеному в даний опис як посилання.

"Варіабельною областю" антитіла називають варіабельну область легкого ланцюга антитіла або варіабельну область важкого ланцюга антитіла, окремо або в комбінації. Варіабельні області важкого ланцюга й легкого ланцюга, кожна, складаються з чотирьох каркасних областей (FR), сполучених трьома визначальними комплементарними областями (CDR), відомими також як гіперваріабельні області. Ці CDR в кожному ланцюзі утримуються разом у тісній близькості за допомогою цих FR і, з CDR з іншого ланцюга, сприяють утворенню антигензв'язуючого сайту антитілу. Є щонайменше два способи для визначення CDR: (1) підхід на основі перехресно-видової варіабельності послідовності (тобто Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest (5th ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda Md.)); і (2) підхід на основі кристалографічних досліджень комплексів антиген-антитіло (Al-lazikani et al 1997, J. Molec. Biol. 273:927-948)). Крім того, для визначення CDR інколи використовують комбінації цих двох підходів.

Термін "антитіло людини" позначає в даному контексті антитіло, що продукується людиною, або антитіло, що має амінокислотну послідовність, відповідну антитілу, що продукується людиною, отримане з використанням будь-якого з відомих в даній галузі способів. Це визначення антитіла людини включає інтактні або повнорозмірні антитіла, їхні фрагменти і/або

антитіла, що містять щонайменше один поліпептид важкого і/або легкого ланцюга, наприклад антитіло, що містить поліпептиди мишачого легкого ланцюга й важкого ланцюга людини.

"Гібридні антитіла" є молекулами імуноглобулінів, у яких пари важкого й легкого ланцюгів з антитіл з різними областями антигенних детермінант зібрані разом, так що отриманий тетрамер може впізнавати два різні епітопи або два різні антигени й зв'язуватися з ними.

Термін "химерні антитіла" стосується антитіл, у яких амінокислотна послідовність молекули імуноглобуліну вироблена з двох або більш видів. Зазвичай, варіабельна область як легкого ланцюга, так і важкого ланцюга відповідає варіабельній області антитіл, отриманих з одного виду ссавців (наприклад, миші, щура, кролика тощо) з бажаними специфічністю, афінністю й потенційною ефективністю, тоді як константні області є гомологічними з послідовностями в антитілах, отриманих з іншого виду (зазвичай людини), щоб уникнути індукції імунної реакції в цьому вигляді.

Термін "епітоп" або "антигенна детермінанта" використовуються тут взаємозамінно й стосуються частини антигена, здатної впізнаватися й специфічно зв'язуватися конкретним антитілом. Коли цей антиген є поліпептидом, епітопи можуть бути утворені як з суміжних амінокислот, так і несуміжних амінокислот, приведених у безпосереднє сусідство третинним укладанням білка. Епітопи, утворені з суміжних амінокислот, зазвичай зберігаються після денатурації білка, тоді як епітопи, утворені третинним укладанням, зазвичай втрачаються після денатурації білка. Епітоп зазвичай включає щонайменше 3 і, частіше, щонайменше 5 або 8-10 амінокислот в унікальній просторовій конформації.

Конкуренцію між антитілами визначають аналізом, в якому досліджуваний імуноглобулін інгібує специфічне зв'язування посиляльного антитіла із загальним антигеном. Відомі багаточисельні типи аналізів конкурентного зв'язування, наприклад: твердофазний прямий або непрямий радіоімуноаналіз (RIA), твердофазний прямий або непрямий ферментний імуноаналіз (EIA), конкурентний сендвіч-аналіз (див. Stahli et al., 1983, *Methods in Enzymology* 9:242-253); твердофазний прямий, що використовує біотин-авідин EIA (див. Kirkland et al., *J. Immunol.* 1986, 137:3614-3619); твердофазний прямий аналіз з використанням мітки, твердофазний прямий сендвіч-аналіз з використанням мітки (див. Harlow and Lane, 1988, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press); твердофазний прямий RIA, що використовує ¹²⁵I як мітку (див. Morel et al., 1988, *Molec. Immunol.* 25(1):7-15); твердофазний прямий, що використовує біотин-авідин EIA (Cheung et al., 1990, *Virology* 176:546-552); і прямий радіоімуноаналіз RIA (Moldenhauer et al., 1990, *Scand. J. Immunol.* 32:77-82). Зазвичай, такий аналіз включає використання очищеного антигена, пов'язаного з твердою поверхнею, або клітин, що несуть будь-який з неміченого тестованого імуноглобуліну й міченого посиляльного імуноглобуліну. Конкурентне інгібування вимірюють визначенням кількості мітки, зв'язаної з цією твердою поверхнею, або клітин у присутності тестованого імуноглобуліну. Зазвичай, тестований імуноглобулін присутній у надлишку. Антитіла, ідентифіковані конкурентним аналізом (конкуруючи антитіла), включають антитіла, що зв'язуються з тим самим епітопом, що й посиляльне антитіло, й антитіла, що зв'язуються з суміжним епітопом, досить проксимальним відносно епітопа, що зв'язується посиляльним антитілом, для виникнення стеричної невідповідності. Зазвичай, коли конкуруюче антитіло присутнє в надлишку, воно інгібуватиме специфічне зв'язування посиляльного антитіла із загальним антигеном щонайменше на 50 або 75 %.

Те, що антитіло "селективно зв'язується" або "специфічно зв'язується" з епітопом або рецептором, означає, що це антитіло асоціюється частіше, з більшою тривалістю, з більшою афінністю або з будь-якою комбінацією вищезгаданого з епітопом або рецептором, ніж з альтернативними послідовностями, в тому числі сторонніми білками. "Селективно зв'язується" або "специфічно зв'язується" означає, наприклад, що антитіло зв'язується з білком з KD приблизно 0,1 мМ або менше, частіше приблизно 1 мкМ або менше. Інколи "селективно зв'язується" або "специфічно зв'язується" означає, що антитіло зв'язується з білком з KD приблизно 0,1 мМ або менше, інколи приблизно 1 мкМ або менше, інколи приблизно 0,1 мкМ або менше, інколи приблизно 0,01 мкМ або менше й інколи приблизно 1 нМ або менше. Внаслідок ідентичності послідовності між гомологічними білками в різних видах, специфічне зв'язування може включати антитіло, яке розпізнає Notch-рецептор у більш ніж одному вигляді. Так само, внаслідок гомології між різними Notch-рецепторами (наприклад, Notch2 і Notch3) у деяких областях поліпептидної послідовності цих рецепторів, специфічне зв'язування може включати антитіло, яке розпізнає більш ніж один Notch-рецептор. Зрозуміло, що, в деяких варіантах здійснення, антитіло або зв'язуюча частина, яка специфічно розпізнає першу мішень, може специфічно зв'язуватися або не може специфічно зв'язуватися з другою мішенню. Саме по собі, "специфічне зв'язування" не вимагає обов'язково (хоча воно може включати його)

ексклюзивного зв'язування, тобто зв'язування з єдиною мішенню. Таким чином, антитіло може, в деяких варіантах здійснення, специфічно зв'язуватися з більш ніж однією мішенню (наприклад, Notch2 і Notch3 людини). У деяких варіантах здійснення, множинні мішені можуть бути зв'язані одним і тим же антигензв'язуючим сайтом на цьому антитілі. Наприклад, антитіло, в деяких випадках, може містити два ідентичних антигензв'язуючих сайти, кожен з яких специфічно зв'язує два або більш за Notch-рецепторів людини (наприклад, Notch2 і Notch3 людини). В деяких альтернативних варіантах здійснення, антитіло може бути біспецифічним і містити щонайменше два антигензв'язуючих сайти зі специфічностями, що розрізняються. Як необмежуючий приклад, біспецифічне антитіло може містити один антигензв'язуючий сайт, який розпізнає епітоп на одному Notch-рецепторі, такому як Notch2 людини, і, крім того, містить другий, відмінний антигензв'язуючий сайт, який розпізнає інший епітоп на другому Notch-рецепторі, такому як Notch3 людини. Зазвичай, але необов'язково, посилання на "зв'язування" означає в даному описі "специфічне зв'язування".

У даному контексті, терміни "неспецифічне зв'язування" і "фонове зв'язування" при використанні в посиланні на взаємодію антитіла й білка або пептиду відносяться до взаємодії, яка не залежить від присутності конкретної структури (тобто антитіло зв'язується з білками взагалі, а не з конкретною структурою, як-от епітоп).

Терміни "виділений" або "очищений" відносяться до матеріалу, який по суті або в основному вільний від компонентів, які в нормі супроводять його в його нативному стані. Чистоту й гомогенність визначають зазвичай з використанням способів аналітичної хімії, таких як електрофорез у поліакриламідному гелі або високоефективна рідинна хроматографія. Білок (наприклад, антитіло) або нуклеїнова кислота, які є переважаючими молекулами, присутніми в препараті, є по суті очищеними. Зокрема, виділена нуклеїнова кислота відокремлена від відкритих рамок прочитування, які природно фланкують ген і кодують білки, інші, ніж білки, що кодуються цим геном. Виділене антитіло відокремлене від інших білків-неімуноглобулінів і від білків-імуноглобулінів з іншою специфічністю зв'язування антигена. Ці терміни можуть також означати, що ця нуклеїнова кислота або білок є на 85 % чистими, щонайменше на 95 % чистими і, в деяких варіантах, щонайменше на 99 % чистими.

У даному контексті, терміни "рак" і "ракові" відносяться до фізіологічного стану або описують фізіологічний стан у ссавців, в якому популяція клітин характеризується неконтрольованим зростанням клітин. Приклади раку включають, але не обмежуються ними, карциному, лімфому, бластоми, саркому й лейкоз. Конкретніші приклади таких раків включають плоскоклітинний рак, дрібноклітинний рак легені, недрібноклітинний рак легені, аденокарциному легені, плоскоклітинну карциному легені, рак очеревини, печінково-клітинний рак, шлунковокишковий рак, рак підшлункової залози, гліобластоми, рак шийки матки, рак яєчників, рак печінки, рак сечового міхура, гепатому, рак молочної залози, рак ободової кишки, колоректальний рак, ендометріальну або маткову карциному, карциному слинних залоз, рак нирки, рак печінки, рак передміхурової залози, рак вульви, рак щитовидної залози, карциному печінки й різні типи раку голови й шиї.

Терміни "проліферативне порушення" й "проліферативне захворювання" відносяться до порушень, що асоціюються з аномальною проліферацією клітин, як-от рак.

Терміни "пухлина" й "неоплазма" відносяться в даному контексті до будь-якої маси тканини, яка походить з надлишкового зростання або проліферації клітин, або доброякісної (неракової), або злоякісної (ракової), в тому числі до передракових пошкоджень.

"Метастазуванням" називають у даному контексті процес, за допомогою якого рак поширюється або переноситься з ділянки походження в інші ділянки тіла з розвитком схожого ракового пошкодження в новому місці розташування. "Метастатична" або "метастазуюча" клітина є клітиною, яка втрачає адгезивні контакти з сусідніми клітинами й мігрує через кровотік або лімфу з первинної ділянки захворювання для інвазії в сусідні структури тіла.

У даному контексті, термін "суб'єкт" відноситься до будь-якої тварини (наприклад, ссавця), в тому числі, але не лише, до людей, приматів (не людей), гризунів тощо, які мають бути реципієнтами конкретного лікування. Зазвичай, терміни "суб'єкт" і "пацієнт" використовуються в даному описі взаємозамінно при посиланні на суб'єкта-людину.

Терміни "ракова стволова клітина" або "пухлинна стволова клітина" або "стволова клітина солідної пухлини" використовуються тут взаємозамінно й відносяться до популяції клітин з солідної пухлини, які: (1) мають екстенсивну проліферативну здатність; 2) здатні до асиметричного ділення клітин з генеруванням одного типу або декількох типів диференційованого потомства із зменшеним потенціалом проліферації й розвитку; і (3) здатні до симетричних ділень клітин для самовідновлення або самопідтримки. Ці властивості "ракових стволових клітин" або "пухлинних стволових клітин" або "стволових клітин солідних пухлин"

додають цим раковим ствольовим клітинам здатність утворювати пальповані пухлини після серійної трансплантації в мишу з послабленим імунітетом порівняно з більшістю пухлинних клітин, які не здатні утворювати пухлини. Ракові ствольові клітини піддаються самовідновленню, порівняно з диференціюванням, хаотичним чином з утворенням пухлин з аномальними типами клітин, які можуть змінюватися в часі, коли відбуваються мутації.

Терміни "ракова клітина" або "пухлинна клітина" та їхні граматичні еквіваленти відносяться до загальної популяції клітин, що походять з пухлини, включають як неонкогенні клітини, які складають основну масу популяції пухлинних клітин, так і онкогенні ствольові клітини (ракові ствольові клітини).

У даному контексті "онкогенний" відноситься до функціональних ознак ствольової клітини солідної пухлини, що включають самовідновлення (що приводить до додаткових онкогенних ствольових клітин) і проліферацію для генерування всіх інших пухлинних клітин (що приводить до диференційованих і, отже, неонкогенних пухлинних клітин), які дозволяють ствольовим клітинам солідної пухлини утворювати пухлину.

У даному контексті, термін "онкогенність" пухлини відноситься до здатності випадкової проби клітин з цієї пухлини утворювати пальповані пухлини після серійної трансплантації мишам з послабленим імунітетом.

У даному контексті, терміни "маркер ствольових клітин раку" або "раковий маркер ствольових клітин" або "маркер ствольових клітин солідної пухлини" відносяться до гену або генів або білка, поліпептиду або пептиду, експресованих цим геном або цими генами, рівень експресії яких, окремо або в комбінації з іншими генами, корелює з присутністю онкогенних ракових клітин порівняно з неонкогенними клітинами. Ця кореляція може бути пов'язана або зі збільшеною, або зі зменшеною експресією цього гену (наприклад, збільшеними або зменшеними рівнями мРНК або пептиду, кодованих цим геном).

Терміни "сигнатура (відмітна ознака) гену ракової ствольової клітини" або "сигнатура (відмітна ознака) гену пухлинної ствольової клітини" або "сигнатура (відмітна ознака) ракової ствольової клітини" використовуються тут взаємозамінно для вказівки сигнатур генів, що включають гени, диференціально експресовані в ракових ствольових клітинах, порівняно з іншими клітинами або популяціями клітин, наприклад, з епітеліальною тканиною нормальної молочної залози. В деяких варіантах здійснення, ці сигнатури гену ракової ствольової клітини містять гени, диференціально експресовані в ракових ствольових клітинах порівняно з нормальним епітелієм молочної залози, за допомогою зміненої в декілька разів, наприклад, удвічі зменшеної й/або збільшеної експресії й, крім того, обмеженої з використанням статистичного аналізу, наприклад, величиною Р t-критерію з використанням множинних проб. У іншому варіанті здійснення, гени, диференціально експресовані в ракових ствольових клітинах, підрозділяються на сигнатури генів ракових ствольових клітин на основі кореляції їх експресії з вибраним геном у комбінації з їх кратною або процентною зміною експресії. Сигнатури ракових ствольових клітин є передбачаючими, як ретроспективно, так і проспективно, відносно аспекту клінічної варіабельності, в тому числі, але не лише, метастазування й загибелі.

Термін "генетичне випробування" відноситься в даному контексті до процедур, за допомогою яких аналізують організацію генетичного матеріалу пацієнта або проби пухлини пацієнта. Цей аналіз може включати детектування ДНК, РНК, хромосом, білків або метаболітів для детектування спадкових або соматичних пов'язаних із захворюванням генотипів або каріотипів для клінічних цілей.

У даному контексті, терміни "біопсія" або "тканина біопсії" відносяться до проби тканини або рідини, яку вилучають з суб'єкта з метою визначення, чи містить ця проба ракову тканину. В деяких варіантах здійснення, тканину або рідину біопсії отримують у тому випадку, коли передбачається, що суб'єкт має пухлину. Потім цю тканину або рідину біопсії випробовують на присутність або відсутність раку.

У даному контексті, "прийнятний фармацевтичний носій" відноситься до будь-якого матеріалу, який при об'єднанні з активним інгредієнтом фармацевтичної композиції, таким як антитіло, дозволяє цьому антитілу, наприклад, збереження його біологічної активності. Крім того, "прийнятний фармацевтичний носій" не запускає імунну реакцію в суб'єкта-реципієнта. Приклади включають, але не обмежуються ними, будь-які зі стандартних фармацевтичних носіїв, таких як забуферений фосфатом сольовий розчин, вода й різні емульсії типу масло у воді. Деякі розчинники для аерозольного або парентерального введення є забуференим фосфатом сольовим розчином або звичайним (0,9 %) сольовим розчином.

Термін "терапевтично ефективна кількість" відноситься до кількості антитіла, пептиду, поліпептиду, полінуклеотиду, малої органічної молекули або іншого лікарського засобу, ефективного для "лікування" захворювання або порушення у суб'єкта або ссавця. В разі раку,

ця терапевтично ефективна кількість лікарського засобу може зменшувати кількість ракових клітин, зменшувати розмір пухлини; інгібувати або зупиняти інфільтрацію ракових клітин у периферичні органи; інгібувати й зупиняти метастазування пухлини; інгібувати або зупиняти зростання пухлини; послаблювати в деякій мірі один або декілька симптомів, що асоціюються з раком, або комбінацію таких ефектів на ракових клітинах. Що стосується міри, з якою лікарський засіб запобігає зростанню і/або вбиває існуючі ракові клітини, ця міра може називатися цитостатичною й/або цитотоксичною.

Такі терміни, як "лікування" або "обробка" або "лікувати" або "полегшення" або "полегшувати" відносяться як до 1) терапевтичних заходів, які лікують, пом'якшують, зменшують симптоми і/або затримують прогрес діагностованого патологічного стану або порушення, так і до 2) профілактичних або превентивних заходів, які запобігають або уповільнюють розвиток даного патологічного стану або порушення. Таким чином, суб'єкти, що потребують лікування, включають суб'єктів, що вже мають це порушення; суб'єктів, схильних до виникнення цього порушення, і суб'єктів, у яких цьому порушенню мають запобігти. В деяких варіантах здійснення суб'єкт успішно лікується від раку відповідно до способів даного винаходу, якщо цей пацієнт виявляє один з наступних результатів: зменшення в кількості або повна відсутність ракових клітин; зменшення розміру пухлини; інгібування або відсутність інфільтрації ракових клітин у периферичні органи, в тому числі поширення раку в м'які тканини й кістки; інгібування або повна відсутність метастазування пухлини; інгібування або відсутність зростання пухлини; полегшення одного або декількох симптомів, що асоціюються з цим конкретним раком; зменшену хворобливість і смертність; і поліпшення якості життя. Таким чином, у деяких варіантах здійснення лікування раку передбачає інгібування зростання пухлини в суб'єкта.

У даному контексті, терміни "полінуклеотид" або "нуклеїнова кислота" відносяться до полімеру, що складається з безлічі нуклеотидних елементарних ланок (рибонуклеотиду або дезоксирибонуклеотиду або родинних структурних варіантів), зв'язаних через фосфодієфірні зв'язки, в тому числі, але не лише, ДНК або РНК. Цей термін включає послідовності, які включають будь-який з відомих аналогів основ ДНК і РНК, що включають, але не обмежуються ними, 4-ацетилцитозин, 8-гідрокси-N6-метиладенозин, азиридинілцитозин, псевдоізоцитозин, 5-(карбоксигідроксиметил)урацил, 5-фторурацил, 5-бром урацил, 5-карбоксиметиламінометил-2-тіоурацил, 5-карбоксиметиламіно-метилурацил, дигідроурацил, інозин, N6-ізопентеніладенін, 1-метиладенін, 1-метилпсевдоурацил, 1-метилгуанін, 1-метилінозин, 2,2-диметилгуанін, 2-метиладенін, 2-метилгуанін, 3-метилцитозин, 5-метилцитозин, N6-метиладенін, 7-метилгуанін, 5-метиламінометилурацил, 5-метоксіамінометил-етоксіамінометил-2-тіоурацил, бета-D-манозилквеозин, 5'-метоксикарбоніл-метилурацил, 5-метоксіурацил, 2-метилтіо-N6-ізопентеніладенін, метиловийметил-індіго ефір урацил-5-оксіоцтової кислоти, урацил-5-оксіоцтову кислоту, оксибутоксозин, псевдоурацил, квеозин, 2-тіоцитозин, 5-метил-2-тіоурацил, 2-тіоурацил, 4-тіоурацил, 5-метилурацил, метиловийметил-індіго ефір N-урацил-5-оксіоцтової кислоти, урацил-5-оксіоцтову кислоту й 2,6-діамінопурін.

Термін "ген" відноситься до послідовності нуклеїнової кислоти (наприклад, ДНК), яка містить кодуєчі послідовності, необхідні для одержання поліпептиду, попередника або РНК (наприклад, рРНК, тРНК). Цей поліпептид може кодуватися повнорозмірною кодуєчою послідовністю або будь-якою частиною цієї кодуєчої послідовності, поки зберігаються бажана активність або функціональні властивості (наприклад, ферментативна активність, зв'язування ліганду, трансдукція сигналу, імуногенність тощо) повнорозмірного поліпептиду або фрагмента. Цей термін включає кодуєчу область структурного гену й послідовності, розташовані суміжно з кодуєчою областю на обох кінцях 5' і 3' на відстані приблизно 1 т.п.н. або більше від будь-якого кінця, так що цей ген відповідає довжині повнорозмірної мРНК. Послідовності, розташовані 3' (праворуч) від кодуєчої області й присутні на мРНК, називають 3'-нетрансльованими послідовностями. Термін "ген" включає як кДНК, так і форми геномів гену. Геномна форма або клон гену містить кодуєчу область, що переривається некодуєчими послідовностями, названими "інтронами" або "проміжними областями" або "проміжними послідовностями". Інтрони є сегментами гену, які транскрибуються в ядерну РНК (hnRNA); інтрони можуть містити регуляторні елементи, такі як енхансери. Інтрони віддаляються або "сплайсуються" з ядерного або первинного транскрипту; таким чином, інтрони відсутні в транскрипті месенджер-РНК (мРНК). Ця мРНК функціонує під час трансляції, вказуючи послідовність або порядок амінокислот у поліпептиді, що будується. Поряд зі вмістом інтронів, геномні форми гену можуть також включати послідовності, розташовані як на 5'-, так і на 3'-кінці послідовностей, які присутні на РНК-транскрипті. Ці послідовності називають "фланкуючими" послідовностями або областями (ці фланкуючі послідовності розташовані 5' (ліворуч) або 3' (праворуч) від нетрансльованих послідовностей, присутніх на мРНК-транскрипті). 5'-фланкуюча область може

містити регуляторні послідовності, такі як промотори й енхансери, які контролюють транскрипцію або впливають на транскрипцію гену. 3'-фланкуюча область може містити послідовності, які управляють термінацією транскрипції, посттранскрипційним розщеплюванням і поліаденілюванням.

5 Термін "рекомбінантні" при використанні із посиланням на клітину, нуклеїнову кислоту, білок або вектор показує, що ця клітина, нуклеїнова кислота, білок або вектор були модифіковані введенням гетерологічної нуклеїнової кислоти або білка, зміною нативних нуклеїнової кислоти або білка, або що ця клітина отримана з модифікованої таким чином клітини. Так, наприклад, рекомбінантні клітини експресують гени, які не виявлялися в нативній (нерекомбінантній) формі цієї клітини, або експресують гени, що не зустрічаються в природі, які надекспресуються або експресуються аномально іншим чином, так що вони експресуються, наприклад, у вигляді фрагментів, що не зустрічаються в природі, або сплайсингових варіантів. Під терміном "рекомбінантна нуклеїнова кислота" тут мається на увазі нуклеїнова кислота, початково утворена *in vitro*, зазвичай маніпуляцією нуклеїнової кислоти, наприклад, з використанням полімерази і ендонуклеаз, у формі, що не зустрічається зазвичай у природі. Таким шляхом, 15 досягається функціональне зв'язування різних послідовностей. Таким чином, виділена нуклеїнова кислота, в лінійній формі, або експресуючий вектор, утворений *in vitro* лігуванням ДНК-молекул, які не є в нормі сполученими, обидва вважаються рекомбінантними для цілей цього винаходу. Зрозуміло, що після одержання рекомбінантної нуклеїнової кислоти й уведення її в клітину-хазяїна або в організм-хазяїн, вона буде реплікуватися нерекомбінантно, тобто з використанням клітинного апарату *in vivo*, а не маніпуляціями *in vitro*; проте такі нуклеїнові 20 кислоти, після рекомбінантного одержання, хоча вони й реплікуються потім нерекомбінантно, все ще вважаються рекомбінантними для цілей цього винаходу. Так само, "рекомбінантний білок" є білком, створеним з використанням рекомбінантних способів, тобто через експресію рекомбінантної нуклеїнової кислоти, описаної вище.

У даному контексті, термін "вектор" використовується при посиланні на молекули нуклеїнових кислот, які переносять ДНК-сегмент (ДНК-сегменти) від однієї клітини до іншої клітини. Термін "носій" використовується інколи взаємозамінно з терміном "вектор". Вектори часто виробляють з плазмід, бактеріофагів або вірусів рослин або тварин.

30 У даному контексті, термін "експресія гену" відноситься до процесу перетворення генетичної інформації, закодованої в гені, на РНК (наприклад, мРНК, рРНК, тРНК або малу ядерну РНК (snRNA)) за допомогою "транскрипції" цього гену (наприклад, через ферментативну дію РНК-полімерази), і, для кодуєчих білок генів, на білок за допомогою "трансляції" мРНК. Експресія гену може регулюватися на багатьох стадіях у цьому процесі. "Підвищуючою регуляцією" або "активацією" називають регуляцію, яка збільшує продукування продуктів експресії гену (наприклад, РНК або білка), тоді як "знижуючою регуляцією" або "репресією" називають регуляцію, яка зменшує продукування. Молекули (наприклад, чинники транскрипції), які беруть участь у підвищуючій регуляції або знижуючій регуляції, часто називають "активаторами" і "репресорами", відповідно.

40 Терміни "поліпептид" або "пептид" або "білок" або "фрагмент білка" використовуються тут взаємозамінно для посилання на полімер амінокислотних залишків. Ці терміни застосовні до амінокислотних полімерів, у яких один або декілька амінокислотних залишків є штучними хімічними міметиками відповідних амінокислот, що зустрічаються у природі, а також до полімерів амінокислот, що не зустрічаються в природі.

45 Термін "амінокислота" відноситься до амінокислот, що зустрічаються в природі, і синтетичних, і міметиків амінокислот, які функціонують схоже з амінокислотами, що зустрічаються в природі. Амінокислотами, що зустрічаються в природі, є амінокислоти, що кодуються генетичним кодом, а також амінокислоти, які пізніше модифікують, наприклад, гідроксипролін, гамма-карбоксиглутамат і о-фосфосерин. Амінокислотними аналогами називають сполуки, які мають ту саму базову хімічну структуру, що й амінокислота, що зустрічається в природі, наприклад альфа-вуглець, який пов'язаний з воднем, карбоксильною групою, аміногрупою й R-групою, наприклад гомосерин, норлейцин, метіонінсульфоксид, метіонінметилсульфоній. Такі аналоги можуть мати модифіковані R-групи (наприклад, норлейцин) або модифіковані пептидні каркаси, але зберігають ту саму базову хімічну 50 структуру, що й амінокислота, що зустрічається в природі. Міметиками амінокислот називають хімічні сполуки, які мають структуру, яка відрізняється від звичайної хімічної структури амінокислоти, але функціонує схоже з амінокислотою, що зустрічається в природі.

Термін "консервативно модифіковані варіанти" застосовний як до амінокислотних послідовностей, так і послідовностей нуклеїнових кислот. "Амінокислотними варіантами" називають послідовності амінокислот. Що стосується конкретних послідовностей нуклеїнових 60

кислот, консервативно модифікованими варіантами називають нуклеїнові кислоти, які кодують ідентичні або по суті ідентичні амінокислотні послідовності, або, коли нуклеїнова кислота не кодує амінокислотну послідовність, по суті ідентичні або асоційовані (наприклад, природно близькі) послідовності. Внаслідок виродженості генетичного коду, велика кількість функціонально ідентичних нуклеїнових кислот кодують більшість білків. Наприклад, кодони GCA, GCC, GCG і GCU, все, кодують амінокислоту аланін. Таким чином, у кожному положенні, де аланін указаний кодоном, цей кодон може бути змінений на інший з відповідних описаних кодонів без зміни кодованого поліпептиду. Такі варіації нуклеїнових кислот є "мовчазними варіаціями", які є одним видом консервативно модифікованих варіацій. Кожна послідовність нуклеїнової кислоти тут, яка кодує поліпептид, описує мовчазні варіації цієї нуклеїнової кислоти. Вважається, що в певних контекстах кожен кодон у нуклеїновій кислоті (за винятком AUG, який зазвичай є єдиним кодоном для метіоніну, і TGG, який зазвичай є єдиним кодоном для триптофану) може бути модифікований з одержанням функціонально ідентичної молекули. Таким чином, мовчазні варіації нуклеїнової кислоти, яка кодує поліпептид, є прихованими в описаній послідовності відносно продукту експресії, але не відносно фактичних зондових послідовностей. Що стосується амінокислотних послідовностей, слід визнати, що кожна з індивідуальних замін, делецій або додавань до послідовності нуклеїнової кислоти, пептиду, поліпептиду або білкової послідовності, яка змінює, додає або делетує єдину амінокислоту або малий відсоток амінокислот у цій кодованій послідовності, є "консервативно модифікованим варіантом", у тому числі, коли ця зміна приводить до заміни амінокислоти хімічно схожою амінокислотою. Такі консервативно модифіковані варіанти присутні, поряд з поліморфними варіантами, міжвидовими гомологами й аллелями цього винаходу, і не виключають їх. Таблиці, що забезпечують функціонально схожі амінокислоти, застосовні для консервативних замін амінокислот, добре відомі в даній галузі. Типові консервативні заміни включають: 1) Аланін (A), Гліцин (G); 2) Аспарагінову кислоту (D), Глутамінову кислоту (E); 3) Аспарагін (N), Глутамін (Q); 4) Аргінін (R), Лізин (K); 5) Ізолейцин (I), Лейцин (L), Метіонін (M), Валін (V); 6) Фенілаланін (F), Тирозин (Y), Триптофан (W); 7) Серин (S), Треонін (T) і 8) Цистеїн (C), Метіонін (M) (див., наприклад, Creighton, Proteins (1984)). (Див. також таблицю 1).

У контексті даного винаходу й формули винаходу, терміни в однині включають множинні форми, якщо контекст не диктує явно інше.

Зрозуміло, що де б не були описані варіанти з використанням слова "містять", в інших випадках забезпечені аналогічні варіанти зі словами що "складаються з" і/або що "складаються по суті з".

Деякі варіанти здійснення даного винаходу

Даний винахід забезпечує композиції й способи для дослідження, діагностики, характеристики й лікування раку. Зокрема, в деяких варіантах здійснення, даний винахід забезпечує агенти, в тому числі антагоністи, які зв'язують Notch-рецептори, і способи застосування цих агентів або антагоністів для інгібування зростання пухлини й лікування раку або іншого захворювання в пацієнтів-людей. У деяких варіантах здійснення, ці антагоністи є антитілами, які специфічно розпізнають один або декілька Notch-рецепторів людини.

У одному аспекті, даний винахід забезпечує антитіло, яке специфічно зв'язується з незв'язуючою ліганд областю позаклітинного домену Notch-рецептора людини. В деяких варіантах здійснення, це антитіло, яке специфічно зв'язується з незв'язуючою ліганд областю позаклітинного домену Notch-рецептора людини, інгібує зростання пухлини. В деяких варіантах здійснення, це антитіло, яке специфічно зв'язується з незв'язуючою ліганд областю позаклітинного домену Notch-рецептора людини, й інгібує зростання пухлини, специфічно зв'язується з незв'язуючою ліганд областю позаклітинного домену, щонайменше двох членів сімейства Notch-рецепторів. У деяких варіантах здійснення, це антитіло зв'язується з незв'язуючою ліганд областю позаклітинного домену Notch2- і/або Notch3-рецептора. В деяких варіантах здійснення, це антитіло зв'язується з незв'язуючою ліганд областю Notch2 людини. В деяких варіантах здійснення, це антитіло зв'язується з незв'язуючою ліганд областю позаклітинного домену Notch2 і Notch3. У деяких варіантах здійснення, це антитіло зв'язується з незв'язуючою ліганд областю Notch3 людини. У деяких варіантах здійснення, це антитіло зв'язується з Notch1 і/або Notch4.

У деяких варіантах здійснення, це антитіло, яке специфічно зв'язується з незв'язуючою ліганд областю позаклітинного домену Notch-рецептора людини, й інгібує зростання пухлини, є моноклональним антитілом. У деяких варіантах здійснення, це антитіло, яке специфічно зв'язується з незв'язуючою ліганд областю позаклітинного домену Notch-рецептора людини, й інгібує зростання пухлини, є химерним антитілом. У деяких варіантах здійснення, це антитіло, яке специфічно зв'язується з незв'язуючою ліганд областю позаклітинного домену Notch-

позаклітинного домену Notch-рецептора людини, що містить EGF-повтори 13-36; і iii) визначення, чи інгібує ця молекула зростання пухлини.

У деяких варіантах здійснення, даний винахід забезпечує фармацевтичну композицію, що містить антитіло, яке специфічно зв'язується з незв'язуючою ліганд областю позаклітинного домену Notch-рецептора людини, й інгібує зростання пухлини.

У деяких варіантах здійснення, даний винахід забезпечує спосіб одержання антитіла, яке специфічно зв'язується з незв'язуючою ліганд областю позаклітинного домену Notch-рецептора людини, й інгібує зростання пухлини.

У деяких варіантах здійснення, даний винахід забезпечує виділену нуклеїнову кислоту, яка кодує антитіло, яке специфічно зв'язується з незв'язуючою ліганд областю позаклітинного домену Notch-рецептора людини, й інгібує зростання пухлини.

У деяких варіантах здійснення, цей винахід забезпечує агент (наприклад, антитіло), який специфічно зв'язується з EGF10-доменом (або еквівалентом EGF10-домену в разі Notch3) одного або декількох Notch-рецепторів людини. В деяких варіантах здійснення, цей агент є антагоністом. У деяких варіантах здійснення, цей агент специфічно зв'язується з EGF10 Notch2 людини і/або EGF9 Notch3 людини. EGF9 є EGF у Notch3 людини, яка є еквівалентом EGF10 в інших Notch-рецепторах людини, Notch1, Notch2 і Notch4. У деяких варіантах здійснення, цей агент специфічно зв'язує Notch2 людини. В деяких варіантах здійснення, цей агент специфічно зв'язує Notch2 і Notch3 людини. В деяких варіантах здійснення, цей агент специфічно зв'язує Notch3 людини.

В одному аспекті, цей винахід забезпечує антитіло 59R1, що містить послідовності важкого ланцюга й легкого ланцюга, забезпечені в SEQ ID NO:16 і 18 (з сигнальною послідовністю або без сигнальної послідовності), відповідно, або кодоване ДНК, депоноване в ATCC 15 жовтня 2008 року й що отримала присвоєний номер PTA-9547. Цей винахід додатково забезпечує поліпептиди або антитіла, які містять варіабельну область важкого ланцюга (наприклад, SEQ ID NO:14) і/або варіабельну область легкого ланцюга (наприклад, SEQ ID NO:13) такого антитіла 59R1. Цей винахід додатково забезпечує поліпептиди або антитіла, що містять один або декілька (наприклад, 1, 2 або 3) CDR важкого ланцюга, і/або один або декілька CDR легкого ланцюга антитіла 59R1. У додаткових варіантах здійснення, цей винахід забезпечує антитіла, які зв'язуються з тим самим епітопом, що й антитіло 59R1, або антитіла, які конкурують за специфічне зв'язування з Notch2 і/або Notch3 людини з антитілом 59R1.

В іншому аспекті, цей винахід забезпечує антитіло 59R5, що містить послідовності важкого ланцюга й легкого ланцюга, забезпечені в SEQ ID NO:49 і 18 (з сигнальною послідовністю або без сигнальної послідовності), відповідно, або кодовані ДНК, депоноване в ATCC 6 липня 2009 року і що отримала присвоєний номер PTA-10170. Цей винахід додатково забезпечує поліпептиди або антитіла, які містять послідовності варіабельної області важкого ланцюга і/або варіабельної області легкого ланцюга SEQ ID NO:50 і/або SEQ ID NO:13. Цей винахід додатково забезпечує поліпептиди або антитіла, що містять один або декілька (наприклад, 1, 2 або 3) CDR важкого ланцюга, і/або один або декілька CDR легкого ланцюга антитіла 59R5. У додаткових варіантах здійснення, цей винахід забезпечує антитіла, які зв'язуються з тим самим епітопом, що й антитіло 59R5, або антитіла, які конкурують за специфічне зв'язування з Notch2 і/або Notch3 людини з антитілом 59R5.

У деяких додаткових варіантах здійснення, цей винахід забезпечує антитіло, яке специфічно зв'язується з двома або більше (тобто щонайменше двома або двома, трьома або чотирма) Notch-рецепторами людини. В деяких варіантах здійснення, це антитіло специфічно зв'язується з незв'язуючою ліганд областю позаклітинного домену двох або більше Notch-рецепторів людини. В деяких варіантах здійснення, це антитіло є моноспецифічним антитілом, яке специфічно зв'язується з незв'язуючою ліганд областю позаклітинного домену двох або більше Notch-рецепторів людини. В деяких варіантах здійснення, це антитіло зв'язується з EGF10 Notch1, Notch2 або Notch4 і/або з EGF9 Notch3. У деяких варіантах здійснення, незв'язуючою ліганд областю, з якою зв'язується це антитіло, не є EGF4 або не містить EGF4. У деяких варіантах здійснення, ці два або більше Notch-рецепторів людини містять Notch2 і Notch3. У деяких варіантах здійснення, це антитіло є антагоністом цих двох або більше Notch-рецепторів людини.

Цей винахід додатково забезпечує спосіб модуляції функції перичитів і/або клітин гладких м'язів судин у суб'єкта, причому цей спосіб передбачає введення цьому суб'єктові ефективної кількості агента, який специфічно зв'язується з Notch2 і/або Notch3 людини. В деяких варіантах здійснення, цей агент є антитілом. У деяких варіантах здійснення, цей агент є антагоністом.

Крім того, цей винахід забезпечує спосіб інгібування ангиогенезу в суб'єкта, що передбачає стадію введення цьому суб'єктові ефективної кількості агента, який специфічно зв'язує Notch2

i/або Notch3 людини. У деяких варіантах здійснення, цей агент є антитілом. У деяких варіантах здійснення цей агент є антагоністом. У деяких варіантах здійснення, цей антагоніст є антагоністом Notch2. У деяких варіантах здійснення, цей антагоніст є антагоністом Notch3. У деяких варіантах здійснення, цей антагоніст є антагоністом Notch2 і Notch3. У деяких варіантах здійснення, спосіб інгібування ангиогенезу передбачає модуляцію функції перицитів i/або клітин гладких м'язів судин. У деяких варіантах здійснення, цей ангиогенез є ангиогенезом пухлини.

У деяких варіантах здійснення, Notch-зв'язуючий агент є антагоністом Notch-рецептора (Notch-рецепторів) людини, з якими він специфічно зв'язується. В деяких альтернативних варіантах здійснення, Notch-зв'язуючий агент є агоністом Notch-рецептора (Notch-рецепторів) людини, з якими він специфічно зв'язується.

У деяких варіантах здійснення, агент, який специфічно зв'язується з одним або декількома Notch-рецепторами і є антагоністом одного або декількох Notch-рецепторів, інгібує щонайменше приблизно 10 %, щонайменше приблизно 20 %, щонайменше приблизно 30 %, щонайменше приблизно 50 %, щонайменше приблизно 75 %, щонайменше приблизно 90 % або приблизно 100 % однієї або декількох активностей зв'язаного Notch-рецептора (зв'язаних Notch-рецепторів).

У деяких варіантах здійснення, антагоніст одного або декількох Notch-рецепторів людини має одну або декілька з наступних дій: інгібує один або декілька Notch-рецепторів людини; інгібує проліферацію пухлинних клітин; зменшує онкогенність пухлини зменшенням стривальності (частоти) ракових стоволових клітин у цій пухлині; інгібує зростання пухлини; збільшує виживання, запускає загибель пухлинних клітин; інгібує ангиогенез або запобігає метастазуванню пухлинних клітин.

У деяких варіантах здійснення, цей антагоніст має одну з наступних дій: інтерференцію (порушення) експресії Notch-рецептора; інтерференцію (порушення) активації шляху трансдукції сигналу Notch-рецептора, наприклад, стеричним інгібуванням взаємодій між Notch-рецептором і одним або декількома його лігандами, або зв'язуванням з Notch-рецептором людини і запуском загибелі клітин або інгібуванням проліферації клітин.

У деяких варіантах здійснення, антагоністи проти Notch-рецептора, такого як Notch2 або Notch3, діють позаклітинно для дії на функцію або інгібування Notch-рецептора. В деяких варіантах здійснення, антагоніст є малою молекулою, яка зв'язується з позаклітинним доменом Notch-рецептора. В деяких варіантах здійснення, антагоніст Notch-рецептора має білкову природу. В деяких варіантах здійснення, білкові антагоністи Notch-рецептора є антитілами, які специфічно зв'язуються з позаклітинним епітопом Notch-рецептора. Позаклітинне зв'язування антагоніста проти Notch-рецептора може інгібувати передачу сигналу білка Notch-рецептора інгібуванням властивої йому активації (наприклад, кіназної активності) Notch-рецептора i/або стеричним інгібуванням взаємодії, наприклад, Notch-рецептора з одним з його лігандів. Крім того, позаклітинне зв'язування антагоніста проти Notch-рецептора може знижувати чиним регулювати експресію на клітинній поверхні Notch-рецептора, наприклад, інтерналізацією Notch-рецептора i/або зменшенням направленої на клітинну поверхню міграції Notch-рецептора.

У деяких варіантах здійснення, Notch-зв'язуючий агент або антагоніст (наприклад, антитіло) специфічно зв'язується з незв'язуючою ліганд областю позаклітинного домену, щонайменше одного Notch-рецептора людини, в якому незв'язуюча ліганд область містить EGF-повтор 10 (або еквівалент у разі Notch3). У деяких варіантах здійснення, цей агент або антагоніст специфічно зв'язується з Notch2. У деяких варіантах здійснення, цей агент або антагоніст специфічно зв'язується з Notch3. У деяких варіантах здійснення, цей агент або антагоніст специфічно зв'язується як з Notch2, так і з Notch3 людини.

У деяких варіантах здійснення, цей Notch-зв'язуючий агент або антагоніст (наприклад, антитіло) специфічно зв'язується з EGF10-доменом Notch2 людини. В деяких варіантах здійснення, Notch-зв'язуючий агент або антагоніст не зв'язується з якою-небудь областю Notch2-людини поза його EGF10-доменом. В деяких альтернативних варіантах здійснення, Notch-зв'язуючий агент або антагоніст, який специфічно зв'язується з EGF10-доменом Notch2 людини, зв'язується також додатково з іншою областю Notch2 людини. Іншими словами, в деяких варіантах здійснення, весь епітоп цього агента або антагоніста знаходиться в межах EGF10. У деяких інших варіантах здійснення, епітоп цього агента або антагоніста, який зв'язується з Notch2 людини, частково перекривається з EGF10. У деяких варіантах здійснення, цей агент або антагоніст зв'язується щонайменше з частиною послідовності HKGAL (SEQ ID NO:28) в межах EGF10 Notch2 людини. В деяких варіантах здійснення, цей агент або антагоніст зв'язується також з іншими амінокислотами в EGF10 Notch2 людини (наприклад, весь епітоп анти-Notch2-антитіла необов'язково міститься повністю в послідовності HKGAL). У деяких варіантах здійснення, Notch-зв'язаний агент або антагоніст додатково специфічно зв'язується

щонайменше з одним додатковим Notch-рецептором людини (наприклад, Notch1, Notch3 або Notch4). У деяких варіантах здійснення, цей Notch-зв'язуючий агент або антагоніст, який зв'язується з EGF10 Notch2 людини, додатково зв'язується з EGF10-доменом Notch1 людини, EGF9-доменом Notch3 людини і/або EGF10-доменом Notch4 людини. В деяких варіантах здійснення, цим додатковим Notch-рецептором людини є Notch3 людини.

В деяких варіантах здійснення, цей Notch-зв'язуючий агент або антагоніст (наприклад, антитіло) специфічно зв'язується з EGF9-доменом Notch3 людини. Як видно з гомології між послідовностями позаклітинних доменів Notch2 людини і Notch3 людини, EGF9 є EGF, який є функціональним/структурним еквівалентом EGF10 Notch2 в Notch3 людини. У деяких варіантах здійснення, Notch-зв'язаний агент або антагоніст не зв'язується з якою-небудь областю Notch3 людини зовні EGF9. У деяких варіантах здійснення, цей агент або антагоніст зв'язується щонайменше з частиною послідовності HEDAI (SEQ ID NO:29) в EGF9-домени Notch3 людини. HEDAI (SEQ ID NO:29) є послідовністю в EGF9-домени Notch3, яка відповідає послідовності HKGAL (SEQ ID NO:28) в EGF10 Notch2 людини. У деяких варіантах здійснення, цей агент або антагоніст зв'язується також з іншими амінокислотами в EGF9 Notch3 людини. В деяких варіантах здійснення, Notch-зв'язуючий агент або антагоніст зв'язується з EGF10 щонайменше одного додаткового Notch-рецептора людини (наприклад, Notch1, Notch2 або Notch4). У деяких варіантах здійснення, цим додатковим Notch-рецептором людини є Notch2 людини, такий як агент або антагоніст, який зв'язується з EGF10-доменом Notch2 людини. В деяких варіантах здійснення, Notch-зв'язуючий агент або антагоніст не зв'язується з якою-небудь областю Notch2 людини зовні EGF10. У деяких варіантах здійснення, цей агент або антагоніст зв'язується щонайменше з частиною послідовності HKGAL (SEQ ID NO:28) в EGF10 Notch2 людини. В деяких варіантах здійснення, цей агент або антагоніст є моноспецифічним антитілом, яке зв'язується меншою мірою з частиною послідовності HKGAL (SEQ ID NO:28) в Notch2, а також зв'язується щонайменше з частиною послідовності HEDAI (SEQ ID NO:29) в Notch3.

У деяких альтернативних варіантах здійснення, цей Notch-зв'язаний агент або антагоніст зв'язується з частиною незв'язуючої ліганд області позаклітинного домену рецептора Notch1, Notch2 або Notch4 в області, відмінній від EGF10, або Notch3-рецептора в області, відмінній від EGF9. Наприклад, у деяких варіантах здійснення, цей агент або антагоніст зв'язується з LNR-HD-доменом одного або декількох Notch-рецепторів. У деяких варіантах здійснення, цей агент або антагоніст зв'язується з EGF1, EGF2, EGF3, EGF4, EGF5, EGF6, EGF7, EGF9, EGF10, EGF13, EGF14, EGF15, EGF16, EGF17, EGF18, EGF19, EGF20, EGF21, EGF22, EGF23, EGF24, EGF25, EGF26, EGF27, EGF28, EGF29, EGF30, EGF31, EGF32, EGF33, EGF34, EGF35 і/або EGF36 позаклітинного домену одного або декількох Notch-рецепторів.

У деяких варіантах здійснення, цей Notch-зв'язуючий агент або антагоніст зв'язується з незв'язуючою ліганд областю позаклітинного домену одного або декількох Notch-рецепторів людини. Так, у деяких варіантах здійснення, Notch-зв'язуючий агент або антагоніст може зв'язуватися з EGF11 і/або EGF12 Notch 1, 2 або 4 (Rebay et al., 1991, Cell 67:687; Lei et al., 2003, Dev. 130:6411; Hambleton et al., 2004, Structure 12:2173) або EGF10 і EGF11 Notch3 (Peters et al., 2004, Experimental Cell Research, 299:454-464).

У деяких варіантах здійснення, Notch-зв'язуючий агент (наприклад, антитіло) специфічно зв'язується з двома або більш Notch-рецепторами людини (наприклад, Notch1, Notch2, Notch3 і/або Notch4). Іншими словами, в деяких варіантах здійснення, цей агент або це антитіло зв'язується щонайменше з двома Notch-рецепторами людини (тобто двома, трьома або чотирма Notch-рецепторами людини). В цей винахід включені також агенти й антитіла, які специфічно зв'язуються з двома рецепторами сімейства Notch (наприклад, Notch2 і Notch3, Notch1 і Notch2, Notch1 і Notch3, Notch1 і Notch4, Notch2 і Notch4 або Notch3 і Notch4). Розглядаються також агенти й антитіла, які специфічно зв'язуються з трьома членами сімейства Notch людини (наприклад, агенти й антитіла, які специфічно зв'язуються з Notch1, Notch2 і Notch3, Notch1, Notch2 і Notch4 або Notch2, Notch3 і Notch4), а також агенти й антитіла, які специфічно зв'язуються з чотирма членами сімейства Notch-рецепторів людини (наприклад, агенти й антитіла, які специфічно зв'язуються з Notch1, Notch2, Notch3 і Notch4). У деяких варіантах здійснення, агент або антитіло специфічно зв'язується як з Notch2, так і з Notch3 людини. У деяких варіантах здійснення, цей агент або антитіло специфічно зв'язується як з Notch1, так і з Notch3 людини. У інших варіантах здійснення, цей агент або антитіло специфічно зв'язується як з Notch1, так і з Notch4 людини. У деяких варіантах здійснення, цей агент або антитіло є антагоністом двох або більше Notch-рецепторів людини.

У деяких варіантах здійснення, Notch-зв'язуючий агент або антагоніст зв'язується з Notch-

рецептором (наприклад, Notch2 і/або Notch3) з константою дисоціації приблизно 1мкМ або менш, приблизно 100 нМ або менш, приблизно 40 нМ або менш, приблизно 20 нМ або менш або приблизно 10нМ або менш. У деяких варіантах здійснення, цей агент або антагоніст зв'язує один або декілька Notch-рецепторів людини, таких як Notch2 людини і/або Notch3 людини, з K_D 1 нМ або менш. У деяких варіантах здійснення цей Notch-зв'язуючий агент є антитілом, яке зв'язується з Notch2 з K_D приблизно 1нМ або менш. У деяких варіантах здійснення, Notch-зв'язуючий агент є антитілом, яке зв'язується з Notch3 з K_D приблизно 1 нМ або менш. У деяких варіантах здійснення, константа дисоціації для агента або антагоніста відносно конкретного Notch-рецептора є константою дисоціації, визначеною з використанням злитого білка Notch-Fc, що містить позаклітинну область Notch і/або частину позаклітинного домену, що містить EGF10, імобілізованого на чіпі Biacore.

У деяких варіантах здійснення, цей антагоніст специфічно зв'язується з Notch3 людини й інгібує зв'язування ліганду (наприклад, DLL4, JAG1 і JAG2) з Notch3 людини та/або інгібує передачу сигналу Notch3 людини. В деяких варіантах здійснення, цей антагоніст специфічно зв'язується з Notch2 людини й інгібує зв'язування ліганду (наприклад, DLL4, JAG1 і/або JAG2) з Notch2 людини й інгібує передачу сигналу Notch2 людини. В деяких варіантах здійснення, цей антагоніст інгібує DLL4-індуковану передачу сигналу Notch3. У деяких варіантах здійснення, цей антагоніст інгібує JAG2-індуковану передачу сигналу Notch2. У деяких варіантах здійснення, передача сигналу Notch2 і/або Notch3 зменшується щонайменше на 10 %, щонайменше приблизно на 25 %, щонайменше приблизно на 50 %, щонайменше приблизно на 75 %, щонайменше приблизно на 90 % або щонайменше приблизно на 95 %.

У деяких варіантах здійснення, антагоністи проти Notch-рецептора зв'язуються з Notch-рецептором і мають одну або декілька з наступних дій: інгібують проліферацію пухлинних клітин, запускають загибель клітин безпосередньо в пухлинних клітинах або запобігають метастазуванню пухлинних клітин. У деяких варіантах здійснення, антагоністи Notch-рецептора запускають загибель клітин через кон'югований токсин, хіміотерапевтичний агент, радіоізотоп або інший подібний агент. Наприклад, антитіло проти Notch-рецептора кон'югує з токсином, який активується в пухлинних клітинах, експресуючих Notch-рецептор, інтерналізацією білка. В інших варіантах здійснення, антагоністи Notch-рецептора опосередковують клітинну загибель клітини, що експресує Notch-рецептор, через антитілозалежну клітинну цитотоксичність (ADCC). ADCC включає лізис клітин ефекторними клітинами, які розпізнають Fc-частину антитіла. Багато лімфоцитів, моноцити, тканинні макрофаги, гранулоцити й еозинофіли мають, наприклад, Fc-рецептори і можуть опосередковувати цитоліз (Dillman, 1994, J. Clin. Oncol. 12:1497). У деяких варіантах здійснення, антагоніст Notch-рецептора є антитілом, яке запускає клітинну загибель клітини, що експресує Notch-рецептор, активацією комплементзалежної цитотоксичності (CDC). CDC включає зв'язування сироваткового комплементу з Fc-частиною антитіла й подальшу активацію каскаду білків комплементу, що приводить до руйнування клітинних мембран і можливої загибелі клітин. Відомо, що біологічна активність антитіл визначається, в значній мірі, константними доменами або Fc-областю молекули антитіла (Uananie and Benacerraf, Textbook of Immunology, 2nd Edition, Williams & Wilkins, p. 218 (1984)). Антитіла різних класів і підкласів розрізняються в цьому відношенні, як і антитіла того самого підкласу, але з різних видів. З антитіл людини, IgM є найбільш ефективним класом антитіл для зв'язування комплементу, за яким ідуть IgG1, IgG3 і IgG2, тоді як IgG4, мабуть, позбавлений здатності активації каскаду комплементу (Dillman, 1994, J. Clin. Oncol. 12:1497; Jefferis et al., 1998, Immunol. Rev. 163:59-76). Відповідно до даного винаходу, отримують антитіла класів, що мають бажану біологічну активність.

