



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **100984** (13) **C2**

(51) МПК (2013.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 15/73 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

A61P 35/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

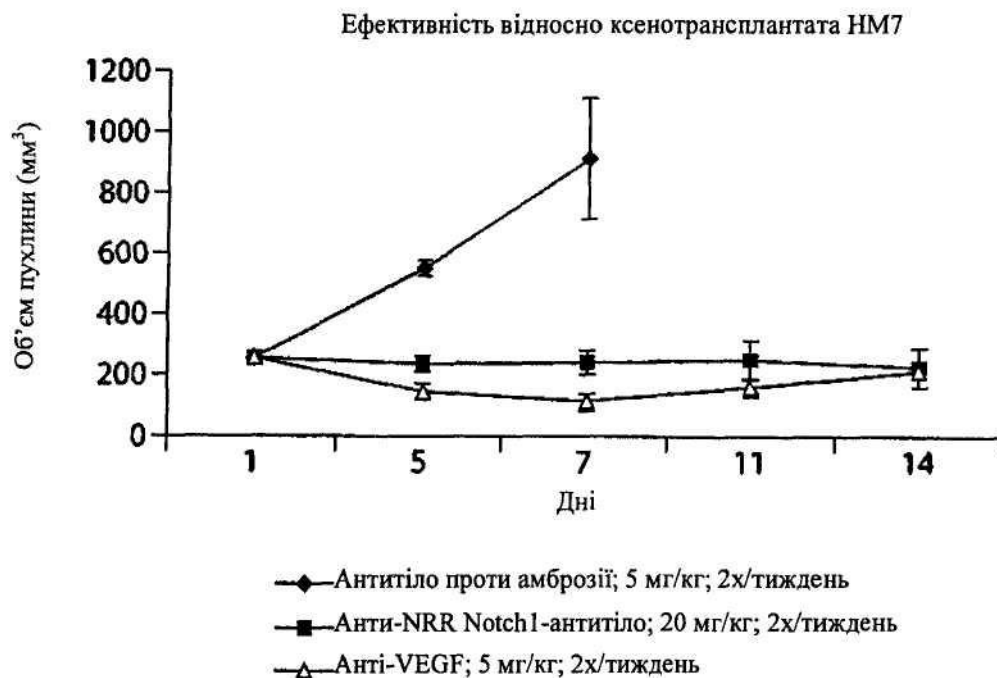
<p>(21) Номер заявки: а 2009 13451</p> <p>(22) Дата подання заявки: 03.06.2008</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 25.02.2013</p> <p>(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 60/933,072, 60/994,646</p> <p>(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 04.06.2007, 20.09.2007</p> <p>(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: US, US</p> <p>(41) Публікація відомостей про заявку: 25.03.2010, Бюл.№ 6</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.02.2013, Бюл.№ 4</p> <p>(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: PCT/US2008/007000, 03.06.2008</p>	<p>(72) Винахідник(и): Сібел Крістіан В. (US), У Янь (US)</p> <p>(73) Власник(и): ДЖЕНЕНТЕК, ІНК., 1 Dna Way, South San Francisco, California 94080-4990, United States of America (US)</p> <p>(74) Представник: Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр. №115</p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 0020576 A, 13.04.2000. WO 2006068822 A, 29.06.2006. WO 0224221 A, 28.03.2002. BOLOS VICTORIA ET AL: "Notch signaling in development and cancer." ENDOCRINE REVIEWS MAY 2007, vol. 28, no. 3, May 2007, pages 339-363. JANG M-S ET AL: "NOTCH SIGNALING AS A TARGET IN MULTIMODALITY CANCER THERAPY" CURRENT OPINION IN MOLECULAR THERAPEUTICS, CURRENT DRUGS, LONDON, GB, vol. 2, no. 1, 1.02.2000, pages 55-65. WO 2006053063 A, 18.05.2006. WO 2007070671 A, 21.06.2007. WO 2008057144 A, 15.05.2008. ALLENSPACH E J ET AL: "NOTCH SIGNALING IN CANCER" CANCER BIOLOGY AND THERAPY, vol. 1, no. 5, 1.09. 2002, pages 466-476. NAKAZAWA M ET AL: "Role of Notch-1 intracellular domain in activation of rheumatoid synoviocytes" MEDLINE, 1.01.1900.</p>
--	---

(54) АНТИТИЛА ПРОТИ NRR NOTCH1 І СПОСОБИ ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ

UA 100984 C2

(57) Реферат:

Винахід належить до анти-NRR Notch1-антитіл, композицій, які містять анти-NRR Notch1-антитіла, способу одержання та способу застосування анти-NRR Notch1-антитіл, поліпептиду, який кодує анти-NRR Notch1-антитіло, вектора, який містить нуклеотид та клітини-хазяїна.



Фіг. 15А

ПЕРЕХРЕСНЕ ПОСИЛАННЯ НА СПОРІДНЕНІ ЗАЯВКИ

У даній заявці вимагається пріоритет по даті подачі попередньої заявки на видачу патенту США з реєстраційним № 60/933072, поданої 4 червня 2007 р., і попередньої заявки на видачу патенту США з реєстраційним № 60/994646, поданої 20 вересня 2007 р., описи яких включені в даний опис у вигляді посилання.

ГАЛУЗЬ ТЕХНІКИ, ДО ЯКОЇ НАЛЕЖИТЬ ВІНАХІД

Даний винахід стосується, головним чином, галузі молекулярної біології. Більш конкретно, винахід стосується антитіл проти області негативної регуляції (NRR) Notch1 і застосувань таких антитіл.

РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

Сімейство рецепторів Notch являє собою клас еволюційно консервативних трансмембранних рецепторів, які передають сигнали, що впливають на розвиток різноманітних організмів, від морських їжаків до людини. І рецептори Notch, і сімейство їх лігандів Delta і Serrate (відомі як Jagged у ссавців) є трансмембранними білками з великими позаклітинними доменами, які містять повтори, подібні епідермальному фактору росту (EGF). Кількість паралогів Notch відрізняється у різних видів. Наприклад, існує чотири рецептори Notch у ссавців (Notch1-Notch4), два у *Caenorhabditis elegans* (LIN-12 і GLP-1) і один у *Drosophila melanogaster* (Notch). Рецептори Notch протеолітично процесуються під час транспорту до клітинної поверхні фуриноподібною протеазою на ділянці S1, розташованій із зовнішньої сторони від трансмембранного домену, вивільняючи позаклітинну субодиночку Notch (ECN) і трансмембранну субодиночку Notch (NTM). Дві вказаних субодиночки залишаються нековалентно асоційованими і складають зрілий гетеродимерний рецептор клітинної поверхні. Субодиночки ECN Notch1 містять 36 N-кінцевих EGF-подібних повторів, за якими ідуть три тандемно повторюваних модулі Lin 12/Notch-повторів (LNR), які передують ділянці S1. Кожний модуль LNR містить три дисульфідних зв'язки і групу консервативних кислих і полярних залишків, які передбачувано координують іон кальцію. У області EGF-повтору знаходяться ділянки зв'язування активуючих лігандів. Модулі LNR, які містять унікальний домен рецепторів Notch, беруть участь в підтриманні Notch в конформації, відповідній стану спокою, перед індукованою лігандом активацією. NTM Notch1 містить позаклітинну область (яка включає сайт розщеплення S2), трансмембранний фрагмент (який несе сайт розщеплення S3) і велику внутрішньоклітинну частину, яка включає домен RAM, повтори анкірину, домен трансактивації і послідовність PEST на карбоксильному кінці. Стабільна асоціація субодиночок ECN і NTM залежить від домену гетеродимеризації (HD), що містить карбоксильний кінець ECN (називаний HD-C) і позаклітинний амінокінець NTM (називаний HD-N). Зв'язування ліганду Notch з субодиночкою ECN ініціює два протеолітичних розщеплення, що ідуть одне за одним, які відбуваються внаслідок регульованого внутрішньомембранного протеолізу. Перше розщеплення металопротеазою в сайті S2 робить трансмембранну субодиночку Notch чутливою до другого розщеплення в сайті S3, розташованому поблизу внутрішнього листка плазматичної мембрани. Розщеплення в сайті S3, яке каталізується мультибілковим комплексом, що містить пресенілін і нікастрин, вивільняє внутрішньоклітинну частину трансмембранної субодиночки Notch, забезпечуючи можливість її транслокації в ядро і активації транскрипції генів-мішеней.

У людини ідентифіковано п'ять лігандів Notch класу Jagged і Delta-подібного класу (Jagged 1 (також називаний Serrate 1), Jagged 2 (також називаний Serrate 2), Delta-подібний 1 (також називаний DLL1), Delta-подібний 3 (також називаний DLL3) і Delta-подібний 4 (також називаний DLL4)). Кожний з лігандів є однопрохідним трансмембранним білком з консервативним N-кінцевим мотивом Delta, Serrate, LAG-2 (DSL), необхідним для зв'язування Notch. Серія EGF-подібних модулів, C-кінцевих відносно мотиву DSL, передують фрагменту, що пронизує мембрану. На відміну від рецепторів Notch ліганди мають короткі цитоплазматичні хвости з 70-215 амінокислот на C-кінці. Крім того, повідомлялося про інші типи лігандів (наприклад, DNER, NB3 і F3/контактин).

Шлях Notch функціонує в ході різних процесів розвитку і фізіологічних процесів, включаючи вплив на нейрогенез у двокрилих і хребетних. Загалом, передача сигналів Notch залучена у латеральне гальмування, прийняття рішень про вибір лінії клітин і створення границь між групами клітин (дивись, наприклад, Bray, *Molecular Cell Biology* 7: 678-679, 2006). Показано, що множина захворювань людини, включаючи злоякісні пухлини і нейродегенеративні порушення, є результатом мутацій в генах, що кодують рецептори Notch або їх ліганди (дивись, наприклад, Nam et al., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6: 501-509, 2002). Зв'язок між необмеженою передачею сигналів Notch і злоякісністю уперше був виявлений, коли ідентифікували рекурентну хромосомну транслокацію t (7; 9) (q34; q34.3), яка створює укорочений, конститутивно активний

варіант Notch1 людини, в підгрупі пацієнтів з гострим лімфобластним лейкозом (T-ALL). У мишачих моделях показано, що передача сигналів Notch1 необхідна для розвитку Т-клітин і що опосередковані Notch1 сигнали стимулюють розвиток Т-клітин за рахунок розвитку В-клітин. Також в мишачих моделях надмірна передача сигналів Notch під час розвитку приводить до неоплазії Т-клітин.

Крім того, рецептори Notch експресуються у великому числі злоякісних пухлин людини і одержаних з пухлин клітинних ліній і стимулюють шлях розвитку клітин нервової системи з ембріональних стовбурових клітин людини. Наприклад, Notch експресується на високому рівні при неопластичних ураженнях шийки матки людини і в клітинах печінковоклітинної карциноми людини. Беручи до уваги участь шляху передачі сигналів Notch в широкій множині захворювань людини, ясно, що зберігається потреба в засобах, які регулюють передачу сигналів Notch, що мають клінічні характеристики, які є оптимальними для розробки терапевтичних засобів. Винахід, описаний в цьому документі, задовольняє таку потребу і забезпечує інші переваги.

Всі публікації, згадувані в даному описі, включаючи заявки на видачу патентів і публікації патентів, включені у вигляді посилання в повному об'ємі.

СУТЬ ВИНАХОДУ

Винахід частково основане на ідентифікації множини агентів, що зв'язують область негативної регуляції (NRR) Notch1 (таких як антитіла і їх фрагменти). NRR Notch1 являє собою важливу і корисну терапевтичну мішень, і винахід стосується композицій і способів, основаних на зв'язуванні NRR Notch1. Засоби, що зв'язують NRR Notch1 згідно з винаходом, які описані в цьому документі, являють собою цінні терапевтичні і діагностичні засоби для застосування у випадку цілеспрямованого впливу на патологічні стани, асоційовані з експресією і/або активністю шляхів передачі сигналів Notch1. Відповідно, винахід стосується способів, композицій, наборів і виробів, які стосуються зв'язування NRR Notch1.

Даний винахід стосується антитіл, які зв'язуються з NRR Notch1. У одному аспекті відмітною ознакою винаходу є ізольоване антитіло, яке зв'язує NRR Notch1. У конкретному аспекті у винаході охарактеризоване ізольоване антитіло проти NRR Notch1, яке зв'язує NRR Notch1 з K_d 1×10^{-7} або сильніше. У переважних варіантах антитіло проти NRR Notch1 зв'язує NRR Notch1 з K_d 1×10^{-8} або сильніше або з K_d 1×10^{-9} або сильніше. У іншому аспекті винахід стосується ізольованого анти-NRR Notch1-антитіла, де повнорозмірна IgG-форма антитіла зв'язує NRR Notch1 людини і миші з K_d 1×10^{-7} або сильніше. Як добре встановлено в даній галузі, афінність зв'язування ліганду з його рецептором може бути визначена з використанням будь-якого з множини аналізів і виражена різними кількісними показниками. Відповідно, в одному варіанті афінність зв'язування виражають у вигляді значень K_d , які відображають дійсну афінність зв'язування (наприклад, з мінімізованими ефектами авідності). Звичайно і переважно афінність зв'язування вимірюють *in vitro* або в безклітинних системах, або в асоційованих з клітинами системах. Можна використовувати будь-який з множини аналізів, відомих в даній галузі, включаючи аналізи, описані в цьому документі, для проведення вимірювань афінності зв'язування, включаючи, наприклад, Біаcore, радіоімунаналіз (RIA) і ELISA.

У одному аспекті відмітною ознакою винаходу є ізольоване анти-NRR Notch1-антитіло, яке містить:

(а) щонайменше одну, дві, три, чотири або п'ять послідовностей гіперваріабельних областей (HVR), вибраних з:

(i) HVR-L1, що містить послідовність A1-A11, де A1-A11 являє собою RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 7),

(ii) HVR-L2, що містить послідовність B1-B7, де B1-B7 являє собою SASFLYS (SEQ ID NO: 8),

(iii) HVR-L3, що містить послідовність C1-C9, де C1-C9 являє собою QQSYTTPPT (SEQ ID NO: 9),

(iv) HVR-H1, що містить послідовність D1-D10, де D1-D10 являє собою GFTFSSYWIH (SEQ ID NO: 1),

(v) HVR-H2, що містить послідовність E1-E18, де E1-E18 являє собою ARINPSNGSTNYADSVKG (SEQ ID NO: 2), і

(vi) HVR-H3, що містить послідовність F1-F14, де F1-F14 являє собою ARGSGFRWVMDY (SEQ ID NO: 6); і

(б) щонайменше один варіант HVR, де послідовність варіанта HVR містить модифікацію щонайменше одного залишку в послідовності, вказаній в SEQ ID NO: 1-12. Модифікація за потреби являє собою заміну, інсерцію або делецію.

У бажаних варіантах здійснення винаходу варіант HVR-L3 містить 1-4 (1, 2, 3 або 4) заміни в будь-якому поєднанні наступних положень: C3 (S або F), C4 (Y або F), C5 (T або S) і C8 (P або

А або S). У іншому бажаному варіанті здійснення винаходу варіант HVR-H2 містить 1-4 (1, 2, 3 або 4) заміни в будь-якому поєднанні наступних положень: E6 (S або P або A); E8 (G або R); E10 (T або A або N); і E11 (N або H або Q або R).

У іншому аспекті відмітною ознакою винаходу є ізольоване анти-NRR Notch1-антитіло, яке містить одну, дві, три, чотири, п'ять або шість HVR, де кожна HVR містить, складається або по суті складається з послідовності, вибраної з послідовностей SEQ ID NO: 1-12, і де послідовність SEQ ID NO: 7 відповідає HVR-L1, послідовність SEQ ID NO: 8 відповідає HVR-L2, послідовність SEQ ID NO: 9, 10, 11 або 12 відповідає HVR-L3, послідовність SEQ ID NO: 1 відповідає HVR-H1, послідовність SEQ ID NO: 2, 3, 4 або 5 відповідає HVR-H2 і послідовність SEQ ID NO: 6 відповідає HVR-H3.

У одному аспекті винаходу пропонується антитіло, яке містить область HVR-H1, що включає послідовність SEQ ID NO: 1. У одному аспекті у винаході пропонується антитіло, яке містить область HVR-H2, що включає послідовність SEQ ID NO: 2, 3, 4 або 5. В одному аспекті у винаході пропонується антитіло, яке містить область HVR-H3, що включає послідовність SEQ ID NO: 6. У одному аспекті у винаході пропонується антитіло, яке містить HVR-L3, що включає послідовність SEQ ID NO: 10, 11 або 12.

У одному аспекті у винаході пропонується антитіло, яке містить щонайменше одну, щонайменше дві, щонайменше три або всі чотири з наступних послідовностей:

- (i) послідовність HVR-H1, що містить послідовність SEQ ID NO: 1;
- (ii) послідовність HVR-H2, що містить послідовність SEQ ID NO: 2, 3, 4 або 5;
- послідовність HVR-H3, що містить послідовність SEQ ID NO: 6;
- послідовність HVR-L3, що містить послідовність SEQ ID NO: 10, 11 або 12.

У переважному варіанті антитіло містить області HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, де кожна по порядку містить послідовність SEQ ID NO: 7, 8, 9, 1, 2, 6. В іншому переважному варіанті антитіло містить області HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, де кожна по порядку містить послідовність SEQ ID NO: 7, 8, 10, 1, 3, 6. В наступному переважному варіанті антитіло містить області HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, де кожна по порядку містить послідовність SEQ ID NO: 7, 8, 11, 1, 4, 6. В наступному переважному варіанті антитіло містить області HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, де кожна по порядку містить послідовність SEQ ID NO: 7, 8, 12, 1, 5, 6.

Амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 1-12 пронумеровані згідно з окремими HVR (тобто H1, H2 або H3), які вказані на фігурі 1, при цьому нумерація відповідає системі нумерації Кабата, яка описана нижче.

У одному конкретному аспекті у винаході пропонується ізольоване анти-NRR Notch1-антитіло, яке інгібує, знижує і/або блокує передачу сигналів Notch1. Деякі варіанти антитіл згідно з винаходом містять варіабельний домен легкого ланцюга гуманізованого антитіла 4D5 (huMAb4D5-8) (HERCEPTIN®, Genentech, Inc., South San Francisco, Calif., USA) (також згадуваного в патенті США № 6407213 і в публікації Lee et al., J. Mol. Biol. (2004), 340(5): 1073-1093), який зображений у вигляді послідовності SEQ ID NO: 53 нижче.

**I Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg
Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr
Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu
Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys 107
(SEQ ID NO:53) (залишки HVR підкреслені)**

У одному варіанті послідовність варіабельного домену легкого ланцюга huMAb4D5-8 модифікована в одному або декількох положеннях 30, 66 і 91 (Asn, Arg і His, які вказані жирним шрифтом/курсивом вище, відповідно). У конкретному варіанті модифікована послідовність huMAb4D5-8 містить Ser в положенні 30, Gly в положенні 66 і/або Ser в положенні 91. Відповідно, в одному варіанті антитіло згідно з винаходом містить варіабельний домен легкого ланцюга, що містить послідовність, зображену в SEQ ID NO: 54 нижче:

1 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg
Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala Trp Tyr
Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu
Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys 107
(SEQ ID NO:54) (залишки HVR підкреслені)

Замінені залишки відносно huMAb4D5-8 показані жирним шрифтом/курсивом.

5 Антитіла згідно з винаходом можуть містити будь-яку послідовність варіабельного домену
 каркаса, за умови, що активність зв'язування з NRR Notch1 по суті зберігається. Наприклад, в
 деяких варіантах антитіла згідно з винаходом містять консенсусну послідовність каркаса
 важкого ланцюга підгрупи III людини. У одному варіанті таких антитіл, каркасна консенсусна
 послідовність містить заміну в положенні 71, 73 і/або 78. У деяких варіантах таких антитіл
 10 положення 71 представлене А, 73 представлене Т і/або 78 представлене А. В одному варіанті
 такі антитіла містять каркасні послідовності варіабельного домену важкого ланцюга huMAb4D5-
 8 (HERCEPTIN®, Genentech, Inc., South San Francisco, Calif., USA) (також описано в патентах
 США №№ 6407213 і 5821337 і в Lee et al., J. Mol. Biol. (2004), 340(5): 1073-1093). В одному
 варіанті такі антитіла додатково містять консенсусну каркасну послідовність легкого ланцюга кі
 людини. У конкретному варіанті такі антитіла містять послідовності HVR легкого ланцюга
 15 huMAb4D5-8, що описано в патентах США №№ 6407213 і 5821337.) У одному варіанті такі
 антитіла містять послідовності варіабельного домену легкого ланцюга huMAb4D5-8
 (HERCEPTIN®, Genentech, Inc., South San Francisco, Calif., USA) (також описаного в патентах
 США №№ 6407213 і 5821337 і в Lee et al., J. Mol. Biol. (2004), 340(5): 1073-1093).

У одному варіанті антитіло згідно з винаходом містить варіабельний домен важкого
 20 ланцюга, в якому каркасна послідовність містить послідовність SEQ ID NO: 19, 20, 21, 22, 23,
 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 і/або 37, і послідовності HVR H1, H2 і H3 являють
 собою послідовності SEQ ID NO: 1, 2 і/або 6, відповідно. У іншому варіанті каркасна
 послідовність містить послідовність SEQ ID NO: 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31,
 32, 33, 34, 35, 36 і/або 37, і послідовності HVR H1, H2 і H3 являють собою послідовності SEQ ID
 25 NO: 1, 3 і/або 6, відповідно. У ще одному варіанті каркасна послідовність містить послідовність
 SEQ ID NO: 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 і/або 37, і
 послідовності HVR H1, H2 і H3 являють собою послідовності SEQ ID NO: 1, 4 і/або 6, відповідно.
 У наступному варіанті каркасна послідовність містить послідовність SEQ ID NO: 19, 20, 21, 22,
 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 і/або 37, і послідовності HVR H1, H2 і H3
 30 являють собою послідовності SEQ ID NO: 1, 5 і/або 6, відповідно.

У конкретному варіанті антитіло згідно з винаходом містить варіабельний домен легкого
 ланцюга, в якому каркасна послідовність містить послідовність SEQ ID NO: 38, 39, 40 і/або 41, і
 послідовності HVR L1, L2 і L3 являють собою послідовності SEQ ID NO: 7, 8 і/або 9, відповідно.
 У іншому варіанті антитіло згідно з винаходом містить варіабельний домен легкого ланцюга, в
 35 якому каркасна послідовність містить послідовність SEQ ID NO: 38, 39, 40 і/або 41, і
 послідовності HVR L1, L2 і L3 являють собою послідовності SEQ ID NO: 7, 8 і/або 10, відповідно.
 У додатковому варіанті антитіло згідно з винаходом містить варіабельний домен легкого
 ланцюга, в якому каркасна послідовність містить послідовність SEQ ID NO: 38, 39, 40 і/або 41, і
 послідовності HVR L1, L2 і L3 являють собою послідовності SEQ ID NO: 7, 8 і/або 11, відповідно.
 40 У ще одному варіанті антитіло згідно з винаходом містить варіабельний домен легкого
 ланцюга, в якому каркасна послідовність містить послідовність SEQ ID NO: 38, 39, 40 і/або 41, і
 послідовності HVR L1, L2 і L3 являють собою послідовності SEQ ID NO: 7, 8 і/або 12, відповідно.

У іншому варіанті антитіло згідно з винаходом містить варіабельний домен важкого
 ланцюга, в якому каркасна послідовність містить послідовність SEQ ID NO: 42, 43, 44 і/або 45, і
 45 послідовності HVR H1, H2 і H3 являють собою послідовності SEQ ID NO: 1, 2 і/або 6, відповідно.
 У додатковому варіанті антитіло згідно з винаходом містить варіабельний домен важкого
 ланцюга, в якому каркасна послідовність містить послідовність SEQ ID NO: 42, 43, 44 і/або 45, і
 послідовності HVR H1, H2 і H3 являють собою послідовності SEQ ID NO: 1, 3 і/або 6, відповідно.

варіанті антитіло згідно з винаходом містить варіабельний домен легкого ланцюга, що містить послідовність SEQ ID NO: 63. У одному варіанті антитіло згідно з винаходом містить варіабельний домен важкого ланцюга, що містить послідовність SEQ ID NO: 62, і варіабельний домен легкого ланцюга, що містить послідовність SEQ ID NO: 63. У іншому аспекті антитіло згідно з винаходом містить варіабельний домен важкого ланцюга, що містить послідовність SEQ ID NO: 64. У одному варіанті антитіло згідно з винаходом містить варіабельний домен легкого ланцюга, що містить послідовність SEQ ID NO: 65. У одному варіанті антитіло згідно з винаходом містить варіабельний домен важкого ланцюга, що містить послідовність SEQ ID NO: 64, і варіабельний домен легкого ланцюга, що містить послідовність SEQ ID NO: 65.

У одному аспекті у винаході пропонується антитіло, яке конкурує з будь-яким з описаних вище антитіл за зв'язування з NRR Notch1. У одному аспекті у винаході пропонується антитіло, яке зв'язується з тим же самим або подібним епітопом на NRR Notch1, що і будь-яке з описаних вище антитіл.

Як відомо в даній галузі і як описано більш детально нижче, положення амінокислот/визначення границь гіперваріабельної області антитіла можуть варіювати залежно від контексту і різних визначень, відомих в даній галузі (які описані нижче). Деякі положення у варіабельному домені можуть розглядатися як гібридні гіперваріабельні положення, оскільки такі положення можна вважати такими, що знаходяться в гіперваріабельній області згідно з однією групою критеріїв, а також вважати такими, що знаходяться поза гіперваріабельною областю згідно з іншою групою критеріїв. Одне або декілька таких положень також можна знайти в розширених гіперваріабельних областях (які додатково визначені нижче).

У деяких варіантах антитіло є моноклональним антитілом. У інших варіантах антитіло є поліклональним антитілом. У деяких варіантах антитіло вибране з групи, яка складається з химерного антитіла, антитіла з дозрілою афінністю, гуманізованого антитіла і антитіла людини. У деяких варіантах антитіло являє собою фрагмент антитіла. У деяких варіантах антитіло являє собою Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂ або scFv.

У одному варіанті антитіло є химерним антитілом, наприклад, антитілом, яке містить антигензв'язувальні послідовності донора, відмінного від людини, до яких прищеплена гетерологічна послідовність тварини, відмінної від людини, людини або гуманізована послідовність (наприклад, каркасні послідовності і/або послідовності константного домену). У одному варіанті донором, відмінним від людини, є миша. У наступному варіанті антигензв'язувальна послідовність є синтетичною, наприклад, одержана за допомогою мутагенезу (наприклад, з використанням скринінгу в фаговому дисплеї і т. д.). У конкретному варіанті химерне антитіло згідно з винаходом має мишачі V-області і людську C-область. У одному варіанті V-область легкого ланцюга миші зливаються з легким ланцюгом каппа людини. У іншому варіанті V-область важкого ланцюга миші зливаються з C-областю IgG1 людини.

Гуманізовані антитіла згідно з винаходом включають антитіла, які мають амінокислотні заміни в каркасній області (FR), і варіанти по дозріванню афінності із змінами в прищеплених CDR. Замінювані амінокислоти в CDR або FR не обмежені амінокислотами, присутніми в донорному або реципієнтному антитілі. У інших варіантах антитіла згідно з винаходом додатково містять зміни в амінокислотних залишках в Fc-області, які приводять до поліпшеної ефекторної функції, включаючи посилену функцію CDC і/або ADCC і В-клітинний кілінг. Інші антитіла згідно з винаходом включають антитіла, що мають специфічні зміни, які підвищують стабільність. У інших варіантах антитіла згідно з винаходом містять зміни амінокислотних залишків в Fc-області, які приводять до зниженої ефекторної функції, наприклад, зниженої функції CDC і/або ADCC і/або зниженого В-клітинного кілінгу. У деяких варіантах антитіла згідно з винаходом характеризуються зниженим зв'язуванням (наприклад, відсутністю зв'язування) з фактором комплементу C1q людини і/або Fc-рецептором людини на природних клітинах-кілерах (NK). У деяких варіантах антитіла згідно з винаходом характеризуються зниженим зв'язуванням (наприклад, відсутністю зв'язування) з FcγRI, FcγRIIA і/або FcγRIIIA. У деяких варіантах антитіла згідно з винаходом стосуються класу IgG (наприклад, IgG1 або IgG4) і містять щонайменше одну мутацію в E233, L234, G236, D265, D270, N297, E318, K320, K322, A327, A330, P331 і/або P329 (нумерація згідно з покажчиком EU). У деяких варіантах антитіла містять мутації L234A/L235A або D265A/N297A.

У одному аспекті у винаході пропонується анти-NRR Notch1-поліпептиди, які містять будь-яку з антигензв'язувальних послідовностей, пропонованих у винаході, при цьому анти-NRR Notch1-поліпептиди специфічно зв'язуються з NRR Notch1, наприклад, з NRR Notch1 людини або миші.

Антитіла згідно з винаходом зв'язують (наприклад, специфічно зв'язують) NRR Notch1 і в деяких варіантах можуть модулювати один або декілька аспектів передачі сигналу Notch1 і/або

порушення будь-якого біологічно важливого біологічного шляху Notch1 і/або ліганду Notch1, і/або лікування і/або профілактику пухлини, клітинного проліферативного порушення або злоякісної пухлини, і/або лікування або профілактику порушення, асоційованого з експресією і/або активністю Notch1 (такою як підвищена експресія і/або активність Notch1). У деяких

варіантах антитіло проти NRR Notch1 специфічно зв'язується з поліпептидом, що складається або в основному складається з NRR Notch1 (наприклад, NRR Notch1 людини або миші). У деяких варіантах антитіло специфічно зв'язує Notch1 з K_d 1×10^{-7} або сильніше. У деяких варіантах антитіло згідно з винаходом зменшує, інгібує і/або блокує активність Notch1 in vivo і/або in vitro.

У одному аспекті винахід стосується застосування антитіла згідно з винаходом для одержання лікарського засобу для терапевтичного і/або профілактичного лікування порушення, такого як злоякісна пухлина, пухлина і/або клітинне проліферативне порушення. У деяких варіантах порушення являє собою невропатію або нейродегенеративне захворювання. У наступних переважних варіантах порушення являє собою патологічний стан, асоційований з ангіогенезом. У деяких варіантах патологічним станом, асоційованим з ангіогенезом, є внутрішньоочне неоваскулярне захворювання.

У одному аспекті у винаході пропонуються композиції, які містять одне або декілька антитіл згідно з винаходом і носій. У одному варіанті носій є фармацевтично прийнятним.

У іншому аспекті у винаході пропонуються нуклеїнові кислоти, які кодують анти-NRR Notch1-антитіло згідно з винаходом.

У ще одному аспекті у винаході пропонуються вектори, які містять нуклеїнову кислоту згідно з винаходом.

У наступному аспекті у винаході пропонуються композиції, які містять одну або декілька нуклеїнових кислот згідно з винаходом і носій. У одному варіанті носій є фармацевтично прийнятним.

У одному аспекті у винаході пропонуються клітини-хазяїни, які містять нуклеїнову кислоту або вектор згідно з винаходом. Вектор може бути будь-якого типу, наприклад, рекомбінантний вектор, такий як експресуючий вектор. Можна використати будь-які з множини клітин-хазяїнів. У одному варіанті клітиною-хазяїном є прокаріотична клітина, наприклад, *E. coli*. У іншому варіанті клітиною-хазяїном є еукаріотична клітина, наприклад, клітина ссавця, така як клітина яєчника китайського хом'ячка (CHO).

У наступному аспекті у винаході пропонуються способи одержання антитіла згідно з винаходом. Наприклад, у винаході пропонуються способи одержання анти-NRR Notch1-антитіла (яке, як визначено в даному описі, включає повнорозмірне антитіло і його фрагменти), де вказаний спосіб включає експресію у придатній клітині-хазяїні рекомбінантного вектора згідно з винаходом, що кодує антитіло (або його фрагмент), і витягання антитіла.

У одному аспекті у винаході пропонується виріб, який містить місткість і композицію, що знаходиться в місткості, при цьому композиція містить одне або декілька анти-NRR Notch1-антитіл згідно з винаходом. У одному варіанті композиція містить нуклеїнову кислоту згідно з винаходом. У іншому варіанті композиція, яка містить антитіло, додатково містить носій, який в деяких варіантах є фармацевтично прийнятним. У одному варіанті виріб згідно з винаходом додатково включає інструкції по введенню композиції (наприклад, антитіла) людині (наприклад, інструкції по застосуванню будь-якого зі способів, описаних в цьому документі).

У іншому аспекті у винаході пропонується набір, який включає першу місткість, що містить композицію, яка містить одне або декілька анти-NRR Notch1-антитіл згідно з винаходом, і другу місткість, що містить буфер. У одному варіанті буфер є фармацевтично прийнятним. У одному варіанті композиція, яка містить антитіло, додатково містить носій, який в деяких варіантах є фармацевтично прийнятним. У іншому варіанті набір додатково містить інструкції по введенню композиції (наприклад, антитіла) людині.

У наступному аспекті винахід стосується застосування анти-NRR Notch1-антитіла згідно з винаходом для одержання лікарського засобу для терапевтичного і/або профілактичного лікування порушення, такого як злоякісна пухлина, пухлина і/або клітинне проліферативне порушення. У деяких варіантах порушення являє собою невропатію або нейродегенеративне захворювання. У наступних переважних варіантах порушення є патологічний стан, асоційований з ангіогенезом. У деяких варіантах патологічним станом, асоційованим з ангіогенезом, є пухлина, злоякісна пухлина і/або клітинне проліферативне порушення. У деяких варіантах патологічним станом, асоційованим з ангіогенезом, є внутрішньоочне неоваскулярне захворювання.

У одному аспекті винахід стосується застосування нуклеїнової кислоти згідно з винаходом для одержання лікарського засобу для терапевтичного і/або профілактичного лікування порушення, такого як злоякісна пухлина, пухлина і/або клітинне проліферативне порушення. У деяких варіантах порушення являє собою невропатію або нейродегенеративне захворювання.

5 У наступних переважних варіантах порушенням є патологічний стан, асоційований з ангіогенезом. У деяких варіантах патологічним станом, асоційованим з ангіогенезом, є пухлина, злоякісна пухлина і/або клітинне проліферативне порушення. У деяких варіантах патологічним станом, асоційованим з ангіогенезом, є внутрішньоочне неоваскулярне захворювання.

10 У іншому аспекті винахід стосується застосування експресуючого вектора згідно з винаходом для одержання лікарського засобу для терапевтичного і/або профілактичного лікування порушення, такого як злоякісна пухлина, пухлина і/або клітинне проліферативне порушення. У деяких варіантах порушення являє собою невропатію або нейродегенеративне захворювання. У наступних переважних варіантах порушенням є патологічний стан, асоційований з ангіогенезом. У деяких варіантах патологічним станом, асоційованим з ангіогенезом, є пухлина, злоякісна пухлина і/або клітинне проліферативне порушення. У деяких

15 варіантах патологічним станом, асоційованим з ангіогенезом, є внутрішньоочне неоваскулярне захворювання.

У наступному аспекті винахід стосується застосування клітини-хазяїна згідно з винаходом для одержання лікарського засобу для терапевтичного і/або профілактичного лікування порушення, такого як злоякісна пухлина, пухлина і/або клітинне проліферативне порушення. У деяких варіантах порушення являє собою невропатію або нейродегенеративне захворювання. У наступних переважних варіантах порушенням є патологічний стан, асоційований з ангіогенезом. У деяких варіантах патологічним станом, асоційованим з ангіогенезом, є пухлина, злоякісна пухлина і/або клітинне проліферативне порушення. У деяких варіантах патологічним станом, асоційованим з ангіогенезом, є внутрішньоочне неоваскулярне захворювання.

20 У наступному аспекті винахід стосується застосування виробу згідно з винаходом для одержання лікарського засобу для терапевтичного і/або профілактичного лікування порушення, такого як злоякісна пухлина, пухлина і/або клітинне проліферативне порушення. У деяких варіантах порушення являє собою невропатію або нейродегенеративне захворювання. У наступних переважних варіантах порушенням є патологічний стан, асоційований з ангіогенезом. У деяких варіантах патологічним станом, асоційованим з ангіогенезом, є пухлина, злоякісна пухлина і/або клітинне проліферативне порушення. У деяких варіантах патологічним станом, асоційованим з ангіогенезом, є внутрішньоочне неоваскулярне захворювання.

30 У одному аспекті винахід також стосується застосування набору згідно з винаходом для одержання лікарського засобу для терапевтичного і/або профілактичного лікування порушення, такого як злоякісна пухлина, пухлина і/або клітинне проліферативне порушення. У деяких варіантах порушення являє собою невропатію або нейродегенеративне захворювання. У наступних переважних варіантах порушенням є патологічний стан, асоційований з ангіогенезом. У деяких варіантах патологічним станом, асоційованим з ангіогенезом, є пухлина, злоякісна пухлина і/або клітинне проліферативне порушення. У деяких варіантах патологічним станом, асоційованим з ангіогенезом, є внутрішньоочне неоваскулярне захворювання.

35 У винаході пропонуються способи і композиції, придатні для модулювання порушень, асоційованих з експресією і/або передачею сигналів Notch1, наприклад, з підвищеною або зниженою експресією і/або передачею сигналів або з небажаною експресією і/або передачею сигналів.

45 Винахід також стосується способів і композицій, придатних для модулювання порушень, асоційованих з активованими рецепторами Notch1. Такі порушення можуть бути асоційовані з транслокацією або активуючою мутацією в амінокислотній послідовності Notch1. Приклади порушень, асоційованих з активованими рецепторами Notch1, включають Т-клітинний гострий лімфобластний лейкоз (T-ALL).

50 У одному аспекті у винаході пропонуються способи лікування пухлини, злоякісної пухлини і/або клітинного проліферативного порушення, асоційованого з підвищеною експресією і/або активністю Notch1 у людини, де способи включають введення ефективної кількості анти-NRR Notch1-антитіла людині. У одному варіанті в пухлину, злоякісну пухлину і/або клітинне проліферативне порушення залучена мутація, яка активує Notch1.

55 У одному аспекті у винаході пропонуються способи цитолізу клітини (такої як ракова або пухлинна клітина) у людини, де способи включають введення людині ефективної кількості анти-NRR Notch1-антитіла.

У іншому аспекті у винаході пропонуються способи зменшення, інгібування, блокування або попередження росту пухлини або злоякісної пухлини у людини, при цьому способи включають введення людині ефективної кількості анти-NRR Notch1-антитіла.

5 У іншому аспекті у винаході пропонуються способи зменшення, інгібування, блокування або попередження ангиогенезу у індивідуума, де способи включають введення індивідууму ефективної кількості анти-NRR Notch1-антитіла.

10 У іншому аспекті у винаході пропонуються способи лікування патологічного стану, асоційованого з ангиогенезом, у індивідуума, де способи включають введення індивідууму ефективної кількості анти-NRR Notch1-антитіла. У деяких варіантах патологічним станом, асоційованим з ангиогенезом, є пухлина, злоякісна пухлина і/або клітинне проліферативне порушення. У деяких варіантах патологічним станом, асоційованим з ангиогенезом, є внутрішньоочне неоваскулярне захворювання.

15 У наступному аспекті у винаході пропонуються способи лікування або профілактики невropатії або нейродегенеративного захворювання або відновлення пошкодженої нервової клітини або порушень, які приводять до роз'єднання аксонів і/або демієлінізації у індивідуума, де способи включають введення індивідууму ефективної кількості анти-NRR Notch1-антитіла.

У одному аспекті у винаході пропонуються способи стимулювання розвитку, проліферації, збереження або регенерації нейронів у індивідуума, де способи включають введення індивідууму ефективної кількості анти-NRR Notch1-антитіла.

20 У наступному аспекті у винаході пропонуються способи посилення у індивідуума імунної відповіді на антиген, де способи включають введення індивідууму ефективної кількості анти-NRR Notch1-антитіла. У деяких варіантах антиген, до якого потрібна імунна відповідь, вводять одночасно з анти-NRR Notch1-антитілом. У інших варіантах у винаході пропонуються способи посилення у індивідуума імунної відповіді на антиген, які включають введення індивідууму агоністичного антитіла проти NRR Notch1; і при цьому індивідууму вводять композицію так, щоб агоністичне антитіло проти NRR Notch1 було презентоване імунним клітинам (таким як Т-клітини) індивідуума під час або відразу після примування імунних клітин (таких як Т-клітини) антигеном, таким чином посилюючи імунну відповідь. У деяких варіантах антигеном є злоякісна пухлина.

30 У наступному аспекті у винаході пропонуються способи стимулювання у індивідуума регенерації і/або репарації тканин, наприклад, регенерації скелетного або серцевого м'яза або кістки, де способи включають введення індивідууму ефективної кількості агоністичного антитіла проти NRR Notch1.

35 У наступному аспекті у винаході пропонуються способи зниження, інгібування, блокування або попередження імунної відповіді на антиген у індивідуума, де способи включають введення індивідууму ефективної кількості агоністичного антитіла проти NRR Notch1. У одному варіанті імунна відповідь являє собою імунологічне порушення внаслідок аномального розвитку або регуляції Т-клітин.

40 У наступному аспекті у винаході пропонуються способи лікування аутоімунного порушення у індивідуума, де способи включають введення індивідууму ефективної кількості агоністичного антитіла проти NRR Notch1. У деяких варіантах аутоімунним порушенням є аутоімунний діабет, розсіяний склероз, відторгнення трансплантата або ревматоїдний артрит.

45 Способи згідно з винаходом можна застосовувати для впливу на будь-який патологічний стан. Приклади порушень описані в цьому документі і включають злоякісну пухлину, вибрану з групи, яка складається з дрібноклітинного раку легені, раку головного мозку (наприклад, нейробластоми або менінгіоми), раку шкіри (наприклад, меланоми, карциноми базальних клітин або карциноми сквамозних клітин), карциноми молочної залози, раку шлунка, раку прямої і ободової кишки (CRC), гепатоклітинної карциноми, раку шийки матки, раку легені, раку підшлункової залози, раку передміхурової залози і гематологічних злоякісних захворювань (наприклад, Т-клітинного гострого лімфобластного лейкозу (T-ALL), В-клітинного гострого лімфобластного лейкозу (B-ALL), гострого мієлогенного лейкозу (AML), лімфоми Ходжкіна і

50 множинної мієломи).
У одному варіанті клітина, яка є мішенню в способі згідно з винаходом, є злоякісною клітиною. Наприклад, злоякісна клітина може являти собою клітину, вибрану з групи, яка складається з клітини раку молочної залози, клітини раку прямої і ободової кишки, клітини раку легені, клітини папілярної карциноми, клітини раку ободової кишки, клітини раку підшлункової залози, клітини раку яєчника, клітини раку шийки матки, клітини раку центральної нервової системи, клітини остеогенної саркоми, клітини карциноми нирок, клітини гепатоклітинної карциноми, клітини раку сечового міхура, клітини раку шлунка, клітини сквамозної карциноми голови і шиї, клітини меланоми, лейкозної клітини і клітини аденоми товстої кишки. У одному

варіанті клітина, яка є мішенню в способі згідно з винаходом, є гіперпроліферуючою і/або гіперпластичною клітиною. У іншому варіанті клітина, яка є мішенню в способі згідно з винаходом, є диспластично зміненою клітиною. У ще одному варіанті клітина, яка є мішенню в способі згідно з винаходом, є метастатичною клітиною.

5 Способи згідно з винаходом додатково можуть включати додаткові стадії обробки. Наприклад, в одному варіанті спосіб додатково включає стадію, на якій клітину-мішень і/або тканину-мішень (наприклад, злаякісну клітину) піддають опроміненню або впливу хіміотерапевтичним засобом.

10 У одному аспекті у винаході пропонуються способи, які включають введення ефективної кількості анти-NRR Notch1-антитіла в поєднанні з ефективною кількістю іншого терапевтичного засобу (такого як засіб проти ангіогенезу, інше антитіло, хіміотерапевтичний засіб, цитотоксичний засіб, імунодепресант, проліки, цитокін, цитотоксична променева терапія, кортикостероїд, протипухлинний засіб, протипухлинна вакцина, анальгетик або інгібуючий ріст засіб). Наприклад, анти-NRR Notch1-антитіла застосовують в поєднанні з протипухлинним засобом або антиангіогенним засобом для лікування різних неопластичних або не

15 неопластичних станів. У конкретних прикладах анти-NRR Notch1-антитіла застосовують в поєднанні з тамоксифеном, летрозолом, ексеместаном, анастрозолом, іринотеканом, цетуксимабом, фулвестрантом, вінорелбіном, ерлотинібом, бевацизумабом, вінкристином, іматинібом, сорафенібом, лапатинібом або трастузумабом.

20 Анти-NRR Notch1-антитіло можна вводити послідовно або в поєднанні з іншим терапевтичним засобом, який є ефективним для таких цілей, або в одній і тій же композиції, або у вигляді окремих композицій. Введення анти-NRR Notch1-антитіла і іншого терапевтичного засобу (наприклад, протипухлинного засобу) можна здійснювати одночасно, наприклад, у вигляді однієї композиції або у вигляді двох або більше окремих композицій, використовуючи

25 один і той самий або різні шляхи введення. Альтернативно або додатково, введення можна здійснювати послідовно в будь-якому порядку. Альтернативно або додатково, стадії можуть бути здійснені у вигляді поєднання як послідовного, так і одночасного введення в будь-якому порядку. У деяких варіантах можуть мати місце інтервали в діапазоні від хвилин до діб, тижнів і місяців між введеннями двох або більше композицій. Наприклад, спочатку може бути введений протипухлинний засіб з подальшим введенням анти-NRR Notch1-антитіла. Однак також передбачається одночасне введення або введення анти-NRR Notch1-антитіла в першу чергу. У деяких варіантах можуть мати місце інтервали в діапазоні від хвилин до діб, тижнів, місяців між введеннями двох або більше композицій.

35 У деяких аспектах у винаході пропонується спосіб лікування порушення (такого як пухлина, злаякісна пухлина і/або клітинне проліферативне порушення) за допомогою введення ефективних кількостей анти-NRR Notch1-антитіла і/або інгібітору(ів) ангіогенезу і одного або декількох хіміотерапевтичних засобів. Можна використовувати різні хіміотерапевтичні засоби в способах комбінованого лікування згідно з винаходом. Зразковий і необмежувальний список передбачуваних хіміотерапевтичних засобів наведений в даному описі в розділі «Визначення».

40 Введення анти-NRR Notch1-антитіла і хіміотерапевтичного засобу можна здійснювати одночасно, наприклад, у вигляді однієї композиції або у вигляді двох або більше різних композицій, використовуючи один і той самий або різні шляхи введення. Альтернативно або додатково, введення можна здійснювати послідовно в будь-якому порядку. Альтернативно або додатково, стадії можуть бути здійснені у вигляді поєднання як послідовного, так і одночасного

45 введення в будь-якому порядку. У деяких варіантах можуть мати місце інтервали в діапазоні від хвилин до діб, тижнів, місяців між введеннями двох або більше композицій. Наприклад, спочатку може бути введений хіміотерапевтичний засіб з подальшим введенням анти-NRR Notch1-антитіла. Однак також передбачається одночасне введення або введення анти-NRR Notch1-антитіла в першу чергу. Відповідно, в одному аспекті у винаході пропонуються способи,

50 які включають введення анти-NRR Notch1-антитіла з подальшим введенням хіміотерапевтичного засобу. У деяких варіантах можуть мати місце інтервали в діапазоні від хвилин до діб, тижнів, місяців між введеннями двох або більше композицій.

У іншому аспекті у винаході пропонуються способи виявлення Notch1, де способи включають виявлення комплексу Notch1-анти-NRR Notch1-антитіло в зразку. Термін «виявлення» у використовуваному в даному описі значенні включає якісне і/або кількісне визначення (рівні вимірювання) відносно або безвідносно контролю.

У іншому аспекті у винаході пропонуються способи діагностики порушення, асоційованого з експресією і/або активністю Notch1, де способи включають виявлення комплексу Notch1-анти-NRR Notch1-антитіло в біологічному зразку, одержаному від індивідуума, у якого є або

60 підозрюється наявність порушення. У деяких варіантах експресія Notch1 являє собою

підвищену експресію або аномальну експресію. У деяких варіантах порушення являє собою пухлину, злоякісну пухлину і/або клітинне проліферативне порушення.

У іншому аспекті у винаході пропонуються способи лікування індивідуума, який має злоякісну пухлину, пухлину і/або клітинне проліферативне порушення, за допомогою введення індивідууму ефективної кількості анти-NRR Notch1-антитіла, при цьому додатково визначають експресію Notch1 і/або експресію ліганду Notch1 в біологічному зразку індивідуума перед, під час або після введення анти-NRR Notch1-антитіла. У деяких варіантах біологічним зразком є злоякісна пухлина, пухлина і/або клітинне проліферативне порушення. У деяких варіантах виявляють надекспресію Notch1 перед, під час і/або після введення анти-NRR Notch1-антитіла. У деяких варіантах виявляють експресію ліганду Notch1 перед, під час і/або після введення анти-NRR Notch1-антитіла. Експресію можна реєструвати перед; під час; після; перед і під час; перед і після; під час і після; або перед, під час і після введення анти-NRR Notch1-антитіла.

У іншому аспекті у винаході пропонуються способи лікування індивідуума, який має злоякісну пухлину, пухлину і/або клітинне проліферативне порушення, за допомогою введення ефективної кількості анти-NRR Notch1-антитіла індивідууму, при цьому біологічний зразок злоякісної пухлини, пухлини і/або клітинного порушення або порушення печінки експресує Notch1 або ліганд Notch1.

У іншому аспекті у винаході пропонуються способи вибору лікування індивідуума, де способи включають: (а) виявлення експресії Notch1 або експресії ліганду Notch1, якщо така має місце, в біологічному зразку індивідуума; і (b) після стадії (а) вибір лікування індивідуума, при цьому вибір лікування оснований на експресії Notch1 або ліганду Notch1, виявленої на стадії (а). У деяких варіантах виявляють підвищену експресію Notch1 або ліганду Notch1 в біологічному зразку індивідуума в порівнянні з еталонним значенням або контрольним зразком. У деяких варіантах у індивідуума виявляють знижену експресію Notch1 або ліганду Notch1 в біологічному зразку індивідуума в порівнянні з еталонним значенням або контрольним зразком. У деяких варіантах визначають експресію Notch1 або ліганду Notch1 і вибирають лікування анти-Notch1-антитілом. У деяких варіантах індивідуум має пухлину, злоякісну пухлину і/або клітинне проліферативне порушення.

У деяких варіантах, які включають виявлення експресії Notch1, здійснюють виявлення делеції гена Notch1, ампліфікації гена і/або мутації гена. У деяких варіантах, які включають виявлення експресії ліганду Notch1, здійснюють виявлення делеції гена Notch1, ампліфікації гена і/або мутації гена.

Біологічні зразки описані в цьому документі, наприклад, при визначенні біологічного зразка. У деяких варіантах біологічний зразок являє собою сироватку або пухлину.

У варіантах, які полягають у виявленні експресії Notch1 і/або ліганду Notch1 (наприклад, Jagged 1, Jagged 2, Delta-подібний 1, Delta-подібний 3 і/або Delta-подібний 4), може бути виявлена експресія поліпептидів Notch1 і/або ліганду Notch1 і/або експресія поліпептидів Notch1 і/або ліганду Notch1. У деяких варіантах, які полягають у виявленні експресії Notch1 і/або ліганду Notch1, виявляють експресію мРНК Notch1 і/або ліганду Notch1. У інших варіантах виявляють експресію поліпептиду Notch1 і/або ліганду Notch1, використовуючи засіб проти NRR Notch1 і/або засіб проти ліганду Notch1. У деяких варіантах експресію поліпептидів Notch1 і/або ліганду Notch1 виявляють, використовуючи антитіло. Можна використовувати будь-яке придатне антитіло для виявлення і/або діагностики, включаючи моноклональні і/або поліклональні антитіла, людське антитіло, химерне антитіло, антитіло з дозрілою афінністю, гуманізоване антитіло і/або фрагмент антитіла. У деяких варіантах для виявлення застосовують анти-NRR Notch1-антитіло, описане в цьому документі. У деяких варіантах експресію поліпептидів Notch1 і/або ліганду Notch1 виявляють, використовуючи імуногістохімію («IHC»). У деяких варіантах експресію Notch1 оцінюють значенням 2 або вище, використовуючи IHC-аналіз.

У деяких варіантах, які полягають у виявленні експресії Notch1 і/або ліганду Notch1, може бути визначена наявність і/або відсутність, і/або рівень експресії Notch1 і/або ліганду Notch1. Експресія Notch1 і/або ліганду Notch1 може бути підвищена. Потрібно розуміти, що відсутність експресії Notch1 і/або ліганду Notch1 включає незначні або мінімальні рівні. У деяких варіантах експресія Notch1 в тестованому біологічному зразку вище, ніж експресія, спостережувана в контрольному біологічному зразку (контрольний або еталонний рівень експресії). У деяких варіантах експресія Notch1 щонайменше приблизно в 2 рази, 5 разів, 10 разів, 20 разів, 30 разів, 40 разів, 50 разів, 75 разів, 100 разів, 150 разів або більше разів вище в тестованому біологічному зразку, ніж в контрольному біологічному зразку. У деяких варіантах експресію поліпептиду Notch1 визначають в імуногістохімічному («IHC») аналізі, оцінюючи інтенсивність фарбування щонайменше значенням 2 або вище. У деяких варіантах експресію поліпептиду

Notch1 визначають в ІНС-аналізі, оцінюючи інтенсивність фарбування щонайменше значенням 1 або вище або щонайменше 3 або вище. У деяких варіантах експресія Notch1 в тестованому біологічному зразку нижче, ніж експресія, яка спостерігається в контрольному біологічному зразку (або ніж контрольний рівень експресії).

5 У іншому аспекті у винаході пропонується будь-яке з анти-NRR Notch1-антитіл, описаних в цьому документі, де анти-NRR Notch1-антитіло містить мітку, що реєструється.

У іншому аспекті у винаході пропонується комплекс будь-якого з анти-NRR Notch1-антитіл, описаних в цьому документі, і Notch1. У деяких варіантах комплекс утворюється *in vivo* або *in vitro*. У деяких варіантах комплекс містить злоякісну клітину. У деяких варіантах анти-NRR

10 Notch1-антитіло мітять міткою, що реєструється.

КОРОТКИЙ ОПИС КРЕСЛЕНЬ

Фігури 1-1 і 1-2: послідовності петлі HVR важкого ланцюга і легкого ланцюга анти-NRR Notch1-антитіл. На фігурах показані послідовності HVR важкого ланцюга, H1, H2 і H3, і послідовності HVR легкого ланцюга, L1, L2 і L3. Послідовності пронумеровані таким чином:

15 антитіло A (HVR-H1 має послідовність SEQ ID NO: 1; HVR-H2 має послідовність SEQ ID NO: 2; HVR-H3 має послідовність SEQ ID NO: 6; HVR-L1 має послідовність SEQ ID NO: 7; HVR-L2 має послідовність SEQ ID NO: 8; HVR-L3 має послідовність SEQ ID NO: 9); антитіло A-1 (HVR-H1 має послідовність SEQ ID NO: 1; HVR-H2 має послідовність SEQ ID NO: 3; HVR-H3 має послідовність SEQ ID NO: 6; HVR-L1 має послідовність SEQ ID NO: 7; HVR-L2 має послідовність

20 SEQ ID NO: 8; HVR-L3 має послідовність SEQ ID NO: 10); антитіло A-2 (HVR-H1 має послідовність SEQ ID NO: 1; HVR-H2 має послідовність SEQ ID NO: 4; HVR-H3 має послідовність SEQ ID NO: 6; HVR-L1 має послідовність SEQ ID NO: 7; HVR-L2 має послідовність SEQ ID NO: 8; HVR-L3 має послідовність SEQ ID NO: 11); і антитіло A-3 (HVR-H1 має послідовність SEQ ID NO: 1; HVR-H2 має послідовність SEQ ID NO: 5; HVR-H3 має послідовність SEQ ID NO: 6; HVR-L1 має послідовність SEQ ID NO: 7; HVR-L2 має послідовність SEQ ID NO: 8; HVR-L3 має послідовність SEQ ID NO: 12). Положення амінокислот пронумеровані згідно з системою нумерації Кабата, як описано нижче.