Може бути аналізована здатність будь-якого конкретного антитіла проти Notch-рецептора опосередковувати лізис клітини-мішені активацією комплементу і ADCC. Клітини, що становлять інтерес, вирощують і мітять *in vitro*; антитіло додають до культури клітин у комбінації або з сироватковим комплементом, або імунними клітинами, які можуть бути активовані комплексами антиген-антитіло. Цитоліз цих клітин-мішеней детектують, наприклад, вивільненням мітки з лізованих клітин. Фактично, антитіла можуть бути піддані скринінгу з використанням власної сироватки пацієнта як джерела комплементу й/або імунних клітин. Потім антитіло, яке здатне активувати комплемент або опосередковувати ADCC у тесті *in vitro*, може бути використане терапевтично в цьому конкретному пацієнті.

У деяких варіантах здійснення, Notch-зв'язуючий агент або антагоніст є антитілом, яке не має жодної або декількох ефекторних функцій. Наприклад, у деяких варіантах здійснення, це антитіло не має активності антитілозалежної клітинної цитотоксичності (ADCC) або активності комплементзалежної цитотоксичності (CDC). У деяких варіантах здійснення, це антитіло не зв'язується з Fc-рецептором і/або чинниками комплементу. В деяких варіантах здійснення, це

антитіло не має ефекторної функції.

У деяких варіантах здійснення, антагоністи Notch-рецептора можуть запускати загибель клітин опосередковано інгібуванням ангиогенезу. Ангиогенез є процесом, за допомогою якого нові кровеносні судини утворюються з передіснуючих судин, і є фундаментальним процесом, необхідним для нормального зростання, наприклад, під час ембріонального розвитку, загоєння ран і у відповідь на овуляцію. Зростання солідних пухлин, більших за 1-2 мм³, також вимагає ангиогенезу для подачі нутрієнтів і кисню, без яких пухлинні клітини вмирають. Таким чином, у деяких варіантах здійснення, антагоніст Notch-рецептора націлений на васкулярні клітини, які експресують Notch-рецептор, що включають ендотеліальні клітини, клітини гладких м'язів або компоненти позаклітинного матриксу, необхідні для збірки судин. У деяких варіантах здійснення, антагоніст Notch-рецептора (наприклад, Notch2 і Notch3) націлений на періцити й/або клітини гладких м'язів судин. У інших варіантах здійснення, антагоніст Notch-рецептора інгібує передачу сигналів зростання, що вимагається рекрутингом, збіркою, підтримкою або виживанням клітин судин. У деяких варіантах здійснення, цей антагоніст модулює функцію періцитів і/або клітин гладких м'язів судин.

У деяких варіантах здійснення Notch-зв'язуючі агенти або антагоністи (наприклад, антитіла), окремо або в комбінації з другим терапевтичним агентом, здатні інгібувати зростання пухлини. В деяких варіантах здійснення, Notch-зв'язуючі агенти або антагоністи здатні інгібувати зростання пухлини *in vivo* (наприклад, у мишачій моделі ксенотрансплантату й/або у людини, що має рак). У деяких варіантах здійснення, Notch-зв'язуючі агенти або антагоністи здатні інгібувати зростання пухлини щонайменше приблизно на 10 %, щонайменше приблизно на 25 %, щонайменше приблизно на 50 %, щонайменше приблизно на 75 %, щонайменше приблизно на 90 % у конкретній тимчасовій крапці в моделі ксенотрансплантату. В деяких варіантах здійснення, Notch-зв'язуючі агенти або антагоністи запобігають зростанню пухлини. В деяких варіантах здійснення, ці Notch-зв'язуючі агенти або антагоністи інгібують рецидив пухлини.

У деяких варіантах здійснення, Notch-зв'язуючі агенти здатні зменшувати онкогенність пухлини. В деяких варіантах здійснення, цей агент або антагоніст здатний зменшувати онкогенність пухлини, що містить ракові ствовові клітини, в моделі тварини, такий як мишача модель ксенотрансплантату. В деяких варіантах здійснення, кількість або стрівальність ракових ствовових клітин у пухлині зменшується щонайменше приблизно вдвічі, приблизно втричі, приблизно в 5 разів, приблизно в 10 разів, приблизно в 50 разів, приблизно в 100 разів або приблизно в 1000 разів (наприклад, у моделі ксенотрансплантату). У деяких варіантах здійснення, це зменшення частоти ракових ствовових клітин визначають аналізом лімітуючих (граничних) розведень з використанням моделі тварини. Приклад аналізу лімітуючих (граничних) розведень, використовуваного для тестування ефективності анти-Notch-антитіла забезпечений у прикладі 8 нижче. Додаткові приклади й керівництво, що стосуються застосування аналізів лімітуючих розведень для визначення зменшення кількості або частоти стрівальності ракових ствовових клітин у пухлині, можуть бути знайдені, наприклад, у Міжнародній Публікації № WO 2008/042236, Публікаціях заявок на патент США з номерами 2008/0064049 і 2008/0178305, кожна з яких включена в даний опис як посилання в повному обсязі.

Даний винахід забезпечує різні поліпептиди, що включають, але не обмежуються ними, антитіла й фрагменти антитіл. У деяких варіантах здійснення, цей поліпептид є виділеним. У деяких альтернативних варіантах здійснення, цей поліпептид є по суті чистим.

У деяких варіантах здійснення, поліпептиди даного винаходу можуть бути рекомбінантними поліпептидами, природними поліпептидами або синтетичними поліпептидами, що містять послідовність SEQ ID NO:2, 4, 13, 14, 16, 18, 19, 20, 39, 40, 49, 50, 52, 53, 54, 55, 56 або 57 (з указаними сигнальними послідовностями або без указаних сигнальних послідовностей), а також поліпептидами, що містять поліпептиди, кодовані полінуклеотидами SEQ ID NO:1, 3, 15, 17, 47, 48, 58, 59 або 60 (з указаними сигнальними послідовностями або без указаних сигнальних послідовностей).

Цей винахід забезпечує поліпептид, що містить важкий ланцюг і/або легкий ланцюг 59R1, забезпечені в SEQ ID NO:16 і/або SEQ ID NO:18, відповідно. У деяких варіантах здійснення, цей поліпептид є антитілом. У деяких варіантах здійснення, цей поліпептид специфічно зв'язує Notch2 і/або Notch3. У деяких варіантах здійснення, цей поліпептид специфічно зв'язує Notch2 і Notch3.

Цей винахід забезпечує поліпептид, що містить важкий ланцюг і/або легкий ланцюг 59R5, забезпечені в SEQ ID NO:49 і/або SEQ ID NO:18, відповідно. У деяких варіантах здійснення, цей поліпептид є антитілом. У деяких варіантах здійснення, цей поліпептид специфічно зв'язує

Notch2 і/або Notch3. У деяких варіантах здійснення, цей поліпептид специфічно зв'язує Notch2 і Notch3.

Цей винахід забезпечує також поліпептид, що містить SEQ ID NO:13, і/або SEQ ID NO:14. У деяких варіантах здійснення, цей поліпептид містить послідовність варіабельного легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO:13, і/або послідовність варіабельного важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO:14. У деяких варіантах здійснення, цей поліпептид містить послідовність варіабельного легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO:13, і/або послідовність варіабельного важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO:50. У деяких варіантах здійснення, цей поліпептид містить послідовність варіабельного легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO:13, і/або послідовність варіабельного важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO:52. У деяких варіантах здійснення, цей поліпептид містить послідовність варіабельного легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO:13, і/або послідовність варіабельного важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO:53. У деяких варіантах здійснення, цей поліпептид містить послідовність варіабельного легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO:13, і/або послідовність варіабельного важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO:54. У деяких варіантах здійснення, цей поліпептид містить послідовність варіабельного легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO:13, і/або послідовність варіабельного важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO:55. У деяких варіантах здійснення, цей поліпептид містить послідовність варіабельного легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO:13, і/або послідовність варіабельного важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO:56. У деяких варіантах здійснення, цей поліпептид містить послідовність варіабельного легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO:13, і/або послідовність варіабельного важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO:57. У деяких варіантах здійснення, цей поліпептид є антитілом. У деяких варіантах здійснення, цей поліпептид специфічно зв'язує Notch2 і/або Notch3. У деяких варіантах здійснення, цей поліпептид специфічно зв'язує Notch2 і/або Notch3. У деяких варіантах здійснення, цей поліпептид специфічно зв'язує Notch2 людини. В деяких варіантах здійснення, цей поліпептид специфічно зв'язує Notch3 людини.

В даній галузі буде зрозуміло, що деякі амінокислотні послідовності цього винаходу можуть варіюватися без значимої дії на структуру або функцію цього білка. При обговоренні таких відмінностей, слід пам'ятати, що на білці знаходяться критичні зони, які визначають активність. Таким чином, цей винахід додатково включає варіації цих поліпептидів, які виявляють істотну активність. Такі мутанти включають делеції, інсерції, повтори й заміни типу. Керівництво, що стосується того, які амінокислотні заміни є, ймовірно, фенотипово мовчазні, може бути знайдено в Bowie et al., Deciphering the Message in Protein Sequences: Tolerance to Amino Acid Substitutions, 1990, Science 247:1306-1310.

Таким чином, ці фрагменти, похідні або аналоги поліпептидів цього винаходу можуть бути: (i) такими, в яких один або декілька амінокислотних залишків замінено консервативним або неконсервативним амінокислотним залишком (часто консервативним амінокислотним залишком), і такий замінений амінокислотний залишок може кодуватися або не може кодуватися генетичним кодом; або (ii) такими, в яких один або декілька амінокислотних залишків включають групу-заступник; або (iii) такими, в яких цей зрілий поліпептид злитий з іншою сполукоюсполукою, як-от сполука, здатна збільшувати час напівжиття цього поліпептиду (наприклад, поліетиленгліколь); або (iv) такими, в яких із зрілим поліпептидом злиті додаткові амінокислоти, наприклад лідерна або секреторна послідовність або послідовність, яка використовується для очищення зрілого поліпептиду або послідовності пробілка. Передбачається, що такі фрагменти, похідні й аналоги знаходяться в обсязі описаних тут ідей.

Особливий інтерес становлять заміни заряджених амінокислот іншою зарядженою амінокислотою й нейтральною або негативно зарядженою амінокислотою. Остання приводить до білків із зменшеним позитивним зарядом. Зменшений позитивний заряд на білці може приводити до зменшення агрегації білка, і це запобігання агрегації є вкрай бажаним. Агрегація білків може не лише приводити до втрати активності, але може також створювати проблему при приготуванні фармацевтичних композицій, оскільки агрегати можуть бути імуногенними (Pinckard et al., 1967, Clin. Exp. Immunol. 2:331-340; Robbins et al., 1987, Diabetes 36:838-845; Cleland et al., 1993, Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Systems 10:307-377).

Як указано, зміни амінокислот зазвичай є змінами мінорного характеру, такими як консервативні амінокислотні заміни, які не впливають значимо на укладання або активність цього білка (див. таблицю 1).

Консервативні амінокислотні заміни

Вихідна амінокислота	Приблизна консервативна заміна
Аланін	Валін, Ізолейцин, Лейцин, Гліцин, Серин
Аргінін	Лізін, Гістидин, Глутамін, Аспарагін
Аспарагін	Глутамін, Гістидин, Лізін, Аргінін
Аспарагінова кислота	Глутамінова кислота, Аспарагін
Цистеїн	Серин, Аланін, Метіонін
Глутамін	Аспарагін
Глутамінова кислота	Аспарагінова кислота, Глутамін
Гліцин	Пролін, Аланін
Гістидин	Аспарагін, Глутамін, Лізін, Аргінін
Ізолейцин	Лейцин, Валін, Метіонін, Аланін, Фенілаланін, Норлейцин
Лейцин	Норлейцин, Ізолейцин, Валін, Метіонін, Аланін, Фенілаланін
Лізін	Аргінін, Глутамін, Аспарагін, Гістидин
Метіонін	Лейцин, Фенілаланін, Ізолейцин, Валін, Цистеїн
Фенілаланін	Лейцин, Валін, Ізолейцин, Аланін, Тирозин
Пролін	Аланін, Гліцин
Серин	Треонін
Треонін	Серин
Триптофан	Тирозин, Фенілаланін
Тирозин	Триптофан, Фенілаланін, Треонін, Серин
Валін	Ізолейцин, Метіонін, Лейцин, Фенілаланін, Аланін, Норлейцин

Звичайно, кількість вироблених амінокислотних замін залежить від багатьох чинників, у тому числі описаних вище. В деяких варіантах здійснення, кількість замін для будь-якого конкретного поліпептиду буде не більшою за 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10 або 3.

5 У деякому варіанті здійснення, поліпептиди й полінуклеотиди даного винаходу забезпечені у виділеній формі й інколи очищені до гомогенності.

10 Поліпептиди даного винаходу включають поліпептиди SEQ ID NO: 2, 4, 13, 14, 16, 18, 19, 20, 39, 40, 49, 50, 52, 53 54, 55, 56, або 57, а також поліпептиди, які мають щонайменше 90 % схожість (у певних тимчасових точках щонайменше 90 % ідентичність послідовності) з поліпептидами SEQ ID NO: 2, 4, 13, 14, 16, 18, 19, 20, 39, 40, 49, 50, 52, 53 54, 55, 56 або 57 і щонайменше 95 % схожість (у певних тимчасових точках щонайменше 95 % ідентичність послідовності) з поліпептидами SEQ ID NO: 2, 4, 13, 14, 16, 18, 19, 20, 49, 50, 52, 53 54, 55, 56 або 57 і, в інших варіантах здійснення, поліпептиди, які мають щонайменше 96 %, 97 %, 98 % або 99 % схожість (у певних тимчасових точках 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичність послідовності) з поліпептидами SEQ ID NO: 2, 4, 13, 14, 16, 18, 19, 20, 39, 40, 49, 50, 52, 53 54, 55, 56 або 57. Як відомо в даній галузі, "схожість" між двома поліпептидами визначають порівнянням амінокислотної послідовності та її консервативних амінокислотних замін одного поліпептиду з послідовністю другого поліпептиду.

20 Фрагменти або частини поліпептидів даного винаходу можуть бути використані для одержання повнорозмірного поліпептиду пептидним синтезом; таким чином, ці фрагменти можуть бути використані для одержання повнорозмірних поліпептидів. Фрагменти або частини полінуклеотидів даного винаходу можуть бути використані для синтезу повнорозмірних полінуклеотидів даного винаходу.

25 У деяких варіантах здійснення, фрагмент білків цього винаходу є частиною білка або цілим білком, який здатний зв'язуватися з білком Notch-рецептора. Цей фрагмент має високу афінність відносно Notch-рецептора або ліганду Notch-рецептора. Деякі фрагменти злитих

білків є білковими фрагментами, що містять щонайменше частину Notch-зв'язуючого домену поліпептидного агента або антагоніста, злитого щонайменше з частиною константної області імуноглобуліну. Ця афінність знаходиться зазвичай у діапазоні приблизно 10^{-11} - 10^{-12} М, хоча ця афінність може значно варіюватися серед фрагментів різних розмірів, у діапазоні від 10^{-7} до 10^{-13} М. У деяких варіантах здійснення, цей фрагмент має приблизно 10-110 амінокислот у довжину і містить Notch-зв'язуючий домен поліпептидного агента або антагоніста, пов'язаний щонайменше з частиною константної області імуноглобуліну.

Поліпептиди й аналоги можуть бути додатково модифіковані для вмісту додаткових хімічних частин молекули, які в нормі не є частиною цього білка. Ці дериватизовані частини молекули можуть покращувати розчинність, біологічний час напівжиття або абсорбцію цього білка. Ці частини можуть також зменшувати або елімінувати будь-які небажані побічні ефекти цих білків і т.п. Огляд цих частин молекул може бути знайдений у Remington's Pharmaceutical Sciences, 20th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (2000).

Описані в даному описі виділені поліпептиди можуть бути отримані будь-яким відповідним способом, відомим у даній галузі. Такі способи знаходяться в діапазоні від прямого синтезу білка до конструювання ДНК-послідовності, що кодує виділені поліпептидні послідовності, й експресії цих послідовностей у відповідному трансформованому хазяїні.

У деяких варіантах рекомбінантного способу, конструюють ДНК-послідовність виділенням або синтезом ДНК-послідовності, що кодує білок дикого типу, що становить інтерес. Необов'язково, ця послідовність може бути піддана мутагенезу для забезпечення її функціональних аналогів. Див., наприклад, Zoeller et al., 1984, Proc. Nat Acad. Sci. USA 81:5662-5066 і Патент США No. 4588585. Іншим способом конструювання ДНК-послідовності, що кодує поліпептид, який становить інтерес, міг би бути хімічний синтез з використанням синтезатору олігонуклеотидів. Такі олігонуклеотиди можуть бути сконструйовані на основі амінокислотної послідовності бажаного поліпептиду й відбору тих кодонів, які є переважними в клітині-хазяїні, в якій продукуватиметься цей рекомбінантний поліпептид.

Для синтезу виділеної поліпептидної послідовності, що кодує виділений поліпептид, який становить інтерес, можуть бути використані стандартні способи. Наприклад, повна амінокислотна послідовність може бути використана для конструювання зворотно-трансльованого гена. Крім того, може бути синтезований ДНК-олігомер, що містить нуклеотидну послідовність, що кодує конкретний виділений поліпептид. Наприклад, можуть бути синтезовані й потім лігвані декілька малих олігонуклеотидів, що кодують частини бажаного поліпептиду. Ці окремі олігонуклеотиди зазвичай містять 5'- або 3'-виступи для збірки комплексу.

Після збірки (за допомогою синтезу, сайт-спрямованого мутагенезу або іншого способу), ДНК-послідовності мутантів, що кодують конкретний виділений поліпептид, що становить інтерес, інсертуватимуться в експресуючий вектор і функціонально зв'язуватимуться з регуляторними послідовностями експресії, відповідними для експресії цього білка в бажаному хазяїні. Правильна збірка може бути підтверджена нуклеотидним секвенуванням, рестрикційним картуванням і експресією біологічно активного поліпептиду у відповідному хазяїні. Як добре відомо в даній галузі, для одержання високих рівнів експресії трансфікованого гену в хазяїні цей ген функціонально пов'язують з регуляторними послідовностями транскрипції й трансляції, які є функціональними у вибраному експресуючому хазяїні.

Для ампліфікації й експресії ДНК, що кодує поліпептиди, можуть бути використані рекомбінантні експресуючі вектори. Рекомбінантні експресуючі вектори є реплікованими ДНК-конструкціями, які мають синтетичні або вироблені з кДНК ДНК-фрагменти, що кодують злитий Notch-рецептор, або біоеквівалентний аналог, функціонально пов'язаний з відповідними регуляторними елементами транскрипції й трансляції, отриманими з генів ссавців, генів мікробів, вірусів або комах. Транскрипційна одиниця зазвичай містить упорядковану структуру (1) генетичного елемента або елементів, що мають регуляторну роль в експресії гену, наприклад, промотори або енхансери транскрипції, (2) структурну або кодуючу послідовність, яка транскрибується в мРНК і транлюється в білок, і (3) відповідні послідовності ініціації й термінації транскрипції й трансляції, описані детально нижче. Такі регуляторні елементи можуть включати операторну послідовність для регуляції транскрипції. Може бути додатково включений сайт ініціації реплікації, який зазвичай додає здатність реплікації в хазяїні, й ген відбору для полегшення розпізнавання трансформантів. ДНК-області є функціонально зв'язаними, коли вони є функціонально родинними одне з одним. Наприклад, ДНК для сигнального пептиду (секреторного лідера) є функціонально пов'язаною з ДНК для поліпептиду, якщо вона експресується як попередник, який бере участь у секреції цього поліпептиду; промотор є функціонально пов'язаним з кодуючою послідовністю, якщо він регулює транскрипцію цього поліпептиду; або сайт зв'язування рибосом є функціонально пов'язаним з кодуючою

послідовністю, якщо він розташований таким чином, щоб зробити можливою трансляцію. Зазвичай, термін "функціонально зв'язані" означає суміжні й, у разі секреторних лідерів, означає прочитування, що є суміжними й знаходяться в рамці. Структурні елементи, призначені для використання в системі експресії дріжджів, включають лідерну послідовність, що допускає

5 позаклітинну секрецію трансльованого білка клітиною-хазяїном. Альтернативно, при експресії рекомбінантного білка без лідерної або транспортної послідовності, він може включати N-кінцевий залишок метіоніну. Цей залишок може бути, необов'язково, надалі відщеплений від експресованого рекомбінантного білка з утворенням кінцевого продукту.

Вибір регуляторної послідовності експресії й експресуючого вектора залежатиме від вибору хазяїна. Може бути використана велика різноманітність комбінацій хазяїн/вектор. Застосовні експресуючі вектори для еукаріотичних хазяїнів включають, наприклад, вектори, що містять регуляторні послідовності експресії з SV40, вірусу бичачої папіломи, аденовірусу й цитомегаловірусу. Застосовні вектори експресії для бактерійних хазяїнів включають відомі бактеріальні плазмідні, такі як плазмідні з *Escherichia coli*, в тому числі pCR1, pBR322, pMB9 та

10 їхні похідні, й плазмідні ширшого діапазону, такі як M13 і нитчасті одноланцюгові ДНК-фаги.

Придатні клітини-хазяї для експресії поліпептиду включають прокаріотів, дріжджі, клітини комах або вищі еукаріотичні клітини під контролем відповідних промоторів. Прокаріоти включають грамнегативні або грампозитивні організми, наприклад *E. coli* або *Bacilli*. Вищі еукаріотичні клітини включають встановлені лінії клітин, що походять із ссавців, описані тут.

20 Можуть бути також використані безклітинні системи трансляції. Придатні клонуючі й експресуючі вектори для використання з бактеріальними, грибовими, дріжджовими хазяїнами й клітинами-хазяїнами ссавців описані Pouwels et al. (Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, N. Y., 1985), релевантний опис яких включений у даний опис як посилання.

Для експресії рекомбінантного білка переважно використовуються також різні системи культур клітин ссавців або комах. Може виконуватися експресія рекомбінантних білків у клітинах ссавців, оскільки такі білки зазвичай є правильно укладеними, відповідним чином модифікованими й повністю функціональними. Приклади відповідних ліній клітин-хазяїнів ссавців включають лінії COS-7 клітин нирки мавпи, описані Gluzman 1981, Cell 23: 175, та інші клітинні лінії, здатні експресувати відповідний вектор, що включають, наприклад, клітини L, C127, 3T3, клітини яєчника китайського хом'яка (CHO), HeLa і клітинні лінії ВНК. Експресуючі вектори ссавців можуть містити нетранскрибовані елементи, такі як сайт ініціації реплікації, відповідні промотор і енхансер, пов'язані з підданим експресії геном, та інші 5'- або 3'-фланкуючі нетранскрибовані послідовності, й 5'- або 3'-нетрансльовані послідовності, такі як обов'язкові сайти зв'язування рибосом, сайт поліаденілювання, донорний і акцепторні сайти сплайсингу й

25 послідовності термінації транскрипції. Бакуловірусні системи для одержання гетерологічних білків у клітинах комах обговорюються в огляді Luckow and Summers, 1988, Bio/Technology 6:47.

Білки, продуктовані трансформованим хазяїном, можуть бути очищені згідно з будь-яким відповідним способом. Такі стандартні способи включають хроматографію (наприклад, іонообмінну, афінну й ексклюзійну колонкову хроматографію за розмірами), центрифугування,

30 диференціальну розчинність або будь-який інший стандартний спосіб для очищення білків. До білка можуть бути приєднані афінні мітки, такі як гексагістидин, мальтозузв'язуючий домен, послідовність оболонки вірусу грипу й глутатіон-S-трансфераза, для полегшення очищення за допомогою пропускання через відповідну афінну колонку. Виділені білки можуть бути також фізично охарактеризовані з використанням таких способів, як протеоліз, ядерний магнітний

35 резонанс і рентгенівська кристалографія.

Наприклад, супернатанти з систем, які секретують рекомбінантний білок в культуральні середовища, можуть бути спочатку сконцентровані з використанням комерційно доступного фільтру для концентрації білків, наприклад, ультрафільтраційної установки Amicon або Millipore Pellicon. Після стадії концентрації, концентрат може бути нанесений на відповідний матрикс для

40 очищення. Альтернативно, може бути використана аніонообмінна смола, наприклад матрикс або субстрат, що мають бічні діетиламіноетильні (ДЕАЕ) групи. Цими матриксами можуть бути акриламід, агароза, декстран, целюлоза або інші типи, зазвичай використовувані в очищенні білків. Альтернативно, може бути використана катіонообмінна стадія. Придатні катіонообмінники включають різні нерозчинні матрикси, що містять сульфопропильні або карбоксиметильні групи. Нарешті, можуть бути використані одна або декілька стадій вискоефективної рідинної хроматографії з оберненою фазою (ОФ-ВРХ), з використанням гідрофобних ОФ-ВРХ-середовищ, наприклад силікагелю, що має бічні метильні або інші аліфатичні групи, для додаткового очищення композиції білок ракових ствольних клітин-Fc. Деякі або всі з попередніх стадій очищення, в різних комбінаціях, можуть бути також використані

55 для забезпечення гомогенного рекомбінантного білка.

60

Рекомбінантний білок, що продукується в бактеріальній культурі, зазвичай виділяють початковою екстракцією з осадів клітин, з подальшими одним або декількома концентраціями, висолюванням, стадіями водної іонообмінної або ексклюзійної хроматографії за розмірами. Мікробні клітини, використовувані в експресії рекомбінантного білка, можуть бути зруйновані

5 будь-яким відповідним способом, що включає циклічне заморожування-відтавання, механічне руйнування або використання лізуючих клітини агентів.

У деяких варіантах здійснення, Notch-зв'язуючий агент або антагоніст містить антитіло. У деяких варіантах здійснення, це антитіло є по суті чистим.

Даний винахід забезпечує антитіла, які конкурують за специфічне зв'язування з Notch2 і/або Notch3 людини з антитілом, що містить варіабельну область важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO:14, і варіабельну область легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO:13. Даний винахід

10 забезпечує також антитіла, які конкурують за специфічне зв'язування з Notch2 і/або Notch3 людиною з антитілом, яке містить IgG2-антитіло 59R1 (або складається або по суті складається з нього), що містить важкий ланцюг і легкий ланцюг SEQ ID NO:16 і 18 (з сигнальною

15 послідовністю або без сигнальної послідовності), відповідно, або кодується ДНК, депонованою в ATCC 15 жовтня 2008 року та що отримала присвоєний номер РТА-9547.

Цей винахід забезпечує також антитіла, які специфічно зв'язуються з одним або декількома Notch-рецепторами, які містять один, два, три, чотири, п'ять і/або шість CDR SEQ ID NO:5-10, 22-27, 30 або 51 з однією - чотирма (тобто, 0, 1, 2, 3 або 4) консервативними замінами

20 амінокислот (див., наприклад, таблицю 1) на CDR. Цей винахід забезпечує також антитіла, які специфічно зв'язуються з одним або декількома Notch-рецепторами, які містять один, два, три, чотири, п'ять і/або шість CDR 59R1 (тобто, SEQ ID NO:5-10), з однією - чотирма консервативними амінокислотними замінами на один CDR. Таким чином, цей винахід

25 забезпечує антитіла, які специфічно зв'язуються з одним або декількома Notch-рецепторами людини, які містять один, два, три, чотири, п'ять і/або шість CDR 59R1. У деяких варіантах здійснення, ці антитіла містять CDR3 важкого ланцюга 59R1, з однією - чотирма консервативними амінокислотними замінами і CDR3 легкого ланцюга 59R1, з однією - чотирма консервативними амінокислотними замінами. В деяких варіантах здійснення, це антитіло

30 містить (а) CDR1 важкого ланцюга, що містить SSSGMS (SEQ ID NO:5), або його варіант, що містить 1, 2, 3 або 4 консервативних амінокислотних заміни; CDR2 важкого ланцюга, що містить VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6), або його варіант, що містить 1, 2, 3 або 4 консервативних амінокислотних заміни; і CDR3 важкого ланцюга, що містить GIFFAI (SEQ ID NO:7), або його варіант, що містить 1, 2, 3 або 4 консервативних амінокислотних заміни; і/або (b) CDR1 легкого ланцюга, що містить RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:8), або його варіант, що

35 містить 1, 2, 3 або 4 консервативних амінокислотних заміни; CDR2 легкого ланцюга, що містить GASSRAT (SEQ ID NO:9), або його варіант, що містить 1, 2, 3 або 4 консервативних амінокислотних заміни; і/або CDR3 легкого ланцюга, що містить QQYSNFPI (SEQ ID NO: 10), або його варіант, що містить 1, 2, 3 або 4 консервативних амінокислотних заміни.

Цей винахід забезпечує також антитіла, які специфічно зв'язуються з одним або декількома Notch-рецепторами, які містять один, два, три, чотири, п'ять і/або шість CDR 59R5 (тобто, SEQ ID NO:5, 6, 8-10, 51), з однією - чотирма консервативними амінокислотними замінами на CDR. У деяких варіантах здійснення, ці антитіла містять CDR3 важкого ланцюга 59R5, з однією - чотирма консервативними амінокислотними замінами, і/або CDR3 легкого ланцюга 59R5, з однією - чотирма консервативними амінокислотними замінами. В деяких варіантах здійснення,

45 це антитіло містить (а) CDR1 важкого ланцюга, що містить SSSGMS (SEQ ID NO:5), або його варіант, що містить 1, 2, 3 або 4 консервативних амінокислотних заміни; CDR2 важкого ланцюга, що містить VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6), або його варіант, що містить 1, 2, 3 або 4 консервативних амінокислотних заміни; і/або CDR3 важкого ланцюга, що містить SEFYTT (SEQ ID NO:51), або його варіант, що містить 1, 2, 3 або 4 консервативних амінокислотних заміни;

50 і/або (b) CDR1 легкого ланцюга, що містить RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:8), або його варіант, що містить 1, 2, 3 або 4 консервативних амінокислотних заміни; CDR2 легкого ланцюга, що містить GASSRAT (SEQ ID NO:9), або його варіант, що містить 1, 2, 3 або 4 консервативних амінокислотних заміни; і/або CDR3 легкого ланцюга, що містить QQYSNFPI (SEQ ID NO: 10), або його варіант, що містить 1, 2, 3 або 4 консервативних амінокислотних заміни. В деяких

55 варіантах здійснення, це антитіло містить CDR1 важкого ланцюга, що містить SSSGMS (SEQ ID NO:5), CDR2 важкого ланцюга, що містить VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6), і CDR3 важкого ланцюга, що містить SEFYTT (SEQ ID NO:51).

Забезпечено також антитіло, яке специфічно зв'язує Notch2 і/або Notch3 людини, де це антитіло містить CDR1 важкого ланцюга, що містить SSSGMS (SEQ ID NO:5), CDR2 важкого ланцюга, що містить VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6), і/або CDR3 важкого ланцюга, що

60 містить VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6), і/або CDR3 важкого ланцюга, що

містить (G/I)(I/S)F(F/Y)(A/P)(I/T/S/N) (SEQ ID NO:30). У деяких варіантах здійснення, CDR3 важкого ланцюга вибраний з групи, що складається з SEFYPT (SEQ ID NO:22), SSFFAS (SEQ ID NO:23), SSFYAS (SEQ ID NO:24), SSFFAT (SEQ ID NO:25), SIFYPS (SEQ ID NO:26) і SSFFAN (SEQ ID NO:27). У деяких варіантах здійснення, це антитіло містить CDR1 важкого ланцюга, що містить SSSGMS (SEQ ID NO:5), CDR2 важкого ланцюга, що містить VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6), і/або CDR3 важкого ланцюга, що містить GIFFAI (SEQ ID NO:7). У деяких варіантах здійснення, ці CDR важкого ланцюга містяться у варіабельній області важкого ланцюга людини. В деяких варіантах здійснення, це антитіло додатково містить CDR1 легкого ланцюга, що містить RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:8), CDR2 легкого ланцюга, що містить GASSRAT (SEQ ID NO:9), і/або CDR3 легкого ланцюга, що містить QQYSNFPI (SEQ ID NO: 10). У деяких варіантах здійснення, ці CDR легкого ланцюга містяться у варіабельній області легкого ланцюга антитіла. В деяких варіантах здійснення, ці CDR важкого ланцюга і/або ці CDR легкого ланцюга були модифіковані 1, 2, 3 або 4 консервативними амінокислотними замінами. В деяких варіантах здійснення, кожен з цих CDR був модифікований не більше ніж 1-2 консервативними амінокислотними замінами.

Наприклад, у деяких варіантах здійснення, цей винахід забезпечує антитіло, яке специфічно зв'язує Notch2 і/або Notch3 людини, де це антитіло містить: (а) CDR1 важкого ланцюга, що містить SSSGMS (SEQ ID NO:5), CDR2 важкого ланцюга, що містить VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6), і CDR3 важкого ланцюга, що містить GIFFAI (SEQ ID NO:7); і/або (b) CDR1 легкого ланцюга, що містить RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:8), CDR2 легкого ланцюга, що містить GASSRAT (SEQ ID NO:9), і/або CDR3 легкого ланцюга, що містить QQYSNFPI (SEQ ID NO: 10). У деяких варіантах здійснення, це антитіло містить вказані CDR як легкого ланцюга, так і важкого ланцюга.

У деяких варіантах здійснення, цей винахід забезпечує антитіло, яке специфічно зв'язує Notch2 і/або Notch3 людини, де це антитіло містить: (а) CDR1 важкого ланцюга, що містить SSSGMS (SEQ ID NO:5), CDR2 важкого ланцюга, що містить VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6), і CDR3 важкого ланцюга, що містить SEFYTT (SEQ ID NO:51); і/або (b) CDR1 легкого ланцюга, що містить RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:8), CDR2 легкого ланцюга, що містить GASSRAT (SEQ ID NO:9), і CDR3 легкого ланцюга, що містить QQYSNFPI (SEQ ID NO: 10). У деяких варіантах здійснення, це антитіло містить вказані CDR як легкого ланцюга, так і важкого ланцюга.

Цей винахід додатково забезпечує антитіло, яке специфічно зв'язує Notch2 і/або Notch3 людини, де це антитіло містить CDR1 легкого ланцюга, що містить RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:8), CDR2 легкого ланцюга, що містить GASSRAT (SEQ ID NO:9), і/або CDR3 легкого ланцюга, що містить QQYSNFPI (SEQ ID NO:10).

Цей винахід додатково забезпечує антитіло, яке специфічно зв'язує Notch2 і/або Notch3 людини, де це антитіло містить: (а) поліпептид, що має щонайменше приблизно 80 %, щонайменше приблизно 85 %, щонайменше приблизно 90 %, щонайменше приблизно 95 % або щонайменше приблизно 98 % ідентичність послідовності з SEQ ID NO:14 або SEQ ID NO:20; і/або (b) поліпептид, що має щонайменше приблизно 80 %, щонайменше приблизно 85 %, щонайменше приблизно 90 %, щонайменше приблизно 95 % або щонайменше приблизно 98 % ідентичність послідовності з SEQ ID NO:13 або SEQ ID NO:19. Таким чином, у деяких варіантах здійснення, це антитіло містить (а) варіабельну область важкого ланцюга, що має щонайменше приблизно 95 % ідентичність послідовності з SEQ ID NO:14; і/або (b) варіабельну область легкого ланцюга, що має щонайменше приблизно 95 % ідентичність послідовності з SEQ ID NO:13. У деяких варіантах здійснення, це антитіло містить: (а) поліпептид (наприклад, варіабельну область важкого ланцюга), що містить SEQ ID NO:14 або SEQ ID NO:20; і/або (b) поліпептид (наприклад, варіабельну область легкого ланцюга), SEQ ID NO:13, що містить, або SEQ ID NO:19.

Цей винахід забезпечує також антитіло, яке специфічно зв'язує Notch2 і/або Notch3 людини, де це антитіло містить: (а) поліпептид, що має щонайменше приблизно 80 %, щонайменше приблизно 85 %, щонайменше приблизно 90 %, щонайменше приблизно 95 % або щонайменше приблизно 98 % ідентичність послідовності з SEQ ID NO:50; і/або (b) поліпептид, що має щонайменше приблизно 80 %, щонайменше приблизно 85 %, щонайменше приблизно 90 %, щонайменше приблизно 95 % або щонайменше приблизно 98 % ідентичність послідовності з SEQ ID NO:13. Таким чином, у деяких варіантах здійснення, це антитіло містить (а) варіабельну область важкого ланцюга, що має щонайменше приблизно 95 % ідентичність послідовності з SEQ ID NO:50; і/або (b) варіабельну область легкого ланцюга, що має щонайменше приблизно 95 % ідентичність послідовності з SEQ ID NO:13. У деяких варіантах здійснення, це антитіло містить: (а) поліпептид (наприклад, варіабельну область важкого ланцюга), що містить SEQ ID

NO:50; i/або (b) поліпептид (наприклад, варіабельну область легкого ланцюга), що містить SEQ ID NO:13.

У деяких варіантах здійснення, ці антагоністи є антитілами, які можуть опосередкувати комплементзалежну цитотоксичність або антитілозалежну клітинну цитотоксичність для вбивання пухлин, експресуючих антиген-мішень. У деяких альтернативних варіантах здійснення, ці антитіла безпосередньо кон'юговані з токсинами або радіоізотопами для опосередкування вбивання пухлинних клітин. Крім того, виживання пухлини залежить від неоваскуляризації, й, у деяких варіантах здійснення, ці антитіла мають антиангіогенну дію.

Даний винахід забезпечує виділені антитіла проти Notch-рецептора, такого як Notch2 i/або Notch3 людини. Це антитіло, або фрагмент антитіла, може бути будь-яким моноклональним або поліклональним антитілом, яке специфічно розпізнає описаний Notch-рецептор. У деяких варіантах здійснення, даний винахід забезпечує моноклональні антитіла, або їх фрагменти, які специфічно зв'язуються з описаним тут Notch-рецептором. У деяких варіантах здійснення, ці моноклональні антитіла, або їх фрагменти, є химерними або гуманізованими антитілами, які специфічно зв'язуються з позаклітинним доменом описаного тут Notch-рецептора. В інших варіантах здійснення, ці моноклональні антитіла, або їх фрагменти, є антитілами людини, які специфічно зв'язуються з позаклітинним доменом описаного тут Notch-рецептора. В деяких варіантах здійснення, ці антитіла є IgG1- або IgG2-антитілами.

Ці антитіла проти Notch-рецептора знаходять застосування в описаних тут експериментальних, діагностичних і терапевтичних способах. У деяких варіантах здійснення, антитіла даного винаходу використовують для детектування експресії Notch-рецептора в біологічних пробах, таких як, наприклад, біопсія тканини пацієнта, плевральний випот або проба крові. Тканинні біопсії можуть використовуватися для приготування зрізів, і білок може бути детектований з використанням, наприклад, імунофлуоресценції або імуногістохімії. Альтернативно, окремі клітини з проби виділяють і експресію білка детектують на фіксованих або живих клітинах за допомогою FACS-аналізу. Крім того, ці антитіла можуть бути використані на матрицях (впорядкованих рядах) білків для детектування експресії Notch-рецептора, наприклад, на пухлинних клітинах, у лізатах клітин або в інших пробах білка. В інших варіантах здійснення, антитіла даного винаходу використовують для інгібування зростання пухлинних клітин контактом цих пухлинних клітин з цими антитілами або в аналізах на основі клітин *in vitro*, або в моделях тварин *in vivo*. В інших варіантах здійснення, ці антитіла використовують для лікування раку в пацієнта-людини введенням терапевтично ефективної кількості антитіла проти Notch-рецептора.

Поліклональні антитіл можуть бути отримані будь-яким відомим способом. Поліклональні антитіла індукують імунізацією тварини (наприклад, кроля, щура, миші, віслюка, кози тощо) множинними підшкірними або внутрішньоочеревинними ін'єкціями релевантного антигену (очищеного пептидного фрагмента, повнорозмірного рекомбінантного білка, злитого білка тощо), необов'язково кон'югованого з гемоціаніном морського молюска (KLH), сироватковим альбуміном тощо, розведеного в стерильному сольовому розчині й об'єднаного з ад'ювантом (наприклад, повним або неповним ад'ювантом Фрейнда) з утворенням стабільної емульсії. Потім це поліклональне антитіло витягують з крові, асцити тощо імунізованої таким чином тварини. Зібрану кров піддають згортанню й сироватку декантують, освітлюють центрифугуванням і аналізують на титр антитіл. Поліклональні антитіла можуть бути очищені з сироватки або асцити відповідно до стандартних у даній галузі способів, що включають афінну хроматографію, іонообмінну хроматографію, гель-електрофорез, діаліз і так далі.

Моноклональні антитіла можуть бути отримані з використанням гібридомних способів, таких як способи, описані Kohler and Milstein, 1975, Nature 256:495. З використанням гібридомного способу, мишу, хом'яка або іншу відповідну тварину імунізують, як описано вище для індукції продукування лімфоцитами антитіл, які специфічно зв'язуватимуться з імунізуючим антигеном. Альтернативно, лімфоцити можуть бути імунізовані *in vitro*. Після імунізації, ці лімфоцити виділяють і зливають з придатною лінією клітин мієломи з використанням, наприклад, поліетиленгліколю, для утворення гібридомних клітин, які потім можуть бути відібрані від незлитих лімфоцитів і мієломних клітин. Гібридами, які продукують моноклональні антитіла, спрямовані специфічно проти вибраного антигену, визначені імунопреципітацією, імуноблотингом або аналізом зв'язування *in vitro*, таким як радіоімуноаналіз (RIA) або твердофазний імуносорбентний аналіз (ELISA), можуть бути потім розмножені або культивуванням *in vitro* з використанням стандартних способів (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, 1986), або *in vivo* у вигляді асцитних пухлин у тварини. Потім ці моноклональні антитіла можуть бути очищені з культурального середовища або асцитної рідини, як описано для поліклональних антитіл вище.

Альтернативно, моноклональні антитіла можуть бути отримані з використанням способів рекомбінантних ДНК, як описано в Патенті США № 4816567. Полінуклеотиди, що кодують моноклональне антитіло, виділяють із зрілих в-клітин або гібридомної клітини, наприклад, за допомогою ОТ-ПЦР з використанням олігонуклеотидних праймерів, які специфічно ампліфікують гени, що кодують важкі й легкі ланцюги цього антитіла, та їх послідовність визначають з використанням загальноприйнятих процедур. Потім ці виділені полінуклеотиди, що кодують важкі й легкі ланцюги, клонують у придатні експресуючі вектори, які, при трансфекції в клітини-хазяїни, такі як клітини E. coli, клітини COS мавп, клітини яєчника китайського хом'яка (CHO) або міеломні клітини, які інакше не продукують імуноглобуліновий білок, експресують моноклональні антитіла в цих клітинах-хазяїнах. Рекомбінантні моноклональні антитіла або їх фрагменти бажаних видів можуть бути також виділені з бібліотек фагового дисплея, наприклад, як описано тут.

Полінуклеотид (полінуклеотиди), що кодують моноклональне антитіло, можуть бути додатково модифіковані низкою різних способів з використанням технології рекомбінантних ДНК для генерування альтернативних антитіл. Наприклад, у деяких варіантах здійснення, константні домени легкого ланцюга й важкого ланцюга, наприклад моноклонального антитіла миші, можуть замінювати 1) ці області, наприклад, антитіла людини для генерування химерного антитіла або 2) неімуноглобуліновий поліпептид для генерування злитого антитіла. В інших варіантах здійснення, ці константні області є скороченими або видаленими для генерування бажаного фрагмента антитіла моноклонального антитіла. Крім того, може бути використаний сайт-спрямований мутагенез або мутагенез високої щільності для оптимізації специфічності, афінності тощо моноклонального антитіла.

У загальнішому вигляді, модифіковані антитіла, застосовні в даному винаході, можуть бути отримані або вироблені з будь-якого антитіла. Крім того, вихідне антитіло або антитіло-попередник, або його фрагмент, використовувані для генерування описаних модифікованих антитіл, можуть бути мишачими антитілами, антитілами людини, химерними антитілами, гуманізованими антитілами, антитілами примату-не людини і приматизованими антитілами. В інших варіантах здійснення, модифіковані антитіла даного винаходу можуть містити одноланцюгові конструкції антитіл (такі як конструкції, описані в Патенті США № 5892019, включеному в даний опис як посилання), що мають змінні константні домени, описані тут. Таким чином, будь-які з цих типів антитіл, модифіковані відповідно до описаних тут способів, є сумісними з цим винаходом.

Згідно з даним винаходом, способи можуть бути адаптовані для одержання одноланцюгових антитіл, специфічних відносно поліпептиду цього винаходу (див. Патент США № 4946778). Крім того, способи можуть бути адаптовані для конструювання експресійних бібліотек Fab (Huse et al., 1989, Science 246:1275-1281) для швидкої й ефективної ідентифікації моноклональних Fab-фрагментів з бажаною специфічністю відносно Notch, або його фрагментів, аналогів або гомологів. Фрагменти антитіл, які містять ідіотипи відносно поліпептиду цього винаходу, можуть бути отримані відомими в даній галузі способами, що включають, але не обмежуються ними: (a) F(ab')₂-фрагмент, що отримується розщеплюванням пепсином молекули антитіла; (b) Fab-фрагмент, генерований відновленням дисульфідних містків F(ab')₂-фрагменту, (c) Fab-фрагмент, генерований обробкою молекули антитіла папаїном і відновним агентом, і (d) Fv-фрагменти.

В обсязі даного винаходу знаходяться також біспецифічні антитіла. Біспецифічні антитіла є моноклональними антитілами, переважно антитілами людини або гуманізованими антитілами, які мають специфічності зв'язування у відношенні щонайменше двох різних антигенів (або, в деяких варіантах здійснення, двох різних епітопів на тому самому антигені). В цьому випадку, одна зі специфічностей зв'язування є специфічністю зв'язування відносно антигенного поліпептиду цього винаходу (Notch або його фрагмента), тоді як другою мішенню зв'язування є будь-який інший антиген, і переважно є білок поверхні клітини або ретор або субодинаця ретора. Забезпечені біспецифічні антитіла, які містять один антигензв'язуючий сайт, який специфічно зв'язує один Notch-ретор людини (наприклад, Notch2), і додатково містять другий, відмінний антигензв'язуючий сайт, який специфічно зв'язує другий Notch-ретор людини (наприклад, Notch3).

Способи одержання біспецифічних антитіл відомі в даній галузі. Звичайне рекомбінантне одержання біспецифічних антитіл ґрунтується на коекспресії двох пар важкого ланцюга/легкого ланцюга імуноглобуліну, де ці два важкі ланцюги мають різні специфічності (Milstein and Cuello, 1983, Nature 305:537-539). Унаслідок випадкового реаранжирування важких і легких ланцюгів імуноглобуліну, ці гібридами (квадроми) продукують потенційну суміш десяти різних молекул

антитіл, з яких лише одна має правильну біспецифічну структуру. Очищення цієї правильної молекули зазвичай виконують афінною хроматографією.

Альтернативно, в деяких варіантах здійснення, описані тут антитіла можуть бути моноспецифічними. Наприклад, у деяких варіантах здійснення, кожен з одного або декількох антигензв'язуючих сайтів, які містять антитіло, здатний зв'язуватися (або зв'язується) з тими самими або декількома Notch-реторами людини (наприклад, Notch2, Notch3, або гомологічними епітопами як на Notch2, так і на Notch3).

Варіабельні домени антитіл з бажаними специфічностями зв'язування можуть зливатися з послідовностями константних доменів імуноглобуліну. Це злиття може відбуватися з константним доменом важкого ланцюга імуноглобуліну, що містить щонайменше частину шарнірної області, Сн2- і Сн3-областей. Перша константна область важкого ланцюга (СН1), що містить сайт, необхідний для зв'язування легкого ланцюга, може бути присутньою щонайменше в одному з цих злиттів. ДНК, що кодує ці злиття важкого ланцюга імуноглобуліну і, якщо бажано, легкого ланцюга імуноглобуліну, інсертують в окремі експресуючі вектори й котрансфікують у відповідний організм-хазяїн. Додаткові деталі генерування біспецифічних антитіл можуть бути знайдені в Suresh et al., 1986, *Methods in Enzymology* 121:210.

Біспецифічні антитіла можуть бути отримані у вигляді повнорозмірних антитіл або у вигляді фрагментів антитіл. Способи генерування біспецифічних антитіл з фрагментів антитіл були описані в літературі. Наприклад, біспецифічні антитіла можуть бути отримані з використанням утворення хімічного зв'язку. Крім того, Brennan et al., 1985, *Science* 229:81 описують процедуру, в якій інтактні антитіла розщеплюють для генерування F(ab')₂-фрагментів.

Крім того, Fab'-фрагменти можуть витягувати безпосередньо з *E. coli* й вони хімічно зв'язані з утворенням біспецифічних антитіл (Shalaby et al., 1992, *J. Exp. Med.* 175:217-225). Ці способи можуть бути використані в одержанні F(ab')₂-молекули повністю гуманізованого біспецифічного антитіла.

Розглядаються також антитіла з більш ніж двома валентностями. Наприклад, можуть бути отримані триспецифічні антитіла (Tutt et al., 1991, *J. Immunol.* 147:60).

Зразкові біспецифічні антитіла можуть зв'язуватися з двома різними епітопами, щонайменше один з яких походить з поліпептиду цього винаходу. Альтернативно, антиантгенне плече молекули імуноглобуліну може бути об'єднане з плечем, яке зв'язується із запускою молекулою на лейкоциті, такому як молекула Т-клітинного ретора (наприклад, CD2, CD3, CD28 або B7), або Fc-реторами для IgG, так щоб сконцентрувати механізми клітинного захисту на клітині, що експресує конкретний антиген. Ці антитіла мають антигензв'язуюче плече й плече, яке зв'язує цитотоксичний агент або радіонуклідний хелатотвірний агент, такий як EOTUBE, DPTA, DOTA або TETA.

Гетерокон'югатні антитіла також знаходяться в обсязі даного винаходу. Гетерокон'югатні антитіла складаються з двох ковалентно з'єднаних антитіл. Такі антитіла пропонувалися, наприклад, для націлювання імунних клітин на небажані клітини (Патент США № 4676980). Передбачається, що ці антитіла можуть бути отримані *in vitro* з використанням відомих способів у хімії синтетичних білків, що включають способи за участю живих агентів. Наприклад, можуть бути сконструйовані імунотоксини з використанням реакції обміну дисульфідів або за допомогою утворення тіоетерного зв'язку. Приклади відповідних реагентів для цих цілей включають імінотіолат і метил-4-меркаптобутиримідат.

Повинно бути зрозуміло, що для цілей даного винаходу модифіковані антитіла можуть містити будь-який тип варіабельної області, який забезпечує асоціацію цього антитіла з поліпептидами Notch. У цьому відношенні, варіабельну область можна отримати або можна виробити з будь-якого типу ссавця, який може бути індукований до виникнення гуморальної реакції й генерування імуноглобулінів проти бажаного асоційованого з пухлиною антигена. Як така, варіабельна область цих модифікованих антитіл може походити, наприклад, з миші, примату (не людини) (наприклад, собакоподібних мавп, макаків тощо) або вовчих. У деяких варіантах здійснення, як варіабельна, так і константна області модифікованих імуноглобулінів походять з імуноглобулінів людини. В інших варіантах здійснення, можуть бути сконструйовані або спеціально пристосовані варіабельні області сумісних антитіл (зазвичай вироблюваних з джерела-не людини) для поліпшення зв'язуючих властивостей або зменшення імуногенності цієї молекули. В цьому відношенні, варіабельні області, застосовні в даному винаході, можуть бути гуманізовані або змінені іншим чином за допомогою включення імпортованих амінокислотних послідовностей.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу, моноклональне антитіло проти Notch-ретора є гуманізованим антитілом. Гуманізовані антитіла є антитілами, які містять мінімальні послідовності з антитіл не людини (наприклад, мишастих) у їх варіабельних областях. Такі

антитіла використовують терапевтично для зменшення антигенності і НАМА-реакцій (антитіла людини проти мишачого Ig) при введенні суб'єктові-людині. На практиці, гуманізовані антитіла є зазвичай антитілами людини з мінімумом послідовностей не людини або без послідовностей не людини. Антитіло людини є антитілом, продукованим людиною, або антитілом, що має

5 амінокислотну послідовність, відповідну антитілу, що продукується людиною.

Гуманізовані антитіла можуть бути отримані з використанням різних способів, відомих у даній галузі. Антитіло може бути гуманізоване заміною CDR антитіла людини CDR антитіла не людини (наприклад, миші, щура, кроля, хом'яка тощо), що має бажані специфічність, афінність і/або потенційну ефективність. (Jones et al., 1986, Nature 321:522-525; Riechmann et al., 1988, Nature 332:323-327; Verhoeven et al., 1988, Science 239:1534-1536). Гуманізоване антитіло може

10 бути додатково модифіковане додатковими залишками в каркаській Fv-області й у заміненіх залишках не людини для поліпшення й оптимізації специфічності, афінності й/або потенційної ефективності.

Як альтернатива гуманізації, можуть бути продуковані антитіла людини. Антитіла людини

15 можуть бути отримані з використанням різних способів, відомих у даній галузі, в тому числі з трансгенних тварин, фагових бібліотек і активованих *in vitro* В-клітин.

Наприклад, тепер можна отримувати трансгенних тварин (наприклад, мишей), що містять локуси імуноглобулінів людини, які здатні, після імунізації, до продукування повного репертуару (спектру) антитіл людини за відсутності одержання ендogenous імуноглобуліну. Наприклад, описувалося, що гомогенна делеція гену області з'єднання (JH) важкого ланцюга антитіла в химерних і мутантних у зародковій лінії мишах приводить до повного інгібування продукування ендogenous антитіл. Перенесення масиву генів імуноглобулінів зародкової лінії людини в таких мутантних у зародковій лінії мишей мутантів приводить до продукування антитіл людини після антигенної стимуляції. Див., наприклад, Jakobovits et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2551; Jakobovits et al., 1993, Nature 362:255-258; Bruggemann et al., 1993, Year in Immuno. 7:33; Патенти США з номерами 5545806; 5569825; 5591669; 5545807; 5545807; 5625126; 5633425 і 5661016; і WO 97/17852.

Альтернативно, може бути використана технологія фагового дисплея для одержання антитіл людини і фрагментів антитіл *in vitro*, з репертуарів (спектрів) генів варіабельного (V) домену імуноглобуліну з неімунізованих донорів. Згідно з цим способом, гени домену V антитіла клонують у рамці зчитування або в ген головного білка оболонки, або в ген мінорного білка оболонки нитчастого бактеріофага, такого як M13 або fd, і демонструють у вигляді фрагментів функціонального антитіла на поверхні частки фага. Оскільки ця нитчаста частка містить одноланцюгову копію ДНК геному фага, відбори на основі функціональних властивостей цього антитіла приводять до відбору гена, що кодує антитіло, яке виявляє ці властивості. Таким чином, цей фаг імітує деякі властивості в-клітини. Фаговий дисплей може виконуватися в різних форматах. Для фагового дисплея можуть бути використані декілька джерел сегментів V-гену. Різноманітний масив анти-оксазолон-антитіл виділяли з малої випадкової комбінаційної бібліотеки V-генів, отриманих з селезінок імунізованих мишей. Вдалося сконструювати репертуар V-генів з неімунізованих донорів-людей і антитіла до різноманітного масиву антигенів (у тому числі аутоантигенів). Способи відбору антигенів людини з фагової бібліотеки, де ця фагова бібліотека експресує антитіла людини, добре відомі в даній галузі (Vaughan et al., 1996, Nature Biotechnology 14:309-314; Sheets et al., 1998, PNAS 95:6157-6162; Hoogenboom and Winter, 1991, J. Mol. Biol. 227:381; McCafferty et al., 1990, Nature 348:552-554; Clackson et al., 1991, Nature 352:624-628; і Marks et al., 1991, J. Mol. Biol. 222:581-597). Способи генерування й застосування фагових бібліотек антитіл описані також у Патентах США з номерами 5969108; 6172197; 5885793; 6521404; 6544731; 6555313; 6582915; 6593081; 6300064; 6653068; 6706484 і 7264963; і Rothe et al., 2008, J. Mol. Bio. 376:1182-1200 (кожен з яких включений у даний опис як посилання в повному обсязі). Стратегії дозрівання афінності, такі як перетасовування ланцюга (стаття Marks et al., 1992, Bio/Technology 10:779-783, включена в даний опис як посилання в повному обсязі), відомі в даній галузі й можуть бути використані для продукування високо афінних антитіл людини.

Антитіла людини можуть бути також отримані безпосередньо з використанням різних способів, відомих у даній галузі. Іморталізовані В-лімфоцити людини можуть бути продуковані *in vitro* або виділені з імунізованого індивідуума, які продукують антитіло, спрямоване проти антигену-мішені. (Див., наприклад, Cole et al., 1985, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77; Boemer et al., 1991, J. Immunol. 147 (1):86-95; Патенти США з номерами 5750373; 5567610 і 5229275).

Має бути зрозуміло, що трансплантація всіх варіабельних доменів не людини на константні області людини вироблятиме "класичні" химерні антитіла. В контексті даної заявки термін

"химерні антитіла" позначатиме будь-яке антитіло, в якому імунореактивна область або сайт отримані або вироблені з першого виду, а константна область (яка може бути інтактною, частковою або модифікованою відповідно до цього винаходу) отримана з другого виду. В деяких варіантах здійснення, ця антигензв'язуюча область або сайт походить з джерела-не людини (наприклад, миші), а константна область є константною областю людини. Хоча на імуногенну специфічність варіабельної області зазвичай не впливає його джерело, константна область людини з меншою вірогідністю індукуватиме імунну реакцію суб'єкта-людини, ніж константна область джерела-не людини.

Варіабельні домени як у важких, так і в легких ланцюгах змінюють щонайменше частковою заміною одного або декількох CDR і, якщо необхідно, частковою заміною каркасної області й модифікацією послідовності. Хоча ці CDR можуть бути вироблені з антитіла того ж класу або навіть підкласу, що й антитіло, з якого вироблені ці каркасні області, передбачається, що ці CDR будуть вироблені з антитіла іншого класу й переважно з антитіла з іншого виду. Слід підкреслити, що може бути не обов'язковою заміна всіх цих CDR повними CDR з донорської варіабельної області для перенесення антигензв'язуючої здатності одного варіабельного домену в інший варіабельний домен. Радше, може бути необхідним лише перенесення тих залишків, які необхідні для підтримки активності антигензв'язуючого сайту. За наявності пояснень, представлених у Патентах США з номерами 5585089; 5693761 і 5693762, сповна в компетенції фахівців з кваліфікацією в даній галузі буде одержання функціонального антитіла зі зменшеною імуногенністю чи то проведенням рутинного експериментування, чи то випробуванням і тестуванням помилок.

Попри зміни відносно варіабельної області, буде зрозуміло, що модифіковані антитіла цього винаходу міститимуть антитіла, або їх імунореактивні фрагменти, в яких щонайменше частина одного або декількох доменів константної області були делетовані або іншим чином змінені так, щоб забезпечувати бажані біохімічні й/або біологічні характеристики, такі як покращуване визначення місцезнаходження пухлини або зменшений час напівжиття в сироватці порівняно з антитілом приблизно тієї самої імуногенності, що містить нативну або незмінену константну область. У деяких варіантах здійснення, константна область цих модифікованих антитіл міститиме константну область людини. Модифікації відносно константної області, сумісні з цим винаходом, включають додавання, делеції або заміни однієї або декількох амінокислот в одному або декількох доменах. Тобто, модифіковані антитіла, описані в даному описі, можуть містити зміни або модифікації відносно одного або декількох з трьох константних доменів важкого ланцюга (CH1, CH2 або CH3) і/або константного домену легкого ланцюга (CL). У деяких варіантах здійснення цього винаходу, обговорюються модифіковані константні області, в яких один або декілька доменів частково або повністю делетовані. В інших варіантах здійснення, модифіковані антитіла міститимуть конструкції або варіанти з делетованим доменом, у яких був видалений повний домен CH2 (Δ CH2 конструкції). В додаткових інших варіантах здійснення, домен видаленої константної області буде замінений коротким амінокислотним спейсером (наприклад, з 10 залишків), який забезпечує певну молекулярну гнучкість, що зазвичай дається відсутньою константною областю.

Поряд з їх конфігурацією, в даній галузі відомо, що константні області опосередковують декілька ефекторних функцій. Наприклад, зв'язування C1-компонента комплементу з антитілами активує систему комплементу. Активація комплементу є важливою в опсонізації й лізисі патогенів клітин. Активація комплементу стимулює також запальну реакцію й може також брати участь у аутоімунній гіперчутливості. Крім того, антитіла зв'язуються з клітинами через Fc-область, причому Fc-реторний сайт у Fc-області антитіла зв'язується з Fc-ретором (FCR) на клітині. Є ряд Fc-реторів, які є специфічними відносно різних класів антитіл, що включають IgG (гамма-ретори), IgE (епсилон-ретори), IgA (альфа-ретори) і IgM (мю-ретори). Зв'язування антитіла з Fc-реторами на поверхні клітин запускає ряд важливих поведінкових і різноманітних реакцій, що включають поглинання й деструкцію покритих антитілами часток, кліренс імунних комплексів, лізис покритих антитілами клітин-мішеней клітинами-кілерами (названий антитілозалежною клітинноопосередкованою цитотоксичністю або ADCC), вивільнення медіаторів запалення, перехід через плаценту й регуляцію продукування імуноглобулінів. Хоча різні Fc-ретори й реторні сайти були в деякій мірі досліджені, багато що про їх місцезнаходження, структуру й функціонування все ще залишається невідомим.

Не обмежуючи обсяг даного винаходу, автори винаходу вважають, що антитіла, що містять константні області, модифіковані, як описано тут, забезпечують змінені ефекторні функції, які, у свою чергу, впливають на біологічний профіль уведеного антитіла. Наприклад, делеція або інактивація (через точкові мутації або інші способи) домену константної області може зменшувати зв'язування Fc-ретора циркулюючого модифікованого антитіла з поліпшенням за

допомогою цього локалізації пухлини. В інших випадках, може бути ситуація, в якій модифікації константної області, відповідно до цього винаходу, стримують зв'язування комплементу й, отже, зменшують час напівжиття в сироватці й неспецифічну асоціацію кон'югованого цитотоксину. В інших модифікаціях ця константна область може бути використана для елімінації дисульфідних зв'язків або олігосахаридних частин молекул, що дозволить поліпшити визначення місцезонашування пухлини внаслідок збільшеної антигенної специфічності або гнучкості антитіла. Так само, модифікації константної області відповідно до цього винаходу можуть бути легко виконані з використанням добре відомих біохімічних способів і способів молекулярної інженерії.

Слід зазначити, що модифіковані антитіла можуть бути сконструйовані для злиття СН3-домену безпосередньо з шарнірною областю відповідних модифікованих антитіл. У інших конструкціях може бути бажаним забезпечення пептидного спейсера між шарнірною областю й модифікованими СН2- і/або СН3-доменами. Наприклад, могли б експресуватися сумісні конструкції, в яких СН2-домен був делетований і залишковий СН3-домен (модифікований або немодифікований) був приєднаний до шарнірної області 5-20-амінокислотним спейсером. Такий спейсер може бути доданий, наприклад, для гарантії того, що регуляторні елементи константного домену залишаються вільними й доступними, або того, що шарнірна область залишається гнучкою. Проте слід зазначити, що амінокислотні спейсери можуть, у деяких випадках, виявитися імуногенними й індукувати небажану імунну реакцію проти цієї конструкції. Таким чином, будь-який спейсер, що додається до цієї конструкції, має бути відносно неімуногенним або навіть видаленим повністю, якщо мають бути збережені бажані біохімічні й/або біологічні якості модифікованих антитіл.

Буде зрозуміло, що, поряд з делецією доменів повної константної області, антитіла за даним винаходом можуть бути забезпечені частковою делецією або заміною невеликого числа або навіть єдиної амінокислоти. Наприклад, мутація єдиної амінокислоти у вибраних зонах СН2-домену може бути достатньою для істотного зменшення Fc-зв'язування й поліпшення за допомогою цього визначення місцезонашування (локалізації) пухлини. Так само, може бути бажаним просте делетування тієї частини одного або декількох доменів константної області, яка контролює ефекторну функцію, що підлягає модуляції (наприклад, зв'язування C1q комплементу). Такі часткові делеції константної області можуть покращувати вибрані властивості цього антитіла (час напівжиття в сироватці), залишаючи інтактними інші бажані функції, що асоціюються з даним доменом константної області. Крім того, як згадувалося вище, константні області описаних антитіл можуть бути модифіковані за допомогою мутації або заміни однієї або декількох амінокислот, яка покращує профіль отриманої конструкції. В цьому відношенні, можна зруйнувати активність, що забезпечується консервативним сайтом зв'язування (наприклад, Fc-зв'язування), при збереженні по суті конфігурації й імуногенного профілю модифікованого антитіла. Інші варіанти здійснення включають додавання однієї або декількох амінокислот до цієї константної області для поліпшення бажаних властивостей, таких як ефекторна функція, або забезпечення більшого приєднання цитотоксину або вуглеводу. В таких варіантах здійснення, може бути бажаним інсертування або реплікація специфічних послідовностей, вироблених з вибраних доменів константної області.

Цей винахід включає також біспецифічні антитіла, які специфічно розпізнають Notch-ретор. Біспецифічні антитіла є антитілами, які здатні специфічно впізнавати і зв'язувати щонайменше два різні епітопи. Ці різні епітопи можуть знаходитися або в тій самій молекулі (наприклад, у тому самому поліпептиді Notch-ретора), або на різних молекулах. Наприклад, ці антитіла можуть специфічно впізнавати і зв'язувати Notch-ретор, у також, наприклад, 1) ефекторну молекулу на лейкоциті, таку як Т-клітинний ретор (наприклад, CD3) або Fc-ретор (наприклад, CD64, CD32 або CD 16), або 2) цитотоксичний агент, як описано детально вище. Біспецифічні антитіла можуть бути інтактними антитілами або фрагментами антитіл. Способи одержання біспецифічних антитіл є звичайними в даній галузі (Millstein et al., 1983, Nature 305:537-539; Brennan et al., 1985, Science 229:81; Suresh et al, 1986, Methods in Enzymol. 121:120; Trauneker et al., 1991, EMBO J. 10:3655-3659; Shalaby et al., 1992, J. Exp. Med. 175:217-225; Kostelny et al., 1992, J. Immunol. 148:1547-1553; Gruber et al., 1994, J. Immunol. 152:5368; і Патент США № 5731168).

У деяких варіантах здійснення цього винаходу, може бути бажаним використання фрагмента антитіла, а не інтактного антитіла, для збільшення, наприклад, проникнення в пухлину. Відомі різні способи для одержання фрагментів антитіл. Зазвичай, ці фрагменти отримують протеолітичним розщеплюванням інтактних антитіл (наприклад, Morimoto et al., 1993, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 і Brennan et al., 1985, Science, 229:81). Проте ці фрагменти тепер отримують зазвичай безпосередньо з використанням експресії в

рекомбінантних клітинах, як описано в даному описі. Так, фрагменти антитіл Fab, Fv і scFv, всі, можуть бути експресовані в *E. coli* або інших клітинах-хазяях і секретовані з них, що дозволяє отримувати великі кількості цих фрагментів. Альтернативно, такі фрагменти антитіл можуть бути виділені з обговорюваних тут фагових бібліотек антитіл. Ці фрагменти антитіл можуть бути також лінійними антитілами, як описано, наприклад, у Патенті США № 5641870, і можуть бути моноспецифічними або біспецифічними. Інші способи одержання фрагментів антитіл будуть очевидними.

Крім того, може бути бажаною, особливо в разі фрагментів антитіл, модифікація антитіла для збільшення його часу напівжиття в сироватці. Це може бути досягнуто, наприклад, включенням зв'язуючого ретор порятунку епітопу в конкретний фрагмент антитіла мутацією області в цьому фрагменті антитіла або включенням цього епітопу в пептидну мітку, яку потім зливають з цим фрагментом антитіла на будь-якому кінці або в середині (наприклад, за допомогою синтезу ДНК або пептидного синтезу).

Даний винахід додатково включає варіанти й еквіваленти, які є по суті гомологічними химерним, гуманізованим антитілам і антитілам людини, або фрагменти цих антитіл, представлені тут. Вони можуть містити, наприклад, консервативну заміну однієї або декількох амінокислот схожими амінокислотами. Наприклад, консервативною заміною називають заміну амінокислоти іншою амінокислотою в тому самому загальному класі, наприклад, однієї кислотної амінокислоти іншою кислотною амінокислотою, однієї основної амінокислоти іншою основною амінокислотою або однієї нейтральної амінокислоти іншою нейтральною амінокислотою. Те, що розуміється під терміном консервативна амінокислотна заміна, добре відоме в даній галузі.

Цей винахід відноситься також до імунокон'югатів, що містять антитіло, кон'юговане з цитотоксичним агентом. Цитотоксичні агенти включають хіміотерапевтичні агенти, агенти, що інгібують зростання, токсини (наприклад, ферментативно активний токсин бактеріального, грибного, рослинного або тваринного походження, або їхні фрагменти), радіоактивні ізотопи (тобто радіокон'югат) і т.д. Хіміотерапевтичні агенти, застосовні в генеруванні таких імунокон'югатів, включають, наприклад, метотрексат, адриаміцин, доксорубіцин, мелфалан, мітоміцин С, хлорамбуцил, даунорубіцин або інші інтеркалюючі агенти. Ферментативно активні токсини та їхні фрагменти, які можуть бути використані, включають а-ланцюг дифтерійного токсину, незв'язуючі активні фрагменти дистерійного токсину, а-ланцюг екзотоксину, а-ланцюг рицинирицину, а-ланцюг абрину, а-ланцюг сарцину, білки *Aleurites fordii*, білки діантину, білки *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII і PAP-S), інгібітор *Momordica charantia*, курцин, кротин, інгібітор *Saponaria officinalis*, гелонін, мітогелін, рестриктоцин, феноміцин, еноміцин і трихотецени. Кон'югати цього антитіла й цитотоксичного агента отримують з використанням різних біфункціональних протеїнів зв'язуючих агентів, таких як N-сукцинімідил-3-(2-піридилдитіол)пропіонат (SPDP), імінотіолан (IT), біфункціональні похідні імідоєфірів (такі як диметиладипімідат HCL), активні ефіри (такі як дисукцинімідилсуберат), альдегіди (такі як глутаровий альдегід), біс-азидосполуки (такі як бісBIC(п-азидобензоїл)гександіамін), похідні біс-діазонію (такі як біс-(п-діазонійбензоїл)етилендіамін), діізоціанати (такі як толуол-2,6-діізоціант) і біс-активні сполуки фтору (такі як 1,5-дифтор-2,4-динітробензол). Кон'югати антитіла й цитотоксичного агента отримують з використанням одного або декількох токсинів з малою молекулою, таких як каліхеаміцини, майтансиноїди, трихотен і CC1065, і можуть бути також використані похідні цих токсинів, які мають активність токсину.

Кон'югатні антитіла складаються з двох ковалентно сполучених антитіл. Такі антитіла пропонувалися, наприклад, для націлювання імунних клітин на небажані клітини (Патент США №4676980). Передбачається, що ці антитіла можуть бути отримані *in vitro* з використанням відомих способів у хімії синтетичних білків, що включають способи за участю зживних агентів. Наприклад, можуть бути сконструйовані імунотоксини з використанням реакції обміну дисульфідів або за допомогою утворення тіоефірного зв'язку. Приклади відповідних реагентів для цих цілей включають імінотіолат і метил-4-меркаптобутиримідат.

У деяких варіантах здійснення, антитіло цього винаходу містить Fc-області людини, які модифіковані для збільшення ефекторної функції, наприклад, антитілозалежної клітинноопосередкованої цитотоксичності (ADCC) і/або комплементзалежної цитотоксичності (CDC). Це може досягатися введенням однієї або декількох амінокислотних заміни у Fc-області цього антитіла. Наприклад, залишок (залишки) цистеїну можуть бути введені в Fc-області для можливості утворення міжланцюгових дисульфідних зв'язків у цій області для поліпшення опосередкованого комплементом вбивання клітин і антитілозалежної клітинної цитотоксичності (ADCC) (Caron et al., 1992, J. Exp Med. 176:1191-1195; Shopes, 1992, Immunol. 148:2918-2922). Можуть бути також отримані гомодимерні антитіла із збільшеною протипухлинною активністю з

використанням гетеробіфункціональних зшиваючих лінкерів, як описано у Wolff et al., 1993, Cancer Research 53:2560-2565. Альтернативно, може бути сконструйоване антитіло, яке має подвійні Fc-області (Stevenson et al., 1989, Anti-Cancer Drug Design 3:219-230).

Незалежно від того, як отримують застосовні кількості, антитіла даного винаходу можуть бути використані в будь-якій з ряду кон'югованих (тобто імунокон'югатних) або некон'югованих форм. Антитіла цього винаходу можуть бути використані в некон'югованій або "голій" формі для використання природних механізмів захисту суб'єкта, що включають комплементзалежну цитотоксичність (CDC) і антитілозалежну клітинну токсичність (ADCC) для елімінації злоякісних клітин. У деяких варіантах здійснення, ці антитіла можуть бути кон'юговані з радіоізотопами, що включають, але не обмежуються ними, ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I , ^{123}I , ^{111}In , ^{131}In , ^{212}Bi , ^{105}Rh , ^{153}Sm , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{166}Ho , ^{177}Lu , ^{186}Re і ^{188}Re , з використанням будь-якого з ряду добре відомих хелатотвірних агентів або прямого мічення. В інших варіантах здійснення, описані композиції можуть містити антитіла, зв'язані з лікарськими засобами, проліками або модифікаторами біологічних реакцій, такими як метотрексат, адриаміцин і лімфокіни, такі як інтерферон. Інші варіанти даного винаходу включають застосування антитіл, кон'югованих із специфічними біотоксинами, як-от рицин або дифтерійний токсин. У інших додаткових варіантах здійснення, ці модифіковані антитіла можуть знаходитися в комплексі з іншими імунологічно активними лігандами (наприклад, антитілами або їхніми фрагментами), в яких отримана молекула зв'язується як з пухлинною (неопластичною) клітиною, так і з ефекторною клітиною, як-от Т-клітина. Вибір, яке кон'юговане або некон'юговане модифіковане антитіло використовувати, залежатиме від типу й стадії раку, використання додаткової терапії (наприклад, хіміотерапії або зовнішнього опромінення) й стану пацієнта. Має бути зрозуміло, що кваліфікований фахівець зможе легко виконувати такий відбір з використанням наведених тут описів.

Одержання й характеристика анти-Notch-антитіл описане також, наприклад, у Публікації заявки на патент США № 2008/0131434, яка включена в даний опис як посилання в повному обсязі.

В деяких варіантах здійснення, Notch-зв'язуючий агент або антагоніст є поліпептидом, який не є антитілом. У даній галузі відомі різні способи ідентифікації й одержання поліпептидів, що не є антитілами, які зв'язуються з високою афінністю з білком-мішенню. Див., наприклад, посилання Skerra, 2007, Curr. Opin. BIOTECHNOL, 18:295-304; Hosse et al., 2006, Protein Science, 15:14-27; Gill et al., 2006, Curr. Opin. BIOTECHNOL, 17:653-658; Nygren, 2008, FEBS J., 275:2668-76 і Skerra, 2008, FEBS J., 275:2677-83, кожне з яких включене в даний опис як посилання в повному обсязі. В деяких варіантах здійснення, для ідентифікації/отримання Notch-зв'язуючого поліпептиду використовували технологію фагового дисплею. В деяких варіантах здійснення, цей поліпептид містить білковий каркас типу, вибраного з групи, що складається з білка А, ліпокаліну, домену фібронектину, консенсусного повторюваного домену анкірину й тіоредоксину.

У деяких варіантах здійснення, цей агент є небілковою молекулою. В деяких варіантах здійснення, цей агент є малою молекулою. Комбінаторні хімічні бібліотеки й способи, застосовні в ідентифікації небілкових Notch-зв'язуючих агентів відомі кваліфікованим у даній галузі фахівцям. Див., наприклад, посилання Kennedy et al., 2008, J. Comb. Chem, 10:345-354; Dolle et al, 2007, J. Comb. Chem., 9:855-902 і Bhattacharyya, 2001, Curr. Med. Chem., 8:1383-404, кожне з яких включене в даний опис як посилання в повному обсязі. В деяких варіантах здійснення, цей агент є вуглеводом, глікозаміногліканом, глікопротеїном або протеогліканом.

У деяких варіантах здійснення, цей агент є аптамером нуклеїнової кислоти. Аптамери є полінуклеотидними молекулами, які були відібрані (наприклад, з випадкового або мутагенізованого пулу) на основі їх здатності зв'язуватися з іншою молекулою. В деяких варіантах здійснення, цей аптамер містить ДНК-полінуклеотид. У деяких варіантах здійснення, цей аптамер містить РНК-полінуклеотид. У деяких варіантах здійснення, цей аптамер містить один або декілька модифікованих залишків нуклеїнових кислот. Способи генерування й скринінгу аптамерів нуклеїнових кислот на зв'язування з білками добре відомі в даній галузі. Див., наприклад, Патенти США з номерами 5270163; 5,683,867; 5763595; 6344321; 7368236; 5582981; 5756291; 5840867; 7312325 і 7329742; Міжнародні Публікації № WO 02/077262 і № WO 03/070984; Публікації заявок на патент США з номерами 2005/0239134; 2005/0124565 і 2008/0227735, які включені в даний опис як посилання в повному обсязі.

Антитіла даного винаходу можуть бути аналізовані на імуноспецифічне зв'язування будь-яким способом, відомим у даній галузі. Імуноаналізи, які можуть бути використані, включають, але не обмежуються ними, конкурентні й неконкурентні системи, такі як Біасоре-аналіз, FACS-аналіз, імунофлуоресценція, імуногістохімія, Вестерн-блот-аналіз, радіоімуноаналіз, ELISA, "сендвіч"-імуноаналіз, аналіз імунопреципітації, преципітинова реакція, гель-дифузійна

преципітинова реакція, імунодифузійний аналіз, аналіз аглютинації, аналіз фіксації комплементу, імунорадіометричний аналіз, флуоресцентний аналіз та імуноаналіз білка А. Такі аналізи є рутинними й добре відомі в даній галузі (див., наприклад, посилання Ausubel et al, eds, 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York, яке включене в даний опис як посилання в повному обсязі).

У деяких варіантах здійснення даного винаходу, імуноспецифічність антитіла проти Notch-рецептора визначають з використанням ELISA. Аналіз ELISA включає приготування антигену, покриття лунок 96-лункового мікротитраційного планшету цим антигеном, додавання антитіла проти Notch-рецептора, кон'югованого з детектованою сполукою, як-от субстрат ферменту (наприклад, пероксидаза хрину або лужна фосфатаза), в лунку, інкубацію протягом деякого періоду часу й детектування присутності антигену. Альтернативно, антитіло проти Notch-рецептора не кон'югують з детектованою сполукою, але замість цього в лунку додають друге кон'юговане антитіло, яке розпізнає антитіло проти Notch-рецептора. Додатково, замість покриття лунки антигеном, антитіло проти Notch-рецептора може бути нанесене у вигляді покриття в лунку, а друге антитіло, кон'юговане з детектованою сполукою, може бути додане після додавання цього антигену в лунку, що має покриття. Параметри, які можуть бути модифіковані для збільшення детектованого сигналу, а також інші варіації ELISA добре відомі в даній галузі (див., наприклад, Ausubel et al., eds, 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York at 11.2.1).

Афінність зв'язування антитіл з Notch-рецептором і швидкість дисоціації взаємодії антитіло-антиген можуть бути визначені конкурентним аналізом зв'язування. Одним прикладом конкурентного аналізу зв'язування є радіоімуноаналіз, що передбачає інкубацію міченого антигену (наприклад, 3H або 125I), або його фрагмента або варіанту, з антитілом, що становить інтерес, у присутності збільшуваних кількостей неміченого антигену, з подальшим детектуванням антитіла, пов'язаного з цим міченим антигеном. Афінність цього антитіла проти Notch-рецептора й швидкості дисоціації зв'язування можуть бути визначені з результатів аналізу діаграми Скетчарда. В деяких варіантах здійснення, кінетичний аналіз Біасоре використовують для визначення швидкостей асоціації й дисоціації зв'язування антитіл проти Notch-рецептора. Кінетичний аналіз Біасоре передбачає аналіз зв'язування й дисоціації антитіл з мікрочипів з імобілізованими Notch-антигенами на їх поверхні.

Цей винахід забезпечує виділені полінуклеотиди, що кодують поліпептиди SEQ ID NO:2, 4, 13, 14, 16, 18, 19, 20, 39, 40, 49, 50, 52, 53, 54, 55, 56 або 57, а також полінуклеотиди SEQ ID NO:1, 3, 15, 17, 47 або 48. Полінуклеотиди цього винаходу можуть бути у формі РНК або у формі ДНК, де ДНК включає кДНК, геномну ДНК і синтетичну ДНК. Ця ДНК може бути двохланцюговою або одноланцюговою, та якщо вона є одноланцюговою, вона може бути кодуючим ланцюгом або некодуючим (антисмисловим) ланцюгом. Таким чином, термін "полінуклеотид, що кодує поліпептид", включає полінуклеотид, який включає лише кодуючі послідовності для поліпептиду, а також полінуклеотид, який включає додаткові кодуючі й/або некодуючі послідовності. В деяких варіантах здійснення, цей винахід забезпечує полінуклеотид, який гібридується з полінуклеотидом, що кодує поліпептиди SEQ ID NO:2, 4, 13, 14, 16, 18, 19, 20, 39, 40, 49, 50, 52, 53, 54, 55, 56 або 57. У деяких варіантах здійснення, ці полінуклеотиди гібридизуються за суворих умов гібридизації.

У даному контексті, фрази "гібридується" або "селективно гібридується" або "специфічно гібридується" відносяться до зв'язування або утворення дуплексу молекули лише з конкретною нуклеотидною послідовністю за суворих умов гібридизації, коли ця послідовність присутня в комплексній суміші (наприклад, бібліотеці ДНК або РНК). Див., наприклад, Andersen (1998) *Nucleic Acid Hybridization* Springer-Verlag; Ross (ed. 1997) *Nucleic Acid Hybridization* Wiley.

У даному контексті, фраза "суворі умови гібридизації" відноситься до умов, за яких зонд або інший полінуклеотид гібридуватиметься з його субпослідовністю-мішенню або іншою комплементарною послідовністю, зазвичай у комплексній суміші нуклеїнової кислоти, але зазвичай не з іншими послідовностями. Суворі умови є послідовність-залежними й будуть різними в різних обставинах. Довші послідовності гібридизуються специфічно при вищих температурах. Широке керівництво відносно гібридизації нуклеїнових кислот можна знайти в Tijssen, *Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Probes*, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays" (1993). Зазвичай, суворі умови вибирають таким чином, що вони передбачають температуру, яка є приблизно на 5-10°C нижчою, ніж температурна точка плавлення (Tm) для цієї конкретної послідовності при певній іонній силі. Ця Tm є температурою (при визначених іонній силі, pH і концентрації нуклеїнової кислоти), при якій 50 % зондів, комплементарних цій мішені, гібридизуються з цією

послідовністю-мішенню при рівновазі (коли ці послідовності-мішені присутні в надлишку, при T_m , 50 % цих зондів є зайнятими при рівновазі). Суворі умови будуть умовами, в яких концентрація солі рівна менше 1,0 Мм іону натрію, звичайно приблизно 0,01-1,0 Мм концентрації іону натрію (або інших солей) при pH 7,0-8,3, і температура рівна щонайменше 30°C для коротких зондів (наприклад, 10-50 нуклеотидів) і щонайменше приблизно 60°C для довгих зондів (наприклад, більших, ніж 50 нуклеотидів). Суворі умови можуть бути також досягнуті додаванням дестабілізуючих агентів, таких як формамід. Для гібридизації високої суворості, позитивний сигнал є гібридизацією, щонайменше вдвічі більшою, ніж фон, або в 10 разів більшою, ніж фон. Приблизні умови гібридизації високої суворості або умови суворі гібридизації включають: 50 % формамід, 5x SSC і 1 % ДСН, інкубовані при 42°C або 5x SSC і 1 % ДСН, інкубовані при 65°C, з промиванням у 0,2x SSC і 0,1 % ДСН при 65°C. Для ПЦР, температура приблизно 36°C є типовою для ампліфікації низької суворості, хоча температура відпалу може варіюватися від приблизно 32°C до приблизно 48°C залежно від довжини праймера. Для PCR-ампліфікації високої суворості, температура відпалу приблизно 62°C є типовою, хоча температури відпалу високої суворості можуть знаходитися в діапазоні від приблизно 50°C до приблизно 65°C, залежно від довжини й специфічності праймера. Типові умови циклів для ампліфікації як високої, так і низької суворості включають фазу денатурації 90°C-95°C протягом 30-120 сек, фазу відпалу, що триває 30-120 сек, і фазу подовження приблизно 72°C протягом 1-2 хвил.

Даний винахід відноситься, далі, до варіантів вищеописаних полінуклеотидів, які кодують фрагменти, аналоги й похідні. Варіант цього полінуклеотиду може бути алельним варіантом цього полінуклеотиду, що зустрічається в природі, або варіантом цього полінуклеотиду, що не зустрічається в природі.

Як вказано тут вище, цей полінуклеотид може мати кодуючу послідовність, яка є алельним варіантом кодуючої послідовності описаних поліпептидів, що зустрічається в природі. Як відомо в даній галузі, алельний варіант є іншою формою полінуклеотидної послідовності, яка має заміну, делецію або додавання одного або декількох нуклеотидів, які по суті не змінюють функцію кодованого поліпептиду.

Даний винахід включає також полінуклеотиди, в яких кодуюча послідовність зрілого поліпептиду може зливатися в тій самій рамці зчитування з полінуклеотидом з клітини-хазяїна, наприклад, лідерною послідовністю, яка функціонує як секреторна послідовність для регуляції транспорту поліпептиду з цієї клітини. Цей поліпептид, що має лідерну послідовність, є пробілком і може мати лідерну послідовність, що відщеплюється клітиною-хазяїном, з утворенням зрілої форми цього поліпептиду. Ці полінуклеотиди можуть також кодувати пробілок, який є зрілим білком плюс додаткові 5'-амінокислотні залишки. Зрілий білок, що має пропослідовність, є пробілком і є неактивною формою цього білка. Після відщеплення цієї пропослідовності, залишається активний зрілий білок.

Так, наприклад, полінуклеотид даного винаходу може кодувати зрілий білок або білок, що має як пропослідовність, так і препослідовність (лідерну послідовність).

Полінуклеотиди даного винаходу можуть також мати кодуючу послідовність, злику в рамці зчитування з маркерною послідовністю, яка дозволяє виконувати очищення поліпептиду даного винаходу. Наприклад, ця маркерна послідовність може бути гексагістидиною міткою, що постачається вектором pQE-9, для забезпечення очищення зрілого поліпептиду, злитого з цим маркером, в разі бактеріального хазяїна. Або, наприклад, ця маркерна послідовність може бути гемаглютининовою міткою (HA) при використанні ссавця як хазяїна, наприклад, клітин COS-7. Мітка HA відповідає епітопу, отриманому з білка гемаглютиніну вірусу грипу (Wilson et al., 1984, Cell 37:767).

Додаткові варіанти цього винаходу включають виділені молекули нуклеїнових кислот, що містять полінуклеотид, що має нуклеотидну послідовність щонайменше на 90 % ідентичну, на 95 % ідентичну і, в деяких варіантах здійснення, щонайменше на 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичну SEQ ID NO:1, 3, 15, 17, 47, 48, 58, 59 або 60. У деяких варіантах здійснення, полінуклеотиди, що містять нуклеотидну послідовність, щонайменше на 90 % ідентичну, на 95 % ідентичну й, у деяких варіантах здійснення, щонайменше на 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичну, гібридизуються з полінуклеотидами SEQ ID NO:1, 3, 15, 17, 47, 48, 58, 59 або 60. У деяких варіантах здійснення, полінуклеотиди, що містять нуклеотидну послідовність, щонайменше на 90 % ідентичну, на 95 % ідентичну і, в деяких варіантах здійснення, щонайменше на 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичну, гібридизуються з полінуклеотидами SEQ ID NO:58, 59 або 60. У деяких варіантах здійснення, ці полінуклеотиди гібридизуються за суворих умов гібридизації. В деяких варіантах здійснення, ці полінуклеотиди гібридизуються з полінуклеотидами SEQ ID NO:58, 59 або 60 за суворих умов гібридизації. Під полінуклеотидом,

що має нуклеотидну послідовність, щонайменше, наприклад, на 95 % "ідентичну" посилавальній нуклеотидній послідовності, мається на увазі, що нуклеотидна послідовність цього полінуклеотиду є ідентичною референсній послідовності, за винятком того, що ця полінуклеотидна послідовність може включати до п'яти точкових мутацій на кожних 100 нуклеотидів референсної послідовності. Іншими словами, для одержання полінуклеотиду, що має нуклеотидну послідовність, щонайменше на 95 % ідентичну посилавальній нуклеотидній послідовності, до 5 % нуклеотидів у референсній послідовності можуть бути делетовані або замінені іншим нуклеотидом, або кількість нуклеотидів до 5 % загальних нуклеотидів у референсній послідовності можуть бути інсертовані в цю посилавальну послідовність. Ці мутації референсної послідовності можуть зустрічатися в аміно- або карбокси-кінцевих положеннях посилавальної нуклеотидної послідовності або в будь-якому місці між цими кінцевими положеннями, в розсіяному вигляді або окремо серед нуклеотидів у референсній послідовності, або у вигляді однієї або декількох груп у цій референсній послідовності.

Практично, можна зручним чином визначити, чи має будь-яка конкретна молекула нуклеїнової кислоти напевно відсоткову ідентичність послідовності з референсною послідовністю (наприклад, має щонайменше приблизно 80 %, щонайменше приблизно 90 %, щонайменше приблизно 95 % або щонайменше приблизно 97 % ідентичність послідовності з референсною послідовністю, або є на 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичною референсній послідовності), з використанням відомих комп'ютерних програм, таких як програма Bestfit (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711). Bestfit використовує алгоритм локальної гомології Smith and Waterman, 1981, *Advances in Applied Mathematics* 2: 482-489, для знаходження найкращого сегменту гомології між двома послідовностями. При використанні Bestfit або будь-якої іншої програми зіставлення послідовностей для визначення, чи є конкретна послідовність, наприклад, на 95 % ідентичною референсній послідовності за даним винаходом, ці параметри встановлюють, звичайно, таким чином, що відсоток ідентичності розраховують упродовж повної довжини цієї референсної послідовності, й таким чином, що допускаються гепи в гомології до 5 % загальної кількості нуклеотидів у цій референсній послідовності.

Полінуклеотидні варіанти можуть містити зміни в кодуєчих областях, некодуєчих областях або в тих та інших. У деяких варіантах здійснення, ці полінуклеотидні варіанти містять зміни, які виробляють мовчазні заміни, додавання або делеції, але не змінюють властивості або активності кодованого поліпептиду. В деяких варіантах здійснення, нуклеотидні варіанти виробляються мовчазними замінами, внаслідок вродженості генетичного коду. Полінуклеотидні варіанти можуть вироблятися через обставин, наприклад, для оптимізації експресії кодонів для конкретного хазяїна, наприклад, зміни кодонів у мРНК людини на кодони, переважні для бактеріального хазяїна, такого як *E. coli*.

Даний винахід забезпечує також фармацевтичні композиції, що містять антагоністи (наприклад, антитіла), які націлені на Notch-рецептор. Ці фармацевтичні композиції знаходять застосування в інгібуванні зростання пухлинних клітин і лікуванні раку в пацієнтах-людях.

Готові форми отримують для зберігання й використання об'єднанням очищеного Notch-зв'язуючого агента або антагоніста (наприклад, антитіла) даного винаходу з фармацевтично прийнятним носієм, ексципієнтом і стабілізатором у вигляді стерильного порошку, водного розчину тощо (Remington, *The Science and Practice of Pharmacy* 20th Edition Mack Publishing, 2000). Придатні носії, ексципієнти або стабілізатори включають: нетоксичні буфери, такі як фосфат, цитрат та інші органічні кислоти; солі, такі як хлорид натрію; антиоксиданти, такі як аскорбінова кислота й метіонін; консерванти, такі як октадецилдиметиламонійхлорид, гексаметонійхлорид, бензалконійхлорид, бензетонійхлорид, фенол, бутиловий або бензиловий спирт, алкілпарабени, такі як метил або пропілпарабен, катехін, резорцин, циклогексанол, 3-пентанол і м-крезол; низькомолекулярні поліпептиди (менші за приблизно 10 амінокислотних залишків); білки, такі як сироватковий альбумін, желатин та імуноглобуліни; гідрофільні полімери, такі як полівінілпіролідон; амінокислоти, такі як гліцин, глютамін, аспарагін, гістидин, аргінін і лізин; вуглеводи, такі як моносахариди, дисахариди, глюкоза, маноза й декстрин; хелатотвірні агенти, такі як ЕДТА; цукри, такі як цукроза, маніт, трегалоза й сорбіт; солетвірні протиіони, такі як натрій; комплекси металів, такі як комплекси Zn-білок; і/або неіоногенні поверхнево-активні речовини, такі як ТВІН і поліетиленгліколь (PEG).

Фармацевтичні композиції даного винаходу можуть вводитися будь-якою кількістю способів для або місцевого, або системного лікування. Введення може бути локальним (наприклад, у мембрани, що секретують слиз, що включають вагінальну й ректальну доставку) з використанням трансдермальних пластирів, мазей, лосьйонів, кремів, гелів, крапель супозиторіїв, спреїв, рідин і порошків; легенеvim (наприклад, за допомогою інгаляції або

інсуфляції або аерозолів, у тому числі за допомогою розпилювача; інтратрахеальним, інтраназальним, епідермальним і трансдермальним); пероральним або парентеральним, у тому числі внутрішньовенною, внутрішньоартеріальною, підшкірною, внутрішньоочеревинною, внутрішньопухлинною або внутрішньом'язовою ін'єкцією або інфузією; або внутрішньочерепним (наприклад, інтратекальним або інтравентрикулярним) введенням.

Терапевтична готова форма може знаходитися в одиничній дозованій формі. Такі готові форми включають пігулки, пілюлі, капсули, порошки, гранули, розчини або суспензії у воді або в неводних середовищах, або супозиторії для перорального, парентерального або ректального введення або для введення інгаляцією. В твердих композиціях, таких як пігулки, основний активний інгредієнт змішаний з фармацевтичним носієм. Зручні таблетуючі інгредієнти включають кукурудзяний крохмаль, лактозу, цукрозу, сорбіт, тальк, стеаринову кислоту, стеарат магнію, дикальційфосфат або камедь та інші розчинники (наприклад, воду) для утворення твердої заздалегідь приготованої композиції, що містить гомогенну суміш сполуки даного винаходу або її нетоксичної фармацевтично прийнятної солі. Потім цю тверду заздалегідь приготовану композицію розділяють на одиничні дозовані форми описаного вище типу. Пігулки, пілюлі тощо цієї нової композиції можуть мати покриття або можуть бути компаундовані іншим чином для забезпечення лікарської форми, що надає перевагу пролонгованої дії. Наприклад, ця пігулка або пілюля може містити внутрішню композицію, покриту зовнішнім компонентом. Крім того, ці два компоненти можуть бути розділені ентросолюбільним шаром, який служить для протидії дезінтеграції й дозволяє внутрішньому компоненту проходити інтактним через шлунок або мати затримане вивільнення. Для таких ентросолюбільних шарів або покриттів можуть бути використані різні матеріали, причому такі матеріали включають ряд полімерних кислот і суміші полімерних кислот з такими матеріалами, як шелак, цетиловий спирт і ацетат целюлози.

Фармацевтичні композиції включають антагоністи (наприклад, антитіла) даного винаходу, що знаходяться в комплексі з ліпосомами (Epstein, et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688; Hwang, et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030; і Патенти США з номерами 4485045 і 4544545). Ліпосоми зі збільшеним часом циркуляції описані в Патенті США № 5013556. Деякі ліпосоми можуть бути отримані обернено-фазовим випаровуванням з ліпідною композицією, що містить фосфатидилхолін, холестерин і PEG-дериватизований фосфатидилетаноламін (PEG-PE). Ліпосоми екструдують через фільтри з певним розміром пір з утворенням ліпосом бажаного діаметру.

Цей антагоніст (наприклад, антитіло) може бути також поміщений у мікрокапсули. Такі мікрокапсули готують, наприклад, способами коацервації або міжфазною полімеризацією, наприклад, гідроксиметилцелюлози або мікрокапсул желатину й полі(метилметакрилатних)мікрокапсул, відповідно, в системах доставки колоїдних лікарських засобів (наприклад, ліпосом, альбумінових мікросфер, мікроемulsій, наночасток і нанокapsул) або в макроемulsіях, як описано в Remington's, The Science and Practice of Pharmacy, 20th Ed., Mack Publishing (2000).

Крім того, можуть бути приготовані препарати пролонгованого вивільнення. Придатні приклади препаратів пролонгованого вивільнення включають напівпроникні матрикси твердих гідрофобних полімерів, що містять антитіло, причому ці матрикси знаходяться у формі сформованих виробів (наприклад, плівок або мікрокапсул). Приклади матриксів пролонгованого вивільнення включають поліефіри, гідрогелі, такі як полі(2-гідроксietилметакрилат) або полі(вініловий спирт), полілактиди (Патент США № 3773919), співполімери L-глутамінової кислоти й 7-етил-L-глутамату, недеградований співполімер етилену й вінілацетату, деградований співполімер молочної кислоти й гліколевої кислоти, такі як Lupron Depot (ін'єктовані мікросфери, що складаються зі співполімеру молочної кислоти й гліколевої кислоти й ацетату лейпроліду), ацетат-ізобутират цукрози й полі-D(-)-3-гідроксимаєляну кислоту.

В деяких варіантах здійснення, ці фармацевтичні композиції містять як Notch-зв'язуючий агент або антагоніст, так і другий терапевтичний агент. У деяких варіантах здійснення, цей другий терапевтичний агент є протираковим агентом і/або антиангіогенним агентом.

Даний винахід забезпечує способи інгібування зростання або проліферації онкогенних клітин, експресуючих Notch-рецептор, з використанням описаних тут антагоністів Notch-рецептора. В деяких варіантах здійснення, ці способи передбачають інгібування зростання онкогенних клітин, експресуючих Notch2- і/або Notch3-рецептор, з використанням будь-якого з описаних тут антитіл або поліпептидів. У деяких варіантах здійснення, цей спосіб інгібування зростання онкогенних клітин, експресуючих Notch-рецептор, передбачає контакт клітини з антагоністом проти Notch-рецептора *in vitro*. Наприклад, лінію іморталізованих клітин або лінію ракових клітин, яка експресує Notch-рецептор, культивують у середовищі, до якого додають антитіло, яке специфічно зв'язується з Notch2 і/або Notch3 й інгібує зростання клітин. Або

пухлинні клітини й/або пухлинні ствольні клітини виділяють з проби пацієнта, такої як, наприклад, тканинна біопсія, плевральний випот або проба крові, й культивують у середовищі, до якого додають антитіло, яке специфічно зв'язується з Notch2 і/або Notch3 і інгібує зростання клітин. У деяких варіантах здійснення, цей антагоніст є антитілом, яке специфічно розпізнає епітоп Notch2- і/або Notch3-рецептора.

У деяких варіантах здійснення, цей спосіб інгібування зростання або проліферації онкогенних клітин, експресуючих Notch-рецептор, передбачає контакт клітини з антагоністом проти Notch-рецептора (наприклад, антагоністом Notch2 і/або Notch3) *in vivo*. У деяких варіантах здійснення, контакт онкогенної клітини з антагоністом відносно Notch-рецептора здійснюють у моделі тварини. Наприклад, ксенотрансплантати, експресуючі Notch-рецептор, вирощують у мишах з послабленим імунітетом (наприклад, мишах NOD/SCID). Цим мишам вводять антагоніст до Notch-рецептора для інгібування зростання пухлини. Альтернативно, ракові ствольні клітини, які експресують Notch-рецептор, виділяють з проби від пацієнта, такої як, наприклад, тканинна біопсія, плевральний випот або проба крові, й ін'єктують мишам з ослабленим імунітетом. Потім цим мишам вводять антагоніст проти Notch-рецептора для інгібування зростання пухлинних клітин. У деяких варіантах здійснення, цей антагоніст Notch-рецептора вводять одночасно з введенням онкогенних клітин або незабаром після введення онкогенних клітин для запобігання зростанню клітин. У інших варіантах здійснення, антагоніст Notch-рецептора вводять як терапевтичний агент після того, як ці онкогенні клітини зростають до вказаного розміру. В деяких варіантах здійснення, цей антагоніст є злиттям білка Notch-рецептора, яке специфічно зв'язується з Notch-рецептором. У деяких варіантах здійснення, цей антагоніст є антитілом, яке специфічно розпізнає епітоп Notch-рецептора. В деяких варіантах здійснення, це антитіло є будь-яким з антитіл або поліпептидів, описаних тут.

У деяких варіантах здійснення, контакт онкогенної клітини з антагоністом Notch-рецептора здійснюють у пацієнта-людини зі встановленим діагнозом раку. В деяких варіантах здійснення, цей антагоніст є антитілом, яке специфічно зв'язується з Notch-рецептором. У інших варіантах здійснення, цей антагоніст є антитілом, яке специфічно розпізнає епітоп Notch-рецептора. Наприклад, цей винахід забезпечує спосіб інгібування зростання пухлини в суб'єкта, що передбачає введення цьому суб'єктові терапевтично ефективної кількості антагоніста Notch2 і/або Notch3 людини. В деяких варіантах здійснення, цей антагоніст є антитілом, яке зв'язується з Notch2. У деяких варіантах здійснення, цей антагоніст є антитілом, яке зв'язується з Notch3. У деяких варіантах здійснення, цей антагоніст є антитілом, яке зв'язується з Notch2 і Notch3. У деяких варіантах здійснення, цей антагоніст є антитілом або поліпептидом, описаним в будь-якому з вищезазначених аспектів або варіантів, а також будь-яких інших аспектів або варіантів, описаних тут. У деяких варіантах здійснення, ця пухлина містить інактивуючу делецію або мутацію в гені фосфатази або гомолога тензину (PTEN).

Цей винахід забезпечує далі спосіб інгібування передачі сигналу Notch (наприклад, Notch2 і/або Notch3) в клітині, що передбачає контакт цієї клітини з ефективною кількістю Notch-антагоніста. Ці способи можуть бути способами *in vivo* або *in vitro*. В деяких варіантах здійснення, Notch-антагоніст є антитілом. У деяких варіантах здійснення ці способи передбачають інгібування передачі сигналу Notch2 у клітині, що передбачає контакт цієї клітини з ефективною кількістю будь-якого з антитіл або поліпептидів вищезазначених аспектів або варіантів, а також інших описаних тут аспектів або варіантів. У деяких варіантах здійснення, антагоніст Notch є антитілом. У деяких варіантах здійснення, ці способи передбачають інгібування передачі сигналу Notch3 в клітині, що передбачає контакт цієї клітини з ефективною кількістю будь-якого з антитіл або поліпептидів вищезазначених аспектів або варіантів, а також інших описаних тут аспектів або варіантів.

Цей винахід забезпечує додатково спосіб модуляції функції перичитів і/або клітин гладких м'язів судин, що передбачає введення ефективної кількості антагоніста Notch3 людини суб'єктові. У деяких варіантах здійснення, цей спосіб інгібує ангиогенез модуляцією функції перичитів і клітин гладких м'язів судин. У деяких варіантах здійснення, цей антагоніст є антитілом або пептидом, описаним у будь-якому з вищезазначених аспектів або варіантів, а також будь-яких інших аспектах або варіантах, описаних тут. У деяких варіантах здійснення, розвиток судин, який інгібується, знаходиться в пухлині. В деяких варіантах здійснення, цей спосіб додатково передбачає введення суб'єктові антагоніста VEGF або VEGF-рецептора.

Крім того, цей винахід забезпечує способи інгібування ангиогенезу або розвитку судин у суб'єкта, що передбачають введення ефективної кількості Notch-антагоніста цьому суб'єктові. В деяких варіантах здійснення, Notch-антагоніст є антагоністом Notch3. У деяких варіантах здійснення, Notch-антагоніст є антагоністом Notch2. У деяких варіантах здійснення, Notch-антагоніст є антагоністом Notch2 і/або Notch3. У деяких варіантах здійснення, цей антагоніст

являє собою анти-Notch3/3-антитіла. У деяких варіантах здійснення, цей спосіб інгібування ангіогенезу передбачає введення антитіла або поліпептиду будь-якого з вищезазначених аспектів або варіантів, а також будь-яких інших описаних тут варіантів або аспектів. У деяких варіантах здійснення цей ангіогенез є ангіогенезом пухлини. В деяких варіантах здійснення, цей ангіогенез не є ангіогенезом пухлини. В деяких варіантах здійснення, інгібування ангіогенезу або розвитку судин обумовлене, щонайменше частково, модуляцією функції перицитів і/або клітин гладких м'язів судин. У деяких варіантах здійснення, цей спосіб додатково передбачає введення цьому суб'єктові антагоніста ендотеліального чинника зростання судин (VEGF) або VEGF-рецептора.