На фігурі 2 зображені амінокислотні послідовності варіабельних областей важкого ланцюга і варіабельних областей легкого ланцюга антитіл A, A-1, A-2 і A-3 (SEQ ID NO: 58-65).

30 На фігурах 3A, 3B і 4 зображені зразкові акцепторні консенсусні каркасні послідовності для застосування при практичному здійсненні даного винаходу, які мають наступні ідентифікаційні номери послідовностей:

Консенсусні каркаси варіабельної області важкого ланцюга (VH) (фіг. 3A, 3B)

консенсусний каркас підгрупи I VH людини мінус CDR за Кабатом (SEQ ID NO: 19);

35 консенсусний каркас підгрупи I VH людини мінус розширені гіперваріабельні області (SEQ ID NO: 20-22);

консенсусний каркас підгрупи II VH людини мінус CDR за Кабатом (SEQ ID NO: 23);

консенсусний каркас підгрупи II VH людини мінус розширені гіперваріабельні області (SEQ ID NO: 24-26);

40 консенсусний каркас підгрупи II VH людини мінус розширені;

консенсусний каркас підгрупи III VH людини мінус CDR за Кабатом (SEQ ID NO: 27);

консенсусний каркас підгрупи III VH людини мінус розширені гіперваріабельні області (SEQ ID NO: 28-30);

акцепторний каркас VH людини мінус CDR за Кабатом (SEQ ID NO: 31);

45 акцепторний каркас VH людини мінус розширені гіперваріабельні області (SEQ ID NO: 32-33);

акцепторний каркас 2 VH людини мінус CDR за Кабатом (SEQ ID NO: 34);

акцепторний каркас 2 VH людини мінус розширені гіперваріабельні області (SEQ ID NO: 35-37).

50 Консенсусні каркаси варіабельної області легкого ланцюга (VL) (фіг. 4)

консенсусний каркас підгрупи I VL каппа людини (SEQ ID NO: 38);

консенсусний каркас підгрупи II VL каппа людини (SEQ ID NO: 39);

консенсусний каркас підгрупи III VL каппа людини (SEQ ID NO: 40);

консенсусний каркас підгрупи IV VL каппа людини (SEQ ID NO: 41).

55 На фігурі 5 зображені послідовності каркасної області легкого (SEQ ID NO: 15-18) і важкого ланцюгів (SEQ ID NO: 42-45) huMAb4D5-8. Надрядкові/зображені жирним шрифтом номери вказують положення амінокислот згідно з Кабатом.

На фігурі 6 зображені модифіковані/варіантні послідовності каркасних областей легкого (SEQ ID NO: 15, 16, 18 і 46) і важкого ланцюгів (SEQ ID NO: 42, 43, 45 і 47) huMAb4D5-8.

Надрядкові/зображені жирним шрифтом номери вказують положення амінокислот згідно з Кабатом.

Фігура 7 являє собою графік, який показує, що антитіло А є сильним інгібітором Notch1, що виміряно з використанням репортерного гена люциферази. У кожній колонці А-Л клітинами, що несуть рецептор, були клітини NIH-3T3-Notch1. У випадку А клітиною, що несе ліганд, була батьківська клітина NIH-3T3, у випадку В-Л клітиною, що несе ліганд, була клітина NIH-3T3-Jag1. У випадку А, В і К не додавали ні антитіла, ні сполуки Е (інгібітор гамма-секретази); у випадку С додавали антитіло, використовуване як контроль ізотипу, в концентрації 400 нг/мл; у випадку D додавали антитіло А в концентрації 16 нг/мл; у випадку Е додавали антитіло А в концентрації 80 нг/мл; у випадку F додавали антитіло А в концентрації 400 нг/мл; у випадку G додавали антитіло А в концентрації 2000 нг/мл; у випадку H додавали антитіло А в концентрації 400 нг/мл; у випадку I додавали антитіло А в концентрації 400 нг/мл; у випадку J додавали антитіло, використовуване як контроль ізотипу, в концентрації 400 нг/мл; у випадку K додавали 0,01% ДМСО; і у випадку L додавали сполуку Е в концентрації 1 мкМ в 0,01% ДМСО. У випадку H додавали білок NRR Notch1 в концентрації 5 мкг/мл (100 мкл); у випадку I додавали білок БСА (бичачий сироватковий альбумін) в концентрації 6,5 мкг/мл (100 мкл); у випадку J додавали білок NRR Notch1 в концентрації 5 мкг/мл (100 мкл); у випадку А-Г, К і L не додавали білка.

Фігура 8 являє собою графік, який показує, що антитіла А, А-1, А-2 і А-3 інгібують Notch1, як виміряно з використанням аналізу на основі репортера люциферази. Чорні стовпчики показують результати, одержані з використанням батьківського антитіла А, а інші стовпчики показують результати, одержані з використанням антитіла А-1 (горизонтальні смужки), антитіла А-2 (сіра штриховка) і антитіла А-3 (діагональні смужки). Як виявлено при використанні 80 нг/мл антитіла, антитіла А-1 і А-2 давали більш сильне блокування сигналу Notch1, ніж батьківське антитіло А. На осі Х на графіку представлена концентрація антитіл (нг/мл), і на осі Y графіка представлена люмінесценція люциферази світляка/Renilla.

Фігура 9 являє собою графік, який показує, що антитіло А знижує блокування диференціювання міоцитів C2C12 миші, викликаного активацією передачі сигналів Notch. У випадку А-F середовище являло собою середовище для диференціювання. У випадку А міобласти C2C12 миші не культивували спільно з клітинами NIH-3T3, експресуючими ліганд Jagged1, тоді як у випадку В-F міобласти C2C12 миші культивували спільно з клітинами NIH-3T3, експресуючими ліганд Jagged1. Додавали наступне антитіло/проводили наступну обробку клітин: у випадку А і В без антитіла/обробки, контроль ізотипу у випадку С, антитіло А в концентрації 200 нг/мл у випадку D, ДМСО у випадку Е, і сполука Е в концентрації 1 мкМ у випадку F.

На фігурах 10А-10F показані зображення клітин міоцитів C2C12 миші, забарвлених МНС/Alexa® 488 (верхній ряд) або DAPI (гідрохлорид 4',6'-діамідино-2-феніліндолу; нижній ряд). У випадку А-F середовище являло собою середовище для диференціювання. У випадку А міобласти C2C12 миші не культивували спільно з клітинами NIH-3T3, експресуючими ліганд Jagged1, тоді як у випадку В-F міобласти C2C12 миші культивували спільно з клітинами NIH-3T3, експресуючими ліганд Jagged1. Додавали наступне антитіло/проводили наступну обробку клітин: у випадку А і В без антитіла/обробки, контроль ізотипу у випадку С, антитіло А в концентрації 200 нг/мл у випадку D, ДМСО у випадку Е, і сполука Е в концентрації 1 мкМ у випадку F.

На фігурах 11-1-11-4 показане вирівнювання амінокислотних послідовностей Notch1 людини і миші (SEQ ID NO: 56 і 57). Використовували програму для вирівнювання SIM (доступну на веб-сайті ExPASy), щоб провести вирівнювання повних послідовностей білків Notch1 людини і миші. Були вибрані параметри за умовчанням зі штрафом за відкриття пропуску 12, штрафом за розширення пропуску 4 і BLOSUM62 як матриці порівняння. Домени білків підкреслені і помічені. Границі сигнального пептиду, трансмембранного і EGF-домену основані на результатах, одержаних для Notch1 людини з ExPASy.org; границі LNR основані на даних Vardar et al. (Biochemistry, 42: 7061-7067, 2003); границі HD-N і HD-C основані на даних Malecki et al. (Mol. Cell. Biol. 26: 4642-4651, 2006). Область негативної регуляції (NRR) відповідає послідовностям, починаючи з LNR_A і закінчуючи після HD-C. Імуногенні послідовності, використовувані для створення антитіл проти NRR Notch1, підкреслені зверху заштрихованою лінією і включають повтори EGF 34-36 плюс NRR. Скорочення: амінокислоти показані однобуквеним кодом; TM, трансмембранна; EGF, повтори епідермального фактора росту; LNR, повтори Lin 12-Notch; HD-N, домен гетеродимеризації - з амінокінцевої сторони від сайту розщеплення S1; HD-C, домен гетеродимеризації - зі сторони карбоксильного кінця від сайту розщеплення S1; S1, сайт розщеплення S1 для фуринових протеаз; S2, сайт розщеплення S2 для протеаз ADAM (сімейство дезінтегринів і металопротеїназ).

Фігури 12A-12C являють собою графіки, які показують результати експериментів по картуванню епітопів для антитіла А (фігура 12A), антитіла А-1 (фігура 12B) і антитіла А-2 (фігура 12C).

Фігура 13 являє собою графік, який показує, що анти-Notch1-NRR-антитіла інгібують передачу сигналів рецептора Notch1 дикого типу і мутантного рецептора Notch1. Повністю заштриховані чорні стовпчики показують результати, одержані з використанням контрольного антитіла в концентрації 2000 нг/мл; стовпчики з великими точками показують результати, одержані з використанням антитіла А в концентрації 80 нг/мл; стовпчики з тонкими смужками показують результати, одержані з використанням антитіла А в концентрації 400 нг/мл; стовпчики з товстими смужками показують результати, одержані з використанням антитіла А в концентрації 2000 нг/мл; стовпчики з поперечними штрихами показують результати, одержані з використанням сполуки Е в концентрації 10 мкМ; і стовпчики з дрібними точками показують результати, одержані з використанням ДМСО (носії для сполуки Е). Результати для кожної умови вимірювали у восьми повторях і потім виражали у вигляді середнього значення із зображенням відрізків, які показують стандартне відхилення.

На фігурі 14A представлена серія зображень, які показують, що обробка анти-NRR Notch1-антитілом і анти-D114-антитілом викликає помітне збільшення проростання і довжини судин в аналізі проростання клітин HUVEC (ендотеліальні клітини пупкової вени людини). Результати показані для клітин, оброблених PBS (фосфатно-сольовим буфером) як контролем або анти-NRR Notch1-антитілом А або А-2.

На фігурі 14B представлена серія зображень, які показують вплив анти-NRR Notch1-антитіл на васкуляризацію і ангиогенез у випадку використання аналізу кармана роگیвки. Обробка анти-NRR Notch1-антитілом (антитілом А-2) значуще збільшувала густину судинної мережі.

На фігурі 14C представлена серія зображень, які показують вплив анти-D114- і анти-NRR Notch1-обробки на плин рідини по судинах в аналізі роگیвки. Перфузія через анти-D114- і анти-NRR Notch1-оброблені судини була обмежена.

На фігурі 14D представлена серія зображень, які показують вплив анти-NRR Notch1-антитіл в моделі ангиогенезу в сітківці мишей. Обробка анти-NRR Notch1-антитілом (антитілом А-2) збільшувала густину судинної мережі і створювала фенотип з гіперпроростанням.

На фігурі 14E представлена серія зображень, які показують, що в моделі ангиогенезу в сітківці мишей анти-NRR Notch1-обробка (антитілом А-2) викликає збільшення кількості ядер, яка узгоджується із збільшенням проліферації клітин.

Фігура 15A являє собою графік, який показує вплив анти-NRR Notch1-антитіла на ріст пухлини в мишачій моделі *in vivo*. Обробка анти-NRR Notch1-антитілом А-2 затримувала ріст пухлини.

Фігура 15B являє собою графік, який показує, що різні дози анти-NRR Notch1-антитіла А-2 затримували або сповільнювали ріст пухлини в мишачій моделі *in vivo*.

Фігура 15C являє собою графік, який показує, що в мишачій моделі *in vivo* анти-NRR Notch1-антитіло А-2 зменшувало об'єм пухлини.

Фігура 15D являє собою графік, який показує, що в мишачій моделі *in vivo* анти-NRR Notch1-антитіло А-2 викликає втрату маси залежним від дози чином.

Фігура 15E являє собою графік, який показує кліренс анти-NRR Notch1-антитіла А-2 з перебігом часу з сироватки імунодефіцитних мишей (Balb-C Nu/Nu).

На фігурах 16A і 16B представлена серія зображень, які показують приклади кишкових крипт і ворсинок тонкого (фігура 16A) або товстого (фігура 16B) кишечника мишей, оброблених контрольним антитілом (наповнювачем) або анти-NRR Notch1-антитілом А-2 в концентрації 10 мг/кг.

Фігура 17 являє собою графік, який показує, що анти-NRR Notch1-антитіла і інгібітори гамма-секретази знижують життєздатність деяких ліній злоякісних клітин. Використовували анти-NRR Notch1-антитіло А-2 і інгібітори гамма-секретази, трет-бутиловий ефір N-[N-(3,5-дифторфенацетил)-L-аланіл]-S-фенілгліцину (DAPT) і сполуку Е (CmpE). Лінії злоякісних клітин вказані на осі x.

ДОКЛАДНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

Даний винахід стосується анти-NRR Notch1-антитіл, які застосовні, наприклад, для лікування або профілактики патологічних станів, асоційованих з експресією і/або активністю Notch, наприклад, з підвищеною експресією і/або активністю або небажаною експресією і/або активністю. У деяких варіантах антитіла згідно з винаходом застосовують для лікування пухлини, злоякісної пухлини і/або клітинного проліферативного порушення.

У іншому аспекті анти-NRR Notch1-антитіла згідно з винаходом знаходять застосування як реагенти для виявлення і/або виділення Notch1, наприклад, для виявлення Notch1 в різних тканинах і різних типах клітин.

Винахід, крім того, стосується способів одержання анти-NRR Notch1-антитіл і полінуклеотидів, що кодує анти-NRR Notch1-антитіла.

Загальні способи

Способи і процедури, які описані в цьому документі або на які в даному документі наведені посилання, загалом, добре відомі і широко застосовуються фахівцями в даній галузі з використанням звичайних методик, таких як, наприклад, широко використовувані методики, описані в Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3rd. edition (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel, et al. eds., (2003)); the series METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.): PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (M. J. MacPherson, B. D. Hames and G. R. Taylor eds. (1995)), Harlow and Lane, eds. (1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, та ANIMAL CELL CULTURE (R. I. Freshney, ed. (1987)).

ВИЗНАЧЕННЯ

«Ізольоване» антитіло являє собою антитіло, яке було ідентифіковане і відділене і/або витягнуте з його природного оточення, що складається з певних компонентів. Компоненти, що є домішками в природному оточенні, являють собою речовини, які можуть заважати діагностичним або терапевтичним застосуванням антитіла і можуть включати ферменти, гормони і інші білкові і небілкові розчинені речовини. У переважних варіантах антитіло буде очищене (1) до більше ніж 95% мас. антитіла на основі визначення способом Лоурі, і найбільш переважно до більше ніж 99% мас., (2) в достатній мірі для одержання щонайменше 15 залишків N-кінцевої або внутрішньої амінокислотної послідовності з використанням секвенатора з обертовим стаканом, або (3) до гомогенності за допомогою SDS-ПААГ (електрофорез в поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію) у відновних або не відновних умовах, використовуючи фарбування Кумасі синім або переважно сріблом. Ізольоване антитіло включає антитіло *in situ* в рекомбінантних клітинах, оскільки щонайменше один компонент природного оточення антитіла не буде присутнім. Однак звичайно ізольоване антитіло може бути одержане щонайменше на одній стадії очищення.

«Ізольована» молекула нуклеїнової кислоти являє собою молекулу нуклеїнової кислоти, яка ідентифікована і відділена щонайменше від однієї забруднюючої молекули нуклеїнової кислоти, з якою вона звичайно асоційована в природному джерелі нуклеїнової кислоти. Ізольована молекула нуклеїнової кислоти має іншу форму або оточення, відмінні від тієї форми і оточення, в яких вона зустрічається в природі. Тому ізольовані молекули нуклеїнової кислоти відрізняються від молекули нуклеїнової кислоти, у вигляді якої вони існують в природних клітинах. Однак ізольована молекула нуклеїнової кислоти включає молекули нуклеїнової кислоти, які містяться в клітинах, які звичайно експресують нуклеїнову кислоту (наприклад, нуклеїнову кислоту, що кодує антитіло), в яких молекула нуклеїнової кислоти знаходиться, наприклад, в положенні хромосоми, відмінному від положення в хромосомі в природних клітинах.

Термін «нумерація залишків варіабельного домену згідно з Кабатом» або «нумерація положень амінокислот згідно з Кабатом» і його варіанти стосуються системи нумерації, використовуваної для варіабельних доменів важкого ланцюга або варіабельних доменів легкого ланцюга при узагальненні даних про антитіла в публікації Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991). При використанні такої системи нумерації реальна лінійна амінокислотна послідовність може містити менше або може містити додаткові амінокислоти, що відповідає укороченню або інсерції в FR або CDR варіабельного домену. Наприклад, варіабельний домен важкого ланцюга може містити інсерцію однієї амінокислоти (залишок 52a згідно з нумерацією Кабата) після залишку 52 в H2 і вбудовані залишки (наприклад, залишки 82a, 82b і 82c і т. д. згідно з нумерацією Кабата) після залишку 82 FR важкого ланцюга. Нумерація залишків згідно з Кабатом може бути визначена для даного антитіла в результаті вирівнювання областей гомології послідовності антитіла зі «стандартною» послідовністю, пронумерованою за Кабатом.

Фраза «по суті схожий» або «по суті такий же» у використовуваному в даному описі значенні означає досить високу міру схожості між двома числовими значеннями (звичайно одне асоційоване з антитілом згідно з винаходом, а інше асоційоване з еталонним антитілом/антитілом для порівняння), так що фахівець в даній галузі може вважати відмінність між двома значеннями невеликим або біологічно і/або статистично не значущим в контексті біологічної ознаки, вимірюваної вказаними значеннями (наприклад, значеннями Kd). Відмінність

між двома вказаними значеннями переважно менше ніж приблизно 50%, переважно менше ніж приблизно 40%, переважно менше ніж приблизно 30%, переважно менше ніж приблизно 20%, переважно менше ніж приблизно 10% від значення для еталонного/порівнюваного антитіла.

«Афінність зв'язування» звичайно стосується сили сумарних нековалентних взаємодій між одним сайтом зв'язування молекули (наприклад, антитіла) і його партнером по зв'язуванню (наприклад, антигеном). Якщо не обумовлено особливо, у використовуваному в даному описі значенні «афінність зв'язування» стосується властивості молекулам афінності зв'язування, яка відображає взаємодію 1:1 між членами пари, що зв'язується (наприклад, антитілом і антигеном). Афінність молекули X відносно її партнера Y, як правило, може бути представлена константою дисоціації (K_d). Бажано, щоб K_d становила 1×10^{-7} , 1×10^{-8} , 5×10^{-8} , 1×10^{-9} , 3×10^{-9} , 5×10^{-9} або навіть 1×10^{-10} або ще сильніше. Афінність може бути виміряна звичайними способами, відомими в даній галузі, включаючи способи, описані в цьому документі. Низькоафінні антитіла звичайно зв'язують антиген повільно і мають тенденцію легко дисоціювати, тоді як високоафінні антитіла звичайно зв'язують антиген швидше і мають тенденцію довше залишатися зв'язаними. У даній галузі відомі різні способи вимірювання афінності зв'язування, будь-які з яких можна застосовувати з метою даного винаходу. Конкретні ілюстративні варіанти описані нижче.

У одному варіанті « K_d » або «значення K_d » згідно з даним винаходом вимірюють за допомогою аналізу зв'язування радіоактивно міченого антигену (PIA), здійснюваного з Fab-варіантом антитіла, що представляє інтерес, і його антигеном, який описаний на прикладі наступного аналізу, в якому вимірюють афінність зв'язування в розчині Fab для антигену за допомогою зрівноважування Fab з мінімальною концентрацією (^{125}I)-міченого антигену в присутності серії неміченого антигену для титрування, потім вловлюючи зв'язаний антиген на покритому анти-Fab-антитілом планшеті (Chen, et al., (1999) J. Mol. Biol. 293: 865-881). Щоб створити умови для аналізу, планшети для мікротитрування (Dynex) покривають протягом ночі 5 мкг/мл уловлювального анти-Fab-антитіла (Cappel Labs) в 50 мМ карбонаті натрію (pH 9,6) і потім блокують 2% (мас./об.) бичачим сироватковим альбуміном в PBS протягом двох-пяти годин при кімнатній температурі (приблизно 23°C). У неадсорбуючому планшеті (Nunc №269620), 100 пМ або 26 пМ [^{125}I]-антигену змішують з серійним розведенням Fab, що представляє інтерес (наприклад, відповідно до оцінки анти-VEGF-антитіла, Fab-12, в публікації Presta et al., (1997) Cancer Res. 57: 4593-4599). Потім Fab, що представляє інтерес, інкубують протягом ночі; однак інкубація може продовжуватися протягом більш тривалого періоду (наприклад, 65 годин), щоб гарантувати досягнення рівноваги. Потім суміші переносять в уловлювальний планшет для інкубації при кімнатній температурі (наприклад, протягом однієї години). Потім розчин видаляють і планшети промивають вісім разів 0,1% твін-20 в PBS. Після висихання планшетів додають по 150 мкл/ямку сцинтилятора (MicroScint-20; Packard) і планшети піддають рахуванню в гамма-лічильнику Торсcount (Packard) протягом десяти хвилин. Концентрації кожного Fab, які дають зв'язування, яке менше або дорівнює 20% від максимального зв'язування, вибирають для використання в аналізах конкурентного зв'язування. Згідно з іншим варіантом K_d або значення K_d вимірюють, застосовуючи аналізи поверхневого плазмонного резонансу з використанням BIAcore™-2000 або BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, N.J.), при 25°C за допомогою чипів CM5 з іммобілізованим антигеном на рівні 10 одиниць сигнал у відповідь (RU). Коротко, біосенсорні чипи з карбоксиметильованого декстрану (CM5, BIAcore Inc.) активували гідрохлоридом N-етил-N'-(3-диметиламінопропіл)карбодііміду (EDC) і N-гідроксисукцинімідом (NHS) згідно з інструкціями постачальника. Антиген розбавляли 10 мМ ацетатом натрію, pH 4,8, в концентрації 5 мкг/мл (0,2 мкМ) перед ін'єктуванням зі швидкістю потоку 5 мкл/хвилину, щоб досягнути приблизно 10 одиниць сигналу у відповідь (RU) від зв'язаного білка. Після ін'єкції антигену ін'єктували 1 М етаноламіну, щоб блокувати групи, які не вступили в реакцію. Для кінетичних вимірювань двократне серійне розведення Fab (від 0,78 нМ до 500 нМ) ін'єктували в PBS з 0,05% твін-20 (PBST) при 25°C зі швидкістю потоку приблизно 25 мкл/хв. Швидкості асоціації (k_{on}) і швидкості дисоціації (k_{off}) обчислювали, використовуючи просту модель зв'язування Ленгмюра «один до одного» (комп'ютерна програма для оцінки BIAcore, версія 3.2), за допомогою одночасної підгонки сенсограми асоціації і дисоціації. Рівноважну константу дисоціації (K_d) обчислюють у вигляді відношення k_{off}/k_{on} . Дивись, наприклад, Chen, Y., et al., (1999) J. Mol. Biol. 293: 865-881. Якщо швидкість утворення комплексу перевищує $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ сек}^{-1}$ за даними вказаного вище аналізу поверхневого плазмонного резонансу, то швидкість утворення комплексу можна визначити, використовуючи методику гасіння флуоресценції, яка дозволяє вимірювати збільшення або зменшення інтенсивності випромінювання флуоресценції (збудження = 295 нм; емісія = 340 нм, смуга пропускання 16 нм) при 25°C 20 нМ антитіла проти антигену (Fab-форма)

в PBS, pH 7,2, в присутності зростаючих концентрацій антигену, при цьому вимірювання проводять на спектрометрі, такому як спектрофотометр, обладнаний пристроєм для зупинення потоку (Aviv Instruments) або спектрофотометр SLM-Aminco серії 8000 (ThermoSpectronic), в кюветі з перемішуванням вмісту.

«Швидкість утворення комплексу» або «швидкість асоціації» або « k_{on} » згідно з даним винаходом також можна визначити таким же способом на основі поверхневого плазмонного резонансу, який описаний вище, з використанням BIAcore™-2000 або BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, N.J.) при 25°C за допомогою чипів CM5 з іммобілізованим антигеном на рівні 10 одиниць сигналу у відповідь (RU). Коротко, біосенсорні чипи з карбоксиметильованого декстрану (CM5, BIAcore Inc.) активували гідрохлоридом N-етил-N'-(3-диметиламінопропіл)карбодііміду (EDC) і N-гідроксисукцинімідом (NHS) згідно з інструкціями постачальника. Антиген розбавляли 10 мМ ацетатом натрію, pH 4,8, в концентрації 5 мкг/мл (~0,2 мкМ) перед ін'єктуванням зі швидкістю потоку 5 мкл/хвилину, щоб досягнути приблизно 10 одиниць сигналу у відповідь (RU) від зв'язаного білка. Після ін'єкції антигену ін'єктували 1 М етаноламіну, щоб блокувати групи, які не вступили в реакцію. Для кінетичних вимірювань двократне серійне розведення Fab (від 0,78 нМ до 500 нМ) ін'єктували в PBS з 0,05% твін-20 (PBST) при 25°C зі швидкістю потоку приблизно 25 мкл/хвилину. Швидкості асоціації (k_{on}) і швидкості дисоціації (k_{off}) обчислювали, використовуючи просту модель зв'язування Ленгмюра «один до одного» (комп'ютерна програма для оцінки BIAcore, версія 3.2), за допомогою одночасної підгонки сенсограми асоціації і дисоціації. Рівноважну константу дисоціації (K_d) обчислювали у вигляді відношення k_{off}/k_{on} . Дивись, наприклад, Chen, Y., et al., (1999) J. Mol. Biol. 293: 865-881. Однак, якщо швидкість утворення комплексу перевищує $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ сек}^{-1}$ за даними вказаного вище аналізу поверхневого плазмонного резонансу, то швидкість утворення комплексу можна визначити, використовуючи методику гасіння флуоресценції, яка дозволяє вимірювати збільшення або зменшення інтенсивності випромінювання флуоресценції (збудження = 295 нм; емісія = 340 нм, смуга пропускання 16 нм) при 25°C 20 нМ антитіла проти антигену (Fab-форма) в PBS, pH 7,2, в присутності зростаючих концентрацій антигену, при цьому вимірювання проводять на спектрометрі, такому як спектрофотометр, обладнаний пристроєм для зупинення потоку (Aviv Instruments) або спектрофотометр SLM-Aminco серії 8000 (ThermoSpectronic), в кюветі з перемішуванням вмісту.

Мають на увазі, що термін «вектор» у використовуваному в даному описі значенні стосується молекули нуклеїнової кислоти, здатної транспортувати іншу нуклеїнову кислоту, з якою вона була зв'язана. Одним з типів векторів є «плазмід», яка являє собою кільцеву двониткову петлю ДНК, в яку можуть бути ліговані додаткові фрагменти ДНК. Іншим типом вектора є фаговий вектор. Наступним типом вектора є вірусний вектор, при цьому додаткові фрагменти ДНК можуть бути ліговані у вірусний геном. Деякі вектори здатні до автономної реплікації в клітині-хазяїні, в яку їх вводять (наприклад, бактеріальні вектори, що мають бактеріальний початок реплікації, і епісомні вектори ссавців). Інші вектори (наприклад, неепісомні вектори ссавців) можуть бути інтегровані в геном клітини-хазяїна при введенні в клітину-хазяїна і при цьому реплікуються разом з геномом хазяїна. Крім того, деякі вектори здатні керувати експресією генів, з якими вони оперативно зв'язані. Такі вектори називають в даному описі «рекомбінантними експресуючими векторами» (або просто «рекомбінантними векторами»). Загалом, експресуючі вектори, застосовні в технологіях рекомбінантної ДНК, часто мають форму плазмід. У даному описі терміни «плазмід» і «вектор» можуть бути використані взаємозамінно, оскільки плазмід являє собою найбільш широко використовувану форму вектора.

Терміни «полінуклеотид» або «нуклеїнова кислота», які використовуються в даному описі взаємозамінно, стосуються полімерів нуклеотидів будь-якої довжини і включають ДНК і РНК. Нуклеотиди можуть являти собою дезоксирибонуклеотиди, рибонуклеотиди, модифіковані нуклеотиди або основи і/або їх аналоги, або будь-який субстрат, який може бути введений в полімер ДНК- або РНК-полімеразою або в результаті реакції синтезу. Полінуклеотид може містити модифіковані нуклеотиди, такі як метильовані нуклеотиди і їх аналоги. При наявності модифікація в структурі нуклеотиду може бути введена до або після збирання полімеру. Послідовність нуклеотидів може бути перервана нуклеотидними компонентами. Полінуклеотид може бути додатково модифікований після синтезу, наприклад, за допомогою кон'югування з міткою. Інші типи модифікацій включають, наприклад, «кепи», заміни одного або декількох природних нуклеотидів аналогом, міжнуклеотидні модифікації, такі як, наприклад, модифікації незарядженими зв'язками (наприклад, метилфосфонати, фосфотриєфіри, фосфоамідати, карбамати і т. д.) і зарядженими зв'язками (наприклад, фосфоротіоати, фосфородитіоати і т. д.), модифікації, що містять бічні залишки, такі як, наприклад, білки

(наприклад, нуклеази, токсини, антитіла, сигнальні пептиди, *ply*-L-лізин і т. д.), модифікації інтеркаляторів (наприклад, акридин, псорален і т. д.), модифікації, що містять хелатори (наприклад, метали, радіоактивні метали, бор, окислювальні метали і т. д.), модифікації, що містять алкілятори, полінуклеотиди з модифікованими зв'язками (наприклад, альфа-аномерні нуклеїнові кислоти і т. д.), а також немодифіковані форми полінуклеотиду(ів). Крім того, будь-яка з гідроксильних груп, звичайно присутніх в цукрах, може бути заміщена, наприклад, фосфонатними групами, фосфатними групами, захищена стандартними захисними групами або активована для одержання додаткових зв'язків з додатковими нуклеотидами, або може бути кон'югована з твердими або напівтвердими підкладками. 5'- і 3'-кінцева OH може бути фосфорилована або заміщена амінами або органічними кепуючими групами з 1-20 атомів вуглецю. Інші гідроксили також можуть бути дериватизовані стандартними захисними групами. Полінуклеотиди також можуть містити аналогічні форми цукрів рибози і дезоксирибози, які звичайно відомі в даній галузі, включаючи, наприклад, 2'-O-метил-, 2'-O-аліл-, 2'-фтор- або 2'-азидорибозу, карбоциклічні аналоги цукрів, α -аномерні цукри, епімерні цукри, такі як арабіноза, ксилози або ліксози, піранозні цукри, фуранозні цукри, седогептулози, ациклічні аналоги і позбавлені основи аналоги нуклеозидів, такі як метилрибозид. Один або декілька фосфодіефірних зв'язків можуть бути замінені альтернативними зв'язуючими групами. Такі альтернативні зв'язуючі групи включають без обмеження варіанти, в яких фосфат замінений P(O)S («тіоат»), P(S)S («дитіоат»), (O)NR₂ («амідат»), P(O)R, P(O)OR', CO або CH₂ («формацеталь»), де кожний R або R' незалежно означає H або заміщений або незаміщений алкіл (1-20 C), що необов'язково містить ефірний (-O-) зв'язок, арил, алкеніл, циклоалкіл, циклоалкеніл або аралкіл. Не всі зв'язки в полінуклеотиді повинні бути ідентичними. Попередній опис застосовний до всіх вказаних в даному описі полінуклеотидів, включаючи РНК і ДНК.

«Олігонуклеотид» у використовуваному в даному описі значенні загалом стосується коротких, звичайно одониткових, звичайно синтетичних полінуклеотидів, які, як правило, але не обов'язково, мають довжину менше ніж приблизно 200 нуклеотидів. Терміни «олігонуклеотид» і «полінуклеотид» не є взаємовиключними. Наведений вище опис полінуклеотидів в рівній мірі і повністю застосовний до олігонуклеотидів.

«Ідентичність амінокислотних послідовностей в процентах (%)» відносно пептидної або поліпептидної послідовності визначають у вигляді процентного вмісту амінокислотних залишків у вибраній для дослідження послідовності, які ідентичні амінокислотним залишкам в конкретній пептидній або поліпептидній послідовності після вирівнювання послідовностей і введення пропусків, якщо це необхідно, щоб досягнути максимальної ідентичності послідовностей в процентах, і не беручи до уваги які-небудь консервативні заміни як частину ідентичності послідовностей. Вирівнювання з метою визначення ідентичності амінокислотних послідовностей в процентах можна здійснити різними шляхами, які відомі фахівцям в даній галузі, наприклад, з використанням загальнодоступної комп'ютерної програми, такої як комп'ютерна програма BLAST, BLAST-2, ALIGN або Megalign (DNASTAR). Фахівці в даній галузі можуть визначити придатні параметри для вимірювання вирівнювання, включаючи будь-які алгоритми, необхідні для досягнення максимального вирівнювання протягом всієї довжини порівнюваних послідовностей. Однак з метою даного винаходу значення ідентичності амінокислотних послідовностей в % одержують, використовуючи комп'ютерну програму для порівняння послідовностей ALIGN-2, при цьому вихідний текст програми ALIGN-2 наведений в таблиці А нижче. Автором комп'ютерної програми для порівняння послідовностей ALIGN-2 є Genentech, Inc., і вихідний текст був поданий разом з документацією для користувача в Бюро охорони авторських прав США, Washington D.C., 20559, де він зареєстрований з номером реєстрації Бюро охорони авторських прав США TXU510087. Програма ALIGN-2 загальнодоступна в Genentech, Inc., South San Francisco, Calif. або може бути компільована з вихідного тексту програми, представленого, наприклад, в WO 2007/001851. Програма ALIGN-2 може бути компільована для застосування в операційній системі UNIX, переважно цифровій UNIX V4.0D. Всі параметри для порівняння послідовностей встановлені програмою ALIGN-2 і не варіюють.

У ситуаціях, коли ALIGN-2 застосовують для порівнянь амінокислотних послідовностей, ідентичність амінокислотної послідовності в % для даної амінокислотної послідовності А в порівнянні або відносно даної амінокислотної послідовності В (що альтернативно може бути виражено як дана амінокислотна послідовність А, яка має або містить певну ідентичність амінокислотних послідовностей у % в порівнянні або відносно даної амінокислотної послідовності В) розраховують таким чином:

$$100 \times \text{дріб } X/Y,$$

де X означає кількість амінокислотних залишків, оцінених як ідентичні збіги програмою вирівнювання послідовностей ALIGN-2 при вирівнюванні вказаною програмою A і B , і де Y означає загальну кількість амінокислотних залишків в B . Буде зрозуміло, що, в тому випадку, коли довжина амінокислотної послідовності A не дорівнює довжині амінокислотної послідовності B , ідентичність амінокислотної послідовності A в порівнянні з B в % не буде дорівнювати ідентичності амінокислотної послідовності B в порівнянні з A в %.

Бажано, щоб дві або більше амінокислотних послідовностей були ідентичні щонайменше на 50%, 60%, 70%, 80% або 90%. Більш переважно дві або більше амінокислотних послідовностей ідентичні щонайменше на 95%, 97%, 98%, 99% або навіть 100%. Якщо не вказане інше, всі значення ідентичності амінокислотних послідовностей в %, використовувані в даному описі, одержані, як описано безпосередньо в попередньому абзаці, з використанням комп'ютерної програми ALIGN-2.

Термін «Notch1» у використовуваному в даному описі значенні, якщо не вказано інакше, стосується будь-якого нативного або будь-якого варіанта (або нативного, або синтетичного) поліпептиду Notch1. Термін «нативна послідовність», зокрема, охоплює природні укорочені форми (наприклад, послідовність позаклітинного домену або послідовність трансмембранної субодиниці), природні форми варіантів (наприклад, альтернативно сплайсовані форми) і природні алельні варіанти. Термін «Notch1 дикого типу» загалом стосується поліпептиду, що містить амінокислотну послідовність природного білка Notch1. Термін «послідовність Notch1 дикого типу» загалом стосується амінокислотної послідовності, наявної в природному Notch1.

Термін «ліганд Notch1» у використовуваному в даному описі значенні, якщо не вказано інакше, стосується будь-якого нативного або будь-якого варіанта (або нативного, або синтетичного) поліпептиду ліганду Notch1 (наприклад, Jagged1, Jagged2, Delta-подібний 1, Delta-подібний 3 і/або Delta-подібний 4). Термін «нативна послідовність», зокрема, охоплює природні укорочені форми (наприклад, послідовність позаклітинного домену або послідовність трансмембранної субодиниці), природні форми варіантів (наприклад, альтернативно сплайсовані форми) і природні алельні варіанти. Термін «ліганд Notch1 дикого типу» загалом стосується поліпептиду, що містить амінокислотну послідовність природного білка ліганду Notch1. Термін «послідовність ліганду Notch1 дикого типу» загалом стосується амінокислотної послідовності, наявної в природному ліганді Notch1.

Термін «NRR Notch1» у використовуваному в даному описі значенні, якщо спеціально або відповідно до тексту не вказано інше, стосується будь-якої нативної або будь-якого варіанта (або нативного, або синтетичного) області поліпептиду Notch1, що складається з 3 модулів LNR і амінокислотних послідовностей, розташованих з карбоксильного кінця від модулів LNR, що простягаються до трансмембранного домену, наприклад, амінокислоти з номерами приблизно від 1446 до приблизно 1735 амінокислотної послідовності Notch1 людини (SEQ ID NO: 56) і амінокислоти з номерами приблизно від 1446 до приблизно 1725 амінокислотної послідовності Notch1 миші (SEQ ID NO: 57). Термін «нативна послідовність», зокрема, охоплює природні укорочені форми, природні форми варіантів (наприклад, альтернативно сплайсовані форми) і природні алельні варіанти. Термін «NRR Notch1 дикого типу» загалом стосується поліпептиду, що містить амінокислотну послідовність NRR Notch1, який зустрічається в природі. У деяких варіантах NRR Notch1 являє собою поліпептид, що містить амінокислоти від 1446 до 1735 послідовності SEQ ID NO: 56 або амінокислоти від 1446 до 1725 послідовності SEQ ID NO: 57. У деяких варіантах NRR Notch1 знаходиться в Notch1, такому як, наприклад, Notch1, процесований в сайті (сайтах) S1, S2 і/або S3, або непроцесований Notch1. У деяких варіантах NRR Notch1 містить два або більше нековалентно зв'язаних фрагменти амінокислотної послідовності NRR Notch1, наприклад, фрагмент, що містить амінокислоти від 1446 до 1664 послідовності SEQ ID NO: 56, нековалентно зв'язаний з фрагментом, що містить амінокислоти від 1665 до 1735 послідовності SEQ ID NO: 56. У іншому варіанті фрагмент, що містить амінокислоти від 1446 до 1654 послідовності SEQ ID NO: 57, нековалентно зв'язаний з фрагментом, що містить амінокислоти від 1655 до 1725 послідовності SEQ ID NO: 57.

Термін «підвищена передача сигналів Notch1» у використовуваному в даному описі значенні стосується підвищення передачі сигналів Notch1, тобто щонайменше в два рази вище рівня передачі сигналів Notch1, спостережуваного в контролі в ідентичних умовах, наприклад, з використанням аналізу люциферази, описаного в цьому документі в прикладах 5 і 6. Бажано, підвищення передачі сигналів Notch1 складає щонайменше в три рази, в чотири рази, в п'ять разів або навіть в десять разів вище (або ще вище) рівня, спостережуваного в контролі.

Термін «знижена передача сигналів Notch1» у використовуваному в даному описі значенні стосується зниження передачі сигналів Notch1, тобто щонайменше в два рази нижче рівня передачі сигналів Notch1, спостережуваного в контролі в ідентичних умовах, наприклад, з

використанням аналізу люциферази, описаного в цьому документі в прикладах 5 і 6. Бажано, зниження передачі сигналу Notch1 складає щонайменше в три рази, в чотири рази, в п'ять разів або навіть в десять разів нижче (або ще нижче) рівня, спостережуваного в контролі.

Терміни «мутація, яка активує Notch1» і «мутація, яка активує передачу сигналів Notch1» стосуються інсерції однієї або декількох амінокислот, делеції однієї або декількох амінокислот або заміни однієї або декількох амінокислот в порівнянні з амінокислотною послідовністю Notch1 дикого типу, яка приводить до підвищеної передачі сигналів Notch1 в порівнянні з передачею сигналів Notch1 у випадку відповідної амінокислотної послідовності Notch1 дикого типу, або інсерції одного або декількох нуклеотидів, делеції одного або декількох нуклеотидів, транслокації одного або декількох нуклеотидів або заміни одного або декількох нуклеотидів в порівнянні з послідовністю нуклеїнової кислоти Notch1 дикого типу, що приводить до підвищеної передачі сигналів Notch1 в клітині, що містить мутантну послідовність нуклеїнової кислоти, в порівнянні з передачею сигналів Notch1 в клітині, що містить відповідну послідовність нуклеїнової кислоти Notch1 дикого типу. Передача сигналів Notch1 від рецептора Notch1, що містить активуючу мутацію, може бути залежною від ліганду або незалежною від ліганду.

Терміни «антитіло» і «імуноглобулін» використовують взаємозамінно в найбільш широкому значенні, і терміни охоплюють моноклональні антитіла (наприклад, повнорозмірні або інтактні моноклональні антитіла), поліклональні антитіла, полівалентні антитіла, поліспецифічні антитіла (наприклад, біспецифічні антитіла, при умові, що вони виявляють необхідну біологічну активність), а також можуть включати деякі фрагменти антитіл (які більш детально описані в цьому документі). Антитіло може бути людським, гуманізованим і/або афінно дозрілим.

Термін «варіабельний» стосується того факту, що деякі частини варіабельних доменів значною мірою відрізняються по послідовності серед антитіл і використовуються в зв'язуванні і забезпеченні специфічності кожного конкретного антитіла відносно його конкретного антигену. Однак варіабельність нерівномірно розподілена протягом варіабельних доменів антитіл. Вона сконцентрована в трьох ділянках, званих областями, які визначають комплементарність (CDR), або гіперваріабельними областями, у варіабельних доменах як легкого ланцюга, так і важкого ланцюга. Більш високо консервативні частини варіабельних доменів називають каркасними областями (FR). Кожний з варіабельних доменів нативних важкого і легкого ланцюгів містить чотири області FR, які в основному приймають конфігурацію β -шарів, сполучених трьома CDR, які утворюють петлі, які зв'язують і в деяких випадках утворюють частину β -шаруватої структури. CDR в кожному ланцюгу утримуються разом в безпосередній близькості за допомогою областей FR і з CDR з іншого ланцюга додають внесок в утворення антигензв'язувальної ділянки антитіл (дивись Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Ed. National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Константні домени безпосередньо не залучені у зв'язування антитіла з антигеном, але виявляють різні ефекторні функції, такі як участь антитіла в залежній від антитіл опосередкованій клітинами цитотоксичності.

Розщеплення антитіл папаїном дає два ідентичних антигензв'язувальних фрагменти, званих «Fab»-фрагментами, кожний з яких має одну антигензв'язувальну ділянку, і залишковий «Fc»-фрагмент, назва якого відображає його здатність легко кристалізуватися. Обробка пепсином дає $F(ab')_2$ -фрагмент, який має дві антигензв'язувальні ділянки і ще здатний до перехресного зв'язування антигену.

«Fv» являє собою мінімальний фрагмент антитіла, який містить повний сайт упізнання і зв'язування антигену. У дволанцюжкових формах Fv така область складається з димеру одного варіабельного домену важкого ланцюга і одного варіабельного домену легкого ланцюга в тісній нековалентній асоціації. У одностанцюжкових формах Fv один варіабельний домен важкого ланцюга і один варіабельний домен легкого ланцюга можуть бути ковалентно зв'язані гнучким пептидним лінкером так, щоб легкий і важкий ланцюги могли асоціювати з утворенням «димерної» структури, аналогічної структурі дволанцюжкових форм Fv. Утворюється така конфігурація, що три CDR кожного варіабельного домену взаємодіють, визначаючи границі антигензв'язувальної ділянки на поверхні димеру VH-VL. Шість CDR разом надають антитілу специфічність в зв'язуванні антигену. Однак навіть один варіабельний домен (або половина Fv, що містить тільки три CDR, специфічні відносно антигену) має здатність упізнавати і зв'язувати антиген, хоч і з більш низькою афінністю, ніж повна ділянка зв'язування.

Fab-фрагмент також містить константний домен легкого ланцюга і перший константний домен (CH1) важкого ланцюга. Fab'-фрагменти відрізняються від Fab-фрагментів додаванням декількох залишків на карбоксильному кінці домену CH1 важкого ланцюга, включаючи один або декілька цистеїнів з шарнірної області антитіла. Fab'-SH в даному описі означає Fab', в якому залишок(ки) цистеїну константних доменів несуть вільну тиольну групу. $F(ab')_2$ -фрагменти

антитіл початково одержували у вигляді пар Fab'-фрагментів, між якими є цистеїни шарніра. Також відомі інші типи хімічного зв'язування фрагментів антитіл.

«Легкі ланцюги» антитіл (імуноглобулінів) будь-якого виду хребетних можна віднести до одного з двох чітко відмінних типів, званих каппа (κ) і лямбда (λ), на основі амінокислотних послідовностей їх константних доменів.

Залежно від амінокислотної послідовності константного домену своїх важких ланцюгів імуноглобуліни можуть бути віднесені до різних «класів». Існує п'ять основних класів імуноглобулінів: IgA, IgD, IgE, IgG і IgM, і деякі з них можуть бути додатково розділені на підкласи (ізотипи), наприклад IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ і IgA₂. Константні домени важкого ланцюга, які відповідають різним класам імуноглобулінів, названі α, δ, ε, γ і μ, відповідно. Субодиничні структури і тривимірні конфігурації різних класів імуноглобулінів добре відомі. «Фрагменти антитіла» містять тільки частину інтактного антитіла, при цьому частина переважно зберігає щонайменше одну, переважно більшість або всі функції, в нормі асоційовані з такою частиною, коли вона присутня в інтактному антитілі. Приклади фрагментів антитіла включають фрагменти Fab, Fab', F(ab')₂ і Fv; димерні антитіла (diabodies); лінійні антитіла; одноланцюжкові молекули антитіл і поліспецифічні антитіла, утворені з фрагментів антитіл. У одному варіанті фрагмент антитіла містить антигензв'язувальну ділянку інтактного антитіла і, отже, зберігає здатність зв'язувати антиген. У іншому варіанті фрагмент антитіла, наприклад фрагмент, який містить Fc-область, зберігає щонайменше одну з біологічних функцій, в нормі асоційованих з Fc-областю, коли така присутня в інтактному антитілі, таку як зв'язування FcRn, модулювання часу напівжиття антитіла, функцію ADCC і зв'язування комплементу. У одному варіанті фрагмент антитіла являє собою моновалентне антитіло, яке має час напівжиття *in vivo*, по суті схожий з часом напівжиття інтактного антитіла. Наприклад, такий фрагмент антитіла може містити антигензв'язувальне плече, зв'язане з послідовністю Fc, здатною надавати фрагментам стабільність *in vivo*.

Термін «гіперваріабельна область», «HVR» або «HV» при використанні в даному описі стосується областей варіабельного домену антитіла, які є гіперваріабельними по послідовності і/або утворюють структурно обмежені петлі. Загалом, антитіла містять шість гіперваріабельних областей; три в VH (H1, H2, H3) і три в VL (L1, L2, L3). Використовують декілька варіантів визначення границь гіперваріабельних областей і вони розглядаються в даному описі. Області (CDR), що визначають комплементарність, згідно з системою Kabat основані на варіабельності послідовностей і найбільш широко використовуються (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). Замість цього Chothia розглядає положення структурних петель (Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987)). Гіперваріабельні області AbM являють собою компроміс між CDR згідно з Kabat і структурними петлями згідно з Chothia і використовуються в комп'ютерній програмі для моделювання антитіл AbM Oxford Molecular. Гіперваріабельні області «контакту» основані на аналізі наявних кристалічних структур комплексів. Залишки для кожної з таких гіперваріабельних областей вказані нижче.

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

Гіперваріабельні області можуть містити наступні «розширені гіперваріабельні області»: 24-36 або 24-34 (L1), 46-56 або 50-56 (L2) і 89-97 (L3) в VL і 26-35 (H1), 50-65 або 49-65 (H2) і 93-

102, 94-102 або 95-102 (H3) в VH. Залишки варіабельних доменів пронумеровані згідно з Kabat et al. (посилання вказане вище) для кожного з наведених визначень.

Залишки «каркаса» або «FR» являють собою інші залишки варіабельного домену, відмінні від залишків гіперваріабельної області, яка визначена в даному описі.

5 «Гуманізовані» форми антитіл тварин, відмінних від людини (наприклад мишей), являють собою химерні антитіла, які містять мінімальну послідовність, одержану з імуноглобуліну тварини, відмінної від людини. Головним чином гуманізовані антитіла являють собою імуноглобуліни людини (реципієнтне антитіло), в яких залишки з гіперваріабельної області реципієнта замінені залишками з гіперваріабельної області виду, відмінного від людини (донорне антитіло), такого як миша, щур, кролик або примат, відмінний від людини, що має необхідну специфічність, афінність і місткість. У деяких випадках залишки каркасної області (FR) імуноглобуліну людини замінюють відповідними залишками тварини, відмінної від людини. Крім того, гуманізовані антитіла можуть містити залишки, які не зустрічаються ні в реципієнтному антитілі, ні в донорному антитілі. Такі модифікації здійснюються для того, щоб додаточно поліпшити ефективність антитіла. Загалом, гуманізоване антитіло буде містити в основному повністю щонайменше один і звичайно два варіабельних домени, в яких всі або в основному всі гіперваріабельні петлі відповідають петлям імуноглобуліну тварини, відмінної від людини, і всі або в основному всі FR є FR з послідовності імуноглобуліну людини. Гуманізоване антитіло необов'язково також буде містити щонайменше частину константної області імуноглобуліну (Fc), звичайно константної області імуноглобуліну людини. Більш докладний опис дивись в Jones et al., Nature 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332: 323-329 (1988) і Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593-596 (1992). Також дивись наступні оглядові статті і наведені в них посилання: Vaswani and Hamilton, Ann. Allergy, Asthma and Immunol. 1: 105-115 (1998); Harris, Biochem. Soc. Transactions 23: 1035-1038 (1995); Hurlle and Gross, Curr. Op. Biotech. 5: 428-433 (1994).

«Химерні» антитіла (імуноглобуліни) мають частину важкого і/або легкого ланцюга, ідентичну або гомологічну відповідним послідовностям в антитілах, які одержані від конкретного виду або стосуються конкретного класу або підкласу антитіл, тоді як інша частина ланцюга (ланцюгів) ідентична або гомологічна відповідним послідовностям в антитілах, які одержані від іншого виду або стосуються іншого класу або підкласу антитіл, а також фрагменти таких антитіл, при умові, що вони виявляють необхідну біологічну активність (патент США № 4816567; і Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855 (1984)). Гуманізовані антитіла у використовуваному в даному описі значенні є підгрупою химерних антитіл.

«Одноланцюжкові Fv» або «scFv» фрагменти антитіл містять домени VH і VL антитіла, при цьому такі домени знаходяться в одному поліпептидному ланцюгу. Звичайно поліпептид scFv додатково містить поліпептидний лінкер між доменами VH і VL, який забезпечує можливість утворення необхідної структури scFv для зв'язування антигену. Огляд scFv дивись в Pluckthun, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994).

«Антиген» являє собою попередньо визначуваний антиген, з яким антитіло може вибірно зв'язуватися. Антигеном-мішенню може бути поліпептид, вуглевод, нуклеїнова кислота, ліпід, гаптен або інша природна або синтетична сполука. Переважно антигеном-мішенню є поліпептид.

Термін «димерні антитіла» стосується невеликих фрагментів антитіл з двома антигензв'язувальними ділянками, і такі фрагменти містять варіабельний домен важкого ланцюга (VH), зв'язаний з варіабельним доменом легкого ланцюга (VL) в одному і тому ж поліпептидному ланцюгу (VH-VL). У випадку використання лінкера, який є дуже коротким, щоб забезпечити можливість спарювання між двома доменами на одному і тому ж ланцюгу, домени вимушені спарюватися з комплементарними доменами іншого ланцюга і утворювати дві антигензв'язувальні ділянки. Димерні антитіла більш повно описані, наприклад, в EP 404097, WO 93/11161 і в Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993).

«Людським антитілом» є антитіло, яке має амінокислотну послідовність, відповідну амінокислотній послідовності антитіла, утвореного в організмі людини і/або одержуваного з використанням будь-якого способу одержання людських антитіл, який описаний в даному документі. Таке визначення людського антитіла спеціально включає гуманізоване антитіло, яке містить антигензв'язувальні залишки тварини, відмінної від людини.

Антитіло з «дозрілою афінністю» являє собою антитіло з однією або декількома змінами в одній або декількох його CDR, які приводять до підвищення афінності антитіла до антигену в порівнянні з вихідним антитілом, яке не має такої зміни (змін). Переважні антитіла з дозрілою афінністю будуть мати наномольярні або навіть пікомольярні афінності відносно антигену-

мішені. Антитіла з дозрілою афінністю одержують способами, відомими в даній галузі. Marks et al. *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992) описують дозрівання афінності в результаті перетасовування доменів VH і VL. Випадковий мутагенез залишків CDR і/або каркаса описаний в: Barbas et al., *Proc Nat. Acad. Sci, USA* 91: 3809-3813 (1994); Schier et al., *Gene* 169: 147-155 (1995); Yelton et al., *J. Immunol.* 155: 1994-2004 (1995); Jackson et al., *J. Immunol.* 154(7): 3310-9 (1995); і Hawkins et al., *J. Mol. Biol.* 226: 889-896 (1992).

«Ефекторні функції» антитіл стосуються біологічних активностей, властивих Fc-області (Fc-області з нативною послідовністю або Fc-області з варіантом амінокислотної послідовності) антитіла, і варіюють залежно від ізотипу антитіл. Приклади ефекторних функцій антитіл включають: зв'язування C1q і комплементзалежну цитотоксичність (CDC); зв'язування рецептора Fc; залежну від антитіл опосередковану клітинами цитотоксичність (ADCC); фагоцитоз; знижувальну регуляцію рецепторів клітинної поверхні (наприклад, B-клітинного рецептора) і активацію B-клітин.

Терміни «залежна від антитіл опосередкована клітинами цитотоксичність» і «ADCC» стосуються форми цитотоксичності, при якій секретований Ig, зв'язаний рецепторами Fc (FcR), присутній на деяких цитотоксичних клітинах (наприклад, природних клітинах-кілерах (NK), нейтрофілах і макрофагах), забезпечує можливість специфічного зв'язування таких цитотоксичних ефекторних клітин з несучою антиген клітиною-мішенню і потім викликає лізис клітини-мішені. Антитіла «озброюють» цитотоксичні клітини і абсолютно необхідні для такого лізису. Первинні клітини для опосередковування ADCC, NK-клітини, експресують тільки FcγRIII, тоді як моноцити експресують FcγRI, FcγRII і FcγRIII. Експресія FcR на гематопоетичних клітинах підсумована в таблиці 3 на сторінці 464 в Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9: 457-92 (1991). Щоб оцінити активність в ADCC молекули, що представляє інтерес, можна здійснити аналізи ADCC *in vitro*, такі як аналізи, описані в патентах США №№ 5500362 або 5821337, або в Presta U.S. Pat. № 6737056. Застосовні ефекторні клітини для таких аналізів включають моноклеарні клітини периферичної крові (PBMC) і природні клітини-кілери (NK). Альтернативно або додатково, ADCC-активність молекули, що представляє інтерес, можна оцінити *in vivo*, наприклад в тваринній моделі, такій як модель, описана в Clynes et al. *PNAS (USA)* 95: 652-656 (1998).

«Ефекторними клітинами людини» є лейкоцити, які експресують один або декілька FcR і здійснюють ефекторні функції. Переважно клітини експресують щонайменше FcγRIII і здійснюють ADCC-ефекторну функцію. Приклади лейкоцитів людини, які опосередковують ADCC, включають моноклеарні клітини периферичної крові (PBMC), природні клітини-кілери (NK), моноцити, цитотоксичні Т-клітини і нейтрофіли; при цьому звичайно переважні PBMC і NK-клітини. Ефекторні клітини можуть бути виділені з їх природного джерела, наприклад з крові.

Терміни «Fc-рецептор» і «FcR» використовують для опису рецептора, який зв'язується з Fc-областю антитіла. Переважним FcR є FcR людини з нативною послідовністю. Крім того, переважним FcR є FcR, який зв'язує IgG-антитіло (гамма-рецептор), і до переважних рецепторів належать рецептори підкласів FcγRI, FcγRII і FcγRIII, включаючи алельні варіанти і альтернативно сплайсовані форми вказаних рецепторів. Рецептори FcγRII включають FcγRIIA («активуючий рецептор») і FcγRIIB («інгібуючий рецептор»), які мають схожі амінокислотні послідовності, що відрізняються головним чином своїми цитоплазматичними доменами. Активуючий рецептор FcγRIIA містить в своєму цитоплазматичному домені оснований на тирозині мотив активації імунорецептора (ITAM). Інгібуючий рецептор FcγRIIB містить в своєму цитоплазматичному домені оснований на тирозині мотив інгібування імунорецептора (ITIM) (огляд в Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15: 203-234 (1997)). Огляд, присвячений FcR, представлений в Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9: 457-92 (1991); Capel et al., *Immunomethods* 4: 25-34 (1994); і de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.* 126: 330-41 (1995). Інші FcR, включаючи FcR, що ідентифікуються в природі, включені в даному описі в термін «FcR». Термін також охоплює неонатальний рецептор, FcRn, який відповідає за перенесення материнських IgG в плід (Guyer et al., *J. Immunol.* 117: 587 (1976) і Kim et al., *J. Immunol.* 24: 249 (1994)) і регулює гомеостаз імуноглобулінів. У WO 00/42072 (Presta) описані варіанти антитіл з підвищеним або зменшеним зв'язуванням з FcR. Вміст вказаної патентної публікації спеціально включений в даний опис у вигляді посилання. Дивись також Shields et al., *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001).

Способи вимірювання зв'язування з FcRn відомі (дивись, наприклад, Ghetie 1997, Hinton 2004). Зв'язування з FcRn людини *in vivo* і час напівжиття в сироватці поліпептидів, які з високою афінністю зв'язують FcRn людини, можна аналізувати, наприклад, у трансгенних

мишей або в трансфектованих лініях клітин людини, експресуючих FcRn людини, або у приматів, яким вводять варіанти поліпептидів Fc.

«Комплементзалежна цитотоксичність» і «CDC» стосуються лізису мішені в присутності комплементу. Шлях активації комплементу ініціюється зв'язуванням першого компонента системи комплементу (C1q) з антитілами (відповідного підкласу), які зв'язані зі своїм антигеном. Щоб оцінити активацію комплементу можна здійснити аналіз CDC, наприклад, як описано в Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202: 163 (1996).

Варіанти поліпептидів із зміненою амінокислотною послідовністю Fc-області і підвищеною або зниженою здатністю зв'язувати C1q описані в патенті США № 6194551B1 і в WO 99/51642. Зміст вказаних патентних публікацій спеціально включений в даний опис у вигляді посилання. Дивись також Idusogie et al., J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000).

Термін «поліпептид, який містить Fc-область» стосується поліпептиду, такого як антитіло або імуноадгезин, який містить Fc-область. С-кінцевий лізин (залишок 447 згідно з системою нумерації EU) Fc-області може бути видалений, наприклад, під час очищення поліпептиду або в результаті конструювання рекомбінантної нуклеїнової кислоти, яка кодує поліпептид. Відповідно, композиція, що містить поліпептид, який має Fc-область, згідно з даним винаходом може містити поліпептиди з K447, зі всіма видаленими K447 або суміш поліпептидів, які мають і не мають залишок K447.

«Блокувальне» антитіло або «антагоністичне» антитіло являє собою антитіло, яке інгібує або знижує біологічну активність антигену, який воно зв'язує. Переважні блокувальні антитіла або антагоністичні антитіла значною мірою або повністю інгібують біологічну активність антигену. Бажано, щоб біологічна активність була знижена на 10%, 20%, 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% або навіть на 100%.

«Агоністичне антитіло» у використовуваному в даному описі значенні являє собою антитіло, яке імітує щонайменше одну з функціональних активностей поліпептиду, що представляє інтерес.

«Акцепторний каркас людини» з метою даного опису означає каркас, що містить амінокислотну послідовність каркаса VL або VH, одержану з каркаса імуноглобуліну людини або з консенсусного каркаса людини. Акцепторний каркас людини, «одержаний з» каркаса імуноглобуліну людини або з консенсусного каркаса людини, може містити ту ж саму амінокислотну послідовність або може містити попередні зміни амінокислотної послідовності. У тому випадку, коли є попередні зміни амінокислот, переважно присутні не більше 5 і переважно 4 або менше або 3 або менше попередніх змін амінокислот. У тому випадку, коли попередні зміни амінокислот присутні в VH, переважно такі зміни мають місце тільки в трьох, двох або одному положенні 71H, 73H, і 78H; наприклад, амінокислотними залишками в таких положеннях можуть бути 71A, 73T і/або 78A. У одному варіанті акцепторний каркас VL людини ідентичний по послідовності каркасній послідовності VL імуноглобуліну людини або консенсусній каркасній послідовності людини.

«Консенсусним каркасом людини» є каркас, який має амінокислотний залишок, що найбільш часто зустрічається, при селекції каркасних послідовностей VL або VH імуноглобуліну людини. В основному селекція послідовностей VL або VH імуноглобуліну людини здійснюється з підгрупи послідовностей варіабельних доменів. Звичайно підгрупа послідовностей являє собою підгрупу згідно з системою Kabat et al. У одному варіанті для VL підгрупою є підгрупа каппа I згідно з Kabat et al. У одному варіанті для VH підгрупою є підгрупа III згідно з Kabat et al.

«Консенсусний каркас підгрупи III VH» містить консенсусну послідовність, одержану з амінокислотних послідовностей в підгрупі III варіабельних областей важкого ланцюга згідно з Kabat et al. У одному варіанті амінокислотна послідовність консенсусного каркаса підгрупи III VH містить щонайменше частину або повністю кожну з наступних послідовностей:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO:42)-H1-

WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO:43)-H2-RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC (SEQ ID

NO:44)-H3-WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:45).

«Консенсусний каркас підгрупи I VL» містить консенсусну послідовність, одержану з амінокислотних послідовностей в підгрупі I варіабельної області легкого ланцюга каппа згідно з Kabat et al. У одному варіанті амінокислотна послідовність консенсусного каркаса підгрупи I VH містить щонайменше частину або повністю кожну з наступних послідовностей:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO:15)-L1-WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO:16)-L2-GVPSRFSGSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:17)-L3-FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:18).

«Порушення» або «захворювання» означає будь-який стан, при якому може бути корисне лікування речовиною/молекулою або способом згідно з винаходом. Такий стан включає хронічні і гострі порушення або захворювання, включаючи такі патологічні стани, які зумовлюють схильність ссавця до порушення, що розглядається. Необмежувальними прикладами порушень, які піддаються лікуванню згідно з винаходом, є злоякісні і доброякісні пухлини; карцинома, бластома і саркома.

Терміни «клітинне проліферативне порушення» і «проліферативне порушення» стосуються порушень, які асоційовані з певною мірою аномальної проліферації клітин. У одному варіанті клітинним проліферативним порушенням є злоякісна пухлина.

«Пухлина» у використуваному в даному описі значенні стосується проліферації клітин і неопластичного росту, або злоякісного, або доброякісного, і всіх передзлоякісних і злоякісних клітин і тканин. Терміни «злоякісна пухлина», «злоякісна», «клітинне проліферативне порушення», «проліферативне порушення» і «пухлина» не є взаємовиключними при згадуванні в даному описі.

Терміни «злоякісна пухлина» і «злоякісний» стосуються або описують фізіологічний стан у ссавців, який звичайно характеризується нерегульованим клітинним ростом/проліферацією. Приклади злоякісної пухлини включають без обмеження карциному, лімфому, бластоми, саркому і лейкоз. Більш конкретні приклади таких злоякісних пухлин включають рак сквамозних клітин, дрібноклітинний рак легені, недрібноклітинний рак легені, аденокарциному легені, сквамозну карциному легені, рак очеревини, гепатоклітинний рак, рак шлунково-кишкового тракту, рак підшлункової залози, гліобластоми, рак шийки матки, рак яєчника, рак печінки, рак сечового міхура, гепатому, рак молочної залози, рак ободової кишки, рак прямої і ободової кишки, карциному ендометрія або матки, карциному слинних залоз, рак нирок, рак печінки, рак простати, рак вульви, рак щитовидної залози, карциному печінки, рак шлунка, меланому і різні типи раку голови і шиї. Порушення регуляції ангиогенезу може приводити до багатьох порушень, які можна лікувати, застосовуючи композиції і способи згідно з винаходом. Такі порушення включають як не неопластичні, так і неопластичні стани. Неопластичні порушення включають без обмеження описані вище порушення. Не неопластичні порушення включають без обмеження небажану гіпертрофію або гіпертрофію, що відхиляється від норми, артрит, ревматоїдний артрит (RA), псоріаз, псоріазні бляшки, саркоїдоз, атеросклероз, атеросклеротичні бляшки, діабетичні і інші проліферативні ретинопатії, включаючи ретинопатію недоношених, ретролентальну фіброплазію, неоваскулярну глаукому, пов'язану з віком дегенерацію жовтої плями, діабетичний макулярний набряк, неоваскуляризацію рогівки, неоваскуляризацію трансплантата рогівки, відторгнення трансплантата рогівки, неоваскуляризацію сітківки/хоріоїду, неоваскуляризацію кутка ока (почервоніння райдужки), неоваскулярне захворювання ока, рестеноз судин, артеріовенозні мальформації (AVM), менінгіому, гемангіому, ангиофіброму, гіперплазії щитовидної залози (включаючи дифузний токсичний зоб), трансплантацію рогівки і інших тканин, хронічне запалення, запалення легень, гостре легеневе ушкодження/ARDS, сепсис, первинну легенеvu гіпертонію, злоякісні легеневі черепи/травмою), синовіальне запалення, утворення пануса при RA, осифікувальний міозит, гіпертрофічне утворення кісток, остеоартрит (OA), рефрактерні асцити, полікістоз яєчника, ендометріоз, захворювання, пов'язані з втратою рідини в 3-тій простір (панкреатит, синдром міжфасціального простору, опіки, захворювання кишечника), фіброїди матки, передчасні роди, хронічне запалення, таке як IBD (хвороба Крона і виразковий коліт), відторгнення алотрансплантата нирки, запальне захворювання кишечника, нефротичний синдром, небажаний ріст маси тканини або ріст маси тканини, що відхиляється від норми (не злоякісний), гемофілічні гемартрози, гіпертрофічні рубці, інгібування росту волосся, синдром Ослера-Вебера, піогенну гранульому, ретролентальні фіброплазії, склеродермію, трахому, спайки судин, синовіт, дерматит, передекламписю, асцити, перикардальний випіт (такий як перикардальний випіт, пов'язаний з перикардитом) і плевральний випіт.

Терміни «нейродегенеративне захворювання» і «нейродегенеративне порушення» використовують в найбільш широкому значенні, і терміни включають всі порушення, патологія при яких полягає в дегенерації і/або порушенні функції нейронів, включаючи без обмеження периферичні невропатії; порушення рухових нейронів, такі як бічний аміотрофічний склероз

(ALS, хвороба Лу Геріга), периферичний параліч лицьового нерва і різні стани, в які залучена м'язова атрофія спинного мозку або параліч; і інші нейродегенеративні захворювання людини, такі як хвороба Альцгеймера, хвороба Паркінсона, епілепсія, розсіяний склероз, хорея Хантінгтона, синдром Дауна, нервова глухота і хвороба Мен'єра.

«Периферична невропатія» є нейродегенеративним порушенням, яке уражає периферичні нерви, що найчастіше виявляється у вигляді одного порушення моторної, сенсорної, сенсомоторної або аутоімунної функції або у вигляді поєднання порушень вказаних функцій. Периферичні невропатії, наприклад, можуть бути спадковими, можуть бути результатом системного захворювання або можуть бути індуковані токсичним агентом, таким як нейротоксичний лікарський засіб, наприклад, антинеопластичний засіб або промислова забруднююча речовина або забруднююча речовина навколишнього середовища.

«Периферична сенсорна невропатія» характеризується дегенерацією периферичних сенсорних нейронів, яка може бути ідіопатичною, може виникати, наприклад, як наслідок діабету (діабетична невропатія), лікування цитостатичними лікарськими засобами при злоякісній пухлині (наприклад, лікування такими хімотерапевтичними засобами як вінкрисин, цисплатин, метотрексат, 3'-азидо-3'-дезокситимідин або таксани, наприклад, паклітаксел [TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.] і доксетаксел [TAXOTERE®, Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France]), алкоголізму, синдрому набутого імунodefіциту (AIDS) або генетичної схильності. Генетично зумовлені периферичні невропатії включають, наприклад, синдром Рефсума, хворобу Краббе, метакроматичну лейкодистрофію, хворобу Фабрі, синдром Дежеріна-Сотта, абеталіпопротеїнемію і хворобу Шарко-Марі-Тута (CMT) (також звану м'язовою атрофією перонеального типу або спадковою сенсомоторною невропатією (HMSN)). Більшість типів периферичної невропатії розвивається повільно, протягом декількох місяців або років. У клінічній практиці такі невропатії називають хронічними. Іноді периферична невропатія розвивається швидко, протягом декількох днів, і тоді її називають гострою. Периферична невропатія звичайно уражає сенсорні і моторні нейрони разом, так що виникає змішана сенсомоторна невропатія, але також відомі незмішані сенсорна і моторна невропатії.

«Аутоімунне захворювання» у використовуваному в даному описі значенні стосується будь-якого порушення, в патологію якого залучена імунна відповідь проти власної тканини індивідуума. Аутоімунні захворювання включають без обмеження ревматоїдний артрит (RA), астму, хронічне обструктивне легеневе захворювання (COPD), запальне захворювання кишечника, целіакію, алергічний риніт, алергічну кропивницю, хворобу Крона, хворобу Гіршпрунга, дифузний токсичний зоб, Аддісонову хворобу, синдром Гійєна-Барре, хворобу Хашимото, алергічні внутрішньоочні запальні захворювання, анкілозуючий спондиліт, atopічний дерматит, аутоімунну гемолітичну анемію, аутоімунний гепатит, хворобу Бехчета, синдром Когана, контактний дерматит, синдром Кушинга, дерматоміозит, цукровий діабет, дискоїдний червоний вовчак, вовчаковий нефрит, еозинофільний фасціт, вузлувату еритему, ексфоліативний дерматит, осередковий або сегментарний гломерулосклероз, гігантоклітинний артеріт, подагру, подагричний артрит, екзему рук, пурпуру Геноха-Шенлейна, герпес вагітних, гірсутизм, ідіопатичний кератосклероз, ідіопатичну тромбоцитопенічну пурпуру, запальні дерматози, розсіяний склероз, бульбоспинальний параліч, міозит, остеоартрит, панкреатит, пемфігоїд вагітних, вульгарний пемфігус, періодонтит; нодозний поліартеріт, ревматичну поліміалгію, мошонковий свербіж, прурит/запалення, псоріаз, псоріатичний артрит, легеневий гістоплазмоз, рецидивуючий поліхондрит, рожеві вугри, саркоїдоз, склеродермію, синдром септичного шоку, тендиніт або бурсит плеча, синдром Шегрена, синдром Стілла, хворобу Світа, системний червоний вовчак, системний склероз, артеріт Такаюсу, темпоральний артеріт, токсичний епідермальний некроліз, відторгнення трансплантата, туберкульоз, діабет типу 1, виразковий коліт, увеїт, васкуліт і гранулематоз Вегенера.

«Імунологічне порушення» у використовуваному в даному описі значенні стосується будь-якого порушення, в патологію якого залучений аномальний розвиток або аномальна регуляція імунної системи у індивідуума. Переважно в імунологічне порушення залучений аномальний розвиток або аномальна регуляція Т-клітин.

«Лікарським засобом» є активний засіб для лікування порушення, що розглядається, або його синдромів, або побічних ефектів.

У використовуваному в даному описі значенні «лікування» стосується клінічного втручання з метою спроби змінити природний перебіг процесу в організмі індивідуума або в клітині, що піддається лікуванню, і лікування можна здійснювати або для профілактики, або під час перебігу клінічної патології. Необхідні ефекти лікування включають профілактику виникнення або рецидивів захворювання, ослаблення симптомів, зниження яких-небудь прямих або опосередкованих патологічних наслідків захворювання, попередження метастазів, зниження

швидкості прогресування захворювання, ослаблення або полегшення патологічного стану і ремісію або поліпшений прогноз. У деяких варіантах антитіла згідно з винаходом використовують для сповільнення розвитку захворювання або порушення.

«Індивідуумом» є хребетне, переважно ссавець, більш переважно людина. Ссавці включають без обмеження сільськогосподарських тварин (таких як корови), спортивних тварин, домашніх тварин (таких як кішки, собаки, коні), приматів, мишей і щурів.

«Ссавець» з метою лікування стосується будь-якої тварини, що класифікується як ссавець, включаючи людину, домашніх і сільськогосподарських тварин і тварин в зоопарках, спортивних тварин або кімнатних тварин, таких як собаки, коні, кішки, корови і т. д. Переважно ссавцем є людина.

Термін «ефективна кількість» стосується кількості, ефективної в дозах і протягом необхідних періодів часу стосовно досягнення необхідного терапевтичного або профілактичного результату.

«Терапевтична ефективна кількість» речовини/молекули згідно з винаходом, агоніста або антагоніста може варіювати залежно від таких факторів, як тип патологічного стану, вік, стать і маса пацієнта і здатність речовини/молекули, агоніста або антагоніста викликати необхідну відповідь у індивідуума. Терапевтично ефективна кількість також являє собою таку кількість, при використанні якої будь-які токсичні або шкідливі ефекти речовини/молекули, агоніста або антагоніста переважаються терапевтично корисними ефектами. «Профілактично ефективна кількість» стосується кількості, ефективної в дозах і протягом необхідного періоду часу стосовно досягнення необхідного профілактичного результату. Звичайно, але не обов'язково, в зв'язку з тим, що профілактичну дозу використовують для індивідуума до виникнення або на ранній стадії захворювання, профілактично ефективна кількість буде меншою, ніж терапевтично ефективна кількість.

Термін «цитотоксичний засіб» у використовуваному в даному описі значенні стосується речовини, яка інгібує або попереджує функцію клітин і/або викликає руйнування клітин. Мається на увазі, що термін включає радіоактивні ізотопи (наприклад ^{211}At , ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{212}Bi , ^{32}P і радіоактивні ізотопи Lu), хіміотерапевтичні засоби, наприклад, метотрексат, адриаміцин, алкалоїди барвінку (вінкристин, вінбластин, етопозид), доксорубіцин, мелфалан, мітоміцин С, хлорамбуцил, даунорубіцин або інші інтеркалюючі агенти, ферменти і їх фрагменти, такі як нуклеолітичні ферменти, антибіотики і токсини, такі як низькомолекулярні токсини або ферментативно активні токсини бактеріального, грибового, рослинного або тваринного походження, включаючи їх фрагменти і/або варіанти, і різні протипухлинні або протиракові засоби, описані нижче. Інші цитотоксичні засоби описані нижче. Тумороцидний засіб викликає руйнування пухлинних клітин.

«Хіміотерапевтичним засобом» є хімічна сполука, застосовна для лікування злоякісної пухлини. Приклади хіміотерапевтичних засобів включають алкілувальні агенти, такі як тіотепа і CYTOXAN® циклофосфамід; алкілсульфонати, такі як бусульфан, імпросульфан і піпосульфан; азиридины, такі як бензодоба, карбоквон, метуредоба і уредоба; етиленіміни і метилмеламіни, включаючи алтретамін, триетиленмеламін, триетиленфосфорамід, триетилентіофосфорамід і триметилмеламін; ацетогеніни (зокрема булатацин і булатацинон); дельта-9-тетрагідроканабінол (дронабінол, MARINOL®); бета-лапахон; лапахол; колхіцини; бетулінову кислоту; камптотецин (включаючи синтетичний аналог топотекан (HYCAMTIN®), CPT-11 (іринотекан, CAMPTOSAR®), ацетилкамптотецин, скополектин і 9-амінокамптотецин); бріостатин; калістатин; CC-1065 (включаючи його синтетичні аналоги адозелезин, карзелезин і бізелезин); подофілотоксин; подофілінову кислоту; теніпозид; криптофіцини (зокрема криптофіцин 1 і криптофіцин 8); доластатин; дуокарміцин (включаючи синтетичні аналоги KW-2189 і CB1-TM1); елеутеробін; панкратистатин; саркодиктиїн; спонгістатин; азотистий іприт, такий як хлорамбуцил, хлорнафазин, холофосфамід, естрамустин, іфосфамід, мехлоретамін, гідрохлорид оксиду мехлоретаміну, мелфалан, новембіхін, фенестерин, преднімустин, трофосфамід, урамустин; нітрозосечовини, такі як кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, німустин і ранімустин; антибіотики, такі як енедіїнові антибіотики (наприклад, каліхеаміцин, зокрема каліхеаміцин гамма II і каліхеаміцин омега II (дивись, наприклад, Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)); динеміцин, включаючи динеміцин А; еспераміцин; а також хромофор неокарциностатину і споріднені хромофори хромопротейнів - енедіїнові антибіотики), аклациномізини, актиноміцин, аутраміцин, азасерин, блеоміцини, кактиноміцин, карабіцин, карміноміцин, карзинофілін, хромоміцин, дактиноміцин, даунорубіцин, деторубіцин, 6-діазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубіцин ADRIAMICIN® (включаючи морфолінодоксорубіцин, ціаноморфолінодоксорубіцин, 2-піролінодоксорубіцин і дезоксидоксорубіцин), епірубіцин, езорубіцин, ідарубіцин, марцеломіцин, мітоміцини, такі як мітоміцин С, мікофенолову кислоту,

ногаламіцин, оливоміцини, пепломіцин, потфіроміцин, пуроміцин, квеламіцин, родорубіцин, стрептонігрин, стрептозоцин, туберцидин, убенімекс, зиностатин, зорубіцин; антиметаболіти, такі як метотрексат і 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолієвої кислоти, такі як деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметотрексат; аналоги пурину, такі як флударабін, 6-меркаптопурин, тіаміприн, тіогуанін; аналоги піримідину, такі як анцитабін, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабін, дидезоксіуридин, доксифлуридин, еноцитабін, флоксуридин; андрогени, такі як калустерон, пропіонат дромостанолону, епітіостанол, мепітіостан, тестолактон; засоби, що пригнічують функції надниркових залоз, такі як аміноглютетимід, мітотан, трилостан; компенсатор фолієвої кислоти, такий як фолінова кислота; ацеглатон; глікозид альдофосфамід; амінолевулінову кислоту; енілурацил; амсакрин; бестрабуцил; бісантрен; едотраксат; дефофамін; демеколцин; діазиквон; елфорнітин; ацетат еліптінію; епотилон; етоглуцид; нітрат галію; гідроксисечовину; лентинан; лонідаїнін; мейтанзиноїди, такі як мейтанзин і ансамітоцини; мітогуазон; мітоксантрон; мопіданмол; нітраерин; пентостатин; фенамет; пірарубіцин; лозоксантрон; 2-етилгідрозид; прокарбазин; полісахаридний комплекс PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); разоксан; ризоксин; сизофіран; спірогерманій; теназонову кислоту; триазиквон; 2,2',2"-трихлортриетиламін; трихотецени (зокрема токсин Т-2, веракурин А, роридин А і ангуїдин); уретан; віндезин (ELDISINE®, FILDESINE®); дакарбазин; маномустин; мітобронітол; мітолактон; піпоброман; гацитозин; арабінозид («ara-C»); тіотепу; таксоїди, наприклад паклітаксел (TAXOL®) (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE™, препарат паклітакселу, що не містить кремофору, на основі сконструйованих зв'язаних з альбуміном наночастинок (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Ill.), і доксетаксел TAXOTERE® (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France); хлорамбуцил; гемцитабін (GEMZAR®); 6-тіогуанін; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платини, такі як цисплатин і карбоплатин; вінбластин (VELBAN®); платину; етопозид (VP-16); іфосфамід; мітоксантрон; вінкристин (ONCOVIN®); оксаліплатин; лейковорин; вінорелбін (NAVELBINE®); новантрон; едотрексат; дауноміцин; аміноптерин; ібандронат; інгібітор топоізомерази RFS 2000; дифторметилорнітин (DMFO); ретиноїди, такі як ретиноева кислота; капецитабін (XELODA®); фармацевтично прийнятні солі, кислоти і похідні будь-якого засобу, вказаного вище; а також поєднання двох або більше вказаних вище засобів, такі як CHOP, скорочена назва комбінованої терапії циклофосфамідом, доксорубіцином, вінкристином і преднізолоном, і FOLFOX, скорочена назва схеми лікування оксаліплатином (ELOXATIN™) в поєднанні з 5-FU і лейковорином.

Також у вказане визначення включені протигормональні засоби, які діють, регулюючи, зменшуючи, блокуючи або інгібуючи ефекти гормонів, які можуть стимулювати ріст злоякісної пухлини, і часто їх використовують у формі системного лікування або лікування на рівні цілого організму. Вони самі можуть бути гормонами. Приклади включають антиестрогени і вибірні модулятори рецепторів естрогену (SERM), включаючи, наприклад, тамоксифен (включаючи тамоксифен NOLVADEX®), ралоксифен EVISTA®, дролоксифен, 4-гідрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон і тореміфен FARESTON®; антипрогестерони; знижувальні регулятори рецептора естрогену (ERD); засоби, які функціонують, пригнічуючи або припиняючи роботу яєчників, наприклад, агоністи рилізінг-гормону лютеїнізуючого гормону (LHRH), такі як ацетат лейпроліду (LUPRON® і ELIGARD®), ацетат гозереліну, ацетат бузереліну і триптерелін; інші антиандрогени, такі як флутамід, нілутамід і бікалутамід; і інгібітори ароматази, які інгібують фермент ароматазу, яка регулює продукцію естрогену в надниркових залозах, такі як, наприклад, 4(5)-імідазоли, аміноглютетимід, ацетат мегестролу (MEGASE®), ексеместан (AROMASIN®), форместан, фазрозол, ворозол (RIVISOR®), летрозол (FEMARA®) і анастрозол (ARIMIDEX®). Крім того, таке визначення хіміотерапевтичних засобів включає бісфосфонати, такі як клодронат (наприклад, BONEFOS® або OSTAC®), етидронат (DIDROCAL®), NE-58095, золедронову кислоту/золедронат (ZOMETAX®), алендронат (FOSAMAX®), памідронат (AREDIA®), тилудронат (SKELID®) або ризедронат (ACTONEL®); а також троксациабін (1,3-діоксолановий нуклеозидний аналог цитозину); антисмислові олігонуклеотиди, зокрема олігонуклеотиди, які інгібують експресію генів в шляхах передачі сигналів, залучених в аномальну проліферацію клітин, таких як, наприклад, PKC-альфа, Raf, H-Ras і рецептор епідермального фактора росту (EGF-R); вакцини, такі як вакцина THERATOPE® і вакцини для генної терапії, наприклад, вакцина ALLOVECTIN®, вакцина LEUVECTIN® і вакцина VAXID®; інгібітор топоізомерази 1 LURTOTECAN®; rmRH ABARELIX®; дитозилат лапатинібу (низькомолекулярний подвійний інгібітор тирозинкіназ ErbB-2 і EGFR, також відомий як GW572016); і фармацевтично прийнятні солі, кислоти або похідні будь-якого з вказаних вище засобів.

«Інгібуючий ріст засіб» при використанні в даному описі стосується сполуки або композиції, яка інгібує ріст клітини (такої як клітина, експресуюча Notch1) *in vitro* і/або *in vivo*. Таким чином, інгібуючим ріст засобом може бути засіб, який значною мірою зменшує процентний вміст клітин (таких як клітина, експресуюча Notch1) в S-фазі. Приклади інгібуючих ріст засобів включають засоби, які блокують проходження клітинного циклу (в іншому місці, відмінному від S-фази), такі як засоби, які індукують затримку в G1-фазі і затримку в M-фазі. Класичні блокатори M-фази включають алкалоїди барвінку (вінкристин і вінбластин), таксани і інгібітори топоізомерази II, такі як доксорубіцин, епірубіцин, даунорубіцин, етопозид і блеоміцин. Засоби, які затримують в G1-фазі, також розповсюджують свою дію на затримку в S-фазі, наприклад ДНК-алкілувальні агенти, такі як тамоксифен, преднізон, дакарбазин, мехлоретамін, цисплатин, метотрексат, 5-фторурацил і ара-С. Додаткову інформацію можна знайти в *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn and Israel, eds., в розділі 1, озаглавленому «Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs» by Murakami et al. (WB Saunders: Philadelphia, 1995), особливо на стор. 13. Таксани (паклітаксел і доцетаксел) є протипухлинними лікарськими засобами, одержаними з тиса. Доцетаксел (TAXOTERE®, Rhône-Poulenc Rorer), одержаний з Європейського тиса, є напівсинтетичним аналогом паклітакселу (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). Паклітаксел і доцетаксел стимулюють збирання мікротрубочок з димерів тубуліну і стабілізують мікротрубочки, попереджуючи деполімеризацію, що приводить до інгібування мітозу в клітинах.

«Доксорубіцин» є антрацикліновим антибіотиком. Повна хімічна назва доксорубіцину (8S-цис)-10-[(3-аміно-2,3,6-тридезоксис- α -L-лікогексапіранозил)окси]-7,8,9,10-тетрагідро-6,8,11-тригідрокси-8-(гідроксіацетил)-1-метокси-5,12-нафтацендіон.

Термін «antineoplastic composition» стосується композиції, застосовної для лікування злоякісної пухлини, яка містить щонайменше один активний терапевтичний засіб, наприклад, «протипухлинний засіб». Приклади терапевтичних засобів (протипухлинних засобів, також званих в даному описі «antineoplastic agents») включають без обмеження, наприклад, хімотерапевтичні засоби, інгібуючі ріст засоби, цитотоксичні засоби, засоби, використовувані в променевій терапії, засоби проти ангіогенезу, викликаючі апоптоз засоби, засоби проти тубуліну, токсини і інші засоби для лікування злоякісної пухлини, наприклад, нейтралізуючі антитіла проти VEGF, антагоніст VEGF, анти-HER-2, анти-CD20, антагоніст рецептора епідермального фактора росту (EGFR) (наприклад, інгібітор тирозинкінази), інгібітор HER1/EGFR, ерлотиніб, інгібітор COX-2 (наприклад, целекоксиб), інтерферони, цитокіни, антагоністи (наприклад, нейтралізуючі антитіла), які зв'язуються з одним або декількома рецепторами ErbB2, ErbB3, ErbB4 або VEGF, інгібітори рецепторних тирозинкіназ, одержаного з тромбоцитів фактора росту (PDGF) і/або фактора стовбурових клітин (SCF) (наприклад, мезилат іматинібу (Gleevec® Novartis)), TRAIL/Apo2, і інші біологічно активні і органічні хімічні агенти, і т. д.

Термін «prodrug», використовуваний в даній заявці, стосується форми попередника або похідного фармацевтично активної речовини, яка є менш цитотоксичною відносно пухлинних клітин в порівнянні з вихідним лікарським засобом і здатна піддаватися ферментативній активації або перетворенню в більш активну вихідну форму. Дивись, наприклад, Wilman, «Prodrugs in Cancer Chemotherapy» Biochemical Society Transactions, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986) і Stella et al., «Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery», Directed Drug Delivery, Borchardt et al., (ed.), pp. 247-267, Humana Press (1985). Проліки згідно з винаходом включають без обмеження проліки, що містять фосфат, проліки, що містять тіофосфат, проліки, що містять сульфат, проліки, що містять пептид, модифіковані D-амінокислотами проліки, глікозиловані проліки, проліки, що містять бета-лактам, проліки, що містять необов'язково заміщений феноксіацетамід або проліки, що містять необов'язково заміщений фенілацетамід, 5-фторцитозинвмісні і інші 5-фторуридинвмісні проліки, які можуть бути перетворені в більш активний цитотоксичний вільний лікарський засіб. Приклади цитотоксичних лікарських засобів, які можуть бути дериватизовані в пролікарську форму для застосування в даному винаході, включають без обмеження хімотерапевтичні засоби, описані вище.

Термін «antiangiogenic agent» або «angiogenesis inhibitor» стосується низькомолекулярної речовини, поліпептиду, поліпептиду, ізолюваного білка, рекомбінантного білка, антитіла або їх кон'югатів або злитих білків, які інгібують ангіогенез, васкулогенез або небажану проникність судин або прямо, або опосередковано. Наприклад, засобом проти ангіогенезу є антитіло або інший антагоніст ангіогенного засобу, який описаний вище, наприклад, антитіла до VEGF, антитіла до рецепторів VEGF, малі молекули, які блокують передачу сигналу рецептора VEGF (наприклад, PTK787/ZK2284, SU6668, SUTENT/SU11248 (малат сунітинібу), AMG706). Засоби проти ангіогенезу також включають нативні інгібітори

ангіогенезу, наприклад, ангіостатин, ендостатин і т. д. Дивись наприклад Klagsbrun and D'Amore, *Annu. Rev. Physiol.*, 53: 217-39 (1991); Streit and Detmar, *Oncogene*, 22: 3172-3179 (2003) (наприклад, таблиця 3, в якій перераховані антиангіогенні терапевтичні засоби у випадку злоякісної меланоми); Ferrara and Alitalo, *Nature Medicine* 5(12): 1359-1364 (1999); Tonini et al., *Oncogene*, 22: 6549-6556 (2003) (наприклад таблиця 2, в якій перераховані антиангіогенні фактори); і Sato *Int. J. Clin. Oncol.*, 8: 200-206 (2003) (наприклад, таблиця 1, в якій перераховані антиангіогенні засоби, використовувані в клінічних випробуваннях).

Термін «біологічний зразок» (взаємозамінно називаний «зразком» або «зразком тканини або клітин») охоплює множину типів зразків, які одержані від індивідуума і які можуть бути використані в діагностичному або моніторинговому аналізі. Визначення охоплює зразок крові і інші рідкі зразки біологічного походження, зразки солідних тканин, такі як зразки біопсії, або одержані з них культури тканини і клітини і їх потомство. Визначення також включає зразки, які були оброблені яким-небудь чином після їх одержання, наприклад, оброблені реагентами, піддані солюбілізації або збагачені деякими компонентами, такими як білки або полінуклеотиди, або залиті в напівтвердий або твердий матрикс з метою одержання зрізів. Термін «біологічний зразок» охоплює клінічний зразок, а також включає клітини в культурі, надосади клітин, лізати клітин, сироватку, плазму, біологічну рідину і зразки тканин. Джерелом біологічного зразка може бути солідна тканина зі свіжого, замороженого і/або законсервованого органа або зразок тканини або біопсія, або аспірат; кров або будь-які компоненти крові; рідини організму, такі як спинномозкова рідина, амніотична рідина, рідина черевної порожнини або рідина кишечника; клітини в будь-якому періоді вагітності або розвитку індивідуума. У деяких варіантах біологічний зразок одержують з первинної або метастатичної пухлини. Біологічний зразок може містити сполуки, які не зустрічаються в тканинах в природі, такі як консерванти, антикоагулянти, буфери, фіксатори, поживні речовини, антибіотики або тому подібне.

З метою даного опису «зріз» зразка тканини означає одну частину або шматочок зразка тканини, наприклад, тонкий зріз тканини або клітини із зразка тканини. Мається на увазі, що може бути одержано декілька зрізів зразків тканин, і зрізи можуть бути піддані аналізу згідно з даним винаходом. У деяких варіантах аналізують один і той же зріз зразка тканини на морфологічному і молекулярному рівнях і аналізують відносно і білка, і нуклеїнової кислоти.

Слово «мітка» при використанні в даному описі стосується сполуки або композиції, які кон'юговані або злиті прямо або опосередковано з реагентом, таким як зонд нуклеїнової кислоти або антитіло, що полегшує реєстрацію реагенту, з яким вони кон'юговані або злиті. Мітку можна реєструвати як таку (наприклад, радіоізотопні мітки або флуоресціюючі мітки) або, як у випадку ферментної мітки, вона може каталізувати хімічну зміну субстратної сполуки або композиції, що реєструється.

Рецептор Notch1 і активуючі мутації

Рецептори Notch протеолітично процесуються під час транспорту до клітинної поверхні фуриноподібною протеазою в сайті S1 приблизно на 70 амінокислот із зовнішньої сторони відносно трансмембранного домену з одержанням позаклітинної субодиноці Notch (ECN) і трансмембранної субодиноці Notch (NTM). Дві вказаних субодиноці залишаються нековалентно зв'язаними і складають зрілий гетеродимерний рецептор клітинної поверхні. Субодиноця ECN Notch1 містить 36 N-кінцевих EGF-подібних повтори, за якими ідуть три тандемно повторюваних модулі LNR (LNR_A, LNR_B і LNR_C). Кожний модуль LNR містить три дисульфідних зв'язки і групу консервативних кислих і полярних залишків, які, як вважають, координують іон кальцію. У області повторів EGF лежать сайти зв'язування для активуючих лігандів. Модулі LNR беруть участь в підтриманні Notch в конформації спокою до індукованої лігандом активації. NTM Notch1 містить позаклітинну область, трансмембранну ділянку і велику внутрішньоклітинну частину, яка включає в себе домен RAM (молекула, асоційована з RBP J κ), повтори анкірину, домен трансактивації і PEST-послідовність на карбоксильному кінці. Стабільна асоціація субодиноць ECN і NTM залежить від домену гетеродимеризації (HD), що включає в себе карбоксильний кінець ECN (званий HD-C) і позаклітинний амінокінець NTM (званий HD-N). Зв'язування ліганду Notch з субодиноцею ECN ініціює два послідовних протеолітичних розщеплення, які відбуваються в результаті регульованого внутрішньомембранного протеолізу. Перше розщеплення металопротеазою в сайті розщеплення S2 (локалізованому в NTM) робить трансмембранну субодиноцю Notch чутливою до другого розщеплення в сайті розщеплення S3 поблизу внутрішнього шару плазматичної мембрани. Розщеплення в сайті S3, яке каталізується мультибілковим комплексом, що містить пресенілін і нікастрин, вивільняє внутрішньоклітинну частину трансмембранної субодиноці Notch (також званої внутрішньоклітинною Notch; «ICN»), забезпечуючи можливість її транслокації в ядро і активації транскрипції генів-мішеней.

На фігурах з 11-1 по 11-4 показано вирівнювання між амінокислотними послідовностями Notch1 людини (SEQ ID NO: 56) і миші (SEQ ID NO: 57). Сигнальний пептид приблизно охоплює амінокислоти 1-18 послідовності SEQ ID NO: 56 або 57, повтори EGF (EGF1-EGF36) приблизно охоплюють амінокислоти 20-1426 послідовності SEQ ID NO: 56 або 57, LNR_A приблизно охоплює амінокислоти 1446-1489 послідовності SEQ ID NO: 56 або 57, LNR_B приблизно охоплює амінокислоти 1490-1527 послідовності SEQ ID NO: 56 або 57, LNR_C приблизно охоплює амінокислоти 1528-1562 послідовності SEQ ID NO: 56 або 57, HD-N приблизно охоплює амінокислоти 1563-1664 послідовності SEQ ID NO: 56 або амінокислоти 1563-1654 послідовності SEQ ID NO: 57, HD-C приблизно охоплює амінокислоти 1665-1733 послідовності SEQ ID NO: 56 або амінокислоти 1655-1723 послідовності SEQ ID NO: 57, і домен PEST приблизно охоплює амінокислоти 2484-2555 послідовності SEQ ID NO: 56 або приблизно амінокислоти 2459-2530 послідовності SEQ ID NO: 57. Домен HD, який включає в себе HD-N і HD-C, приблизно охоплює амінокислоти 1563-1733 послідовності SEQ ID NO: 56 або амінокислоти 1563-1723 послідовності SEQ ID NO: 57. Сайт розщеплення S1 знаходиться між амінокислотами 1664 і 1665 послідовності SEQ ID NO: 56 і між амінокислотами 1654 і 1655 послідовності SEQ ID NO: 57. Сайт розщеплення S2 знаходиться між амінокислотами 1720 і 1721 послідовності SEQ ID NO: 56 і амінокислотами 1710 і 1711 послідовності SEQ ID NO: 57. Трансмембранна частина приблизно охоплює амінокислоти 1736-1747 послідовності SEQ ID NO: 56 і приблизно амінокислоти 1726-1737 послідовності SEQ ID NO: 57.

Ідентифіковано і охарактеризовано декілька типів мутацій Notch1, які впливають на передачу сигналів Notch1. Мутації Notch1, які активують передачу сигналів Notch1, поділяються на два загальних класи, а саме - незалежні від ліганду і залежні від ліганду активуючі мутації. Крім того, деякі незалежні від ліганду активуючі мутації, проте, є чутливими до лігандів. Мутації, які активують передачу сигналів Notch1, були асоційовані з T-ALL (Weng et al., Science 306: 269-271, 2004; Malecki et al., Mol. Cell. Biol. 26: 4642-4651, 2006). Зокрема, активуючі мутації Notch1, асоційовані з T-ALL, були ідентифіковані в області HD і в домені PEST. Крім того, транслокації можуть приводити до аномальної передачі сигналів Notch1. Наприклад, було виявлено, що Notch1 є геном-партнером в хромосомній транслокації (7;9) (q34; q34.3). Така транслокація виявлена в рідкій підгрупі T-ALL і зливає 3'-кінець гена Notch1 з промотором/енхансером T-клітинного рецептора β (Weng et al., Science 306: 269-271, 2004).

Прикладами незалежних від ліганду мутацій, які передають сигнал за відсутності зв'язування ліганду, але зберігають здатність відповідати на зв'язування ліганду, є мутації в області HD Notch1. Активуючими мутаціями в області HD-N Notch1 людини є, наприклад, L1575P, V1577E, F1593S, L1594P, L1597H, R1599P, L1601P і I1617T/N. Прикладами активуючих мутацій в області HD-C Notch1 людини є V1677D, L1679P, I1681N, A1702P, I1719T і інсерція (ARLGS LNIPYKIEA; SEQ ID NO: 52) в сайті розщеплення S2 (інсерція P12). Мутації L1575P, V1577E, F1593S, L1594P, L1597H, R1599P, L1601P, I1617T/N, V1677D, L1679P, I1681N, A1702P і I1719T і інсерція P12 викликають підвищене розщеплення в S2 і S3, і передача сигналів Notch1 при цьому вище, ніж передача сигналів у випадку рецептора Notch1 дикого типу.

Підгрупа активуючих мутацій Notch1 знижує стабільність гетеродимеру - вони ослабляють взаємодію ECN-області і NTM. Прикладами мутацій, які знижують стабільність гетеродимеру у випадку Notch1 людини, є L1575P, V1577E, F1593S, L1594P, L1597H, R1599P, I1617T, I1617N, I1681N, A1702P і I1719T. Інсерція P12 виникає в результаті прямої дуплікації, яка, як передбачають, приводить до перестановки ендогенного домену HD-C з сайту розщеплення S2 і може підвищувати доступність сайту S2 для металопротеаз (Malecki et al., Mol. Cell. Biol. 26: 4642-4651, 2006).

Приклади активуючих мутацій Notch1, які є залежними від ліганду, включають мутації в домені PEST, такі як інсерції або делеції, які індукують зсув рамки зчитування або точкові мутації, які створюють передчасні стоп-кодони. Вважають, що видалення інгібуючого домену PEST збільшує час напівжиття ICN. Прикладом мутації в домені PEST є DelPEST, яка являє собою делецію на карбоксильному кінці, починаючи з амінокислоти 2473 амінокислотної послідовності Notch1 людини (SEQ ID NO: 57). Інші мутації в домені PEST відомі в даній галузі і описані, наприклад, в Weng et al. (Science 306: 269-271, 2004).

Композиції згідно з винаходом і способи їх одержання

Даний винахід охоплює композиції, включаючи фармацевтичні композиції, що містять анти-NRR Notch1-антитіло; і полінуклеотиди, що містять послідовності, які кодують анти-NRR Notch1-антитіло. У використовуваному в даному описі значенні композиції містять одне або декілька антитіл, які зв'язуються з NRR Notch1, і/або один або декілька полінуклеотидів, що містять послідовності, які кодують одне або декілька антитіл, що зв'язуються з NRR Notch1. Такі

композиції можуть додатково містити придатні носії, такі як фармацевтично прийнятні ексципієнти, включаючи буфери, які добре відомі в даній галузі.

Винахід також охоплює варіанти ізольованих антитіл і полінуклеотидів. Винахід також охоплює по суті чисті варіанти антитіл і полінуклеотидів.

5 Анти-NRR Notch1-антитіла згідно з винаходом переважно є моноклональними. Також в об'єм винаходу включені Fab-, Fab'-, Fab'-SH- і F(ab')₂-фрагменти анти-NRR Notch1-антитіл, описаних в цьому документі. Такі фрагменти антитіл можуть бути створені традиційними способами, такими як ферментативне розщеплення, або можуть бути створені з використанням методики рекомбінації. Такі фрагменти антитіл можуть бути химерними або гуманізованими.

10 Такі фрагменти застосовні для діагностичних і терапевтичних цілей, вказаних нижче. Моноклональні антитіла одержують з популяції по суті гомогенних антитіл, тобто окремі антитіла, що складають популяцію, є ідентичними, за винятком можливих мутацій, що зустрічаються в природі, які присутні в мінорних кількостях. Таким чином, визначення «моноклональне» вказує на характер антитіл, як таких, що не є сумішшю, відмінних одне від

15 одного антитіл. Моноклональні анти-NRR Notch1-антитіла згідно з винаходом можуть бути одержані з використанням способу на основі гібридом, вперше описаного в Kohler et al., Nature, 256: 495 (1975), або можуть бути одержані способами на основі рекомбінації ДНК (патент США № 4816567).

20 У способі на основі гібридом мишу або іншу придатну тварину-хазяїна, таку як хом'ячок, імунізують, щоб викликати появу лімфоцитів, які продукують або здатні продукувати антитіла, які будуть специфічно зв'язуватися з білком, використовуваним для імунізації. Антитіла до NRR Notch1 звичайно утворюються у тварин при багаторазових підшкірних (п/ш) або внутрішньоочереваних (в/о) ін'єкціях NRR Notch1 і ад'юванту. NRR Notch1 може бути одержаний способами, добре відомими в даній галузі, деякі з яких описані в цьому документі. Наприклад, нижче описане рекомбінантне одержання NRR Notch1 людини і миші. У одному варіанті тварин імунізують NRR Notch1, злитим з Fc-частиною важкого ланцюга імуноглобуліну. У переважному варіанті тварин імунізують злитим білком NRR Notch1-IgG1. Тварин звичайно імунізують імуногенними кон'югатами або похідними NRR Notch1 з монофосфорилліпідом A

30 (MPL)/дикриноміколатом трегалози (TDM) (Ribi Immunochem. Research, Inc., Hamilton, Mont.), і розчин ін'єктують інтрадермально в декілька ділянок. Через два тижні тваринам проводять бустер-імунізацію. Через 7-14 днів у тварин беруть кров і аналізують сироватку відносно титру анти-NRR Notch1-антитіл. Тваринам проводять бустер-імунізації аж до виходу титру на плато.

35 Альтернативно, лімфоцити можна імунізувати *in vitro*. Потім лімфоцити зливають з клітинами мієломи, використовуючи придатний агент для злиття, такий як поліетиленгліколь, щоб утворити гібридомну клітину (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)).

40 Одержані таким чином клітини гібридами висівають і вирощують у придатному культуральному середовищі, яке переважно містить одну або декілька речовин, які інгібують ріст або життєздатність незлитих вихідних клітин мієломи. Наприклад, якщо у вихідних клітинах мієломи відсутній фермент гіпоксантингуанінфосфорибозилтрансфераза (HGPRT або HPRT), то в культуральне середовище для гібридом звичайно будуть включати гіпоксантин, аміноптерин і тимідин (середовище HAT), і такі речовини попереджують ріст HGPRT-дефіцитних клітин.

45 Переважні клітини мієломи являють собою клітини, які ефективно зливаються, підтримують на стабільно високому рівні продукцію антитіл відібраними продукуючими антитіла клітинами і чутливі до такого середовища, як середовище HAT. Серед них переважними лініями клітин мієломи є лінії клітин мієломи мишей, такі як лінії, одержані з пухлин мишей MOPC-21 і MPC-11, доступні з Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA, і клітини SP-2 або X63-Ag8-653, доступні з Американської колекції типів культур, Rockville, Maryland USA. Лінії клітин мієломи людини і гетеромієломи миші-людини також були описані для одержання моноклональних антитіл людини (Kozbor, J. Immunol., 133: 3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

55 Культуральне середовище, в якому вирощують клітини гібридами, аналізують відносно продукції моноклональних антитіл, направлених, наприклад, проти NRR Notch1. Переважно специфічність зв'язування моноклональних антитіл, продукованих клітинами гібридами, визначають за допомогою імунопреципітації або аналізом зв'язування *in vitro*, таким як радіоімуноаналіз (PIA) або твердофазний імуноферментний аналіз (ELISA).

Афінність зв'язування моноклонального антитіла можна, наприклад, визначити аналізом за Скетчардом, як описано в Munson et al., *Anal. Biochem.*, 107: 220 (1980).

Після того, як ідентифіковані клітини гібридами, які продукують антитіла необхідної специфічності, афінності і/або активності, клони можуть бути субклоновані способами лімітуючого розведення і вирощені стандартними способами (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)). Придатні культуральні середовища для вказаної мети включають, наприклад, середовище D-MEM або RPMI-1640. Крім того, клітини гібридами можуть бути вирощені *in vivo* у вигляді асцитних пухлин у тварини.

Моноклональні антитіла, секретовані підклонами, відповідним чином відділяють від культурального середовища, асцитної рідини або сироватки звичайними способами очищення імуноглобулінів, такими як, наприклад, хроматографія з використанням білок А-сефарози, гідроксилапатиту, гель-електрофорез, діаліз або афінна хроматографія.

Анти-NRR Notch1-антитіла згідно з винаходом можуть бути одержані з використанням комбінаторних бібліотек для скринінгу синтетичних клонів антитіл з необхідною активністю або активностями. У принципі, синтетичні клони антитіл відбирають в результаті скринінгу фагових бібліотек, що містять фаг, який презентує на своїй поверхні різні фрагменти варіабельної області антитіла (Fv), злитої з білком оболонки фага. Такі фагові бібліотеки сортуєть способом пенінгу, використовуючи афінну хроматографію проти необхідного антигену. Клон, експресуючі Fv-фрагменти, здатні зв'язуватися з необхідним антигеном, адсорбують на антигені і таким чином відділяють від не зв'язуючих клонів в бібліотеці. Потім зв'язуючі клони елюють з антигену, і їх можна потім збагатити в додаткових циклах адсорбції/елювання антигену. Будь-яке з анти-NRR Notch1-антитіл згідно з винаходом може бути одержане в результаті розробки способу скринінгу придатного антигену, щоб відібрати фаговий клон, що представляє інтерес, з подальшим конструюванням клону повнорозмірного анти-NRR Notch1-антитіла з використанням Fv-послідовностей з фагового клону, що представляє інтерес, і придатних послідовностей константної області (Fc), описаних в Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda Md. (1991), vols. 1-3.

Антигензв'язувальний домен антитіла утворений двома варіабельними (V) областями довжиною приблизно 110 амінокислот, по одному з легкого (VL) і важкого (VH) ланцюгів, кожний з яких має три гіперваріабельних петлі або області (CDR), що визначають комплементарність. Варіабельні домени можуть бути представлені функціонально на фазі, або у вигляді одноланцюжкових фрагментів Fv (scFv), в яких VH і VL ковалентно зв'язані за допомогою короткого гнучкого пептиду, або у вигляді Fab-фрагментів, в яких вони злиті з константним доменом і взаємодіють нековалентно, як описано в Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). У використовуваному в даному описі значенні фагові клони, що кодують scFv, і фагові клони, що кодують Fab, разом називають «фаговими клонами Fv» або «Fv-клонами».

Репертуари генів VH і VL можуть бути клоновані окремо в полімеразній ланцюговій реакції (ПЛР) і рекомбіновані випадковим чином в фагових бібліотеках, в яких потім можна провести пошук антигензв'язувальних клонів, як описано в Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Бібліотеки з імунізованих джерел дозволяють одержувати високоафінні антитіла до імуногена без необхідності в конструюванні гібридом. Альтернативно, може бути клонований нативний репертуар, щоб одержати одне джерело антитіл людини до широкого кола не власних, а також власних антигенів без якої-небудь імунізації, як описано в Griffiths et al., *EMBO J.*, 12: 725-734 (1993). Нарешті, нативні бібліотеки також можуть бути одержані синтетично в результаті клонування не підданих реаранжуванню фрагментів V-генів зі стовбурових клітин і з використанням ПЛР-праймерів, що містять випадкову послідовність, щоб одержати кодування високоваріабельних областей CDR3 і здійснити реаранжування *in vitro*, як описано в Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992).

Нитчастий фаг використовують для одержання дисплея фрагментів антитіл в результаті злиття мінорного білка оболонки pIII. Фрагменти антитіл можуть бути представлені на дисплеї у вигляді одноланцюжкових Fv-фрагментів, в яких домени VH і VL зв'язані в одному і тому ж поліпептидному ланцюгу гнучким поліпептидним спейсером, наприклад, як описано в Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), або у вигляді Fab-фрагментів, в яких один ланцюг злитий з pIII, а інший секретується в периплазму бактеріальної клітини-хазяїна, де збирається структура Fab-білок оболонки, яка презентується у вигляді дисплея на фаговій поверхні в результаті витіснення деяких білків оболонки дикого типу, наприклад, як описано в Hoogenboom et al., *Nucl. Acids Res.*, 19: 4133-4137 (1991).