Забезпечені також способи зменшення онкогенності пухлини (наприклад, пухлини, яка містить ракові ствольні клітини). В деяких варіантах здійснення, ці способи передбачають уведення суб'єктові, що потребує цього (наприклад, суб'єктові, що має пухлину), терапевтично ефективної кількості Notch-антагоніста. В деяких варіантах здійснення, цей Notch-антагоніст є антитілом, яке зв'язує Notch2. У деяких варіантах здійснення, цей Notch-антагоніст є антитілом, яке зв'язує Notch3. У деяких варіантах здійснення, цей Notch-антагоніст є антитілом, яке зв'язує Notch2 і Notch3. У деяких варіантах здійснення, цей Notch-антагоніст є антитілом або поліпептидом будь-якого з вищезазначених аспектів або варіантів, а також будь-яких інших варіантів або аспектів, описаних у іншому місці тут. У деяких варіантах здійснення, стрівальність (частота) ракових ствольних клітин зменшується введенням цього антитіла. В деяких варіантах здійснення, ця пухлина є колоректальною пухлиною, пухлиною підшлункової залози або меланою.

Крім того, очікується, що агенти й антагоністи даного винаходу можуть бути використані для лікування різних станів, що характеризуються експресією Notch-рецептора і/або збільшеною чутливістю клітин до Notch-рецептора. Цей винахід забезпечує способи лікування проліферативного захворювання, такого як рак, захворювань, що асоціюються з ангіогенезом (наприклад, ангіогенез-залежних захворювань), і захворювань, у яких грає роль збільшувальна регуляція або порушення регуляції передачі сигналу Notch.

У деяких варіантах здійснення, захворювання, що піддається лікуванню Notch-зв'язуючими агентами або антагоністами, є зв'язаним в Notch захворюванням. У деяких варіантах здійснення, це захворювання характеризується збільшувальною регуляцією або порушенням регуляції передачі сигналу Notch (наприклад, передачі сигналу Notch2 і/або Notch3). У деяких варіантах здійснення, це захворювання або ця пухлина є Notch2- і/або Notch3-залежними.

Конкретно, очікується, що ці антагоністи (наприклад, антитіла) проти Notch-рецептора використовуватимуться для лікування проліферативних порушень, що включають, але не обмежуються ними, доброякісні й злоякісні пухлини нирки, печінки, сечового міхура, молочної залози, шлунку, яєчника, ободової кишки, прямої кишки, передміхурової залози, легені, вульви, щитовидної залози, голови й шиї, головного мозку (гліобластоми, астроцитомы, медулобластоми тощо), крові й лімфи (лейкозів і лімфом). У деяких варіантах здійснення, проліферативне порушення, для лікування якого використовують Notch-зв'язуючий агент або антагоніст, є колоректальним раком, раком молочної залози, раком підшлункової залози або меланою. В деяких варіантах здійснення, цей рак містить ракові ствольні клітини.

У деяких варіантах здійснення, потребуючі лікування пухлини є солідними пухлинами. Приклади солідних пухлин, які можуть лікуватися з використанням терапевтичної композиції даного винаходу, наприклад антитіла, яке зв'язує Notch, включають, але не обмежуються ними, саркоми й карциноми, такі як фібросаркома, міксосаркома, ліпосаркома, хондросаркома, остеогенна саркома, хордома, ангіосаркома, ендотеліосаркома, лімфангіосаркома, лімфангіоендотеліосаркома, синовіома, мезотеліома, пухлина Юїнга, лейоміосаркома, рабдіоміосаркома, саркома ободової кишки, рак підшлункової залози, рак молочної залози, рак яєчника, плоскоклітинна карцинома, базально-клітинна карцинома, аденокарцинома, карцинома потових залоз, карцинома сальних залоз, папілокарцинома, папілярна аденокарцинома, цистаденокарцинома, медулярний рак, бронхогенний рак, нирково-клітинний рак, гепатома, рак жовчних проток, хоріокарцинома, семіома, ембріональна карцинома, пухлина Вільмса, рак шийки матки, тестикулярна пухлина, рак легені, дрібноклітинний рак легені, карцинома сечового міхура, епітеліальний рак, гліома, астроцитомы, медулобластома, краніофарингіома, епендиміома, пінеалома, гемангіобластоманевринома слухового нерву, олігодендрогліома, менінгіома, меланома, нейробластома й ретинобластома. Цей винахід застосовний до сарком і епітеліальних раків, як-от раку яєчника й раку молочної залози. В деяких варіантах здійснення, ця пухлина є колоректальною пухлиною, пухлиною молочної залози, пухлиною підшлункової залози або меланою. В деяких варіантах здійснення, ця пухлина є пухлиною яєчника. В

деяких варіантах здійснення, ця пухлина є медулобластомою. В деяких варіантах здійснення, ця пухлина містить ракові стоволові клітини.

У деяких варіантах здійснення, захворювання, що потребує лікування Notch-зв'язуючим агентом або антагоністом, є захворюванням, що асоціюється з ангиогенезом. У деяких варіантах здійснення, це захворювання є раком. У інших варіантах здійснення, це захворювання не є раком. Наприклад, це захворювання може бути вологою дегенерацією жовтої плями, пов'язаною зі старінням дегенерацією жовтої плями, діабетичною ретинопатією, гемангіомою, ревматоїдним артритом, псоріазом, неоваскулярною глаукомою, полікістозом яєчника, ендометріозом і запальними порушеннями кишечника.

У деяких варіантах здійснення, ця пухлина експресує Notch-рецептор або рецептори, на які націлений Notch-зв'язуючий агент або антагоніст. У деяких варіантах здійснення, ця пухлина експресує Notch2 і/або Notch3. У деяких варіантах здійснення, пухлина надекспресує Notch2 і/або Notch3. У деяких варіантах здійснення, ця пухлина залежить від одного або деяких Notch-рецепторів, з якими специфічно зв'язується антитіло, що вводиться. Наприклад, у деяких варіантах здійснення, антитіло, яке специфічно зв'язує Notch2 (або Notch2 і Notch3), може бути використане для інгібування зростання Notch2-залежної пухлини або іншої дії на Notch2-залежну пухлину. В деяких варіантах здійснення, антитіло, яке специфічно зв'язує Notch3 (або Notch2 і Notch3), може бути використане для інгібування зростання Notch-залежної пухлини або іншої дії на Notch3-залежну пухлину. В деяких варіантах здійснення, ця пухлина містить ракові стоволові клітини.

У деяких варіантах здійснення, ця пухлина є гомозиготною або гетерозиготною відносно делеції або мутації в гені, що кодує пухлинну супресорну фосфатазу й гомолог тензину (PTEN). У деяких варіантах здійснення, пухлина, що містить цю делецію або мутацію, є пухлиною молочної залози.

Ці антагоністи вводять у вигляді відповідної фармацевтичної композиції пацієнтові-людині відповідно до відомих способів. Придатні способи введення включають внутрішньовенне введення у вигляді болюсу або введення безперервною інфузією впродовж деякого періоду часу, внутрішньом'язовим, внутрішньоочеревинним, внутрішньовенним, внутрішньопухлинним, внутрішньоартеріальним, інтрацереброспінальним, підшкірним, внутрішньосуглобним, інтрасиновіальним, пероральним або інгаляційним способами.

У деяких варіантах здійснення, окрім введення Notch-антагоніста, цей спосіб лікування додатково передбачає введення другого терапевтичного агента (до, одночасно й після введення Notch-антагоніста). В деяких варіантах здійснення, цей другий терапевтичний агент є протираковим і антиангіогенним агентом. Забезпечені також фармацевтичні композиції, що містять Notch-антагоніст і другий терапевтичний агент.

Буде зрозуміло, що комбінація Notch-антагоніста (наприклад, антитіла) і другого терапевтичного агента може вводитися в будь-якому порядку або спільно. У вибраних варіантах здійснення, Notch-антагоністи вводитимуться пацієнтам, які раніше піддавалися лікуванню другим протираковим агентом. У деяких інших варіантах здійснення, Notch-антагоніст і другий терапевтичний агент уводитимуться по суті одночасно або спільно. Наприклад, суб'єктові може вводитися Notch-антагоніст впродовж часу піддання його курсу лікування другим терапевтичним агентом (наприклад, хіміотерапією). В деяких варіантах здійснення, Notch-антагоніст уводитиметься в межах 1 року лікування другим терапевтичним агентом. У деяких варіантах здійснення, Notch-антагоніст уводитиметься в межах 10, 8, 6, 4 або 2 місяців будь-якого лікування другим терапевтичним агентом. У деяких варіантах здійснення, Notch-антагоніст уводитиметься в межах 4, 3, 2 або 1 тижня будь-якого лікування другим терапевтичним агентом. У деяких варіантах здійснення, Notch-антагоніст уводитиметься в межах 5, 4, 3, 2 днів або 1 дня будь-якого лікування другим терапевтичним агентом. Крім того, має бути зрозуміло, що ці два агенти або два типи терапії можуть вводитися цьому суб'єктові в межах годин або хвилин (тобто по суті одночасно).

Застосовні класи протиракових агентів включають, наприклад, антитубулінові агенти, ауристатини, зв'язуючі агенти мінорної канавки ДНК, інгібітори реплікації ДНК, алкілюючі агенти (наприклад, комплекси платини, такі як цисплатин, моно(платина), бісBIC(платина) і триядерні комплекси платини й карбоплатин), антрацикліни, антибіотики, антифолати, антиметаболіти, сенсibilізатори хіміотерапії, дуокарміцини, етопозиди, фторовані піримідини, іонофори, лекситропсини, нітрозосечовини, платиноли, сприяючі приготуванню сполуки, пуринові антиметаболіти, пуроміцини, сенсibilізатори опромінення, стероїди, таксани, інгібітори топоізомерази, вінкаалкалоїди або т.п. У деяких варіантах здійснення, другий протираковий агент є метаболітом, інгібітором топоізомерази або інгібітором ангиогенезу.

Протиракові агенти, які можуть уводитися в комбінації з Notch-антагоністами, включають хіміотерапевтичні агенти. Так, у деяких варіантах здійснення, лікування включає об'єднане введення антагоніста даного винаходу й хіміотерапевтичного агента або коктейля множинних різних хіміотерапевтичних агентів. Лікування антагоністом може здійснюватися до введення, одночасно з введенням або після введення хіміотерапевтичних агентів. Хіміотерапії, що обговорюються цим винаходом, включають хімічні речовини або лікарські засоби, які відомі в даній галузі й комерційно доступні, такі як доксорубіцин, 5-фторурацил, цитозинарабінозид (ARA-C), циклофосфамід, тіотепа, бусульфан, цитоксин, таксол, метотрексат, цисплатин, мелфолан, вінбластин і карбоплатин. Об'єднане введення може включати спільне введення, або в єдиній фармацевтичній композиції, або з використанням окремих композицій, або послідовне введення в будь-якому порядку, але зазвичай у межах такого періоду часу, що всі активні агенти можуть виявляти їх біологічні активності одночасно. Схеми приготування й дозування для таких хіміотерапевтичних агентів можуть бути використані відповідно до інструкцій виготовників або можуть бути визначені емпірично. Схеми приготування й дозування для такої хіміотерапії описані також у Chemotherapy Service Ed., M. C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, Md. (1992).

Хіміотерапевтичні агенти, застосовні в даному винаході, включають також, але не обмежуються ними, алкілюючі агенти, такі як тіотепа й циклофосфамід (ЦИТОКСАН); алкілсульфонати, такі як бусульфан, імпросульфан і піпосульфан; азириди, такі як бензодоба, карбохон, метуредоба й уредоба; етиленіміни й метиламеламіни, включаючи альтретамін, триетиленамеламін, триетиленафосфосфамід, триетилентіофосфосфамід і триметиллоамеламін; азотні аналоги гірчичного газу (іприту), такі як хлорамбуцил, хлорнафазин, холофосфамід, естрамустин, іфосфамід, меклоретамін, гідрохлорид меклоретаміноксиду, мелфалан, новембіхін, фенестерин, преднімустин, трофосфамід, урацилпірит (урацилдихлордіетилсульфід); нітрозосечовини, такі як кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, німустин, ранімустан; антибіотики, такі як аклациномізини, актиноміцин, аутраміцин, азасерин, блеомицини, кактиномицин, каліхеаміцин, карабіцин, каміномицин, карцинофілін, хромоміцини, дактиномицин, даунорубіцин, деторубіцин, 6-діазо-5-оксо-L-норлейцин, доксрубіцин, епірубіцин, езорубіцин, ідарубіцин, марцеломіцин, мітоміцини, мікофенолова кислота, ногаломіцин, олівоміцини, пепломіцин, потфіроміцин, пуроміцин, квеламіцин, родорубіцин, стрептонігрин, стрептозоцин, туберцидин, убенімекс, зиностатин, зорубіцин; антиметаболіти, такі як метотрексат і 5-фторурацил (5-ФУ); аналоги фолієвої кислоти, такі як деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметрексат; аналоги пурину, такі як флударабин, 6-меркаптопурин, тіаміприн, тіогуанін; аналоги піримідину, такі як анцитабін, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабін, дидезоксіуридин, доксифлуридин, еноцитабін, флоксуридин, 5-ФУ; андрогени, такі як калустерон, дромостанолон пропіонат, епітіостанол, меритіостан, тестостерон; антиадrenalіни, такі як аміноглутетимід, мітотан, трилостан, поповнювач фолієвої кислоти, такий як фролінова кислота; ацеглатон; альдофосфаміду глікозид; амінолевулінову кислоту; амсакрин; бестрабуцил; бісантрон; едатраксат; дефофамін; демеколцин; діазихон; елформітин; еліптінію ацетат; етоглуцид; галію нітрат; гідроксисечовину; лентинан; лонідамін; мітоквазон; мітоксантрон; мопідамор; нітракрин; пентостатин; фенамет; пірарубіцин; подофілінову кислоту; 2-етилгідразид; прокарбазин; PSK.; разоксан; сизофуран; спірогерманій; теназонову кислоту; триазион; 2,2',2"-трихлортриетиламін; уретан; віндесин; дакарбазин; маномустин; мітобронітол; мітолактол; піпоброман; гацитозин; арабінозид (Ara-C); циклофосфамід; тіотепа; таксоїди, такі як паклітаксел (TAXOL) і доксетаксел (TAXOTERE, Rhone); хлорамбуцил; гемцитабін; 6-тіогуанін; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платини, такі як цисплатин і карбоплатин; вінбластин; платина; етопозид (VP-16); іфосфамід; мітоміцин C; мітоксантрон; вінкрестин; вінорелбін; навелбін; новантрон; теніпозид; дауноміцин; аміноптерин; кселода; ібандронат; CPT11; інгібітор топомерази RFS 2000; дифторметилорнітин (DMFO); ретиноєву кислоту; еспераміцини; капецитабін й фармацевтично прийнятні солі, кислоти або похідні будь-якої з сполук. Хіміотерапевтичні агенти включають також антигормональні агенти, які діють, регулюючи або інгібуючи дію гормонів, такі як антиестрогени, що включають, наприклад, тамоксифен, ралоксифен, ароматазу, що інгібує 4(5)-імідазоли, 4-гідрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон і тореміцен (Фарестон); і антиандрогени, такі як флутамід, нілутамід, бікалутамід, лейпролід і гoserелін; і фармацевтично прийнятні солі, кислоти або похідні будь-якої з сполук.

У деяких варіантах здійснення, хіміотерапевтичний агент є інгібітором топоізомерази. Інгібітори топоізомераз є хіміотерапевтичними агентами, які перешкоджають дії ферменту топоізомерази (наприклад, топоізомерази I або II). Інгібітори топоізомераз включають, але не обмежуються ними, доксорубіцин-HCl, цитрат даунорубіцину, мітоксантрон-HCl, актиноміцин D,

етопозид, топотекан-HCl, теніпозид (VM-26) й іринотекан. У деяких варіантах здійснення, пухлиною, що підлягає лікуванню, є колоректальна пухлина, а другий протираковий агент є інгібітором топоізомерази, таким як іринотекан.

У деяких варіантах здійснення, хіміотерапевтичний агент є антиметаболітом. Антиметаболіт є хімікалієм зі структурою, яка є схожою з метаболітом, потрібним для нормальних біохімічних реакцій, але що досить відрізняється для порушення однієї або декількох нормальних функцій клітин, наприклад, ділення клітин. Антиметаболіти включають, але не обмежуються ними, гемцитабін, фторурацил, капецитабін, натрій-метотрексат, ралітрексед, пеметрексед, тегафур, цитозинарабінозид, тіогуанін, 5-азациитидин, 6-меркаптопурин, азатіоприн, 6-тіогуанін, пентостатин, флударабінфосфат і кладрибін, а також фармацевтично прийнятні солі, кислоти або похідні будь-яких з них. У деяких варіантах здійснення, другий протираковий агент є гемцитабіном. У деяких варіантах здійснення, пухлина, що підлягає лікуванню, є пухлиною підшлункової залози, а другий протираковий агент є антиметаболітом (наприклад, гемцитабіном).

У інших варіантах здійснення, лікування включає об'єднане введення антагоніста даного винаходу й променевої терапії. Лікування антагоністом може мати місце до введення, спільно з введенням або після введення променевої терапії. Для такої променевої терапії можуть бути використані будь-які схеми введення доз.

У інших варіантах здійснення, це лікування може включати об'єднане введення антитіл даного винаходу з іншими антитілами проти додаткових пухлиноасоційованих антигенів, що включають, але не обмежуються ними, антитіла, які зв'язуються з EGF-рецептором (EGFR) (наприклад, Erbitux®), erbB2-рецептором (HER2) (наприклад, Herceptin®) і ендотеліальним чинником зростання судин (VEGF) (наприклад, Avastin®). У деяких альтернативних варіантах здійснення, другий протираковий агент містить антитіло, яке специфічно зв'язується з DLL4 людини або іншим лігандом Notch-рецептора, або антитілом, яке специфічно зв'язується з додатковим Notch-рецептором. Зразкові анти-DLL4-антитіла описані, наприклад, в Публікації заявки на патент США № US 2008/0187532, включеній у даний опис як посилання в повному обсязі. Додаткові анти-DLL4-антитіла описані, наприклад, у Міжнародних Публікаціях патентів з номерами WO 2008/091222 і WO2008/0793326 і в Публікаціях заявок на патент США з номерами US 2008/0014196, US2008/0175847; US 2008/0181899 і US 2008/0107648, кожна з яких включена в даний опис як посилання в повному обсязі. Зразкові анти-Notch-антитіла описані, наприклад, в Публікації заявки на патент США № US 2008/0131434, включеній у даний опис як посилання в повному обсязі. В деяких варіантах здійснення, другий протираковий агент є інгібітором передачі сигналу Notch. У деяких варіантах здійснення, цей другий протираковий агент є антитілом, яке є інгібітором ангиогенезу (наприклад, анти-VEGF-антитілом). У деяких варіантах здійснення, цей другий терапевтичний агент є антитілом, яке специфічно зв'язує VEGF-рецептор. У деяких варіантах здійснення, цей другий терапевтичний агент є AVASTIN (бевацизумабом), HERCEPTIN (трастуцумабом), VECTIBIX (панітумумабом) або ERBITUX (цетуксимабом). Об'єднане введення може включати спільне введення, або в єдиній фармацевтичній композиції, або з використанням окремих композицій, або послідовне введення у будь-якому порядку, але зазвичай у межах такого періоду часу, що всі активні агенти можуть виявляти їх біологічні активності одночасно.

Крім того, лікування може включати введення одного або декількох цитокінів (наприклад, лімфокінів, інтерлейкінів, чинників некрозу пухлин і/або чинників зростання) або може супроводжуватися хірургічним видаленням ракових клітин або будь-якою іншою терапією, що її вважає необхідною лікар.

Для лікування цього захворювання відповідна доза антагоніста даного винаходу залежить від типу захворювання, що підлягає лікуванню, важкості й перебігу цього захворювання, відповіді на лікування цього захворювання, від того, чи вводять цей антагоніст для терапевтичних або превентивних цілей, від попередньої терапії, клінічної історії пацієнта тощо, причому всі ці чинники оцінюються лікарем. Антагоніст може вводитися один раз або впродовж ряду введень, що продовжуються від декількох днів до декількох місяців, або доки не відбувалося вилікування або послаблення патологічного стану (наприклад, зменшення об'єму пухлини). Оптимальні схеми введення доз можуть бути розраховані з вимірювань накопичення лікарського засобу в тілі пацієнта й варіюватимуться залежно від відносної ефективності окремого антагоніста. Лікар, що здійснює введення, може легко визначити оптимальні дози, методології введення доз і швидкості їх повторення. Зазвичай, доза дорівнює від 0,01 мг до 100 мг/на масу тіла й може вводитися один або кілька разів на день, на тиждень, на місяць або на рік. Лікар може оцінити швидкості повторення для введення доз на основі вимірювань часу перебування й концентрацій лікарського засобу в рідинах тіла або тканинах.

У деяких варіантах здійснення, пацієнтів, що розглядаються для лікування Notch-антагоністом, піддають скринінгу перед лікуванням Notch-антагоністом. У деяких варіантах здійснення, пухлину в пацієнта або пухлину, яка була видалена в пацієнта, тестують на присутність ракових стоволових клітин. У деяких варіантах здійснення, цю пухлину тестують на експресію одного або декількох Notch-рецепторів (наприклад, Notch2 і/або Notch3), з якими зв'язується цей антагоніст. У деяких варіантах здійснення, цю пухлину тестують на присутність інактивуючої делеції або мутації в гені, що кодує пухлинну супресорну фосфатазу й гомолог тензину (PTEN). У деяких варіантах здійснення, тестована таким чином пухлина є пухлиною молочної залози.

Наприклад, цей винахід забезпечує спосіб вибору суб'єкта для лікування Notch2- і/або Notch3-антагоністом, де цей суб'єкт має пухлину або мав видалену пухлину. В деяких варіантах здійснення, цей спосіб передбачає (а) визначення, чи містить ця пухлина делецію або мутацію в гені PTEN, і (b) вибір суб'єкта для лікування Notch-антагоністом, якщо ця пухлина містить цю делецію або мутацію.

У деяких альтернативних варіантах здійснення цього винаходу, пацієнтів, що піддаються скринінгу на присутність аденом або поліпів ободової кишки, тестують на алельну втрату й соматичні мутації за допомогою генетичного тесту. В деяких варіантах здійснення, цей тест здійснює скринінги на втрату або мутації в Wnt-шляху, в тому числі, наприклад, у APC, Axin2 або бета-катеніні.

У іншому аспекті, даний винахід забезпечує набори, які можуть бути використані для виконання описаних тут способів. У деяких варіантах здійснення, набір містить антитіло або антитіла, специфічні відносно Notch-рецептора, очищене антитіло або антитіла, в одному або декількох контейнерах. У деяких варіантах здійснення, набір може додатково містити по суті виділений Notch-рецептор, що містить епітоп, який є специфічно реактивним з антитілом або антитілами, включеними в цей набір, контрольне антитіло, яке не взаємодіє з Notch-рецептором, і засоби для детектування зв'язування антитіла з Notch-рецептором (такі як, наприклад, флуоресцентний хромофор, субстрат ферменту, радіоактивна сполука або люмінесцентна сполука, кон'югована з антитілом проти Notch-рецептора або з другим антитілом, яке розпізнає антитіло проти Notch-рецептора). В інших варіантах здійснення, набір містить реагенти, специфічні для детектування мРНК або кДНК (наприклад, олігонуклеотидні зонди або праймери) одного або декількох Notch-рецепторів. У деяких варіантах здійснення, ці набори містять всі компоненти, необхідні й достатні для виконання аналізу детектування, в тому числі всі контролю, інструкції для виконання аналізу й будь-яке необхідне програмне забезпечення для аналізу й надання результатів.

Набір компартментів включає будь-який набір, у якому реагенти знаходяться в окремих компартментах. Такі контейнери включають малі скляні контейнери, пластикові контейнери або смужки з пластика або паперу. Такі контейнери дозволяють ефективно переносити реагенти з одного компартмента в іншій компартмент, так що ці проби й реагенти не забруднюються перехресно й агенти або розчини кожного контейнера можуть додаватися кількісним чином з одного компартмента в іншій. Такі контейнери включатимуть контейнер, який прийматиме тест-пробу, контейнер, який містить антитіла або зонди, використовувані в цих способах, контейнери, які містять промивальні реагенти (такі як забуферений фосфатом сольовий розчин, Трис-буфери тощо), й контейнери, які містять реагенти, використовувані для детектування зв'язаного антитіла або зонда. Фахівцеві буде добре відомо, що описані полінуклеотиди, поліпептиди й антитіла даного винаходу можуть бути легко включені в один зі встановлених форматів наборів, які добре відомі в даній галузі.

У деяких варіантах здійснення, цей винахід додатково забезпечує набір, що містить Notch-зв'язуючий агент, або антагоніст і другий терапевтичний агент. У деяких варіантах здійснення, цей Notch-зв'язуючий агент або антагоніст є антитілом, яке специфічно зв'язується з Notch2 і/або Notch3. У деяких варіантах здійснення, цей Notch-зв'язуючий агент або антагоніст є антитілом, яке специфічно зв'язується з Notch2 і Notch3. У деяких варіантах здійснення, цей другий терапевтичний агент є протираковим агентом і/або антиангіогенним агентом.

У одному аспекті даний винахід забезпечує спосіб ідентифікації молекули, яка зв'язується з незв'язуючою ліганд областю позаклітинного домену Notch-рецептора людини, й інгібує зростання пухлини, що передбачає: i) інкубацію цієї молекули з незв'язуючою ліганд областю позаклітинного домену Notch-рецептора людини; ii) визначення, чи зв'язується ця молекула з незв'язуючою ліганд областю позаклітинного домену Notch-рецептора людини; і (iii) визначення, чи інгібує ця молекула зростання пухлини. Молекули, які специфічно зв'язують незв'язуючу ліганд область позаклітинного домену Notch-рецептора людини, включають, але не обмежуються ними, малі органічні молекули, поліпептиди й антитіла.

Скринінг може виконуватися з використанням будь-якого відповідного способу, відомого в даній галузі. В деяких варіантах здійснення, скринінг виконують *in vitro*. В деяких варіантах здійснення, клітини, експресуючі незв'язуючу ліганд область позаклітинного домену Notch-рецептора людини, інкубують з міченою молекулою, і специфічне зв'язування цієї міченої молекули з незв'язуючою ліганд областю позаклітинного домену Notch-рецептора людини, визначають за допомогою FACS-аналізу. В деяких варіантах здійснення, незв'язуючу ліганд область позаклітинного домену Notch-рецептора людини експресують з використанням фагового дисплея й молекули, які специфічно зв'язуються з незв'язуючою ліганд областю позаклітинного домену Notch-рецептора людини, ідентифікують. Інші відповідні способи для ідентифікації молекул, які специфічно зв'язуються з незв'язуючою ліганд областю Notch-рецептора людини, включають, але не обмежуються ними, ELISA, Вестерн (або імуно)-блотинг і дріжджовий двогибридний скринінг.

Потім молекули, які специфічно зв'язуються з незв'язуючою ліганд областю позаклітинного домену Notch-рецептора людини, тестують на інгібування зростання клітин пухлини. Тестування може виконуватися з використанням будь-якого відповідного способу, відомого в даній галузі. В деяких варіантах здійснення, молекули, які специфічно зв'язуються з незв'язуючою ліганд областю позаклітинного домену Notch-рецептора людини, тестують на здатність інгібувати зростання пухлини *in vitro*. В деяких варіантах здійснення, молекули, які специфічно зв'язують незв'язуючу ліганд область позаклітинного домену Notch-рецептора людини, інкубують з пухлинними клітинами в культурі й проліферацію пухлинних клітин у присутності молекули, яка специфічно зв'язує незв'язуючу ліганд область позаклітинного домену Notch-рецептора людини, визначають і порівнюють з пухлинними клітинами, що інкубуються з незв'язуючою контрольною молекулою. В деяких варіантах здійснення, молекули, які специфічно зв'язують незв'язуючу ліганд область позаклітинного домену Notch-рецептора людини, ін'єктують у модель ксенотрансплантату тварини й зростання пухлин у тварин, оброблених молекулами, які специфічно зв'язуються з незв'язуючою ліганд областю позаклітинного домену Notch-рецептора людини, визначають і порівнюють з тваринами, обробленими незв'язуючою контрольною молекулою.

ПРИКЛАДИ

Зрозуміло, що описані тут приклади й варіанти наведені лише для ілюстративних цілей і що різні модифікації або зміни передбачатимуться особами з кваліфікацією в даній галузі, й вони мають бути включені в ідею й уміст цієї заявки.

Приклад 1

Одержання антитіл людини до Notch2

Антитіла людини, які специфічно розпізнають незв'язуючу ліганд частину позаклітинного домену Notch2-рецептора, виділяли з використанням способів фагового дисплея. Бібліотеку синтетичних антитіл, що містить варіабельні домени антитіл людини, піддавали скринінгу на специфічне й високоафінне розпізнавання Notch2-рецептора.

Коротко, 2×10^{13} візуально представляючих Fab фагових часток інкубували з пасивно іммобілізованим, рекомбінантним злитим білком Notch2 Fc (SEQ ID NO:21), що містить позаклітинний лігандзв'язуючий сайт Notch2 і навколишні EGF-повтори (EGF1-12) в раунді 1. Неспецифічний фаг вимивали, й потім специфічний фаг елюювали з використанням DTT. Цей елюований вихід використовували для інфікування TG1 F+ бактерій, "рятували" за допомогою вірусу-помічника (хелперного вірусу) і потім Fab-дисплей індукували з використанням IPTG (0,25 мМ). Цей процес повторювали протягом двох додаткових раундів і потім в раунді 3 піддавали скринінгу в аналізі ELISA проти пасивно іммобілізованого злиття рекомбінантний Notch2 (EGF1-12) -Fc (5 мкг/мл).

Ідентифікували конкретний Fab (59R1), який зв'язував Notch2-рецептор людини і блокував зв'язування Jagged1 з Notch2 людини. Зв'язування 59R1 Fab з Notch2 людини підтверджували FACS-аналізом з використанням стабільної лінії клітин HEK-293 людини, яка експресувала Notch2 людини (hN2) (фігура 1A). Fab-зв'язування детектували кон'югованим з фікоеритрином (PE) козином антитілом проти Fab-людини (Jackson Immunochemicals). 59R1 Fab (вказаний на фігурі 1A як клон 1) демонстрував хороше зв'язування з hN2. 59R1 Fab демонстрував також хорошу блокуючу активність проти ліганду Notch людини Jagged1 в аналізі зв'язування, що використовує ту саму стабільну лінію клітин (фігура 1B). Зв'язування ліганду й блокування визначали інкубацією позаклітинного домену (ECD) hJagged1, злитого з константною областю Fc людини, з цими клітинами і Fab, вибраними з фагової бібліотеки, і з використанням для детектування PE-кон'югованих козином антитіл проти Fc-гамма людини (Jackson Immunochemicals).

Послідовності VH і VL 59R1 Fab представлені в SEQ ID NO:11 і SEQ EO NO:12 (включаючи N-кінцеві бактерійні сигнальні послідовності, які відщеплюються після секреції), відповідно. CDR 59R1 Fab показані в таблиці 2 нижче.

Таблиця 2

CDR Fab і IgG-антитіл 59R1 людини

При- клад	Важкий ланцюг			Легкий ланцюг		
	CDR1	CDR2	CDR3	CDR1	CDR2	CDR3
59R1	SSSGMS (SEQ ID NO:5)	VIASSGSNTYYADS VKG (SEQ ID NO:6)	GIFFAI (SEQ ID NO:7)	RASQSVRSNY LA (SEQ ID NO:8)	GASSRAT (SEQ ID NO:9)	QQYSNFP (SEQ ID NO:10)

Варіабельні області на основі варіабельних областей Fab 59R1, клонували в Ig-експресуючі вектори, що містять важкий ланцюг і легкий ланцюг капа IgG2 людини разом з їх відповідними сигнальними послідовностями ссавця, для експресії в клітинах яєчника китайського хом'яка (CHO). VH і VL IgG-антитіла 59R1 забезпечені у вигляді SEQ ID NO:13 і SEQ ID NO:14, відповідно. Амінокислотна послідовність важкого ланцюга й амінокислотна послідовність легкого ланцюга IgG-антитіла 59R1 IGG (включаючи сигнальні послідовності) забезпечені у вигляді SEQ ID NO:16 і SEQ ID NO:18, відповідно. Сигнальна послідовність на N-кінці амінокислотної послідовності кожним з цих ланцюгів відщеплюється після секреції. Послідовності нуклеїнових кислот, що кодують важкий і легкий ланцюги IgG-антитіла 59R1, забезпечені у вигляді SEQ ID NO:1 і SEQ ID NO:3, відповідно. Очищення з використанням білка А використовували для очищення цих антитіл. Бактеріальну плазмідну ДНК, що містить синтетичний Днк-інсерт, що кодує ДНК важкого ланцюга й легкого ланцюга IgG2-антитіла 59R1, депонували у вигляді "59R1" ATCC, 10801 University Boulevard, Manassas, VA, USA, згідно з умовами Будапештського Договору 15 жовтня 2008 року і давали їй присвоєний номер PTA-9547.

Крім того, IgG2-антитіло 59R1 аналізували на його здатність блокувати зв'язування DLL4 з Notch2-ретором людини за допомогою FACS-аналізу. Клітини HEK-293, стабільно надекспресуючі Notch2 людини, інкубували з антитілом при різній концентрації й потім детектували на зв'язування hNotch2 (фігура 1C) з використанням РЕ-кон'югованого козиного антитіла, специфічного у відношенні Fc-гамма людини, або лігандблокуючу активність (фігура ID). Блокування ліганду визначали інкубацією цих клітин з DLL4 ECD людини, міченим константним Fc кроля, й антитілом 59R1 при діапазоні концентрацій і потім детектуванням hDLL4 з використанням РЕ-кон'югованого осячого антитіла проти кролячого Ig. Таким чином, були підтверджені зв'язування Notch2 і лігандблокуюча активність IgG2-антитіла 59R1.

Варіант 59R1 зародкової лінії (називаний тут "59RGV") також експресували й очищали. VH і VL цього антитіла 59RGV забезпечені у вигляді SEQ ID NO:19 і SEQ ID NO:20, відповідно. Амінокислотні послідовності важкого ланцюга й легкого ланцюга антитіла 59RGV (включаючи сигнальні послідовності) забезпечені у вигляді SEQ ID NO:2 та SEQ ID NO:4, відповідно. Сигнальна послідовність на N-кінці амінокислотної послідовності кожним з цих ланцюгів відщеплюється після секреції. Послідовності нуклеїнових кислот, що кодують важкий і легкий ланцюги антитіла 59RGV, забезпечені у вигляді SEQ ID NO:15 і SEQ ID NO:17, відповідно.

Високогідрофобні CDR мають, у деяких випадках, потенційну здатність дозволяти несприятливе, неспецифічне зв'язування антитілом. Оскільки амінокислотна послідовність CDR3 важкого ланцюга 59R1 мала не звичайну міру гідрофобного характеру, отримували варіанти 59R1, які містили CDR-послідовності важкого ланцюга зі зменшеним гідрофобним характером. Дозрівання афінності CDR3 важкого ланцюга проводили дозволом обмежених змін з вихідної послідовності (GIFFAI; SEQ ID NO:7), як показано на фігурі 1E. В амінокислотах, що допускаються, дозволяли змінювати вихідні залишки в залишки, вказані на фігурі 1E. Покращувані варіанти виділяли за допомогою їх скринінгу на покращену JAG1-блокуючу активність, як показано на фігурі 1F (вказано стрілками). Коротко, Fab (1 і 10мкг/мл) змішували з hJAG1-rb Fc (з попереднім утворенням кластерів 5 мкг/мл з 2мкл/мл РЕ-кон'югованих осячих антитіл проти Ig кроля) і потім додавали до стабільно трансфікованих hNotch2 клітин 293. Потім оцінювали зв'язування hJAG1 з використанням проточної цитометрії. Було виділено шість покращених варіантів (відносно Fab 59R1) та їх CDR важкого ланцюга (HC) були наступними: SIFYPT (SEQ ID NO:22), SSFFAS (SEQ ID NO:23), SSFYAS (SEQ ID NO:24), SSFFAT (SEQ ID NO:25), SIFYPS (SEQ ID NO:26) і SSFFAN (SEQ ID NO:27). Послідовності варіабельних

областей важкого ланцюга для цих варіантів є послідовностями SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56 і SEQ ID NO:57.

Приклад 2

Перехресна реактивність і афінність зв'язування анти-Notch2/3-антитіла 59R1

Здатність IgG2-антитіла 59R1 перехресно зв'язуватися з іншими Notch-реторами визначали за допомогою FACS-аналізу з використанням клітин HEK-293, транзитивно трансфорованих експресуючою Notch1, Notch2, Notch3 або Notch4 людини плазмідною й зеленого флуоресцентного білка (GFP) як контролю трансфекції. GFP-позитивні клітини показували експресію цього трансгену. IgG2 59R1 додавали до клітин при 2 мкг/мл і детектували PE-кон'югованим козином антитілом, специфічним у відношенні Fc-гамма людини (Jackson Immunochemicals). Всі Notch-конструкції були повнорозмірними. Результати показані на фігурі 2. Як показано на фігурі 2, IgG2-антитіло 59R1 специфічно зв'язується як з Notch3 людини, так і з Notch2 людини, але не зв'язується значимо з повнорозмірним Notch1 людини або Notch4 людини.

Афінності відносно Notch1, Notch2, Notch3 і Notch4 людини й миші визначали з використанням приладу Biacore 2000. Коротко, рекомбінантні білки Notch людини й миші (EGF10-15 для Notch1, 2 і 4; EGF9-14 для Notch3) імобілізували на мікрочіпі CM5 з використанням стандартної хімії на основі аміну (NHS/EDC). Виконували також тестування на зв'язування hNotch2, EGF1-12. Різні концентрації антитіл (1-100 нМ) ін'єктували на поверхню білка й кінетичні дані збирали впродовж часу. Ці дані підганяли з використанням рівняння одночасної глобальної підгонки з одержанням констант дисоціації (KD, нМ) для кожного Notch (таблиця 3).

Таблиця 3

Константи дисоціації IGG 59R1 (KD)

Ab	mNotch1 (нМ)	hNotch1 (нМ)	mNotch2 (нМ)	hNotch2 (нМ)*	hNotch2 (нМ)**	mNotch3 (нМ)	hNotch3 (нМ)	hNotch4 (нМ)
59R1	>10	86,4	0,35	<0,1	<0,1	0,13	0,12	NB

*N2(EGF1-12)

**N2(EGF 10-155)

Приклад 3

Картування епітопів анти-Notch2/3-антитіла 59R1

Для ідентифікації антитіл, які розпізнають специфічні незв'язуючі ліганд області позаклітинних доменів Notch-рецептора, виконували картування епітопів.

Зв'язування анти-Notch2/3-антитілу з супернатантом з клітин HEK 293, трансфорованих послідовностями, що кодують рекомбінантні злиті білки Notch2-Fc людини, що містять повнорозмірний білок Notch2 людини або різні делеційні конструкції білка Notch2, що містять різні делеції EGF-повторів 1-12, тестували за допомогою ELISA. Див. таблицю 4 нижче. Клітини HEK-293 транзитивно трансфоровували pcDNA 3.1 (Invitrogen) з кДНК hNotch2, що кодує вказані амінокислоти та злита з константною областю IgG людини IgG (hFc). Через 48 годин збирали супернатанти. Для захоплення білків hN2-hfc, 96-лункові планшети спочатку покривали козином антитілом, специфічним у відношенні Fc-гамма IGG людини (Jackson Immunochemicals, #109-006-098) при 100 нг на лунку в натрій-бікарбонатному буфері протягом ночі при 4°. Планшети промивали й блокували в 5 % бичачій сироватці/3ФР-Твін-20. Супернатанти додавали в планшети й інкубували при кімнатній температурі протягом 1 години. Планшети промивали в 3ФР-Т. Додавали Fab 59R1 при 10 мкг/мл в 5 % сироватці/3ФР-Т і інкубували при кімнатній температурі протягом 1 години. Планшети промивали в 3ФР-Т. Зв'язування Fab детектували козином специфічним анти-Fab людини-антитілом, кон'югованим з пероксидазою хрину (Thermo # 31414), розведеним 1:5000 в 5 % сироватці/3ФР-Т протягом 1 години при кімнатній температурі. Планшети промивали й проявляли 1 Step Ultra TMB (Thermo # 34028). Планшети прочитували на планшет-ридері Perkin Elmer Victor 1420. Анти-Notch2/3-антитіло 59R1 зв'язувалося лише з супернатантом від клітин, експресуючих рекомбінантні білки Notch2, що містять EGF10, який складається з амінокислот 375-417 Notch2 людини (фігура 3A).

Таблиця 4

Делеційні конструкції Notch2 людини

Конструкція	амінокислоти
hN2 1-3	1-144
hN2 1-4	1-181
hN2 1-5	1-221
hN2 1-6	1-263
hN2 1-7	1-301
hN2 1-8	1-341
hN2 1-9	1-378
hN2 1-10	1-417
hN2 1-11	1-456
hN2 1-12	1-493
hN2 8-12	296-493
hN2 9-12	326-493
hN2 10-12	375-493
hN2 11-12	413-493
hN2 12-12	454-493

Крім того, FACS-аналіз показує, що зв'язування Fab антитіла 59R1 зберігається при делетуванні EGF11 або EGF12 з повнорозмірного рекомбінантного білка Notch2, експресованого клітинами HEK 293 (фігура 3B). Отримували точкові мутації в EGF10 злитих білків Notch2 і зв'язування, 59R1 з кожним мутантом EGF10 визначали FACS-аналізом. Клітини HEK-293 транзитивно трансфікували вказаною експресуючою Notch плазмідом і GFP як контролем трансфекції. GFP-позитивні клітини вказували на експресію трансгену. До цих клітин додавали Fab антитіла 59R1 при 10 мкг/мл і детектували з використанням PE-кон'югованого козиного антитіла проти антитіла людини. (Jackson Immunochemicals).

Для підтвердження, що втрата EGF-повтору 10 не заважає зв'язуванню ліганду, генерували мутант hNotch2, позбавлений амінокислот 375-412, і тестували його на зв'язування з 59R1, моноклональним hNotch2-антитілом 59M70, спрямованим проти EGF 1-4, і зв'язування з лігандом DLL4 людини (фігура 3C). Виконували FACS-аналіз клітин HEK-293, транзитивно трансфікованих вказаною експресуючою Notch плазмідом і GFP як контролем трансфекції. GFP-позитивні клітини вказують на експресію трансгену. Анти-Notch2 (59M70) додавали при 20 мкг/мл і детектували PE-кон'югованим козиным антитілом проти антитіла миші (Caltag, #3004-4). 59R1 (IgG2) додавали до цих клітин при 2мкг/мл і детектували PE-кон'югованим козиным антитілом проти антитіла людини, специфічного у відношенні Fc-гамма (Jackson Immunochemicals). Зв'язування ліганду визначали інкубацією цих клітин з позаклітинним доменом (ECD) DLL4 людини, злитим з константною областю IGG кроля, при 5 мкг/мл і детектували PE-кон'югованим осячим антитілом проти антитіла кроля. Як показано на фігурі 3C, обидва, ліганд і 59M70, зв'язуються з hNotch2 у відсутність EGF 10, але 59R1 не зв'язується.

Виконували аналіз зв'язування областей EGF 10 Notch1, Notch2 і Notch4 і області EGF 9 Notch3 людини (еквіваленту EGF 10 в інших Notch-рецепторах) для визначення зв'язуючих подібним чином сайтів для 59R1 (фігура 14A). В результаті цього аналізу, були створені декілька точкових мутантів у повнорозмірному Notch2, перетворенням залишків на EGF10 на відповідні амінокислотні залишки в Notch1 людини. Навпаки, були створені також точкові мутації в EGF10 hNotch1 перетворенням на відповідні залишки hN2. Мутанти в повнорозмірних послідовностях Notch генерували QuikChange®-мутагенезом (Stratagene) і підтверджували секвенуванням. Зв'язування з мутантами визначали FACS-аналізом (фігура 14B і 14C). 59R1 детектували PE-кон'югованим козиным антитілом проти специфічного анти-Fc гамма людини (Jackson Immunochemicals, #109-116-170). Таким чином, було визначено, що амінокислоти, необхідні для зв'язування 59R1 з hNotch2, є гістидином 385, аланіном 388 і лейцином 389 (залишками в уміщеній у бокс послідовності hNotch2, показаної на фігурі 14A). Відповідними залишками в hNotch3 є гістидин 361, аланін 364 та ізолейцин 365.

Приклад 4

Анти-Notch2/3-антитіло 59R1 інгібує передачу сигналу Notch2

Люциферазні репортерні аналізи використовували для аналізу антитіла 59R1 на його здатність блокувати hDLL4-, hJAG1- і hJAG2-індуковану передачу сигналу Notch2.

Клітини HeLa, які стабільно надекспресують Notch2 людини, транзитивно трансфікували люциферазою світляка з синтетичним промотором 8X CBS (Ong et al., 2006, J. of Biological Chemistry, 281:5106-5119), pSPORT6 MAML-1 і люциферазою-CMV Renilla як контролем трансфекції. Клітини інкубували з 100 нг імобілізованого hDLL4 (R&D systems) з указаними антитілами протягом 16 годин і потім аналізували з використанням Dual-Glo (Promega) відповідно до інструкцій виготівника. Контрольне антитіло було в концентрації 40мкг/мл. IgG2-антитіло 59R1 титрували, починаючи при 40 мкг/мл і потім розводили 1:4. Використовували інгібітор гамма-секретази (GSI) дибензазепін (DBZ) як контроль при 1мкМ. Як показано на фігурі 4A, було виявлено, що антитіло 59R1 інгібує hDLL4-індуковану Notch2-репортерну активність.

Клітини HeLa, які стабільно надекспресують Notch2 людини, транзитивно трансфікували люциферазою світляка з синтетичним промотором 8X CBS, pSPORT6 MAML-1 і люциферазою-CMV Renilla як контролем трансфекції. Клітини інкубували з 200 нг або імобілізованого hJAG1 (R&D systems), або імобілізованого hJAG2 (R&D systems) протягом 16 годин і потім аналізували з використанням Dual-Glo (Promega) відповідно до інструкцій виготівника. IgG2-антитіло 59R1 було в концентрації 40 мкг/мл. Використовували інгібітор гамма-секретази (GSI) дибензазепін (DBZ) як контроль при 1 мкМ. Як показано на фігурах 4B і 4C, було виявлено, що антитіло 59R1 інгібує hJAG1- і hJAG2-індуковану Notch2-репортерну активність, відповідно.

Приклад 5

Анти-Notch2/3-антитіло 59R1 запобігає зростанню пухлини *in vivo*

Цей приклад описує використання анти-Notch2/3-рецептор-антитіла (59R1), яке зв'язує незв'язуюча ліганд область Notch-рецепторів (EGF10 Notch2 і EGF10 Notch3), запобігаючи зростанню пухлини в моделі ксенотрансплантату.

У деяких варіантах здійснення, мишей NOD/SCID, ін'єктованих 50000 пухлинних клітин молочної залози PE13 або T3, обробляли анти-Notch2/3-антитілом 59R1 або контрольним антитілом 1B7.11 через два дні після ін'єкцій клітин. Антитіла вводили в дозах 10 мг/кг двічі на тиждень. Анти-Notch2/3-антитіло 59R1 значимо зменшувало зростання пухлини як PE13 (фігура 5A), так і T3 (фігура 5B) порівняно з контролем.

Приклад 6

Лікування *in vivo* пухлин з використанням анти-Notch 2/3-антитіла 59R1

Цей приклад описує використання анти-Notch2/3-антитіл для лікування раку в моделі ксенотрансплантату.

У одному експерименті, 1×10^7 життєздатних клітин Colo-205 пухлини ободової кишки ін'єктували в 6-8-тижневу імунодефіцитну bg/nu XID самку миші на фенотипі Swiss CD-1. Пухлини давали зростати до розміру $65-200 \text{ мм}^3$, після чого мишей рандомізували ($n=10$ на експериментальну групу) і починали введення антитіл. Тварин обробляли 15 мг/кг або контрольних антитіл 1B7.11, або анти-Notch2/3-антитіл 59R1 один раз на тиждень. Розмір пухлини вимірювали двічі на тиждень і об'єм пухлини розраховували, як описано (див. Michieli et al., 2004, Cancer Cell, 6:61-73). Анти-Notch2/3-антитіло 59R1 значимо зменшувало зростання пухлини Colo-205 порівняно з контролем (фігура 5C).

У іншому експерименті, анти-Notch2/3-антитіла тестували на дію на зростання пухлини підшлункової залози. Мишам NOD/SCID ін'єктували 30000 клітин пухлини підшлункової залози PN4 підшкірно в правий бік і пухлинам давали зростати, поки вони не сягали середнього об'єму 100 мм^3 . Тварин рандомізували й починали введення доз анти-Notch2/3-антитіла 59R1 або контрольного антитіла 1B7.11. Антитіла вводили в дозі 15 мг/кг, що дається один раз на тиждень. Анти-Notch2/3-антитіло 59R1 значимо зменшувало зростання пухлини PN4 порівняно з контролем (фігура 5D).

У наступному експерименті, анти-Notch2/3-антитіла тестували на дію на зростання пухлини молочної залози. Мишам NOD/SCID ін'єктували 50000 клітин P13 або T3 пухлини молочної залози й пухлинам давали зростати до розміру $65-200 \text{ мм}^3$, після чого мишей рандомізували ($n=10$ на експериментальну групу) й починали введення антитіл. Тварин обробляли 15 мг/кг або контрольних антитіл 1B7.11, або анти-Notch2/3-антитіл 59R1 двічі на тиждень. Розмір пухлини вимірювали двічі на тиждень і об'єм пухлини розраховували, як описано (див. Michieli et al., 2004, Cancer Cell, 6:61-73). Анти-Notch2/3-антитіло 59R1 значимо зменшувало зростання як пухлини Pe13 (фігура 5E), так і зростання пухлини T1 (фігура 5F) порівняно з контролем.

У кінцевій точці обробки антитілами, пухлини можуть бути зібрані для додаткового аналізу. В деяких варіантах здійснення, частину пухлини аналізують імунофлуоресценцією для оцінки проникнення антитіла в цю пухлину й реакції пухлини. Частину кожної зібраної пухлини з

оброблених анти-Notch2/3-антитілом або контрольним антитілом мишей заморожують у свіжому вигляді в рідкому азоті, заливають в О.С.Т. і роблять зрізи на кріостаті у вигляді зрізів 10 мкм на предметних стеклах. Альтернативно, частину кожної пухлини фіксують формаліном, заливають у парафін і нарізують на мікротомі у вигляді 10мкм зрізів на предметних стеклах. Зрізи

5 постфіксують і інкубують з міченими хромофором антитілами, які специфічно розпізнають ін'єктовані антитіла, для детектування анти-Notch2/3-антитіла або контрольних антитіл, присутніх у цій тканинній біопсії. Крім того, антитіла, які детектують різні пухлинні й рекрутовані пухлиною типи клітин, такі як, наприклад, антитіла проти VE-кадгерину (CD144) або антитіла проти PECAM-1 (CD31) для детектування ендотеліальних клітин судин, антитіла проти альфа-

10 актину гладких м'язів для детектування клітин гладких м'язів судин, антитіла проти Ki67 для детектування проліферируючих клітин, TUNEL-аналізи для детектування вмираючих клітин і антитіла проти фрагменту внутрішньоклітинного домену (ICD) Notch для детектування передачі сигналу Notch можуть бути використані для оцінки дій обробки антитілами на ангиогенез, зростання пухлини й морфологію пухлини.

15 Може оцінюватися також дія обробки анти-Notch2/3-антитілом на експресії генів пухлинних клітин. Загальну РНК екстрагують з частини кожної зібраної пухлини з оброблених Notch2/3-антитілом і контрольним антитілом мишей і використовують для кількісної ОТ-ПЦР. Рівні експресії Notch2/3, компонентів шляху передачі сигналом Notch2 і/або Notch3, а також маркерів ракових стоволових клітин, що включають, наприклад, CD44, аналізують відносно гену "домашнього господарства" (гену життєво важливої функції) як внутрішній контроль. Таким

20 чином визначають зміни в експресії генів пухлинних клітин після обробки Notch2/3-антитілом.

Крім того, може оцінюватися дія обробки анти-Notch2/3-антитілом на присутність ракових стоволових клітин у пухлині. Проби пухлин з оброблених Notch2/3-антитілом проти оброблених контрольним антитілом мишей нарізують на маленькі шматочки, подрібнюють повністю з використанням стерильних лез і отримують суспензії окремих клітин ферментативним розщеплюванням і механічним руйнуванням. Потім дисоційовані пухлинні клітини аналізують за допомогою FACS-аналізу на присутність онкогенних ракових стоволових клітин на основі експресії маркерів клітинної поверхні ESA+, CD44+, CD24-/low, Lin-, як описано детально вище.

25

Потім може оцінюватися онкогенність виділених клітин на основі експресії ESA+, CD44+,

30 CD24-/low, Lin- після обробки анти-Notch2/3-антитілом. У одному прикладі 5000, 1000, 500 і 100 виділених ESA+, CD44+, CD24-/low, Lin- ракових стоволових клітин з оброблених Notch2/3-антитілом проти оброблених контрольним антитілом мишей повторно ін'єктують підшкірно в скупчення жирової тканини молочної залози мишей NOD/SCID. Таким чином визначають онкогенність ракових стоволових клітин на основі кількості ін'єктованих клітин, потрібних для

35 утворення щільних пухлин.