Загалом, нуклеїнові кислоти, що кодують фрагменти гена антитіла, одержують з імунних клітин, зібраних з організму людини або тварин. Якщо потрібна бібліотека, зміщена переважно в

сторону анти-NRR Notch1-клонів, то індивідуума імунізують NRR Notch1, щоб викликати гуморальну відповідь, і витягують клітини селезінки і/або циркулюючі В-клітини, відмінні від периферичних лімфоцитів кров (PBL), для конструювання бібліотеки. У переважному варіанті бібліотеку фрагментів генів антитіл людини, зміщену переважно в сторону анти-NRR Notch1-клонів, одержують, викликаючи гуморальну відповідь у вигляді утворення анти-NRR Notch1-антитіл у трансгенних мишей, що несуть ряд функціональних генів імуноглобуліну людини (у яких відсутня система продукування функціональних ендогенних антитіл), так що імунізація NRR Notch1 викликає продукування В-клітинами антитіл людини проти NRR Notch1. Створення трансгенних мишей, продукуючих антитіла людини, описане нижче.

Додаткове збагачення популяції анти-NRR Notch1-реактивних клітин можна здійснити, використовуючи придатний спосіб скринінгу, щоб виділити В-клітини, експресуючі NRR Notch1-специфічне зв'язане з мембраною антитіло, наприклад, за допомогою розділення клітин NRR Notch1-афінною хроматографією або за допомогою адсорбції клітин на міченому флуорохромом NRR Notch1 з подальшим флуоресцентно активованим сортуванням клітин в потоці (FACS).

Альтернативно, використання клітин селезінки і/або В-клітин або інших PBL від імунізованого донора дає краще представлення можливого репертуару антитіл, а також дозволяє сконструювати бібліотеку антитіл для будь-якого виду тварини (людини або тварини, відмінної від людини), у якій NRR Notch1 не є антигеном. У випадку створення бібліотек із залученням конструювання генів антитіл *in vitro* з організму індивідуума витягують стовбурові клітини, щоб одержати нуклеїнові кислоти, що кодують не піддані аранжуванню ділянки генів антитіл. Імунні клітини, що представляють інтерес, можуть бути одержані з різних видів тварин, таких як людина, миша, щур, зайцеподібні, вовчі, псові, котяті, свині, корови, коні і птахи, і т. д.

Нуклеїнову кислоту, що кодує гени варіабельних областей антитіла (включаючи ділянки VH і VL), витягують з клітин, що представляють інтерес, і ампліфікують. У випадку бібліотек реаранжованих генів VH і VL необхідна ДНК може бути одержана в результаті виділення геномної ДНК або мРНК з лімфоцитів з подальшим проведенням полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням праймерів, співпадаючих з 5'- і 3'-кінцями реаранжованих генів VH і VL, як описано в Orlandi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 3833-3837 (1989), з одержанням таким чином різноманітних репертуарів V-генів для експресії. V-гени можуть бути ампліфіковані з кДНК і геномної ДНК з використанням зворотних праймерів на 5'-кінці екзона, що кодує зрілий V-домен, і прямих праймерів, розміщених в J-ділянці, як описано в Orlandi et al. (1989) і в Ward et al., Nature, 341: 544-546 (1989); однак для ампліфікації з кДНК також можуть розміщуватися в лідерному екзоні, як описано в Jones et al., Biotechnol., 9: 88-89 (1991), а прямі праймери - в константній області, як описано в Sastry et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 5728-5732 (1989). Щоб максимізувати комплементарність, в праймери можна ввести виродженість, як описано в Orlandi et al. (1989) або Sastry et al. (1989). Переважно різноманітність бібліотеки максимізують, використовуючи праймери ПЛР, направлені до кожного сімейства V-генів, щоб ампліфікувати всі доступні реаранжування VH і VL, присутні в зразку нуклеїнових кислот імунних клітин, наприклад, згідно зі способом, описаним в Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991), або згідно зі способом, описаним в Orum et al., Nucleic Acids Res., 21: 4491-4498 (1993). У випадку клонування ампліфікованої ДНК в експресуючих векторах в праймер для ПЛР можуть бути введені рідкі сайти рестрикції у вигляді мітки на одному кінці, як описано в Orlandi et al. (1989), або проведена додаткова ПЛР-ампліфікація з міченим праймером, як описано в Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991).

Репертуари синтетично реаранжованих V-генів можуть бути одержані *in vitro* з фрагментів V-генів. Більшість фрагментів VH-генів людини можуть бути клоновані і секвеновані (як повідомляється в Tomlinson et al., J. Mol. Biol., 227: 776-798 (1992)), і картовані (як повідомляється в Matsuda et al., Nature Genet., 3: 88-94 (1993)); такі клоновані фрагменти (включаючи всі основні конформації петлі H1 і H2) можуть бути використані для створення різноманітного репертуару генів VH з використанням ПЛР-праймерів, що кодують петлі H3 з різною послідовністю і довжиною, як описано в Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992). Репертуар VH також можна одержати з використанням повної різноманітності послідовностей, сфокусованої на петлі H3 однієї довжини, як описано в Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4457-4461 (1992). Фрагменти Vk і Vl людини були клоновані і секвеновані (як повідомляється в Williams and Winter, Eur. J. Immunol., 23: 1456-1461 (1993)) і можуть бути використані для одержання репертуару синтетичних легких ланцюгів. Репертуар синтетичних V-генів, оснований на різноманітності складок VH і VL і довжин L3 і H3, буде кодувати антитіла, що характеризуються великою структурною різноманітністю. Після ампліфікації кодуючих V-гени

ДНК фрагменти V-генів зародкової лінії можуть бути реаранжовані *in vitro* способами, згідно з Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992).

Репертуар фрагментів антитіл може бути сконструйований за допомогою комбінування репертуарів генів VH і VL разом декількома шляхами. Кожний репертуар може бути створений в різних векторах, і може бути здійснена рекомбінація векторів *in vitro*, наприклад, як описано в Hogrefe et al., Gene, 128: 119-126 (1993), або *in vivo* за допомогою комбінаторної інфекції, наприклад, з використанням системи loxP, описаної в Waterhouse et al., Nucl. Acids Res., 21: 2265-2266 (1993). В способі рекомбінації *in vivo* використовують дволанцюжкову природу Fab-фрагментів, щоб подолати обмеження по розміру бібліотеки, яке накладається ефективністю трансформації *E. coli*. Нативні репертуари VH і VL клонують окремо, один в фагміді, а інший в фаговому векторі. Потім дві бібліотеки об'єднують за допомогою фагової інфекції бактерії, що містять фагмід, для того, щоб кожна клітина містила різне сполучення, і розмір бібліотеки був обмежений тільки кількістю наявних клітин (приблизно 10^{12} клонів). Обидва вектори містять сигнали рекомбінації *in vivo*, так що гени VH і VL рекомбінують в одному репліконі і упаковуються спільно в фагові віріони. Такі гігантські бібліотеки забезпечують великі кількості різноманітних антитіл з хорошою афінністю (K_d^{-1} приблизно 10^8 M).

Альтернативно, репертуари можуть бути клоновані послідовно в одному і тому ж векторі, наприклад, як описано в Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 7978-7982 (1991), або зібрані разом за допомогою ПЛР і потім клоновані, як описано в Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991). ПЛР-зборання також можна використати для з'єднання ДНК VH і VL з ДНК, що кодує гнучкий пептидний спейсер, з утворенням репертуарів одноланцюжкового Fv (scFv). Ще один спосіб «ПЛР-збирання в клітинах» використовують для комбінування генів VH і VL в лімфоцитах за допомогою ПЛР і подальшим клонування репертуарів зв'язаних генів, як описано в Embleton et al., Nucl. Acids Res., 20: 3831-3837 (1992).

Антитіла, одержані з використанням нативних бібліотек (або природних, або синтетичних), можуть мати середню афінність (K_d^{-1} складає від 10^6 до 10^7 M $^{-1}$), але дозрівання афінності також можна імітувати *in vitro* за допомогою конструювання і повторної селекції вторинних бібліотек, як описано в Winter et al. (1994), див. вище. Наприклад, можуть бути випадково введені мутації *in vitro* з використанням схильної до помилок полімерази (як повідомляється в Leung et al., Technique, 1: 11-15 (1989)) згідно зі способом Hawkins et al., J. Mol. Biol., 226: 889-896 (1992) або способом Gram et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 3576-3580 (1992). Додатково дозрівання афінності можна здійснити в результаті випадкового мутагенезу однієї або декількох CDR, наприклад, з використанням ПЛР з праймерами, що несуть випадкову послідовність, яка охоплює CDR, що представляє інтерес, у вибраних окремих клонах Fv і скринінгу стосовно клонів з більш високою афінністю. У WO 96/07754 (опублікованій 14 березня 1996 р.) описаний спосіб індукування мутагенезу в області, що визначає комплементарність, легкого ланцюга імуноглобуліну, щоб створити бібліотеку генів легкого ланцюга. Інший ефективний спосіб полягає в рекомбінуванні доменів VH або VL, відібраних за допомогою фагового дисплея, з репертуарами варіантів V-доменів, що зустрічаються в природі, одержаних від неімунізованих донорів, і скринінгу відносно більш високої афінності в декількох раундах перетасовування ланцюгів, як описано в Marks et al., Biotechnol., 10: 779-783 (1992). Такий спосіб дозволяє одержувати антитіла і фрагменти антитіл з афінностями в діапазоні 10^{-9} M.

Послідовності нуклеїнової кислоти і амінокислотні послідовності NRR Notch1 відомі в даній галузі. Послідовність нуклеїнової кислоти, кодуюча NRR Notch1, може бути сконструйована з використанням амінокислотної послідовності необхідної області NRR Notch1. Послідовності можуть містити послідовність SEQ ID NO: 55, 13 або 14. Альтернативно, можна використовувати послідовність кДНК (або її фрагменти), що має номер доступу в GenBank NM-017617. Нуклеїнові кислоти, що кодують NRR Notch1, можуть бути одержані різними способами, відомими в даній галузі. Такі способи включають без обмеження хімічний синтез будь-якими зі способів, описаних в Engels et al., Agnew. Chem. Int. Ed. Engl., 28: 716-734 (1989), такими як способи на основі триєфірів, фосфітів, фосфорамідитів і Н-фосфонатів. У одному варіанті використовують кодони, переважні для експресії в клітині-хазяїні, для конструювання ДНК, що кодує NRR Notch1. Альтернативно, ДНК, що кодує NRR Notch1, може бути виділена з геномної бібліотеки або з бібліотеки кДНК.

Після конструювання молекулу ДНК, що кодує NRR Notch1, оперативно зв'язують послідовністю, що регулює експресію, в експресуючому векторі, такому як плазміда, при цьому регуляторна послідовність упізнається клітиною-хазяїном, трансформованою вектором. Загалом, плазмідні вектори містять послідовності реплікації і регуляторні послідовності, які одержані з виду, сумісного з клітиною-хазяїном. Вектор звичайно несе ділянку реплікації, а також послідовності, які кодують білки, які здатні забезпечувати фенотипічну селекцію

трансформованих клітин. Вектори, придатні для експресії в прокаріотичних і еукаріотичних клітинах-хазяїнах, відомі в даній галузі, а деякі додатково описані в цьому документі. Можна використовувати еукаріотичні організми, такі як дріжджі або клітини, одержані з багатоклітинних організмів, таких як ссавці.

5 Необов'язково ДНК, що кодує NRR Notch1, оперативно зв'язують з послідовністю лідера секреції, що приводить до секреції продукту експресії клітиною-хазяїном в культуральне середовище. Прикладами секреторних лідерних послідовностей є послідовності still, екотину, lamB, GD герпесу, lpp, лужної фосфатази, інвертази і альфа-фактора. Також придатною для застосування в даному винаході є 36-амінокислотна лідерна послідовність білка A (Abrahmsen et al., EMBO J., 4: 3901 (1985)).

10 Клітини-хазяїни трансфекують і переважно трансформують описаними вище експресуючими або клонуючими векторами згідно з даним винаходом і культивують в звичайних поживних середовищах, відповідним чином модифікованих для індукції промоторів, селекції трансформантів або ампліфікації генів, які кодують необхідні послідовності.

15 Трансфекція стосується включення експресуючого вектора в клітину-хазяїна, незалежно від того, експресуються або не експресуються будь-які кодуєчі послідовності насправді. Фахівцям в даній галузі відомі численні способи трансфекції, наприклад, преципітація CaPO_4 і електропорація. Про успішну трансфекції звичайно судять на основі того, що в клітині-хазяїні спостерігається яка-небудь ознака роботи такого вектора. Способи трансфекції добре відомі в даній галузі, і деякі способи додатково описані в цьому документі.

20 Трансформація означає введення ДНК в організм так, щоб ДНК могла реплікуватися, або у вигляді позакромосомного елемента, або як інтегрований в хромосому елемент. Залежно від використовуваної клітини-хазяїна трансформацію здійснюють, використовуючи стандартні способи, придатні для таких клітин. Способи трансформації добре відомі в даній галузі, і деякі способи додатково описані в цьому документі.

25 Прокаріотичні клітини-хазяїни, використовувані для одержання NRR Notch1, можуть бути культивовані, як загалом описано в Sambrook et al., див. вище.

Клітини-хазяїни ссавців, використовувані для одержання NRR Notch1, можуть бути культивовані в різноманітних середовищах, які добре відомі в даній галузі, і деякі з яких описані в цьому документі.

30 Клітини-хазяїни, згадувані в даному описі, охоплюють клітини в культурі in vitro, також клітини, які знаходяться в організмі тварини-хазяїна.

Очищення NRR Notch1 може бути здійснене з використанням відомих в даній галузі способів, деякі з яких описані в цьому документі.

35 Очищений NRR Notch1 може бути зв'язаний з придатним матриксом, таким як агарозні кульки, акриламідні кульки, скляні кульки, целюлоза, різні акрилові співполімери, гідроксіалкілметакрилатні гелі, поліакрилові і поліметакрилові співполімери, нейлон, нейтральні і іонні носії і тому подібне, для використання при розділенні за допомогою афінної хроматографії клонів на основі фагового дисплея. Зв'язування білка NRR Notch1 з матриксом можна здійснити способами, описаними, наприклад, в Methods in Enzymology, 44 (1976). Звичайно використовуваний спосіб зв'язування білкових лігандів з полісахаридними матриксами, наприклад, агарозою, декстраном або целюлозою, полягає в активації носія галогенідами ціаногену і подальшому зв'язуванні первинних аліфатичних або ароматичних амінів пептидного ліганду з активованим матриксом.

45 Альтернативно, NRR Notch1 може бути використаний для покривання ямок адсорбуючих планшетів, експресований на клітинах-хазяїнах, прикріплених до адсорбуючих планшетів, або використаний для сортування клітин, або кон'югований з біотином для уловлювання кульками, покритими стрептавідином, або використаний в будь-якому іншому відомому в даній галузі способі пенінгу бібліотек на основі фагового дисплея.

50 Зразки фагової бібліотеки піддають контакту з іммобілізованим NRR Notch1 в умовах, придатних для зв'язування щонайменше частини фагових частинок з адсорбентом. Звичайно умови, включаючи рН, іонну силу, температуру і тому подібне, вибирають так, щоб імітувати фізіологічні умови. Фаги, зв'язані з твердою фазою, промивають і потім елюють кислотою, наприклад, як описано в Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 88: 7978-7982 (1991), або лугом, наприклад, як описано в Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991), або за допомогою конкуренції з антигеном NRR Notch1, наприклад, в способі, подібному способу на основі конкуренції з антигеном, описаному в Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991). Фаги можуть бути збагачені в 20-1000 разів за один раунд селекції. Крім того, збагачені фаги можуть бути вирощені в бактеріальній культурі і піддані наступним раундам селекції.

Ефективність селекції залежить від багатьох факторів, включаючи кінетику дисоціації під час промивання, і від того, чи можуть множинні фрагменти антитіла на одному фазі одночасно контактувати з антигеном. Антитіла зі швидкою кінетикою дисоціації (і слабкими афінностями зв'язування) можуть утримуватися при використанні короточасних промивань, полівалентного фагового дисплея і високої густини покривання антигеном твердої фази. Висока густина не тільки стабілізує фаг за допомогою полівалентних взаємодій, але і сприяє повторному зв'язуванню фага, який дисоціював. Селекція антитіл з повільною кінетикою дисоціації (і хорошими афінностями зв'язування) може бути здійснена за допомогою використання тривалих промивань і моновалентного фагового дисплея, як описано в Bass et al., *Proteins*, 8: 309-314 (1990) і в WO 92/09690, і низької густини покривання антигеном, як описано в Marks et al., *Biotechnol.*, 10: 779-783 (1992).

Можна провести селекцію фагових антитіл з різними афінностями відносно NRR Notch1, навіть з афінностями, які відрізняються незначно. Однак можливі випадкові мутації відібраного антитіла (наприклад, виникаючі при деяких способах дозрівання афінності, описаних вище), які приводять до одержання множини мутантів, більшість з яких зв'язується з антигеном, і небагато які зв'язується з більш високою афінністю. У випадку обмеження NRR Notch1 рідкий високоафінний фаг може бути втрачений внаслідок конкуренції. Щоб зберегти всі мутанти з більш високою афінністю, фаги можуть бути інкубовані з надлишком біотинільованого NRR Notch1, але з біотинільованим NRR Notch1 в більш низькій молярній концентрації, ніж молярна константа афінності відносно мішені для NRR Notch1. Потім фаги, що зв'язуються з високою афінністю, можна уловлювати за допомогою парамагнітних кульок, покритих стрептавідином. Таке «рівноважне уловлювання» дозволяє відбирати антитіла згідно з їх афінностями зв'язування з такою чутливістю, яка дозволяє виділяти мутантні клони зі всього лише в два рази більш високою афінністю з великого надлишку фагів з більш низькою афінністю. Умовами, використовуваними для промивання фагів, зв'язаних з твердою фазою, також можна маніпулювати, щоб диференціювати їх на основі кінетики дисоціації.

Анти-NRR Notch1-клони можуть бути піддані селекції відносно активності. У одному варіанті у винаході пропонуються анти-NRR Notch1-антитіла, які блокують зв'язування між рецептором Notch1 і його лігандом (таким як Jagged1, Jagged2, Delta-подібний 1, Delta-подібний 3 і Delta-подібний 4) або протеолітичне розщеплення Notch1, індуковане після зв'язування ліганду. Fv-клони, відповідні таким анти-NRR Notch1-антитілам, можуть бути піддані селекції за допомогою (1) виділення анти-NRR Notch1-клонів з фагової бібліотеки, як описано вище, і необов'язково ампліфікації виділеної популяції фагових клонів за допомогою вирощування популяції у придатному бактеріальному хазяїні; (2) селекції NRR Notch1 і другого білка, проти яких потрібна блокувальна і не блокувальна активність, відповідно; (3) адсорбції фагових клонів проти NRR Notch1 на іммобілізованому NRR Notch1; (4) використання надлишку другого білка, щоб елюювати небажані клони, які упізнають зв'язуючі NRR Notch1 детермінанти, які перекриваються або які є загальними з детермінантами зв'язування другого білка; і (5) елювання клонів, які залишаються адсорбованими після стадії (4). Необов'язково клони з необхідними блокувальними/не блокувальними властивостями можуть бути додатково збагачені в результаті повторення способів селекції, описаних в цьому документі, один або декілька разів.

ДНК, що кодує одержані з гібридом моноклональні антитіла, або Fv-клони з фагового дисплея згідно з винаходом легко виділяють і секвенують, використовуючи звичайні способи (наприклад, використовуючи олігонуклеотидні праймери, сконструйовані для того, щоб специфічно ампліфікувати кодуючі області, що представляють інтерес, важкого і легкого ланцюга з ДНК-матриці гібридами або фага). Після виділення ДНК може бути поміщена в експресуючі вектори, які потім трансфекують в клітини-хазяїни, такі як клітини *E. coli*, клітини мавп COS, клітини яєчника китайського хом'ячка (CHO) або клітини мієломи, які в іншому випадку не продукують білок імуноглобуліну, щоб одержати синтез моноклональних антитіл в рекомбінантних клітинах-хазяїнах. Оглядові статті про рекомбінантну експресію в бактеріях ДНК, що кодує антитіла, включають Skerra et al., *Curr. Opinion in Immunol.*, 5: 256 (1993) і Pluckthun, *Immunol. Revs.*, 130: 151 (1992).

ДНК, що кодує Fv-клони згідно з винаходом, можна комбінувати з відомими послідовностями ДНК, що кодують константні області важкого ланцюга і/або легкого ланцюга (наприклад, придатні послідовності ДНК можна знайти в Kabat et al., див. вище), щоб утворити клони, які кодують повнорозмірні або важкі і/або легкі ланцюги або їх частини. Буде зрозуміло, що для такої мети можна використовувати константні області будь-якого ізотипу, включаючи константні області IgG, IgM, IgA, IgD і IgE, і що можуть бути одержані такі константні області людини або тварини, відмінної від людини. Fv-клон, одержаний з ДНК варіабельного домену одного виду

тварини (такої як людина) і потім злитий з ДНК константної області іншого виду тварини з утворенням кодуючої послідовності(ей) для «гібридного» повнорозмірного важкого ланцюга і/або легкого ланцюга, включений у визначення «химерне» і «гібридне» антитіло у використуваному в даному описі значенні. У переважному варіанті Fv-клон, одержаний з ДНК

варіабельної області людини, зливають з ДНК константної області людини з утворенням кодуючої послідовності(ей) для повністю людських повнорозмірних або часткових важких і/або легких ланцюгів.

ДНК, що кодує анти-NRR Notch1-антитіло, одержану з гібридами згідно з винаходом, також може бути модифікована, наприклад, заміною кодуючої послідовності константних доменів важкого і легкого ланцюга людини замість гомологічних мишачих послідовностей, одержаних з гібридного клону (наприклад, як в способі, описаному в Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)). ДНК, що кодує одержане з гібридного клону або з Fv-клону антитіло або фрагмент, може бути додатково модифікована ковалентним зв'язуванням кодуючої послідовності імуноглобуліну з повнорозмірною або частковою кодуючою послідовністю неімуноглобулінового поліпептиду. Таким чином одержують «химерні» або «гібридні» антитіла, які мають специфічність зв'язування антитіл згідно з винаходом, одержаних з Fv-клону або з гібридного клону.

Фрагменти антитіл

Фрагменти антитіл також включені в об'єм винаходу. У деяких випадках переважне використання фрагментів антитіл, а не цілих антитіл. Менший розмір фрагментів забезпечує швидкий кліренс і може приводити до поліпшеного доступу до солідних пухлин.

Розроблені різні способи одержання фрагментів антитіл. Традиційно такі фрагменти одержували в результаті протеолітичного розщеплення інтактних антитіл (дивись, наприклад, Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24: 107-117 (1992) і Brennan et al., Science, 229: 81 (1985)). Однак в цей час такі фрагменти можуть безпосередньо продукуватися рекомбінантними клітинами-хазяїнами. Fab-, Fv- і scFv-фрагменти антитіл можуть бути експресовані і секретовані з *E. coli*, таким чином забезпечуючи просте одержання великих кількостей таких фрагментів. Фрагменти антитіл можуть бути виділені з фагових бібліотек антитіл, обговорюваних вище. Альтернативно, Fab'-SH-фрагменти можуть бути безпосередньо витягнуті з клітин *E. coli* і хімічно зв'язані з утворенням F(ab')₂-фрагментів (Carter et al., Bio/Technology 10: 163-167 (1992)). Згідно з іншим способом F(ab')₂-фрагменти можуть бути виділені безпосередньо з культури рекомбінантних клітин-хазяїнів. Fab- і F(ab')₂-фрагменти із збільшеним часом напівжиття *in vivo*, що містять залишки епітопа, який зв'язує рецептор порятунку, описані в патенті США № 5869046. Інші способи одержання фрагментів антитіл будуть відомі фахівцям в даній галузі. У інших варіантах переважне антитіло являє собою одноланцюжковий Fv-фрагмент (scFv) (дивись, наприклад, WO 93/16185, патенти США №№ 5571894 і 5587458). Fv і scFv є єдиними видами з інтактними зв'язуючими ділянками, які позбавлені константних областей; таким чином, вони є придатними з точки зору зниженого неспецифічного зв'язування у випадку застосування *in vivo*. Можуть бути сконструйовані злиті білки scFv, щоб одержати злиття ефекторного білка або з аміно-, або з карбоксильним кінцем scFv. Дивись Antibody Engineering, ed. Borrebaeck, вище. Фрагмент антитіла також може являти собою «лінійне антитіло», наприклад таке, як описане в патенті США 5641870. Такі лінійні фрагменти антитіл можуть бути моноспецифічними або біспецифічними.

Гуманізовані антитіла

В об'єм даного винаходу включені гуманізовані антитіла. У даній галузі відомі різні способи гуманізації антитіл тварин, відмінних від людини. Наприклад, гуманізоване антитіло може мати один або декілька амінокислотних залишків, введених в нього з джерела, яке відмінне від людини. Вказані амінокислотні залишки тварини, відмінної від людини, часто називають «імпортованими» залишками, які звичайно беруть з «імпортованого» варіабельного домену. Гуманізацію можна по суті виконати, додержуючись способу Вінтера і співавторів (Jones et al., Nature, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332: 323-327 (1988); Verhoeven et al., Science, 239: 1534-1536 (1988)), заміною послідовностями гіперваріабельних областей відповідних послідовностей антитіла людини. Відповідно такі «гуманізовані» антитіла є химерними антитілами (патент США № 4816567), в яких значно менша частина, ніж інтактний варіабельний домен людини, була замінена відповідною послідовністю виду, відмінного від людини. На практиці гуманізовані антитіла звичайно являють собою антитіла людини, в яких деякі залишки гіперваріабельних областей і можливо деякі залишки FR замінені залишками з аналогічних ділянок антитіл гризунів.

Вибір варіабельних доменів людини, як легкого, так і важкого ланцюга, використуваних для одержання гуманізованих антитіл, дуже важливий для зниження антигенності. Згідно з так

званим способом «оптимальної підгонки» послідовність варіабельного домену антитіла гризуна піддають скринінгу в порівнянні з повною бібліотекою відомих послідовностей варіабельних доменів людини. Послідовність людини, яка найбільш близька до послідовності гризуна, потім беруть як каркас людини для гуманізованого антитіла (Sims et al., *J. Immunol.*, 151: 2296 (1993); Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 196: 901 (1987)). У іншому способі використовують конкретний каркас, одержаний з консенсусної послідовності повністю людських антитіл конкретної підгрупи легких або важких ланцюгів. Один і той же каркас можна використовувати для декількох різних гуманізованих антитіл (Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4285 (1992); Presta et al., *J. Immunol.*, 151: 2623 (1993)).

Крім того, важливо, щоб антитіла були гуманізовані із збереженням високої афінності відносно антигену і інших сприятливих біологічних властивостей. Для досягнення вказаної мети згідно із звичайним способом гуманізовані антитіла одержують, проводячи аналіз вихідних послідовностей і різних концептуальних гуманізованих продуктів з використанням тривимірних моделей вихідних і гуманізованих послідовностей. Тривимірні моделі імуноглобулінів загальнодоступні і відомі фахівцям в даній галузі. Доступні комп'ютерні програми, які ілюструють і показують можливі тривимірні конформаційні структури вибраних для дослідження послідовностей імуноглобуліну. Дослідження таких зображень дозволяє проаналізувати імовірну роль залишків в функціонуванні вибраної для дослідження послідовності імуноглобуліну, тобто аналізувати залишки, які впливають на здатність вибраного для дослідження імуноглобуліну зв'язувати відповідний йому антиген. Таким чином, можуть бути вибрані і об'єднані залишки FR з реципієнтних і імпортованих послідовностей так, щоб досягнути необхідних характеристик антитіла, таких як підвищена афінність відносно антигену(ів)-мішені. Загалом, залишки гіперваріабельних областей безпосередньо і в найбільшій мірі впливають на зв'язування антигену.

Антитіла людини

Анти-NRR Notch1-антитіла людини згідно з винаходом можуть бути сконструйовані в результаті об'єднання послідовності(ей) варіабельного домену Fv-клонів, вибраної з бібліотек в фаговому дисплеї, одержаних для антитіл людини, з відовими послідовностями константного домену людини, як описано вище. Альтернативно, людські моноклональні анти-NRR Notch1-антитіла згідно з винаходом можуть бути одержані способом на основі гібридом. Лінії клітин миєломи людини і гетеромієломи миші-людини для одержання моноклональних антитіл людини описані, наприклад, в Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); і Boerner et al., *J. Immunol.*, 147: 86 (1991).

На даний час можна одержувати трансгенних тварин (наприклад мишей), які здатні після імунізації продукувати повний репертуар антитіл людини за відсутності продукції ендегенних імуноглобулінів. Наприклад, описано, що гомозиготна делеція гена з'єднувальної області важкого ланцюга (JH) антитіла у химерних і мутантних по зародковій лінії мишей приводить до повного інгібування продукції ендегенних антитіл. Перенесення ряду генів імуноглобуліну зародкової лінії людини в таких мутантних по зародковій лінії мишей буде приводити до продукції антитіл людини при антигенній стимуляції. Дивись, наприклад, Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature*, 362: 255-258 (1993); Bruggermann et al., *Year in Immunol.*, 7: 33 (1993).

Перетасовування генів також можна використовувати для одержання людських антитіл з антитіл тварини, відмінної від людини, наприклад, гризунів, при цьому антитіло людини має афінності і специфічності, схожі з вихідним антитілом тварини, відмінної від людини. Згідно з вказаним способом, який також називають «епітопним імпринтингом», варіабельну область або важкого, або легкого ланцюга фрагмента антитіла тварини, відмінної від людини, одержаного способом на основі фагового дисплея, який описаний вище, замінюють репертуаром генів V-домену людини, створюючи популяцію химер scFv або Fab на основі ланцюга тварини, відмінної від людини/ланцюга людини. Результатом селекції з використанням антигену є виділення химерних scFv або Fab на основі ланцюга тварини, відмінної від людини/ланцюга людини, при цьому ланцюг людини відновлює антигензв'язувальну ділянку, порушену при видаленні відповідного ланцюга тварини, відмінної від людини, в первинному клоні фагового дисплея, тобто епітоп регулює (накладає відбиток) на вибір партнера у вигляді ланцюга людини. Коли процес повторюють, щоб замінити ланцюг, що залишився, тварини, відмінної від людини, одержують людське антитіло (дивись PCT WO 93/06213, опубліковану 1 квітня 1993 р.). На відміну від традиційної гуманізації антитіл тварин, відмінних від людини, в результаті прищеплення CDR, такий спосіб дозволяє одержувати повністю людські антитіла, які не мають залишків FR або CDR тварини, відмінної від людини.

Біспецифічні антитіла

Біспецифічні антитіла є моноклональними, переважно людськими або гуманізованими антитілами, які мають специфічності зв'язування щонайменше двох різних антигенів. У цьому випадку одна зі специфічностей зв'язування являє собою специфічність відносно NRR Notch1, а інша - специфічність відносно іншого антигену. Наведені як приклад біспецифічні антитіла можуть зв'язувати два різних епітопи NRR Notch1. Біспецифічні антитіла також можна застосовувати для того, щоб локалізувати цитотоксичні засоби в клітинах, які експресують NRR Notch1. Такі антитіла мають плече, яке зв'язує NRR Notch1, і плече, яке зв'язує цитотоксичний засіб (наприклад, сапонін, анти-інтерферон- α , алкалоїд барвінку, ланцюг А рицину, метотрексат або мічений радіоактивним ізотопом гаптен). Біспецифічні антитіла можуть бути одержані у вигляді повнорозмірних антитіл або у вигляді фрагментів антитіл (наприклад, біспецифічні антитіла у вигляді $F(ab')_2$).

Способи одержання біспецифічних антитіл відомі в даній галузі. Традиційно рекомбінантне одержання біспецифічних антитіл основане на коекспресії двох пар важкий ланцюг-легкий ланцюг імунoglobуліну, при цьому два важких ланцюги мають різні специфічності (Millstein et al., Nature, 305: 537-539 (1983)). Внаслідок випадкового вибору важких і легких ланцюгів імунoglobуліну такі гібридами (квадроми) продукують можливу суміш 10 різних молекул антитіл, з яких тільки одна має правильну біспецифічну структуру. Очищення правильної молекули, яке звичайно здійснюють, використовуючи стадії афінної хроматографії, є досить громіздким, а виходи продукту низькими. Схожі способи описані в WO 93/08829, опублікованій 13 травня 1993 року, і в Traunecker et al., EMBO J., 10: 3655-3659 (1991).

Згідно з іншим і більш переважним способом варіабельні домени антитіл з необхідними специфічностями зв'язування (ділянки зв'язування антитіло-антиген) зливають з послідовностями константних доменів імунoglobуліну. Злиття переважно здійснюють з константним доменом важкого ланцюга імунoglobуліну, що містить щонайменше частину шарнірної області, областей CH2 і CH3. Переважно мати першу константну область важкого ланцюга (CH1), яка містить сайт, необхідний для зв'язування легкого ланцюга, присутній щонайменше в одному із злиттів. ДНК, що кодують злиття важкого ланцюга імунoglobуліну і у випадку необхідності легкого ланцюга імунoglobуліну, вбудовують в окремі експресуючі вектори і котрансфекують у придатний організм хазяїна. Це дає більшу гнучкість при коректуванні взаємних співвідношень трьох поліпептидних фрагментів в таких варіантах, коли нерівні співвідношення трьох поліпептидних ланцюгів, використовуваних в конструкції, дають оптимальні виходи. Однак можна вбудовувати кодуючі послідовності для двох або всіх трьох поліпептидних ланцюгів в один експресуючий вектор в тому випадку, коли експресія щонайменше двох поліпептидних ланцюгів в рівних співвідношеннях дає високі виходи або коли співвідношення не мають особливого значення.

У переважному варіанті вказаного способу біспецифічні антитіла складаються з гібридного важкого ланцюга імунoglobуліну з першою специфічністю зв'язування в одному плечі і гібридної пари важкого ланцюга-легкого ланцюга імунoglobуліну (що забезпечує другу специфічність зв'язування) в іншому плечі. Виявлено, що така асиметрична структура полегшує відділення необхідної біспецифічної сполуки від небажаних комбінацій ланцюгів імунoglobуліну, оскільки наявність легкого ланцюга імунoglobуліну тільки в одній половині біспецифічних молекул забезпечує простий спосіб розділення. Такий спосіб описаний в WO 94/04690. Більш докладний опис створення біспецифічних антитіл дивись, наприклад, в Suresh et al., Methods in Enzymology, 121: 210 (1986).

Згідно з іншим способом область контакту між парою молекул антитіл може бути сконструйована так, щоб максимізувати процент гетеродимерів, які витягують з культури рекомбінантних клітин. Переважна область контакту містить щонайменше частину домену CH3 константного домену антитіла. У вказаному способі один або декілька невеликих бічних ланцюгів амінокислот з області контакту першої молекули антитіла замінюють більш великими бічними ланцюгами (наприклад, тирозин або триптофан). Створюють компенсуючі «западини», що мають розмір, ідентичний або схожий з розміром великого бічного ланцюга (ланцюгів), на області контакту другої молекули антитіла, замінюючи великі бічні ланцюги амінокислот меншими бічними ланцюгами (наприклад, аланін або треонін). Це забезпечує механізм збільшення виходу гетеродимеру в порівнянні з іншими небажаними кінцевими продуктами, такими як гомодимери.

Біспецифічні антитіла включають поперечнозшиті антитіла або «гетерокон'югати» антитіл. Наприклад, одне з антитіл в гетерокон'югаті може бути зв'язане з авідином, а інше - з біотином. Такі антитіла, наприклад, були запропоновані для того, щоб направити клітини імунної системи до небажаних клітин-мішеней (патент США № 4676980), і для лікування ВІЛ-інфекції (WO

91/00360, WO 92/200373 і EP 03089). Гетерокон'югати антитіл можуть бути одержані з використанням будь-яких способів утворення поперечних зшивок. Придатні поперечнозшивальні агенти добре відомі в даній галузі і описані в патенті США № 4676980 разом з рядом способів утворення поперечних зшивок.

Способи створення біспецифічних антитіл з фрагментів антитіл також описані в літературі. Наприклад, біспецифічні антитіла можуть бути одержані з використанням хімічного зв'язування. У Brennan et al., Science, 229: 81 (1985) описаний спосіб, при якому інтактні антитіла протеолітично розщеплюють, щоб створити $F(ab')_2$ -фрагменти. Одержані фрагменти відновлюють в присутності агента, який утворює комплекси дитіолу, арсеніту натрію, щоб стабілізувати сусідні дитіоли і запобігти утворенню міжмолекулярного дисульфідіду. Потім створені Fab' -фрагменти перетворюють в похідні тіонітробензоату (TNB). Один з Fab' -TNB-похідних потім знов перетворюють в Fab' -тіол відновленням з використанням меркаптоетиламіну і змішують з еквімолярною кількістю іншого Fab' -TNB-похідного з утворенням біспецифічного антитіла. Одержані біспецифічні антитіла можна використовувати як агенти для вибіркої іммобілізації ферментів.

Нещодавні досягнення полегшили пряме витягання Fab' -SH-фрагментів з *E. coli*, які можуть бути хімічно зв'язані з утворенням біспецифічних антитіл. У Shalaby et al., J. Exp. Med., 175: 217-225 (1992) описане одержання повністю гуманізованої молекули біспецифічного антитіла на основі $F(ab')_2$. Кожний Fab' -фрагмент окремо секретувався з клітин *E. coli*, і його піддавали хімічному зв'язуванню *in vitro* з утворенням біспецифічного антитіла. Утворене таким чином біспецифічне антитіло здатне зв'язуватися з клітинами, надекспресуючими рецептор HER2, і нормальними Т-клітинами людини, а також запускати літичну активність цитотоксичних лімфоцитів людини проти пухлинних мішеней молочної залози людини.

Також описані різні способи одержання і виділення фрагментів біспецифічних антитіл безпосередньо з культури рекомбінантних клітин. Наприклад, були одержані біспецифічні антитіла з використанням лейцинових блискавок. Kostelny et al., J. Immunol., 148(5): 1547-1553 (1992). Пептиди лейцинової блискавки з білків Fos і Jun зв'язували з Fab' -частинами двох різних антитіл за допомогою злиття генів. Гомодимери антитіл відновлювали в шарнірній області, щоб утворити мономер, і потім знов окисляли з утворенням гетеродимерів антитіл. Такий спосіб також можна використовувати для одержання гомодимерів антитіл. Спосіб «димерних антитіл», описаний Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993), дав альтернативний механізм одержання фрагментів біспецифічних антитіл. Фрагменти містять варіабельний домен важкого ланцюга (VH), зв'язаний з варіабельним доменом легкого ланцюга (VL) лінкером, який дуже короткий, щоб забезпечити можливість спарювання між двома доменами на одному і тому ж ланцюзі. Відповідно домени VH і VL одного фрагмента змушені спарюватися з комплементарними доменами VL і VH іншого фрагмента, утворюючи при цьому дві антигензв'язувальні ділянки. Також повідомлялося про іншу методику одержання фрагментів біспецифічних антитіл з використанням димерів одноланцюжкового Fv (sFv). Дивись Gruber et al., J. Immunol., 152: 5368 (1994).

Передбачаються антитіла з більше ніж двома валентностями. Наприклад, можуть бути одержані триспецифічні антитіла. Tutt et al. J. Immunol. 147: 60 (1991).

Полівалентні антитіла

Полівалентне антитіло може бути швидше інтерналізоване (і/або піддане катаболізму) клітиною, експресуючою антиген, з яким зв'язуються антитіла, ніж бівалентне антитіло. Антитіла згідно з даним винаходом можуть являти собою полівалентні антитіла (які не належать до класу IgM) з трьома або більше антигензв'язувальними ділянками (тобто тетравалентні антитіла), які можуть бути легко одержані за допомогою рекомбінантної експресії нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептидні ланцюги антитіла. Полівалентне антитіло може містити домен димеризації і три або більше антигензв'язувальних ділянок. Переважний домен димеризації містить або складається з Fc-області або шарнірної області. За такому планом антитіло буде містити Fc-область і три або більше антигензв'язувальних ділянок, амінокінцевих відносно Fc-області. Переважне полівалентне антитіло згідно з винаходом містить (або складається з) від трьох до приблизно восьми, але переважно чотири антигензв'язувальні ділянки. Полівалентне антитіло містить щонайменше один поліпептидний ланцюг (і переважно два поліпептидних ланцюги), при цьому поліпептидний ланцюг (ланцюги) містить два або більше варіабельних доменів. Наприклад, поліпептидний ланцюг (ланцюги) може містити $VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc$, де VD1 означає перший варіабельний домен, VD2 означає другий варіабельний домен, Fc означає один поліпептидний ланцюг Fc-області, X1 і X2 означають амінокислоту або поліпептид, і n дорівнює 0 або 1. Наприклад, поліпептидний ланцюг (ланцюги) може містити: ланцюг VH-CH1-гнучкий лінкер-VH-CH1-Fc-область або ланцюг VH-CH1-VH-CH1-Fc-область.

Полівалентне антитіло згідно з винаходом переважно додатково містить щонайменше два (і переважно чотири) поліпептиди варіабельного домену легкого ланцюга. Полівалентне антитіло згідно з винаходом може, наприклад, містити приблизно від двох до приблизно восьми поліпептидів варіабельного домену легкого ланцюга. Поліпептиди варіабельного домену легкого ланцюга, передбачені в даному винаході, містять варіабельний домен легкого ланцюга і не обов'язково додатково містять домен CL.

Варіанти антитіл

У деяких варіантах передбачається модифікація(ії) амінокислотної послідовності антитіл, описаної в цьому документі. Наприклад, може бути бажаним поліпшення афінності зв'язування і/або інших біологічних властивостей антитіла. Варіанти амінокислотної послідовності антитіла одержують введенням відповідних змін нуклеотидів в нуклеїнову кислоту антитіла або в результаті синтезу пептидів. Такі модифікації включають, наприклад, делеції і/або інсерції, і/або заміни залишків в амінокислотних послідовностях антитіла. Здійснюють будь-яке поєднання делеції, інсерції і заміни, щоб досягнути кінцевої конструкції, при умові, що кінцева конструкція має необхідні характеристики. Амінокислотні зміни можуть бути введені в амінокислотну послідовність антитіла, що розглядається, під час одержання такої послідовності.

Застосовний спосіб ідентифікації певних залишків або областей антитіла, які є переважними місцями для мутагенезу, називають «мутагенезом на основі сканування аланіном», який описаний в Cunningham and Wells (1989) Science, 244: 1081-1085. В цьому випадку залишок або групу залишків-мішеней ідентифікують (наприклад, заряджені залишки, такі як arg, asp, his, lys і glu) і замінюють нейтральними або негативно зарядженими амінокислотами (найбільш переважно аланіном або поліаланіном), щоб вплинути на взаємодію амінокислот з антигеном. Ті положення амінокислот, які виявляють функціональну чутливість до заміни, потім поліпшують введенням додаткових або інших варіантів в сайти заміни. Таким чином, хоч сайт для введення варіанта амінокислотної послідовності визначають попередньо, природа мутації як такої не потребує попереднього визначення. Наприклад, щоб проаналізувати ефективність мутації в даній ділянці, проводять сканування аланіном або випадковий мутагенез в кодоні або області-мішені і здійснюють скринінг експресованих імуноглобулінів відносно необхідної активності.

Інсерції в амінокислотній послідовності включають злиття на аміно- і/або карбоксильному кінці, діапазон довжини яких складає від одного залишку до поліпептидів, що містять сто або більше залишків, а також інсерції всередині послідовності одного або декількох амінокислотних залишків. Приклади кінцевих інсерцій включають антитіло з N-кінцевим залишком метіонілу або антитіло, злите з цитотоксичним поліпептидом. Інші інсерційні варіанти молекули антитіла включають злиття N- або C-кінця антитіла з ферментом (наприклад, ADEPT) або поліпептидом, який збільшує час напівжиття антитіла в сироватці.

Глікозилювання поліпептидів звичайно є або N-зв'язаним, або O-зв'язаним. N-зв'язане глікозилювання стосується зв'язування вуглеводного залишку з бічним ланцюгом залишку аспарагіну. Трипептидні послідовності аспарагін-X-серін і аспарагін-X-треонін, де X означає будь-яку амінокислоту за винятком проліну, являють собою упізнавані послідовності для ферментативного зв'язування вуглеводного залишку з бічним ланцюгом аспарагіну. Таким чином, присутність будь-якої з вказаних трипептидних послідовностей в поліпептиді створює потенційний сайт глікозилювання. O-зв'язане глікозилювання стосується зв'язування одного з цукрів N-ацетилгалактозаміну, галактози або ксилози з гідроксіамінокислотою, частіше за все серином або треоніном, хоч також можуть бути використані 5-гідроксипролін або 5-гідроксилізін.

Додавання сайтів глікозилювання до антитіла звичайно супроводжується зміною амінокислотної послідовності так, що вона містить одну або декілька описаних вище трипептидних послідовностей (у випадку сайтів N-зв'язаного глікозилювання). Зміну також можна здійснити заміною або додаванням одного або декількох залишків серину або треоніну до послідовності вихідного антитіла (у випадку сайтів O-зв'язаного глікозилювання).

У тому випадку, коли антитіло містить Fc-область, зв'язаний з нею вуглевод може бути змінений. Наприклад, антитіла зі зрілою вуглеводною структурою, в якій відсутня фукоза, зв'язана з Fc-областю антитіла, описані в заявці на видачу патенту США № US 2003/0157108 (Presta, L.). Також дивись US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Антитіла з розгалуженим N-ацетилглюкозаміном (GlcNAc) у вуглеводі, зв'язаному з Fc-областю антитіла, описані в WO 2003/011878, Jean-Mairet et al. і в патенті США № 6602684, Umana et al. Антитіла щонайменше з одним залишком галактози в олігосахариді, зв'язаному з Fc-областю антитіла, розкриті в WO 1997/30087, Patel et al. Також дивись WO 1998/58964 (Raju, S.) і WO 1999/22764 (Raju, S.), які стосуються антитіл із зміненим вуглеводом, зв'язаним з їх Fc-областю. Дивись

також US 2005/0123546 (Umana et al.), де описані антигензв'язувальні молекули з модифікованим глікозилюванням.

5 Переважний згідно з даним винаходом варіант глікозилювання містить Fc-область, при цьому у вуглеводній структурі, зв'язаній з Fc-областю, відсутня фукоза. Такі варіанти мають поліпшену ADCC-функцію. Необов'язково Fc-область додатково містить одну або декілька
10 амінокислотних замін, які додатково посилюють ADCC, наприклад, заміни в положеннях 298, 333 і/або 334 Fc-області (нумерація залишків Eu). Приклади публікацій, пов'язаних з «дефукозилюванням» або антитілами з «недостатністю фукози», включають: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO 2005/053742; Okazaki et al. J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004). Приклади клітинних ліній, продукуючих дефукозилювані антитіла, включають клітини CHO Lec13, дефіцитні по фукозилюванню білків (Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249: 533-545 (1986); заявка на
15 видачу патенту США № US 2003/0157108 A1, Presta, L; і WO 2004/056312 A1, Adams et al., особливо в прикладі 11), і нокаутовані лінії клітин, такі як клітини CHO, нокаутовані по гену альфа-1,6-фукозилтрансферази, FUT8, (Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)).

Іншим типом варіанта є варіант з амінокислотою заміною. Такі варіанти мають щонайменше один амінокислотний залишок в молекулі антитіла, замінений іншим залишком.
20 Ділянки, які представляють найбільший інтерес для основанийого на замінах мутагенезу, включають гіперваріабельні області, але також передбачаються зміни FR. Консервативні заміни показані в таблиці 1 під заголовком «переважні заміни». Якщо такі заміни приводять до зміни біологічної активності, то можуть бути введені більш суттєві зміни, показані в таблиці 1 під заголовком «приклади замін» або додатково описані нижче при описі класів амінокислот, і
25 продукти піддають скринінгу.

Таблиця 1

Вихідний залишок	Приклади замін	Переважні заміни
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Норлейцин	Leu
Leu (L)	Норлейцин; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Норлейцин	Leu

Суттєві модифікації біологічних властивостей антитіла здійснюють за допомогою відбору замін, які значною мірою відрізняються за своїм впливом на збереження (а) структури поліпептидного кістяка в області заміни, наприклад, у вигляді складчастої або спіральної конформації, (б) заряду або гідрофобності молекули в сайті-мішені, або (с) об'єму бічного ланцюга. Залишки, що зустрічаються в природі, поділяють на групи на основі схожості властивостей їх бічних ланцюгів:

- (1) гідрофобні: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) нейтральні гідрофільні: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) кислі: Asp, Glu;
- (4) основні: His, Lys, Arg;
- (5) залишки, які впливають на орієнтацію ланцюга: Gly, Pro; і
- (6) ароматичні: Trp, Tyr, Phe.

Неконсервативні заміни викликають обмін представника одного з вказаних класів представником іншого класу.

Один тип варіанта із замінами включає в себе заміну одного або декількох залишків гіперваріабельної області вихідного антитіла (наприклад, гуманізованого антитіла або антитіла людини). Загалом, одержаний в результаті варіант(и), відібраний для подальшої розробки, буде мати поліпшені біологічні властивості в порівнянні з вихідним антитілом, з якого він був

утворений. Придатний спосіб створення таких варіантів із замінами полягає в дозріванні афінності з використанням фагового дисплея. Коротко, декілька ділянок гіперваріабельної області (наприклад, 6-7 ділянок) піддають мутаціям, щоб створити всі можливі амінокислотні заміни в кожній ділянці. Створені таким чином антитіла представляють на частинках нитчастого фага у вигляді злиття з продуктом гена III M13, упакованого в кожній частинці. Потім проводять скринінг варіантів в фаговому дисплеї відносно їх біологічної активності (наприклад, афінності зв'язування), як описано в даному документі. Щоб ідентифікувати ділянки гіперваріабельної області - можливі кандидати для модифікації, можна здійснити мутагенез на основі сканування аланіном, щоб виявити залишки гіперваріабельної області, які додають суттєвий внесок в зв'язування антигену. Альтернативно або додатково, може бути корисним аналіз кристалічної структури комплексу антиген-антитіло, щоб ідентифікувати точки контакту між антитілом і антигеном. Такі контактуючі залишки і сусідні залишки є кандидатами для заміни способами, пропонуваними в даному винаході. Після створення таких варіантів панель варіантів піддають скринінгу, який описаний в даній публікації, і антитіла з кращими властивостями в одному або декількох відповідних аналізах можуть бути відібрані для подальшої розробки.

Молекули нуклеїнових кислот, що кодують варіанти амінокислотних послідовностей антитіла, одержують різними способами, відомими в даній галузі. Такі способи включають без обмеження виділення з природного джерела (у випадку природних варіантів амінокислотної послідовності) або одержання опосередкованим олігонуклеотидами (або сайт-специфічним) мутагенезом, мутагенезом на основі ПЛР і касетним мутагенезом раніше одержаного варіанта або неваріантної версії антитіла.

Може бути бажаним введення однієї або декількох амінокислотних модифікацій в Fc-область поліпептидів імуноглобуліну згідно з винаходом, таким чином створюючи варіант Fc-області. Варіант Fc-області може містити послідовність Fc-області людини (наприклад, Fc-області IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4 людини), яка містить амінокислотну модифікацію (наприклад, заміну) в одному або декількох положеннях амінокислот, включаючи положення шарнірного цистеїну. Відповідно до опису і керівництва, які є в даній галузі, передбачається, що в деяких варіантах антитіла, застосовуване в способах згідно з винаходом, може містити одну або декілька змін в порівнянні з еквівалентним антитілом дикого типу, наприклад, в Fc-області. Такі антитіла, проте, можуть зберігати по суті такі ж характеристики, які потрібні для терапевтичного застосування, в порівнянні з їх еквівалентом дикого типу. Наприклад, вважається, що в Fc-області можуть бути здійснені деякі зміни, які можуть привести до зміненого (тобто або підвищеного, або зниженого) зв'язування C1q і/або залежної від комплементу цитотоксичності (CDC), наприклад, як описано в WO 99/51642. Дивись також Duncan and Winter, Nature 322: 738-40 (1988); патент США № 5648260, патент США № 5624821 і WO 94/29351, які стосуються інших прикладів варіантів Fc-області. У WO 00/42072 (Presta) і WO 2004/056312 (Lowman) описані варіанти антитіл з підвищеним або зниженим зв'язуванням з FcR. Зміст вказаних патентних публікацій спеціально включений в даний опис у вигляді посилання. Також дивись Shields et al. J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001). Антитіла із збільшеним часом напівжиття і поліпшеним зв'язуванням з неонатальним Fc-рецептором (FcRn), який відповідає за перенесення материнських IgG в плід (Guyer et al., J. Immunol. 117: 587 (1976) і Kim et al., J. Immunol. 24: 249 (1994)), описані в US 2005/0014934A1 (Hinton et al.). Такі антитіла містять Fc-область з однією або декількома замінами, які поліпшують зв'язування Fc-області з FcRn. Поліпептидні варіанти із зміненими амінокислотними послідовностями Fc-області і підвищеною або зниженою здатністю зв'язувати C1q описані в патенті США № 6194551B1, WO 99/51642. Зміст вказаних патентних публікацій спеціально включений в даний опис у вигляді посилання. Також дивись Idusogie et al., J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000).

Похідні антитіл

Антитіла згідно з даним винаходом можуть бути додатково модифіковані так, щоб вони містили додаткові небілкові компоненти, які відомі в даній галузі і легко доступні. У деяких варіантах компонентами, придатними для дериватизації антитіла, є водорозчинні полімери. Необмежувальні приклади водорозчинних полімерів включають без обмеження поліетиленгліколь (ПЕГ), співполімери етиленгліколю/пропіленгліколю, карбоксиметилцелюлозу, декстран, полівініловий спирт, полівінілпіролідон, полі-1,3-діоксолан, полі-1,3,6-триоксан, співполімер етилен/малеїновий ангідрид, поліамінокислоти (або гомополімери, або випадкові співполімери) і декстран або полі(н-вінілпіролідон)поліетиленгліколь, гомополімери пропіленгліколю, співполімери поліпропіленоксид/етиленоксид, поліоксєтиленовані поліюли (наприклад, гліцерин), полівініловий спирт і їх суміші. Пропіоновий альдегід поліетиленгліколю може мати переваги при виробництві внаслідок його стабільності у воді. Полімер може мати будь-яку молекулярну масу і може бути

розгалуженим або нерозгалуженим. Кількість полімерів, зв'язаних з антитілом, може варіювати, і якщо зв'язують більше одного полімеру, то вони можуть бути однаковими або різними молекулами. Загалом, кількість і/або тип полімерів, використовуваних для дериватизації, можна визначити на основі розгляду ряду факторів, включаючи без обмеження конкретні властивості або функції поліпшуваного антитіла, чи буде похідне антитіла використане в терапії при певних станах і т. д.

Скринінг антитіл з необхідними властивостями

Антитіла згідно з даним винаходом можуть бути охарактеризовані відносно їх фізичних/хімічних властивостей і біологічних функцій в різних аналізах, відомих в даній галузі. У деяких варіантах антитіла характеризують відносно однієї або декількох властивостей: зниження або блокування активації Notch1, зниження або блокування передачі сигналів молекул, розташованих в каскаді нижче Notch1, порушення або блокування зв'язування Notch1 з лігандом (наприклад, Jagged1, Jagged2, Delta-подібний 1, Delta-подібний 3 або Delta-подібний 4) і/або лікування і/або профілактики пухлини, клітинного проліферативного порушення або злоякісної пухлини; і/або лікування або профілактики порушення, асоційованого з експресією і/або активністю Notch1 (наприклад, з підвищеною експресією і/або активністю Notch1). У інших варіантах антитіла характеризують відносно будь-якої однієї або декількох з наступних властивостей: індукції або посилення активації Notch1, індукції або посилення передачі сигналів молекул, розташованих нижче Notch1 в каскаді, і/або лікування або профілактики порушення, асоційованого з експресією і/або активністю Notch1.

Очищені антитіла можуть бути додатково охарактеризовані за допомогою серії аналізів, включаючи без обмеження N-кінцеве секвенування, амінокислотний аналіз, високоефективну рідинну ексклюзійну хроматографію по розміру в неденатуруючих умовах (ВЕРХ), мас-спектрометрію, іонообмінну хроматографію і розщеплення папаїном.

У деяких варіантах здійснення винаходу антитіла, одержані згідно з винаходом, аналізують відносно їх біологічної активності. У деяких варіантах антитіла згідно з даним винаходом тестують відносно їх антигензв'язувальної активності. Аналізи зв'язування антигенів, які відомі в даній галузі і можуть бути використані в даному винаході, включають без обмеження будь-які аналізи прямого або конкурентного зв'язування з використанням таких способів, як Вестерн-блоти, радіоімунаналізи, ELISA (твердофазний імуноферментний аналіз), імуноаналізи типу «сендвіч», аналізи імунопреципітації, флуоресцентні імуноаналізи і імуноаналізи з використанням білка А. Ілюстративний аналіз зв'язування антигену описаний нижче в розділі «Приклади».

У ще одному варіанті у винаході пропонуються моноклональні анти-NRR Notch1-антитіла, які конкурують з антитілом А, антитілом А-1, антитілом А-2 і/або антитілом А-3 за зв'язування з NRR Notch1. До таких конкуруючих антитіл належать антитіла, які упізнають епітоп NRR Notch1, який являє собою той же самий епітоп або епітоп, що перекривається з епітопом NRR Notch1, упізнаваним антитілом А, антитілом А-1, антитілом А-2 і/або антитілом А-3. Такі конкуруючі антитіла можуть бути одержані в результаті скринінгу надосадів анти-NRR Notch1-гібридом відносно зв'язування з іммобілізованим NRR Notch1 в умовах конкуренції з міченим антитілом А, антитілом А-1, антитілом А-2 і/або антитілом А-3. Надосад гібридами, що містить конкуруюче антитіло, буде зменшувати кількість зв'язаного міченого антитіла, яке виявляється в суміші для даного аналізу конкурентного зв'язування в порівнянні з кількістю зв'язаного міченого антитіла, яке виявляється в контрольній суміші для зв'язування, що містить нерелевантне антитіло (або не містить антитіла). Будь-який з аналізів конкурентного зв'язування, описаний в цьому документі, є придатним для застосування в описаному вище способі.

У іншому аспекті у винаході пропонується моноклональне анти-NRR Notch1-антитіло, яке містить одну або декілька (наприклад, 2, 3, 4, 5 і/або 6) HVR антитіла А, антитіла А-1, антитіла А-2 або антитіла А-3. Моноклональне анти-NRR Notch1-антитіло, яке містить одну або декілька HVR антитіла А, антитіла А-1, антитіла А-2 і/або антитіла А-3, може бути сконструйоване в результаті щеплення однієї або декількох HVR антитіла А, антитіла А-1, антитіла А-2 і/або антитіла А-3 в послідовність матричного антитіла, наприклад, в послідовність антитіла людини, яка є найбільш близькою до відповідної мишачої послідовності вихідного антитіла, або в консенсусну послідовність повністю людських антитіл в конкретній підгрупі легкого або важкого ланцюга вихідного антитіла, і потім експресії одержаної в результаті химерної послідовності(ей) варіабельної області легкого і/або важкого ланцюга разом або за відсутності супроводжуючої послідовності(ей) константної області в рекомбінантних клітинах-хазяїнах, які описані в цьому документі.

Анти-NRR Notch1-антитіла згідно з винаходом, які мають унікальні властивості, описані в цьому документі, можуть бути одержані в результаті скринінгу клонів анти-NRR Notch1-гібридом

відносно необхідних властивостей будь-яким зручним способом. Наприклад, якщо потрібне моноклональне анти-NRR Notch1-антитіло, яке блокує або яке не блокує зв'язування ліганду Notch1 з Notch1, то вибране як кандидат антитіло може бути тестоване в аналізі конкурентного зв'язування, такому як аналіз конкурентного зв'язування ELISA, при цьому ямки планшета покривають Notch1, а розчин антитіла в присутності надлишку Notch1 нашаровують на покриті планшети, і зв'язане антитіло виявляють ферментативно, наприклад, забезпечуючи контакт зв'язаного антитіла з анти-Ig-антитілом, кон'югованим з HRP, або з біотинільованим анти-Ig-антитілом і проводячи кольорову реакцію з HRP, наприклад, обробляючи планшети стрептавідином-HRP і/або перексидом водню і реєструючи кольорову реакцію з HRP за допомогою спектрофотометрії при 490 нм, використовуючи зчитувальний пристрій для планшетів для ELISA.

Якщо потрібне анти-NRR Notch1-антитіло, яке інгібує ріст клітин, то вибране як кандидат антитіло може бути тестоване в аналізах *in vitro* і/або *in vivo*, в яких вимірюють інгібування клітинного росту. Такі аналізи відомі в даній галузі і додатково описані і проілюстровані в даному описі.

У одному варіанті даний винахід стосується зміненого антитіла, яке має деякі, але не всі ефекторні функції, які роблять його необхідним кандидатом для багатьох застосувань, при яких важливим є час напівжиття антитіла *in vivo*, однак деякі ефекторні функції (такі як комплемент і ADCC) є не обов'язковими або шкідливими. У деяких варіантах вимірюють Fc-активність одержаного імуноглобуліну, щоб пересвідчитися, що зберігаються тільки необхідні властивості. Можуть бути проведені аналізи цитотоксичності *in vitro* і/або *in vivo*, щоб підтвердити зменшення/ослаблення активностей CDC і/або ADCC. Наприклад, можуть бути проведені аналізи зв'язування Fc-рецептора (FcR), щоб пересвідчитися, що відсутнє зв'язування антитіла з FcγR (отже, ймовірно, відсутня активність ADCC), але зберігається здатність зв'язування FcRn. Основні клітини для опосередковування ADCC, NK-клітини, експресують тільки FcγRIII, тоді як моноцити експресують FcγRI, FcγRII і FcγRIII. Експресія FcR на гематопоетичних клітинах підсумована в таблиці 3 на сторінці 464 в публікації Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9: 457-92 (1991). Приклад аналізу *in vitro* для оцінки активності ADCC молекули, що представляє інтерес, описаний в патентах США №№ 5500362 або 5821337. Застосовні ефекторні клітини для таких аналізів включають мононуклеарні клітини периферичної крові (PBMC) і природні клітини-кілери (NK). Альтернативно або додатково, ADCC-активність молекули, що представляє інтерес, можна оцінити *in vivo*, наприклад, в тваринній моделі, такій як модель, описана в Clynes et al. *PNAS (USA)* 95: 652-656 (1998). Також можуть бути здійснені аналізи зв'язування C1q для підтвердження того, що антитіло нездатне зв'язувати C1q і тому не має CDC-активності. Щоб оцінити активацію комплементу, можна здійснити аналіз CDC, наприклад, як описано в Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202: 163 (1996). Зв'язування FcRn і визначення кліренсу/часу напівжиття *in vivo* також можна здійснити, використовуючи способи, відомі в даній галузі, наприклад, способи, описані в розділі «Приклади».

Вектори, клітини-хазяїни і способи рекомбінації

Для рекомбінантної продукції антитіл згідно з винаходом нуклеїнову кислоту, що кодує антитіло, виділяють і вбудовують в реплікований вектор для подальшого клонування (ампліфікації ДНК) або для експресії. ДНК, що кодує антитіло, легко виділяють і секвенують, використовуючи звичайні способи (наприклад, використовуючи олігонуклеотидні зонди, які здатні специфічно зв'язуватися з генами, які кодують важкі і легкі ланцюги антитіла). Доступна множина векторів. Вибір вектора частково залежить від використовуваної клітини-хазяїна. Звичайно переважними клітинами-хазяїнами є клітини або прокаріотичного, або еукаріотичного походження (звичайно клітини ссавців). Буде зрозуміло, що для вказаної мети можна використовувати константні області будь-якого ізотипу, включаючи константні області IgG, IgM, IgA, IgD і IgE, і що такі константні області можуть бути одержані від людини або будь-якого виду тварини.

а. Створення антитіл з використанням прокаріотичних клітин-хазяїнів:

і. Конструювання векторів

Полінуклеотидні послідовності, що кодують поліпептидні компоненти антитіла згідно з винаходом, можуть бути одержані з використанням стандартних способів рекомбінації. Необхідні полінуклеотидні послідовності можуть бути виділені і секвеновані з продукуючих антитіла клітин, таких як клітини гібридами. Альтернативно, полінуклеотиди можуть бути синтезовані з використанням синтезатора нуклеотидів або способів ПЛР. Після одержання послідовності, кодуючі поліпептиди вбудовують в рекомбінантний вектор, здатний реплікуватися і експресувати гетерологічні полінуклеотиди в прокаріотичних хазяїнах.

Множину векторів, які доступні і відомі в даній галузі, можна використовувати з метою даного винаходу. Відбір придатного вектора головним чином буде залежати від розміру нуклеїнових кислот, вбудовуваних у вектор, і конкретної клітини-хазяїна, яку необхідно трансформувати вектором. Кожний вектор містить різні компоненти, залежно від його функції (ампліфікація або експресія гетерологічного полінуклеотиду або і те, і інше) і його сумісності з конкретною клітиною-хазяїном, в якій він знаходиться. Компоненти вектора звичайно включають без обмеження: початок реплікації, маркерний ген для селекції, промотор, ділянку зв'язування з рибосомою (RBS), сигнальну послідовність, вставку гетерологічної нуклеїнової кислоти і послідовність термінації транскрипції.

Загалом, плазмідні вектори, що містять реплікон і регуляторні послідовності, які одержують з виду, сумісного з клітиною-хазяїном, використовують з такими хазяїнами. Вектор звичайно несе сайт реплікації, а також маркерні послідовності, які здатні забезпечувати фенотипічну селекцію в трансформованих клітинах. Наприклад, *E. coli* звичайно трансформують, використовуючи pBR322, плазмиду, одержану з виду *E. coli*. pBR322 містить гени, що кодують резистентність до ампіциліну (Amp) і тетрацикліну (Tet) і тому забезпечує прості способи ідентифікації трансформованих клітин. pBR322, її похідні або інші плазмідні мікроорганізмів або бактеріофаги також можуть містити або можуть бути модифіковані так, щоб вони містили промотори, які можуть бути використані мікроорганізмом для експресії ендегенних білків. Приклади похідних pBR322, використовуваних для експресії конкретних антитіл, детально описані в Carter et al., патент США № 5648237.

Крім того, фагові вектори, що містять реплікон і регуляторні послідовності, які сумісні з мікроорганізмом-хазяїном, можуть бути використані як трансформуючі вектори для таких хазяїнів. Наприклад, бактеріофаг, такий як λ GEM.TM.-11, можна використовувати для одержання рекомбінантного вектора, який можна застосовувати для трансформації чутливих клітин-хазяїнів, таких як *E. coli* LE392.

Експресуючий вектор згідно з винаходом може містити дві або більше пари промотор-цистрон, кожна з яких кодує поліпептидні компоненти. Промотор являє собою нетрансльовану регуляторну послідовність, розташовану вище (5') від цистрона, яка модулює його експресію. Прокаріотичні промотори звичайно поділяють на два класи, індуковані і конститутивні. Індукованим промотором є промотор, який ініціює підвищені рівні транскрипції цистрона, який знаходиться під його контролем, у відповідь на зміни умов культивування, наприклад, присутність або відсутність поживної речовини або зміна температури.

Добре відома велика кількість промоторів, упізнаваних різними можливими клітинами-хазяїнами. Вибраний промотор може бути функціонально зв'язаний з ДНК цистрона, що кодує легкий або важкий ланцюг, за допомогою витягання промотору з вихідної ДНК за допомогою розщеплення ферментами рестрикції і вбудовування виділеної промоторної послідовності у вектор згідно з винаходом. І нативну промоторну послідовність, і багато які гетерологічні промотори можна використовувати для керування ампліфікацією і/або експресією генів-мішеней. У деяких варіантах використовують гетерологічні промотори, оскільки вони звичайно забезпечують більш високу транскрипцію і більш високі рівні експресованого гена-мішені в порівнянні з нативним промотором поліпептиду-мішені.

Промотори, придатні для застосування у випадку прокаріотичних хазяїнів, включають промотор *PhoA*, промоторні системи β -галактамази і лактози, промоторну систему триптофану (*trp*) і гібридні промотори, такі як промотор *tac* або *trc*. Однак придатними також є і інші промотори, які є функціональними в бактеріях (такі як інші відомі бактеріальні або фагові промотори). Їх нуклеотидні послідовності опубліковані, тому фахівці можуть лігувати їх оперативно з цистронами, що кодують легкі і важкі ланцюги мішені (Siebenlist et al. (1980) Cell 20: 269), використовуючи лінкер або адаптори, щоб одержати будь-які необхідні сайти рестрикції.

У одному аспекті винаходу кожний цистрон в рекомбінантному векторі містить компонент у вигляді послідовності сигналу секреції, який керує переміщенням експресованих поліпептидів через мембрану. Загалом, сигнальна послідовність може бути компонентом вектора або вона може бути частиною ДНК поліпептиду-мішені, яку вбудовують у вектор. Сигнальна послідовність, вибрана для мети даного винаходу, повинна являти собою послідовність, яка упізнається і процесується (тобто відщеплюється сигнальною пептидазою) в клітині-хазяїні. Для прокаріотичних клітин-хазяїнів, які не упізнають і не процесують сигнальні послідовності, нативні відносно гетерологічних поліпептидів, сигнальну послідовність замінюють вибраною прокаріотичною сигнальною послідовністю, наприклад, з групи, яка складається з лідерів лужної фосфатази, пеніцилінази, *Irr* або термостабільного ентеротоксину II (STII), *LamB*, *PhoE*, *PeiB*, *OmpA* і *MBP*. У одному варіанті здійснення винаходу сигнальними послідовностями,

використовуваними в обох цистронах системи експресії, є сигнальні послідовності STII або їх варіанти.

У іншому аспекті продукування імуноглобулінів згідно з винаходом може відбуватися в цитоплазмі клітини-хазяїна і тому не потрібна присутність сигнальних послідовностей секреції в кожному цистроні. У цьому відношенні легкі і важкі ланцюги імуноглобулінів експресуються, піддаються фолдингу і збиранню з утворенням функціональних імуноглобулінів в цитоплазмі. Деякі штами-хазяїни (наприклад, штами *E. coli* trxB⁻) забезпечують умови в цитоплазмі, які сприятливі для утворення дисульфідного зв'язку, таким чином забезпечуючи правильний фолдинг і збирання експресованих субодиниць білка. Proba and Pluckthun Gene, 159: 203 (1995).

Прокаріотичні клітини-хазяїни, придатні для експресії антитіл згідно з винаходом, включають Archaeobacteria і Eubacteria, такі як грамнегативні або грампозитивні організми. Приклади застосовних бактерій включають *Escherichia* (наприклад *E. coli*), *Bacilli* (наприклад, *B. subtilis*), *Enterobacteria*, види *Pseudomonas* (наприклад, *P. aeruginosa*), *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescans*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Shigella*, *Rhizobia*, *Vitreoscilla* або *Paracoccus*. У одному варіанті використовують грамнегативні клітини. У одному варіанті для винаходу використовують клітини *E. coli* як хазяїни. Приклади штамів *E. coli* включають штам W3110 (Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, D. C: American Society for Microbiology, 1987), pp. 1190-1219; ATCC депозит № 27325) і його похідні, включаючи штам 33D3, що має генотип W3110 Δ*hlyA* (Δ*tonA*)*ptr3 lac Ig lacL8 ΔompTΔ(nmpc-fepE) degP41 kanR* (патент США № 5639635). Також придатними є інші штами і їх похідні, такі як *E. coli* 294 (ATCC 31446), *E. coli* B, *E. coli* 1776 (ATCC 31537) і *E. coli* RV308 (ATCC 31608). Наведені приклади є ілюстративними, а не обмежувальними. Способи конструювання похідних будь-якої з вказаних вище бактерій, що мають певні генотипи, відомі в даній галузі і описані, наприклад, в Bass et al., Proteins, 8: 309-314 (1990). Звичайно необхідно відбирати придатні бактерії, беручи до уваги здатність реплікони до реплікації в клітинах бактерії. Наприклад, *E. coli*, *Serratia* або види *Salmonella* можуть бути придатними для використання як хазяїна, коли використовують добре відомі плазмиди, такі як pBR322, pBR325, pACYC177 або pKN410, для забезпечення реплікони. Звичайно клітина-хазяїн повинна секретувати мінімальні кількості протеолітичних ферментів, і бажано можуть бути введені додаткові інгібітори протеаз в культуру клітин.

ii. Продукція антитіл

Клітини-хазяїни трансформують описаними вище експресуючими векторами і культивують у придатному поживному середовищі, модифікованому відповідним чином для індукції промоторів, селекції трансформантів або ампліфікації генів, що кодують необхідні послідовності.

Трансформація означає введення ДНК в прокаріотичного хазяїна так, щоб ДНК була реплікованою або у вигляді позахромосомного елемента, або у вигляді інтегрованого в хромосому елемента. Залежно від використовуваної клітини-хазяїна трансформацію здійснюють, використовуючи стандартні способи, придатні для таких клітин. Обробку кальцієм з використанням хлориду кальцію звичайно застосовують у випадку бактеріальних клітин, які мають міцні бар'єри у вигляді клітинних стінок. У іншому способі трансформації використовують поліетиленгліколь/ДМСО. У ще одному способі використовують електропорацію.

Прокаріотичні клітини, використовувані для одержання поліпептидів згідно з винаходом, вирощують в середовищах, відомих в даній галузі і придатних для культивування вибраних клітин-хазяїнів. Приклади придатних середовищ включають бульйон Лурія (LB) плюс необхідні добавки поживних речовин. У деяких варіантах середовище також містить агент для селекції, вибраний на основі конструкції експресуючого вектора, який вибірно дозволяє рости прокаріотичним клітинам, що містять експресуючий вектор. Наприклад, в середовище додають ампіцилін для росту клітин, експресуючих ген резистентності до ампіциліну.

Будь-які інші необхідні добавки крім джерел вуглецю, азоту і неорганічного фосфату також можуть бути включені у придатних концентраціях за допомогою введення окремо або у вигляді суміші з іншою добавкою або середовищем, таким як комплексне джерело азоту. Необов'язково культуральне середовище може містити один або декілька відновників, вибраних з групи, яка складається з глутатіону, цистеїну, цистаміну, тіогліколату, дитіоеритритолу і дитіотреїтолу.

Прокаріотичні клітини-хазяїни культивують при придатних температурах. Для росту *E. coli*, наприклад, переважна температура знаходиться в діапазоні приблизно від 20°C до приблизно 39°C, більш переважно приблизно від 25°C до приблизно 37°C, ще більш переважно приблизно 30°C. Значення pH середовища може бути будь-яким в діапазоні pH приблизно від 5 до приблизно 9, головним чином залежно від організму-хазяїна. Для *E. coli* pH може складати приблизно від 6,8 до приблизно 7,4, і може складати приблизно 7,0.

Якщо в експресуючому векторі згідно з винаходом використовують індукований промотор, то експресію білка індукують в умовах, придатних для активації промотору. У одному аспекті згідно з винаходом використовують промотори *RhoA* для регулювання транскрипції поліпептидів. Відповідно трансформовані клітини-хазяїни культивують в обмеженому по фосфату середовищі для індукції. Переважно обмеженням по фосфату середовищем є середовище *C.R.A.P* (дивись, наприклад, Simmons et al., *J. Immunol. Methods* (2002), 263: 133-147). Можна використовувати множину інших індукторів відповідно до використовуваної векторної конструкції, як відомо в даній галузі.

У одному варіанті експресовані поліпептиди згідно з даним винаходом секретуються і витягуються з периплазми клітин-хазяїнів. Витягання білка звичайно полягає в руйнуванні мікроорганізму, звичайно такими способами, як осмотичний шок, обробка ультразвуком або лізис. Після руйнування клітин клітинні уламки або цілі клітини можуть бути видалені центрифугуванням або фільтруванням. Білки можуть бути додатково очищені, наприклад, афінною хроматографією на смолі. Альтернативно, білки можуть бути транспортовані в культуральне середовище і виділені з нього. Клітини можуть бути видалені з культури, і надосад культури може бути профільтований і сконцентрований для додаткового очищення одержаних білків. Експресовані поліпептиди можуть бути потім виділені і ідентифіковані з використанням широко відомих способів, таких як електрофорез в поліакриламідному гелі (ПААГ) і Вестерн-блот аналіз.

У одному аспекті винаходу продукування антитіл здійснюють у великих кількостях способом ферментації. Доступні різні великомасштабні способи ферментації з підживленням для одержання рекомбінантних білків. Великомасштабні ферментери мають місткість щонайменше 1000 літрів, переважно мають місткість приблизно від 1000 до 100000 літрів. У таких ферментерах використовують лопатеві мішалки для розподілу кисню і поживних речовин, особливо глюкози (переважне джерело вуглецю/енергії). Ферментація в малому масштабі звичайно стосується ферментації в ферментері, місткість якого складає не більше ніж приблизно 100 літрів і може складати приблизно від 1 літра до приблизно 100 літрів.

У способі ферментації індукцію експресії білка звичайно ініціюють після того, як клітини були вирощені у придатних умовах до необхідної густини, наприклад, до OD550, що становить приблизно 180-220, на такій стадії клітини знаходяться в ранній стаціонарній фазі. Можна використовувати множину індукторів відповідно до використовуваної векторної конструкції, які відомі в даній галузі і описані вище. Клітини можна вирощувати протягом більш коротких періодів до індукції. Клітини звичайно індукують приблизно протягом 12-50 годин, хоч можна використовувати більш тривалі або більш короткі періоди часу інкубації.

Щоб підвищити вихід продукції і якість поліпептидів згідно з винаходом, можна модифікувати різні умови ферментації. Наприклад, щоб поліпшити правильне збирання і фолдинг секретованих поліпептидів антитіл, можна використовувати додаткові вектори, надекспресуючі білки-шаперони, такі як білки *Dsb* (*DsbA*, *DsbB*, *DsbC*, *DsbD* і/або *DsbG*) або *FkpA* (пептидилпроліл-цис, транс-ізомераза з активністю шаперона), для котрансфекції прокаріотичних клітин-хазяїнів. Показано, що білки-шаперони полегшують правильний фолдинг і розчинність гетерологічних білків, продукованих в бактеріальних клітинах-хазяїнах. Chen et al. (1999) *J. Bio. Chem.* 274: 19601-19605; Georgiou et al., патент США № 6083715; Georgiou et al., патент США № 6027888; Bothmann and Pluckthun (2000) *J. Biol Chem.* 275: 17100-17105; Ramm and Pluckthun (2000) *J. Biol. Chem.* 275: 17106-17113; Arie et al. (2001) *Mol. Microbiol.* 39: 199-210.

Щоб мінімізувати протеоліз експресованих гетерологічних білків (особливо білків, які є протеолітично чутливими), для даного винаходу можна використовувати деякі штами-хазяїни, дефіцитні по протеолітичних ферментах. Наприклад, штами клітин-хазяїнів можуть бути модифіковані, щоб здійснити генетичну мутацію(її) в генах, які кодують відомі бактеріальні протеази, такі як протеаза III, *OmpT*, *DegP*, *Tsp*, протеаза I, протеаза Mi, протеаза V, протеаза VI і їх поєднання. Деякі дефіцитні по протеазах штами *E. coli* доступні і описані, наприклад, в Joly et al. (1998), вище; Georgiou et al., патент США № 5264365; Georgiou et al., патент США № 5508192; Hara et al., *Microbial Drug Resistance*, 2: 63-72 (1996).

У одному варіанті штами *E. coli*, дефіцитні по протеолітичних ферментах і трансформовані плазмідами, надекспресуючими один або декілька білків-шаперонів, використовують як клітини-хазяїни в системі експресії згідно з винаходом.

iii. Очищення антитіл

Можна використовувати стандартні способи очищення білків, відомі в даній галузі. Прикладами придатних способів очищення є наступні способи: фракціонування на імуноафінних або іонообмінних колонках, преципітація етанолом, оберненофазова ВЕРХ, хроматографія на діоксиді кремнію або на катіонообмінній смолі, такий як DEAE,

хроматофокусування, SDS-ПААГ, преципітація сульфатом амонію і гель-фільтрація з використанням, наприклад, сефадексу G-75.

У одному аспекті білок А, іммобілізований на твердій фазі, використовують для імуноафінного очищення продуктів у вигляді повнорозмірних антитіл згідно з винаходом. Білок А являє собою білок клітинної стінки з молекулярною масою 41 кД Staphylococcus aureus, який зв'язується з високою афінністю з областю Fc антитіл. Lindmark et al. (1983) J. Immunol. Meth. 62: 1-13. Твердою фазою, на якій іммобілізують білок А, переважно є колонка, що має скляну поверхню або поверхню з діоксиду кремнію, більш переважно скляна колонка з контрольованим розміром пор або колонка з кремнієвою кислотою. У деяких застосуваннях колонка покрита реагентом, таким як гліцерин, щоб спробувати попередити неспецифічну адгезію забруднюючих речовин.

Як перша стадія очищення препарат, одержаний з культури клітин, як описано вище, наносять на тверду фазу з іммобілізованим білком А, забезпечуючи специфічне зв'язування антитіла, що представляє інтерес, з білком А. Потім тверду фазу промивають, щоб видалити домішки, неспецифічно зв'язані з твердою фазою. Нарешті антитіло, що представляє інтерес, витягують з твердої фази елюванням.

b. Створення антитіл з використанням еукаріотичних клітин-хазяїнів:

До компонентів векторів звичайно належать без обмеження один або декілька з наступних компонентів: сигнальна послідовність, початок реплікації, один або декілька маркерних генів, енхансерний елемент, промотор і послідовність термінації транскрипції.

i. Компонент - сигнальна послідовність

Вектор для застосування в еукаріотичній клітині-хазяїні також може містити сигнальну послідовність або інший поліпептид, який має специфічний сайт розщеплення на N-кінці зрілого білка, що представляє інтерес, або поліпептиду. Переважно вибрана гетерологічна сигнальна послідовність являє собою послідовність, яка упізнається і процесується (тобто відщеплюється сигнальною пептидазою) клітиною-хазяїном. Для експресії в клітинах ссавців наявні сигнальні послідовності ссавців, а також вірусні лідери секреції, наприклад, сигнал простого герпесу gD.

ДНК для такої області попередника лігують в рамці зчитування з ДНК, яка кодує антитіло.

ii. Початок реплікації

Загалом, компонент, представлений початком реплікації, не є необхідним для експресуючих векторів ссавців. Наприклад, початок SV40 звичайно можна використовувати тільки тому, що воно містить ранній промотор.

iii. Компонент - ген для селекції

Експресуючі і клонуючі вектори можуть містити ген для селекції, також називаний селектованим маркером. Звичайно селектовані гени кодують білки, які (а) надають резистентність до антибіотиків або інших токсинів, наприклад, до ампіциліну, неоміцину, метотрексату або тетрацикліну, (b) комплементують ауксотрофні дефіцити у відповідному випадку, або (c) забезпечують необхідними поживними речовинами, недоступними зі складних середовищ.

У одному прикладі схеми селекції використовують лікарський засіб для затримки росту клітини-хазяїна. Ті клітини, які успішно трансформовані гетерологічним геном, продукують білок, який надає резистентності до лікарського засобу, і таким чином виживають в режимі селекції. У прикладах такої домінантної селекції використовують лікарські засоби неоміцин, мікофенолову кислоту і гігromіцин.

Іншим прикладом придатних селектованих маркерів для клітин ссавців є маркери, які забезпечують можливість ідентифікації клітин, компетентних відносно поглинання нуклеїнової кислоти антитіла, такі як гени DHFR, тимідинкінази, металотіонеїну-I і II, переважно гени металотіонеїнів приматів, аденозиндезамінази, орнітиндекарбоксилази і т. д.

Наприклад, клітини, трансформовані селектованим геном DHFR, спочатку ідентифікують культивуванням всіх трансформантів в культуральному середовищі, яке містить метотрексат (Mtx), конкурентний антагоніст DHFR. Придатною клітиною-хазяїном при використанні DHFR дикого типу є лінія клітин яєчника китайського хом'ячка (CHO), дефіцитних по активності DHFR (наприклад, ATCC CRL-9096).

Альтернативно, клітини-хазяїни (особливо хазяїни дикого типу, які містять ендогенну DHFR), трансформовані або котрансфековані послідовностями ДНК, які кодують антитіло, білок DHFR дикого типу і інший селектований маркер, такий як аміноглікозид-3'-фосфотрансфераза (APH), можна відбирати по росту клітин в середовищі, що містить агент для селекції, відповідний селектованому маркеру, такий як аміноглікозидний антибіотик, наприклад канаміцин, неоміцин або G418. Дивись патент США № 4965199.

iv. Промоторний компонент

Експресуючі і клонуючі вектори звичайно містять промотор, який розпізнається організмом-хазяїном і функціонально зв'язаний з нуклеїновою кислотою, що кодує поліпептид антитіла. Відомі промоторні послідовності для еукаріот. Практично всі еукаріотичні гени мають АТ-багату область, розташовану приблизно на 25-30 основ вище сайту ініціації транскрипції. Іншою послідовністю, що виявляється на 70-80 основ вище старту транскрипції багатьох генів, є область CNCAAT, де N може бути будь-яким нуклеотидом. На 3'-кінці більшості еукаріотичних генів знаходиться послідовність AATAAA, яка може бути сигналом для додавання полі-А-хвоста до 3'-кінця кодуючої послідовності. Всі такі послідовності відповідним чином вбудовують в еукаріотичні експресуючі вектори.

Транскрипція поліпептидів антитіл з векторів в клітинах-хазяїнах ссавців регулюється, наприклад, промоторами, одержаними з геномів вірусів, таких як вірус поліоми, поксвірус птахів, аденовірус (такий як аденовірус 2), вірус бичачої папіломи, вірус саркоми птахів, цитомегаловірус, ретровірус, вірус гепатиту-В і вірус мавп 40 (SV40), гетерологічними промоторами ссавців, наприклад, промотором актину або промотором імуноглобуліну, промоторами теплового шоку, при умові, що такі промотори сумісні з системами клітин-хазяїнів.

Ранній і пізній промотори вірусу SV40 легко одержують у вигляді рестрикційного фрагмента SV40, який також містить початок реплікації вірусу SV40. Негайний ранній промотор цитомегаловірусу людини легко одержують у вигляді фрагмента рестрикції HindIII E. Система для експресії ДНК в хазяїнах-ссавцях з використанням вірусу бичачої папіломи як вектора описана в патенті США № 4419446. Модифікація такої системи описана в патенті США № 4601978. Альтернативно, як промотор можна використовувати довгий кінцевий повтор вірусу саркоми Рауса.

v. Компонент - енхансерний елемент

Транскрипцію ДНК, що кодує поліпептид антитіла згідно з даним винаходом, вищими еукаріотами часто підвищують вбудовуванням послідовностей енхансера у вектор. На даний час відомо багато енхансерних послідовностей генів ссавців (глобіну, еластази, альбуміну, α -фетопротейну і інсуліну). Однак, як правило, використовують енхансер з вірусу еукаріотичних клітин. Прикладами є енхансер SV40, розташований зі сторони пізніх генів відносно початку реплікації (100-270 п.н.), енхансер раннього промотору цитомегаловірусу, енхансер вірусу поліоми, розташований зі сторони пізніх генів відносно початку реплікації, і аденовірусні енхансери. Дивись також Yaniv, Nature 297: 17-18 (1982) відносно посилюючих елементів для активації еукаріотичних промоторів. Енхансер може бути сплайсований у вектор в положенні 5' або 3' відносно послідовності, яка кодує поліпептид антитіла, але переважно енхансер розташований в сайті з 5'-сторони від промотору.

vi. Компонент для термінації транскрипції

Експресуючі вектори, використовувані в еукаріотичних клітинах-хазяїнах, звичайно також будуть містити послідовності, необхідні для термінації транскрипції і для стабілізації мРНК. Такі послідовності звичайно доступні з 5'- і іноді 3'-нетрансльованих областей еукаріотичних або вірусних ДНК або кДНК. Вказані області містять нуклеотидні ділянки, транскрибовані у вигляді поліаденільованих фрагментів в нетрансльованій частині мРНК, яка кодує антитіло. Одним із застосовних компонентів для термінації транскрипції є область поліаденільовання бичачого гормону росту. Дивись WO 94/11026 і описаний в цьому документі експресуючий вектор.

vii. Селекція і трансформація клітин-хазяїнів

Придатні клітини-хазяїни для клонування або експресії ДНК у векторах згідно з винаходом включають клітини вищих еукаріот, описані в цьому документі, включаючи клітини-хазяїни хребетних. Розмноження клітин хребетних в культурі (культурі тканини) стало рутинною процедурою. Прикладами застосовних ліній клітин-хазяїнів ссавців є лінія клітин нирки мавпи CV1, трансформованих SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); лінія клітин ембріональної нирки людини (клітини 293 або 293, субклоновані для росту в суспензійній культурі, Graham et al., J. Gen. Virol. 36: 59 (1977); клітини нирки сирійського хом'ячка (BHK, ATCC CCL 10); клітини яєчника китайського хом'ячка/DHFR (CHO, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 (1980)); клітини Сертолі мишей (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23: 243-251 (1980)); клітини нирки мавпи (CV1 ATCC CCL 70); клітини нирки африканської зеленої мавпи (VERO-76, ATCC CRL-1587); клітини карциноми шийки матки людини (HELA, ATCC CCL 2); клітини нирки собаки (MDCK, ATCC CCL 34); клітини печінки щурів Buffalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); клітини легені людини (W138, ATCC CCL 75); клітини печінки людини (Hep G2, HB 8065); клітини пухлини молочної залози миші (MMT 060562, ATCC CCL51); клітини TRI (Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383: 44-68 (1982)); клітини MRC 5; клітини FS4 і лінія клітин гепатоми людини (Hep G2).

Клітини-хазяїни трансформують описаними вище експресуючими або клонуючими векторами для продукції антитіл і культивують в звичайних поживних середовищах, відповідним

чином модифікованих для індукції промоторів, селекції трансформантів або ампліфікації генів, які кодує необхідні послідовності.

viii. Культивування клітин-хазяїнів

Клітина-хазяїні, використовувані для одержання антитіла згідно з винаходом, можна культивувати в багатьох середовищах. Комерційно доступні середовища, такі як середовище Хама F10 (Sigma), мінімальне поживне середовище ((MEM), (Sigma)), RPMI-1640 (Sigma) і модифіковане Дульбекко середовище Ігла ((DMEM), Sigma) придатні для культивування клітин-хазяїнів. Крім того, будь-яке з середовищ, описаних в Ham et al., Meth. Enz. 58: 44 (1979), Barnes et al., Anal. Biochem. 102: 255 (1980), патентах США №№ 4767704, 4657866, 4927762, 4560655 або 5122469, WO 90/03430, WO 87/00195 або в патенті США Re. 30985, можна використовувати як культуральне середовище для клітин-хазяїнів. Будь-яке з вказаних середовищ може бути доповнене за необхідності гормонами і/або іншими факторами росту (такими як інсулін, трансферин або епідермальний фактор росту), солями (такими як хлорид натрію, кальцій, магній і фосфат), буферами (такими як HEPES), нуклеотидами (такими як аденозин і тимідин), антибіотиками (такими як лікарський засіб GENTAMYCINTM), мікроелементами (визначуваними як неорганічні сполуки, звичайно присутні в кінцевих концентраціях в мікромолярному діапазоні) і глюкозою або еквівалентним джерелом енергії. Будь-які інші необхідні добавки також можуть бути включені у відповідних концентраціях, які можуть бути відомі фахівцям в даній галузі. Умови культивування, такі як температура, рН і тому подібне, являють собою умови, описані раніше для клітин-хазяїнів, відібраних для експресії, і умови будуть відомі фахівцям в даній галузі.

ix. Очищення антитіл

При використанні способів рекомбінації антитіло може бути одержане внутрішньоклітинно або безпосередньо секретоване в середовище. Якщо антитіло продукується внутрішньоклітинно, то як перша стадія частинки уламків або цілі клітини або лізовані фрагменти видаляють, наприклад, центрифугуванням або ультрацентрифугуванням. Коли антитіло секритується в середовище, надосади з таких систем експресії звичайно спочатку концентрують, використовуючи комерційно доступний фільтр для концентрації білків, наприклад, блок для ультрафільтрації Amicon або Millipore Pellicon. На будь-якій з подальших стадій може бути введений інгібітор протеаз, такий як PMSF, щоб інгібувати протеоліз, і можуть бути введені антибіотики, щоб попередити зростання випадкових забруднень.

Композиція антитіл, одержаних з клітин, може бути очищена з використанням, наприклад, хроматографії на гідроксилапатиті, гель-електрофорезу, діалізу і афінної хроматографії, при цьому афінна хроматографія є переважним способом очищення. Придатність білка А як афінного ліганду залежить від виду і ізотипу будь-якого Fc-домену імуноглобуліну, який присутній в антитілі. Білок А можна використовувати для очищення антитіл, які основані на важких ланцюгах $\gamma 1$, $\gamma 2$ або $\gamma 4$ людини (Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62: 1-13 (1983)). Білок G рекомендується для всіх мишачих ізотипів і для $\gamma 3$ людини (Guss et al., EMBO J. 5: 1567-1575 (1986)). Матрицею, з якою зв'язують афінний ліганд, найчастіше є агароза, але є і інші матриці. Механічно стабільні матриці, такі як скло з контрольованим розміром пор або полі(стиролдивініл)бензол, забезпечують можливість більш високих швидкостей потоку і більш коротких періодів часу обробки, ніж можна досягнути у випадку агарози. У тому випадку, коли антитіло містить домен CH3, для очищення застосовна смола Bakerbond ABXTM (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ). Також доступні інші способи очищення білка, такі як фракціонування на іонообмінній колонці, преципітація етанолом, оберненофазова ВЕРХ, хроматографія на діоксиді кремнію, хроматографія на гепарин-сефарозі, хроматографія на аніонообмінній або катіонообмінній смолі (наприклад, на колонці з поліаспарагіноювою кислотою), хроматофокусування, SDS-ПААГ і преципітація сульфатом амонію, залежно від антитіла, яке необхідно витягнути.

Після якої-небудь попередньої стадії (стадій) очищення суміш, яка містить антитіло, що представляє інтерес, і забруднюючі домішки, піддають хроматографії, основаній на гідрофобній взаємодії, при низькому значенні рН, використовуючи буфер для елюювання з рН в діапазоні приблизно 2,5-4,5, переважно здійснюваній при низьких концентраціях солі (наприклад, при концентрації солі приблизно 0-0,25 M).

Імунокон'югати

Винахід також стосується імунокон'югатів (взаємозамінно називаних «кон'югатами антитіло-лікарський засіб» або «ADC»), які містять будь-яке з анти-NRR Notch-антитіл, описаних в цьому документі, кон'югованих з цитотоксичним засобом, таким як хіміотерапевтичний засіб, лікарський засіб, інгібуючий ріст засіб, токсин (наприклад, ферментативно активний токсин, що

походить з клітин бактерій, грибів, рослин або тварин, або його фрагменти) або радіоактивний ізотоп (тобто радіокон'югат).

Застосування кон'югатів антитіло-лікарський засіб для локальної доставки цитотоксичних або цитостатичних засобів, тобто лікарських засобів для знищення або інгібування пухлинних клітин при лікуванні злоякісної пухлини (Syrigos and Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19: 605-614; Niculescu-Duvaz and Springer (1997) *Adv. Drg. Del. Rev.* 26: 151-172; патент США 4975278), забезпечує можливість цілеспрямованої доставки компонента, представленого лікарським засобом, до пухлин і внутрішньоклітинного накопичення в пухлині, коли системне введення таких некон'югованих лікарських засобів може приводити до недопустимих рівнів токсичності відносно нормальних клітин, також як відносно пухлинних клітин, які намагаються видалити (Baldwin et al., (1986) *Lancet* pp. (Mar. 15, 1986): 603-05; Thorpe, (1985) «Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review», в *Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications*, A. Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506). При цьому добиваються максимальної ефективності при мінімальній токсичності. Повідомлялося, що і поліклональні антитіла, і моноклональні антитіла застосовні в таких способах (Rowland et al., (1986) *Cancer Immunol. Immunother.*, 21: 183-87). Лікарські засоби, застосовні в таких способах, включають дауноміцин, доксорубіцин, метотрексат і віндезин (Rowland et al., (1986), вище). Токсини, використовувані в кон'югатах антитіло-токсин, включають бактеріальні токсини, такі як дифтерійний токсин, рослинні токсини, такі як рицин, низькомолекулярні токсини, такі як гелданамицин (Mandler et al. (2000) *Jour. of the Nat. Cancer Inst.* 92(19): 1573-1581; Mandler et al. (2000) *Bioorganic and Med. Chem. Letters* 10: 1025-1028; Mandler et al. (2002) *Bioconjugate Chem.* 13: 786-791), мейтанзиноїди (EP 1391213; Liu et al., (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 8618-8623), і каліхеаміцин (Lode et al (1998) *Cancer Res.* 58: 2928; Hinman et al. (1993) *Cancer Res.* 53: 3336-3342). Токсини можуть здійснювати свій цитотоксичний і цитостатичний вплив за допомогою механізмів, які включають зв'язування тубуліну, зв'язування ДНК або інгібування топоізомераз. Деякі цитотоксичні лікарські засоби схильні до інактивації або стають менш активними при кон'югуванні з великими антитілами або білковими лігандами рецепторів.

ZEVALIN® (ібритумомаб тіуксетан, Biogen/Idec) є кон'югатом антитіло-радіоізотоп, яке складається з мишачого моноклонального антитіла IgG1 каппа, направлено проти антигену CD20, що знаходиться на поверхні нормальних і злоякісних В-лімфоцитів, і радіоактивного ізотопу ^{111}In або ^{90}Y , зв'язаного за допомогою тіосечовинного лінкера-хелатора (Wiseman et al. (2000) *Eur. Jour. Nucl. Med.* 27(7): 766-77; Wiseman et al (2002) *Blood* 99(12): 4336-42; Witzig et al. (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(10): 2453-63; Witzig et al (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(15): 3262-69). Хоч зевалін має активність, направлену проти В-клітинної неходжкінської лімфоми (NHL), введення приводить до важких і тривалих цитопеній у більшості пацієнтів. MYLOTARG™ (гемтузумаб озогаміцин, Wyeth Pharmaceuticals), кон'югат антитіло-лікарський засіб, який складається з антитіла hu-CD33, зв'язаного з каліхеаміцином, схвалений в 2000 році для лікування гострого мієлоїдного лейкозу за допомогою ін'єкції (Drugs of the Future (2000) 25(7): 686; патенти США №№ 4970198, 5079233, 5585089, 5606040, 5693762, 5739116, 5767285, 5773001). Кантузумаб мертанзин (Immunogen, Inc.), кон'югат антитіло-лікарський засіб, який складається з антитіла huC242, зв'язаного за допомогою дисульфідного лінкера SPP з компонентом у вигляді мейтанзиноїдного лікарського засобу, DM1, пройшов у фазу II випробувань відносно лікування злоякісних пухлин, які експресують CanAg, таких як злоякісні пухлини ободової кишки, підшлункової залози, шлунка і інші. MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologies, Immunogen Inc.), кон'югат антитіло-лікарський засіб, який складається з моноклонального антитіла проти специфічного для простати мембранного антигену (PSMA), зв'язаного з компонентом у вигляді мейтанзиноїдного лікарського засобу, DM1, розробляється для можливого лікування пухлин простати. Ауристатинові пептиди, ауристин Е (AE) і монометилауристин (MMAE), синтетичні аналоги доластатину, кон'югували з химерними моноклональними антитілами cBR96 (специфічними до Y Льюїса на карциномах) і cAC10 (специфічними до CD30 на гематологічних злоякісних новоутвореннях) (Doronina et al. (2003) *Nature Biotechnology* 21(7): 778-784), і кон'югати використовуються для розробки терапевтичних засобів.

Хіміотерапевтичні засоби, придатні для створення таких імунокон'югатів, описані в цьому документі (наприклад, вище). Ферментативно активні токсини і їх фрагменти, які можуть бути використані, включають ланцюг А дифтерійного токсину, активні фрагменти дифтерійного токсину, що не зв'язуються, ланцюг А екзотоксину (з *Pseudomonas aeruginosa*), ланцюг А рицину, ланцюг А абрину, ланцюг А модекцину, альфа-сарцин, білки *Aleurites fordii*, білки діантини, білки *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII і PAP-S), інгібітор *Momordica charantia*, курцин, кротин, інгібітор *Saponaia officinalis*, гелонін, мітогелін, рестриктоцин, феноміцин, еноміцин і трикотецени. Дивись, наприклад, WO 93/21232, опубліковану 28 жовтня 1993 р.

Множина радіонуклідів доступна для одержання антитіл, кон'югованих з радіонуклідами. Приклади включають ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y і ^{186}Re . Кон'югати антитіла і цитотоксичного засобу одержують, використовуючи множину біфункціональних зв'язуючих білки агентів, таких як N-сукцинімідил-3-(2-піридилдитіо)пропіонат (SPDP), імінотіолан (IT), біфункціональні похідні складних імідоефірів (такі як диметиладипімідат·HCl), активні складні ефіри (такі як дисукцинімідилсуберат), альдегіди (такі як глутаровий альдегід), біс-азидосполуки (такі як біс(пара-азидобензоїл)гександіамін), похідні біс-діазонію (такі як біс(пара-діазонійбензоїл)етилендіамін), діізоціанати (такі як толуол-2,6-діізоціанат) і біс-активні сполуки фтору (такі як 1,5-дифтор-2,4-динітробензол). Наприклад, імунотоксин рицин може бути одержаний, як описано в Vitetta et al. Science 238: 1098 (1987). Мічена вуглецем-14 1-ізотіоціанатобензил-3-метилдіетилентриамінпентаоцтова кислота (MX-DTPA) є прикладом хелатуючого агента для кон'югування радіонукліда з антитілом. Дивись WO 94/11026.

Кон'югати антитіла і одного або декількох низькомолекулярних токсинів, таких як каліхеаміцин, мейтанзиноїди, доластатини, ауростатини, трихотецен і CC1065 і похідні таких токсинів, які мають активність токсинів, також розглядаються в даному винаході.

i. Мейтанзин і мейтанзиноїди

У деяких варіантах імунокон'югат містить антитіло (повнорозмірне або фрагменти) згідно з винаходом, кон'юговане з однією або декількома молекулами мейтанзиноїдів.

Мейтанзиноїди є інгібіторами мітозу, які діють, інгібуючи полімеризацію тубуліну. Мейтанзин вперше був виділений зі східно-африканського чагарника *Maytenus serrata* (патент США № 3896111). Потім було виявлено, що деякі мікроорганізми також продукують мейтанзиноїди, такі як мейтанзинол і складні C-3-мейтанзинолові ефіри (патент США № 4151042). Синтетичний мейтанзинол і його похідні і аналоги описані, наприклад, в патентах США №№ 4137230, 4248870, 4256746, 4260608, 4265814, 4294757, 4307016, 4308268, 4308269, 4309428, 4313946, 4315929, 4317821, 4322348, 4331598, 4361650, 4364866, 4424219, 4450254, 4362663 і 4371533.

Залишки у вигляді мейтанзиноїдних лікарських засобів є привабливими залишками лікарських засобів в кон'югатах антитіло-лікарський засіб, оскільки вони є: (i) відносно доступними для одержання за допомогою ферментації або хімічної модифікації, дериватизації продуктів ферментації, (ii) функціональними групами, що піддаються дериватизації, придатними для кон'югування за допомогою недисульфідних лінкерів з антитілами, (iii) стабільними в плазмі і (iv) ефективними проти різних ліній пухлинних клітин.

Імунокон'югати, що містять мейтанзиноїди, способи їх одержання і їх терапевтичне застосування описані, наприклад, в патентах США №№ 5208020, 5416064 і в європейському патенті EP 0425235 B1, описи яких спеціально включені в даний опис у вигляді посилання. У публікації Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 8618-8623 (1996) описані імунокон'югати, що містять мейтанзиноїд, називаний DM1, зв'язаний з моноклональним антитілом C242, направленим проти злоякісної пухлини прямої і ободової кишки людини. Виявлено, що кон'югат є високоцитотоксичним відносно культивованих злоякісних клітин ободової кишки і виявляє протипухлинну активність в аналізі росту пухлини *in vivo*. У Chari et al., Cancer Research 52: 127-131 (1992) описані імунокон'югати, в яких мейтанзиноїд кон'югований за допомогою дисульфідного лінкера з мишачим антитілом A7, що зв'язується з антигеном на лініях злоякісних клітин ободової кишки людини, або з іншим мишачим моноклональним антитілом TA.1, яке зв'язує онкоген HER-2/neu. Цитотоксичність кон'югата TA.1-мейтанзиноїд тестували *in vitro* на лінії злоякісних клітин молочної залози людини SK-BR-3, яка експресує 3×10^5 поверхневих антигенів HER-2 на клітину. Кон'югат з лікарським засобом досягає міри цитотоксичності, схожої з цитотоксичністю вільного мейтанзиноїдного лікарського засобу, яка може бути підвищена в результаті збільшення кількості молекул мейтанзиноїду на молекулу антитіла. Кон'югат A7-мейтанзиноїд виявляв низьку системну цитотоксичність у мишей.

Кон'югати антитіло-мейтанзиноїд одержують хімічним зв'язуванням антитіла з молекулою мейтанзиноїду без суттєвого зниження біологічної активності антитіла і молекули мейтанзиноїду. Дивись, наприклад, патент США № 5208020 (опис якого спеціально включений в даний опис у вигляді посилання). Показано, що в середньому 3-4 молекули мейтанзиноїду, кон'югованих з молекулою антитіла, ефективні для посилення цитотоксичності для клітин-мішеней без негативного впливу на функцію або розчинність антитіла, хоч можна очікувати, що навіть одна молекула токсин/антитіло посилює цитотоксичність в порівнянні із застосуванням «голого» антитіла. Мейтанзиноїди добре відомі в даній галузі і можуть бути синтезовані відомими способами або виділені з природних джерел. Придатні мейтанзиноїди описані, наприклад, в патенті США № 5208020 і в інших патентах і непатентних публікаціях, посилання на які вказані вище. Переважними мейтанзиноїдами є мейтанзинол і аналоги мейтанзинолу,

модифіковані в ароматичному циклі або в інших положеннях молекули мейтанзинолу, такі як різні складні мейтанзинолові ефіри.

Існує багато зв'язуючих груп, відомих в даній галузі, для одержання кон'югатів антитіло-мейтанзиноїд, включаючи, наприклад, групи, описані в патенті США № 5208020 або патенті EP 0425235 B1 і в Chari et al., Cancer Research 52: 127-131 (1992), і в заявці на видачу патенту США № 10/960602, поданій 8 жовтня 2004 року, опис яких спеціально включений в даний опис у вигляді посилання. Кон'югати антитіло-мейтанзиноїд, які містять лінкерний компонент SMCC, можуть бути одержані, як описано в заявці на видачу патенту США з реєстраційним номером 10/960602, поданій 8 жовтня 2004 р. Зв'язуючі групи включають дисульфідні групи, тіоефірні групи, кислотолабільні групи, фотолабільні групи, нестійкі до дії пептидази групи або нестійкі до дії естерази групи, які описані у вказаних вище патентах, при цьому переважними є дисульфідні і тіоефірні групи. Додаткові зв'язуючі групи описані і наведені як приклади в даному описі.

Кон'югати антитіла і мейтанзиноїду можуть бути одержані з використанням множини біфункціональних, зв'язуючих білки агентів, таких як N-сукцинімідил-3-(2-піридилдитіо)пропіонат (SPDP), сукцинімідил-4-(N-малеїдометил)циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), імінотіолан (IT), біфункціональні похідні складних імідоефірів (такі як диметиладипімідат·HCl), активні складні ефіри (такі як дисукцинімідилсуберат), альдегіди (такі як глутаровий альдегід), біс-азидосполуки (такі як біс(пара-азидобензоїл)гександіамін), похідні біс-діазонію (такі як біс(пара-діазонійбензоїл)етилендіамін), діізоціанати (такі як толуол-2,6-діізоціанат) і біс-активні сполуки фтору (такі як 1,5-дифтор-2,4-динітробензол). Особливо переважними зв'язуючими агентами є N-сукцинімідил-3-(2-піридилдитіо)пропіонат (SPDP) (Carlsson et al., Biochem. J. 173: 723-737 [1978]) і N-сукцинімідил-4-(2-пиридилтіо)пентаноат (SPP), які забезпечують утворення дисульфідного зв'язку.

Лінкер може бути зв'язаний з молекулою мейтанзиноїду в різних положеннях, залежно від типу зв'язку. Наприклад, складноефірний зв'язок може бути утворений при взаємодії з гідроксильною групою з використанням звичайних способів зв'язування. Реакція може здійснюватися в положенні C-3, яке має гідроксильну групу, в положенні C-14, модифікованому гідроксиметилом, в положенні C-15, модифікованому гідроксильною групою, і в положенні C-20, яке має гідроксильну групу. У переважному варіанті зв'язок утворюється в положенні C-3 мейтанзинолу або аналога мейтанзинолу.

ii. Ауристатини і доластатини

У деяких варіантах імунокон'югат містить антитіло згідно з винаходом, кон'юговане з доластатинами або пептидними аналогами і похідними доластатину, ауристатинами (патенти США №№ 5635483 і 5780588). Показано, що доластатини і ауристатини негативно впливають на динаміку мікротрубочок, гідроліз GTP і розподіл ядер і клітин (Woyke et al. (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12): 3580-3584) і мають протипухлинну (патент США № 5663149) і протигрибкову активність (Pettit et al., (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42: 2961-2965). Залишки лікарських засобів доластатину або ауристатину можуть бути зв'язані з антитілом через N-кінець (амінокінець) або C-кінець (карбоксильний кінець) залишку пептидного лікарського засобу (WO 02/088172).

Приклади варіантів з використанням ауристатинів включають залишки лікарського засобу монометилауристатину DE і DF, що зв'язуються на N-кінці, описані в заявці на видачу патенту США «Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands», з реєстраційним номером 10/983340 від 5 листопада 2004 р., опис якої спеціально включений у вигляді посилання в повному об'ємі.