Приклад 7

Анти-Notch2/3-антитіло 59R1 затримує рецидив пухлини in vivo після лікування паклітакселом

Клітини B51 пухлини молочної залози (50000 клітин на мишу) ін'єктували мишам NOD-SCID підшкірно в жирове скупчення молочної залози. Пухлинам давали зростати протягом 50 днів, поки вони не досягали середнього об'єму $\sim 100 \text{ мм}^3$. Тварин рандомізували (n=10/група) і починали обробки. Одна група отримувала контрольне антитіло (1B711) при 10 мг/кг двічі на тиждень і паклітаксел (Таксол) при 15 мг/кг двічі на тиждень, а інша група отримувала 59R1 при 10 мг/кг двічі на тиждень і паклітаксел при 15 мг/кг двічі на тиждень. Об'єми пухлин вимірювали

45 в указані дні. Обробки проводили протягом 38 днів, поки об'єми пухлин не регресували до $\sim 50 \text{ мм}^3$, після чого обробки паклітакселом зупиняли й обробки антитілом продовжували протягом всієї тривалості цього експерименту.

Результати показані на фігурі 6. Спостерігали, що пухлини рецидивують швидше в контрольній групі порівняно з групою, обробленою 59R1.

Приклад 8

Анти-Notch2/3-антитіло 59R1 зменшує стрівальність (частоту) ракових стоволових клітин в пухлині in vivo

Аналізи лімітуючих (граничних) розведень (LDA) можуть бути використані для оцінювання дії Notch-зв'язуючого агента на ракових стоволових клітинах солідних пухлин і на онкогенності

55 пухлини, що містить ці ракові стоволові клітини. Ці аналізи можуть використовуватися для визначення стрівальності (частоти) ракових стоволових клітин з тварин, оброблених Notch-зв'язуючим агентом або іншим агентом, і для порівняння цієї стрівальності зі стрівальністю ракових стоволових клітин у пухлинах з контрольних тварин.

Один LDA використовували для оцінювання дії на онкогенність пухлин молочної залози B51,

60 які обробляли комбінацією контрольне антитіло (1B711) плюс паклітаксел (Таксол) або

обробляли комбінацією 59R1 і паклітаксел, як описано вище в прикладі 7. Крім того, визначали також за допомогою LDA дію обробки пухлин молочної залози B51 лише контрольним антитілом або лише 59R1. Дози антитіл і паклітакселу й схеми введення доз для групи контрольного антитіла й групи 59R1 були такі самі, як описані в прикладі 7 вище, для цих інших двох груп обробки. Після трьох доз антитіл і/або паклітакселу пухлини збирали, обробляли й диссоціювали в окремі клітини. Пухлинні клітини людини виділяли з пухлинних клітин ксенотрансплантату інкубацією з біотинільованими антитілами миші (розведення 1:200-CD45 миші-біотин і розведення 1:100 α -H2Kd щури-біотин, BioLegend, San Diego, CA) на льоді протягом 30 хвил, з подальшим додаванням мічених стрептавідином магнітних гранул і видаленням мишачих клітин за допомогою магніта. Клітини людини в цій суспензії збирали й підраховували.

Серійне титрування клітин (30, 90, 270 і 810 клітин) з кожної з чотирьох груп обробки ін'єктували в суміші 1:1 (o/o) FACS-буферу й і Матригеля нової партії мишей NOD-SCID (n=10/група). Пухлинам давали зростати протягом 72 днів. У всіх групах визначали відсоток мишей з пухлинами, що детектувалися. Потім стрівальність ракових стоволових клітин розраховували з використанням програмного забезпечення L-CalculTM (StemCell Technologies Inc.; що допускає завантаження з www.stemcell.com/search/default.asp).

Ці результати показані на фігурі 7. Було визначено, що стрівальність (частота) ракових стоволових клітин у пухлині в оброблених контролем мишах ("Контроль") була 1:66. Було показано, що стрівальність ракових стоволових клітин в оброблених паклітакселом мишах ("Таксол") була 1:25, що вказує на те, що обробка паклітакселом дійсно збільшувала стрівальність ракових стоволових клітин в пухлині більш ніж вдвічі відносно контролю. З іншого боку, обробка антитілом 59R1, або окремо ("59R1"), або в комбінації з паклітакселом ("Таксол+59R1"), зменшувала стрівальність ракових стоволових клітин у цих пухлинах. Одне антитіло 59R1 зменшувало стрівальність ракових стоволових клітин у пухлинах молочної залози більш ніж удвічі відносно контролю. Обробка комбінацією антитіла 59R1 і паклітакселу зменшувала стрівальність ракових стоволових клітин у цій пухлині більш ніж приблизно вдвічі відносно обробки одним 59R1 (p<0,0001), приблизно в 4,5-разів відносно обробки контрольним антитілом і приблизно у дванадцять разів відносно обробки одним паклітакселом. Ці результати вказують на те, що обробка антитілом 59R1 є ефективною в зменшенні онкогенності пухлині молочної залози, незалежно від того, вводилося це антитіло окремо або в комбінації з паклітакселом, навіть коли обробка одним паклітакселом мала протилежну дію.

Приклад 9

Додаткове лікування пухлин in vivo з використанням анти-Notch2/3-антитіла 59R1

Клітини пухлини PN4 підшлункової залози (50000 клітин на мишу) ін'єктували підшкірно в бічну область мишей Nod-Scid. Пухлинам давали зростати протягом 27 днів, поки вони не досягали середнього об'єму ~120 мм³. Тварин рандомізували в чотири групи обробки (n=10/група) і починали обробки. Одна група отримувала контрольне антитіло (1B711) при 10 мг/кг двічі на тиждень; одна група отримувала гемцитабін при 40 мг/кг один раз на тиждень плюс контрольне антитіло при 10 мг/кг двічі на тиждень; одна група отримувала 59R1 при 10 мг/кг двічі на тиждень і четверта група отримувала комбінацію 59R1 при 10 мг/кг двічі на тиждень і гемцитабін 40 мг/кг один раз на тиждень. Об'єми пухлин вимірювали в указані дні. Результати показані на фігурі 8. Було виявлено, що зростання пухлини ігнібувалося комбінацією 59R1 і гемцитабіну (p<0,001).

Пухлинні клітини M4 меланоми (10000 клітин на мишу) ін'єктували підшкірно в бічну область мишам Nod-Scid. Пухлинам давали зростати протягом 25 днів, поки вони не досягали середнього об'єму ~80 мм³. Тварин рандомізували групи обробки (n=10/група) і починали обробки. Одна група отримувала контрольне антитіло (1B711) при 10 мг/кг двічі на тиждень і одна група отримувала 59R1 при 10 мг/кг двічі на тиждень. Об'єми пухлин вимірювали в указані дні. Результати показані на фігурі 9. Було виявлено, що зростання пухлини ігнібувалося 59R1.

Пухлинні клітини C28 ободової кишки (10000 клітин на мишу) ін'єктували підшкірно в бічну область мишам Nod-Scid. Пухлинам давали зростати протягом 24 днів, поки вони не досягали середнього об'єму ~130 мм³. Тварин рандомізували на чотири групи обробки (n=10/група) і починали обробки. Одна група отримувала контрольне антитіло (1B711) при 10 мг/кг двічі на тиждень; одна група отримувала іринотекан при 7,5 мг/кг один раз на тиждень плюс контрольне антитіло при 10 мг/кг двічі на тиждень; одна група отримувала 59R1 при 10 мг/кг двічі на тиждень, і четверта група отримувала комбінацію 59R1 при 10мг/кг двічі на тиждень та іринотекан при 7,5 мг/кг один раз на тиждень. Об'єми пухлин вимірювали в указані дні. Результати показані на фігурі 10. Було виявлено, що зростання пухлини ігнібувалося одним

59R1 відносно групи контрольного антитіла й комбінацією 59R1 й іринотекану відносно групи іринотекану.

IgG2-антитіло 59R1 тестували також *in vivo* в лініях ксенотрансплантатів пухлини молочної залози OMP-B34, OMP-B39, OMP-B44, PE13 і UM-T1, лінії ксенотрансплантату пухлини підшлункової залози OMP-PN8 і лінії ксенотрансплантату пухлини ободової кишки OMP-C8. Ці лінії ксенотрансплантатів пухлин були встановлені згідно з процедурами, описаними в Al-Hajj et al., 2003, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100:3983-3988. Самок мишей NOD/SCID з послабленим імунітетом використовували для встановлення ксенотрансплантатів пухлини молочної залози й самців мишей NOD/SCID використовували для моделей пухлин OMP-Pn8 і OMP-C8 (Harlan, Indianapolis, Indiana). IgG2-антитіло 59R1 тестували також *in vivo* в моделі ксенотрансплантату пухлини ободової кишки Colo-205. Самок імунодефіцитних мишей bg/nu XID з фенотипом Swiss CD-1 використовували для моделі пухлини ксенотрансплантату Colo-205. В разі моделей пухлин молочної залози, повинні були імплантуватися гранули, що повільно вивільняють естроген (0,36 мг). Мишам підшкірно ін'єктували в правий бік 50000 (OMP-B34, OMP-B39, OMP-B44, PE13 і UM-T1) або 1×10^7 (Colo-205) життєздатних клітин, відповідно, в суміші 3ФР (без магнію або кальцію) і Матрігеля при співвідношенні 1:1. Загальний об'єм, що ін'єктується, на одну мишу складав 200 мкл, причому 50 % є Матрігелем. Після досягнення пухлиною розміру $65\text{--}200\text{мм}^3$, цих мишей рандомізували. Антитіла вводили один раз на тиждень і пухлини вимірювали двічі на тиждень. LZ1 (антитіло людини, яке розпізнає лізоцим) або 1B711 (мишаче IgG1-антитіло, яке розпізнає гаптен тринітрофенол) використовували як контрольне антитіло для обробки кожного типу пухлини. Об'єм пухлини розраховували, як описано Al-Hajj et al. (2003). Дані виражені у вигляді середнього \pm S.E.M.(стандартна помилка середньої). Середні величини груп порівнювали з використанням двостороннього непарного t-критерію Ст'юдента. Величини вірогідності (P) $<0,05$ інтерпретувалися як значимо різні. Весь статистичний аналіз виконували з використанням Microsoft EXCEL і Graph Pad PRISM.

Результати додаткових експериментів *in vivo* в моделях ксенотрансплантатів Colo205, C8, PNA, B34, B39, B44, PE13 і T1 показані на фігурах 11A-11H, відповідно. Як показано на фігурі 11A, монотерапія з антитілом 59R1 значимо збільшувала зростання пухлини Colo205 відносно контрольного антитіла (LZ1) ($p<0,01$). Комбінована терапія з 59R1 плюс анти-VEGF-антитіло бевацицумаб (AVASTIN) забезпечувала навіть більше інгібування зростання пухлини ($p<0,001$), ніж з 59R1 або бевацицумабом окремо. В іншій моделі колоректального ксенотрансплантату, C8, було показано, що 59R1 схожим чином інгібує зростання пухлини відносно контрольного антитіла LZ1 (фігура 11B). Так само, було виявлено, що 59R1 інгібує зростання пухлини підшлункової залози (відносно контрольного антитіла) в моделі ксенотрансплантату PN8 (фігура 11C). Було показано також, що 59R1 інгібує зростання раку молочної залози відносно контрольного антитіла в кожній з п'яти моделей ксенотрансплантатів раку молочної залози B34 (фігура 11D), B39 (фігура 11E), B44 (фігура 11F) і PE13 (фігура 11G). Так само, було виявлено, що антитіло 59R1 є ефективним в інгібуванні зростання пухлини в моделі раку молочної залози T1 (фігура 11H), хоча воно було ефективним лише у присутності естрогену, попри те, що T1 є негативною відносно рецептора естрогену пухлиною.

Приклад 10

Дія обробки анти-Notch2/3-антитілом 59R1 на регуляцію генів у моделях пухлин ксенотрансплантатів

Рівні експресії генів у різних моделях ксенотрансплантованих пухлин, оброблених IgG2-антитілом 59R1, аналізували за допомогою аналізу мікроматриць. Аналіз профілю глобальної експресії генів виконували на мікроматриці Affymetrix HG-U 133 plus 2.0 (Affymetrix, Santa Clara, CA). Три незалежні РНК-проби цілих пухлин ксенотрансплантатів з контрольною групою й групи обробки виділяли й гібридизували з мікроматрицями відповідно до інструкцій виготівника. Скановане коректування фону матриці й нормалізацію інтенсивності виконували з використанням алгоритму GCRMA з програмним забезпеченням біокондуктора з відкритим вихідним кодом (www.biocconductor.org). Рівень експресії кожного гену нормалізували перетворенням z-значення по всіх пробах у контрольній (CTRL) групі й групах обробки (59R1). Гени, диференціально експресовані ($p<0,05$ і кратна зміна $>2,0$) між цими двома групами, ідентифікували з використанням Bayesian t-критерію (Baldi et al., 2001, Bioinformatics, 17:509-519). Розподіли експресії вибраних асоційованих диференціально регульованих генів у вибраних моделях ксенотрансплантатів пухлин (Colo205, B44, PE13 і T1) показані в таблиці 5 нижче. Р-величина (PVal) кожного гену є вірогідністю випадкової значимої регуляції цього гену антитілом 59R1 з використанням Bayesian t-критерію. Показано, що ряд генів, що включають гени, що кодують регулятор передачі сигналу G-білка 5 (RGS5), Notch3 і hairy/enhancer-of-split, пов'язані з подібним до YRPW-мотиву (HEYL) білком, значимо регулюються знижуючим чином у стромі

59R1-оброблених мишей відносно контрольних мишей. (На противагу цьому, не було виявлено, що конкретні гени, кодуєчі RGS5, Notch3 і HEYL, регулюються знижувачим чином у клітинах людини цих пухлин).

Таблиця 5

Диференціально експресовані гени в стромі 59R1-оброблених пухлин

Ген	Colo205		B44		PE13		T1	
	Fold	pVal	Fold	pVal	Fold	pVal	Fold	pVal
1420942_s_в (Rgs5)	-5,52	7,65E-07	-2,43	5,59E-04	-4,23	2,86E-05	-1,18	9,82E-04
1417466_y (Rgs5)	-3,39	6,62E-07	-2,22	3,11E-04	-4,03	1,31E-10	-1,99	4,11E-04
1420941_y (Rgs5)	-5,10	1,66E-03	-2,09	1,18E-03	-2,99	1,35E-05	-1,97	2,07E-03
1421964_y (Notch3)	-3,26	3,70E-06	-2,03	2,30E-03	-1,91	1,67E-03	-1,01	8,86E-01
1416286_y (Rgs4)	-3,08	2,69E-03	-1,57	3,84E-02	-1,83	6,71E-05	-1,13	4,47E-01
1434141_y (Gucy1a3)	-2,49	2,87E-03	-1,74	1,07E-02	-4,18	1,49E-07	1,20	5,95E-01
1459713_s_в (Tmem16a)	-1,90	1,90E-03	-1,70	1,01E-02	-7,28	9,89E-10	-2,14	1,79E-04
1420872_y (Gucy1b3)	-1,94	1,90E-02	-1,65	7,68E-03	-3,06	8,52E-10	-1,01	7,13E-01
1422789_y (Aldh1a2)	-1,73	1,20E-02	-4,92	2,42E-08	-2,17	1,58E-04	-2,16	9,27E-04
1419302_y (Heyl)	-3,28	5,61E-03	-1,12	2,36E-01	-1,77	5,72E-04	-1,07	2,39E-02
1451501_a_в (Ghr)	-1,83	1,69E-02	-2,24	2,71E-04	-1,66	8,90E-04	-1,12	3,38E-01
1417714_x_в (Hba-a1/Hba-a2)	-8,37	2,49E-02	-2,56	4,63E-04	-1,92	1,06E-02	1,42	9,24E-01
1428361_x_в (Hba-a1/Hba-a2)	-8,91	1,93E-02	-2,42	1,08E-03	-1,73	4,27E-02	1,73	4,67E-01
1452590_a_в (Plac9)	-1,61	1,07E-02	-1,64	1,22E-02	-1,62	6,17E-03	1,20	7,36E-01
1449632_s_в (Fkbp10)	-1,72	1,69E-02	-1,57	1,12E-02	-1,63	1,80E-04	1,07	5,97E-01
1449280_y (Esm1)	2,07	1,06E-02	1,55	3,48E-02	1,56	4,35E-02	1,18	2,44E-01
1418829_a_в (Eno2)	1,79	2,92E-02	1,71	1,02E-02	1,54	5,43E-03	1,29	9,92E-02

5

Рівні експресії в стромі з моделей ксенотрансплантатів Colo205, B29, B34, B44, PE13, T1 (без обробки естрогеном), T1 (з обробкою естрогеном), C8 і PN8 вибраних генів, які були ідентифіковані в аналізі мікроматриці, як регульовані обробкою антитілом (hey1, notch3, rgs5, angpt1 і angpt2), аналізували додатково TaqMan®-аналізом. Ці результати показані на фігурах 12A (hey1), 12B (notch3), 12C (rgs5), 12D (angpt1) і 12E (angpt2).

10

Результати TaqMan®-аналізу підтверджують, що notch3 і rgs5 регулюються знижувачим чином у стромі кожного з різних типів пухлин у відповідь на обробку антитілом 59R1 (відносно контролю) (фігури 12B і C). RGS5 є добре відомим маркером перичитів і клітин гладких м'язів судин (Berger et al., 2005, Blood, 105:1094-1101; Lovschall et al., 2007, Int. J. Dev. Biol., 51: 715-721; Cho et al., 2003, FASEB J., 17:440-2). Notch3 був ідентифікований як такий, що співекспресується зі RGS5 у перичитах під час ангиогенезу й грає важливу роль у регуляції долі перичитів і клітин гладких м'язів судин (Lovschall et al., 2007, Int. J. Dev. Biol., 51: 715-721; Domenga et al., 2004, Genes & Dev., 18:2730-2735; Sweeney et al., 2004, FASEB J., 18:1421-3; Morrow et al., 2005, Am. J. Physiol. Cell Physiol., 289:C1188-C1196).

15

Крім того, було також підтверджено, що hey1 регулюється знижувачим чином у стромі кожної з моделей ксенотрансплантатів, за винятком B34 (фігура 12A). HEYL належить до сімейства Neu розташованих далі в цьому шляху чинників транскрипції передачі сигналу Notch (Hey1, Hey2 і HEYL). Знижувача регуляція hey1 антитілом 59R1 передбачає, що антитіло 59R1 безпосередньо діє на передачу сигналу Notch знижувачою регуляцією hey1.

20

Було також визначено, що ангиопоетин-1 (angpt1) і ангиопоетин-2 (angpt2) знижувачим чином регулюються в стромі ряду моделей раку молочної залози (фігури 12D і E). ANGPT1 і 2 (ангиопоетин-1 і -2) є лігандами для рецепторів TIE 1 і 2. TIE-рецептори, подібно VEGF, є критичними молекулами передачі сигналів у процесах неоангиогенезу (Jones et al., 2001, Nature Reviews, 2:257-267).

25

Помітно, проте, що *angpt1* і *angpt2* регулювалися знижуючим чином у стромі моделі T1, коли використовували обробку естрогеном ("T1 e"), умови, за яких обробка антитілом 59R1 була ефективною проти зростання пухлини, але не в стромі тієї самої моделі у відсутність обробки естрогеном ("T1 ne"), умови, за яких обробка антитілом 59R1 була неефективною проти зростання пухлини (див. приклад 9, вище). Таким чином, дія 59R1 на знижуючу регуляцію ангіопоетину-1 і ангіопоетину-2 в стромі пухлини T1 припинялося у відсутність обробки естрогеном. Одним можливим поясненням цього ефекту є те, що у відсутність обробки естрогеном, рівні чинників зростання ангіопоетину-1 і ангіопоетину-2 в стромі T1 є недостатньо підвищеними для забезпечення вимірюваних зменшень у рівнях експресії після обробки антитілом 59R1. Було показано, що естроген надає значиму дію на мікрооточення пухлини (Banka et al., 2006, Cancer Res. 66:3667-3672). Одним можливим поясненням цих даних є те, що рівні естрогену приводять до залежності цієї пухлини від передачі сигналу ANGPT2, яка потім приводить до чутливості до обробки 59R1.

Приклад 11

Анти-Notch2/3-антитіло 59R1 значимо індукує гіпоксію в пухлинах ободової кишки й молочної залози

Фарбування на гіпоксичні області виконували в пухлинах ободової кишки Colo-205 і пухлинах молочної залози PE-13, які обробляли або IgG2-антитілом 59R1, або контрольним антитілом 1B711. Фарбування виконували, як описано в Ridgway et al., 2006, Nature 444:1083-1087. Коротко, для вимірювання гіпоксії, пімонідазолгідрохлорид (HypoxyProbe, NPI, Burlington, MA), який утворює довгоживучі аддукти при парціальному тиску кисню, меншому ніж приблизно 10 мм ртутного стовпчика, ін'єктували внутрішньочеревно при 60мг/кг за 1 годину перед убиванням. Потім пухлини обробляли для гістологічного аналізу, й зрізи пухлин забарвлювали з використанням анти-пімонідазол-антитіла згідно з протоколом виготівника (NPI). Фотографії отримували з використанням мікроскопа BX51 (Olympus, Center Valley, PA).

Було виявлено, що життєздатні пухлинні клітини присутні рівним чином в оброблених 1B711 і 59R1 пухлинах, як показано відносно однорідним і щільним фарбуванням DAPI (дані не показані). Кількість CD31-позитивних клітин також залишалася незмінною, що дозволяє передбачити, що обробка 59R1 не впливала на кількість ендотеліальних клітин. Проте, в 59R1-оброблених пухлинах Colo-205 і PE13, області (як детектовано з використанням анти-пімонідазол-антитіла) гіпоксії були значимо більш вираженими, ніж в оброблених 1B711 пухлинах (дані не показані). AF594-кон'юговане козине антитіло проти щурячого F(ab')₂ використовували для детектування анти-пімонідазол-антитіла.

Приклад 12

Пухлини молочної залози, що містять делеції, в супресорному гені PTEN пухлини, є чутливими до обробки антитілом 59R1

Проби ДНК отримували з пухлинних клітин ксенотрансплантатів раків молочної залози. Перед виділенням ДНК, клітини стромы мишей у пухлинах ксенотрансплантатів виснажували з використанням магнітних гранул, кон'югованих із специфічними для мишачих клітин антитілами. Очищені проби ДНК гібридизували з чіпом генів Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0 (Affymetrix, Santa Clara, CA), який має більше 946000 зондів для детектування варіацій копійності (CNV), відповідно до інструкцій виготівника. Зміни стану копійності оцінювали з використанням Hidden Markov Model (HMM), та їх варіації (CNV) кожної проби отримували ранговим сегментаційним аналізом з використанням Нармар270 як фону. Внаслідок шуму, властивого цій матриці, відношення -0,5 і -1,0 log₂ використовували як межі для гетерозиготної делеції й гомозиготної делеції при порозі значущості <1,0×10⁻⁶ і мінімальній кількості зондів на сегмент, рівній 5.

Фігура 13 показує екзон, розподіл зондів Affymetrix і делеції в гені пухлинного супресора фосфатази й гомолога тензину (PTEN) в хромосомі 10. Було виявлено, що пухлини B29, B34, B37, B40, B51, T2, T3 і T6 мають інтактні гени PTEN у їх геномах. Було визначено, що ген PTEN має гомозиготні делеції в пухлині B39, тоді як пухлини B44, PE13 і T1, як було визначено, мають гетерозиготні делеції цього гену. Як обговорювалося вище, було визначено, що 59R1 має протипухлинну ефективність у кожній з чотирьох пухлин молочної залози, що мають гомозиготні або гетерозиготні делеції PTEN. Ці результати передбачають, що пухлини, що несуть гомозиготні або гетерозиготні делеції, можуть бути особливо для лікування анти-Notch2/3-антитілом, таким як 59R1.

Приклад 13

Характеристика антитіла 59R5

Було ідентифіковано одне додаткове антитіло людини 59R5, яке специфічно зв'язує Notch2 людини і Notch3 людини. Послідовності важкого ланцюга й легкого ланцюга забезпечені в SEQ

- ID NO:49 і SEQ ID NO:18, відповідно. Варіабельну область важкого ланцюга забезпечено в SEQ ID NO:50 і варіабельну область легкого ланцюга забезпечено в SEQ ID NO:13. CDR3-послідовність важкого ланцюга 59R5 містить SIFYTT, SEQ ID NO:51. Інші CDR-послідовності 59R5 є ідентичними з 59R1. Біасcore-аналіз афінності зв'язування 59R1 і 59R5 показав, що 59R5 мав такі самі властивості зв'язування у відношенні як Notch2, так і Notch3, що й 59R1. Обидва антитіла пов'язують Notch2- і Notch3-рецептори з субнанолярною афінністю (див. таблицю 6).

Таблиця 6

Константи дисоціації IgG (KD, нМ)

	m-Notch1	h-Notch1	m-Notch2	h-Notch2	m-Notch3	h-Notch3	h-Notch4
59R1	>10	>10	0,65	0,05	0,32	0,19	NB
59R5	>10	>10	0,26	0,05	0,29	0,22	NB

- Було визначено, що 59R5 має схожу активність блокування передачі сигналу Notch2 і Notch3 з цією активністю 59R1. Визначали активацію рецептора в аналізах на основі люциферази. Пухлинні клітини PC3 транзитивно трансфікували Notch-рецептором людини або миші (Notch2 людини, мишачим Notch2, Notch3 людини або мишачим Notch3) і GFP-індукованою репортерною конструкцією. Трансфіковані клітини інкубували з різними концентраціями 59R1-або 59R5-антитіла з одержанням пасивно іммобілізованого білка DLL4-Fc. Активацію Notch-рецептора визначали вимірюванням люциферазної активності. Як показано на фігурі 15A, антитіло 59R5 блокувало індуковану лігандом активацію передачі сигналу Notch2 людини, мишачого Notch2, Notch3 людини, мишачого Notch3-рецептора при рівнях, схожих з рівнями, визначеними для 59R1.

- Визначали зв'язуючий епітоп 59R5. Як було описано в прикладі 3 для аналізу антитіла 59R1, створювали декілька точкових мутантів у повнорозмірному Notch1, перетворенням залишків у EGF10 на відповідні амінокислоти в Notch2 людини. Мутанти в повнорозмірних Notch-послідовностях генерували QuikChange®-мутагенезом (Stratagene) і підтверджували секвенуванням. Клітини HEK 293 транзитивно трансфікували експресуючими векторами, кодуєчими Notch2 людини, Notch1 людини або Notch1 людини із залишками 382-386, мутуваними у відповідні залишки Notch2 людини. Клітини також котрансфікували плазмідом, що кодує зелений флуоресцентний білок (GFP) для маркування клітин, які отримали трансфіковану плазмиду. Клітини інкубували з 59R1 або 59R5 і флуоресцентним вторинним антитілом і потім випробовували за допомогою FACS. 59R1 і 59R5 детектували PE-кон'югованим козином специфічним антитілом проти Fc-гамма людини. (Jackson Immunochemicals, #109-116-170). Як показано на фігурі 15B, було виявлено, що 59R5 зв'язувався з Notch2 і не зв'язувався з Notch1. Проте при заміні амінокислот, відповідних амінокислотам 385-389 Notch2 у Notch1, 59R5 був здатний зв'язуватися з цим мутуваним Notch1. Це передбачало, що щонайменше одна або декілька амінокислот, необхідних для зв'язування 59R5 з Notch2 людини, було розташовано в амінокислотах 385-389 (залишках у вміщеній у бокс послідовності hNotch2, показаній на фігурі 14A) sequence shown in Figure 14A), і передбачало, що 59R5 зв'язує той самий епітоп, що й 59R1, або епітоп, схожий з епітопом 59R1 або що перекривається з епітопом 59R1.

Приклад 14

In vivo обробка пухлин з використанням Notch2/3-антитіла 59R5

- У одному варіанті здійснення, мишам NOD/SCID ін'єктували пухлинні клітини Pe13 молочної залози. Цих мишей обробляли анти-Notch2/3-антитілом 59R1, анти-Notch2/3-антитілом 59R5 або контрольним антитілом. Антитіла вводили при 15 мг/кг один раз на тиждень в "превентивному" режимі, де введення доз починали через два дні після ін'єкції клітин. Фігура 16A показує, що обробка 59R5 інгібувала зростання пухлини більш ніж на 80 %, подібно до ефектів, спостережуваних з 59R1.

- У іншому варіанті, мишам NOD/SCID ін'єктували пухлинні клітини ободової кишки C28. Цих мишей обробляли анти-Notch2/3-антитілом 59R1, анти-Notch2/3-антитілом 59R5 або контрольним антитілом. Антитіла вводили при 15 мг/кг один раз на тиждень в "превентивному" режимі, де введення доз починали через два дні після ін'єкції клітин. Фігура 16B показує, що як 59R1, так і 59R5 інгібували зростання пухлин ободової кишки C28.

- У іншому варіанті, мишам NOD/SCID ін'єктували пухлинні клітини Colo205. Цих мишей обробляли анти-Notch2/3-антитілом 59R1, анти-Notch2/3-антитілом 59R5 або контрольним антитілом. Антитіла вводили при 15 мг/кг один раз на тиждень в "превентивному" режимі, де

введення доз починали через один тиждень після встановлення пухлин. Фігура 16С показує, що як 59R1, так і 59R5 інгібували зростання пухлин ободової кишки Colo208 при схожих рівнях.

Приклад 15

5 In vivo лікування пухлин з використанням Notch2/3-антитіла 59R5 у комбінованому лікуванні
У одному варіанті здійснення, мишам NOD/SCID ін'єктували клітини пухлини підшлункової залози PN8. Цим клітинам давали зростати протягом приблизно 33 днів, поки вони не досягали середнього об'єму пухлини 150 мм³. Мишей обробляли гемцитабіном при 20 мг/кг один раз на тиждень у комбінації з контрольним антитілом, анти-Notch2/3-антитілом 59R1 або анти-Notch2/3-антитілом 59R5. Як показано на фігурі 17А, антитіло 59R5 інгібувало зростання пухлини при рівні, схожій з рівнем, що викликається антитілом 59R1, і комбінована обробка пролонгувала виникнення рецидиву пухлини триваліше, ніж один гемцитабін.

10 У одному варіанті здійснення, для оцінювання дії 59R5 на ракових стоволових клітинах дослідження рецидиву пухлини здійснювали на моделі пухлини молочної залози PE13. Мишей NOD/SCID ін'єктували клітинами пухлини молочної залози PE13. Пухлинам давали зростати протягом 40 днів перед початком обробки. Цих мишей обробляли таксоллом при 15мг/кг двічі на тиждень протягом 5 тижнів, у комбінації або з контрольним антитілом, або з анти-Notch2/3-антитілом 59R5. Через 5 тижнів обробки таксоллом припиняли, а обробки антитілом продовжували. Спостерігали, що 59R5 значимо затримував рецидив пухлини після обробки високою дозою таксолу (Фіг. 17В). Ці результати передбачають, що обробка 59R5 зменшує стрівальність (частоту) ракових стоволових клітин.

20 Підсумовування активності in vivo 59R1 і 59R5, описаної в попередніх варіантах здійснення, показано в таблиці 7. Об'єми пухлин і р-величини для кожного експерименту показані відносно контрольної групи. Дослідження PE13, C28 і Colo205 здійснювали, як описано в прикладі 14. Дослідження PN8 проводили, як описано вище. Для експерименту з PN8, контролем є один гемцитабін, і величини для 59R1 і 59R5 є комбінаціями з гемцитабіном. Дози антитіл вводили один раз на тиждень при 15 мг/кг для всіх експериментів.

Таблиця 7

	PE13		C28		Colo205		PN8	
	Об'єм пухлини	величина р	Об'єм пухлини	величина р	Об'єм пухлини	величина р	Об'єм пухлини	величина р
59R1	0,25	<0,0001	0,29	<0,0001	0,68	0,003	0,27	0,026
59R5	0,18	<0,0001	0,38	<0,0001	0,61	0,001	0,11	0,036

Приклад 16

30 Регуляція експресії генів в пухлинах після обробки 59R5

Для визначення, чи функціонували 59R5 і 59R1 за допомогою тих самих механізмів in vivo, досліджували експресію ключових генів-мішеней у пухлинних клітинах і в клітинах стромы. Експресію генів аналізували кількісними ПЦР у пухлинних клітинах PE13 і стромальних клітинах. Рівні експресії генів відносно обробленої контрольним антитілом групи показані на фігурі 18. 59R1 і 59R5 регулювали експресію мишачих HEYL, Notch3 і RGS5 у стромальних клітинах до схожої міри (ліва панель). Однаковий характер регуляції спостерігали в пухлинах C28 (дані не показані). Таким чином, механізм дії раніше ідентифікований для 59R1 в регуляції генів у стромальних клітинах пухлини, критичний для функції судинної сітки пухлини й перичитів, зберігався антитілом 59R5. Так само, 59R5 і 59R1 регулювали експресію генів людини ID4, EDNRA і EGLN3 в пухлинних клітинах у тій самій мірі (права панель).

40 На відміну від інших членів цього сімейства генів, ID4 зазвичай недостатньо експресувався в пухлинах, і було показано, що ID4 є супресором пухлини в раку молочної залози, який часто стає мовчазним унаслідок метилування. Втрата експресії ID4 корелює з гіршим прогнозом у пацієнтів з раком молочної залози (Noetzel et al., 2008, Bmc Cancer 8:154). Таким чином, позитивна регуляція ID4 в клітинах PE13 пухлини молочної залози може бути частиною протипухлинного механізму анти-Notch2/3. EDNRA є геном, що кодує рецептор ендотеліну, який забезпечує зростання як ендотеліальних, так і пухлинних клітин і стимулює метастатичну активність пухлинних клітин (Bagnato and Rosano 2008, Int. J. Biochem. Cell. Biol. 40:1443-51). EGLN3 (також відомий як HIF-3α) є індуктованим гіпоксією геном. Індукція EGLN3 анти-Notch2/3 узгоджується з руйнуванням функціональної судинної сітки в оброблених пухлинах. Ці дані показують, що біологічні активності й механізм дії 59R1 і 59R5 були дуже схожими.

Таблиця 8 показує результати аналізу мікроматриць, оброблених 59R1 і 59R5 пухлин PE13. Ці числа є середніми величинами диференціальної експресії для оброблених тварин проти контрольних тварин, з 3 тваринами на групу.

Таблиця 8

59R1		59R5		Символ	Назва гену
Кратність	pVal	Кратність	pVal		
-5,10	3,21E-05	-3,00	1,10E-03	Foxc2	forkhead box C2
-4,40	1,26E-05	-2,46	7,45E-04	Hey2	hairy/enhancer-of-split, споріднений мотиву 2 YRPW
-4,32	8,03E-06	-2,14	1,00E-04	Rgs5	регулятор передачі сигналу G-білка 5
-3,33	5,59E-04	-2,79	3,18E-03	Heyl	hairy/enhancer-of-split, споріднений мотиву YRPW
-2,71	4,80E-04	-2,90	1,02E-04	Rgs4	регулятор передачі сигналу G-білка 4
-2,10	2,17E-04	-1,86	4,33E-05	Notch3	гомолог 3 Notch-гену (Drosophila)
-1,92	3,16E-02	-2,35	3,43E-03	Mmp9	Матриксна металопептидаза 9
2,36	3,06E-02	4,97	3,35E-02	Pdcd1lg2	ліганд 2 програмованої загибелі клітин
7,42	6,25E-07	2,80	2,07E-03	Gzma	гранзим А

5

Аналіз мікроматриці виявив, що 59R5 значимо інгібував Notch-шлях ($p < 0,01$), як виміряно за допомогою експресії генів (e.g., Foxc2, Hey2, Heyl, Notch3). Ці результати були порівнянні з 59R1. Foxc2 є мішенню, розташованою далі в Hedgehog-шляху й бере участь у диференціюванні клітин. Додаткові гени, що беруть участь в апоптозі (наприклад, гранзим А) і пухлиноасоційованому ремоделюванні тканини (MMP-9), також експресувалися схожим чином між 59R1 і 59R5. Ці дані передбачають, що біологічні активності й механізм дії 59R1 і 59R5 є дуже схожими.

Приклад 17

Одержання додаткових Notch2- і/або Notch3-антитіл

Одержання антигену

У деяких варіантах здійснення, рекомбінантні фрагменти поліпептидів позаклітинного домену Notch2 людини або Notch3 генерували у вигляді антигенів для одержання антитіл. Наприклад, стандартна технологія рекомбінантних ДНК може бути використана для виділення поліпептиду, що кодує амінокислоти 1-493 Notch2 (SEQ ID NO:33), які включають EGF 1-12. Цей поліпептид може лігуватися в рамці зчитування N-кінця або з Fc-міткою людини, або з гістидиновою міткою й клонований у аденілатциклазний вектор-переносник для опосередкованої бакуловірусом експресії в клітинах комах. Стандартні протоколи трансфекції, інфікування й культур клітин можуть бути використані для одержання рекомбінантних клітин-хазяїв, експресуючих відповідний поліпептид Notch2 (SEQ ID NO:34) (O'Reilly et al., 1994, Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual, Oxford: Oxford University Press).

Розщеплювання ендегенної сигнальної послідовності Notch2 людини було приблизно визначене з використанням програми передбачення розщеплювання SIGNALP 3.0, але фактична точка розщеплювання in vivo може відрізнятись декількома амінокислотами або напрямом. Передбачене розщеплювання Notch2 знаходиться між амінокислотами 1 і 26, отже, антигенний білок Notch2 містить приблизно 27 амінокислот - 493 амінокислоти. Антигенний білок може бути очищений з кондиціонованого середовища клітин комах з використанням Білок А- і Ni⁺⁺-хелат-афінної хроматографії. Потім очищений антигенний білок діалізують проти ЗФР (pH=7), концентрують до приблизно 1 мг/мл і стерильно фільтрують у препараті для імунізації.

Імунізація

Миші можуть бути імунізовані очищеним антигенним білком Notch2 або Notch3 з використанням стандартних способів. Кров з окремих мишей може бути піддана скринінгу через приблизно 70 днів після початкової імунізації на розпізнавання антигену з використанням аналізів ELISA і FACS (описаних детально нижче). Потім тварин з найвищими титрами антитіл відбирають для кінцевого бустингу антигену, після чого виділяють клітини селезінки для одержання гібридом. Гібридомні клітини висівають при 1 клітині на лунку в 96-лункових планшетах і супернатант з кожної лунки піддають скринінгу за допомогою аналізів ELISA і FACS проти антигенного білка. Відбирають декілька гібридом з високим титром антитіла й розмножують у культурі з нерухомими колбами. Антитіла очищають з гібридомного супернатанту з використанням хроматографії на білок А- або білок G-агарозі й ці антитіла тестують за допомогою FACS, як описано нижче.

FACS-аналіз

Для відбору моноклональних антитіл, що продукуються гібридомами, клони, які розпізнають нативний білок Notch2 (і/або Notch3) клітинної поверхні, використовують FACS-аналіз. Клітини HEK293 котрансфікують експресуючими векторами, що кодують повнорозмірний кДНК-клон Notch2 і маркер трансфекції GFP. Через двадцять чотири - сорок вісім годин після трансфекції, клітини збирають у суспензії й інкубують на льоду з анти-Notch2- (або анти-Notch3- або анти-Notch2/3-антитілами) або контрольним IGG для детектування зв'язування антигену фону. Ці клітини промивають і первинні антитіла, що детектуються вторинними антимішачими антитілами, кон'югують з флуоресцентним хромофором. Потім мічені клітини сортують за допомогою FACS для ідентифікації анти-Notch2-, анти-Notch3- або анти-Notch2/3-антитіл, які специфічно розпізнають експресію на поверхні клітин нативного Notch2- і Notch3-білка клітинної поверхні.

Химерні антитіла

Після ідентифікації моноклональних антитіл, які специфічно розпізнають незв'язуючий ліганд домен Notch-рецептора, ці антитіла модифікують для подолання імунної реакції антимішачого антитіла людини (HAMA) при використанні як терапевтичні агентів антитіл гризунів. Варіабельні області важкого ланцюга й легкого ланцюга вибраного моноклонального антитіла виділяють ОТ-ПЦР з гібридомних клітинклітин і лігують у рамці зчитування з константними областями важкого ланцюга й каппа-легкого ланцюга IgG1 людини, відповідно, в експресуючих векторах ссавця. Альтернативно, використовують експресуючий вектор Ig людини, такий як TCAE 5.3, який містить гени константної області важкого ланцюга IgG1 і каппа-легкого ланцюга на тій самій плазміді. (Preston et al., 1998, Infection & Immunity 66:4137-42). Потім експресуючі вектори, що кодують химерні ланцюги важкого й легкого ланцюгів, котрансфікують у клітини яєчників китайського хом'яка (CHO) для одержання химерних антитіл. Імунореактивність і афінність химерних антитіл порівнюють з вихідними мишачими антитілами за допомогою ELISA і FACS.

Гуманізовані антитіла

Оскільки терапевтичні агенти, що є химерними антитілами, часто є все ще антигенними, виробляючими імунну реакцію людини проти химерного антитіла (HAMA), химерні антитіла проти Notch2- або Notch3-рецептора можуть вимагати додаткової гуманізації. Для генерування гуманізованих антитіл ці три короткі гіперваріабельні послідовності або визначальні комплементарності області (CDR) варіабельних областей важкого ланцюга й легкого ланцюга химерного антитіла, описані вище, вбудовують з використанням технології рекомбінантних ДНК у каркас варіабельного домену важкого й легкого ланцюгів, відповідно, й потім клонують в експресуючий вектор ссавця для експресії в клітинах CHO. Імунореактивність і афінність цих гуманізованих антитіл порівнюють з вихідними химерними антитілами за допомогою ELISA і FACS. Крім того, може бути використаний сайт-спрямований мутагенез або мутагенез високої щільності варіабельної області для оптимізації специфічності, афінності тощо цього гуманізованого антитіла.

Приклад 18

Додаткові аналізи *in vitro* для оцінювання антитіл проти Notch-рецептора

Цей приклад описує способи для аналізів *in vitro* для тестування активності антитіл, генерованих проти Notch2- і/або Notch3-рецептора, на проліферації й цитотоксичності.

Аналіз проліферації

Антитіла проти Notch2 і/або Notch3 тестують на їх дію на зростання пухлинних клітин *in vitro* з використанням аналізу на основі BrdU. Свіжодисоційовані, Lin-виснажені пухлинні клітини молочної залози культивують при низькому кисні протягом 2-5 днів. Потім клітини культивують при 20000 клітин на лунку з 2,5 мкг/мл або 5,0 мкг/мл анти-Notch-антитіла, контрольного неспецифічного мишачого IgG або без антитіла протягом трьох днів з подальшими 18 годинами BrdU-мічення. Всі експерименти виконують з множинними повторностями. Потім визначають здатність анти-Notch-антитіл інгібувати проліферацію клітин порівняно з контрольними антитілами.

Аналіз комплементзалежної цитотоксичності

Лінії ракових клітин, експресуючих Notch2-рецептор і/або Notch3-рецептор, або, альтернативно, ракові клітини, виділені з проби пацієнтів, пасованої як ксенотрансплантат у мишах з послабленим імунітетом, використовують для вимірювання комплементзалежної цитотоксичності (CDC), опосередкованої антитілом проти Notch2- і/або Notch3-рецептора. Клітини суспендують у 200 мкл культурального середовища RPMI 1640, доповненого антибіотиками і 5 % ФТС при 106 клітин/мл. Потім суспендовані клітини змішують з 200 мкл сироватки або інактивованої нагріванням сироватки з антитілами проти Notch2- і/або Notch3-

рецептора в трьох повторностях. Суміші клітин інкубують протягом 1-4 годин при 37° у 5 % CO₂. Потім оброблені клітини збирають, ресуспендують у 100 мкл FITC-міченого анексину V, розведеного в культуральному середовищі, й інкубують при кімнатній температурі протягом 10 хвилин. Додають 100 мкл розчину йодиду пропідію (25 мкг/мл), розведеного в HBSS, і інкубують при кімнатній температурі протягом 5 хвилин. Клітини збирають, ресуспендують у культуральному середовищі й аналізують проточною цитометрією. Проточна цитометрія FITC-забарвлених клітин забезпечує загальні кількості клітин, і поглинання йодиду пропідію мертвими клітинами у вигляді відсотка загальних кількостей клітин використовують для вимірювання загибелі клітин у присутності сироватки й антитіл проти Notch2- і/або Notch3-рецептора порівняно з інактивованою нагріванням сироваткою й контрольними антитілами. Таким чином визначають здатність анти-Notch2/3-антитіл опосередкувати комплементзалежну цитотоксичність.

Аналіз антитілозалежної клітинної цитотоксичності

Лінії ракових клітин, експресуючих Notch2-рецептор і/або Notch3-рецептор, або, альтернативно, ракові ствольні клітини, виділені з проби пацієнтів, пасованої як ксенотрансплантат у мишах з ослабленим імунітетом (як описано детально нижче), для вимірювання антитілозалежної клітинної цитотоксичності (ADCC), опосередкованої антитілом проти Notch2- і/або Notch3-рецептора. Клітини суспендують у 200 мкл культурального середовища RPMI 1640, що не містить фарбника фенолового червоного, доповненого антибіотиками і 5 % ФТС, при 106 клітинах/мл. Мононуклеарні клітини периферичної крові (PBMC) виділяють з гепаринізованої периферичної крові центрифугуванням у градієнті щільності Ficoll-Paque, для застосування як ефекторних клітин. Потім клітини-мішені (Т) змішують з ефекторними клітинами PBMC (Е) при відношеннях Е/Т 25:1, 10:1 і 5:1 в 96-лункових планшетах у присутності Notch2- або Notch3-рецепторів або контрольних антитіл. Контролі включають інкубацію лише клітин-мішеней і лише ефекторних клітин у присутності антитіла. Суміш клітин інкубують протягом 1-6 годин при 37°C в 5 % CO₂. Потім вимірюють вивільнену лактатдегідрогеназу (LDH), стабільний цитозольний фермент, що вивільняється після лізису клітин, за допомогою колориметричного аналізу (наприклад, CytoTox96 Non-radioactive Cytotoxicity Assay; Promega; Madison, WI). Дані оптичної щільності при 490 нм збирають стандартним ридером 96-лункових планшетів і роблять поправки на фон. Відсоток специфічної цитотоксичності розраховують відповідно до формули: % цитотоксичність = 100× (експериментальне вивільнення LDH - мимовільне вивільнення LDH ефектором - спонтанне вивільнення LDH мішенню)/(максимальне вивільнення LDH мішенню - мимовільне вивільнення LDH мішенню). Таким чином визначають здатність антитіл проти Notch2- і/або Notch3-рецептора опосередкувати антитілозалежну клітинну цитотоксичність.

Приклад 19

Одержання антитіл проти EGF10 (або еквівалентного EGF) Notch-рецепторів

Ідентифікація антитіла, яке специфічно розпізнає десятий повтор EGF Notch2 і відповідний повтор EGFR Notch3 (дев'ятий повтор EGF), який зменшує зростання пухлини у тварин, передбачає важливість цього незв'язуючого ліганд домену й десятого повтору EGF (або його еквіваленту), зокрема, для ефективних ракових терапій. Для націлювання на EGF-повтор 10 (або еквівалентний EGF) у членах сімейства Notch-рецепторів, отримують і аналізують антитіла проти EGF10 Notch1, Notch2 або Notch4 або проти EGF9 Notch3. Конкретно, мишей імунізують антигенами, що містять десятий повтор EGF Notch1 (SEQ ID NO:35); Notch2 (SEQ ID NO:36) або Notch4 (SEQ ID NO:38) або дев'ятий повтор EGF Notch3 (SEQ ID NO:37). Антитіла, які розпізнають різні комбінації цих чотирьох Notch-рецепторів, ідентифікують з використанням FACS-аналізу клітин HEK 293, трансфікованих кожним Notch-рецептором, як описано детально вище). Передбачаються антитіла, які розпізнають десятий повтор EGF (або еквівалентний EGF) з двох членів сімейства Notch-рецепторів: (наприклад, антитіла які розпізнають EGFR10 Notch1 і EGF10 Notch2; EGF10 Notch1 і EGF9 Notch3; EGF10 Notch1 і EGF10 Notch4; EGF10 Notch2 і EGF9 Notch3; EGF10 Notch2 і Notch4 EGF10 Notch4 або EGF9 Notch3 і EGF10 Notch4). Також обговорюються антитіла, які розпізнають десятий повтор EGFt (наприклад, еквівалентний EGF) з трьох членів сімейства Notch-рецепторів (наприклад, антитіла, які розпізнають EGF10 Notch1, EGF10 Notch2 і EGF9 Notch3; EGF10 Notch1, EGF10 Notch2 і EGF10 Notch4; або EGF10 Notch2, EGF9 Notch3 і EGF10 Notch4). Очікуються також антитіла, які розпізнають десятий повтор EGF (або еквівалентний EGF) з чотирьох членів сімейства Notch-рецепторів (наприклад, антитіла, які розпізнають EGF10 Notch1, EGF10 Notch2, EGF9 Notch3 і EGF10 Notch4).

Приклад 20

Лікування раку людини з використанням анти-Notch-рецептор-антитіл

Цей приклад описує способи лікування раку з використанням антитіл проти Notch-рецептора для націлювання на пухлини, що містять ракові ствольні клітини й пухлинні клітини, в яких була детектована експресія Notch-рецептора.

Присутність експресії маркера ракових ствольних клітин спочатку визначають від біопсії пухлини. Пухлинні клітини з біопсії з пацієнта з діагнозом раку витягують за стерильних умов. У деяких варіантах здійснення, тканину біопсію заморожують у свіжому рідкому азоті, заливають в О.С.Т. і роблять зрізи на кріостаті у вигляді зрізів 10 мкм на предметних стеклах. Альтернативно, частину кожної пухлини фіксують формаліном, заливають в парафін і нарізують на мікротомі у вигляді 10 мкм зрізів на предметних стеклах. Зрізи інкубують з антитілами проти Notch-рецептора для детектування експресії білка. Крім того, може бути визначена присутність ракових ствольних клітин. Проби тканинної біопсії нарізують на маленькі шматочки, подрібнюють повністю з використанням стерильних лез і клітини піддають ферментативному переварюванню й механічному руйнуванню з одержанням суспензії окремих клітин. Потім дисоційовані пухлинні клітини інкубують з анти-ESA-CD44, -CD24 і -Lin-антитілами для детектування ракових ствольних клітин і присутність пухлинних ствольних клітин ESA+, CD44+, CD24-/low, Lin- визначають проточною цитометрією, як описано детально вище.

Ракові пацієнти, пухлини яких були діагностовані як експресуючі Notch-рецептор, лікують анти-Notch-рецептор-антитілами. Гуманізовані моноклональні анти-Notch-рецептор-антитіла або моноклональні анти-Notch-рецептор-антитіла людини, отримані, як описано вище, очищають і готують з придатним фармацевтичним носієм у ЗФР для ін'єкції. Пацієнтів обробляють Notch-антитілами один раз на тиждень протягом щонайменше 10 тижнів, але в певних випадках один раз на тиждень протягом щонайменше приблизно 14 тижнів. Кожне введення цього антитіла має бути фармацевтично ефективною дозою приблизно 2 - приблизно 100 мг/мл і в деяких випадках приблизно 5 - приблизно 40мг/мл. Це антитіло може вводитися до, одночасно або після схем стандартної хіміотерапії з використанням одного або декількох хіміотерапевтичних агентів, таких як паклітаксел, гемцитабін, іринотекан, оксаплатин, фторурацил, лейковорин або стрептозоцин. Пацієнтів піддають моніторингу для визначення, чи приводила така обробка до протипухлинної реакції, наприклад, на основі регресу, зменшення в стрівальності нових пухлин, зниження експресії пухлинних антигенів, зменшених кількостей ракових ствольних клітин або інших способів оцінювання прогнозу захворювання.

Приклад 21

Одержання антитіл проти EGF-повтору 4 Notch1, Notch2, Notch3 і/або Notch4

Для націлювання на EGF-повтор 4 в членах сімейства Notch-рецепторів, отримували й аналізували антитіла проти EGF-повтору 4 Notch1, Notch2, Notch3 і/або NOTCH4. Конкретно, мишей імунізували антигенами, що містять четвертий повтор EGF Notch1 (SEQ ID NO:41), Notch2 (SEQ ID NO:42), Notch3 (SEQ ID NO:43) або Notch4 (SEQ ID NO:44). Антитіла, які розпізнають специфічні Notch-рецептори, а також антитіла, які розпізнають різні комбінації цих чотирьох Notch-рецепторів, ідентифікують за допомогою FACS-аналізу клітин HEK 293, трансфікованих кожним Notch-рецептором, як описано детально вище. Передбачаються антитіла, які розпізнають цей четвертий повтор EGF з двох членів сімейства Notch-рецепторів (наприклад, антитіла, які розпізнають четвертий повтор EGF Notch1 і Notch2; Notch1 та Notch3; Notch1 і Notch4; Notch2 і Notch3; Notch2 і Notch4; або Notch3 і Notch4). Передбачаються антитіла, які розпізнають цей четвертий повтор EGF з трьох членів сімейства Notch-рецепторів (наприклад, полімерази, які розпізнають четвертий повтор EGF Notch1, Notch2 і Notch3; Notch1, Notch2 і Notch4; або Notch2, Notch3 і Notch4). Передбачаються також антитіла, які розпізнають четвертий повтор EGF з чотирьох членів сімейства Notch-рецепторів (наприклад, антитіла, які розпізнають четвертий повтор EGF з Notch1, Notch2, Notch3 і Notch4).