Звичайно залишки основаних на пептидах лікарських засобів можуть бути одержані за допомогою утворення пептидного зв'язку між двома або більше амінокислотами і/або пептидними фрагментами. Такі пептидні зв'язки можуть бути одержані, наприклад, згідно зі способом синтезу в рідкій фазі (дивись E. Schröder and K. Lübke, "The Peptides", volume 1, pp. 76-136, 1965, Academic Press), який добре відомий в галузі хімії пептидів. Залишки лікарських засобів ауристатину/доластатину можуть бути одержані згідно зі способами, описаними в патентах США №№ 5635483 і 5780588; в публікаціях Pettit et al., (1989) J. Am. Chem. Soc. 111: 5463-5465; Pettit et al., (1998) Anti-Cancer Drug Design 13: 243-277; Pettit, G. R., et al., Synthesis, 1996, 719-725; і Pettit et al., (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 15: 859-863. Також дивись Doronina (2003) Nat. Biotechnol. 21(7): 778-784; заявку на видачу патенту США «Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands» з реєстраційним номером № 10/983340, подану 5 листопада 2004 р., вказані публікації включені в даний опис у вигляді посилання в повному об'ємі (в них розкриті, наприклад, лінкери і способи одержання монометилвалінових сполук, таких як MMAE і MMAF, кон'югованих з лінкерами).

iii. Каліхеаміцин

У інших варіантах імунокон'югат містить антитіло згідно з винаходом, кон'юговане з однією або декількома молекулами каліхеаміцину. Каліхеаміцинове сімейство антибіотиків здатне утворювати двониткові розриви ДНК в субпікомольарних концентраціях. Одержання кон'югатів сімейства каліхеаміцину дивись в патентах США 5712374, 5714586, 5739116, 5767285, 5770701, 5770710, 5773001, 5877296 (всі American Cyanamid Company). Структурні аналоги каліхеаміцину, які можуть бути використані, включають без обмеження γ_1^1 , α_2^1 , α_3^1 , N-ацетил- γ_1^1 , PSAG і Θ_1^1 (Hinman et al., Cancer Research 53: 3336-3342 (1993), Lode et al., Cancer Research 58: 2925-2928 (1998) і вказані вище патенти США, що належать American Cyanamid). Іншим протипухлинним лікарським засобом, з яким може бути кон'юговане антитіло, є QFA, який являє собою антифолат. Як каліхеаміцин, так і QFA мають внутрішньоклітинні місця дії і складно проходять через плазматичну мембрану. Тому поглинання клітинами вказаних засобів завдяки опосередкованій антитілами інтерналізації значно посилює їх цитотоксичну дію.

iv. Інші цитотоксичні засоби

Інші протипухлинні засоби, які можуть бути кон'юговані з антитілами згідно з винаходом, включають BCNU, стрептозоцин, вінкристин і 5-фторурацил, сімейство агентів, разом відомих як комплекс LL-E33288, описаних в патентах США 5053394, 5770710, а також еспераміцини (патент США 5877296).

Ферментативно активні токсини і їх фрагменти, які можуть бути використані, включають ланцюг А дифтерійного токсину, активні фрагменти дифтерійного токсину, що не зв'язуються, ланцюг А екзотоксину (з *Pseudomonas aeruginosa*), ланцюг А рицину, ланцюг А абрину, ланцюг А модекцину, альфа-сарцин, білки *Aleurites fordii*, білки діантини, білки *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII і PAP-S), інгібітор *Momordica charantia*, курцин, кротин, інгібітор *Saponaia officinalis*, гелонін, мітогелін, рестриктоцин, феноміцин, неоміцин і трикотецени. Дивись, наприклад, WO 93/21232, опубліковану 28 жовтня 1993 р.

Даний винахід, крім того, охоплює імунокон'югат, утворений між антитілом і сполукою з нуклеолітичною активністю (наприклад, рибонуклеазою або ДНК-ендонуклеазою, такою як дезоксирибонуклеаза; ДНКаз).

Для вибірного руйнування пухлини антитіло може містити високорадіоактивний атом. Множина радіоактивних ізотопів доступна для одержання радіокон'югованих антитіл. Приклади включають ^{211}At , ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{212}Bi , ^{32}P , ^{212}Pb і радіоактивні ізотопи Lu. У тому випадку, коли кон'югат використовують для виявлення, він може містити радіоактивний атом для сцинтиграфічних досліджень, наприклад $^{99\text{m}}\text{Tc}$ або ^{123}I , або спінову мітку для ядерної магнітно-резонансної (ЯМР) візуалізації (також відомої як магнітно-резонансна візуалізація, MRI), таку як йод-123, йод-131, індій-111, фтор-19, вуглець-13, азот-15, кисень-17, гадоліній, марганець або залізо.

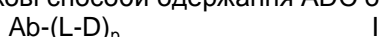
Радіоактивні або інші мітки можуть бути включені в кон'югат відовими способами. Наприклад, пептид може бути біологічно синтезований або може бути синтезований за допомогою хімічного синтезу з амінокислот з використанням придатних попередників амінокислот, які містять, наприклад, фтор-19 замість водню. Такі мітки, як $^{99\text{m}}\text{Tc}$ або ^{123}I , ^{186}Re , ^{188}Re і ^{111}In , можуть бути зв'язані з пептидом через залишок цистеїну. Ітрій-90 може бути зв'язаний через залишок лізину. Спосіб IODOGEN (Fraker et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57 (1978)) можна використовувати для включення йоду-123. У «Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy (Chatal, CRC Press 1989) детально описані інші способи.

Кон'югати антитіла і цитотоксичного засобу можуть бути одержані з використанням множини біфункціональних зв'язуючих білки агентів, таких як N-сукцинімідил-3-(2-піридилдитіо)пропіонат (SPDP), сукцинімідил-4-(N-малеїмідометил)циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), імінотіолан (IT), біфункціональні похідні складних імідоефірів (такі як диметиладипімідат·HCl), активні складні ефіри (такі як дисукцинімідилсуберат), альдегіди (такі як глутаровий альдегід), біс-азидосполуки (такі як біс(пара-азидобензоїл)гександіамін), похідні біс-діазонію (такі як біс(пара-діазонійбензоїл)етилендіамін), діізоціанати (такі як толуол-2,6-діізоціанат) і біс-активні сполуки фтору (такі як 1,5-дифтор-2,4-динітробензол). Наприклад імунотоксин рицин може бути одержаний, як описано в Vitetta et al. Science 238: 1098 (1987). Мічена вуглецем-14 1-ізотіоціанатобензил-3-метилдіетилентриамінпентаоцтова кислота (MX-DTPA) є прикладом хелатуючого агента для кон'югування радіонукліда з антитілом. Дивись WO 94/11026. Лінкер може являти собою «відщеплюваний лінкер», який полегшує вивільнення цитотоксичного лікарського засобу в клітині. Наприклад, можна використовувати кислотолабільний лінкер, чутливий до пептидази лінкер, фотоллабільний лінкер, лінкер на основі диметилу або лінкер, що містить дисульфід (Chari et al., Cancer Research. 52: 127-131 (1992); патент США № 5208020).

Сполуки згідно з винаходом зокрема включають, але не обмежені вказаним, ADC, приготований з використанням поперечношшивальних реагентів: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, сульфо-EMCS, сульфо-GMBS, сульфо-KMUS, сульфо-MBS, сульфо-SIAB, сульфо-SMCC і сульфо-SMPB і SVSB (сукцинімідил- (4-вінілсульфон)бензоат), які є комерційно доступними (наприклад, з Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A). Дивись сторінки 467-498, 2003-2004 Applications Handbook and Catalog.

Одержання кон'югатів антитіло-лікарський засіб

У кон'югатах антитіло-лікарський засіб (ADC) згідно з винаходом антитіло (Ab) кон'югують з одним або декількома залишками лікарського засобу (D), наприклад, приблизно від 1 до приблизно 20 залишків лікарського засобу на антитіло, через лінкер (L). ADC формули I може бути одержаний декількома шляхами з використанням реакцій органічної хімії, умов і реагентів, відомих фахівцям в даній галузі, включаючи: (1) взаємодію нуклеофільної групи антитіла з бівалентним лінкерним реагентом з утворенням Ab-L за допомогою ковалентного зв'язку з подальшою взаємодією із залишком лікарського засобу D; і (2) взаємодію нуклеофільної групи залишку лікарського засобу з бівалентним лінкерним реагентом з утворенням D-L за допомогою ковалентного зв'язку з подальшою взаємодією з нуклеофільною групою антитіла. Додаткові способи одержання ADC описані в цьому документі.



Лінкер може складатися з одного або декількох лінкерних компонентів. Прикладами лінкерних компонентів є 6-малеїмідокапроїл («MC»), малеїмідопропаноїл («MP»), валін-цитрулін («val-cit»), аланін-фенілаланін («ala-phe»), пара-амінобензилкарбоніл («PAB»), N-сукцинімідил-4-(2-пиридилтіо)пентаноат («SPP»), N-сукцинімідил-4-(N-малеїмідометил)циклогексан-1-карбоксилат («SMCC») і N-сукцинімідил(4-йодацетил)амінобензоат («SIAB»). Додаткові лінкерні компоненти відомі в даній галузі, і деякі з них описані в цьому документі. Дивись також «Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands» з реєстраційним № 10/983340, подану 5 листопада 2004 р., зміст якої включений в даний опис у вигляді посилання в повному об'ємі.

У деяких варіантах лінкер може містити амінокислотні залишки. Приклади амінокислотних лінкерних компонентів включають дипептид, трипептид, тетрапептид або пентапептид. Приклади дипептидів включають: валін-цитрулін (vc або val-cit), аланін-фенілаланін (af або ala-phe). Приклади трипептидів включають: гліцин-валін-цитрулін (gly-val-cit) і гліцин-гліцин-гліцин (gly-gly-gly). Амінокислотні залишки, які містять амінокислотний лінкерний компонент, включають залишки, що зустрічаються в природі, а також міnorні амінокислоти і аналоги амінокислот, що не зустрічаються в природі, такі як цитрулін. Амінокислотні лінкерні компоненти можуть бути сконструйовані і оптимізовані відносно їх вибірності до ферментативного розщеплення конкретними ферментами, наприклад, асоційованою з пухлиною протеазою, катепсином B, C і D або протеазою плазміном.

Нуклеофільні групи антитіл включають без обмеження: (i) N-кінцеві аміногрупи, (ii) аміногрупи бічних ланцюгів, наприклад, лізину, (iii) тіольні групи бічних ланцюгів, наприклад, цистеїну, і (iv) гідроксил цукру або аміногрупи, в яких антитіло глікозилюється. Аміногрупи, тіольні і гідроксильні групи є нуклеофільними і здатні взаємодіяти з утворенням ковалентних зв'язків з електрофільними групами на лінкерних залишках і лінкерних реагентах, включаючи: (i) активні складні ефіри, такі як складні NHS-ефіри, складні HOBT-ефіри, галогенформіати і галогенангідриди; (ii) алкілгалогеніди і бензилгалогеніди, такі як галогенацетаміди; (iii) альдегіди, кетони, карбоксильні і малеїмідні групи. Деякі антитіла мають відновлювані міжланцюжкові дисульфідні, тобто цистеїнові, містки. Антитіла можуть бути зроблені хімічно активними для кон'югування з лінкерними реагентами обробкою відновником, таким як DTT (дитіотреїтол). Таким чином, кожний цистеїновий місток теоретично буде утворювати два хімічно активних тіольних нуклеофіли. Додаткові нуклеофільні групи можуть бути введені в антитіла за допомогою взаємодії лізінів з 2-імінотіолоном (реагентом Трота), що приводить до перетворення аміну в тіол. Хімічно активні тіольні групи можуть бути введені в антитіло (або його фрагмент) за допомогою введення одного, двох, трьох, чотирьох або більше залишків цистеїну (наприклад, в результаті одержання мутантних антитіл, що містять один або декілька не нативних амінокислотних залишків цистеїну).

Кон'югати антитіло-лікарський засіб згідно з винаходом також можуть бути одержані при модифікації антитіла з метою введення електрофільних залишків, які можуть взаємодіяти з нуклеофільними замісниками на лінкерному реагенті або лікарському засобі. Цукри глікозилованих антитіл можуть бути окиснені, наприклад, окислювальними реагентами на основі періодату, з утворенням альдегідної або кетонної групи, які можуть взаємодіяти з аміногрупою лінкерних реагентів або залишків лікарських засобів. Одержані в результаті

іміногрупи основи Шиффа можуть утворювати стабільний зв'язок або можуть бути відновлені, наприклад, борогідридними реагентами з утворенням стабільних амінних зв'язків. У одному варіанті взаємодія вуглеводної частини глікозилизованого антитіла або з оксидазою галактози, або з мета-періодатом натрію може давати карбонільні (альдегідні і кетонів) групи в білку, які

5 можуть взаємодіяти з придатними групами на лікарському засобі (Hermanson, Bioconjugate Techniques). У іншому варіанті білки, що містять N-кінцеві залишки серину або треоніну, можуть взаємодіяти з мета-періодатом натрію, приводячи до одержання альдегіду замість першої

10 амінокислоти (Geoghegan and Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3: 138-146; патент США № US 5362852). Такий альдегід може бути підданий взаємодії із залишком лікарського засобу або нуклеофільним лінкером.

Подібним чином, нуклеофільні групи на залишку лікарського засобу включають без обмеження: амін, тіол, гідроксил, групи гідразиду, оксиму, гідразину, тіосемікарбазону, карбоксилату гідразину і арилгідразиду, здатні взаємодіяти з утворенням ковалентних зв'язків з електрофільними групами на лінкерних залишках і лінкерних реагентах, включаючи: (i) активні

15 складні ефіри, такі як складні NHS-ефіри, складні HOBT-ефіри, галогенформіати і галогенангідриди; (ii) алкілгалогеніди і бензилгалогеніди, такі як галогенацетаміди; (iii) альдегіди, кетони, карбоксильні і малеїмідні групи.

Альтернативно, злитий білок, що містить антитіло і цитотоксичний засіб, може бути одержаний, наприклад, способами на основі рекомбінації або пептидним синтезом. У довжину

20 ДНК можуть бути включені відповідні області, що кодують дві частини кон'югата, або розташовані поруч одна з одною, або розділені областю, що кодує лінкерний пептид, який не порушує необхідні властивості кон'югата.

У ще одному варіанті антитіло може бути кон'юговане з «рецептором» (таким як стрептавідин) у випадку застосування для попереднього направлення до пухлини, коли кон'югат антитіло-рецептор вводять пацієнту, з подальшим видаленням незв'язаного кон'югата з кровообігу з використанням хелатуючого агента і потім введенням «ліганду» (наприклад, авідину), який кон'югує з цитотоксичним засобом (наприклад, радіонуклідом).

Фармацевтичні препарати

Терапевтичні препарати, що містять антитіло згідно з винаходом, готують для зберігання змішуванням антитіла, яке має необхідну міру чистоти, з необов'язковими фармацевтично прийнятними носіями, ексципієнтами або стабілізаторами (Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20th edition (2000)), у формі водних розчинів, ліофілізованих або інших висушених препаратів. Прийнятні носії, ексципієнти або стабілізатори є нетоксичними для реципієнтів в застосовуваних дозах і концентраціях і включають буфери, такі як фосфат, цитрат, гістидин і

35 інші органічні кислоти; антиоксиданти, включаючи аскорбінову кислоту і метіонін; консерванти (такі як хлорид октадецилдиметилбензиламонію; хлорид гексаметонію; хлорид бензалконію, хлорид бензетонію; фенол, бутиловий або бензиловий спирт; алкілпарабени, такі як метил- або пропілпарабен; катехол; резорцинол; циклогексанол; 3-пентанол і м-крезол); поліпептиди з низькою молекулярною масою (приблизно менше 10 залишків); білки, такі як сироватковий

40 альбумін, желатин або імуноглобуліни; гідрофільні полімери, такі як полівінілпіролідон; амінокислоти, такі як гліцин, глутамін, аспарагін, гістидин, аргінін або лізин; моносахариди, дисахариди і інші вуглеводи, включаючи глюкозу, манозу або декстрини; хелатуючі агенти, такі як EDTA; цукри, такі як сахароза, маніт, трегалоза або сорбіт; солеутворювальні протиіони, такі як натрій; комплекси металів (наприклад, комплекси Zn-білок); і/або неіоногенні поверхово-

45 активні речовини, такі як твін, плуроніки або поліетиленгліколь (ПЕГ).

Препарат згідно з винаходом також може містити більше однієї активної сполуки, яка необхідна для лікування конкретного стану, переважно сполуки з доповнюючими активностями, які не здійснюють несприятливого впливу одна на одну. Такі молекули відповідно присутні в поєднанні в кількостях, які є ефективними для передбачуваної мети.

Активні інгредієнти також можуть бути поміщені в мікрокапсули, приготовані, наприклад, способами коацервації або полімеризації на границі фаз, наприклад, мікрокапсули з гідроксиметилцелюлози або желатинові мікрокапсули і мікрокапсули з полі(метилметакрилату), відповідно, в колоїдні системи доставки лікарських засобів (наприклад, ліпосоми, альбумінові мікросфери, мікроемульсії, наночастинки і нанокапсули) або

55 в макроемульсії. Такі способи описані в Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20th edition (2000).

Препарати, використовувані для введення in vivo, повинні бути стерильними. Це легко здійснити, наприклад, фільтруванням через стерильні фільтрувальні мембрани.

Можуть бути приготовані препарати тривалого вивільнення. Придатні приклади препаратів

60 тривалого вивільнення включають напівпроникні матриці з твердих гідрофобних полімерів, що

містять імуноглобулін згідно з винаходом, і такі матриці мають форму певних виробів, наприклад, плівок або мікрокапсул. Приклади матриць для тривалого вивільнення включають складні полієфіри, гідрогелі (наприклад полі(2-гідроксіетилметакрилат) або полі(вініловий спирт)), полілактиди (патент США № 3773919), співполімери L-глутамінової кислоти і γ -етил-L-глутамату, неруйновний етилен-вінілацетат, руйновні співполімери молочної кислоти-гліколевої кислоти, такі як LUPRON DEPOT™ (ін'єктовні мікросфери, що складаються зі співполімеру молочної кислоти-гліколевої кислоти і ацетату лейпроліду) і полі-D-(-)-3-гідроксимасляна кислота. У той час, як такі полімери, як етилен-вінілацетат і молочна кислота-гліколева кислота, здатні вивільняти молекули протягом більше ніж 100 днів, деякі гідрогелі вивільняють білки протягом більш коротких періодів часу. У тому випадку, коли інкапсульовані імуноглобуліни залишаються в організмі протягом тривалого часу, вони можуть денатурувати або агрегувати в результаті впливу вологи при 37°C, що приводить до втрати біологічної активності і можливих змін імуногенності. Можуть бути розроблені доцільні методики стабілізації, залежно від залучуваного механізму. Наприклад, якщо виявлено, що механізмом агрегації є утворення міжмолекулярного S-S-зв'язку в результаті тіодисульфідного обміну, то стабілізація може бути досягнута за допомогою модифікації сульфгідрильних залишків, ліофілізацією з кислих розчинів, регуляцією вологовмісту, використанням відповідних добавок і розробкою спеціальних композицій на основі полімерної матриці.

Застосування

Антитіло згідно з даним винаходом можна застосовувати, наприклад, в терапевтичних способах *in vitro*, *ex vivo* і *in vivo*.

У одному аспекті у винаході пропонуються способи лікування або профілактики пухлини, злоякісної пухлини і/або клітинного проліферативного порушення, асоційованого з підвищеною експресією і/або активністю (передачею сигналу) Notch1, при цьому способи включають в себе введення ефективної кількості анти-NRR Notch1-антитіла індивідууму, потребуючому такого лікування.

У іншому аспекті у винаході пропонуються способи зниження, інгібування або попередження росту пухлини або злоякісної пухлини, при цьому способи включають введення ефективної кількості анти-NRR Notch1-антитіла індивідууму, потребуючому такого лікування.

Крім того, щонайменше деякі антитіла згідно з винаходом можуть зв'язувати антиген з інших видів. Бажано, щоб антитіло проти NRR Notch1 зв'язувало як людський, так і мишачий NRR Notch1; бажано з K_d 1×10^{-7} або сильніше. Відповідно, антитіла згідно з винаходом можна застосовувати для зв'язування специфічної антигенної активності, наприклад, в культурі клітин, що містить антиген, в організмі людини або в організмі інших ссавців, що мають антиген, з яким антитіло згідно з винаходом перехресно взаємодіє (наприклад, шимпанзе, павіан, мавпа, макака-краббід і резус, свиня або миша). У одному варіанті антитіло згідно з винаходом можна застосовувати для інгібування активності антигену, здійснюючи контакт антитіла з антигеном так, щоб активність антигену була інгібована. Переважно антигеном є молекула білка людини.

У одному варіанті антитіло згідно з винаходом можна застосовувати в способі зв'язування антигену у індивідуума, страждаючого від порушення, асоційованого з підвищеною експресією і/або активністю (передачею сигналу) антигену, який включає введення індивідууму антитіла згідно з винаходом для того, щоб зв'язати антиген в організмі індивідуума. Зрозуміло, що підвищена активність Notch1 (передача сигналів) охоплює підвищену активність Notch1 внаслідок активуючих мутацій Notch, підвищену активність Notch1 внаслідок підвищеної експресії і/або активності лігандів Notch, а також підвищену активність Notch1 внаслідок інших механізмів. Переважно антигеном є молекула білка людини, і індивідуумом є людина. Альтернативно, індивідуумом може бути ссавець, експресуючий антиген, з яким зв'язується антитіло згідно з винаходом. Ще одним індивідуумом може бути ссавець, в організм якого був введений антиген (наприклад, за допомогою введення антигену або в результаті експресії трансгена антигену). Антитіло згідно з винаходом можна вводити людині в терапевтичних цілях. Крім того, антитіло згідно з винаходом можна вводити ссавцеві, відмінному від людини, експресуючому антиген, з яким імуноглобулін перехресно взаємодіє (наприклад, примату, свині або миші), у ветеринарних цілях або як модель захворювання людини на тваринах. Що стосується останнього, то такі моделі на тваринах можна використовувати для оцінки терапевтичної ефективності антитіл згідно з винаходом (наприклад, для тестування доз і часових курсів введення).

Антитіла згідно з винаходом можна застосовувати для лікування, інгібування, сповільнення прогресування, попередження/затримки рецидиву, ослаблення або профілактики захворювань, порушень або станів, асоційованих з експресією і/або активністю однією або декількох молекул антигенів.

Приклади порушень включають карциному, лімфому, бластоми, саркому і лейкоз або лімфоїдні злоякісні захворювання. Більш конкретні приклади таких злоякісних пухлин включають рак сквамозних клітин (наприклад, рак сквамозних клітин епітелію), рак легені, включаючи дрібноклітинний рак легені, недрібноклітинний рак легені, аденокарциному легені, сквамозну карциному легені, рак очеревини, гепатоклітинний рак, рак кишечника або шлунка, включаючи рак шлунково-кишкового тракту, рак підшлункової залози, гліобластоми, рак шийки матки, рак яєчника, рак печінки, рак сечового міхура, рак сечовивідних шляхів, гепатому, рак молочної залози, рак ободової кишки, рак прямої кишки, рак прямої і ободової кишки, карциному ендометрія або матки, карциному слинних залоз, рак нирок або нирковий рак, рак простати, рак вульви, рак щитовидної залози, карциному печінки, рак ануса, карциному пеніса, меланому, множинну мієлому і В-клітинну лімфому, рак головного мозку, а також рак голови і шиї і асоційовані метастази. У деяких варіантах злоякісна пухлина вибрана з групи, яка складається з дрібноклітинного раку легені, нейробластом, меланоми, карциноми молочної залози, раку шлунка, раку прямої і ободової кишки (CRC) і гепатоклітинної карциноми.

Антитіла згідно з винаходом також застосовні для лікування (включаючи профілактику) порушень, патології яких полягає в дегенерації або порушенні функції клітин, наприклад, для лікування різних (хронічних) нейродегенеративних порушень і гострих уражень нервових клітин. Такі нейродегенеративні порушення включають без обмеження периферичні neuropatii; порушення рухових нейронів, такі як бічний аміотрофічний склероз (ALS, хвороба Лу Геріга), периферичний параліч лицьового нерва і різні стани, в які залучена м'язова атрофія спинного мозку або параліч; і інші нейродегенеративні захворювання людини, такі як хвороба Альцгеймера, хвороба Паркінсона, епілепсія, розсіяний склероз, хорея Хантінгтона, синдром Дауна, нервова глухота і хвороба Мен'єра, і гострі ураження нервових клітин, наприклад, внаслідок травми або пошкодження спинного мозку.

Активність Notch1 залучена до розвитку різних систем стовбурових клітин і клітин ранніх попередників, як у фазі розвитку, так і у дорослій фазі. Дивись, наприклад, Chirba, S. (2006) Stem Cells 24: 2437-2447. Відповідно, в іншому аспекті у винаході пропонуються способи розмноження не диференційованих термінально клітин («клітин-попередників») за допомогою модулювання шляху Notch в клітині-попереднику для того, щоб інгібувати диференціювання клітини-попередника. У використовуваному в даному описі значенні термін «клітини-попередники» означає будь-які не диференційовані термінально клітини. Клітиною-попередником переважно є стовбурова клітина або недиференційована клітина. У деяких варіантах у винаході пропонуються способи розмноження клітин-попередників в популяції, яка містить клітини-попередники, за допомогою активації шляху Notch в клітинах для того, щоб інгібувати диференціювання стовбурової клітини. Крім того, клітини-попередники за необхідності можуть бути виділені з популяції клітин до або після активації шляху Notch. Активацію шляху Notch переважно здійснюють в результаті контактування клітини з агоністичним антитілом проти NRR Notch1.

Один з варіантів здійснення даного винаходу полягає в обробці необхідної популяції клітин агоністами шляху Notch, і потім таким клітинам або дозволяють проліферувати в культурі перед трансплантацією їх назад у відповідну область, або безпосередньо трансплантують їх без необхідності надання їм можливості проліферувати *in vitro*. Антагоністи можна використовувати для того, щоб відмінити або нейтралізувати дію агоніста функції Notch.

Збільшені в об'ємі популяції стовбурових клітин згідно з даним винаходом можуть бути трансплантовані в організм індивідуума для лікування захворювання або ураження або для генної терапії будь-яким способом, відомим в даній галузі, який придатний для даного типу трансплантованих стовбурових клітин і місця трансплантації. Гематопоетичні стовбурові клітини можна трансплантувати внутрішньовенно, як, наприклад, стовбурові клітини печінки, які будуть локалізуватися в печінці. Нервові стовбурові клітини можуть бути трансплантовані безпосередньо в головний мозок в місце пошкодження або захворювання.

Крім застосувань антагоністичних анти-NRR Notch1-антитіл, описаних в цьому документі, також застосовні агоністичні анти-NRR Notch1-антитіла для лікування або для одержання композицій для модулювання патологічних станів, асоційованих з експресією і/або активністю Notch1, і/або порушенням якого-небудь біологічно важливого біологічного шляху Notch1 і/або ліганду Notch1.

У одному аспекті у винаході пропонуються способи лікування або профілактики імунологічного порушення, при цьому способи включають введення ефективної кількості агоністичного антитіла проти NRR Notch1 індивідууму, потребуючому такого лікування. У деяких варіантах імунологічним порушенням є порушення, виникає в результаті аномального

розвитку або регуляції Т-клітин (дивись, наприклад, McKenzie et al., Expert. Opin. Ther. Targets 9: 395-410, 2005).

У іншому аспекті у винаході пропонуються способи лікування або профілактики аутоімунного захворювання, при цьому способи включають введення ефективної кількості агоністичного антитіла проти NRR Notch1 індивідууму, потребує такого лікування. У деяких варіантах аутоімунним захворюванням є аутоімунний діабет, розсіяний склероз або ревматоїдний артрит.

У наступному аспекті у винаході пропонуються способи лікування або профілактики відторгнення трансплантата, при цьому способи включають введення ефективної кількості агоністичного антитіла проти NRR Notch1 індивідууму, потребує такого лікування.

У наступному аспекті у винаході пропонуються способи стимулювання регенерації і/або репарації тканини, при цьому способи включають введення ефективної кількості агоністичного антитіла проти NRR Notch1 індивідууму, потребує такого лікування. У деяких варіантах спосіб полягає в стимулюванні регенерації і/або репарації скелетного або серцевого м'яза або кістки.

Винахід також стосується способів і композицій, застосованих для модулювання патологічних станів, асоційованих з експресією і/або активністю Notch1, такою як підвищена або знижена експресія і/або активність або небажана експресія і/або активність.

У одному аспекті у винаході пропонуються способи лікування або профілактики пухлини, злоякісної пухлини і/або клітинного проліферативного порушення, асоційованого з підвищеною експресією і/або активністю Notch1, при цьому способи включають введення ефективної кількості анти-NRR Notch1-антитіла індивідууму, потребує такого лікування.

У одному аспекті у винаході пропонуються способи інгібування ангіогенезу, які включають введення ефективної кількості анти-NRR Notch1-антитіла індивідууму, потребує такого лікування.

У одному аспекті у винаході пропонуються способи лікування патологічного стану, асоційованого з ангіогенезом, які включають введення ефективної кількості анти-NRR Notch1-антитіла індивідууму, потребує такого лікування. У деяких варіантах патологічним станом, асоційованим з ангіогенезом, є пухлина, злоякісна пухлина і/або клітинне проліферативне порушення. У деяких варіантах патологічним станом, асоційованим з ангіогенезом, є внутрішньоочне неоваскулярне захворювання.

У деяких варіантах пацієнту вводять імунокон'югат, що містить антитіло, кон'юговане з одним або декількома цитотоксичними засобами. У деяких варіантах імунокон'югат і/або антиген, з яким він зв'язаний, інтерналізується клітиною, що приводить до підвищеної терапевтичної ефективності імунокон'югата в знищенні клітини-мішені, з якою він зв'язується. У одному варіанті цитотоксичний засіб цілеспрямовано впливає або діє на нуклеїнову кислоту в клітині-мішені. У одному варіанті цитотоксичний засіб цілеспрямовано впливає або діє на полімеризацію мікротрубочок. Приклади таких цитотоксичних засобів включають будь-який з хімотерапевтичних засобів, вказаних в даному описі (такий як мейтанзиноїд, ауристатин, доластатин або каліхеаміцин), радіоактивний ізотоп або рибонуклеазу або ДНК-ендонуклеазу.

Антитіло згідно з винаходом можна застосовувати в терапії або окремо, або в поєднанні з іншими композиціями. Наприклад, антитіло згідно з винаходом можна вводити спільно з іншим антитілом, хімотерапевтичним засобом (засобами) (включаючи суміші хімотерапевтичних засобів), іншим цитотоксичним засобом (засобами), антиангіогенним засобом (засобами), цитокінами і/або інгібуючим ріст засобом (засобами). У тому випадку, коли антитіло згідно з винаходом інгібує ріст пухлини, може бути особливо бажаним його поєднання з одним або декількома іншими терапевтичними засобами, які також інгібують ріст пухлини. Альтернативно або додатково, пацієнт може одержувати комбіновану променеву терапію (наприклад, зовнішнє опромінення або терапія радіоактивно міченим засобом, таким як антитіло). Така комбінована терапія, яка вказано вище, включає спільне введення (коли два або більше засобів включені в один і той же або в різні препарати) і роздільне введення, при якому введення антитіла згідно з винаходом може відбуватися до і/або після введення допоміжного терапевтичного засобу або терапевтичних засобів.

Комбінована терапія

Як вказано вище, у винаході пропонується комбінована терапія, при якій анти-NRR Notch1-антитіло вводять разом з проведенням іншої терапії. Наприклад, анти-NRR Notch1-антитіла використовують в поєднаннях з протипухлинними терапевтичними засобами або з терапевтичними засобами проти неоваскуляризації для лікування різних неопластичних або не неопластичних станів. У одному варіанті неопластичний або не неопластичний стан характеризується патологічним порушенням, асоційованим з аномальним або небажаним

ангіогенезом. Анти-NRR Notch1-антитіло можна вводити послідовно або в поєднанні з іншим засобом, який є ефективним для таких цілей, або в одній і тій же композиції, або в різних композиціях. Альтернативно або додатково, можна вводити різні інгібітори Notch1.

Введення анти-NRR Notch1-антитіла можна здійснювати одночасно, наприклад, у вигляді однієї композиції або у вигляді двох або більше різних композицій, використовуючи один і той же або різні шляхи введення. Альтернативно або додатково, введення можна здійснювати послідовно в будь-якому порядку. У деяких варіантах можуть мати місце інтервали в діапазоні від хвилин до діб, тижнів і місяців між введеннями двох або більше композицій. Наприклад, спочатку може бути введений протипухлинний засіб з подальшим введенням інгібітору Notch1. Однак також передбачається одночасне введення або введення анти-NRR Notch1-антитіла в першу чергу.

Ефективні кількості терапевтичних засобів, що вводяться в поєднанні з анти-NRR Notch1-антитілом, знаходяться на розсуді лікуючого лікаря або ветеринара. Введення доз і коректування здійснюють так, щоб максимально справитися зі станами, що піддаються лікуванню. Додатково, доза буде залежати від таких факторів, як тип застосовуваного терапевтичного засобу і конкретний пацієнт, що піддається лікуванню. Придатними дозами для протипухлинного засобу є використовувані на даний час дози, і вони можуть бути знижені завдяки комбінованій дії (синергії) протипухлинного засобу і анти-NRR Notch1-антитіла. У деяких варіантах поєднання інгібіторів посилює ефективність одного інгібітору. Термін «посилювати» стосується підвищення ефективності терапевтичного засобу в його загальноприйнятій або схваленій дозі.

Звичайно анти-NRR Notch1 антитіла і протипухлинні засоби є придатними для одного і того ж або схожих захворювань, щоб блокувати або зменшити патологічне порушення, таке як пухлинний ріст або ріст злоякісних клітин. У одному варіанті протипухлинний засіб являє собою засіб проти ангіогенезу.

Приклади протипухлинних засобів включають алкілувальний агент, антагоніст фолату, антагоніст піримідину, цитотоксичний антибіотик, сполуку платини або основану на платині сполуку, таксан, алкалоїд барвінку, інгібітор c-Kit, інгібітор топоізомерази, антиангіогенний інгібітор, такий як інгібітор проти VEGF, інгібітор HER-2, інгібітор EGFR або подвійний інгібітор EGFR/HER-2-кінази, антиестроген, такий як фулвестрант, і гормональний терапевтичний засіб, такий як карбоплатин, цисплатин, гемцитабін, капецитабін, епірубіцин, тамоксифен, інгібітор ароматази і преднізон. У деяких варіантах злоякісна пухлина являє собою рак прямої і ободової кишки, і другим лікарським засобом є інгібітор EGFR, такий як ерлотиніб, анти-VEGF-інгібітор, такий як бевацизумаб, або цетуксимаб, аринотекан, іринотекан або FOLFOX, або злоякісна пухлина являє собою рак молочної залози, і другим лікарським засобом є антиестрогенний модулятор, такий як фулвестрант, тамоксифен або інгібітор ароматази, такий як летрозол, ексеместан або анастрозол, або другим засобом є інгібітор VEGF, такий як бевацизумаб, або другим засобом є хімотерапевтичний засіб, такий як доксорубіцин і/або таксан, такий як паклітаксел, або другим засобом є анти-HER-2-інгібітор, такий як трастузумаб, або подвійний інгібітор EGFR/HER-2-кінази, такий як лапатиніб, або знижувальний регулятор HER-2, такий як 17AAG (похідне гелданаміцину, яке є токсином білка теплового шоку [Hsp] 90) (наприклад, у випадку раку молочної залози, який прогресує при використанні трастузумабу). У інших варіантах злоякісною пухлиною є рак легені, такий як дрібноклітинний рак легені, а другим лікарським засобом є інгібітор VEGF, такий як бевацизумаб, або інгібітор EGFR, такий як, наприклад, ерлотиніб, або інгібітор c-Kit, такий як, наприклад, іматиніб.

Антиангіогенна терапія в зв'язку зі злоякісною пухлиною являє собою методику лікування злоякісної пухлини, націлену на інгібування розвитку кровоносних судин в пухлині, необхідних для доставки поживних речовин для підтримання росту пухлини. Оскільки ангіогенез залучений як в ріст первинної пухлини, так і в метастази, то антиангіогенне лікування, що пропонується у винаході, здатне інгібувати неопластичний ріст пухлини в первинному місці, а також запобігати метастазам пухлини у вторинних місцях, таким чином дозволяючи боротися з пухлинами за допомогою інших терапевтичних засобів.

У даній галузі ідентифікована і відома множина антиангіогенних засобів, включаючи засоби, перераховані в даному описі, наприклад, перераховані в розділі «Визначення», і наприклад в Carmeliet and Jain, Nature 407: 249-257 (2000); Ferrara et al., Nature Reviews: Drug Discovery, 3: 391-400 (2004); і Sato Int. J. Clin. Oncol., 8: 200-206 (2003). Дивись також заявку на видачу патенту США US 20030055006. У одному варіанті анти-NRR Notch1-антитіло використовують в поєднанні з нейтралізуючим анти-VEGF-антитілом (або фрагментом) і/або іншим антагоністом VEGF або антагоністом рецептора VEGF, включаючи без обмеження, наприклад, розчинні фрагменти рецептора VEGF (наприклад VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, нейропіліни (наприклад

NRP1, NRP2)), аптамери, здатні блокувати VEGF або VEGFR, нейтралізуючі анти-VEGFR-антитіла, низькомолекулярні інгібітори тирозинкіназ VEGFR (RTK), антисмислові методики відносно VEGF, рибозими проти VEGF або рецепторів VEGF, антагоністичні варіанти VEGF і будь-які їх поєднання. Альтернативно або додатково, два або більше інгібіторів ангиогенезу

необов'язково можна спільно вводити пацієнту крім антагоніста VEGF і іншого засобу. У деяких варіантах один або декілька додаткових терапевтичних засобів, наприклад протипухлинних засобів, можна вводити в поєднанні з анти-NRR Notch1-антитілом, антагоністом VEGF і засобом проти ангиогенезу.

У деяких аспектах винаходу інші терапевтичні засоби, застосовні для комбінованої терапії

пухлин з анти-NRR Notch1-антитілом, включають інші засоби терапії злоякісної пухлини (наприклад, хірургічну операцію, радіологічне лікування (наприклад, яке включає опромінення або введення радіоактивних речовин), хіміотерапію, лікування протипухлинними засобами, перерахованими в даному описі і відомими в даній галузі, або поєднання вказаного). Альтернативно або додатково, пацієнту можна спільно вводити два або більше антитіл, зв'язуючих один і той самий або два або більше різних антигенів, описаних в даному документі. Іноді також може бути корисним введення пацієнту одного або декількох цитокінів.

Хіміотерапевтичні засоби

У деяких аспектах винахід стосується способу блокування або зменшення пухлинного росту або росту злоякісної клітини за допомогою введення ефективних кількостей антагоніста Notch1 і/або інгібітору(ів) ангиогенезу і одного або декількох хіміотерапевтичних засобів пацієнту, сприйнятливому до злоякісної пухлини, або пацієнту, у якого діагностована злоякісна пухлина. Множину хіміотерапевтичних засобів можна використовувати в способах комбінованої терапії згідно з винаходом. Зразковий і необмежувальний список хіміотерапевтичних засобів, що розглядаються, представлений в даному описі в розділі «Визначення» і деякі з них описані вище.

Фахівцям в даній галузі буде зрозуміло, що придатні дози хіміотерапевтичних засобів будуть, як правило, близькі до доз, що вже застосовуються в клінічній терапії, при якій хіміотерапевтичні засоби вводять окремо або в поєднанні з іншими хіміотерапевтичними засобами. Ймовірно, буде мати місце варіювання доз залежно від стану, який піддається лікуванню. Лікар, який проводить лікування, зможе визначити придатну дозу для конкретного пацієнта.

Рецидивуючий ріст пухлини

Винахід також стосується способів і композицій для інгібування або попередження рецидивуючого пухлинного росту або рецидивуючого росту злоякісних клітин. Рецидивуючий пухлинний ріст або рецидивуючий ріст злоякісних клітин використовують для опису стану, при якому пацієнти, що піддаються лікуванню одним або декількома наявними на даний час способами терапії (наприклад, терапії злоякісної пухлини, такої як хіміотерапія, променева терапія, хірургія, гормональна терапія і/або біологічна терапія/імунотерапія, терапія анти-VEGF-антитілами, зокрема стандартна терапевтична схема для конкретної злоякісної пухлини), клінічно не реагують адекватно на лікування, або коли пацієнти більше не одержують якого-небудь корисного ефекту від терапії, так що такі пацієнти потребують додаткової ефективної терапії. У використовуваному в даному описі значенні фраза також може стосуватися стану «не відповідаючого/важковилікового» пацієнта, наприклад, описує пацієнтів, які відповідають на терапію, страждаючи при цьому від побічних ефектів, у яких розвивається резистентність, які не відповідають на терапію, які незадовільно відповідають на терапію і т. д. В різних варіантах злоякісна пухлина являє собою рецидивуючий пухлинний ріст або рецидивуючий ріст злоякісних клітин, коли кількість злоякісних клітин суттєво не зменшилася або навіть збільшилася, або розмір пухлини суттєво не зменшився або навіть збільшився, або не вдалося яке-небудь подальше зменшення розміру або кількості злоякісних клітин. Визначення того, чи являють собою злоякісні клітини результат рецидивуючого пухлинного росту або рецидивуючого росту злоякісних клітин, можна здійснити або *in vivo*, або *in vitro* будь-яким способом, відомим в даній галузі, для аналізу ефективності обробки злоякісних клітин, використовуючи в такому контексті прийняті в даній галузі значення термінів «рецидивуючий» або «рефрактерний» або «не відповідаючий». Пухлина, резистентна до анти-VEGF-лікування, є прикладом рецидивуючого пухлинного росту.

Винахід стосується способів блокування або зниження рецидивуючого пухлинного росту або рецидивуючого росту злоякісних клітин у індивідуума за допомогою введення одного або декількох анти-NRR Notch1-антитіл, щоб блокувати або зменшити рецидивуючий пухлинний ріст або рецидивуючий ріст злоякісних клітин у індивідуума. У деяких варіантах антагоніст можна вводити після терапевтичного засобу проти злоякісної пухлини. У деяких варіантах анти-

NRR Notch1-антитіло вводять одночасно з протипухлинною терапією. Альтернативно або додатково, терапію анти-NRR Notch1-антитілом чергують з іншою протипухлинною терапією, які можна здійснювати в будь-якому порядку. Винахід також охоплює способи введення одного або декількох інгібуючих антитіл, щоб запобігти появі або рецидиву злоякісної пухлини у індивідуумів, схильних до наявності злоякісної пухлини. Загалом, індивідуума або раніше піддавали або він одночасно піддається терапії, направленої проти злоякісної пухлини. У одному варіанті терапія злоякісної пухлини являє собою лікування засобом проти ангиогенезу, наприклад, антагоністом VEGF. Засоби проти ангиогенезу включають засоби, відомі в даній галузі, і засоби, вказані в даному описі в розділі «Визначення». У одному варіанті засобом проти ангиогенезу є нейтралізуюче анти-VEGF-антитіло або фрагмент (наприклад, гуманізоване антитіло A4.6.1, AVASTIN® (Genentech, South San Francisco, CA), Y0317, M4, G6, B20, 2C3 і т. д.). Дивись, наприклад, патенти США 6582959, 6884879, 6703020, WO 98/45332, WO 96/30046, WO94/10202, EP 0666868B1, заявки на видачу патентів США 20030206899, 20030190317, 20030203409 і 20050112126; Popkov et al., *Journal of Immunological Methods* 288: 149-164 (2004) і WO 2005012359. Можуть бути введені додаткові засоби в поєднанні з антагоністами VEGF і анти-NRR Notch1-антитілом для блокування або зменшення рецидивуючого пухлинного росту або рецидивуючого росту злоякісних клітин, наприклад, дивись розділ, озаглавлений «Комбінована терапія», в даному описі.

Сполуки згідно з винаходом (наприклад, анти-NRR Notch1-антитіла) вводять індивідууму (наприклад, людині) відомими способами, такими як внутрішньовенне введення у вигляді болюсу або за допомогою безперервної інфузії протягом певного періоду часу, наприклад, за допомогою перорального, місцевого шляху або за допомогою інгаляції, парентеральним, підшкірним, внутрішньоочеревинним, внутрішньолегеневим і інтраназальним шляхом, і за необхідності в місцевому лікуванні за допомогою введення в місце пошкодження. Парентеральні інфузії включають внутрішньом'язове, внутрішньовенне, внутрішньоартеріальне, внутрішньоочеревинне, інтрацереброспінальне, внутрішньосуглобове, інтратекальне або підшкірне введення. Місцеве введення особливо бажане, якщо з інгібуванням передачі сигналів Notch1 асоційовані сильні побічні ефекти. Методика *ex vivo* також може бути використана для терапевтичних застосувань. Методика *ex vivo* полягає, наприклад, в трансфекції або трансдукції клітин, одержаних з організму індивідуума, полінуклеотидом, що кодує анти-NRR Notch1-антитіло. Трансфеговані або трансдуковані клітини потім повертають в організм індивідуума. Клітини можуть бути будь-якого типу з великої різноманітності типів клітин, включаючи без обмеження гематопоетичні клітини (наприклад, клітини кісткового мозку, макрофаги, моноцити, дендритні клітини, Т-клітини або В-клітини), фібробласти, епітеліальні клітини, ендотеліальні клітини, кератиноцити або м'язові клітини.

Крім того, антитіло може бути відповідним чином введене за допомогою імпульсної інфузії, зокрема, з використанням доз антитіла, що знижуються. Переважно дози вводять за допомогою ін'єкцій, найбільш переважно внутрішньовенних або підшкірних ін'єкцій, частково залежно від того, чи є введення короточасним або постійним.

У іншому прикладі анти-NRR Notch1-антитіло вводять локально, наприклад, прямими ін'єкціями, якщо це допускає порушення або положення пухлини, і ін'єкції можна періодично повторювати. Анти-NRR Notch1-антитіло також можна доставляти в організм індивідуума системно або безпосередньо в пухлинні клітини, наприклад, в пухлину або ложе пухлини після хірургічного видалення пухлини, щоб попередити або зменшити локальний рецидив або метастази.

Альтернативно, інгібуючу молекулу нуклеїнової кислоти або полінуклеотид, що містить послідовність нуклеїнової кислоти, кодує анти-NRR Notch1-антитіло, можна вводити у відповідні клітини в організмі індивідуума. У деяких варіантах нуклеїнову кислоту можна вводити безпосередньо в пухлину.

Нуклеїнову кислоту можна вводити до клітини будь-якими способами, придатними у випадку застосування векторів. Множина таких способів добре відома в даній галузі (Sambrook et al., вище, і Watson et al., *Recombinant DNA*, Chapter 12, 2d edition, Scientific American Books, 1992). Прикладами способів доставки генів є опосередкована ліпосомами трансфекція, електропорація, способи на основі фосфату кальцію/DEAE-декстрану, генна гармата і мікроін'єкція.

Введення доз можна здійснювати будь-яким придатним шляхом, наприклад, за допомогою ін'єкцій, таких як внутрішньовенні або підшкірні ін'єкції, частково залежно від того, чи є введення короточасним або постійним. Композиція антитіла згідно з винаходом буде приготована, дозована і введена таким чином, який сумісний з позитивною медичною

практикою. Фактори, які враховуються в такому контексті, включають конкретне порушення, що піддається лікуванню, конкретного ссавця, що піддається лікуванню, клінічний стан пацієнта, причину порушення, місце доставки засобу, спосіб введення, схему введення і інші фактори, відомі лікуючим спеціалістам. Антитіло необов'язково готують з одним або декількома засобами, використовуваними на даний час для профілактики або лікування порушення, що розглядається. Ефективна кількість таких інших засобів залежить від кількості антитіл згідно з винаходом, присутніх в препараті, типу порушення або лікування і інших факторів, обговорюваних вище. Засоби звичайно використовують в таких же дозах і такими ж шляхами введення, як використовували раніше, або приблизно від 1 до 99% від використовуваних раніше доз.

Для профілактики або лікування захворювання придатна доза антитіла згідно з винаходом (у випадку застосування окремо або в поєднанні з іншими засобами, такими як хіміотерапевтичні засоби) буде залежати від типу захворювання, що піддається лікуванню, типу антитіла, тяжкості і характеру перебігу захворювання, від того, чи вводять антитіло в профілактичних або терапевтичних цілях, попередньої терапії, історії хвороби пацієнта і реакції на антитіло, і вводиться за розсудом лікуючого спеціаліста. Антитіло відповідним чином вводять пацієнту за один раз або протягом серії введень. Залежно від типу і тяжкості захворювання доза, що складає приблизно від 1 мкг/кг до 15 мг/кг (наприклад, 0,1 мкг/кг-10 мг/кг) антитіла, є початково вибіраною дозою для введення пацієнту, наприклад, або за допомогою одного або декількох окремих введень, або за допомогою безперервної інфузії. Одна типова добова доза може знаходитися в діапазоні приблизно від 1 мкг/кг до 100 мг/кг або вище, залежно від факторів, вказаних вище. У випадку повторних введень протягом декількох днів або довше залежно від стану лікування підтримують аж до настання необхідного пригнічення симптомів захворювання. Одна із зразкових доз антитіла може бути в діапазоні приблизно від 0,05 мкг/кг до приблизно 10 мкг/кг. Таким чином, одну або декілька доз приблизно по 0,5 мкг/кг, 2,0 мкг/кг, 4,0 мкг/кг або 10 мкг/кг (або будь-яке їх поєднання) можна вводити пацієнту. Такі дози можна вводити з перервами, наприклад, кожного тижня або кожні три тижні (наприклад, так, щоб пацієнт одержав приблизно від двох до двадцяти, наприклад, шість доз антитіла). Може бути введена початкова більш висока ударна доза з подальшим введенням однієї або декількох більш низьких доз. Зразкова схема дозування включає в себе введення початкової ударної дози приблизно 4 мкг/кг з подальшою щотижневою підтримуючою дозою приблизно 2 мкг/кг антитіла. Однак можуть бути застосовні інші схеми дозування. Успішність такої терапії легко контролювати звичайними способами і аналізами.

Анти-NRR Notch1-антитіла згідно з винаходом також застосовні в аналізах виявлення експресії Notch1 (таких як діагностичні або прогностичні аналізи) в специфічних клітинах або тканинах, при цьому антитіла мітять, як описано нижче, і/або іммобілізують на нерозчинній матриці.

У іншому аспекті у винаході пропонуються способи виявлення Notch1, при цьому способи включають виявлення комплексу Notch1-анти-NRR Notch1-антитіло в зразку. Термін «виявлення» у використовуваному в даному описі значенні охоплює якісне і/або кількісне визначення (рівні вимірювання) при порівнянні або без порівняння з контролем.

У іншому аспекті у винаході пропонуються способи діагностики порушення, асоційованого з експресією і/або активністю Notch1, при цьому способи включають виявлення комплексу Notch1-анти-NRR Notch1-антитіло в біологічному зразку від індивідуума, у якого є порушення або у якого підозрюється наявність порушення. У деяких варіантах експресія Notch1 являє собою підвищену експресію або аномальну (небажану) експресію. У деяких варіантах порушенням є пухлина, злоякісна пухлина і/або клітинне проліферативне порушення. Альтернативно або на доповнення до виявлення експресії Notch1 в способах діагностики або лікування, описаних в цьому документі, можна визначати експресію лігандів Notch1 в біологічному зразку. Експресія ліганду Notch1 може бути визначена з використанням стандартних в даній галузі способів.

У іншому аспекті у винаході пропонуються будь-які анти-NRR Notch1-антитіла, описані в цьому документі, при цьому анти-NRR Notch1-антитіло містить мітку, що реєструється.

У іншому аспекті у винаході пропонується комплекс будь-якого з описаних анти-NRR Notch1-антитіл і Notch1. У деяких варіантах комплекс утворюється in vivo або in vitro. У деяких варіантах комплекс містить злоякісну клітину. У деяких варіантах анти-NRR Notch1-антитіло мітять міткою, що реєструється.

Анти-NRR Notch1-антитіла можна застосовувати для виявлення Notch1 в будь-якому з ряду добре відомих способів аналізу для виявлення. Наприклад, біологічний зразок може бути підданий аналізу відносно Notch1 за допомогою одержання зразка з необхідного джерела,

змішування зразка з анти-NRR Notch1-антитілом, щоб забезпечити можливість антитілу утворити комплекс антитіло/Notch1 з будь-яким Notch1, присутнім в суміші, і реєстрації комплексу антитіло/Notch1, присутнього в суміші. Біологічний зразок може бути одержаний для аналізу будь-якими способами, відомими в даній галузі, які придатні для конкретного зразка.

Способи змішування зразка з антитілами і способи реєстрації комплексу антитіло/Notch1 вибирають відповідно до типу застосовуваного аналізу. Такі аналізи включають імуногістохімію (IHC), конкурентні аналізи і аналізи типу «сендвіч», і аналізи стеричного інгібування.

У всіх способах аналізу Notch1 використовують один або декілька з наступних реагентів:

мічений аналог Notch1, іммобілізований аналог Notch1, мічене анти-NRR Notch1-антитіло, іммобілізоване анти-NRR Notch1-антитіло і стеричні кон'югати. Мічені реагенти також відомі як «індикатори».

Використовувана мітка являє собою будь-яку функціональну групу, що реєструється, яка не заважає зв'язуванню Notch1 і анти-NRR Notch1-антитіла. Відомі численні мітки для застосування в імуноаналізі, приклади включають компоненти, які можна безпосередньо реєструвати, такі як флуорохром, хемілюмінесцентна речовина і радіоактивні мітки, а також такі компоненти, як ферменти, які повинні бути піддані взаємодії або дериватизовані для виявлення. Приклади таких міток включають радіоактивні ізотопи ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H і ^{131}I , флуорофори, такі як рідкісноземельні хелати або флуоресцеїн і його похідні, родамін і його похідні, дансил, умбеліферон, люциферази, наприклад, люциферазу світляка і бактеріальну люциферазу (патент США № 4737456), люциферин, 2,3-дигідрофталазиндіони, пероксидазу хрому (HRP), лужну фосфатазу, β -галактозидазу, глюкоамілазу, лізоцим, оксидази сахаридів, наприклад, глюксооксидазу, галактозооксидазу і глюксо-6-фосфатдегідрогеназу, оксидази гетероциклів, такі як уриказа і ксантинооксидаза, в парі з ферментом, який використовує пероксид водню для окислення попередника барвника, таким як HRP, лактопероксидазу або мікропероксидазу, біотин/авідин, спінові мітки, мітки бактеріофага, стабільні вільні радикали і тому подібне.

Є стандартні способи для зв'язування таких міток з білками або поліпептидами. Наприклад, можна використовувати зв'язуючі агенти, такі як діальдегіди, карбодііміди, дималеіміди, біс-імідати, біс-діазотований бензидин і тому подібні, для мічення антитіл описаними вище флуоресціюючими, хемілюмінесцентними і ферментними мітками. Дивись, наприклад, патенти США №№ 3940475 (флуориметрія) і 3645090 (ферменти); Hunter et al., *Nature*, 144: 945 (1962); David et al., *Biochemistry*, 13: 1014-1021 (1974); Pain et al., *J. Immunol. Methods*, 40: 219-230 (1981); і Nygren, *J. Histochem. and Cytochem.*, 30: 407-412 (1982). Переважними в даному винаході мітками є ферменти, такі як пероксидаза хрому і лужна фосфатаза. Кон'югування такої мітки, включаючи ферменти, з антитілом є стандартною процедурою обробки для фахівця в сфері імуноаналізу. Дивись, наприклад, O'Sullivan et al., «Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for Use in Enzyme Immunoassay», в *Methods in Enzymology*, ed. J. J. Langone and H. Van Vunakis, Vol. 73 (Academic Press, New York, N.Y., 1981), pp. 147-166.

Для деяких способів аналізу необхідна іммобілізація реагентів. Іммобілізація викликає відділення анти-NRR Notch1-антитіла від Notch1 або NRR Notch1, який залишається вільним в розчині. Це звичайно здійснюють, або роблячи анти-NRR Notch1-антитіло або аналог NRR Notch1 нерозчинними перед процедурою аналізу, наприклад, адсорбуючи на водонерозчинній матриці або поверхні (Bennich et al., патент США № 3720760) за допомогою ковалентного зв'язування (наприклад, використовуючи поперечне зшивання глутаральдегідом), або роблячи анти-NRR Notch1-антитіло або аналог NRR Notch1 нерозчинними пізніше, наприклад, в результаті імунопреципітації.

Експресію білків в зразку можна дослідити, використовуючи протоколи імуногістохімії і фарбування. Показано, що імуногістохімічне фарбування зрізів тканини є надійним способом оцінки або виявлення наявності білків в зразку. У методиках імуногістохімії («IHC») використовують антитіло для дослідження і візуалізації клітинних антигенів *in situ*, звичайно хромогенними або флуоресцентними способами. Для одержання зразка можна використовувати зразок тканини або клітин ссавця (звичайно людини). Приклади зразків включають без обмеження злоякісні клітини, такі як клітини раку прямої і ободової кишки, молочної залози, простати, яєчника, легені, шлунка, підшлункової залози, лімфоми і лейкозу. Зразок може бути одержаний різними способами, відомими в даній галузі, включаючи без обмеження вирізання хірургічним шляхом, аспірацію або біопсію. Тканина може бути свіжою або замороженою. У одному варіанті зразок фіксують і заливають в парафін або подібну речовину. Зразок тканини можна фіксувати (тобто зберегти) звичайним способом. Фахівцеві в даній галузі буде зрозуміло, що вибір фіксатора визначається метою, для якої зразок необхідно гістологічно пофарбувати або аналізувати іншим чином. Фахівцеві в даній галузі також буде

зрозуміло, що тривалість фіксації залежить від розміру зразка тканини і використовуваного фіксатора.

ІНС може бути здійснена в поєднанні з додатковими методиками, такими як морфологічне фарбування і/або флуоресценція при гібридизації in-situ. Доступні два загальноприйнятих способи ІНС: прямий і непрямий аналізи. Згідно з першим аналізом зв'язування антитіла з антигеном-мішенню (наприклад, NRR Notch1) визначають безпосередньо. У такому прямому аналізі використовують мічений реагент, такий як флуоресціююча мітка або мічене ферментом перше антитіло, яке може бути візуалізоване без взаємодії з додатковим антитілом. У типовому непрямому аналізі некон'юговане перше антитіло зв'язується з антигеном, і потім мічене друге антитіло зв'язується з першим антитілом. У тому випадку, коли друге антитіло кон'югує з ферментною міткою, додають хромогенний або флуорогенний субстрат, щоб забезпечити візуалізацію антигену. Посилення сигналу відбувається внаслідок того, що декілька других антитіл можуть взаємодіяти з різними епітопами на першому антитілі.

Перше і/або друге антитіло, використовуване для імуногістохімії, звичайно мітять компонентом, що реєструється. Доступні численні мітки, які загалом можуть бути віднесені до наступних категорій.

Крім способів приготування зразка, обговорюваних вище, може вимагатися додаткова обробка зрізу тканини до, під час або після ІНС. Наприклад, можуть бути здійснені способи відновлення епітопів, такі як нагрівання зразка тканини в цитратному буфері (дивись, наприклад, Leong et al. Appl. Immunohistochem. 4(3):201 (1996)).

Після необов'язкової стадії блокування зріз тканини піддають впливу першого антитіла протягом достатнього періоду часу і у придатних умовах, так що перше антитіло зв'язується з білковим антигеном-мішенню в зразку тканини. Придатні умови для досягнення зв'язування можна визначити в результаті рутинного експерименту. Міру зв'язування антитіла із зразком визначають, використовуючи будь-яку з міток, що реєструються, обговорюваних вище. Переважно мітка є ферментною міткою (наприклад, HRPO), яка каталізує хімічну зміну хромогенного субстрату, такого як хромоген 3,3'-діамінобензидин. Переважно ферментну мітку кон'югують з антитілом, яке специфічно зв'язується з першим антитілом (наприклад, першим антитілом є поліклональне антитіло кролика, а другим антитілом є антитіло кози проти Ig кролика).

Приготовані таким чином зразки можуть бути закріплені і покриті покривним склом. Потім проводять оцінку препарату, наприклад, використовуючи мікроскоп, і можна використовувати критерії інтенсивності фарбування, звичайно використовувані в даній галузі. Критерії інтенсивності забарвлення можна оцінити таким чином:

Таблиця 2

Картина фарбування	Оцінка
У клітинах не спостерігається фарбування	0
Виявляють слабе/ледве помітне фарбування більше ніж в 10% клітин	1+
Спостерігають від слабого до середнього фарбування більше ніж в 10% клітин	2+
Спостерігають від середнього до сильного фарбування більше ніж в 10% клітин	3+

Звичайно оцінка картини фарбування близько 2+ або вище при аналізі ІНС є діагностичною і/або прогностичною. У деяких варіантах оцінка картини фарбування близько 1+ або вище є діагностичною і/або прогностичною. У інших варіантах оцінка картини фарбування близько 3 або вище є діагностичною і/або прогностичною. Зрозуміло, що, коли досліджують клітини і/або тканину з пухлини або аденоми ободової кишки, використовуючи ІНС, то фарбування звичайно визначають або оцінюють в пухлинній клітині і/або тканині (на відміну від стромальної або оточуючої тканини, яка може бути присутньою в зразку).

Інші способи аналізу, відомі як конкурентний аналіз або аналіз типу «сендвіч», добре розроблені і широко використовуються в комерційній діагностичній індустрії.

Конкурентні аналізи ґрунтуються на здатності індикаторного міченого аналога NRR Notch1 конкурувати з NRR Notch1 в тестованому зразку за обмежену кількість антигензв'язувальних сайтів анти-NRR Notch1-антитіла. Анти-NRR Notch1-антитіло звичайно не розчинне до або після конкуренції, і потім індикатор і Notch1 або NRR Notch1, зв'язаний з анти-NRR Notch1-антитілом, відділяють від незв'язаного індикатора і Notch1 або NRR Notch1. Таке розділення здійснюють, декантуючи (у випадку, коли партнер, що зв'язується, попередньо робили нерозчинним) або центрифугуючи (у випадку, коли партнер, що зв'язується, преципітували після конкурентної реакції). Кількість Notch1 або NRR Notch1 в тестованому зразку зворотно пропорційна кількості

зв'язаного індикатора, яку вимірюють по кількості маркерної речовини. Одержують криві залежності «доза-відповідь» з відомими кількостями NRR Notch1 і порівнюють з результатами тесту, щоб кількісно визначити кількість Notch1 або NRR Notch1, присутнього в тестованому зразку. Такі аналізи називають системами ELISA, коли як маркери, що реєструються, використовують ферменти.

Інший тип конкурентного аналізу, називаний «гомогенним» аналізом, не вимагає розділення фаз. У цьому випадку одержують і використовують кон'югат ферменту з Notch1 або NRR Notch1, так що при зв'язуванні анти-NRR Notch1-антитіла з Notch1 або NRR Notch1 присутність анти-NRR Notch1-антитіла модифікує ферментативну активність. У цьому випадку Notch1 або NRR Notch1 або їх імунологічно активні фрагменти кон'югують за допомогою біфункціонального органічного містка з ферментом, таким як пероксидаза. Кон'югати вибирають для використання з анти-NRR Notch1-антитілом так, що зв'язування анти-NRR Notch1-антитіла інгібує або стимулює ферментативну активність мітки. Такий спосіб як такий широко використовується на практиці під назвою EMIT.

Стеричні кон'югати використовують в способах оцінки стеричної невідповідності в гомогенному аналізі. Такі кон'югати синтезують за допомогою ковалентного зв'язування гаптену з низькою молекулярною масою з невеликим фрагментом NRR Notch1, так що антитіло до гаптену по суті не здатне зв'язувати кон'югат одночасно з анти-NRR Notch1-антитілом. У такому способі аналізу NRR Notch1, присутній в тестованому зразку, буде зв'язувати анти-NRR Notch1-антитіло, таким чином забезпечуючи можливість зв'язування антигаптену з кон'югатом, що приводить до зміни характеру гаптену в кон'югаті, наприклад, зміни флуоресценції, коли гаптен є флуорофор.

Аналіз типу «сендвіч» особливо застосовний для визначення Notch1, NRR Notch1 або анти-NRR Notch1-антитіл. У аналізах на основі послідовного утворення «сендвіча» використовують іммобілізоване анти-NRR Notch1-антитіло для адсорбції Notch1 або NRR Notch1 із тестованого зразка, тестований зразок видаляють за допомогою промивання, зв'язаний Notch1 або NRR Notch1 використовують для адсорбції другого міченого анти-NRR Notch1-антитіла і потім зв'язану речовину відділяють від залишкового міченого індикатора. Кількість зв'язаного міченого індикатора прямо пропорційна Notch1 або NRR Notch1 в тестованому зразку. У аналізах на основі одночасного утворення «сендвіча» тестований зразок не відділяють перед додаванням міченого анти-NRR Notch1. Аналіз на основі послідовного утворення «сендвіча» з використанням моноклонального анти-NRR Notch1-антитіла як одного з антитіл і поліклонального анти-NRR Notch1-антитіла як іншого антитіла застосовний при тестуванні зразків відносно Notch1 або NRR Notch1.

Описані вище аналізи являють собою тільки ілюстративні аналізи для виявлення Notch1 або NRR Notch1. Розроблені на даний час способи або способи, які будуть розроблені в майбутньому, в яких використовується анти-NRR Notch1-антитіло для визначення Notch1 або NRR Notch1, включені в об'єм винаходу, включаючи біологічні аналізи, описані в цьому документі.

У одному аспекті у винаході пропонуються способи виявлення (наприклад, присутності або відсутності або кількості) полінуклеотиду(ів) (наприклад, полінуклеотидів Notch1) в біологічному зразку від індивідуума, такого як людина. Можна використовувати множину способів виявлення полінуклеотидів, і до таких способів належить, наприклад, ЗТ-ПЛР, аналіз експресії генів TaqMan®, способи ампліфікації, мікроматриці полінуклеотидів і тому подібне.

Способи виявлення полінуклеотидів (таких як мРНК) добре відомі і включають, наприклад, аналізи гібридизації з використанням комплементарних ДНК-зондів (такі як гібридизація *in situ* з використанням мічених рибонуклеотидних зондів Notch1), Нозерн-блот і споріднені методики, і різні аналізи на основі ампліфікації нуклеїнової кислоти (такі як ЗТ-ПЛР з використанням комплементарних праймерів, специфічних для Notch1, і інші способи виявлення на основі ампліфікації, такі як, наприклад, на основі розгалуженої ДНК, SPIA (ізотермічна ампліфікація з одним праймером), Ribo-SPIA, SISBA, NASBA (ампліфікація, основана на послідовності нуклеїнової кислоти), TMA (опосередкована транскрипцією ампліфікація) і тому подібні).

Біологічні зразки від ссавців можна аналізувати зручним способом, наприклад, відносно мРНК Notch1, використовуючи Нозерн-блот, дот-блот або ПЛР-аналіз. Наприклад, аналізи ЗТ-ПЛР, такі як кількісні ПЛР-аналізи, добре відомі в даній галузі. У ілюстративному варіанті здійснення винаходу спосіб виявлення мРНК Notch1 в біологічному зразку включає одержання кДНК із зразка за допомогою зворотної транскрипції з використанням щонайменше одного праймера; ампліфікацію одержаної таким чином кДНК з використанням полінуклеотиду Notch1 як смислового і антисмислового праймерів, щоб ампліфікувати кДНК Notch1; і реєстрацію наявності або відсутності ампліфікованої кДНК Notch1. Крім того, такі способи можуть включати

одну або декілька стадій, які дозволяють визначити кількість (рівні) мРНК Notch1 в біологічному зразку (наприклад, при одночасному дослідженні рівнів використовуваної для порівняння контрольної послідовності мРНК гена домашнього господарства, такого як представник сімейства актину). Необов'язково можна визначити послідовність ампліфікованої кДНК Notch1.

Зонди і/або праймери можна мітити маркером, що реєструється, таким як, наприклад, радіоактивний ізотоп, флуоресціююча сполука, біолоюмінесцентна сполука, хемілюмінесцентна сполука, хелатор металу або фермент. Такі зонди і праймери можна використовувати для виявлення присутності полінуклеотидів Notch1 в зразку і як засоби виявлення клітини, експресуючої білки Notch1. Як буде зрозуміло фахівцям в даній галузі, можна одержати дуже багато різних праймерів і зондів (наприклад, основаних на послідовностях, пропонуваніх в даному описі) і ефективно використовувати їх для ампліфікації, клонування і/або визначення наявності або відсутності і/або кількостей мРНК Notch1.

Необов'язкові способи згідно з винаходом включають протоколи визначення полінуклеотидів, таких як полінуклеотид Notch1, в зразку тканини або клітин з використанням методики мікроматриць. Наприклад, при використанні мікроматриць нуклеїнових кислот тестовані і контрольні зразки мРНК з тестованих і контрольних зразків тканини зворотно транскрибують і мітять, щоб одержати зонди кДНК. Потім зонди гібридизують з матрицею нуклеїнових кислот, іммобілізованих на твердій підкладці. Матрицю компонують так, щоб були відомі послідовність і положення кожного представника матриці. Наприклад, на твердій підкладці може бути розподілений набір генів, які ймовірно експресуються при деяких патологічних станах. Гібридизація міченого зонда з конкретним представником на матриці показує, що зразок, з якого одержаний зонд, експресує даний ген. Аналіз диференціальної експресії генів патологічної тканини може дати цінну інформацію. У методиці мікроматриць використовують способи гібридизації нуклеїнових кислот і комп'ютерні технології, щоб оцінити профіль експресії мРНК тисяч генів в одному експерименті (дивись, наприклад, WO 01/75166, опубліковану 11 жовтня 2001 р.). (Обговорення виготовлення матриць дивись, наприклад, патент США № 5700637, патент США № 5445934, патент США № 5807522; Lockart, Nature Biotechnology, 14: 1675-1680 (1996) і Cheung, V. G. et al., Nature Genetics 21 (Suppl): 15-19 (1999)). Мікроматриці ДНК являють собою невеликі матриці, що містять фрагменти генів, які або безпосередньо синтезують на скляній або інших підкладках, або наносять на них у вигляді плям. На одній матриці звичайно представлені тисячі генів. Типовий експеримент з використанням мікроматриці звичайно включає наступні стадії: (1) приготування флуоресцентно міченої мішені з РНК, виділеної із зразка, (2) гібридизацію міченої мішені з мікроматрицею, (3) промивання, фарбування і сканування матриці, (4) аналіз сканованого зображення і (5) одержання профілів експресії генів. На даний час застосовують два основних типи мікроматриць ДНК: матриці олігонуклеотидів (звичайно 25-70-мерів) і матриці експресії генів, що містять продукти ПЛР, одержані на кДНК. При створенні матриці олігонуклеотиди або можна попередньо утворювати і наносити у вигляді плям на поверхню, або безпосередньо синтезувати на поверхні (in situ).

Система Affymetrix GeneChip® є комерційно доступною системою на основі мікроматриць, яка містить мікроматриці, виготовлені прямим синтезом олігонуклеотидів на поверхні скла. Мікроматриці зондів/генів: олігонуклеотиди («олігомери»), звичайно 25-мери, синтезують безпосередньо на скляній підкладці, поєднуючи основу на напівпровідниках фотолітографію і методику твердофазного хімічного синтезу. Кожна матриця містить до 400000 різних олігонуклеотидів, і кожний олігонуклеотид присутній в мільйонах копій. Олігонуклеотидні зонди синтезують у відомих положеннях на матриці, картини гібридизації і інтенсивність сигналів можуть бути інтерпретовані з одержанням даних по ідентифікації генів і відносних рівнів експресії з використанням комп'ютерної програми для аналізу набору мікроматриць Affymetrix. Кожний ген представлений на матриці серією різних олігонуклеотидних зондів. Кожна пара зондів складається з точно співпадаючого олігонуклеотиду і неточно співпадаючого олігонуклеотиду. Точно співпадаючий зонд має послідовність, повністю комплементарну конкретному гену і, отже, дозволяє вимірювати експресію гена. Неточно співпадаючий зонд відрізняється від точно співпадаючого зонда заміною однієї основи в центральному положенні основи, що порушує зв'язування транскрипту гена-мішені. Це допомагає визначити фонову і неспецифічну гібридизацію, яка додає внесок в сигнал, виміряний для точно співпадаючого олігонуклеотиду. Комп'ютерна програма для аналізу набору мікроматриць віднімає інтенсивність гібридизації неточно співпадаючих зондів з інтенсивності гібридизації для точно співпадаючих зондів, щоб визначити абсолютне або специфічне значення інтенсивності для кожного набору зондів. Зонди вибирають на основі наявної на цей час інформації з GenBank і інших репозитаріїв нуклеотидів. Вважають, що послідовності упізнають унікальні області на 3'-

кінці гена. Використовують піч для гібридизації GeneChip (піч типу «рашпера з рожном») для здійснення гібридизації аж до 64 матриць одночасно. Струминний пристрій здійснює промивання і фарбування матриць зондів. Він повністю автоматизований і містить чотири модулі, при цьому кожний модуль утримує одну матрицю зондів. Кожний модуль регулюється

5 незалежно комп'ютерною програмою для аналізу набору мікроматриць з використанням попередньо запрограмованих протоколів для струминного пристрою. Сканером є конфокальний лазерний флуоресцентний сканер, який вимірює інтенсивність флуоресценції, що випромінюється міченою кРНК, зв'язаною з матрицями зондів. Комп'ютерна робоча станція за допомогою комп'ютерної програми для набору мікроматриць регулює роботу струминної

10 станції і сканера. Комп'ютерна програма для набору мікроматриць може контролювати до восьми струминних станцій на основі використання попередньо запрограмованих протоколів гібридизації, промивання і фарбування для матриці зондів. Комп'ютерна програма також збирає і перетворює дані про інтенсивність гібридизації у виклик присутність/відсутність для кожного гена з використанням відповідних алгоритмів. Нарешті, комп'ютерна програма виявляє зміни в експресії генів в різних експериментах за допомогою порівняльного аналізу і форматує вихідні дані в текстові файли, які можуть бути використані з іншими комп'ютерними програмами для подальших аналізів даних.

У деяких варіантах виявляють делецію гена Notch1, мутацію гена або ампліфікацію гена. Делецію гена, мутацію або ампліфікацію гена можна виміряти, використовуючи будь-який з

20 широкої множини протоколів, відомих в даній галузі, наприклад, використовуючи звичайний Саузерн-блотинг, Нозерн-блотинг, щоб кількісно визначити транскрипцію мРНК (Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 5201-5205 (1980)), дот-блотинг (аналіз ДНК) або гібридизацію in situ (наприклад, флуоресцентну гібридизацію in situ («FISH»)), використовуючи відповідний мічений зонд, цитогенетичні способи або порівняльну геномну гібридизацію (CGH), використовуючи відповідний мічений зонд. Крім того, вказані способи можна використовувати для виявлення делеції гена, мутації гена або ампліфікації гена ліганду Notch1. У використовуваному в даному описі значенні вираз «виявлення експресії Notch1» охоплює виявлення делеції гена, мутації гена або ампліфікації гена Notch1.

Крім того, можна дослідити статус метилування гена Notch1 в зразку тканини або клітин. Аномальне деметилування і/або гіперметилування острівців CpG в 5'-регуляторних областях гена часто виникає в іморталізованих і трансформованих клітинах і може приводити до зміненої експресії різних генів. У даній галузі добре відома множина аналізів для дослідження статусу метилування гена. Наприклад, в способах на основі Саузерн-гібридизації можна використовувати чутливі до метилування ферменти рестрикції, які не можуть розщеплювати

35 послідовності, які містять метильовані ділянки CpG, щоб оцінити статус метилування острівців CpG. Крім того, в MSP (специфічній для метилування ПЛР) можна швидко одержати профіль статусу метилування всіх ділянок CpG, присутніх в острівці CpG даного гена. Вказаний спосіб полягає в початковій модифікації ДНК бісульфітом натрію (який буде перетворювати всі неметильовані цитозини в урацил) з подальшою ампліфікацією з використанням праймерів, специфічних для метильованої ДНК в порівнянні з неметильованою ДНК. Протоколи, в які включений вплив на метилування, також можна знайти, наприклад, в Current Protocols In Molecular Biology, Unit 12, Frederick M. Ausubel et al. eds., 1995; De Marzo et al., Am. J. Pathol. 155(6): 1985-1992 (1999); Brooks et al., Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 7: 531-536 (1998); i Lethe et al., Int. J. Cancer 76(6): 903-908 (1998). У використовуваному в даному описі значенні вираз «виявлення експресії Notch1» охоплює визначення метилування гена Notch1.

Вироби

У іншому аспекті винаходу пропонується виріб, що містить речовини, застосовні для лікування, профілактики і/або діагностики порушень, описаних вище. Виріб містить місткість і етикетку або вкладиш в упаковку на місткості або прикріплену до місткості. Придатні місткості включають, наприклад, пляшки, флакони, шприци і т. д. Місткості можуть бути зроблені з множини матеріалів, таких як скло або пластмаса. У місткості знаходиться композиція, яка, як така або в поєднанні з іншою композицією(ями), є ефективною для лікування, профілактики і/або діагностики стану, і місткість може мати стерильний вхідний отвір (наприклад, місткість може являти собою мішок з внутрішньовенним розчином або флакон, що має пробку, проколювану голкою для підшкірної ін'єкції). Щонайменше одним активним засобом в композиції є антитіло згідно з винаходом. Ярлик або вкладиш в упаковку вказує, що композиція застосовна для лікування вибраного стану, такого як злоякісна пухлина. Крім того, виріб може містити (а) першу місткість з композицією, що знаходиться в ній, при цьому композиція містить антитіло згідно з винаходом; і (б) другу місткість з композицією, що знаходиться в ній, при

60 цьому композиція містить додатковий цитотоксичний засіб. Виріб в такому варіанті здійснення

винаходу може додатково містити вкладиш в упаковку, на якому указано, що першу і другу композиції антитіл можна застосовувати для лікування конкретного стану, наприклад, злоякісної пухлини. Альтернативно або додатково, виріб може додатково включати другу (або третю) місткість, що містить фармацевтично прийнятний буфер, такий як бактеріостатична вода для ін'єкцій (BWF), фосфатно-сольовий буфер, розчин Рінгера і розчин декстрози. Виріб може додатково містити інші матеріали, бажані з комерційної точки зору і точки зору користувача, включаючи інші буфери, розріджувачі, наповнювачі, голки і шприци.

Нижче наведені приклади способів і композицій згідно з винаходом. Зрозуміло, що на практиці можуть бути здійснені різні інші варіанти на основі загального опису, наведеного вище.

ПРИКЛАДИ

Приклад 1: Створення імуногена для одержання анти-NRR Notch1-антитіл
hNRR Notch1

Імуноген, що містить NRR Notch1 людини (hNRR Notch1), одержували таким чином.

Субклонування для експресії

Використовуючи повнорозмірний клон Notch1 людини (номер доступу в GenBank NM_017617) як еталонну послідовність і матрицю, конструювали набір з 4 ПЛР-праймерів, щоб ампліфікувати область Notch1, що охоплює ділянку від амінокислоти V1307 до Q1733 послідовності SEQ ID NO: 56. Вказана область включає в себе EGF-повтори 34-36 і кінці безпосередньо перед трансмембранним доменом. Конструювали 5'-праймери, щоб додати N-кінцеву Flag-мітку безпосередньо перед специфічною послідовністю гена. Продукт ПЛР, відповідний даному домену, клонували у векторі B9.1 для секретованої експресії з клітин комарів Sf-9, використовуючи спосіб незалежного від рестрикції клонування (RIC). Коротко, праймери містили 5'-подовження, необхідні для додавання частин сайтів рестрикції BamHI і EcoRI до двох незалежних продуктів ПЛР, одержаних з використанням полімерази Pfu (Stratagene). Денатурація і повторний відпал вказаних продуктів ПЛР давали популяцію ДНК, в якій 25% продуктів містили відповідні нуклеотиди, що забезпечують виступаючі BamHI- і EcoRI-кінці на їх 5'- і 3'-кінцях, відповідно. Потім одержану суміш ДНК лігували у вектор B9.1, підготовлений за допомогою рестрикційного розщеплення ферментами BamHI і EcoRI. Одержану конструкцію перевіряли відносно послідовності ДНК і назвали 696.G40.V2.Notch1.V1307-Q1733(N-Flag).B9. Вектор B9.1 є модифікованим варіантом бакуловірусного вектора для перенесення ДНК рACGP67 (BD Pharmingen), який містить сигнал секреції Gp 67 перед сайтом клонування BamHI, С-кінцевий сайт розщеплення тромбіну і His-мітку.

Послідовності, які стосуються клонування конструкції Notch1 людини, показані нижче:

Праймери ПЛР:

Праймери ПЛР:

Прямий:

[Phosp]gatccGATTACAAAGATGACGATGACAAAggctctggtGTCATCAATGGCTGCAAAGGCAAG

(SEQ ID NO:48)

Зворотний: cCTGCGCCGGCGGGGGCGGCTCCACG (SEQ ID NO:49)

Прямий: cGATTACAAAGATGACGATGACAAAggctctggtGTCATCAATGGCTGCAAAGGCAAG

(SEQ ID NO:50)

Зворотний: [phosp]aatcCTGCGCCGGCGGGGGCGGCTCCACG (SEQ ID NO:51)

Великими буквами вказані специфічні послідовності гена Notch1; малими

Великими буквами вказані специфічні послідовності гена Notch1; малими буквами вказані додані сайти; Flag-мітка підкреслена.

Послідовність ДНК експресованого білка:

atgtactagtaaatcagtcacaccaaggcttcaataaggaacacacaagcaagatggta
 agcgctattgtttatatgtgcttttggcgggcgggcgcgattctgcctttggcggggat
 ctggatccgattacaaagatgacgatgacaagggtctgtgtGTCATCAATGGCTGCAAA
 GGCAAGCCCTGCAAGAATGGGGGCACCTGCGCCGTGGCCTCCAACACCGCCCCGCGGGTTC
 ATCTGCAAGTGCCCTGCGGGCTTCGAGGGCGCCACGTGTGAGAATGACGCTCGTACCTGC
 GGCAGCTGCGCTGCCTCAACGGCGGCACATGCATCTCCGGCCCCGCGCAGCCCCACCTGC
 CTGTGCCTGGGCCCCCTTACGGGCCCCGAATGCCAGTTCCCGGCCAGCAGCCCCCTGCCTG
 GGCGGCAACCCCTGCTACAACCAGGGGACCTGTGAGCCACATCCGAGAGCCCCCTTCTAC
 CGTTGCCTGTGCCCCGCCAAATTCAACGGGCTCTTGTGCCACATCCTGGACTACAGCTTC
 GGGGGTGGGGCCGGGCGCGACATCCCCCGCCGCTGATCGAGGAGGCGTGCAGCTGCCC
 GAGTGCCAGGAGGACGCGGGAACAAGGTCTGCAGCCTGCAGTGCAACAACACGCGTGC
 GGCTGGGACGGCGGTGACTGCTCCCTCAACTTCAATGACCCCTGGAAGAACTGCACGCAG
 TCTCTGCAGTGCTGGAAGTACTTCAGTGACGGCCACTGTGACAGCCAGTGCAACTCAGCC
 GGCTGCCTCTTCGACGGCTTTGACTGCCAGCGTGCAGGAAGGCCAGTGCAACCCCTGTAC
 GACCAGTACTGCAAGGACCACTTCAGCGACGGGCACTGCGACCAGGGCTGCAACAGCGCG
 GAGTGCGAGTGGGACGGGCTGGACTGTGCGGAGCATGTACCCGAGAGGCTGGCGGCCGGC
 ACGCTGGTGGTGGTGGTGTGATGCCGCCGGAGCAGCTGCGCAACAGCTCCTTCCACTTC
 CTGCGGGAGCTCAGCCGCGTGCTGCACACCAACGTGGTCTTCAAGCGTGACGCACACGGC
 CAGCAGATGATCTTCCCTACTACGGCCGCGAGGAGGAGCTGCGCAAGCACCCCATCAAG
 CGTGCCGCCGAGGGCTGGGCCGCACCTGACGCCCTGCTGGGCCAGGTGAAGGCCTCGCTG
 CTCCCTGGTGGCAGCGAGGGTGGGCGGCGGCGAGGGAGCTGGACCCCATGGACGTCCGC
 GGCTCCATCGTCTACCTGGAGATTGACAACCGGCAGTGTGTGAGGCCTCCTCGCAGTGC
 TTCCAGAGTGCCACCGACGTGGCCGCATTCTGGGAGCGCTCGCCTCGTGGGCAGCCTC
 AACATCCCCTACAAGATCGAGGCCGTGCAGAGTGAGACCGTGGAGCCGCCCCCGCCGGCG
 CAGgaattcgggtctggttcgctggcagcggtcatcaccatcaccatcac (SEQ ID NO:55)

Послідовність експресованого білка:

5

mllnqshqgfnkehtskmvsaiivlyvllaaaahsaafadlgsdykdddkgsgVINGCKGKPKNGGTCAVASNTARGFI
 CKCPAGFEGATCENDARTCGSLRCLNNGTICISGPRSTCLCLGPFTGPECQFPASSPCLGGNPCY
 NQGTCEPTSESPFYRCLCPAKFNGLLCHILDYSFGGGAGRDIPPLIEEACELPECQEDAGNKVCS
 LQCNNHACGWDGGDCSLNFDNPWKNTQSLQCWKYFSDGHCDSDQNSAGCLFDGFDQRAE
 GQCNPLYDQYCKDHFSDGHCDQGCNSAECEWDGLDCAEHVPERLAAGTLVVVVLMPPEQLRN
 SSFHFRLRELSRVLHTNVVFKRDAHGQQMIFPYYGREEELRKHPIKRAAEGWAAPDALLGQVKA
 SLLPGGSEGRRRRELDPMVRSIVYLEIDNRQCVQASSQCFQSATDVA AFLGALASLGLSLNIP
 YKIEAVQSETVEPPPPAQefglvprgsgghhhhh (SEQ ID NO:13)

Великими буквами вказані специфічні послідовності гена Notch1; і малими буквами вказаний сигнал секреції Grp77, N-кінцева Flag-мітка, сайт тромбіну, C-кінцева Flag-мітка і залишки, що додаються експресуючим вектором.

Створення штамів бакуловірусів і одержання білка

Конструкцію, кодує амінокислоти V1307-Q1733 Notch1 людини, експресували в клітинах Sf-9. Штами бакуловірусів одержували, використовуючи вектори для перенесення ДНК [101V-1]: 696. G40.V2.Notch1.V1307-Q1733(N-Flag).B9.1 (дивись розділ «Субклонування для експресії»). ДНК вектора для перенесення котрансфекували в прикріплені клітини комарів Sf-9, що культивуються в середовищі, яке не містить білка ESF921 (Expression Systems LLC,

Woodland Calif.) при 27°C, разом з лінеаризованою вірусною ДНК BacPak6™ (BD Clontech, Palo Alto Calif.) і Bacfectin™ (BD Clontech) згідно з рекомендаціями виробника. Одержану вихідну культуру вірусу Р1 двічі ампліфікували з одержанням вірусної культури Р3, використовуюваної для великомасштабного одержання білка. Клітини Sf-9, культивовані в суспензії в середовищі ESF921, інфікували при густині клітин $1-2 \times 10^6$ клітин/мл, використовуючи зразкову множинність інфекції (MOI) 0,3 вірусних частинок на клітину, і збирали через 3-5 днів після інфекції. Клітини Sf-9 видаляли центрифугуванням, одержану вихідну культуру вірусу фільтрували, щоб забезпечити стерильність, і додавали 3% інактивовану нагріванням фетальну бичачу сироватку (FBS) для стабільності вірусу. Всі вихідні вірусні культури зберігали при 4°C. Показано, що вихідна культура вірусів, що містить конструкцію [101V-1]: 696. G40.V2.Notch1.V1307-Q1733(N-Flag).B9.1, ефективно інфікує клітини Sf-9 і експресує рекомбінантний білок.

Конструкцію [10V-1]: 696. G40.V2.Notch1.V1307-Q1733(N-Flag).B9.1 експресували в 2 циклах ферментації в масштабі 11 і 16 літрів. Клітини Sf-9, адаптовані для росту в суспензії в середовищі, яке не містить білка, використовували для циклів ферментації. Клітини інокулювали при густині $\sim 2 \times 10^6$ клітин/мл з біореактора для засівного матеріалу, в якому використовували такі ж умови, як і в посудині для продукування. Ферментації здійснювали при 27°C в середовищі ESF921 і контролювали рівень розчиненого кисню на рівні 50% насичення повітря, використовуючи барботування киснем за необхідності і безперервну аерацію вільного простору. Біореактори працювали в умовах струшування при 100 об./хв. з використанням 2 похилих лопатей або однієї плоскої лопаті, залежно від використовуваної посудини. Клітини росли до точки інфекції, густини $2,0-2,7 \times 10^6$ клітин/мл, протягом періоду часу, що становить 24-48 годин, і потім їх інфікували при MOI 0,5 вірусних частинок/клітину вірусним штамом, що кодує поліпептид Notch1. Здійснювали спостереження за клітинами відносно ознак інфекції (зупинення росту, збільшення діаметра клітин), і клітини вирощували ще протягом 65-72 годин. Одержані середовища охолоджували, збирали центрифугуванням і негайно піддавали очищенню білка.

Очищення імуногена, що містить hNRR Notch1

Надосадове середовище з клітин SF9, експресуючих поліпептид, що кодується конструкцією 696.G40.V2.Notch1.V1307-Q1733(N-Flag).B9.1, розбавляли (об./об.=1:4) охолодженим на льоду буфером А (50 мМ Hepes, pH 7,5, 150 мМ NaCl, 5 мМ CaCl₂ і 0,5 мМ фенолметансульфонілфторид) і зв'язували партію протягом 15-20 хвилин із попередньо зрівноваженою смолою Ni-NTA Superflow (Qiagen, Product № 30450) у співвідношенні 2 мл смоли на літр середовища. Афінну Ni-NTA-смолу збирали фільтруванням через фільтр з діаметром пор 0,8 мкм (Nalgene, продукт № 450-0080) і потім смолою набивали придатну колонку, в яку рідина поступає самопливом (діаметр:висота 1:10). Колонку промивали 10 об'ємами колонки (CV) охолодженого на льоду буфера В (50 мМ Hepes, pH 7,5, 1000 мМ NaCl, 5 мМ CaCl₂ і 10 мМ імідазол), потім 10 CV буфера А без PMSF. Потім колонку елюювали 5 CV буфера А, що містить 250 мМ імідазолу (без PMSF). Елюйований білок концентрували, використовуючи концентруючий пристрій Amicon Ultra (межа відсікання по молекулярній масі 3000), і буфер замінювали на буфер для зберігання (10 мМ Hepes pH 7,5, 150 мМ NaCl і 5 мМ CaCl₂), використовуючи колонки PD-10 (GE Healthcare) згідно з рекомендаціями виробника. Чистота білка становила >90% згідно з оцінкою в SDS-ПААГ з фарбуванням Кумасі. Концентрацію очищеного білка оцінювали в аналізі за Бредфордом (набір Кумасі плюс, Pierce, № в каталозі 23236), використовуючи БСА як стандарт. Секвенування пептидів з використанням мас-спектрометрії продуктів розщеплення білка трипсином використовували для підтвердження природи одержаного білка.

mNRR Notch1

Імуноген, що містить NRR Notch1 миші (mNRR Notch1), одержували таким чином.

Послідовність, що охоплює амінокислоти V1307-Q1723 Notch1 миші (SEQ ID NO: 57), субклонували і експресували, загалом, як описано вище для імуногена Notch1 людини. Вказана область Notch1 миші включає в себе EGF-повтори 34-36 і кінці безпосередньо перед трансмембранним доменом. Конструкція, експресуюча імуноген, названа 64794.G1.Notch1.V1307-Q1723(N-Flag,C-His).pRK5-GNE. Амінокислотна послідовність експресованого імуногенного білка, використовуваного для одержання антитіл проти NRR Notch1 миші, показана нижче і містить N-кінцеву FLAG-мітку і C-кінцеву His-мітку:

MGGTAARLGA VILFVVIVGL HGVRGKDYKD DDDKLEIVING
 CRGKPKCKNGG VCAVASNTAR GFICRCPAGF EGATCENDAR
 TCGSLRCLNG GTCISGPRSP TCLCLGSFTG PECQFPASSP
 CVGSNPCYNQ GTCEPTSENF FYRCLCPAKF NGLLCHILDY
 SFTGGAGARDI PPPQIEEACE LPECQVDAGN KVCNLQCNNH
 ACGWDGGDCS LNFNDPWKNC TQSLQCWKYF SDGHCDSDQCN
 SAGCLFDGFD CQLTEGQCNP LYDQYCKDHF SDGHCDQGCN
 SAECEWDGLD CAEHVPERLA AGTLVLVLL PPDQLRNNSF
 HFLRELSHVL HTNVVFKRDA QGQQMIFPYY GHEELRKHP
 IKRSTVGWAT SSLLPGTSGG RQRRELDPM D IRGSIVYLEI
 DNRQCVQSSS QCFQSATDVA AFLGALASLG SLNIPYKIEA
 VKSEPVEPPL PSQSGSHHHH HH (SEQ ID NO:14)

N-кінець вказаної вище послідовності (амінокислоти MGGTAARLGA VILFVVIVGL HGVRG послідовності SEQ ID NO: 14) відщеплюється клітинами, експресуючими білок. Як такий імуноген, використовуваний для одержання антитіл, специфічних для NRR Notch1 миші, не містив такої N-кінцевої послідовності.

Одержання білка

Конструкцію, що кодує амінокислоти V1307-Q1723 Notch1 миші, тимчасово експресували в клітинах Freestyle 293-F, які були адаптовані до культивування в суспензії в середовищі без сироватки (клітини FreeStyle 293-F, Invitrogen, № в каталозі R790-07).

Клітини культивували в середовищі для експресії GIBCO® FreeStyle 293 (Invitrogen, № в каталозі 12338-018). Клітини підтримували при густині $0,3-3 \times 10^6$ життєздатних клітин/мл у струшуваний колбі, інкубуючи при 37°C у вологій атмосфері з 8% CO₂ на платформі орбітального струшуючого пристрою при 125 об./хв. За день до трансфекції клітини висівали при густині 5×10^5 життєздатних клітин/мл. У день трансфекції перевіряли життєздатність і густину клітин (>90% і 1×10^6 клітин/мл). Для кожної трансфекції комплекс ліпід-ДНК одержували наступним чином: у випадку 500 мл клітин з густиною 1×10^6 клітин/мл 500 мкг плазмідної ДНК повільно додавали до 40 мл Opti-MEM® I (Invitrogen, № в каталозі 51985-034), 500 мкл розчину поліетиленіміну в концентрації 1,5 мкг/мл (поліетиленімін PEI, лінійний, М.м. 25000, № в каталозі Polysciences 9002-98-6). Суміш обережно перемішували і інкубували протягом 20-30 хвилин при кімнатній температурі, щоб забезпечити утворення ДНК-ліпідного комплексу. Потім ДНК-ліпідний комплекс повільно додавали до клітин і інкубували протягом 3 діб до збирання середовища.

Конструкцію mNotch1 експресували в двох об'ємах по 1 літру. Клітини трансфекували при густині $0,9-1 \times 10^6$ клітин/мл, середовище збирали через 65-75 годин, коли густина клітин становила $2,2-2,5 \times 10^6$ клітин/мл і життєздатність - 75-78%.

Одержане середовище охолоджували, збирали центрифугуванням і негайно використовували для очищення поліпептиду Notch1 миші, що містить NRR.

Очищення імуногена, що містить mNRR Notch1

Імуноген очищали з середовища, в яке він був секретований клітинами HEK 293, партіями, використовуючи анти-FLAG-M2-агарозу (Sigma-Aldrich, № продукту A2220). Анти-FLAG-M2-агарозу в буфері В (50 мМ HEPES, pH 7,5, 150 мМ NaCl, 5 мМ CaCl₂) додавали в середовище з секретованим продуктом, яке містить повну суміш інгібіторів протеаз без EDTA (20 таблеток на літр середовища, Roche), у співвідношенні 5 мл агарози на літр середовища. Потім середовище інкубували при 4°C при постійному обертанні протягом 3 годин. Анти-FLAG-агарозу збирали фільтруванням через 0,8 мкм фільтр (Nalgene, № продукту 450-0080) і набивали колонку, в яку рідина поступає самопливом (BioRad, № продукту 731-0003). Агарозу промивали 10 об'ємами колонки буфера В і потім елюювали білок 4 об'ємами колонки розчину пептиду FLAG в концентрації 0,1 мг/мл (Sigma-Aldrich, № продукту F3290) в буфері В. Елюйований поліпептид Notch1 миші концентрували в концентруючому пристрої Amicon Ultra (межа відсікання по молекулярній масі 10000, Millipore, № продукту UFC 901096), і буфер замінювали буфером для зберігання (10 мМ HEPES, pH 7,5, 150 мМ NaCl, 5 мМ CaCl₂, 5% гліцерин), використовуючи колонки PD-10 (GE Healthsciences, № продукту 17-0851-01). Чистота становила >92% за оцінкою за допомогою оберненофазової ВЕРХ. Концентрацію визначали в аналізі за Бредфордом (набір Кумасі плюс, Pierce, № продукту 23236), використовуючи БСА як

стандарт. Ідентифікацію білка підтверджували секвенуванням пептидів з продукту розщеплення білка трипсином, використовуючи мас-спектрометрію.

Приклад 2

Одержання анти-NRR Notch1-антитіл

5 Анти-NRR Notch1-антитіла одержували таким чином.

Сортування і скринінг бібліотеки для ідентифікації анти-NRR Notch1-антитіл

Імуногенний білок NRR Notch1 людини (який описаний вище) використовували як антиген.

96-ямкові імунологічні планшети Nunc Maxisorp покривали протягом ночі при 4°C антигеном-мішенню (10 мкг/мл) і блокували протягом 1 години при кімнатній температурі блокувальним буфером для фага PBST (фосфатно-сольовий буфер (PBS), 1% (мас./об.) бичачий сироватковий альбумін (БСА) і 0,05% (об./об.) твін-20). Фагові бібліотеки антитіл, що представляють Fab-фрагменти (дивись, наприклад, Lee et al., J. Immunol. Meth. 284: 119-132, 2004), додавали в планшети з антигеном і інкубували протягом ночі при кімнатній температурі. На наступний день покриті антигеном планшети промивали десять разів PBT (PBS з 0,05% твіном-20), і зв'язаний фаг елюювали 50 mM HCl і 500 mM NaCl протягом 30 хвилин і нейтралізували рівним об'ємом 1 M основи тріс (pH 7,5). Витягнутий фаг ампліфікували в клітинах E. coli XL-1 Blue. Під час подальших раундів селекції інкубацію фага, несучого антитіло, в покритих антигеном планшетах зменшували до 2-3 годин, а жорсткість промивання планшетів поступово збільшували.

20 Після 4 раундів пенінгу спостерігали значне збагачення. Відбирали 190 клонів, щоб визначити, чи зв'язуються вони специфічно з NRR Notch1 людини, і варіабельні області всіх 190 клонів секвенували в ПЛР, щоб ідентифікувати клони з унікальними послідовностями.

25 Щоб ідентифікувати фагові антитіла, які зв'язують NRR Notch1 і людини, і миші, всі унікальні клони тестували відносно зв'язування з Notch1 людини і миші в ELISA. Афінності фагових антитіл ранжували, використовуючи конкурентний ELISA в одній точці, який описаний нижче в даному прикладі. Додатково визначали значення IC50 фагових антитіл, використовуючи аналіз ELISA конкурентного зв'язування фага, по суті як описано в Lee, C. V., et al. (2004) J. Mol. Biol. 340, 1073-93. Коротко, 96-ямкові імунологічні планшети NUNC Maxisorp покривали протягом ночі при 4°C 1 мкг/мл NRR1 людини або NRR1 миші і блокували протягом 1 години при кімнатній температурі блокувальним буфером PBST (PBS і 1% БСА і 0,05% твін-20). Фаг змішували з серійним розведенням NRR1 людини або миші при кімнатній температурі протягом 1 години перед додаванням суміші в планшет, покритий NRR1 людини і миші. Зв'язаний фаг виявляли з використанням кон'югатів анти-M13-HRP, обробляли субстрат TMB протягом приблизно 5 хвилин, гасили 1 M H₃PO₄ і реєстрували спектрофотометрично при 450 нм. Підгонку кривих конкуренції здійснювали з використанням програми підгонки кривих нелінійної регресії по чотирьох параметрах (Kaleidagraph, комп'ютерна програма Synergy), щоб визначити значення IC50, які обчислювали у вигляді концентрації антигену на стадії зв'язування в розчині, яка інгібувала на 50% зв'язування антитіла в фаговом дисплеї з іммобілізованим антигеном.

40 Антитіла A, B і C перетворювали в IgG за допомогою клонування областей VL і VH окремих клонів у векторах LPG3 і LPG4, відповідно, тимчасової експресії в клітинах ссавців CHO і очищення на колонці з білком A. Такі клони тестували відносно перехресної взаємодії з одним або декількома антигенами: NRR Notch2, NRR Notch3 і NRR Notch4 людини і миші, і відносно блокувальної активності, використовуючи аналіз на основі спільного культивування, описаний в прикладі 5. Результати такої характеристики показані в таблиці 3.

45

Таблиця 3

Характеристика анти-NRR Notch1-IgG

Анти-NRR Notch1-антитіло	Зв'язують NRR1 людини/миші	Зв'язують NRR2 людини/миші	Зв'язують NRR3 людини/миші	Зв'язують NRR4 людини/миші	Блокування при спільному культивуванні
Антитіло B	Так	Ні	ND	ND	Слабке
Антитіло A	Так	Ні	Ні	Ні	Сильне *
Антитіло C	Так	Ні	ND	ND	Слабке

* IC50 ~100 нг/мл

ND = не визначали

Конструювання бібліотек для підвищення афінності клонів, одержаних з бібліотеки VH

Антитіло А було відібране для підвищення афінності. Фагміда pW0703 (одержана з фагміди pV0350-2b (Lee et al., J. Mol. Biol. 340, 1073-1093 (2004)), яка містить стоп-кодон (TAA) у всіх положеннях CDR-L3 і представляє моновалентний Fab на поверхні бактеріофага M13) служила як матриця бібліотеки для здійснення щеплення варіабельних доменів важкого ланцюга (VH) клонів, що представляють інтерес, з бібліотеки VH для дозрівання афінності. Для дозрівання афінності використовували методики як жорсткої, так і м'якої рандомізації. У випадку жорсткої рандомізації одну бібліотеку легких ланцюгів з вибраними положеннями трьох CDR легкого ланцюга рандомізували, використовуючи амінокислоти, сконструйовані для імітації природних антитіл людини, і розрахована виродженість ДНК була такою, як описано в Lee et al. (J. Mol. Biol. 340, 1073-1093 (2004)). У випадку м'якої рандомізації мішенями були залишки в положеннях 91-94 і 96 CDR-L3, 28-31 і 34-35 CDR-H1, 50, 52 і 53-58 CDR-H2, 95-99 і 100A CDR-H3; і для рандомізації відібрали два різних поєднання петель CDR, L3/H1/H2 і L3/H3. Для досягнення умов м'якої рандомізації, яка вводила мутації з частотою приблизно 50% у вибраних положеннях, синтезували мутагенну ДНК з використанням суміші основ 70-10-10-10, віддаючи перевагу нуклеотидам дикого типу (Gallop et al., Journal of Medicinal Chemistry 37: 1233-1251 (1994)).

Методика сортування фагів для досягнення підвищення афінності

У випадку селекції відносно підвищення афінності фагові бібліотеки піддавали сортуванню на планшетах в ході першого раунду з подальшими трьома раундами сортування в розчині. У першому раунді сортування на планшетах три бібліотеки окремо піддавали сортуванню, використовуючи покритий мішенню (NRR Notch1 людини-ECD) планшет (планшет NUNC Maxisorp), при цьому вводили приблизно 3 O.D./мл фага в 1% BCA і 0,05% твін-20 на 2 години при 37°C. Після першого раунду сортування на планшеті здійснювали три-чотири раунди сортування в розчині, щоб підвищити жорсткість селекції. Для сортування в розчині 1 O.D./мл фага, розмноженого в першому раунді сортування на планшеті, інкубували з 20 нМ біотинільованого білка-мішені (концентрація в цьому випадку основана на значенні IC50 для фага батьківського клону) в 100 мкл буфера, який містить 1% Superblock (Pierce Biotechnology) і 0,05% твін-20, протягом 30 хвилин при кімнатній температурі. Потім суміш розбавляли в 10 разів 1% Superblock і вносили по 100 мкл/ямку в покриті нейтравідином ямки (5 мкг/мл) на 15 хвилин при кімнатній температурі і обережному струшуванні для того, щоб біотинільована мішень зв'язала фаг. Ямки десять разів промивали PBS-0,05% твін-20. Щоб визначити фонове зв'язування, вміст контрольних ямок, що містять фаг з мішенями, які не були біотинільовані, вловлювали на планшетах, покритих нейтравідином. Зв'язаний фаг елюювали 0,1н. HCl протягом 20 хвилин, нейтралізували 1/10 об'ємом 1 М тріс, рН 11, титрували і розмножували для наступного раунду. Потім здійснювали два або три раунди селекції в розчині нарівні із застосуванням двох способів підвищення жорсткості селекції. Перший призначений для селекції відносно швидкості асоціації за допомогою зниження концентрації біотинільованого білка-мішені від 2 нМ до 0,1 нМ, і другий призначений для селекції відносно швидкості дисоціації за допомогою додавання надмірних кількостей небіотинільованого білка-мішені (в 100-1000 разів більше), щоб відсіяти при конкуренції слабкі зв'язуючі агенти. Також зменшували введення фага (0,1-0,5 O.D./мл), щоб зменшити фонове зв'язування фага.

Високопродуктивний скринінг афінності в ELISA (конкуренція в одній точці)

Колонії відбирали в третьому і четвертому раундах скринінгу і вирощували протягом ночі при 37°C по 150 мкл/ямку в середовищі 2YT з додаванням 50 мкг/мл карбеніциліну і 1Е10/мл КО7 в 96-ямковому планшеті (Falcon). З того ж планшета відбирали колонію XL-1, інфіковану батьківським фагом, як контроль. 96-ямкові планшети Nunc Maxisorp покривали 100 мкл/ямку білка-мішені (2 мкг/мл) в PBS при 4°C протягом ночі або при кімнатній температурі протягом 2 годин. Планшети блокували 65 мкл 1% BCA протягом 30 хвилин і 40 мкл 1% твін-20 ще протягом 30 хвилин.

Надосад фагів розбавляли 1:10 в буфері для ELISA (твердофазний імуоферментний аналіз) (PBS з 0,5% BCA, 0,05% твін-20) з додаванням або без додавання 10 нМ білка-мішені в загальному об'ємі 100 мкл і інкубували щонайменше 1 годину при кімнатній температурі в планшеті F (NUNC). 75 мкл суміші, що містить або не містить білка-мішені, переносили в розташовані поряд покриті білком-мішенню планшети. Планшет обережно струшували протягом 15 хвилин, щоб забезпечити можливість уловлювання незв'язаного фага з покритим білком-мішенню планшетом. Планшет промивали щонайменше п'ять разів, використовуючи PBS-0,05% твін-20. Зв'язування кількісно оцінювали, додаючи кон'юговане з пероксидазою хрому (HRP) анти-M13-антитіло в буфері для ELISA (1:5000) і інкубуючи протягом 30 хвилин при кімнатній температурі. Планшети промивали PBS-0,05% твін-20 щонайменше п'ять разів. Потім в ямки додавали по 100 мкл/ямку у співвідношенні 1:1 субстрат пероксидази 3,3',5,5'-

тетраметилбензидин (TMB) і розчин В для пероксидази (H_2O_2) (Kirkegaard-Perry Laboratories (Gaithersburg, Md.)) і інкубували протягом 5 хвилин при кімнатній температурі. Реакцію зупиняли додаванням в кожну ямку 100 мкл 1 М фосфорної кислоти (H_3PO_4) і інкубували протягом 5 хвилин при кімнатній температурі. OD (оптичну густину) жовтого забарвлення в кожній ямці визначали, використовуючи стандартний зчитувальний пристрій для планшетів ELISA, при 450 нм. Зниження OD (%) обчислювали, використовуючи наступне рівняння:

$$\text{Зниження OD}_{450 \text{ нм}} (\%) = [(\text{OD}_{450 \text{ нм}} \text{ ямок з конкурентом}) / (\text{OD}_{450 \text{ нм}} \text{ ямки без конкурента})] * 100$$

У порівнянні зі зниженням $OD_{450 \text{ нм}}$ (%) в ямці з батьківським фагом (100%) клони, в яких спостерігали зниження $OD_{450 \text{ нм}}$ (%) менше 50%, відбирали для аналізу послідовностей. Унікальні клони відбирали для одержання фага, щоб визначити афінність зв'язування (IC_{50} фага) в порівнянні з батьківськими клонами (таблиця 4).

Таблиця 4

Характеристика клонів антитіл з дозрілою афінністю

Назва клону	Зміни CDR	IC_{50} фага (нМ)		Блокування при спільному культивуванні
		NRR1 людини	NRR1 миші	
Антитіло А-1	L3/H2	0.8	0.6	+
Антитіло А-2	L3/H2	0.5	0.5	+
Антитіло А-3	L3/H2	0.5	2.5	+

NRR1=NRR Notch1

Приклад 3: Характеристика анти-NRR Notch1-антитіл

Щоб додатково охарактеризувати афінність зв'язування і кінетику зв'язування анти-NRR Notch1-мАт, використовували вимірювання поверхневого плазмонного резонансу (SRP) за допомогою BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, N.J.). Коротко, біосенсорний чип на основі карбоксиметильованого декстрану (CM5, BIAcore Inc.) активували гідрохлоридом N-етил-N'-(3-диметиламінопропіл)карбодііміду (EDC) і N-гідроксисукцинімідом (NHS) згідно з інструкціями виробника. Кроляче антитіло проти Ig людини (Pierce) розбавляли 10 мМ ацетатом натрію, pH 4,8, в концентрації 20 мкг/мл перед ін'єкцією зі швидкістю потоку 5 мкл/хвилину, щоб досягнути приблизно 3000 одиниць сигналу у відповідь (RU) зв'язаного антитіла. Потім ін'єктували 1 М етаноламін, щоб блокувати групи, що не вступили в реакцію. Анти-NRR1-мАт (у формі повнорозмірного IgG) уловлювали кролячим антитілом проти IgG людини, нанесеним у вигляді покриття на чипи з досягненням приблизно 200 одиниць сигналу у відповідь (RU). Для кінетичних вимірювань двократне серійне розведення білків NRR1 людини-ECD або NRR1 миші-ECD (3,9 нМ-500 нМ) ін'єктували в буфері PBS (PBS з 0,05% твін-20) при 25°C зі швидкістю потоку приблизно 30 мкл/хв. Швидкості асоціації (k_{on}) і швидкості дисоціації (k_{off}) обчислювали, використовуючи просту модель зв'язування Ленгмюра «один до одного» (комп'ютерна програма для оцінки BIAcore, версія 3.2). Рівноважну константу дисоціації (K_d) обчислювали у вигляді відношення k_{off}/k_{on} .