Опис прикладів одержання й характеристики моноклонального антитіла, 13M57, яке зв'язує EGF4 Notch1, може бути знайдене в Публікації заявки на патент США №2008/0131434, яка включена в даний опис як посилання в повному обсязі.

Приклад 22

Додаткові аналізи експресії генів у пухлинних клітинах, оброблених 59R1

Були ідентифіковані зміни в експресії генів у відповідь на обробку 59R1 в пухлинних клітинах у моделях ксенотрансплантатів.

Були ідентифіковані декілька наборів шляхів/генів, які регулюються антитілом 59R1 в пухлинних клітинах (таблиця 9) з використанням аналізу збагачення наборів генів (Mootha et al., 2003, Nature Genetics 34:267-73; Subramanian et al., 2005, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:15545-50) в пухлинах молочної залози T1, PE13 і B51. Явно видно, що шляхи клітинного циклу, тус-активуючі гени й декілька наборів генів ствольних клітин знижуючим чином регулюються антитілом у цьому аналізі. Було показано, що cMyc є прямою мішенню Notch-шляху (Weng et al.,

- 2006, Genes Dev. 20:2096-109). Набори генів стоволових клітин, знижуючим чином регульовані 59R1, отримували з молекулярної сигнатури, виробленої з п'яти різних популяцій: фетальних гемопоетичних стоволових клітин людини (HSC), мишачих фетальних HSC і HSC зрілих мишей, нервових стоволових клітин (NSC) і ембріональних стоволових клітин (ESC) (Ivanova et al., 2002, Science 298:601-604), а також нещодавно описаний набір генів ESC кора (Ben-Porath et al., 2008, Nature Genetics 40:499-507) і набір генів самооновлення ESC, знижуюча регуляція яких викликає диференціювання (Hu et al., 2009, Genes Dev. 23:837-48).

Таблиця 9

Назва	Розмір	FDR	Опис
NGUYEN KERATO UP NOTCH	27	0,0774	Гени спільно модульовані активованим Notch1 у первинних кератоцитах миші й людини
CELLCYCLEPATHWAY	22	0,0798	Цикліни взаємодіють з циклін-залежними кіназами з утворенням активних комплексів кінази, які регулюють прогресування thr
YU CMYC UP	28	0,0884	Мус-активовані гени
HSC STHSC FETAL	27	0,0885	Позитивно регульовані в миші короточасні функціональні гемопоетичні стоволові клітини з печінки(ST-HSC Shared)
HSC STHSC SHARED	27	0,0907	Позитивно регульовані в миші короточасні функціональні гемопоетичні стоволові клітини як з кісткового мозку дорослих, так і
WEINBERG ESC EXP2	30	0,1001	40 генів, специфічно надекспресовані в клітинах hES згідно з Meta-аналізом 8 профілюючих досліджень (Natu)
ESC SELF RENEWAL	30	0,1087	Гени, ідентифіковані скринінгом RNAi в об'ємі геному, знижуюча регуляція яких викликала диференціювання mESC
BRENTANI REPAIR	33	0,1122	Пов'язані з раком гени, що беруть участь у репарації ДНК

FDR<15 %

10 Приклад 23

Зменшення стрівальності (частоти) ракових стоволових клітин Notch2/3-антитілами

- З використанням експериментального дослідження, схожого з дослідженням, описаним у прикладі 8, здійснювали аналіз стрівальності (частоти) ракових стоволових клітин аналізом лімітуючих (граничних) розведень у клітинах раку молочної залози PE13. Тварин, що несуть пухлини молочної залози PE13, обробляли контрольним антитілом, комбінацією таксол плюс контрольне антитіло, 59R1, або комбінацією таксол плюс 59R1 протягом трьох тижнів. Пухлини збирали через три тижні й аналізували частоту CSC в оброблених пухлинах. Серійні титрування клітин людини з кожної з чотирьох груп обробки трансплантували в нову партію мишей (n=10 на дозу клітин). Швидкість росту пухлин через 75 днів зростання (фігура 19A) використовували для розрахунку частоти CSC з використанням програми L-calc program (Stem Cell Technologies, Inc.). Було визначено, що оброблені контрольним антитілом пухлини мають стрівальність (частоту) клітин, що ініціюють пухлину, до 1:74. Обробка одним таксолом збільшувала стрівальність CSC до 1:30. На противагу цьому, обробка 59R1 зменшувала стрівальність CSC до 1:179, а комбінація 59R1 плюс таксол до 1:319. Єдина зірочка вказує статистично значиму відмінність (p<0,05) проти обробленої контрольним антитілом групи і подвійна зірочка вказує значиму відмінність проти обробленої таксолом і контрольним антитілом групи. Цей експеримент показав, що обробка антитілом 59R1 пухлин молочної залози Pe13 зменшувала стрівальність CSC як єдиний агент і ефективніше в комбінації з обробкою таксолом. На відміну від цього, обробка лише таксолом, хоча й ефективна в зменшенні об'єму пухлини, збільшувала частоту CSC оброблених пухлин, показуючи, що клітини, які ініціюють пухлину, є переважно резистентними до дій цього хіміотерапевтичного агента.

Окрім дослідження дій 59R1 в пухлинах і дії на частоту CSC, досліджували зміни генів після обробки 59R1 в комбінації з таксолом. Цей експеримент виконували в пухлинах молочної залози PE13, в яких зменшення частоти CSC після обробки одним 59R1 або обробки 59R1 плюс

таксол спостерігалось раніше (й описано тут). Аналіз мікроматриць здійснювали на пухлинах з того самого експерименту, в якому здійснювали аналізи лімітуючих (граничних) розведень PE13 для визначення кількості CSC (фігура 19). Тварин, що несуть PE13, обробляли протягом трьох тижнів комбінацією 59R1 плюс таксол, контролем і таксолом перед збиранням для аналізу мікроматриць. Розраховували середні величини диференціальної експресії для оброблених таксолом порівняно з контролем і для оброблених комбінацією таксол плюс 59R1 порівняно з таксолом тварин (3 тварини на групу). Вражаючи, що в даних мікроматриць експресії генів було виявлено, що 59R1 у комбінації з таксолом діяв на апоптоз, гіпоксію, диференціювання й пов'язані зі ствольними клітинами гени в протилежно кратному напрямі, ніж зміни генів, спостережувані після одного таксолу (таблиця 10) відповідно до дій цих сполук на стрівальність CSC.

Таблиця 10

Таксол проти контролю 59R1 + Таксол проти Таксолу					
кратність	pval	кратність	pval	Символ	Назва
10.2	6.8E-03	-4.3	2.3E-01	BMPR1B	рецептор морфогенетичного білка кісток, тип IB, BCL2/аденовірус E1B-взаємодіючий білок 19 кДа,
-2.1	4.2E-05	1.8	6.9E-05	BNIP3	eglnine гомолог 3,
-21.1	1.0E-02	11.9	3.9E-04	EGLN3	білок теплового шоку, споріднений альфа-кристаліну, B6,
13.4	5.9E-05	-1.8	1.2E-01	HSPB6	інтегрин, альфа M,
2.2	1.5E-02	-2.5	1.9E-03	ITGAM	LIM гомеобокс 8,
4.6	3.6E-03	-4.4	5.2E-03	LHX8	N-мус регульований у пізній стадії ген 1,
-9.0	2.0E-06	6.4	1.8E-05	NDRG1	респондер 1 рецептора ретинової кислоти,
6.4	6.9E-06	-2.2	7.4E-03	RARRES1	респондер 3 рецептора ретинової кислоти,
2.6	3.5E-04	-1.7	1.1E-03	RARRES3	ретинолзв'язуючий білок 2, клітинний,
4.8	3.9E-05	-2.2	1.6E-02	RBP2	XIAP-асоційований фактор 1
10.6	1.3E-10	-1.5	5.9E-02	XAF1	

Пов'язані з апоптозом гени, регульовані в цьому наборі даних, включають BNIP3, NDRG1, HSPB6 і XAF1. BNIP3 (Bcl-2/E1B взаємодіючий білок 19 кДа) є проапоптотичним членом сімейства Bcl-2, який експресується в областях гіпоксії пухлин (Kothari et al., 2003, Oncogene 22:ATSA-AA). BNIP3 знижуючим чином регулюється одним таксолом і підвищуючим чином регулюється комбінованою терапією, що дозволяє передбачити, що 59R1 плюс таксол можуть стимулювати апоптоз. У згоді з цією ідеєю знаходиться спостереження, що HSPB6 негативно регулюється в оброблених таксолом пухлинах; надекспресія HSPB6 може захищати проти апоптозу в деяких біологічних системах (Fan et al., 2005, Trends Cardiovasc. Med. 15:138-41). NDRG1 (N-мус регульований у пізній стадії ген 1), який позитивно регулюється в комбінованій обробці, є необхідним для р53-залежного апоптозу (Stein et al., 2004, J. Biol. Chem. 279:48930-40). Цікаво, що NDRG1 є також можливим супресором метастазів колоректального раку. Його збільшена експресія асоціюється з покращуванням виживанням в разі раку передміхурової залози й раку молочної залози (Shah et al., 2005, Clin. Cancer Res. 11:3296-302). Крім того, NDRG1 бере участь у стимуляції диференціювання. Було показано, що NDRG1 у високій мірі експресується в добре диференційованих ракових клітинах підшлункової залози й не експресується в менш диференційованих пухлинних клітинах (Angst et al., 2006, Br. J. Cancer 95:307-13). Спостерігали також, що інші пов'язані зі ствольними клітинами гени, такі як BMPR1B і ген, що містить гомеобокс, LHX8, позитивно регулюються одними таксолом і потім негативно регулюються обробкою 59R1 в комбінації з таксолом.

Деякі гени, що беруть участь у метаболізмі ретиноїдів (RARRES1, RARRES3, RBP2), які схожі функціонально з гаданим маркером ствольних клітин, ALDH1a1, підвищуючим чином регулювалися таксолом і потім знижуючим чином регулювалися обробкою таксол плюс 59R1. Було показано, що передача сигналу ретинової кислоти була пов'язана з клітинним диференціюванням (Appel and Eisen, 2003, Neuron 40:461-4). Узяті разом, ці дані показують, що 59R1 має значимі дії на експресію генів у клітинах пухлини молочної залози PE13, і можуть бути початком з'ясування деяких з механізмів, які лежать в основі спостережуваного зменшення частоти ракових ствольних клітин у цій пухлині після обробки комбінованою терапією 59R1 й таксолу.

В іншому варіанті здійснення, використовували модель пухлини підшлункової залози PN4 для тестування стрівальності (частоти) ракових ствольних клітин після обробки 59R1. Пухлини підшлункової залози PN4 обробляли контрольним антитілом, анти-Notch2/3-антитілом 59R1, гемцитабіном або комбінацією 59R1 і гемцитабіну протягом періоду трьох тижнів. Антитіла

вводили в дозах 10 мг/кг, двічі на тиждень і гемцитабін вводили в дозах 50мг/кг, двічі на тиждень. Пухлини кожної групи збирали й обробляли для одержання суспензій окремих клітин. Пухлинні клітини в ксенотрансплантаті виділяли й підраховували. Титрування клітин (30, 90 або 210 клітин) повторно ін'єктували мишам NOD-SCID (n=10 на групу). Зростання пухлин аналізували на день 84 і частоту клітин, що ініціювали пухлину, розраховували зі швидкості пухлин, що утворюються. Було визначено, що контрольне антитіло має частоту клітин, що ініціюють пухлину, 1:137. Обробка одним гемцитабіном збільшувала частоту CSC до 1:61. На відміну від цього, обробка 59R1 зменшувала частоту CSC до 1:281 і комбінація 59R1 плюс гемцитабін зменшувала частоту CSC до 1:675 (фігура 19C). Одна зірочка вказує на статистично значиму відмінність ($p < 0,05$) проти обробленої контрольним антитілом групи, а подвійна зірочка вказує на значиму відмінність проти обробленої гемцитабіном і контрольним антитілом групи.

У іншому варіанті здійснення, модель пухлини молочної залози PE13 використовували для тестування на зменшення частоти ракових стоволових клітин після обробки 59R5. Пухлини молочної залози PE13 обробляли контрольним антитілом, анти-Notch2/3-антитілом, таксолем або комбінацією 59R5 і таксолу протягом періоду трьох тижнів. Антитіла вводили в дозі 20 мг/кг, один раз на тиждень і таксол вводили в дозі 15мг/кг, двічі на тиждень. Пухлини з кожної групи збирали й обробляли для одержання суспензій окремих клітин. Пухлинні клітини в ксенотрансплантаті виділяли й підраховували. Титрування клітин (50, 150 або 450 клітин) повторно ін'єктували мишам NOD-SCID (n=10 на групу). Зростання пухлин аналізували на день 39 і частоту клітин, що ініціювали пухлину, розраховували із швидкості пухлин, що утворюються. Було визначено, що контрольне антитіло має частоту клітин, що ініціюють пухлину, 1:70. Обробка одним таксолем збільшувала частоту CSC до 1:30. На відміну від цього, обробка 59R1 зменшувала частоту CSC до 1:202 і комбінація 59R1 плюс таксол зменшувала частоту CSC до 1:382 (фігура 19D). Одна зірочка вказує на статистично значиму відмінність ($p < 0,05$) проти обробленої контрольним антитілом групи, а подвійна зірочка вказує на значиму відмінність проти обробленої таксолем і контрольним антитілом групи.

Як спостерігали в інших варіантах здійснення, ці результати показали, що обробка 59R1 пухлин підшлункової залози PN4 і обробка 59R5 пухлин молочної залози PE13 зменшувала частоту CSC як єдиний агент і більш разюче в комбінації з обробкою гемцитабіном або таксолем, відповідно. На противагу цьому, обробка одним таксолем або одним гемцитабіном, хоча й ефективна у зменшенні об'єму пухлини, збільшувала частоту CSC оброблених пухлин, що вказувало на те, що клітини, що ініціюють пухлину, є переважно резистентними до дій цих хіміотерапевтичних агентів.

Всі публікації й патенти, що згадуються в наведеному вище описі, включені в даний опис як посилання. Різні модифікації й варіації описаного способу й системи цього винаходу будуть очевидними для кваліфікованих у даній галузі фахівців без відхилення від та ідеї цього винаходу. Хоча цей винахід був описаний у зв'язку з конкретними варіантами здійснення, має бути зрозуміло, що заявлений винахід не має надмірно обмежуватися такими конкретними варіантами. Дійсно, передбачається, що різні модифікації бажаних способів здійснення цього винаходу, які є очевидними фахівцям у релевантних галузях, знаходяться в рамках поданої нижче формули винаходу.

ПОСЛІДОВНОСТІ

Послідовності анти-Notch2/3-антитіла людини

SEQ ID NO:1: Нуклеотидна послідовність, що кодує важкий ланцюг IgG2 анти-Notch2/3 59R1, плюс сигнальна послідовність. Послідовність, що кодує сигнальну послідовність, підкреслена.

ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTCTGTCCCAG
GTGCAATTGGTGGAAGCGGCGGCGGCTGGTGCAACCGGGCGGCAGCCTGCGTCTGAGC
 TGCGCGGCCTCCGGATTTACCTTTTCTTCTTCTGGTATGTCTTGGGTGCGCCAAGCCCCCT
 GGGAAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGTTATCGCTTCTTCTGGTAGCAATACCTATTATGCG
 GATAGCGTGAAAGGCCGTTTTACCATTTTACGTGATAATTCGAAAAACACCCTGTATCTG
 CAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTGGTATTTTT
 TTTGCTATTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCAGCCAGCACAAAGGGCCCT
 AGCGTCTTCCCTCTGGCTCCCTGCAGCAGGAGCACCAGCAGAGCACAGCCGCCCTGGGC
 TGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCTCTG
 ACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGC
 AGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGAT
 CACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTCTGAGTGC
 CCACCGTGGCCAGCACCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCC
 AAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGC

CACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC
 AAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAGCGTCCTCACC
 GTTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGGC
 CTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAG
 5 GTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACAGCTGACCTGC
 CTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCG
 GAGAACAACCTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTAC
 AGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTG
 ATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
 10 TGA

SEQ ID NO:16: Передбачена послідовність білка важкого ланцюга IgG2 анти-Notch2/3 59R1, плюс сигнальна послідовність. Сигнальна послідовність підкреслена.

MKHLWFFLLLVAAAPRWVLSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPG
 KGLEWVSVIASSGSNTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGIFFAIWG
 15 QGTLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
 AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVKCCVECPPCPAPPVAG
 PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF
 RVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV
 SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC
 20 SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:3: Нуклеотидна послідовність, що кодує легкий ланцюг анти-Notch2/3 59R1, плюс сигнальна послідовність. Послідовність, що кодує сигнальну послідовність, підкреслена.

ATGGTGTTGCAGACCCAGGTCTTCATTTCTCTGTTGCTCTGGATCTCTGGTGCCTACGGG
 GATATCGTGCTGACCCAGAGCCCGGCGACCCCTGAGCCTGTCTCCGGGCGAACGTGCGACC
 25 CTGAGCTGCAGAGCGAGCCAGTCTGTTCTTAATTATCTGGCTTGGTACCAGCAGAAA
 CCAGGTCAAGCACCGCGTCTATTAATTTATGGTGCTTCTTCTCGTGCAACTGGGGTCCCG
 GCGCGTTTTAGCGGCTCTGGATCCGGCACGGATTTTACCCTGACCATTAGCAGCCTGGAA
 CCTGAAGACTTTGCGGTTTATTATTGCCAGCAGTATTCTAATTTTCTATTACCTTTGGC
 CAGGGTACGAAAGTTGAAATTAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCG
 30 CCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTC
 TATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC
 CAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTG
 ACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAG
 GGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

SEQ ID NO:18: Передбачена послідовність білка легкого ланцюга анти-Notch2/3 59R1, плюс сигнальна послідовність. Сигнальна послідовність підкреслена.

MVLQTQVFISLLWISGAYGDIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSNYLAWYQQKPGQA
 PRLLIYGASSRATGVPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQYSNFPITFGQGTKVEIKR
 40 TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASWCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
 TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:5: CDR1 важкого ланцюга 59R1

SSSGMS

SEQ ID NO:6: CDR2 важкого ланцюга 59R1

VIASSGSNTYYADSVKG

SEQ ID NO:7: CDR3 важкого ланцюга 59R1

GIFFAI

SEQ ID NO:8: CDR1 легкого ланцюга 59R1

RASQSVRSNYLA

SEQ E) NO:9: CDR2 легкого ланцюга 59R1

GASSRAT

SEQ ID NO:10: CDR3 легкого ланцюга 59R1

QQYSNFP

SEQ ID NO:11: Легкий ланцюг VL 59R1 Fab 59R1 плюс сигнальна послідовність. Сигнальна послідовність підкреслена.

MKKTAAIAVALAGFATVAQADIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSNYLAWYQQKPGQ
 APRLLIYGASSRATGVPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQYSNFPITFGQGTKVEIKR

SEQ ID NO:12: Важкий ланцюг VH 59R1 Fab 59R1 плюс сигнальна послідовність. Сигнальна послідовність підкреслена.

MKQSTIALALLPLLFTPVTKAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPG
 60 KGLEWVSVIASSGSNTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGIFFAI

WGQGTTLVTVSSA

SEQ ID NO:13: Легкий ланцюг VL 59R1 IgG-антитіла 59R1

DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSNYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGVPARFS
GSGSGTDFLTISLSEPEDFAVYYCQQYSNFPITFGQGTKVEIKR

5 SEQ ID NO:14: Важкий ланцюг 59R1 IgG-антитіла 59R1

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYYAD
SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGIFFAIWGQGTTLVTVSSA

SEQ ID NO:39: Легкий ланцюг VL 59R1 плюс сигнальна послідовність ссавця (підкреслена).

10 MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSNYLAWYQQKPGQ
APRLLIYGASSRATGVPARFSGSGSGTDFLTISLSEPEDFAVYYCQQYSNFPITFGQGTKVEIKR

SEQ ID NO:40: Важкий ланцюг VH 59R1 плюс сигнальна послідовність ссавця (підкреслена)

10 MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAP
GKGLEWVSVIASSGSNTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGIFFAIWGQG
TLVTVSSA

15 SEQ ID NO:15: Нуклеотидна послідовність, що кодує важкий ланцюг анти-Notch2/3-IgG2-
антитіла 59R1 (варіанту зародкової лінії 59R1), плюс сигнальна послідовність. Послідовність, що
кодує сигнальну послідовність, підкреслена.

ATGAAGCACCTGTGGTCTTTCTGCTGCTGGTCGCCGCTCCTAGATGGGTGCTGTCCGAG
GTGCAGCTGGTCGAGTCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCTCCCTGAGACTGTCC
20 TCGCTGCCTCCGGCTTACCTTCTCCTCCTCCGGCATGTCCTGGGTGCGCCAGGCTCCC
GGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGTCCGTGATCGCCTCCAGCGGCTCCAACACCTACTACGCC
GACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGGACAACCTCCAAGAACACCCTGTACCTG
CAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGGCATCTTC
TTCGCCATCTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGTCTCCTCCGCCTCCACCAAGGGCCCT
25 TCCGTGTTCCCTCTGGCCCCCTTGCTCCCGGTCCACCTCCGAGTCCACCGCCGCTCTGGGC
TGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACAGTGTCTGGAACCTCTGGCGCCCTG
ACCTCCGGCGTGACACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCC
TCCGTGGTGACAGTGCCTTCCCTCCAACCTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTGGAC
CACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGACCGTGGAGCGGAAGTGTCTGCGTGGAGTGC
30 CCTCCTTGCCCTGCCCTCCTGTGGCTGGCCCTAGCGTGTTCCCTGTTCCCTCCTAAGCCT
AAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCC
CACGAGGACCCTGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCC
AAGACCAAGCCTCGGGAGGAACAGTTCAACTCCACCTTCCGGGTGGTGTCCGTGCTGACC
GTGGTGCACCCGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGCAAAGTCTCCAACAAGGGC
35 CTGCCTGCCCCATCGAGAAAACCATCAGCAAGACCAAGGGCCAGCCTCGCGAGCCTCAG
GTGTACACCCTGCCTCCATCCAGGGAGGAAATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGT
CTGGTGAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGTCCAACGGCCAGCCT
GAGAACAACCTACAAGACCACCCCTCCTATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTGTAC
TCCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTG
40 ATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGAGCCCTGGCAAG
TAG

SEQ ID NO:2: Передбачена послідовність білка важкого ланцюга анти-Notch2/3 59RGV
(варіанту зародкової лінії 59R1) плюс сигнальна послідовність. Ця сигнальна послідовність
підкреслена.

45 MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGK
GLEWVSVIASSGSNTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGIFFAIWGQG
TLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECPPCPAPPVAGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRWSV
50 LTWHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGK

55 SEQ ID NO:17: Нуклеотидна послідовність анти-Notch2/3-антитіла 59RGV (варіанту
зародкової лінії 59R1), плюс сигнальна послідовність. Послідовність, що кодує сигнальну
послідовність, підкреслена.

ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGCCTACGGC
GAGATCGTGCTGACCCAGTCCCCTGCCACACTGAGCCTGAGCCCTGGCGAGAGAGCCACC
CTGAGCTGCAGGCGGGCCTCCAGTCCGTGCGGTCCAACCTACCTGGCTTGGTATCAGCAG
AAACCCGGACAGGCCCTCGGCTGCTGATCTACGGCGCCTCCTCCGGGTACCGGCATC
60 CCTGCCCGGTTCTCCGGCTCCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCTCCTCCCTG

GAGCCTGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTACTCCAACCTCCCTATCACCTTC
 GGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAGCGGACCGTGGCCGCTCCTTCCGTGTTTCATCTTC
 CCCCCTTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTGCCTGCTGAACAAC
 TTCTACCCTCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAAC
 5 TCCAGGAATCCGTACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCTCCACC
 CTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCAC
 CAGGGCCTGTCCAGCCCTGTGACCAAGTCCTTCAACCGGGGCGAGTGCTAG

SEQ ID NO:4: Передбачена послідовність білка легкого ланцюга анти-Notch2/3-антитіла
 59R1 (варіанту зародкової лінії 59R1) плюс сигнальна послідовність. Сигнальна послідовність

10 підкреслена.
MVLQTQVFISLLWISGAYGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRRASQSVRSNYLAWYQQKPGQ
 APRLLIYGASSRATGIPARFSGSGSDFTLTISLEPEDFAVYYCQQYSNFPITFGQGTKVEIKRT
 VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASWCLLN
 NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG
 15 LSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:19: 59R1 Легкий ланцюг VL 59R1 антитіло 59RGV (варіанту зародкової лінії
 59R1)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRRASQSVRSNYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPARF
 SGSGSGDFTLTISLEPEDFAVYYCQQYSNFPITFGQGTKVEIKR

20 SEQ ID NO:20: Важкий ланцюг VH 59R1 антитіло 59R1 (варіанту зародкової лінії 59R1)
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYYADS
 VKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGIFFAIWGQGLTVTVSSA

SEQ ID NO:22: (альтернативний CDR3 важкого ланцюга)
 SIFYPT

25 SEQ ID NO:23: (альтернативний CDR3 важкого ланцюга)
 SSFFAS

SEQ ID NO:24: (альтернативний CDR3 важкого ланцюга)
 SSFYAS

SEQ ID NO:25: (альтернативний CDR3 важкого ланцюга)
 30 SSFFAT

SEQ ID NO:26: (альтернативний CDR3 важкого ланцюга)
 SIFYPS

SEQ ID NO:27: (альтернативний CDR3 важкого ланцюга)
 SSFFAN

35 SEQ ID NO:30: (консенсусна послідовність CDR3 важкого ланцюга): (G/S) (I/S) F (F/Y) (A/P)
 (I/T/S/N)

SEQ ID NO:47: Нуклеотидна послідовність легкого ланцюга 59R5 (без сигнальної
 послідовності)

40 GACATCGTGTGACCCAGTCCCCCGCCACACTGTCCCTGTCTCCCGGCGAGAGAGCCACC
 CTGAGCTGTGCGGCCTCCAGTCCGTGCGGTCCAACCTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAG
 CCCGGCCAGGCCCTCGGCTGCTGATCTACGGCGCCTCCTCCAGGGCTACCGGCGTGCCT
 GCCCGGTTCTCCGGCTCCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACCATCTCCAGCCTGGAG
 CCTGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTACTCCAACCTCCCTATCACCTTCGGC
 CAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAGCGGACCGTGGCCGCTCCTTCCGTGTTTCATCTTCCCC
 45 CTTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACCTTC
 TACCCTCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCC
 CAGGAGTCCGTACCGAGCAGGACTCCAAGGACTCTACCTACTCCCTGTCTCTCCACCCTG
 ACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAG
 GGCCTGTCTCTCCCGTGACCAAGTCCTTCAACCGGGGCGAGTGC

50 SEQ ID NO:48: Нуклеотидна послідовність важкого ланцюга 59R5 (без сигнальної
 послідовності)

GAGGTGCAGCTGGTTCGAGTCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCTCCCTGAGACTG
 TCCTGCGCCGCTTCCGGCTTCACCTTCTCCTCCAGCGGCATGTCTGGGTGCGCCAGGCA
 CCTGGCAAAGGACTCGAGTGGGTGTCCGTGATCGCCTCCTCCGGCTCCAACACCTACTAC
 55 GCCGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGGACAACCTCCAAGAACACCCTGTAC
 CTGCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCCGGTCCATC
 TTCTACACCACCTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGTCTCCGCCTCCACCAAGGGC
 CCCTCCGTGTTCCCTCTGGCCCCCTTGCTCCCGGTCCACCTCTGAGTCTACCGCCGCTCTG
 GGCTCCCTGGTGAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTGTCTCTGGAACCTCTGGCCG
 60 CTGACCTCTGGCGTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCTCTCCGGCCTGTACTCCCTG

TCCTCCGTGGTGACCGTGCCTTCCTCCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTG
 GACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGACCGTGGAGCGGAAGTGCTGCGTGGAG
 TGCCCTCCTTGCTCCTGCTCCTGTGGCTGGCCCTTCTGTGTTCCCTCCTAAG
 CCTAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGACGTG
 5 TCCCACGAGGACCCTGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAAC
 GCCAAGACCAAGCCTCGGGAGGAACAGTTCAACTCCACCTTCCGGGTGGTGTCTGTGCTG
 ACCGTGGTGCACCAGGACTGGCTGAACG^CAAAGAATACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAG
 GGCCTGCCTGCCCTATCGAAAAGACCATCTCTAAGACCAAGGGCCAGCCTCGCGAGCCT
 CAGGTCTACACCCTGCCTCCTAGCCGGGAGGAAATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACC
 10 TGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGTCTAACGGCCAG
 CCTGAGAACAACCTACAAGACCACCCCTCCTATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTG
 TACTCCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCC
 GTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGTCTCCTGGC
 AAG

15 SEQ ID NO:49: Важкий ланцюг 59R5
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYYADS
 VKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSIFYTTWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPC
 SRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQ
 TYTCNVDPKPSNTKVDKTVKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWD
 20 VSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRWSVLTWHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP
 APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
 PPMLDSGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ YD NO:50: Варіабельну область важкого ланцюга 59R5
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYY
 25 ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSIFYTTWGQGLTVTVSSAST

SEQ ID NO:51: CDR3 тяч 59R5
 SIFYTT

SEQ ID NO:52: Варіабельну область важкого ланцюга варіанту 59R1
 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYYADS
 30 VKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSIFYPTWGQGLTVTVSSA

SEQ ID NO:53: Варіабельну область важкого ланцюга варіанту 59R1
 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYYAD
 SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSSFFASWGQGLTVTVSSA

SEQ ID NO:54: Варіабельну область важкого ланцюга варіанту 59R1
 35 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYYADS
 VKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSSFFYASWGQGLTVTVSSA

SEQ ID NO:55: Варіабельну область важкого ланцюга варіанту 59R1
 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYYADSV
 40 KGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSSFFATWGQGLTVTVSSA

SEQ ID NO:56: Варіабельну область важкого ланцюга варіанту 59R1
 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYYADSV
 KGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSIFYPSWGQGLTVTVSSA

SEQ ID NO:57: Варіабельну область важкого ланцюга варіанту 59R1
 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYYADS
 45 VKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSSFFANWGQGLTVTVSSA

SEQ ID NO:58: Нуклеотидна послідовність варіабельної області важкого ланцюга 59R5 (без
 сигнальної послідовності)
 GAGGTGCAGCTGGTTCGAGTCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCTCCCTGAGACTG
 TCCTGCGCCGCTTCCGGCTTCACTTCTCCTCCAGCGGCATGTCCTGGGTGCGCCAGGCA
 50 CCTGGCAAAGGACTCGAGTGGGTGTCCGTGATCGCCTCCTCCGGCTCCAACACCTACTAC
 GCCGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGGACAACCTCAAGAACACCCTGTAC
 CTGCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCCGGTCCATC
 TTCTACACCACCTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGTCTCCGCTCCACC

SEQ ID NO:59: Нуклеотидна послідовність варіабельної області легкого ланцюга 59R1 (без
 сигнальної послідовності)
 GATATCGTGCTGACCCAGAGCCCGGCGACCCCTGAGCCTGTCTCCGGGCGAACGTGCGACC
 CTGAGCTGCAGAGCGAGCCAGTCTGTTCTAATTATCTGGCTTGGTACCAGCAGAAA
 CCAGGTCAAGCACCGCTCTATTAATTTATGGTGCTTCTCTCGTGCAACTGGGCTCCCG
 GCGCGTTTTAGCGGCTCTGGATCCGGCACGGATTTTACCCTGACCATTAGCAGCTTGGAA
 60 CCTGAAGACTTTGCGGTTTATTATTGCCAGCAGTATTCTAATTTTCTATTACCTTTGGC

CAGGGTACGAAAGTTGAAATTAACGT

SEQ ID NO:60: Нуклеотидна послідовність варіабельної області важкого ланцюга 59R1 (без сигнальної послідовності)

CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCCTGGTGAACCGGGCGGCAGCCTGCGTCTGAG
CTGCGCGGCCTCCGGATTTACCTTTTCTTCTTCTGGTATGTCTTGGGTGCGCCAAGCCCCTGGG
A

AGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGTTATCGCTTCTTCTGGTAGCAATACCTATTATGCGGATAGCGT
G

AAAGGCCGTTTTACCATTTACGTGATAATTCGAAAAACACCCTGTATCTGCAAATGAACAGCCT
GCGTGCGGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTGGTATTTTTTTTGCTATTTGGGGCCAAG
GCACCCTGGTGACGGTTAGCTCAGCC

Послідовності, пов'язані з Notch людини:

SEQ ID NO:21: Амінокислотна послідовність Fc-злитого білка Notch2(EGF1-12) Fc

MPALRPALLWALLALWLCCAAPAHALQCRDGYEPCVNEGMCVTYHNGTGYCKCPEGFLGEYCC
HRDPCEKNRCQNGGTCVAQAMLGKATCRCASGFTGEDCQYSTSHPCFVSRPCLNGGTCHMLSR
DTYECTCQVGFTGKECQWTDACLSHPCANGSTCTTVANQFSCCKLTGFTGQKCETDVNECDIPGH
CQHGGTCLNLPGSYQCQCPQGFTGQYCDLSLVPCAPSPCVNGGTCRQTGDTFECNCLPGFECS
TCERNIDDCPNHRCQNGGVCVDGVNTYNCRCPPQWTGQFCTEDVDECLLPNACQNGGTCA NR
NGGYGCVCVNGWSGDDCSENIDDCAFASCTPGSTCIDRVASFSCMCPEGKAGLLCHLDDACISNP
CHKGALCDTNPLNGQYICTCPQGYKGADCTEDVDECAMANSNPCEHAGKCVNTDGAHFCECLKG
YAGPRCEMDINECHSDPCQNDATCLDKIGGFTCLCMPGFKGVHCELGRADKTHTCPPCPAPELLG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRW
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNH
YTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:28: (потенційний компонент 59R1-зв'язуючого сайту в EGF10 Notch2 людини): HKGAL

SEQ ID NO:29 (сайт в EGF9 Notch3 людини, який відповідає потенційному компоненту 59R1-зв'язуючого сайту в EGF10 Notch2 людини): HEDAI

SEQ ID NO:45: hNotch1

Амінокислоти 1-1732 Позаклітинний домен (підкреслений)

Амінокислоти 372-414 Повтор 10 EGF (двічі підкреслені або подані курсивом)

MPPLAPLLCLALLPALAARGPRCSQPGETCLNGGKCEAANGTEACVCGGAFVGPQCQDPNPCL
STPCKNAGTCHVVDRRGVADYACSCALGFSGLCLTPLDNACLTNPCRNGGTCDLLTLTEYKCR
CPPGWSGKSCQQADPCASNPCANGGQCLPFEASYICHCPPSFHGPTCRQDVNECGQKPLGRH
GGTCHNEGVSYRCVCRATHTGPNCERPYVPCSPSPCQNGGTCRPTGDVTHEACLPGFTGQNC
EENIDDCPGNNCKNGGACVDGVNTYNCRCPPPEWTGQYCTEDVDECQLMPNACQNGGTCCHNTH
GGYNCVCVNGWTGEDCSENIDDCASAACFHGATCHDRVASFYCECPHGRTGLLCHLNDACISNP
CNEGSNCDTNPVNGKAICTCPSGYTGPAQSQDVDECSLGANPCEHAGKCINTLGSFECQCLQGYT
GPRCEIDVNECVSNPCQNDATCLDQIGEFQCICMPGYEGVHCEVNTDECASSPCLHNGRCLDKIN
EFQCECPTGFTGHLQCYDVDECASTPCKNGAKCLDGPNTYTCVCTEGYTGTHCEVDIDECDPDPC
HYGSKDGVATFTCLCRPGYTGHHCETNINECSSQPCRHHGGTCQDRDNAYLCFLKGTGPNCEI
NLDDCASSPCDSGTCLDKIDGYECACEPGYTGSMCNINIDECAGNPCHNGGTCEDGINGFTCRCP
EGYHDPTCLSEVNECNSNPCVHGACRDSLNGYKCDGDPGWSGTNCDINNECESNPCVNGGTC
KDMTSGYVCTCREGFSGPNCQTNINECASNPCLNQGTICIDVAGYKCNCLLPYTGATCEVVLAPCA
PSPCRNGGECRQSEDIYESFCVCPTGWQGGTCEVDINECVLSPCRHHGASCQNTHHGGYRCHCQA
GYSGRNCETDIDDCRPNPCHNGGSGTDGINTAFCDCLPGFRGTFCCEEDINECASDPCRNGANCTDC
VDSYTCTCPAGFSGIHCENNTPDCTESSCFNGGTCVDGINSFTCLCPPGFTGSYCQHDVNECDSQP
CLHGGTCQDGCYSYRCTCPQGYTGPNQCQLVHWCDSSPCKNGGKCWQTHQYRCECPSGWTGL
YCDVPSVSCEVAAQRQGVVARLCQHGGCLVDAGNTHHCRCQAGYTGSYCEDLVDECSPSPCQ
NGATCTDYLGGYSCKCVAGYHGVCNSEEIDECLSHPCQNGGTCLDLPNTYKCSQPRGTQGVHCEI
NVDDCNPPVDPVSRSPKCFNNGTCVDQVGGYSCTCPPGFVGERCEGDVNECLSNPCDARGTQN
CVQRVNDFHCECRAGHTGRRCESVINGCKGKPKCKNGGTCAVASNTARGFICKCPAGFEGATCEN
DARTCGSLRCLNGGTCISGPRSPCLCLGPFTGPECQFPASSPCLGGNPCYNQGTCEPTSESPFY
RCLCPAKFNGLLCHILDYSFGGGAGRDIPPLIEEACELPECQEDAGNKVCSLQCNNHACGWDGG
DCSLNFNDPWKNCTQSLQCWKYFSDGHCDSDQNSAGCLFDGFDQRAEGQCNPLYDQYCKDH
FSDGHCDQGCNSAECEWDGLDCAEHVPERLAAGTLVVVVLMPPEQLRNSSFHFLRELSRVLHTN
VVFKRDAHGGQMIFFYYGREEELRKHPIKRAAEGWAAPDALLGQVKASLLPGGSEGRRRRRELD
MDVRGSIIVYLEIDNRQCVQASSQCFQSATDVA AFLGALASLSLNIPYKIEAVQSETVEPPPPAQLH
FMYVAAAAFVLLFFVCGVLLSRKRRRRQHGLWFPEGFVSEASKKKRRREPLGEDSVGLKPLKNA

SDGALMDDNQNEWGDEDLETKKFRFEPEVVLPLDDQTDHRQWTQQHLDAADLRMSAMAPTPPQ
 GEVDADCMDVNVVRGPDGFTPLMIASCSGGLETGNSEEEEDAPAVISDFIYQGASLHNQTDRTGET
 ALHLAARYSRSDAAKRLLASADANIQDNMGRTPPLHAAVSADAQGVFQILIRNRATDLDARMHDGT
 TPLILAAARLAVEGMLDLINSHADVNAVDDLKGSALHWAANAANNVDAAVVLLKNGANKDMQNNREE
 5 TPLFLAAREGSYETAKVLLDHFANRDITDHMDRLPRDIAQERMHHDIVRLLDEYNLVRSPQLHGAPL
 GGTPTLSPPLCSPNGYLGLSKPGVQGGKVRKPSSKGLACGSKEAKDLKARRKKSQDGKGCLLDSS
 GMLSPVDSLESPHGYLSDVASPPLLPSPFQQSPSVPLNHLPGMPDTHLGIGHLNVAAPPEMAALGG
 GGRLAFETGPPRLSHLPVAGSTSTVLGSSSGGALNFTVGGSTSLNGQCEWLSRLQSGMVPNQYNPL
 RGSVAPGPLSTQAPSLQHGMVGPLHSSLAASALSQMMSYQGLPSTRLATQPHLVQTQQVQPQNLQ
 10 MQQQNLQPANIQQQQSLQPPPPPPQPHLGVSAAASGHLGRSFLSGEPSQADVQPLGPSSSLAVHTIL
 PQESPALPTSLPSSLVPPVTAAQFLTTPPSQHSYSSPVDNTPSHQLQVPEHPFLTSPESPQDQWSSSS
 PHSNVSDWSEGVSSPPTSMQSQIARIEAFK

SEQ ID NO:31: Notch2 людини

Амінокислоти 1-1677 Позаклітинний домен (підкреслений)

Амінокислоти 375-417 Повтор 10 EGF (двічі підкреслені або подані курсивом)

15 MPALRPALLWALLALWLCCAAPAHALQCRDGYEPCVNEGMCVTYHNGTGYCKCPEGFLGEYCQH
RDPCEKNRCQNGGTCVAQAMLGKATCRCASGFTGEDCQYSTSHPCFVSRPCLNGGTCHMLSRDT
YECTCQVGFTGKECQWTDACLSHPCANGSTCTTVANQFSCKCLTGFTGQKCETDVNECDIPGHCC
HGGTCLNLPGSYQCQCPQGFTGQYCDLSYVPCAPSPCVNGGTCRQTGDTFECNCLPGFEGSTCE
 20 RNIDDCPNHRCQNGGVCVDGVNTYNCRCPPQWTGQFCTEDVDECLLQPNACQNGGTANRNGG
YGCVCVNGWSGDDCSENIDDAFASCTPGSTCIDRVASFSCMCPEGKAGLLCHLDDACISNPCHK
GALCDTNPLNGQYICTCPQGYKGADCTEDVDECAMANSNPCEHAGKCVNTDGAHFCECLKGYAGP
RCEMDINECHSDPCQNDATCLDKIGGFTCLCMPGFKGVHCELEINECQSNPCVNNGQCVDKVNRF
QCLCPPGFTGPVCQIDIDDCSSTPCLNGAKCIDHPNGYECQCATGFTGVLCEENIDNCDPDPCHHG
 25 QCQDGIDSYTCICNPGYMGAIQSDQIDECYSSPCLNDGRCIDLNGYQCNCQPGTSGVNCEINFDDC
ASNPCIHGICMDGINRYSCVCSPGFTGQRCNIDIDECASNPCRKGATCINGVNGFRICPEGPHPS
CYSQVNECLSNPCIHGNCTGGLSGYKCLCDAGWVGINCEVDKNECLSNPCQNGGTCDNLVNGYR
CTCKKGFKGYNCQVNIDECASNPCNLNGTCFDDISGYTCHCVLPYTGNKQTVLAPCSPNPCENAA
VCKESPNFESYTCLCAPGWQGGQRCTIDIDECISKPCMNHGLCHNTQGSYMCECPPGFGSGMDCEED
 30 IDDCLANPCQNGGSCMDGVNTFSCLCPLGFTGDKCQTDMECLSEPCKNGGTCSQDYVNSYTCKCQ
AGFDGVHCENNINECTESSCFNGGTCVDGINSFSCLCPLVGTGVSFCLHEINECSSHPCLNEGTCVDG
LGTYRCSPLGYTGKNCQTLVNLCSRSPCKNKGTCVQKKAESQCLCPSGWAGAYCDVNVSCDI
AASRRGVLVEHLCQHSGVCINAGNTHYCCPLGYTGSYCEEQLDECASNPCQHGATCSDFIGGYR
CECVPGYQGVNCEYEVDECQNQCQNGGTCIDLNVHFKCSCPPGTRGLLCEENIDDCARGPHCLN
 35 GGQCMDRIGGYSCRCLPGFAGERCEGDINECLSNPCSSSEGLDCIQLTNDYLCVCRSAFTGRHCET
FVDVCPQMPCLNGGTCAVASNMPDGFICRCPPGFSGARCSQSSCGQVKCRKGEQCVHTASGPRCF
CPSPRDCESGSCASSPCQHGGSCHPQRQPPYYSCQCAPPFSGSRCELYTAPPSTPPATCLSQYCA
DKARDGVCDEACNSHACQWDGGDCSLTMENPWANCSSPLPCWDYINNQCDELNTVECLFDNF
ECQGNSTCKYDKYCADHFKDNHCDQGCNSEECGWGLDCAADQPENLAEGTLVIVVLMPPPEQ
 40 LLQDARSFLRALGTLHTNLRIKRDSSQELMVYPYGEKSAAMKKQRMTRRSLPGEQEVEVAGSK
VFLEIDNRQCVQSDHCFKNTDAAAALLASHAIQGTLSYPLVSVVSESLTPERTQLLYLLAVAVVILF
IILLGVIMAKRKRKHGSLWLPPEGFTLRRDASNHKRREPVGQDAVGLKNLSVQVSEANLIGTGTSEHW
VDDEGPQPKVKAEDEALLSEDDPIDRRPWTQQHLEAADIRRTPSLALTPPQAEQEVLDVNVNR
 45 PGDGCTPLMLASLRGGSSDLSEDEDAEDSSANIITDLVYQGASLQAQTDRTGEMALHLAARYSRA
DAAKRLLDAGADANAQDNMGRCPPLHAAVAADAQGVFQILIRNRVTDLDARMNDGTTPLILAAARLAV
EGMVAELINCQADVNAVDDHGKSALHWAANAANNVATLLLLKNGANRDMQDNKEETPLFLAAREG
SYEAAKILLDHFANRDITDHMDRLPRDVARDRMHHDIVRLLDEYNVTPSPPGTVLTSALSPVICGP
NRSFLSLKHTPMGKKSRRPSAKSTMPTSLPNLAKEAKDAKGSRRKSLSEKVQLSESSVTLSFV
 50 SVSQLLSHHHIVSPGSGSAGSLSRHLHPVPVPADWMNRMEVNETQYNEMFGMVLAPAEGTHPGIAP
QSRPPEGKHITTPREPLPIVTFQLIPKGSIAQAPAGAPQPQSTCPPAVAGPLPTMYQIPEMARLPSVAF
PTAMMPQQDQQAQTLPAYHPFASVGKYPTPPSQHSYASSNAARTPSHSGHLQGEHPYLTSPSP
ESPDQWSSSSPHSASDWSDVTTSTPTGGAGGGQGRGPGTHMSEPPHNNMQVYA

SEQ ID NO:32: Notch3 людини

Амінокислоти 1-1640 Позаклітинний домен (підкреслений)

Амінокислоти 351-393 Повтор 9 EGF (двічі підкреслені або подані курсивом)

55 MGPGARGRRRRRRPMSPPPPPPPVRALPLLLLAGPGAAAPPCLDGSPCANGGRCTQLPSREA
ACLCPPGWVGERCQLEDPCHSGPCAGRGVCQSSVAGTARFSCRCPRGFRGPDCSLPDPCLS
SPCAHGARC SVGPDRFLCSCPPGYQGRSCRSDVDECRVGEPCRHHGGTCLNTPGSFRCQCPA
 60 GYTGPLCENPAVPCAPSPCRNGGTCRQSGDLTYDCACLPGFEGQNCENVDDCPGHRCLNGG

TCVDGVNTYNCQCPPEWTGQFCTEDVDECQLQPNACHNGGTCFNTLGGHSCVCVNGWTGES
 SQNIDDCATAVCFHGATCHDRVASFYCACPMGKTGLLCHLDDACVSNPCHEDAICDTNPVNGRA
 ICTCPPGFTGGACDQDVDECSIGANPCEHLGRCVNTQGSFLCQCGRGYTGPRCETDVNECLSGP
 CRNQATCLDRIGQFTCICMAGFTGTYCEVDIDECQSSPCVNGGVCKDRVNGFSCTCPSGFSGSTC
 5 QLDVDECASTPCRNGAKCVDQPDGYECRAEGFEGTLCDRNVDCCSPDPCHHGRCVDGIAFS
 CACAPGYTGTRCESQVDECRSQPCRHHGKCLDLVDKYLRCRPSGTTGVNCEVNIDDCASNPCTF
 GVCRDGINRYDCVCQPGFTGPLCNVEINECASSPCGEGGSCVDGENGFRLCPPGSLPLCLPP
 SHPCAHEPCSHGICYDAPGGFRCVCEPGWWSGPRCSQSLARDACESQPCRAGGTCCSSDGMGFH
 CTCPPGVQGRQCELLSPCTPNPCEHGGRCESAPGQLPVCSCPQGWQGPCQQQDVDEACAGPAP
 10 CGPHGICTNLAGSFCTCHGGYTGPSCDQDINDCDPNPCLNGGSCQDGVGSFSCSCLPGFAGPR
 CARDVDECLSNPCGPGTCTDHVASFTCTCPPGYGGFHCEQDLPCSPSSCFNGGTCTVDGVNSFS
 CLCRPGYTGAHCQHEADPCLSRPCLHGGVCSAAHPGFRCTCLESFTGPQCQTLVDWCSRQPCQN
 GGRCVQTGAYCLCPPGWSGRLCDIRSLPCREAAQIGVRLEQLCQAGGQCVDESSHYCVCPEG
 TGSHEQEVDPLCAQPCQHGGTCRGYMGGYMCECLPGYNGDNCEDDVDECADSPCQHGGSCID
 15 LVARYLCSCPPGTLGLVCEINEDDCGPGPLDSGPRCLHNGTCVDLVGGFRCTCPPGYTGLRCEAD
 INECRSGACHAAHTRDCLQDPGGGFRLCHAGFSGPRCQTVLSPCESQPCQHGGGCRPSPGPGG
 GLTFTCHCAQPFWGPCRERVARSRELQCPVGVPCQQTTPRGPRCACPPGLSGPSCRSFPGSPPG
 ASNASCAAAPCLHGGSCRPAPLAPFFRCACAQGWTPRCAPAAAEVSEEPRCPRACQAKRG
 DQRCDRECNSPGCGWDGGDCSLVGDWPWRQCEALQCWRLFNNRCDPACSSPACLYDNFDCH
 20 AGGRERTCNPVYKEYCADHFADGRCDQGCNTEECGWDGLDCASEVPALLARGVLVLTVLLPPEEL
 LRSSADFLQRLSAILRTSLRFLDAHGMVFPYHRPSPGSEPRARRELAPEVIGSVVMLEIDNRLC
 LQSPENDHCFPDAQSAADYLGALSAVERLDFPYPLRDVRGEPEPEPSVPLPLLVAGAVLLLVLV
 LGVMVARRKREHSTLWFPEGFSLHKDVASGHKGRREPVGQDALGMKNMAKGESLMGEVATDWM
 TECPEAKRLKVEEPMGAEEAVDCRQWTQHHLVAADIRVAPAMALTPPQGDADADGMDVNV
 25 GFTPLMLASFCGGALEPMPTEEDEADDSASIISDLICQGAQLGARTDRTGETALHLAARYARADAAK
 RLLDAGADTNAQDHSGRTPHTAVTADAQGVFQILIRNRSTDLDARMADGSTALILAAARLAVEGMVEE
 LIASHADVNAVDELGKSALHWAANVNEATLALLKNGANKDMQDSKEETPLFLAAREGSYEA
 LDHAFANREITDHLDRLPDVAQERLHQDIVRLDQPSGPRSPPGPHGLGPLLCPPGAFLPLKAAQS
 GSKKSRPPGKAGLGPQGPGRGRGKLTACPGPLADSSVTLSPVDSLSPRPFPGPPASPGGFPLE
 30 GPYAAATATAVSLAQLGGPGRAGLGRQPPGGCVLSLGLLNPVAVPLDWARLPPPAPPGPSFLLPLAP
 GPQLLNPGTPVSPQERPPPYLAVPGHGEEYPVAGAHSSPPKARFLRVPSEHPYLTSPESPEH
 WAS PSPPSLSDWSESTPSPATATGAMATTTGALPAQPLPLSVPSLAQAQTLGPQPEVTPKRQVLA
 SEQ ID NO:46: hNotch4
 Амінокислоти 1-1444 Позаклітинний домен (підкреслений)
 35 Амінокислоти 392-434 Повтор 10 EGF (двічі підкреслені або подані курсивом)
 MQPPSLLLLLLLLLCVSVVRPRGLLCGSFPEPCANGGTCLSLSLGQGTCCQAPGFLGETCQFPD
 PCQNAQLCQNGGSCQALLPAPLGLPSSPSLTPSFLCTCLPGFTGERCQAKLEDPCPPSFC
 RCHIQASGRPQCSCMPGWTGEQCQLRDFCSANPCVNGGVCLATYPQIQCHCPPGFEGHACERDV
 NECFQDPGPGCPKGTSCNHTLGSFQCLCPVGQEGPRCELRAGPCPPRGCSNNGGTCQLMPEKDSTF
 40 HLCLCPPGFIGPDCEVNPDCVSHQCQNGGTQDGLDITYTCLCPETWTGWDCSEVDECE
 TQGP PHCRNNGGTCQNSAGSFHCVCVSGWGGTSCEENLDDCIAATCAPGSTCIDRVGSFSC
 LCPPGRTGL LCHLEDMLCSQPCHGDAQCSTNPLTGSTLCLCPGYSGPTCHQDLDECLMAQ
 QGSPCEHGGSC LNTPGSFNCLCPPGYTGSRCADHNECLSQPCHPGSTCLDLLATFHCLCPPGLE
 GQLCEVETNECA SAPCLNHADCHDLLNGFQCICLPGFSGTRCEEDIDECRSSPCANGGQCQDQ
 PGAFHCKCLPGFEG 45 PRCQTEVDECLSDPCPVGASCLDLPGAFFCLCPSGFTGQLCEVPLCAPNLCQPKQICKDQKDKANC
 LCPDGSFGCAPPEDNCTCHHGHCCRSSCVCDVVGWGTGPECEAELGGCISAPCAHGGTCYPQPSGY
 NCTCPTGYTGPTCSEEMTACHSGPCLNGGSCNPSPGGYCTCPPSHTGPQCQSTDYCVSAPCFN
 GGTCVNRPGFTFSCLCAMGFQGPCEGKLRPSCADSPCRNRATCQDSPQGPRLCPTGYTGGSCQ
 TLMDLCAQKPCPRNSHCLQTGPSFHCLCLQGWTPGLCNPLSSCQKAALSQGIDVSSLCHNNGGLCV
 50 DSGPSYFCHCPPGFQGSCLQDHVNPCESRPCQNGATCMAQPSGYLCQCAPGYDQNC
 SKELDACSQSPCHNHGTCTPKPGGFHCACPPGFVGLRCEGDVDECLDQPCHTGTAAACHSLANAFY
 CQCLPG HTGQWCEVEIDPCHSQPCFHGGTCEATAGSPLGFICHCPKGFEGPTCSHRAPSCG
 FHHCHHGGGLC LPSPKPGFPPRCACLSGYGGPDCLTPPAKGC
 GPPSPCLYNGSCSETTGLGGPGFRCS
 PHSSPG PRCQKPGAKGCEGRSGDGACDAGCSGPGGNWDGGDCSLGVPDPWKGCPSHSR
 CWLLFRDQGC HPQCDSEECFLDGYDCETPPACTPAYDQYCHDHFHNGHCEKGCNTAECGWDGGD
 CRPEDGDPE WGPSLALLVVLSPPALDQQLFALARVLSLTLRVGLWVRKDRDGRDMVYPYPGARA
 EEKLGTRDPT YQERAAPQTQPLGKETDSL
 SAGFVVVMGVDLSRCGPDHPASRCPWDPLLLRFLAAMA
 AVGALEP LLPGPLLAVHPHAGTAPPANQLPWPVLCSPVAGVILLALGALLVLQ
 LIRRRRREHGALWLP
 PGFTRRP RTQSAPHRRRPPLGEDSIGLKALKPKAEVDE
 DGVVMCSGPEEGEEVGAEETGPPSTCQLWSLSG 60 GCGALPQAAMLT
 PPQESEMEAPDLTRGPDGVTPLMSAVCCGEVQSGTFFQGAWLGCPEPWEPLLD

GGACPQAHTVGTGETPLHLAARFSRPTAARRLLEAGANPNQPDRAGRTPHLAAVAADAREVCQLLL
RSRQTAVDARTEDGTTPLMLAARLAVEDLVEELIAAQADVGARDKWGKTALHWAAAVNNARAARSL
LQAGADKDAQDNREQTPLFLAAREGAVEVAQLLLGLGAARELRDQAGLAPADVAHQRNHWDLLTLL
EGAGPPEARHKATPGREAGPFPRARTVSVSVPPHGGGALPRCRTLSAGAGPRGGGACLQARTWSV
5 DLAARGGGAYSHCRSLSGVGAGGGPTPRGRRFSAGMRGPRPNPAIMRGRYGVAAGRGGRVSTDD
WPCDWVALGACGSASNIPIPPCLTPSPERGSPQLDCGPPALQEMPINQGGEGKK

SEQ ID NO:33: Полінуклеотидна послідовність, кодує EGF 1-12 Notch2 людини

ATGCCCCGCCCTGCGCCCCGCTCTGCTGTGGGCGCTGCTGGCGCTCTGGCTGTGCTGCGCG
GCCCCCGCGCATGCATTGCAGTGTGAGATGGCTATGAACCCTGTGTAAATGAAGGAATG
10 TGTGTTACCTACCACAATGGCACAGGATACTGCAAATGTCCAGAAGGCTTCTTGGGGGAA
TATTGTCAACATCGAGACCCCTGTGAGAAGAACCGCTGCCAGAATGGTGGGACTTGTGTG
GCCCAGGCCATGCTGGGGAAAGCCAGTGGCGATGTGCCTCAGGGTTTACAGGAGAGGAC
TGCCAGTACTCAACATCTCATCCATGCTTTGTGTCTCGACCCTGCCTGAATGGCGGCACA
TGCCATATGCTCAGCCGGGATACCTATGAGTGCACCTGTCAAGTCGGGTTTACAGGTAAAG
15 GAGTGCCAATGGACGGATGCCTGCCTGTCTCATCCCTGTGCAAATGGAAGTACCTGTACC
ACTGTGGCCAACCAGTTCTCCTGCAAATGCCTCACAGGCTTCACAGGGCAGAAATGTGAG
ACTGATGTCAATGAGTGTGACATTCCAGGACACTGCCAGCATGGTGGCACCTGCCTCAAC
CTGCCTGGTTCCTACCAGTGCCAGTGCCTCAGGGCTTCACAGGCCAGTACTGTGACAGC
CTGTATGTGCCCTGTGCACCCTCACCTTGTGTCAATGGAGGCACCTGTGCGCAGACTGGT
20 GACTTCACTTTTGTGAGTGAACCTGCCTTCCAGGTTTTGAAGGGAGCACCTGTGAGAGGAAT
ATTGATGACTGCCCTAACACAGGTGTGAGAATGGAGGGGTTTGTGTGGATGGGGTCAAC
ACTTACAACCTGCCGCTGTCCCCCACAATGGACAGGACAGTTCTGCACAGAGGATGTGGAT
GAATGCCTGCTGCAGCCCAATGCCTGTCAAATGGGGGCACCTGTGCCAACCGCAATGGA
GGCTATGGCTGTGTATGTGTCAACGGCTGGAGTGGAGATGACTGCAGTGAGAACATTGAT
25 GATTGTGCCTTCGCCTCCTGTACTCCAGGCTCCACCTGCATCGACCGTGTGGCCTCCTTC
TCTTGCATGTGCCCAGAGGGGAAGGCAGGTCTCCTGTGTGATCTGGATGATGCATGCATC
AGCAATCCTTGCCACAAGGGGGGCACTGTGTGACACCAACCCCTAAATGGGCAATATATT
TGCACCTGCCACAAGGCTACAAAGGGGCTGACTGCACAGAAGATGTGGATGAATGTGCC
ATGGCCAATAGCAATCCTTGTGAGCATGCAGGAAAATGTGTGAACACGGATGGCGCCTTC
30 CACTGTGAGTGTCTGAAGGGTTATGCAGGACCTCGTTGTGAGATGGACATCAATGAGTGC
CATTACAGACCCCTGCCAGAATGATGCTACCTGTCTGGATAAGATTGGAGGCTTCACATGT
CTGTGCATGCCAGGTTTCAAAGGTGTGCATTGTGAATTA

SEQ ID NO:34: Послідовність поліпептиду EGF 1-12 Notch2 людини

MPALRPALLWALLALWLCCAARAHALQCRDGYEPCVNEGMCVTYHNGTGYCKCPEGFLGE
35 YCQHRDPCEKNRCQNGGTCVAQAMLGKATCRCAASGFTGEDCQYSTSHPCFVSRPCLNGGT
CHMLSRDITYECTCQVGFTGKECQWTDACLSPCANSTCTTVANQFSCCKLTGFTGQKCE
TDVNECDIPGHCGHGGTCLNLPQSYQCQCPQGFTGQYCDLSLVPCAPSPCVNGGTCRQTG
DFTFECNCLPGFEGSTCERNIDDCPNHRCQNGGVCDGVNTYNCRCPPQWTGQFCTEDVD
ECLLPNACQNGGTANRNGGYGCVVNGWSGDDCSENIDDCAFASCTPGSTCIDRVASF
40 SCMCPEGKAGLLCHLDDACISNPCHKGALCDTNPLNGQYICTCPQGYKGADCTEDVDECA
MANSNPCEHAGKCVNTDGAHFCECLKGYAGPRCEMDINECHSDPCQNDATCLDKIGGFTC
LCMPGFKGVHCEL

SEQ ID NO:35: EGF10 Notch1 людини

LNDACISNPCNEGSNCDTNPVNGKAICTCPSGYTGPACSQDVD

45 SEQ ID NO:36: EGF10 Notch2 людини

LDDACISNPCHKGALCDTNPLNGQYICTCPQGYKGADCTEDVD

SEQ ID NO:37: EGF9 Notch3 людини (EGF9 є EGF Notch3 людини, який відповідає EGF0
інших Notch-рецепторів, у тому числі Notch2)

LDDACVSNPCHEDAICDTNPVNGRAICTCPPGFTGGACDQDVD

50 SEQ ID NO:38: EGF10 Notch4 людини

LEDMLSQPCHGDAQCSTNPLTGSTLCLCQPGYSGPTCHQDL

SEQ ID NO:41: EGF-повтор 4 Notch1

QADPCASNPCANGGQCLPFEASYICHCPPSFHGPTCRQ

SEQ ID NO:42: EGF-повтор 4 Notch2

55 TDACLSPCANSTCTTVANQFSCCKLTGFTGQKCET

SEQ ID NO:43: EGF-повтор 4 Notch3

SDVDECRVGEPCRHHGGTCLNTPGSFRCCPAGYTGPLCEN

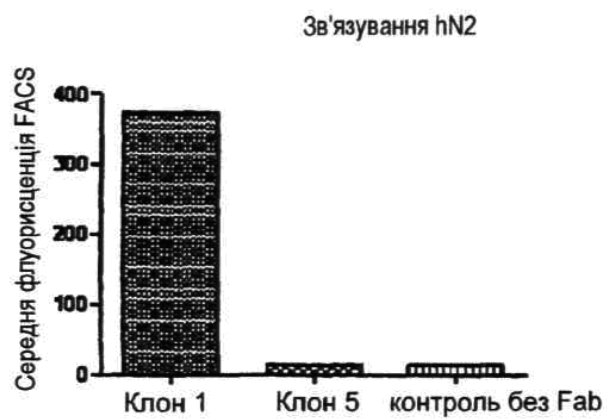
SEQ ID NO:44: EGF-повтор 4 Notch4

RDFCSANPCVNGGVCLATYPQIQCHCPPGFEGHACER

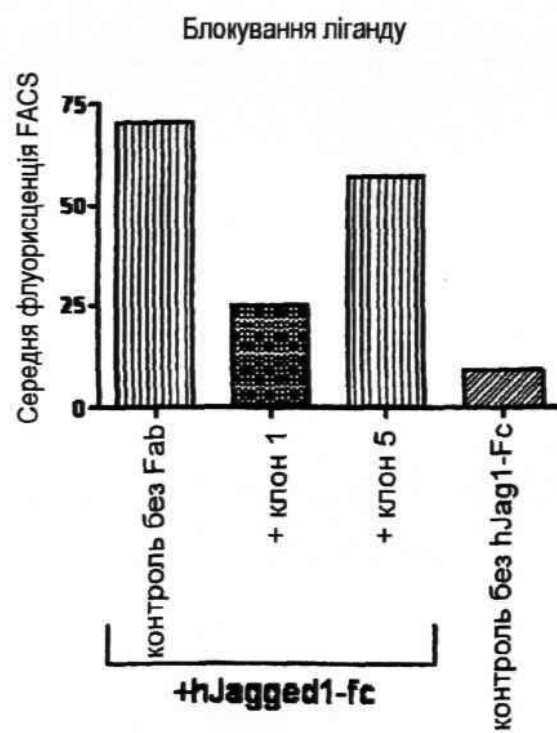
60

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

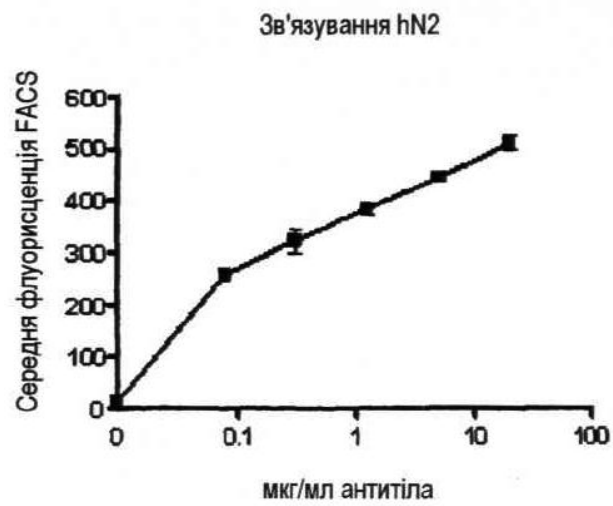
1. Виділене антитіло, яке специфічно зв'язує незв'язуючу ліганд область позаклітинного домену Notch2 і/або Notch3 людини, де це антитіло містить:
 - 5 (a) CDR1 важкого ланцюга, що містить SSSGMS (SEQ ID NO:5), CDR2 важкого ланцюга, що містить VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6), і CDR3 важкого ланцюга, що містить SIFYTT (SEQ ID NO:51); та
 - (b) CDR1 легкого ланцюга, що містить RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:8), CDR2 легкого ланцюга, що містить GASSRAT (SEQ ID NO:9), і CDR3 легкого ланцюга, що містить QQYSNFPI (SEQ ID NO:10).
- 10 2. Виділене антитіло, яке специфічно зв'язує незв'язуючу ліганд область позаклітинного домену Notch2 і/або Notch3 людини, де це антитіло містить:
 - (a) CDR1 важкого ланцюга, що містить SSSGMS (SEQ ID NO:5), CDR2 важкого ланцюга, що містить VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6), і CDR3 важкого ланцюга, що містить GIFFAI (SEQ ID NO:7); та
 - 15 (b) CDR1 легкого ланцюга, що містить RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:8), CDR2 легкого ланцюга, що містить GASSRAT (SEQ ID NO:9), і CDR3 легкого ланцюга, що містить QQYSNFPI (SEQ ID NO:10).
3. Виділене антитіло за п. 1 або 2, яке містить:
 - 20 (a) варіабельну область важкого ланцюга, що має щонайменше близько 90 % ідентичність послідовності з SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:14 або SEQ ID NO:20; та
 - (b) варіабельну область легкого ланцюга, що має щонайменше близько 90 % ідентичність послідовності з SEQ ID NO:13 або SEQ ID NO:19.
4. Виділене антитіло за п. 3, яке містить:
 - 25 (a) варіабельну область важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO:50; та
 - (b) варіабельну область легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO:13.
5. Виділене антитіло за п. 3, яке містить:
 - (a) варіабельну область важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO:14; та
 - (b) варіабельну область легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO:13.
- 30 6. Антитіло за будь-яким з пп. 1-5, яке є рекомбінантним антитілом, моноклональним антитілом, химерним антитілом, біспецифічним антитілом, гуманізованим антитілом, антитілом людини або фрагментом антитіла.
7. Виділене моноклональне антитіло, кодоване полінуклеотидом, депонованим у ATCC як РТА-10170 або РТА-9547.
- 35 8. Фармацевтична композиція, що містить антитіло за будь-яким з пп. 1-7.
9. Застосування антитіла відповідно до будь-якого з пп. 1-7 для виготовлення лікарського засобу для лікування раку або для лікування ангіогенез-асоційованого захворювання.
10. Застосування за п. 9, яке **відрізняється** тим, що лікування раку або лікування ангіогенез-асоційованого захворювання включає введення принаймні одного додаткового терапевтичного агента.
- 40 11. Застосування за п. 10, яке **відрізняється** тим, що зазначений додатковий терапевтичний агент є хіміотерапевтичним агентом.



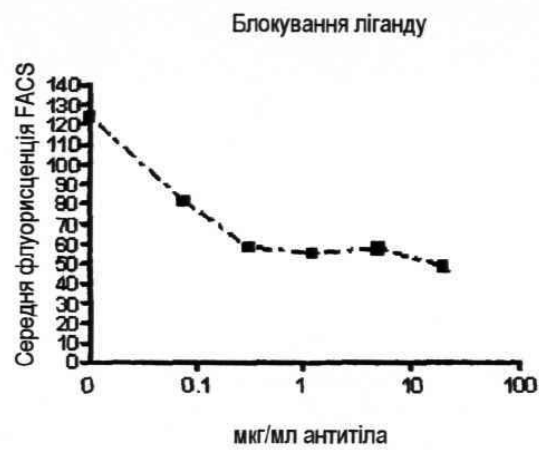
ФІГ. 1А



ФІГ. 1В



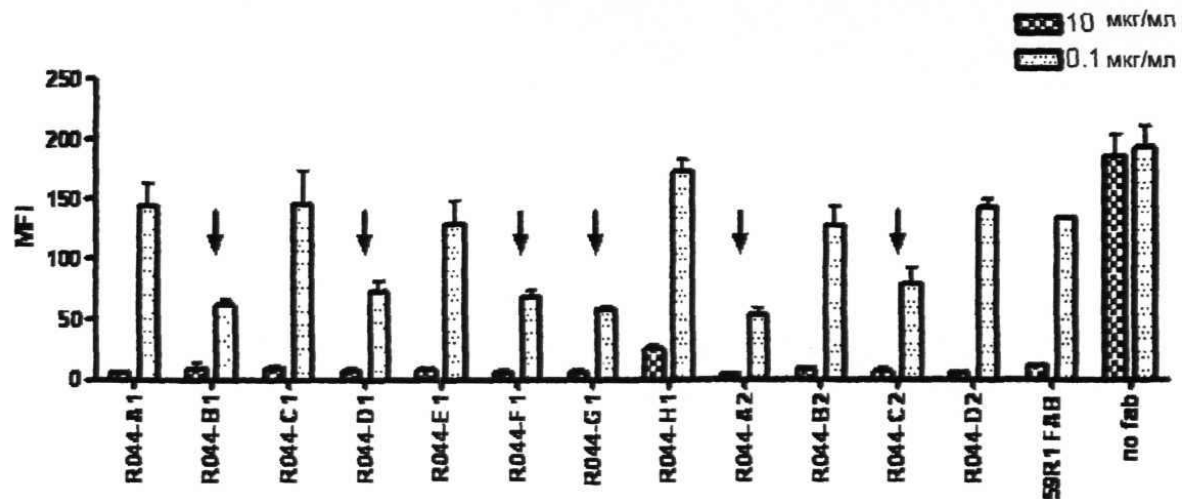
ФІГ. 1С



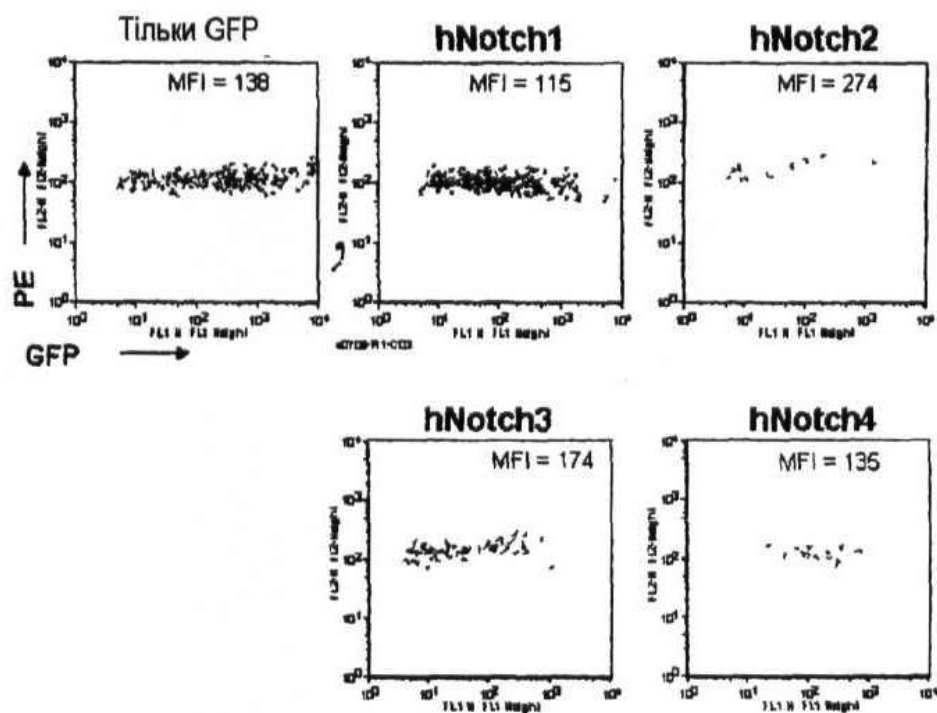
ФІГ. 1D

G	I	F	F	A	I
S	T	Y	Y	S	T
R	S			T	S
	N			P	N

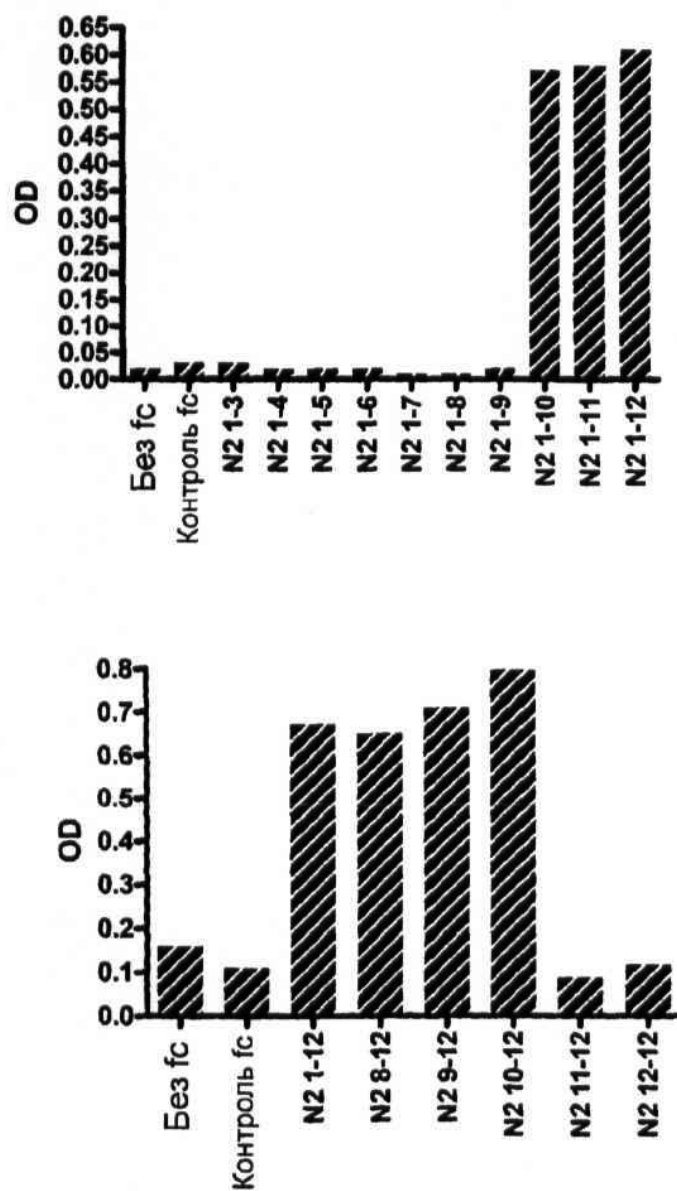
ФІГ. 1E



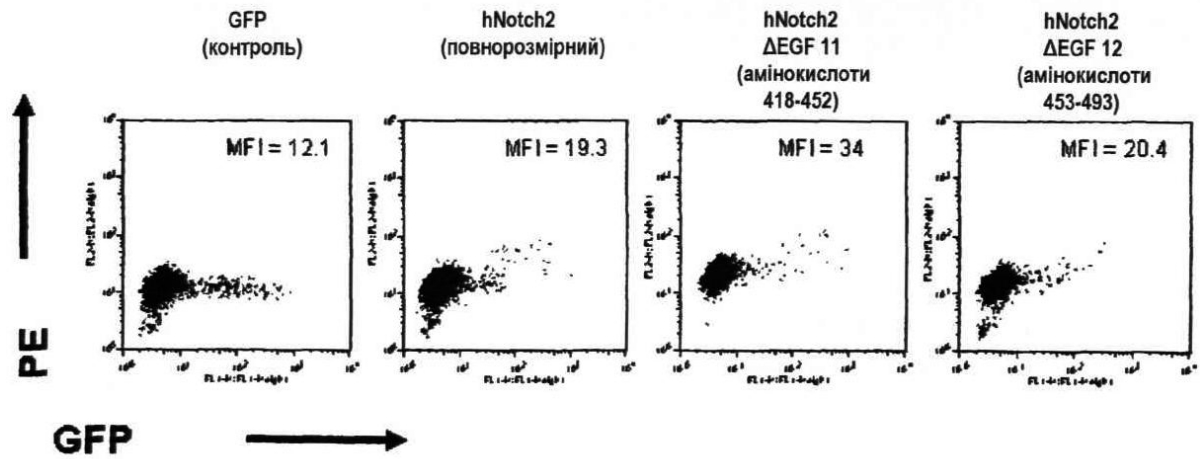
ФІГ. 1F



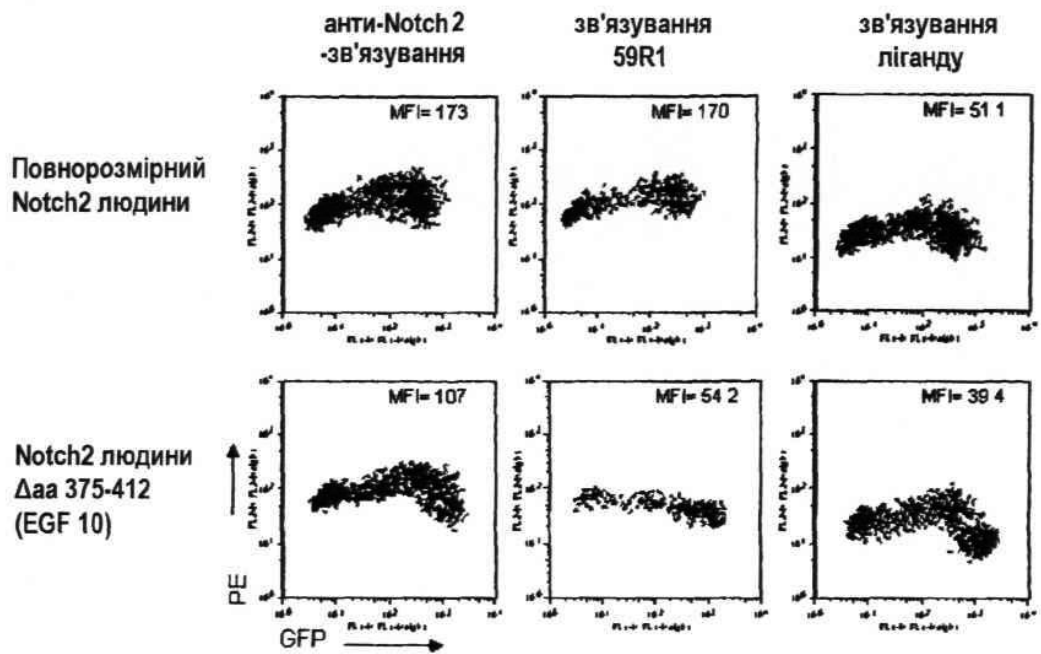
ФІГ. 2



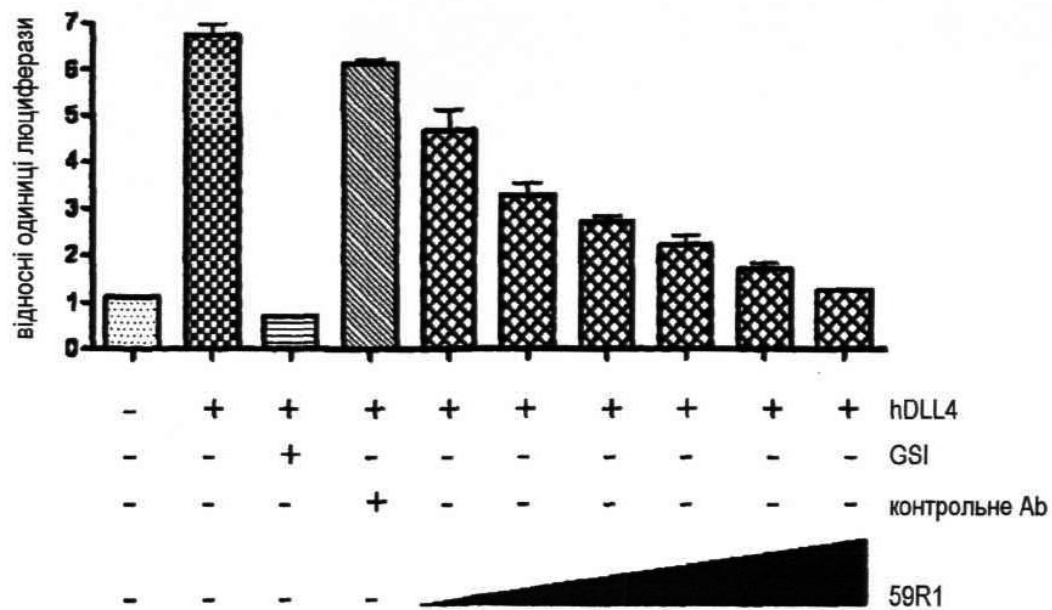
ФІГ. 3А



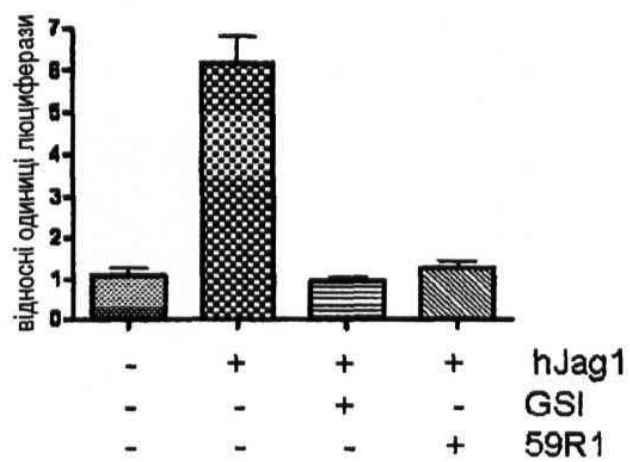
ФІГ. 3В



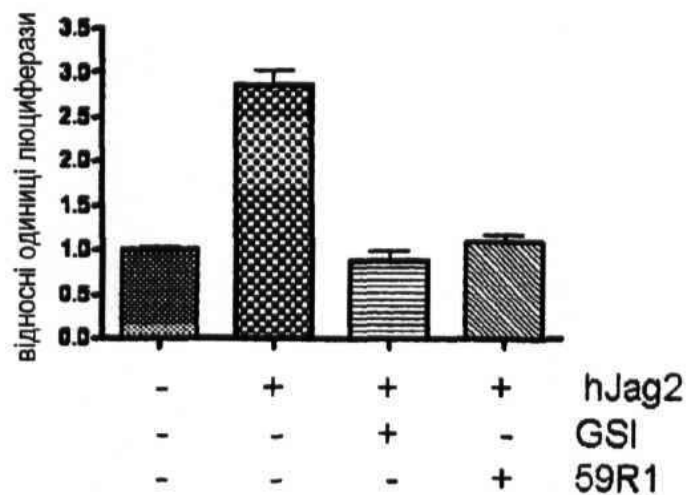
ФІГ. 3С



ФІГ. 4А



ФІГ. 4В

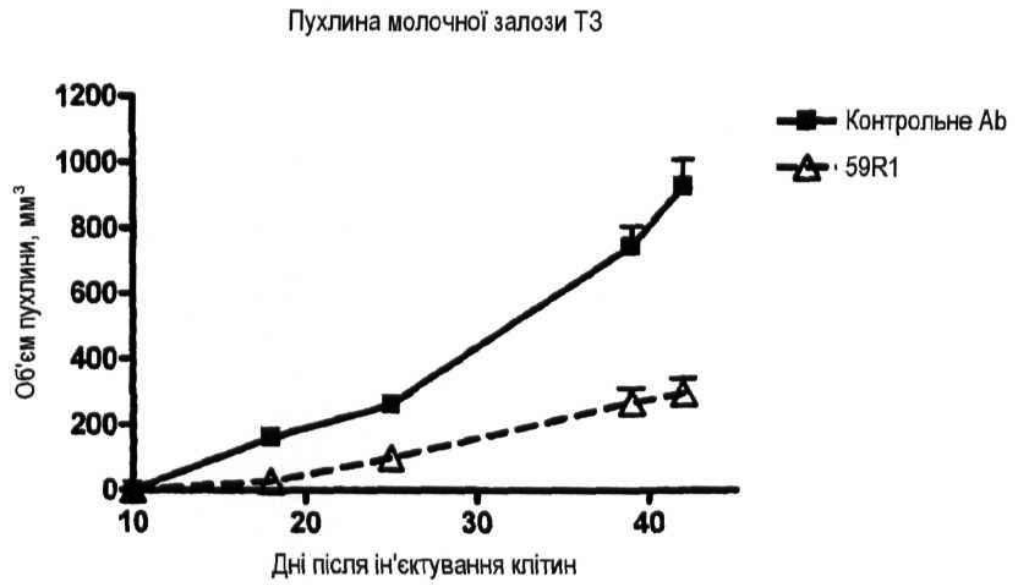


ФІГ. 4С

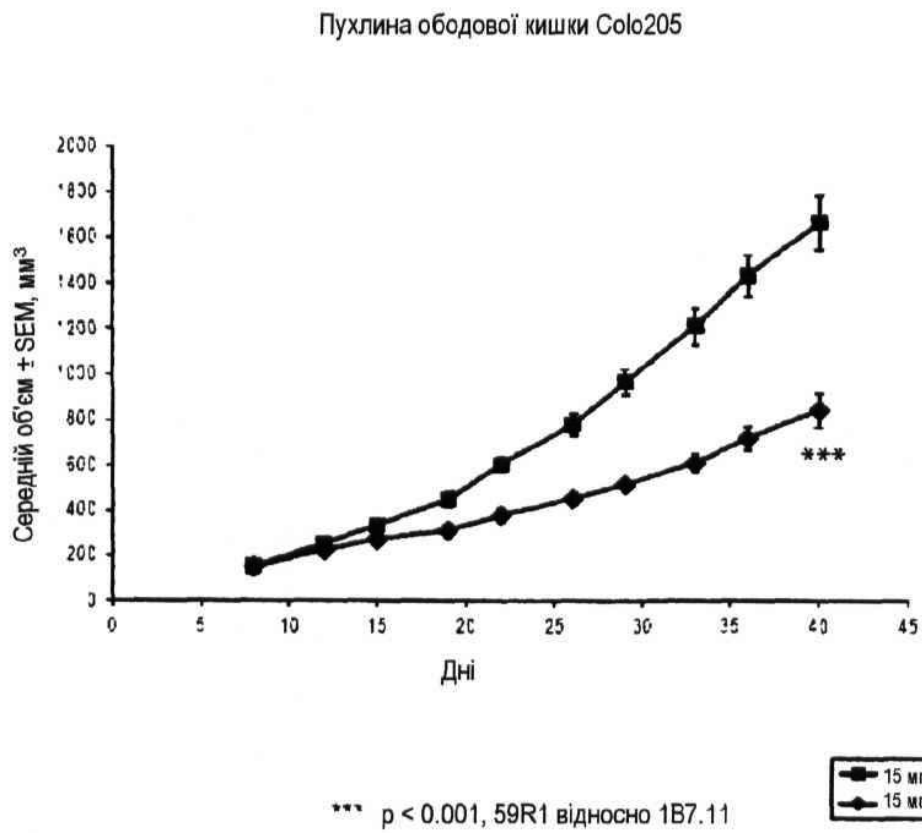
Пухлина молочної залози РЕ13



ФІГ. 5А

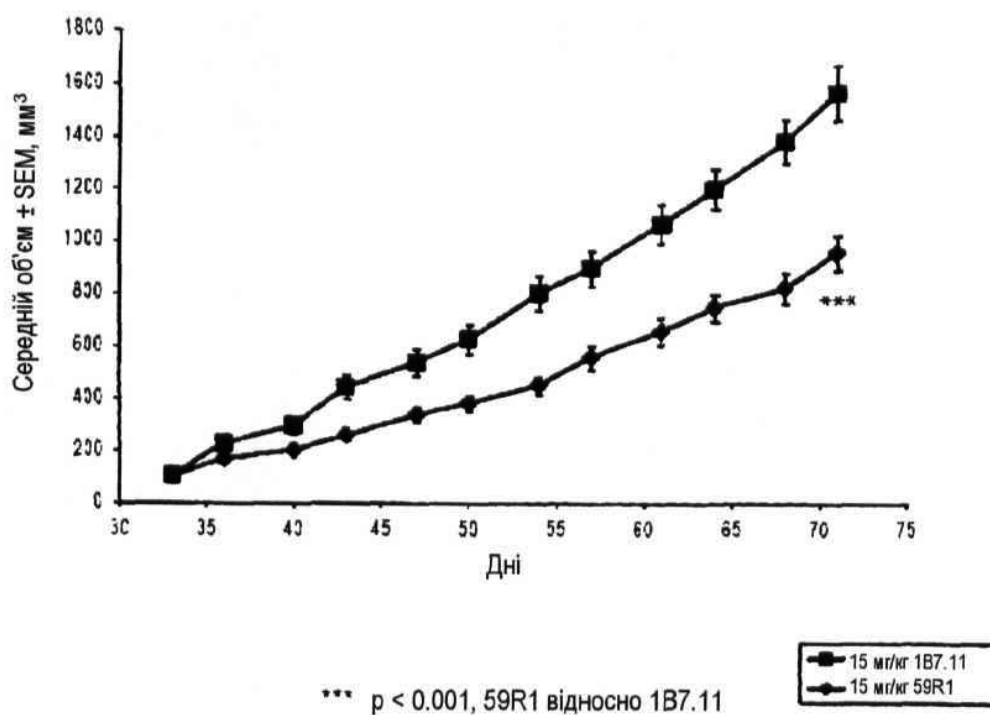


ФІГ. 5В

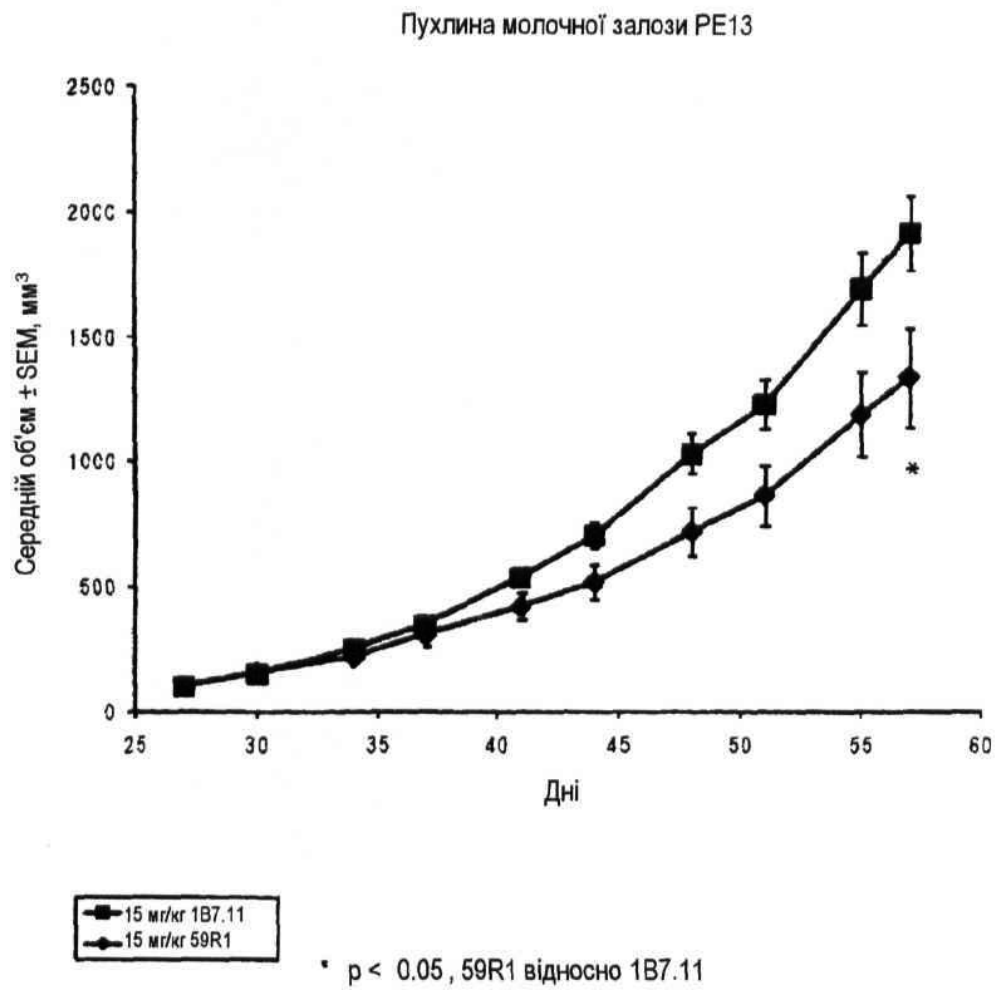


ФІГ. 5С

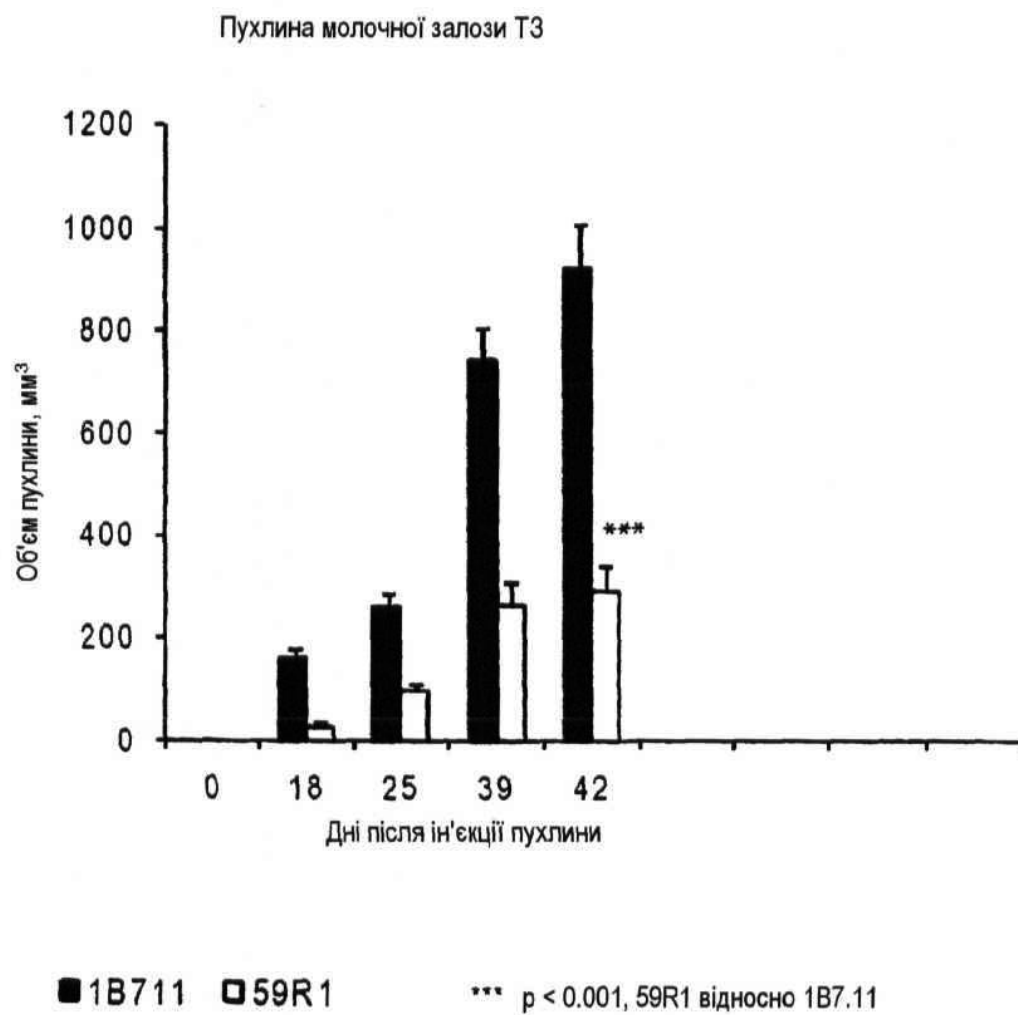
Пухлина підшлункової залози PN4



ФІГ. 5D

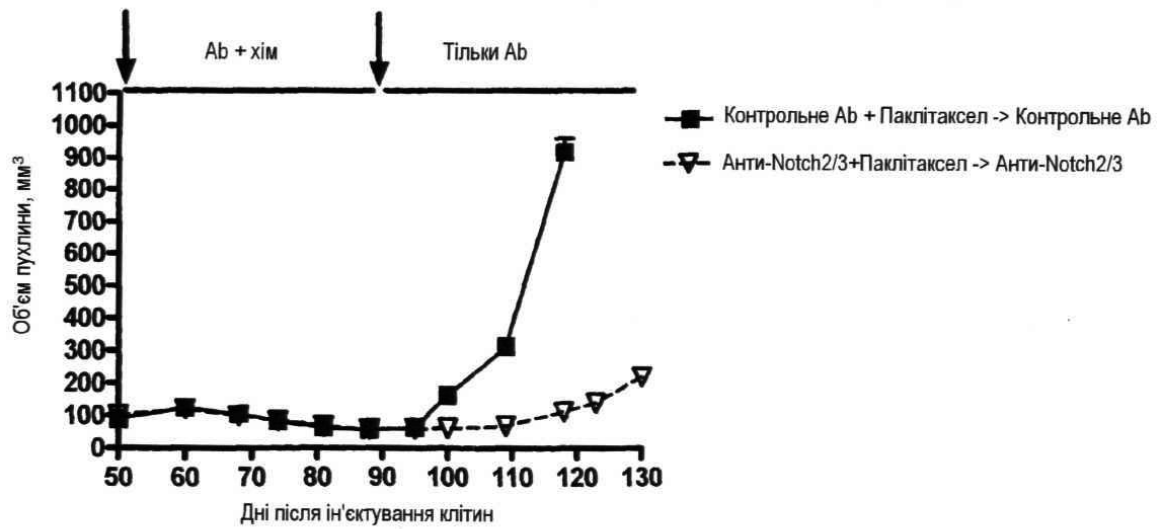


ФІГ. 5Е



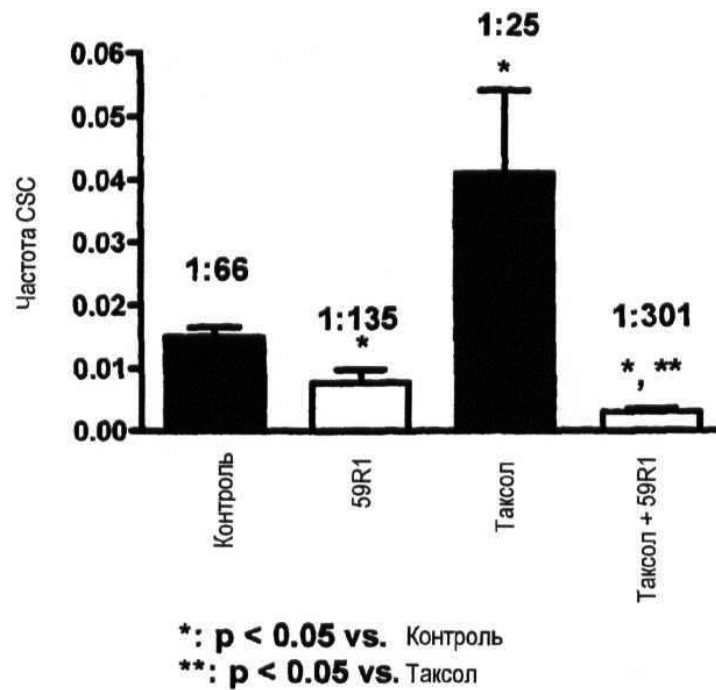
ФІГ. 5F

Пухлина молочної залози B51



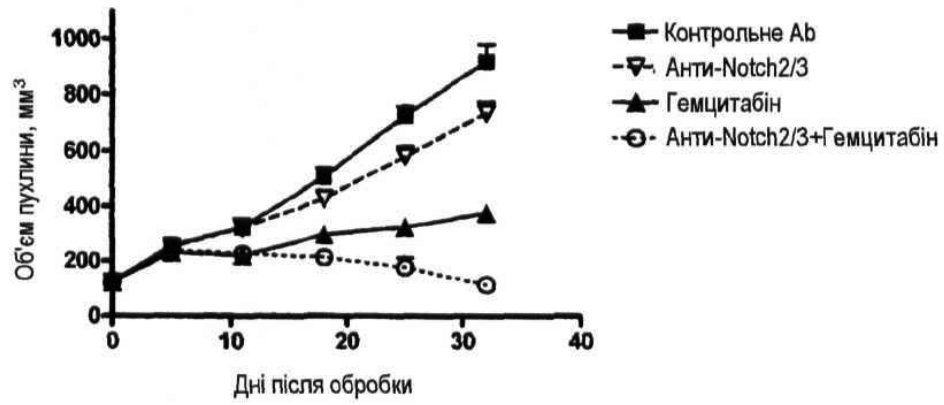
ФІГ. 6

Зростання пухлини молочної залози B51 (день 72)



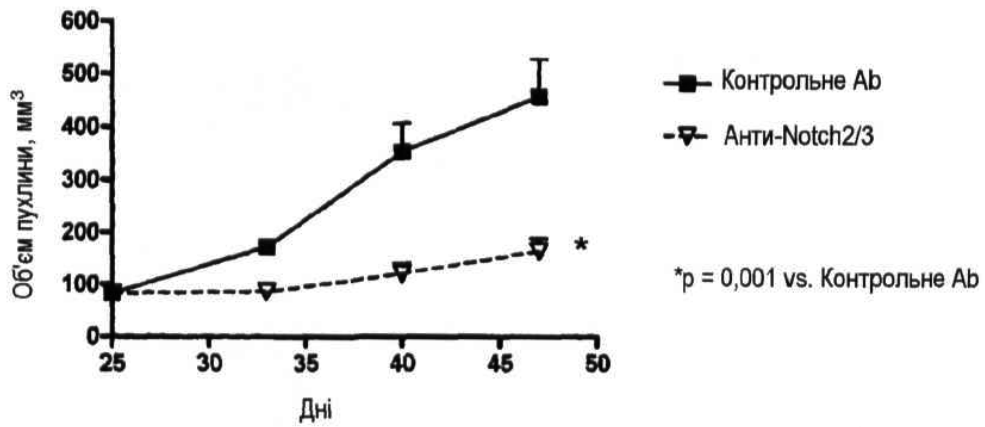
ФІГ. 7

Пухлина підшлункової залози PN4



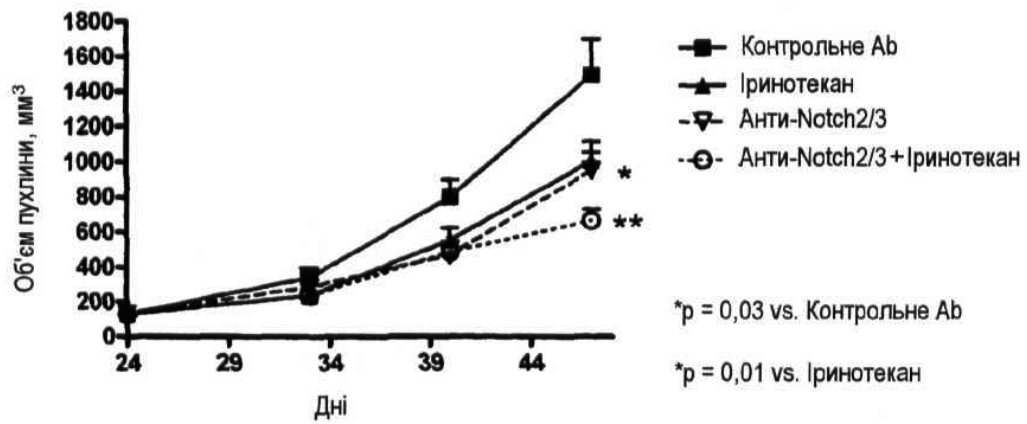
ФІГ. 8

Меланома M4



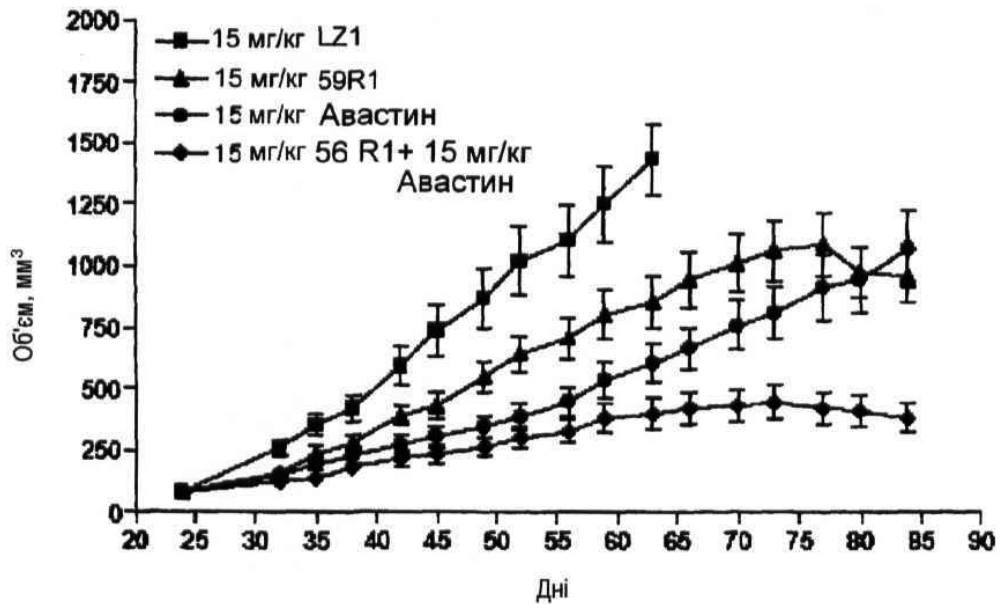
ФІГ. 9

Пухлина ободової кишки C28



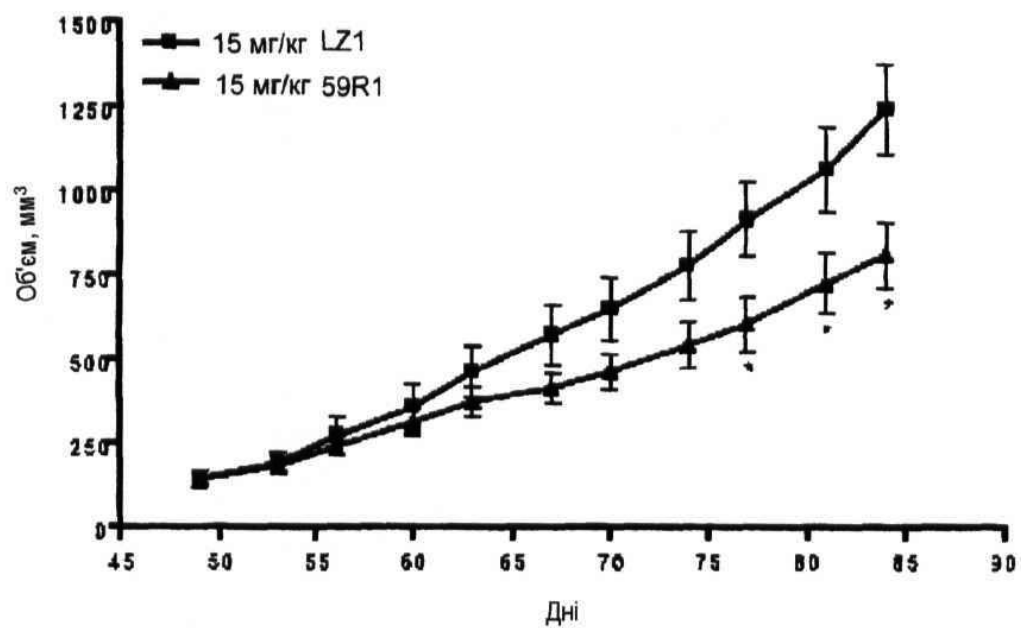
ФІГ. 10

Пухлина ободової кишки COLO205



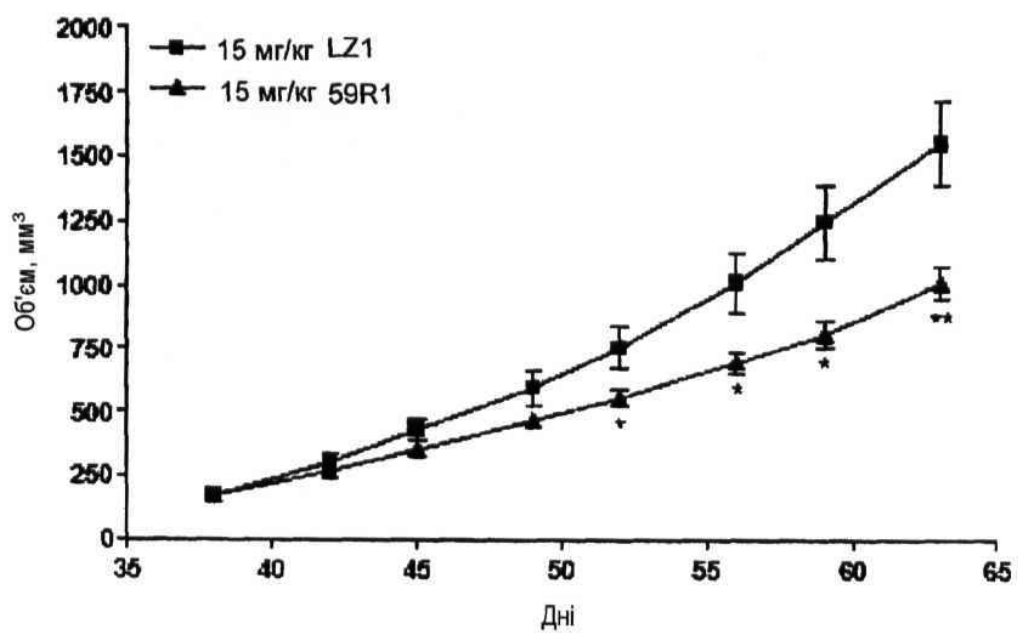
ФІГ. 11А

Пухлина ободової кишки С8



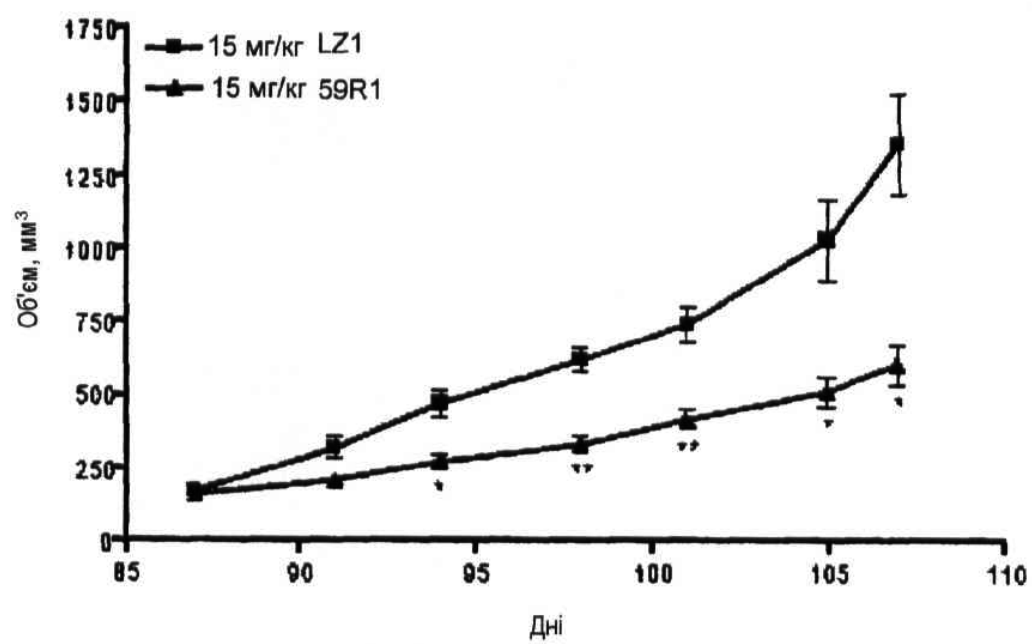
ФІГ. 11В

Пухлина підшлункової залози PN8



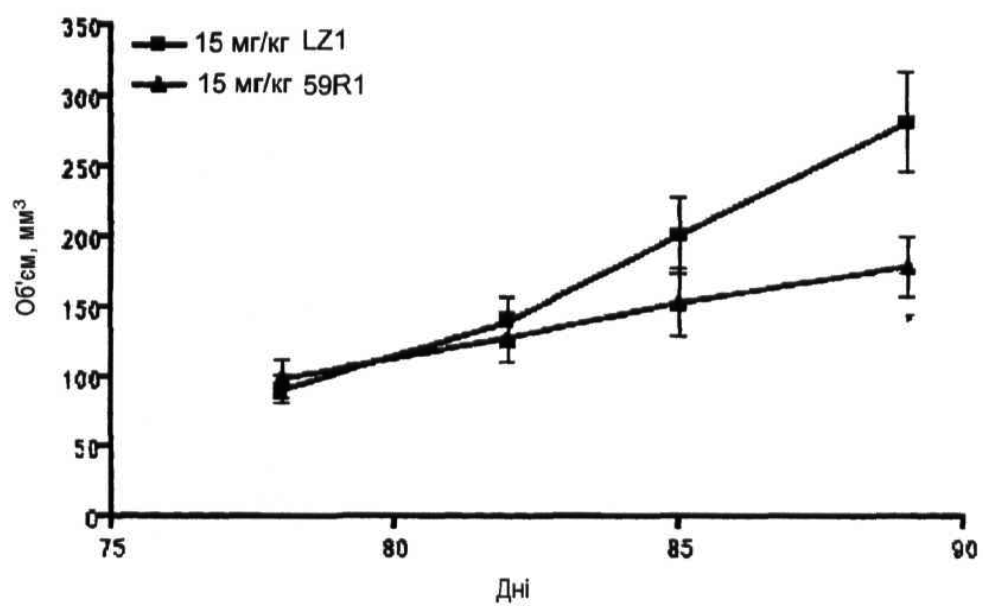
ФІГ. 11С

Пухлина молочної залози В34



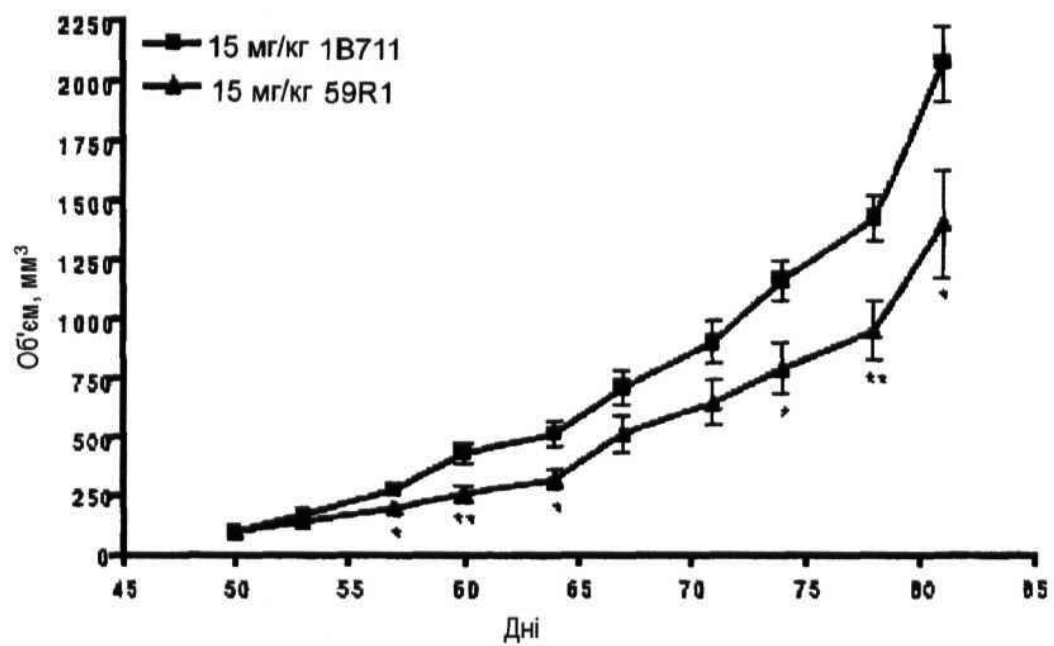
ФІГ. 11D

Пухлина молочної залози В39



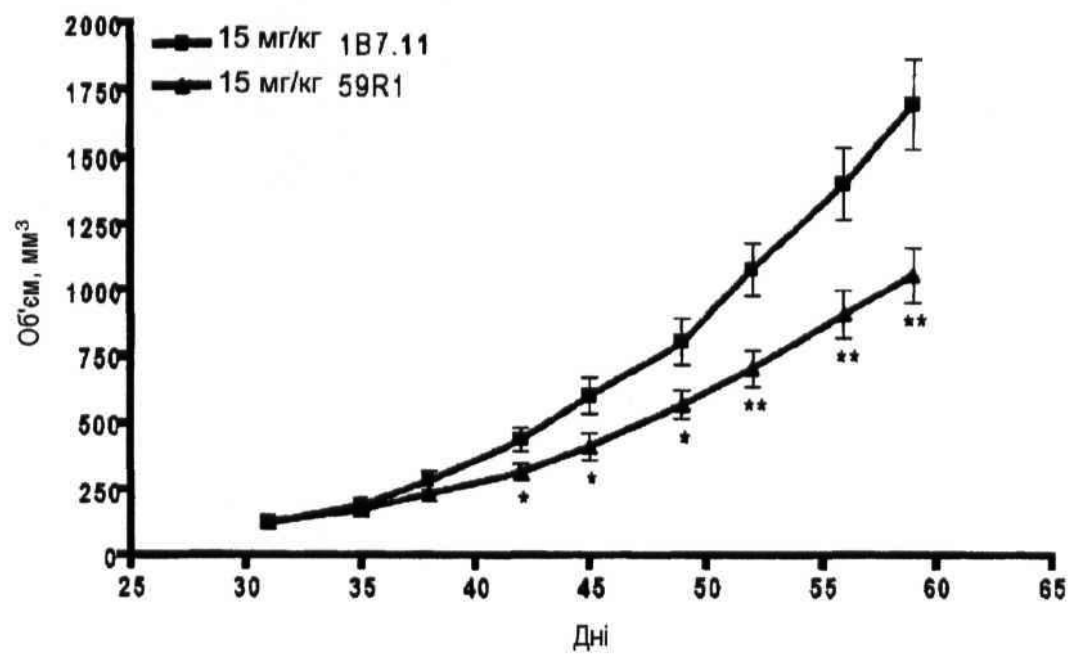
ФІГ. 11Е

Пухлина молочної залози В44



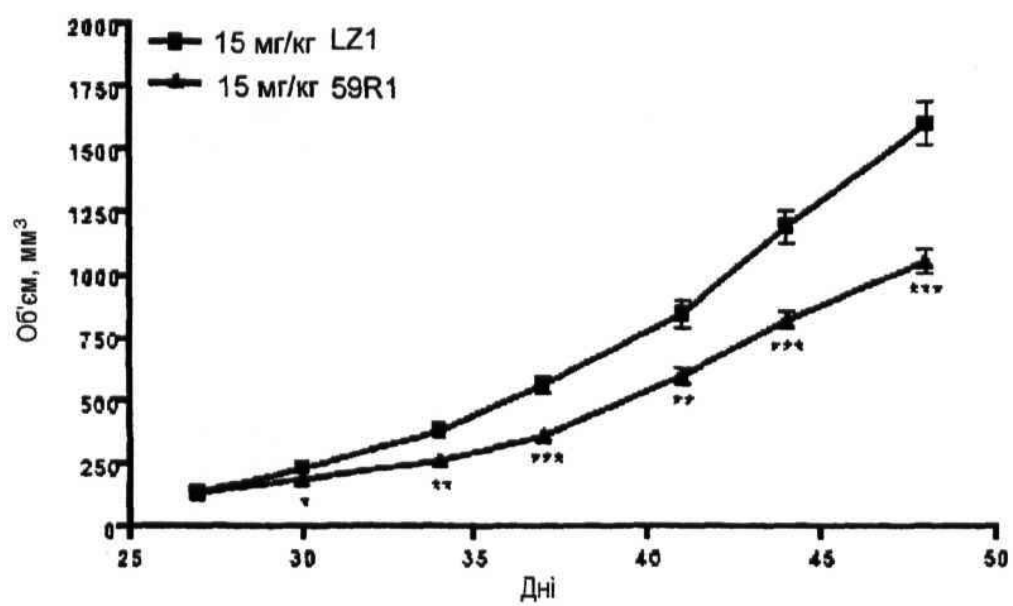
ФІГ. 11F

Пухлина молочної залози PE13

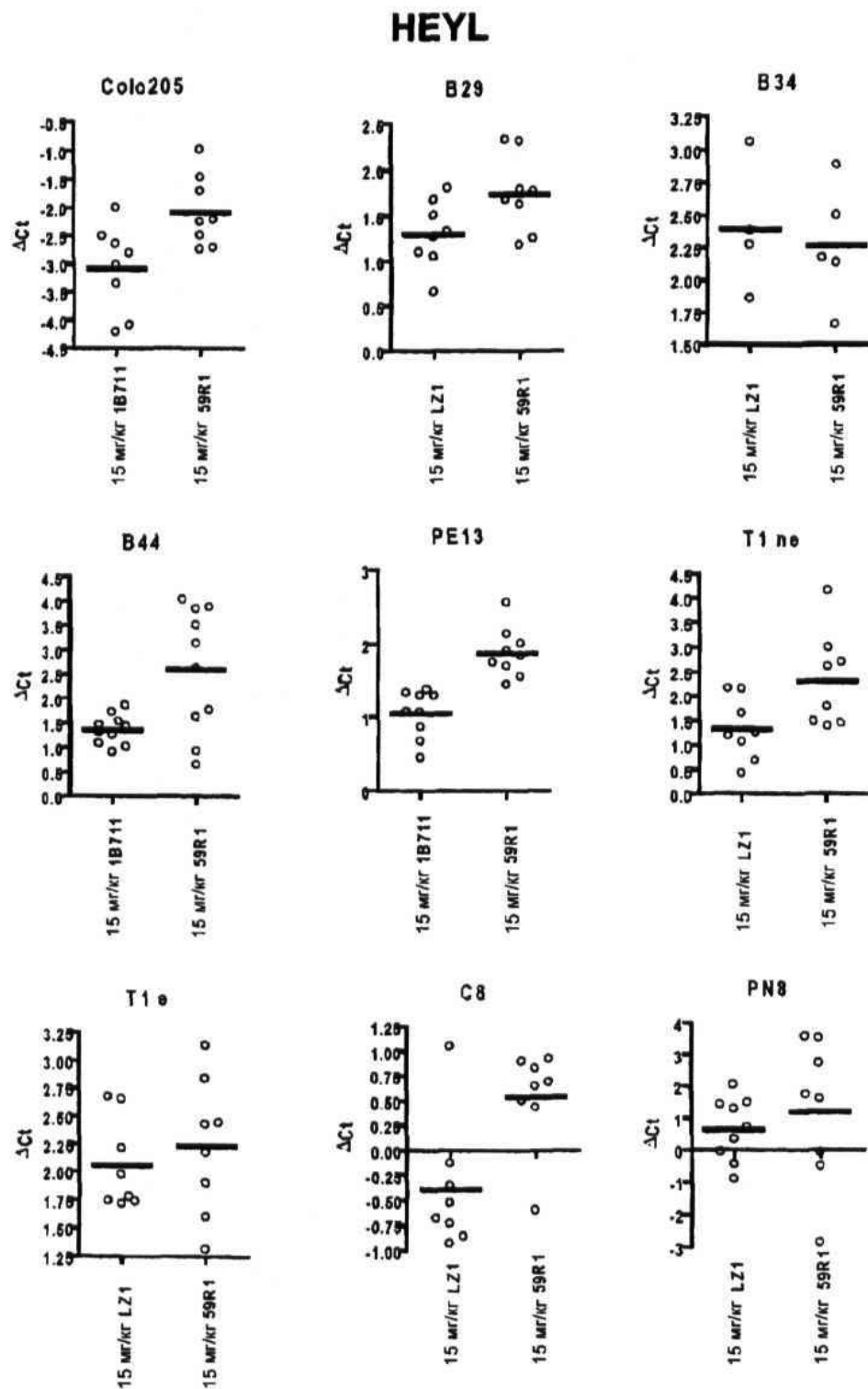


ФІГ. 11G

Пухлина молочної залози T1

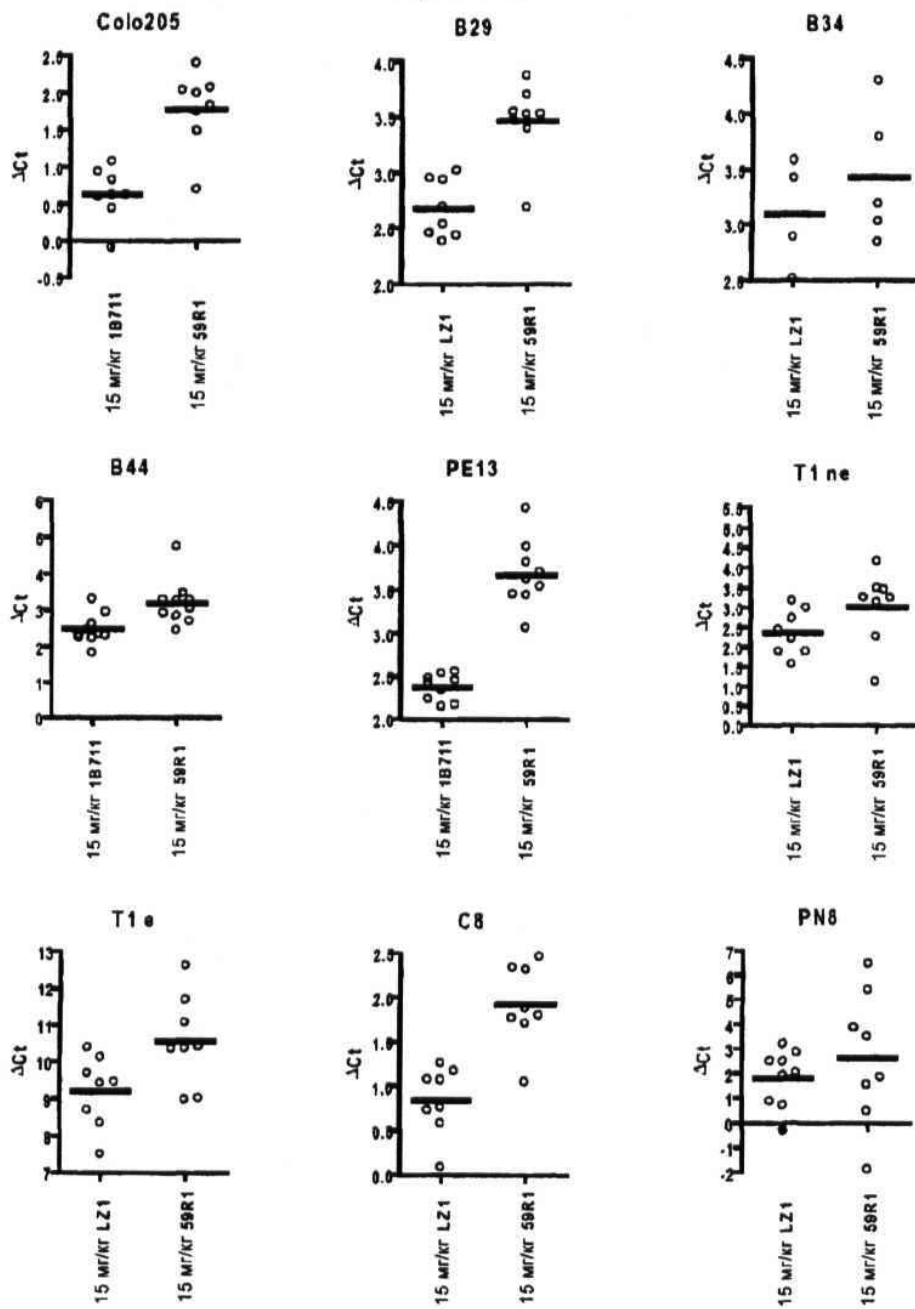


ФІГ. 11Н



Фиг. 12А

NOTCH3



ΦΙΓ. 12B

RGS5

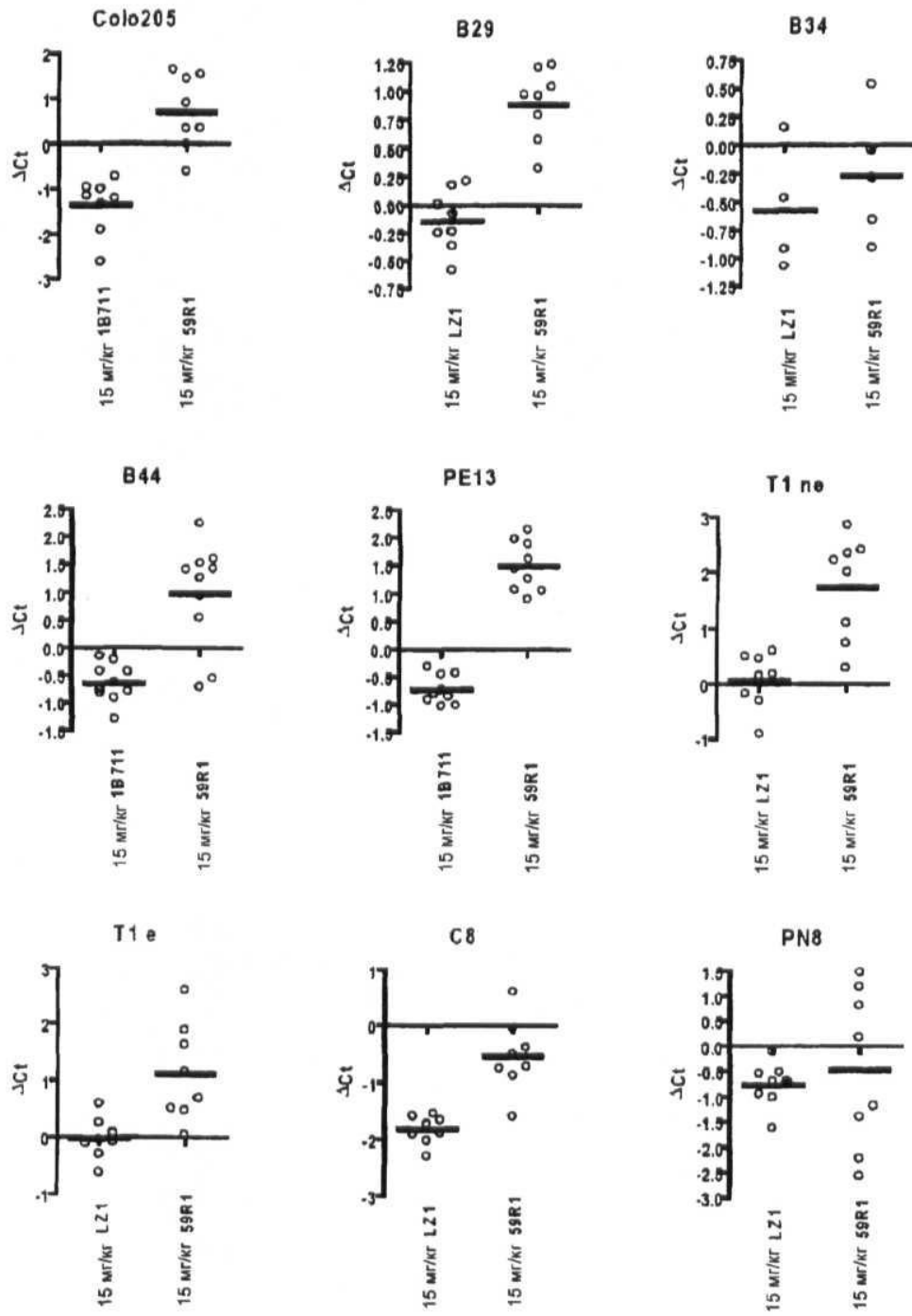
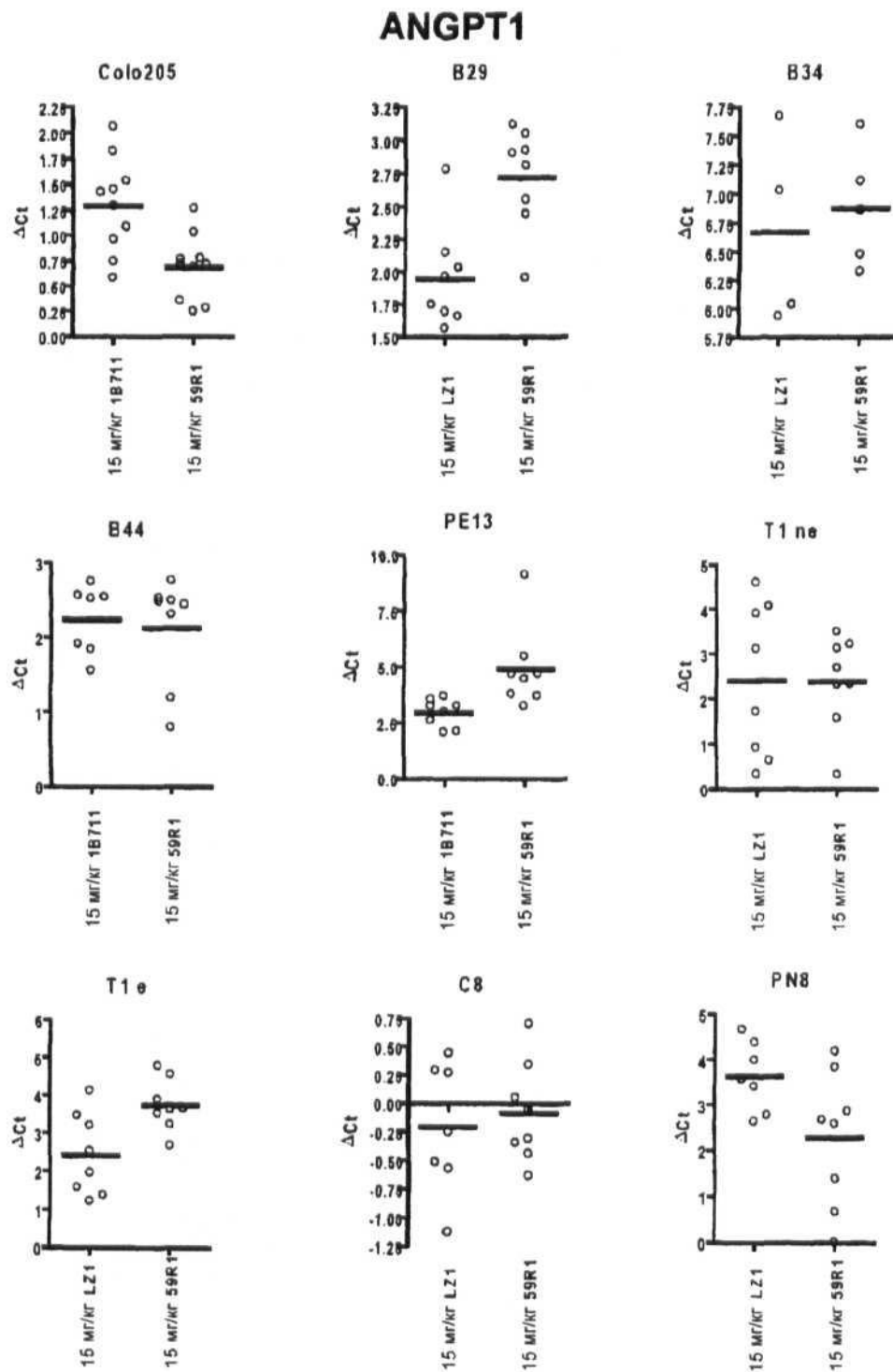


FIG. 12C



ФИГ. 12D

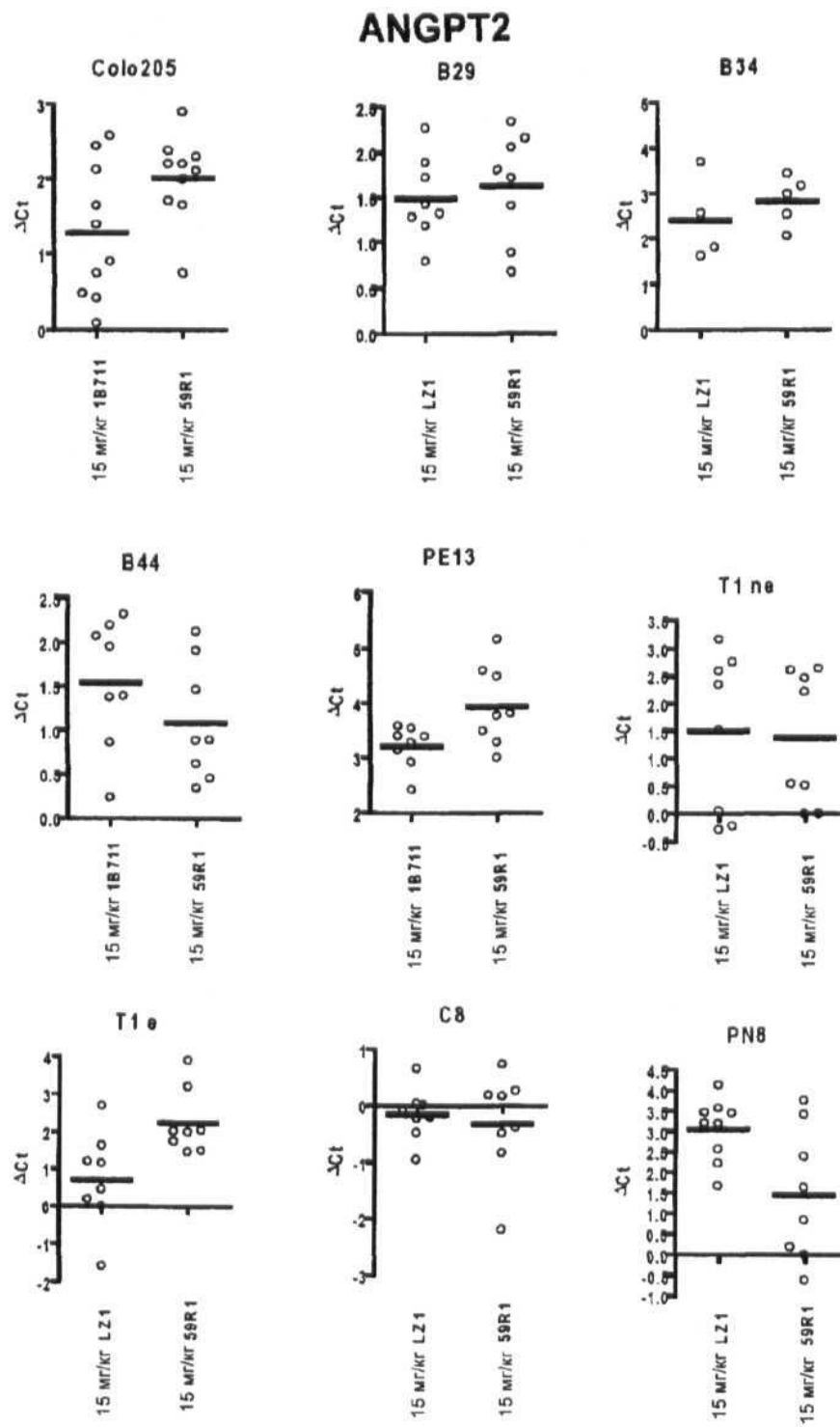
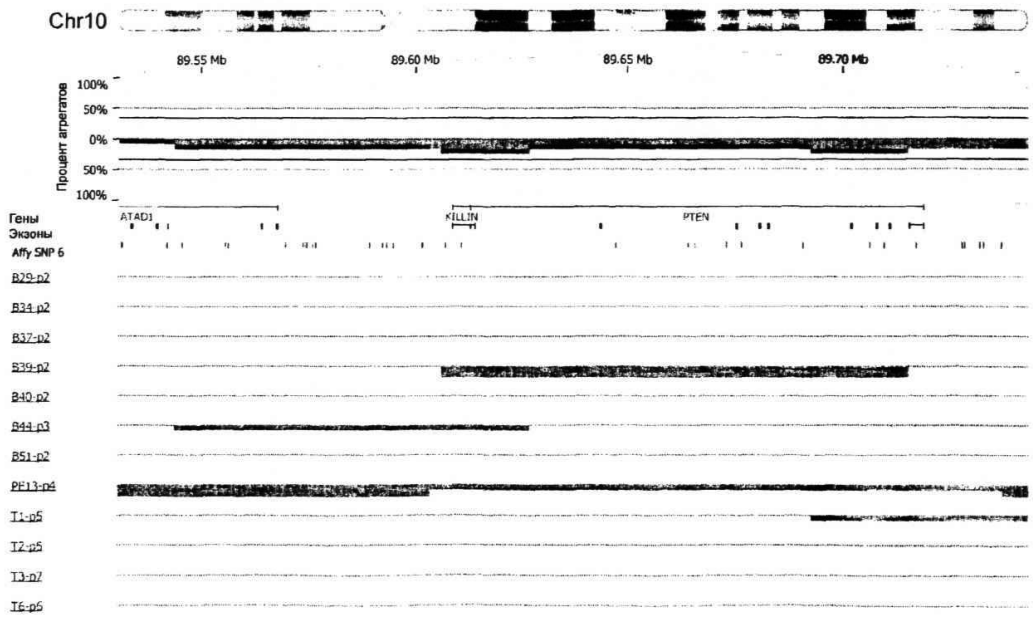
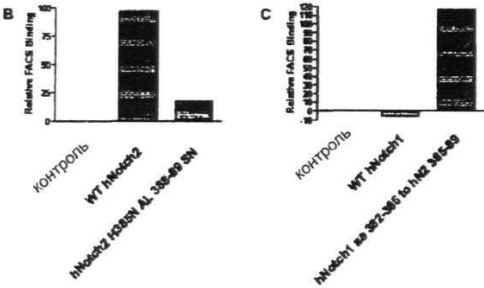


FIG. 12E



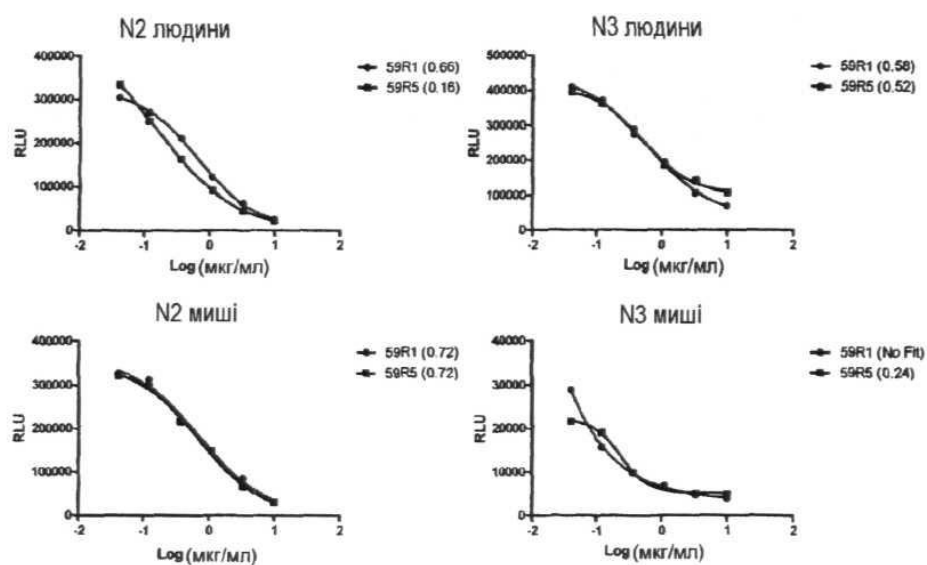
Фиг. 13

A



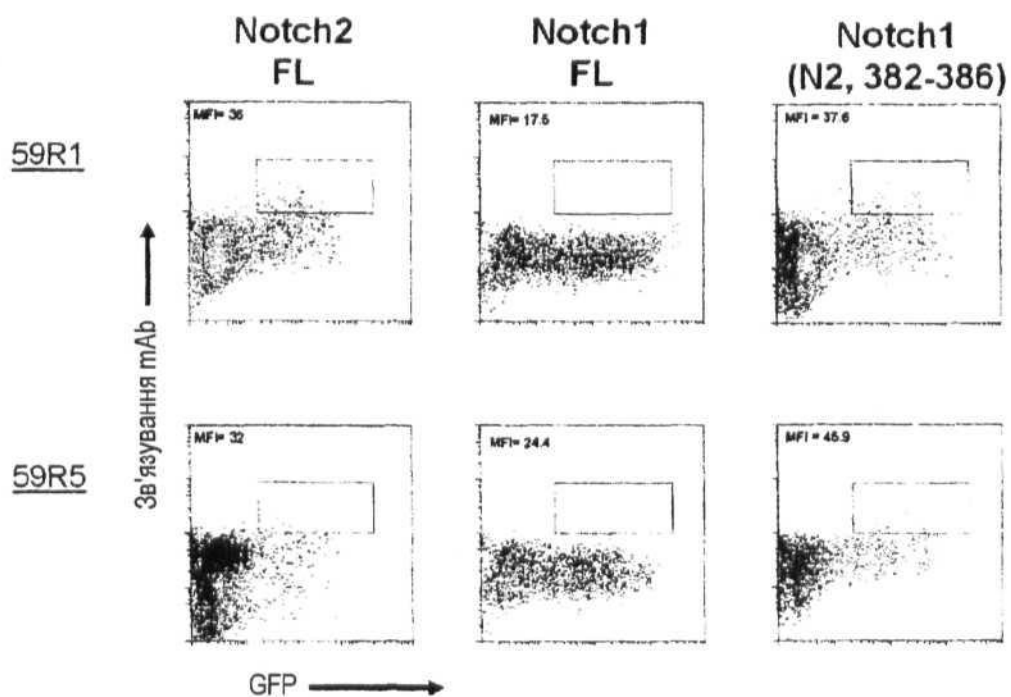
Фиг. 14

15A



ФІГ. 15

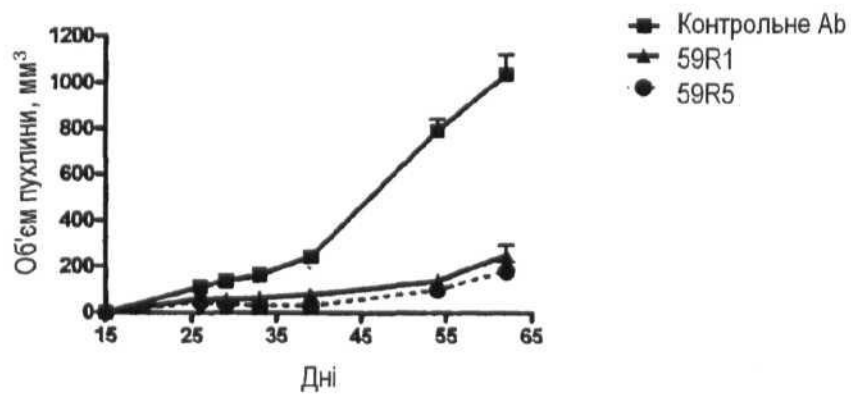
15B



ФІГ. 15

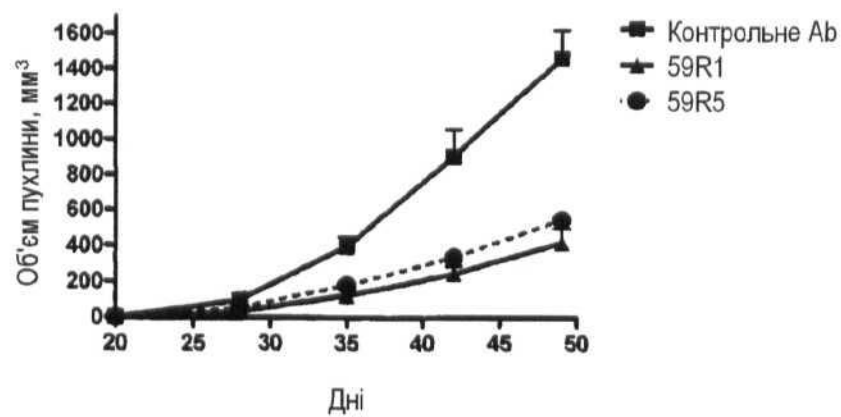
Пухлина молочної залози PE13

16A



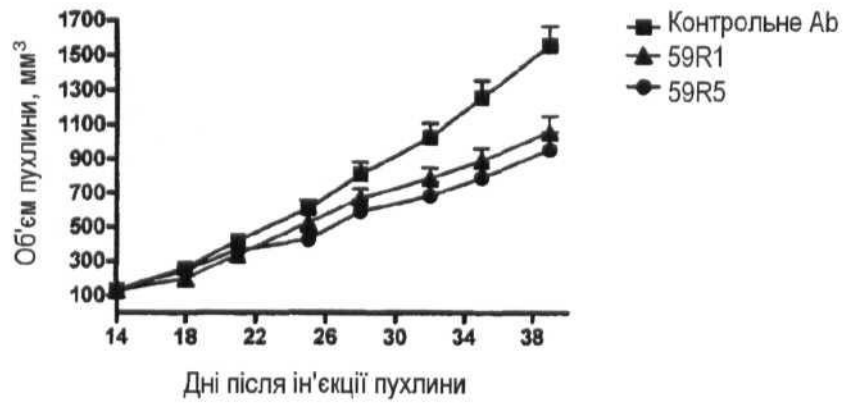
Пухлина ободової кишки C28

16B



ФІГ. 16

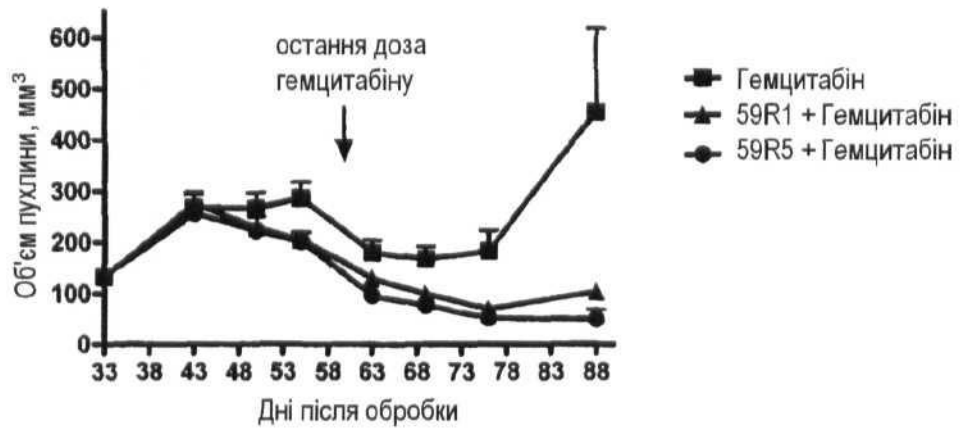
16C

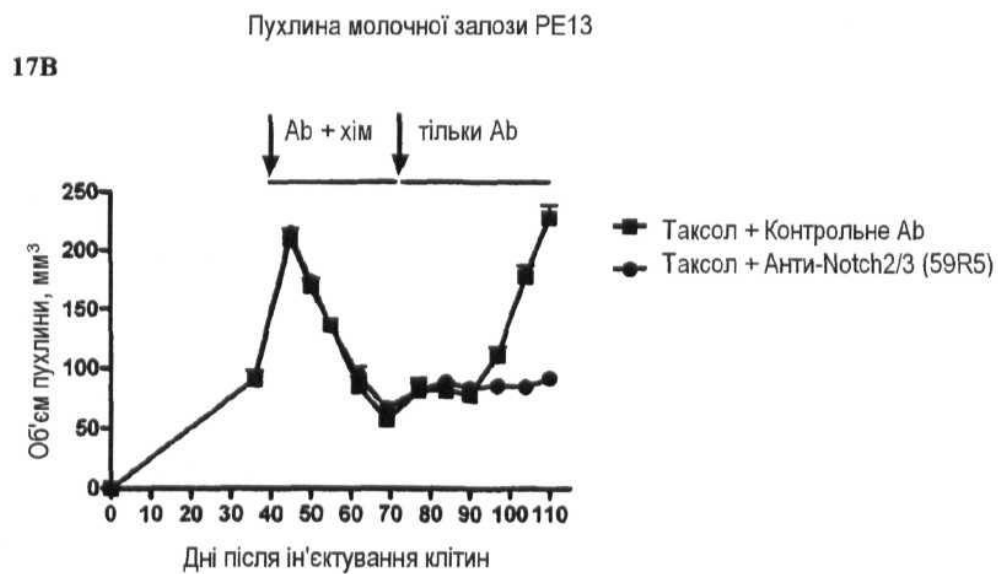


ФІГ. 16

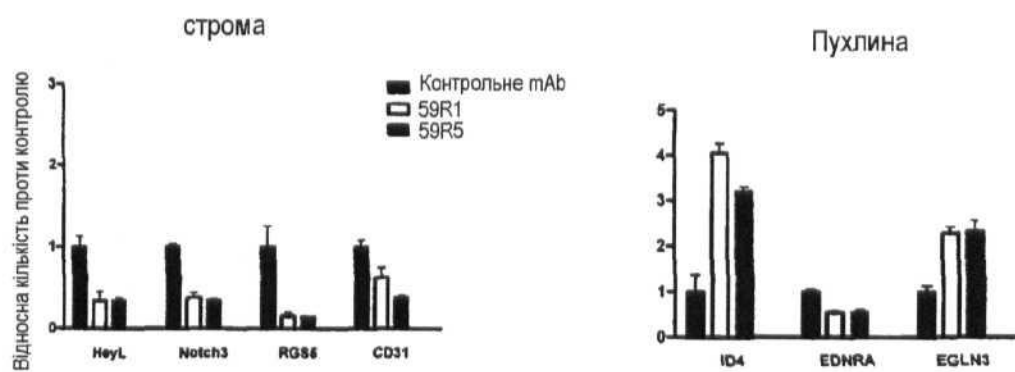
Пухлина підшлункової залози PN8

17A



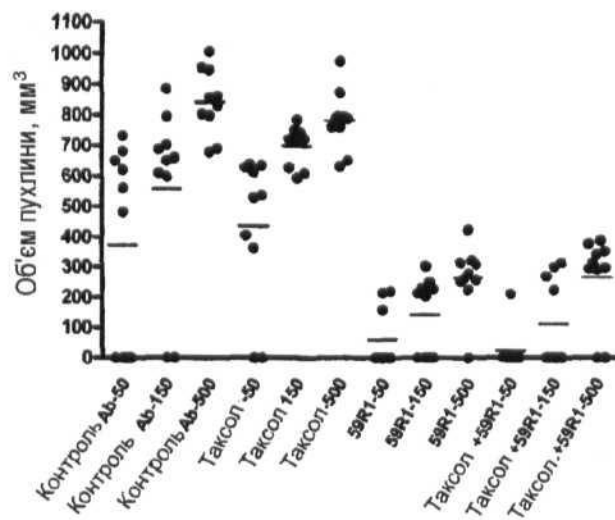


ФІГ. 17

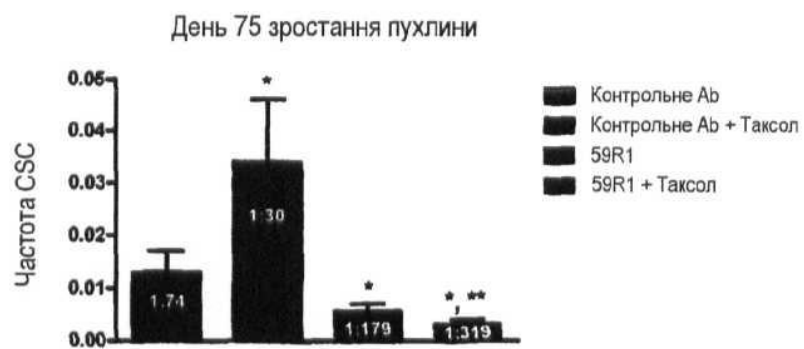


ФІГ. 18

19A



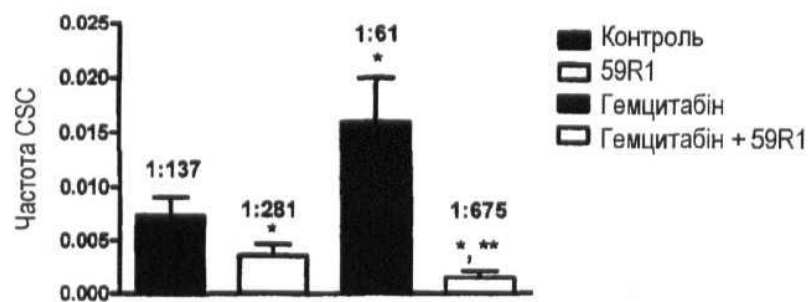
19B



ФІГ. 19

19C

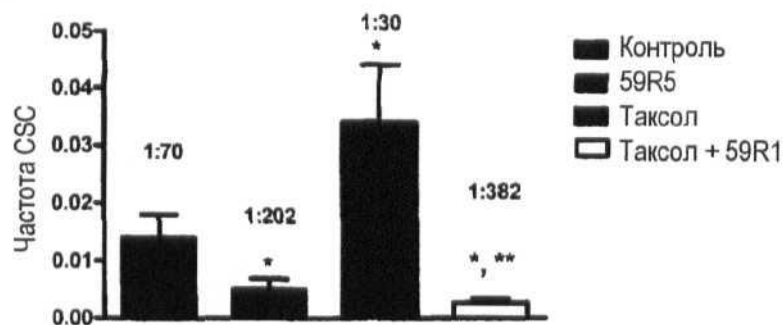
День 86 зростання пухлини



*: $p < 0.05$ vs. Контроль
 **: $p < 0.05$ vs. Гемцитабін

19D

День 39 зростання пухлини



*: $p < 0.05$ vs. Контроль
 **: $p < 0.05$ vs. Таксол

ФІГ. 19

Комп'ютерна верстка Л. Литвиненко

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601