Результати даного експерименту показані в таблиці 5. «NA» означає, що вимірювання не проводили.

Афінність зв'язування і кінетика зв'язування анти-NRR Notch1-антитіл з поліпептидами, що містять NRR Notch1 людини і миші Таблиця 5

Анти-NRR Notch1-антитіло	NRR Notch1 миші			NRR Notch1 людини		
	$k_{off}/(1/\text{мсек.})$	$k_{on}/(1/\text{сек.})$	K_d (М)	$k_{off}/(1/\text{мсек.})$	$k_{on}/(1/\text{сек.})$	K_d (М)
Антитіло А	9.10E+04	2.10E-02	2.31E-07	8.20E+04	1.10E-02	1.34E-07
Антитіло А-1	8.50E+04	3.30E-04	3.88E-09	6.70E+04	2.30E-04	3.43E-09
Антитіло А-2	1.10E+05	3.40E-04	3.09E-09	8.70E+04	2.20E-04	2.53E-09
Антитіло А-3	9.20E+04	1.20E-03	1.30E-08	6.80E+04	4.00E-04	5.88E-09

Приклад 4. Характеристика епітопа анти-NRR Notch1-антитіл

Щоб дослідити детермінанту зв'язування антитіл A, A-1 і A-2, проводили експерименти по зв'язуванню з використанням фрагментів Notch1 людини і миші.

У даних експериментах використовували наступні білки:

(1) hFLAG-EGF34+NRR-His6 (101V) - імуноген Notch1 людини, описаний в прикладі 1 вище.

(2) hFLAG-NRR-His6 (102V): містить амінокислоти E1447-Q1733 Notch1 людини, FLAG-мітку, HIS-мітку і сайт розщеплення тромбіном. Частина Notch1 містить послідовності з LNR_A, LNR_B, LNR_C, HD_N, HD_C. Вказаний білок не містить EGF-подібних повторюваних послідовностей.

(3) hFLAG-HD-His6 (103V): містить амінокислоти R1568-Q1733 Notch1 людини, FLAG-мітку, сайт розщеплення тромбіном і HIS-мітку. Білок Notch1 містить послідовності з HD_N і HD_C. Вказаний білок не містить EGF-подібних повторюваних послідовностей і не містить трьох областей LNR.

(4) mFLAG-EGF34+NRR-His6: мишачий імуноген, описаний в прикладі 1, вище.

(5) mEGF34+NRR-L1597H-FLAG-TEV-Fc: містить амінокислоти V1307-Q1723 Notch1 миші з мутацією L1597H, FLAG-мітку, Fc-мітку і сайт протеази TEV. Мутація L1597H приводить до активації Notch1 і описана, наприклад, в Weng et al., Science 306: 269-271, 2004.

(6) FLAG-контроль: контрольний поліпептид, що містить FLAG-мітку.

(7) His-контроль: контрольний поліпептид, що містить His-мітку.

Протокол ELISA:

Білками в концентрації 1 мкг/мл в PBS, pH 7,4, покривали планшети ELISA (Nunc Maxisorp) при 4°C протягом ночі. Планшети блокували казеїновим блокатором в PBS (фосфатно-сольовий буфер; Pierce) протягом однієї години при кімнатній температурі. У планшети додавали 3-кратне серійне розведення анти-NRR Notch1-IgG або нерелевантного IgG в буфері PBST (буфер PBT (PBS + 0,05% (об./об.) твін-20) з 0,5% (мас./об.) БСА) і інкубували протягом однієї години при кімнатній температурі. Потім планшети промивали PBST і зв'язані антитіла виявляли з використанням кон'югованого з пероксидазою антитіла кози проти Fab людини, специфічного для IgG (Sigma). Використовували субстрат TMB (3,3',5,5'-тетраметилбензидин) і реєстрували поглинання при 650 нМ, використовуючи стандартний зчитувальний пристрій для планшетів ELISA. Поглинання відкладали на графіку проти концентрацій IgG, використовуючи KaleidaGraph (комп'ютерна програма Synergy).

Результат даного експерименту показаний на фігурах 12A (антитіло A-hlgG1), 12B (антитіло A-1-hlgG1) і 12C (антитіло A-2-hlgG1). Антитіла A, A-1 і A-2 зв'язували поліпептиди hFLAG-EGF34+NRR+His6 (101V), hFLAG-NRR-His6 (102V), hFLAG-HD-His6 (103V), mFLAG-EGF34+NRR-His6 і не зв'язували контрольні поліпептиди, в яких відсутні послідовності Notch1. Одержані результати свідчать про те, що домен NRR Notch1 є достатнім для зв'язування антитіла A, антитіла A-1 і антитіла A-2. Антитіла A, A-1 і A-2 також зв'язують білок mEGF34+NRR-L1597H-FLAG-TEV-Fc, який містить активуючу Notch1 мутацію L1597H. Одержаний результат свідчить, що антитіла здатні зв'язуватися з мутантним рецептором Notch1.

Приклад 5. Функціональні аналізи анти-NRR Notch1-антитіл

Аналіз репортера Notch1

Аналіз репортера Notch1 (також званий в даному описі «аналізом спільної культури») здійснювали для вимірювання здатності анти-NRR Notch1-антитіл інгібувати передачу сигналів Notch. Коротко, аналіз включав наступні стадії:

(1) клітини NIH-3T3, експресуючі Notch1 людини, трансфекували репортерною плазмідом, що несе ген люциферази, який відповідає на передачу сигналу Notch;

(2) клітини обробляли антитілами або різними контрольними реагентами;

(3) передачу сигналу ініціювали додаванням клітин NIH-3T3, стабільно експресуючих Jagged1 людини; і

(4) рівень передачі сигналів Notch оцінювали, вимірюючи активність люциферази, експресованої з репортерної плазмиди.

Більш детально аналіз здійснювали таким чином:

(1) Клітини NIH-3T3, стабільно експресуючі Notch1 (N1) людини, висівали в 96-ямковий планшет з чорними перегородками з прозорим дном по 5000 клітин на ямку в середовище DMEM з високим вмістом глюкози, яке містить 10% FBS і не містить антибіотиків. Клітини інкубували при 37°C протягом 16 годин в присутності 5% CO₂. Потім середовище замінювали на DMEM без сироватки і клітини трансфекували 100 нг/ямку люциферазної плазмиди TP-1 (промотор CSL, чутливий до активації Notch) (дивись, наприклад, Minoguchi et al., Mol. Cell. Biol.

17: 2679-2687 (1997)) і 5 нг/мл репортера люциферази Renilla pRL-CMV (Promega). Трансфекцію продовжували протягом 6 годин при 37°C, 5% CO₂, при цьому знов додавали сироватку на початку 4 години.

(2) Наприкінці шостої години середовище, яке містить реанти для трансфекції, видаляли аспірацією і додавали 50 мкл DMEM/FBS з наступними компонентами: А. свіже середовище (пізніше, щоб одержати помилкову стимуляцію контрольних батьківських клітин NIH-3T3); В. свіже середовище (DMEM з 10% FBS); С. контрольне антитіло ізо типу IgG людини в концентрації 400 нг/мл; анти-NRR Notch1-антитіло А в чотирьох різних концентраціях (D. 16 нг/мл, E. 80 нг/мл, F. 400 нг/мл, G. 2000 нг/мл); Н. анти-NRR Notch1-антитіло А в концентрації 400 нг/мл, попередньо інкубоване з очищеним білком NRR Notch1 (5 мкг на ямку) протягом 30 хвилин; І. контрольне антитіло ізо типу IgG людини в концентрації 400 нг/мл з білком NRR Notch1, обробленим як описано в пункті Н; J. анти-NRR Notch1-антитіло А в концентрації 400 нг/мл, попередньо інкубоване протягом 30 хвилин зі знов доданим білком БСА (6,5 мкг/ямку); К. сполуку Е (інгібітор гамма-секретази; C₂₇H₂₄F₂N₄O₃; Seiffert et al., J. Biol. Chem. 275: 34086, 2000) в концентрації 1 мкМ; і L. контроль ДМСО (тільки розчинник сполуки Е). Перераховані вище реанти інкубували з трансфектованими клітинами NIH-3T3-Notch1 протягом 1 години при 37°C, 5% CO₂.

5000 клітин NIH-3T3, стабільно експресуючих ліганд Jagged1 людини, додавали в кожен ямку, за винятком J, в якій клітини являли собою клітини батьківської лінії NIH-3T3. Потім планшети інкубували при 37°C, 5% CO₂ протягом 23 годин.

Активність люциферази світляка (TP1) і Renilla (pRL-CMV) вимірювали з використанням набору для визначення люциферази Dual-Glo (Promega). Рівні передачі сигналів Notch обчислювали шляхом ділення даних для світляка на дані для Renilla і за допомогою усереднення даних 8 повторів для кожної умови. Результати показані на фігурі 7, де відрізками показане стандартне відхилення результатів в повторях.

Як показано на фігурі 7, антитіло А є сильним інгібітором Notch1. Антитіло А інгібує передачу сигналів Notch, судячи з вимірювань з використанням репортера TP1-Лус. Показане титрування антитіла; при 400 нг/мл антитіла передача сигналів Notch була інгібована до 18% від контролю, рівня «початку дії» (рівня передачі сигналу, спостережуваного з використанням контролю ізо типу в концентрації 400 нг/мл). Додаткове додавання розчинного білка NRR, але не контрольного БСА, знижувало індуковане антитілом блокування передачі сигналу, показуючи, що інгібування антитілом передачі сигналу було наслідком взаємодії антитіло-NRR Notch1. Сполуку Е, інгібітор гамма-секретази, використовували як контроль, щоб показати інгібування. При заміні Jagged1-експресуючих клітин батьківськими клітинами (тільки NIH-3T3 без Jagged1) як іншим контролем, не вдавалося індукувати повну передачу сигналу, що свідчить про те, що передача сигналу вимагає Jagged1.

Спосіб аналізу при спільному культивуванні, описаний вище, використовували для порівняння антитіла А з його аналогами з дозрілою афінністю антитілом А-1, антитілом А-2 і антитілом А-3, використовуючи обробку при декількох концентраціях. Як виявлено при використанні 80 нг/мл антитіла, антитіло А-2 і антитіло А-3 викликали більш сильне блокування передачі сигналів Notch, ніж антитіло А (фігура 8).

Аналіз диференціювання міобластів C2C12

Міобласти C2C12 миші піддаються диференціюванню в міотрубочки при обробці середовищем для диференціювання. Спільне культивування з клітинами, експресуючими ліганд Jagged1, інгібує диференціювання за допомогою стимулювання передачі сигналів Notch. Як детально описано нижче, згідно зі здатністю антитіла А інгібувати передачу сигналів Notch1 додавання антитіла А відновлювало диференціювання. Інгібітор гамма-секретази, використовуваний як контроль, також відновлював диференціювання.

Зокрема, міобласти C2C12 миші висівали в 24-ямкову чашку для культивування зі стерильним круглим 10 мм покривним склом на дні в концентрації 2,5×10⁴ клітин в мілілітрі, використовуючи 1 мл на ямку. Клітинам давали можливість прикріпитися і рости протягом 22 годин в середовищі для росту (DMEM з 10% FBS) при 37°C, 5% CO₂. Потім середовище для росту аспірували і додавали середовище для диференціювання (DM) (DMEM з 6% сироватки коня). Клітини обробляли: А. тільки одна DM; В. DM з клітинами 3T3-J1; С. DM з NIH-3T3-Jagged1 і антитілом для контролю ізо типу IgG людини; D. DM з клітинами 3T3-J1 і антитілом А в концентрації 200 нг/мл; E. DM з клітинами NIH-3T3-Jagged1 і ДМСО (наповнювач); F. DM з клітинами 3T3-J1 і сполукою Е (інгібітор гамма-секретази) в концентрації 1 мкМ. Клітини інкубували при 37°C, 5% CO₂ у вказаних умовах протягом чотирьох діб. Покривні стекла витягували і клітини фіксували 4% параформальдегідом і робили проникними, обробляючи 0,2% тритоном X-100 в PBS. Потім клітини блокували 10% FBS в PBS. Антитіло, яке упізнає

важкий ланцюг міозину (Millipore, Anti-Myosin HC, асцити клону A4.1025.), і друге антитіло кози проти IgG (H+L) миші, кон'юговане з Alexa® 488 (Molecular Probes), використовували для фарбування диференційованих міотрубочок. DAPI використовували для контрастного фарбування ядер. Для кожної умови відбирали зображення трьох полів. Підгрупа зображень показана на фігурі 10. Комп'ютерну програму Metamorph (Molecular Devices) використовували для підрахунку кількості ядер і площі, забарвленої Alexa® 488. Площу забарвлення Alexa® 488 ділили на кількість ядер, усереднювали і зображали графічно. Відрізки показують стандартне відхилення для трьох повторів зображень. Одержані результати показані на фігурі 9.

Приклад 6. Анти-NRR Notch1-антитіла інгібують передачу сигналу рецепторами Notch1 дикого типу і мутантними рецепторами Notch1

Аналіз спільного культивування з використанням люциферазного репортера здійснювали на клітинах NIH-3T3, тимчасово трансфекованих плазмідами TP-1 і pRL-CMV, що кодують мутантний рецептор Notch1 L1594P, мутантний рецептор Notch1 DelPEST і рецептор Notch1 дикого типу (wt), використовуючи реагент ліпофектамін і ліпофектамін плюс (Invitrogen), і на клітинах NIH-3T3, стабільно експресуючих Jagged-1 людини, по суті, як описано вище. Мутація L1594P означає мутацію від лейцину до проліну в положенні амінокислоти (a/k) 1594 в домені HD-N домен (дивись, наприклад, Weng et al., Science 306: 269-271, 2004). DelPEST означає делецію на карбоксильному кінці домену PEST, починаючи з амінокислоти 2473 (дивись, наприклад, Malecki et al., Mol. Cell. Biol. 26: 4642-4651, 2006). Відповідно до опублікованих результатів результати, показані на фігурі 13, підтверджують, що обидві мутації L1594P і DelPEST активують передачу сигналів Notch1. У порівнянні з негативним контролем з використанням нерелевантного одержаного з фага моноклонального антитіла такого ж ізо типу антитіло А інгібувало передачу сигналу через кожний з трьох рецепторів залежним від дози чином. Інгібітор гамма-секретази сполуку Е (CmpE), розчинену в ДМСО, використовували як позитивний контроль інгібування передачі сигналу Notch. Заштриховані чорні стовпчики показують результати, одержані з використанням контрольного антитіла в концентрації 2000 нг/мл; стовпчики з великими точками показують результати, одержані з використанням антитіла А в концентрації 80 нг/мл; стовпчики з тонкими смужками показують результати, одержані з використанням антитіла А в концентрації 400 нг/мл; стовпчики з товстими смужками показують результати, одержані з використанням антитіла А в концентрації 2000 нг/мл; стовпчики з поперечними штрихами показують результати, одержані з використанням сполуки Е в концентрації 10 мкМ; і стовпчики з дрібними точками показують результати, одержані з використанням ДМСО (носії для сполуки Е). Результати для кожної умови вимірювали у восьми повторях і потім виражали у вигляді середнього значення із зображенням відрізків, які показують стандартне відхилення.

Приклад 7. Анти-NRR Notch1-антитіла порушують васкуляризацію і ангіогенез

Вплив анти-NRR Notch1-антитіл на васкуляризацію і ангіогенез досліджували, використовуючи аналіз проростання клітин HUVEC. Вказаний аналіз схожий з аналізом, описаним в Nakatsu et al. (Microvasc. Res. 66 (2): 102-112, 2003). Клітинами HUVEC покривали кульки Cytodex 3® (Amersham Biosciences, Piscataway, N.J.), які потім імплантували в гель на основі фібрину. Фібробласти шкіри людини висівали на шар гелю з фібрину, який потім покривали середовищем для культивування клітин. Проростання судин з клітин HUVEC досліджували через 4-9 діб. Подібно результатам, спостережуваним у випадку анти-D114-обробки, обробка анти-NRR Notch1-антитілами викликала помітне збільшення проростання і довжини судин, що показано на фігурі 14A. Представлені результати для клітин, оброблених PBS як контролем або антитілом А або А-2, які вказані. Анти-NRR Notch1-обробка порушує васкуляризацію і ангіогенез за рахунок збільшення проростання судин і густини судинної мережі.

Вплив анти-NRR Notch1-антитіл на васкуляризацію і ангіогенез також досліджували, використовуючи аналіз ангіогенезу в кармані рогівки. Як показано в протоколі, підсумованому на фігурі 14B, в рогівки гризунів, які в нормі не мають судин, імплантували гранули VEGF (№ 63, № 132 і № 390), щоб індукувати ангіогенез, або залишали необробленими як негативний контроль (№ 381). Потім дві рогівки обробляли анти-D114 як позитивним контролем для збільшення густини судинної мережі (№ 132) або антитілом А-2 (№ 390). Судини візуалізували, використовуючи методику імунофлуоресцентного фарбування на основі анти-CD31 (червоне забарвлення). Як показано на фігурі 14B, анти-NRR Notch1-обробка значно збільшувала густину судинної мережі. Судини в рогівках, оброблених, як описано вище для фігури 14B, також перфузували FITC-дестраном (зелений), щоб оцінити потік через судини. Перфузія судин, оброблених анти-D114 і анти-NRR Notch1, була обмежена, як показано на фігурі 14C.

Також досліджували вплив анти-NRR Notch1-антитіл в моделі ангиогенезу в сітківці миші. Як
указано в протоколі, підсумованому на фігурі 14D, сітківки мишей P1 (1 день після народження)
або P3 (3 день після народження) обробляли вказаними концентраціями антитіла проти
амброзії як негативним контролем або антитіла A-2. Сітківки збирали на стадії P5 (5 день після
народження). Ізолектин B4 використовували для візуалізації судинної мережі. Відповідно до
результатів, показаних на фігурах 14A-14C, анти-NRR Notch1-обробка збільшувала густину
судинної мережі і створювала фенотип гіперпроростання. Сітківки мишей, оброблені, як
описано вище для фігури 14D, фарбували DAPI, щоб візуалізувати ядерну ДНК. Як показано на
фігурі 14E, анти-NRR Notch1-обробка викликала збільшення кількості ядер, що свідчить про
можливе посилення проліферації.

Приклад 8. Анти-NRR Notch1-антитіла інгібують ріст пухлини *in vivo*

Вплив анти-NRR Notch1-антитіл на ріст пухлини досліджували, використовуючи мишачу
модель *in vivo*. Імунодефіцитних мишей (Balb-C Nu/Nu) використовували в дослідженні
ксенотрансплантата лінією клітин HM7 (аденокарцинома ободової кишки). П'ять мільйонів
клітин імплантували в 0,1 мл Matrigel (BD Biosciences, San Jose, Calif.), який використовували
для підшкірної інюкації мишей. Пухлинам давали можливість рости приблизно до 250-300
кубічних міліметрів, потім мишей групували випадковим чином для створення трьох класів
обробки і починали введення доз, як указано. Обробка антитілом A-2 затримувала ріст
пухлини, як показано на фігурі 15A. Антитіла проти амброзії і проти VEGF служили як
негативний і позитивний контролю, відповідно. У експерименті, подібному експерименту, який
описаний вище при описі фігури 15A, різні дози антитіла A-2 тестували відносно здатності
затримувати або сповільнювати ріст пухлини. Результати показані на фігурі 15B. У
експерименті, подібному експерименту, який описаний вище при описі фігури 15A, за винятком
того, що використовували лінію клітин CALU6 (лінія клітин недрібноклітинного раку легені)
замість лінії клітин HM7, виявлено, що антитіло A-2 зменшує об'єм пухлини, як показано на
фігурі 15C. Разом взяті результати, показані на фігурах 15A-15C, свідчать, що анти-NRR
Notch1-антитіла інгібують ріст пухлини.

У експерименті, подібному експерименту, описаному вище при описі фігури 15B, виявлено,
що антитіло A-2 викликає втрату маси залежним від дози чином, як показано на фігурі 15D. У
експерименті, подібному експерименту, описаному вище при описі фігури 15B, досліджували
кліренс антитіла A-2, вимірюючи концентрацію Fc людини в сироватці оброблених мишей у
вказаних часових точках. Результати показані на фігурі 15E.

Приклад 9. Анти-NRR Notch1-антитіла впливають на проліферацію і диференціювання
клітин кишечнику

Досліджували вплив анти-NRR Notch1-антитіл на клітини в кишковому тракті мишей.
Кишечник виділяли з контрольних (оброблених наповнювачем) і оброблених мишей приблизно
через 10 днів після внесення дози антитіла A-2 кожні три-чотири дні. Зразки фарбували
гематоксиліном і еозином плюс або алціановий блакитний для муцину (блакитний, як маркер
секреторних клітин), або анти-Ki-67 (коричневий; оснований на антитілах спосіб імунохімічного
фарбування) для широко використовуваного білка-маркера проліферації Ki-67. На фігурах 16A і
16B показані приклади крипт і ворсинок тонкого кишечнику або товстого кишечнику, відповідно,
мишей, оброблених контрольним антитілом (наповнювач) або антитілом A-2 у вказаній
концентрації. Результати показують, що анти-NRR Notch1 затримує проліферацію тимчасово
ампліфікуючих клітин і збільшує кількість секреторних клітин, включаючи бокалоподібні клітини
і клітини Панета.

Приклад 10. Анти-NRR Notch1-антитіла і інгібітори гамма-секретази знижують
життєздатність деяких ліній злоякісних клітин

Досліджували вплив анти-NRR Notch1 і інгібіторів гамма-секретази DAPT і «сполуки E»
(CmpE) на панелі ліній злоякісних клітин. Лінії клітин, показані на фігурі 17 (вісь x), вирощували в
присутності або за відсутності антитіла A-2, DAPT, CmpE або ДМСО (контроль, наповнювач для
інгібіторів гамма-секретази) як вказано, і оцінювали життєздатність клітин, використовуючи
аналіз життєздатності клітин на основі люмінесценції CellTiter-Glo™ (Promega, Madison, Wis.). У
даному аналізі визначають кількість життєздатних клітин на основі кількості присутньої АТФ, яка
є показником метаболічно активних клітин. Люмінесценцію оцінюють кількісно у вигляді
«відносних одиниць люмінесценції», як показано на фігурі 17 (вісь y). Як показано на фігурі 17,
MT-3, яка, як повідомлялося, є лінією карциноми молочної залози, і OVCAR-3, лінія злоякісних
клітин яєчника, мали знижені рівні АТФ, що свідчить про знижену проліферацію і/або підвищену
загибель клітин, після інкубації в присутності DAPT, CmpE або анти-NRR Notch1.

Хоч вищезазначений винахід описаний детально з метою ілюстрації і прикладу для більш
ясного розуміння, опис і приклади не треба тлумачити як такі, що обмежують об'єм винаходу.

Список последовательностей

<110> Genentech, Inc. et al.
 <120> Антитіла проти NRR Notch1 і способи їх застосування
 <130> 50474/013W03
 <150> US 60/994,646
 <151> 2007-09-20
 <150> US 60/933,072
 <151> 2007-06-04
 <160> 65
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 10
 <212> БІЛОК
 <213> Штучний

<220>
 <223> Синтетичний
 <400> 1

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Ile His
 1 5 10

<210> 2
 <211> 18
 <212> БІЛОК
 <213> Штучний

<220>
 <223> Синтетичний
 <400> 2

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

Lys Gly

<210> 3
 <211> 18
 <212> БІЛОК
 <213> Штучний

<220>
 <223> Синтетичний
 <400> 3

Ala Arg Ile Asn Pro Pro Asn Gly Ser Ala His Tyr Ala Asp Ser Val
 1 5 10 15

Lys Gly

<210> 4
 <211> 18
 <212> БІЛОК
 <213> Штучний

<220>
 <223> Синтетичний

<400> 4

Ala Arg Ile Asn Pro Pro Asn Arg Ser Asn Gln Tyr Ala Asp Ser Val
 1 5 10 15

Lys Gly

<210> 5
 <211> 18
 <212> БІЛОК
 <213> Штучний

<220>
 <223> Синтетичний

<400> 5

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

Lys Gly

<210> 6
 <211> 12
 <212> БІЛОК
 <213> Штучний

<220>
 <223> Синтетичний

<400> 6

Ala Arg Gly Ser Gly Phe Arg Trp Val Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 7
 <211> 11
 <212> БІЛОК
 <213> Штучний

<220>
 <223> Синтетичний

<400> 7

Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
 1 5 10

<210> 8
 <211> 7
 <212> БІЛОК
 <213> Штучний

<220>
 <223> Синтетичний

<400> 8

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
 1 5

<210> 9
 <211> 9
 <212> БІЛОК
 <213> Штучний

<220>
 <223> Синтетичний

<400> 9

Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr
 1 5

<210> 10
 <211> 9
 <212> БІЛОК
 <213> Штучний

<220>
 <223> Синтетичний

<400> 10

Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Ala Thr
 1 5

<210> 11
 <211> 9
 <212> БІЛОК
 <213> Штучний

<220>
 <223> Синтетичний

<400> 11

Gln Gln Phe Tyr Thr Thr Pro Ser Thr
 1 5

<210> 12
 <211> 9
 <212> БІЛОК
 <213> Штучний

<220>
 <223> Синтетичний

<400> 12

Gln Gln Ser Phe Ser Thr Pro Ala Thr
1 5

<210> 13

<211> 497

<212> BIJIOK

<213> Homo sapiens

<400> 13

Met Leu Leu Val Asn Gln Ser His Gln Gly Phe Asn Lys Glu His Thr
1 5 10 15

Ser Lys Met Val Ser Ala Ile Val Leu Tyr Val Leu Leu Ala Ala Ala
20 25 30

Ala His Ser Ala Phe Ala Ala Asp Leu Gly Ser Asp Tyr Lys Asp Asp
35 40 45

Asp Asp Lys Gly Ser Gly Val Ile Asn Gly Cys Lys Gly Lys Pro Cys
50 55 60

Lys Asn Gly Gly Thr Cys Ala Val Ala Ser Asn Thr Ala Arg Gly Phe
65 70 75 80

Ile Cys Lys Cys Pro Ala Gly Phe Glu Gly Ala Thr Cys Glu Asn Asp
85 90 95

Ala Arg Thr Cys Gly Ser Leu Arg Cys Leu Asn Gly Gly Thr Cys Ile
100 105 110

Ser Gly Pro Arg Ser Pro Thr Cys Leu Cys Leu Gly Pro Phe Thr Gly
115 120 125

Pro Glu Cys Gln Phe Pro Ala Ser Ser Pro Cys Leu Gly Gly Asn Pro
130 135 140

Cys Tyr Asn Gln Gly Thr Cys Glu Pro Thr Ser Glu Ser Pro Phe Tyr
145 150 155 160

Arg Cys Leu Cys Pro Ala Lys Phe Asn Gly Leu Leu Cys His Ile Leu
165 170 175

Asp Tyr Ser Phe Gly Gly Gly Ala Gly Arg Asp Ile Pro Pro Pro Leu
180 185 190

Ile Glu Glu Ala Cys Glu Leu Pro Glu Cys Gln Glu Asp Ala Gly Asn
195 200 205

Lys Val Cys Ser Leu Gln Cys Asn Asn His Ala Cys Gly Trp Asp Gly
 210 215 220
 Gly Asp Cys Ser Leu Asn Phe Asn Asp Pro Trp Lys Asn Cys Thr Gln
 225 230 235 240
 Ser Leu Gln Cys Trp Lys Tyr Phe Ser Asp Gly His Cys Asp Ser Gln
 245 250 255
 Cys Asn Ser Ala Gly Cys Leu Phe Asp Gly Phe Asp Cys Gln Arg Ala
 260 265 270
 Glu Gly Gln Cys Asn Pro Leu Tyr Asp Gln Tyr Cys Lys Asp His Phe
 275 280 285
 Ser Asp Gly His Cys Asp Gln Gly Cys Asn Ser Ala Glu Cys Glu Trp
 290 295 300
 Asp Gly Leu Asp Cys Ala Glu His Val Pro Glu Arg Leu Ala Ala Gly
 305 310 315 320
 Thr Leu Val Val Val Val Leu Met Pro Pro Glu Gln Leu Arg Asn Ser
 325 330 335
 Ser Phe His Phe Leu Arg Glu Leu Ser Arg Val Leu His Thr Asn Val
 340 345 350
 Val Phe Lys Arg Asp Ala His Gly Gln Gln Met Ile Phe Pro Tyr Tyr
 355 360 365
 Gly Arg Glu Glu Glu Leu Arg Lys His Pro Ile Lys Arg Ala Ala Glu
 370 375 380
 Gly Trp Ala Ala Pro Asp Ala Leu Leu Gly Gln Val Lys Ala Ser Leu
 385 390 395 400
 Leu Pro Gly Gly Ser Glu Gly Gly Arg Arg Arg Arg Glu Leu Asp Pro
 405 410 415
 Met Asp Val Arg Gly Ser Ile Val Tyr Leu Glu Ile Asp Asn Arg Gln
 420 425 430
 Cys Val Gln Ala Ser Ser Gln Cys Phe Gln Ser Ala Thr Asp Val Ala
 435 440 445
 Ala Phe Leu Gly Ala Leu Ala Ser Leu Gly Ser Leu Asn Ile Pro Tyr
 450 455 460

Lys Ile Glu Ala Val Gln Ser Glu Thr Val Glu Pro Pro Pro Pro Ala
465 470 475 480

Gln Glu Phe Gly Leu Val Pro Arg Gly Ser Gly His His His His His
485 490 495

His

<210> 14

<211> 462

<212> БІЛОК

<213> Штучний

<220>

<223> Синтетичний

<400> 14

Met Gly Gly Thr Ala Ala Arg Leu Gly Ala Val Ile Leu Phe Val Val
1 5 10 15

Ile Val Gly Leu His Gly Val Arg Gly Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp
20 25 30

Asp Lys Leu Glu Val Ile Asn Gly Cys Arg Gly Lys Pro Cys Lys Asn
35 40 45

Gly Gly Val Cys Ala Val Ala Ser Asn Thr Ala Arg Gly Phe Ile Cys
50 55 60

Arg Cys Pro Ala Gly Phe Glu Gly Ala Thr Cys Glu Asn Asp Ala Arg
65 70 75 80

Thr Cys Gly Ser Leu Arg Cys Leu Asn Gly Gly Thr Cys Ile Ser Gly
85 90 95

Pro Arg Ser Pro Thr Cys Leu Cys Leu Gly Ser Phe Thr Gly Pro Glu
100 105 110

Cys Gln Phe Pro Ala Ser Ser Pro Cys Val Gly Ser Asn Pro Cys Tyr
115 120 125

Asn Gln Gly Thr Cys Glu Pro Thr Ser Glu Asn Pro Phe Tyr Arg Cys
130 135 140

Leu Cys Pro Ala Lys Phe Asn Gly Leu Leu Cys His Ile Leu Asp Tyr
145 150 155 160

Ser Phe Thr Gly Gly Ala Gly Arg Asp Ile Pro Pro Pro Gln Ile Glu
165 170 175

Glu Ala Cys Glu Leu Pro Glu Cys Gln Val Asp Ala Gly Asn Lys Val
 180 185 190
 Cys Asn Leu Gln Cys Asn Asn His Ala Cys Gly Trp Asp Gly Gly Asp
 195 200 205
 Cys Ser Leu Asn Phe Asn Asp Pro Trp Lys Asn Cys Thr Gln Ser Leu
 210 215 220
 Gln Cys Trp Lys Tyr Phe Ser Asp Gly His Cys Asp Ser Gln Cys Asn
 225 230 235 240
 Ser Ala Gly Cys Leu Phe Asp Gly Phe Asp Cys Gln Leu Thr Glu Gly
 245 250 255
 Gln Cys Asn Pro Leu Tyr Asp Gln Tyr Cys Lys Asp His Phe Ser Asp
 260 265 270
 Gly His Cys Asp Gln Gly Cys Asn Ser Ala Glu Cys Glu Trp Asp Gly
 275 280 285
 Leu Asp Cys Ala Glu His Val Pro Glu Arg Leu Ala Ala Gly Thr Leu
 290 295 300
 Val Leu Val Val Leu Leu Pro Pro Asp Gln Leu Arg Asn Asn Ser Phe
 305 310 315 320
 His Phe Leu Arg Glu Leu Ser His Val Leu His Thr Asn Val Val Phe
 325 330 335
 Lys Arg Asp Ala Gln Gly Gln Gln Met Ile Phe Pro Tyr Tyr Gly His
 340 345 350
 Glu Glu Glu Leu Arg Lys His Pro Ile Lys Arg Ser Thr Val Gly Trp
 355 360 365
 Ala Thr Ser Ser Leu Leu Pro Gly Thr Ser Gly Gly Arg Gln Arg Arg
 370 375 380
 Glu Leu Asp Pro Met Asp Ile Arg Gly Ser Ile Val Tyr Leu Glu Ile
 385 390 395 400
 Asp Asn Arg Gln Cys Val Gln Ser Ser Ser Gln Cys Phe Gln Ser Ala
 405 410 415
 Thr Asp Val Ala Ala Phe Leu Gly Ala Leu Ala Ser Leu Gly Ser Leu
 420 425 430

Asn Ile Pro Tyr Lys Ile Glu Ala Val Lys Ser Glu Pro Val Glu Pro
435 440 445

Pro Leu Pro Ser Gln Gly Ser Gly His His His His His His
450 455 460

<210> 15
<211> 23
<212> БІЛОК
<213> Штучний

<220>
<223> Синтетичний

<400> 15

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 16
<211> 15
<212> БІЛОК
<213> Штучний

<220>
<223> Синтетичний

<400> 16

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 17
<211> 32
<212> БІЛОК
<213> Штучний

<220>
<223> Синтетичний

<400> 17

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

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

<210> 18
<211> 10
<212> БІЛОК
<213> Штучний

<220>
<223> Синтетичний

<400> 18

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

<210> 19

<211> 87

<212> БІЛОК

<213> Штучний

<220>

<223> Синтетичний

<400> 19

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

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

Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg Val Thr Ile
35 40 45

Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu
50 55 60

Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly
65 70 75 80

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
85

<210> 20

<211> 81

<212> БІЛОК

<213> Штучний

<220>

<223> Синтетичний

<400> 20

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
20 25 30

Gln Gly Leu Glu Trp Met Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr
35 40 45

Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala
50 55 60

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
65 70 75 80

Ser

<210> 21

<211> 80

<212> БІЛОК

<213> Штучний

<220>

<223> Синтетичний

<400> 21

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
20 25 30

Gln Gly Leu Glu Trp Met Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr
35 40 45

Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala
50 55 60

Val Tyr Tyr Cys Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
65 70 75 80

<210> 22

<211> 79

<212> БІЛОК

<213> Штучний

<220>

<223> Синтетичний

<400> 22

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
20 25 30

Gln Gly Leu Glu Trp Met Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr
35 40 45

Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala
50 55 60

Val Tyr Tyr Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
65 70 75

<210> 23
<211> 87
<212> БИЛОК
<213> Штучний

<220>
<223> Синтетичний

<400> 23

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

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

Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Val Thr Ile
35 40 45

Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val
50 55 60

Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly
65 70 75 80

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
85

<210> 24
<211> 81
<212> БИЛОК
<213> Штучний

<220>
<223> Синтетичний

<400> 24

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly
20 25 30

Lys Gly Leu Glu Trp Ile Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys
35 40 45

Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
50 55 60

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
65 70 75 80

Ser

<210> 25

<211> 80

<212> БІЛОК

<213> Штучний

<220>

<223> Синтетичний

<400> 25

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly
20 25 30

Lys Gly Leu Glu Trp Ile Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys
35 40 45

Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
50 55 60

Val Tyr Tyr Cys Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
65 70 75 80

<210> 26

<211> 79

<212> БІЛОК

<213> Штучний

<220>

<223> Синтетичний

<400> 26

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly
20 25 30

Lys Gly Leu Glu Trp Ile Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys
35 40 45

Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
50 55 60

Val Tyr Tyr Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

65 70 75

<210> 27
 <211> 87
 <212> БІЛОК
 <213> Штучний

<220>
 <223> Синтетичний

<400> 27

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

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

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Arg Phe Thr Ile
 35 40 45

Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
 50 55 60

Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly
 65 70 75 80

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 85

<210> 28
 <211> 81
 <212> БІЛОК
 <213> Штучний

<220>
 <223> Синтетичний

<400> 28

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 20 25 30

Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
 35 40 45

Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
 50 55 60

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 65 70 75 80

Ser

<210> 29
 <211> 80
 <212> БІЛОК
 <213> Штучний

<220>
 <223> Синтетичний

<400> 29

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 20 25 30

Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
 35 40 45

Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
 50 55 60

Val Tyr Tyr Cys Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 65 70 75 80

<210> 30
 <211> 79
 <212> БІЛОК
 <213> Штучний

<220>
 <223> Синтетичний

<400> 30

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 20 25 30

Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
 35 40 45

Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
 50 55 60

Val Tyr Tyr Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 65 70 75

<210> 31
 <211> 87
 <212> БІЛОК
 <213> Штучний

<220>
 <223> Синтетичний

<400> 31

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Trp Val
 20 25 30

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Arg Phe Thr Ile
 35 40 45

Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
 50 55 60

Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gln Gly
 65 70 75 80

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 85

<210> 32
 <211> 81
 <212> БІЛОК
 <213> Штучний

<220>
 <223> Синтетичний

<400> 32

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 20 25 30

Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys
 35 40 45

Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
 50 55 60

Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 65 70 75 80

Ser

<210> 33

<211> 80

<212> БИЛОК

<213> Штучний

<220>

<223> Синтетичний

<400> 33

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
20 25 30

Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys
35 40 45

Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
50 55 60

Val Tyr Tyr Cys Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
65 70 75 80

<210> 34

<211> 87

<212> БИЛОК

<213> Штучний

<220>

<223> Синтетичний

<400> 34

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Trp Val
20 25 30

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Arg Phe Thr Ile
35 40 45

Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
50 55 60

Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly
65 70 75 80

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

<210> 35
 <211> 81
 <212> БІЛОК
 <213> Штучний

<220>
 <223> Синтетичний

<400> 35

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 20 25 30

Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys
 35 40 45

Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
 50 55 60

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 65 70 75 80

Ser

<210> 36
 <211> 80
 <212> БІЛОК
 <213> Штучний

<220>
 <223> Синтетичний

<400> 36

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 20 25 30

Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys
 35 40 45

Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
 50 55 60

Val Tyr Tyr Cys Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 65 70 75 80

<210> 37
 <211> 79
 <212> БІЛОК
 <213> Штучний

<220>
 <223> Синтетичний

<400> 37

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 20 25 30

Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys
 35 40 45

Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
 50 55 60

Val Tyr Tyr Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 65 70 75

<210> 38
 <211> 80
 <212> БІЛОК
 <213> Штучний

<220>
 <223> Синтетичний

<400> 38

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
 20 25 30

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
 35 40 45

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp
 50 55 60

Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 65 70 75 80

<210> 39
 <211> 80
 <212> БІЛОК

<213> Штучний

<220>

<223> Синтетичний

<400> 39

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
20 25 30

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly
35 40 45

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp
50 55 60

Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
65 70 75 80

<210> 40

<211> 80

<212> БІЛОК

<213> Штучний

<220>

<223> Синтетичний

<400> 40

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
20 25 30

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly
35 40 45

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp
50 55 60

Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
65 70 75 80

<210> 41

<211> 80

<212> БІЛОК

<213> Штучний

<220>

<223> Синтетичний

<400> 41

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro
20 25 30

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly
35 40 45

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp
50 55 60

Val Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
65 70 75 80

<210> 42

<211> 25

<212> БІЛОК

<213> Штучний

<220>

<223> Синтетичний

<400> 42

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 43

<211> 13

<212> БІЛОК

<213> Штучний

<220>

<223> Синтетичний

<400> 43

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

<210> 44

<211> 30

<212> БІЛОК

<213> Штучний

<220>

<223> Синтетичний

<400> 44

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln

1	5	10	15
---	---	----	----

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

<210> 45
<211> 11
<212> БІЛОК
<213> Штучний

<220>
<223> Синтетичний

<400> 45

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

<210> 46
<211> 32
<212> БІЛОК
<213> Штучний

<220>
<223> Синтетичний

<400> 46

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

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

<210> 47
<211> 30
<212> БІЛОК
<213> Штучний

<220>
<223> Синтетичний

<400> 47

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

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

<210> 48
<211> 62
<212> ДНК
<213> Штучний

<220>
<223> Синтетичний

```

<400> 48
gatccgatta caaagatgac gatgacaagg gctctggtgt catcaatggc tgcaaaggca 60
ag 62

<210> 49
<211> 26
<212> ДНК
<213> Штучний

<220>
<223> Синтетичний

<400> 49
cctgcgcccgc cgggggcggc tccacg 26

<210> 50
<211> 58
<212> ДНК
<213> Штучний

<220>
<223> Синтетичний

<400> 50
cgattacaaa gatgacgatg acaagggtctc tgggtgtcatc aatggctgca aaggcaag 58

<210> 51
<211> 30
<212> ДНК
<213> Штучний

<220>
<223> Синтетичний

<400> 51
aattcctgcg ccggcggggg cggctccacg 30

<210> 52
<211> 14
<212> БІЛЮК
<213> Штучний

<220>
<223> Синтетичний

<400> 52
Ala Arg Leu Gly Ser Leu Asn Ile Pro Tyr Lys Ile Glu Ala
1 5 10

<210> 53
<211> 107
<212> БІЛЮК
<213> Штучний

<220>
<223> Синтетичний

<400> 53

```

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

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

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

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

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

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

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

<210> 54
<211> 107
<212> БІЛОК
<213> Штучний

<220>
<223> Синтетичний

<400> 54

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

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

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

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

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

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

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

<210> 55
 <211> 1491
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 55
 atgctactag taaatcagtc acaccaaggc ttcaataagg aacacacaag caagatggta 60
 agcgctattg ttttatatgt gcttttggcg gcggcggcgc attctgcctt tgcggcggat 120
 cttggatccg attacaaaga tgacgatgac aagggtctctg gtgtcatcaa tggctgcaaa 180
 ggcaagccct gcaagaatgg gggcacctgc gccgtggcct ccaacaccgc ccgcggttc 240
 atctgcaagt gccctgcggg cttcgagggc gccacgtgtg agaatgacgc tcgtacctgc 300
 ggcagcctgc gctgcctcaa cggcggcaca tgcatctccg gcccgcgag cccacctgc 360
 ctgtgcctgg gcccttcac gggcccgaa tgccagttcc cgccagcag cccctgcctg 420
 ggcggcaacc cctgctacaa ccaggggacc tgtgagcca catccgagag ccccttctac 480
 cgttgctgtg gcccgccaa attcaacggg ctcttgtgcc acatcctgga ctacagcttc 540
 gggggtgggg ccggcgcgga catcccccg ccgctgatcg aggaggcgtg cgagctgcc 600
 gagtgccagg aggacgggg caacaaggtc tgcagcctgc agtgcaaca ccacgcgtgc 660
 ggctgggacg gcggtgactg ctccctcaac ttcaatgacc cctggaagaa ctgcacgcag 720
 tctctgcagt gctggaagta cttcagtgc gccactgtg acagccagt caactcagcc 780
 ggctgcctct tcgacggctt tgactgccag cgtgcggaag gccagtgcaa cccctgtac 840
 gaccagtact gcaaggacca cttcagcgac gggcactgcg accagggctg caacagcgcg 900
 gagtgcgagt gggacgggct ggactgtgcg gagcatgtac ccgagaggct ggcggccggc 960
 acgctggtgg tgggtgtgct gatgccgcg gagcagctgc gcaacagctc cttccacttc 1020
 ctgcgggagc tcagccgctg gctgcacacc aacgtgtct tcaagcgtga cgcacacggc 1080
 cagcagatga tcttcccta ctacggccgc gaggaggagc tgcgcaagca ccccatcaag 1140
 cgtgccgcgc agggctgggc cgcacctgac gccctgctgg gccaggtgaa ggctcgctg 1200
 ctccctggtg gcagcgaggg tgggcggcgg cgaggaggagc tggacccat ggacgtccgc 1260
 ggctccatcg tctacctgga gattgacaac cggcagtgtg tgcaggcctc ctgcagctgc 1320
 ttccagagt ccaccgacgt ggcgcattc ctgggagcgc tcgcctcgct gggcagcctc 1380
 aacatccct acaagatcga ggcgtgcag agtgagaccg tggagccgc cccgcccgcg 1440
 caggaattcg gtctgggtcc gcgtggcagc ggtcatcacc atcaccatca c 1491

<210> 56
 <211> 2555
 <212> БИЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 56


```

Met Pro Pro Leu Leu Ala Pro Leu Leu Cys Leu Ala Leu Leu Pro Ala
1          5          10          15

Leu Ala Ala Arg Gly Pro Arg Cys Ser Gln Pro Gly Glu Thr Cys Leu
20          25          30

Asn Gly Gly Lys Cys Glu Ala Ala Asn Gly Thr Glu Ala Cys Val Cys
35          40          45

Gly Gly Ala Phe Val Gly Pro Arg Cys Gln Asp Pro Asn Pro Cys Leu
50          55          60

Ser Thr Pro Cys Lys Asn Ala Gly Thr Cys His Val Val Asp Arg Arg
65          70          75          80

Gly Val Ala Asp Tyr Ala Cys Ser Cys Ala Leu Gly Phe Ser Gly Pro
85          90          95

Leu Cys Leu Thr Pro Leu Asp Asn Ala Cys Leu Thr Asn Pro Cys Arg
100         105         110

Asn Gly Gly Thr Cys Asp Leu Leu Thr Leu Thr Glu Tyr Lys Cys Arg
115         120         125

Cys Pro Pro Gly Trp Ser Gly Lys Ser Cys Gln Gln Ala Asp Pro Cys
130         135         140

Ala Ser Asn Pro Cys Ala Asn Gly Gly Gln Cys Leu Pro Phe Glu Ala
145         150         155         160

Ser Tyr Ile Cys His Cys Pro Pro Ser Phe His Gly Pro Thr Cys Arg
165         170         175

Gln Asp Val Asn Glu Cys Gly Gln Lys Pro Gly Leu Cys Arg His Gly
180         185         190

Gly Thr Cys His Asn Glu Val Gly Ser Tyr Arg Cys Val Cys Arg Ala
195         200         205

Thr His Thr Gly Pro Asn Cys Glu Arg Pro Tyr Val Pro Cys Ser Pro
210         215         220

Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Thr Cys Arg Pro Thr Gly Asp Val Thr
225         230         235         240

His Glu Cys Ala Cys Leu Pro Gly Phe Thr Gly Gln Asn Cys Glu Glu
245         250         255

```

Asn	Ile	Asp	Asp	Cys	Pro	Gly	Asn	Asn	Cys	Lys	Asn	Gly	Gly	Ala	Cys	
			260						265						270	
Val	Asp	Gly	Val	Asn	Thr	Tyr	Asn	Cys	Arg	Cys	Pro	Pro	Glu	Trp	Thr	
		275					280					285				
Gly	Gln	Tyr	Cys	Thr	Glu	Asp	Val	Asp	Glu	Cys	Gln	Leu	Met	Pro	Asn	
		290				295					300					
Ala	Cys	Gln	Asn	Gly	Gly	Thr	Cys	His	Asn	Thr	His	Gly	Gly	Tyr	Asn	
305					310					315					320	
Cys	Val	Cys	Val	Asn	Gly	Trp	Thr	Gly	Glu	Asp	Cys	Ser	Glu	Asn	Ile	
				325					330					335		
Asp	Asp	Cys	Ala	Ser	Ala	Ala	Cys	Phe	His	Gly	Ala	Thr	Cys	His	Asp	
			340					345					350			
Arg	Val	Ala	Ser	Phe	Tyr	Cys	Glu	Cys	Pro	His	Gly	Arg	Thr	Gly	Leu	
		355					360					365				
Leu	Cys	His	Leu	Asn	Asp	Ala	Cys	Ile	Ser	Asn	Pro	Cys	Asn	Glu	Gly	
	370					375					380					
Ser	Asn	Cys	Asp	Thr	Asn	Pro	Val	Asn	Gly	Lys	Ala	Ile	Cys	Thr	Cys	
385					390					395					400	
Pro	Ser	Gly	Tyr	Thr	Gly	Pro	Ala	Cys	Ser	Gln	Asp	Val	Asp	Glu	Cys	
				405					410					415		
Ser	Leu	Gly	Ala	Asn	Pro	Cys	Glu	His	Ala	Gly	Lys	Cys	Ile	Asn	Thr	
			420					425					430			
Leu	Gly	Ser	Phe	Glu	Cys	Gln	Cys	Leu	Gln	Gly	Tyr	Thr	Gly	Pro	Arg	
		435					440					445				
Cys	Glu	Ile	Asp	Val	Asn	Glu	Cys	Val	Ser	Asn	Pro	Cys	Gln	Asn	Asp	
	450					455					460					
Ala	Thr	Cys	Leu	Asp	Gln	Ile	Gly	Glu	Phe	Gln	Cys	Ile	Cys	Met	Pro	
465					470					475					480	
Gly	Tyr	Glu	Gly	Val	His	Cys	Glu	Val	Asn	Thr	Asp	Glu	Cys	Ala	Ser	
				485					490					495		
Ser	Pro	Cys	Leu	His	Asn	Gly	Arg	Cys	Leu	Asp	Lys	Ile	Asn	Glu	Phe	
			500					505					510			
Gln	Cys	Glu	Cys	Pro	Thr	Gly	Phe	Thr	Gly	His	Leu	Cys	Gln	Tyr	Asn	

515										520										525										
Val	Asp	Glu	Cys	Ala	Ser	Thr	Pro	Cys	Lys	Asn	Gly	Ala	Lys	Cys	Leu															
530							535								540															
Asp	Gly	Pro	Asn	Thr	Tyr	Thr	Cys	Val	Cys	Thr	Glu	Gly	Tyr	Thr	Gly															
545					550					555					560															
Thr	His	Cys	Glu	Val	Asp	Ile	Asp	Glu	Cys	Asp	Pro	Asp	Pro	Cys	His															
				565					570					575																
Tyr	Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Gly	Val	Ala	Thr	Phe	Thr	Cys	Leu	Cys	Arg															
			580					585					590																	
Pro	Gly	Tyr	Thr	Gly	His	His	Cys	Glu	Thr	Asn	Ile	Asn	Glu	Cys	Ser															
		595					600					605																		
Ser	Gln	Pro	Cys	Arg	His	Gly	Gly	Thr	Cys	Gln	Asp	Arg	Asp	Asn	Ala															
	610					615					620																			
Tyr	Leu	Cys	Phe	Cys	Leu	Lys	Gly	Thr	Thr	Gly	Pro	Asn	Cys	Glu	Ile															
625					630					635				640																
Asn	Leu	Asp	Asp	Cys	Ala	Ser	Ser	Pro	Cys	Asp	Ser	Gly	Thr	Cys	Leu															
				645					650					655																
Asp	Lys	Ile	Asp	Gly	Tyr	Glu	Cys	Ala	Cys	Glu	Pro	Gly	Tyr	Thr	Gly															
		660						665					670																	
Ser	Met	Cys	Asn	Ile	Asn	Ile	Asp	Glu	Cys	Ala	Gly	Asn	Pro	Cys	His															
		675					680					685																		
Asn	Gly	Gly	Thr	Cys	Glu	Asp	Gly	Ile	Asn	Gly	Phe	Thr	Cys	Arg	Cys															
	690					695					700																			
Pro	Glu	Gly	Tyr	His	Asp	Pro	Thr	Cys	Leu	Ser	Glu	Val	Asn	Glu	Cys															
705					710					715				720																
Asn	Ser	Asn	Pro	Cys	Val	His	Gly	Ala	Cys	Arg	Asp	Ser	Leu	Asn	Gly															
			725						730				735																	
Tyr	Lys	Cys	Asp	Cys	Asp	Pro	Gly	Trp	Ser	Gly	Thr	Asn	Cys	Asp	Ile															
		740						745					750																	
Asn	Asn	Asn	Glu	Cys	Glu	Ser	Asn	Pro	Cys	Val	Asn	Gly	Gly	Thr	Cys															
		755					760					765																		
Lys	Asp	Met	Thr	Ser	Gly	Tyr	Val	Cys	Thr	Cys	Arg	Glu	Gly	Phe	Ser															
	770					775					780																			

Gly Pro Asn Cys Gln Thr Asn Ile Asn Glu Cys Ala Ser Asn Pro Cys
 785 790 795 800
 Leu Asn Gln Gly Thr Cys Ile Asp Asp Val Ala Gly Tyr Lys Cys Asn
 805 810 815
 Cys Leu Leu Pro Tyr Thr Gly Ala Thr Cys Glu Val Val Leu Ala Pro
 820 825 830
 Cys Ala Pro Ser Pro Cys Arg Asn Gly Gly Glu Cys Arg Gln Ser Glu
 835 840 845
 Asp Tyr Glu Ser Phe Ser Cys Val Cys Pro Thr Gly Trp Gln Gly Gln
 850 855 860
 Thr Cys Glu Val Asp Ile Asn Glu Cys Val Leu Ser Pro Cys Arg His
 865 870 875 880
 Gly Ala Ser Cys Gln Asn Thr His Gly Gly Tyr Arg Cys His Cys Gln
 885 890 895
 Ala Gly Tyr Ser Gly Arg Asn Cys Glu Thr Asp Ile Asp Asp Cys Arg
 900 905 910
 Pro Asn Pro Cys His Asn Gly Gly Ser Cys Thr Asp Gly Ile Asn Thr
 915 920 925
 Ala Phe Cys Asp Cys Leu Pro Gly Phe Arg Gly Thr Phe Cys Glu Glu
 930 935 940
 Asp Ile Asn Glu Cys Ala Ser Asp Pro Cys Arg Asn Gly Ala Asn Cys
 945 950 955 960
 Thr Asp Cys Val Asp Ser Tyr Thr Cys Thr Cys Pro Ala Gly Phe Ser
 965 970 975
 Gly Ile His Cys Glu Asn Asn Thr Pro Asp Cys Thr Glu Ser Ser Cys
 980 985 990
 Phe Asn Gly Gly Thr Cys Val Asp Gly Ile Asn Ser Phe Thr Cys Leu
 995 1000 1005
 Cys Pro Pro Gly Phe Thr Gly Ser Tyr Cys Gln His Asp Val Asn
 1010 1015 1020
 Glu Cys Asp Ser Gln Pro Cys Leu His Gly Gly Thr Cys Gln Asp
 1025 1030 1035

Gly	Cys	Gly	Ser	Tyr	Arg	Cys	Thr	Cys	Pro	Gln	Gly	Tyr	Thr	Gly
1040						1045					1050			
Pro	Asn	Cys	Gln	Asn	Leu	Val	His	Trp	Cys	Asp	Ser	Ser	Pro	Cys
1055						1060					1065			
Lys	Asn	Gly	Gly	Lys	Cys	Trp	Gln	Thr	His	Thr	Gln	Tyr	Arg	Cys
1070						1075					1080			
Glu	Cys	Pro	Ser	Gly	Trp	Thr	Gly	Leu	Tyr	Cys	Asp	Val	Pro	Ser
1085						1090					1095			
Val	Ser	Cys	Glu	Val	Ala	Ala	Gln	Arg	Gln	Gly	Val	Asp	Val	Ala
1100						1105					1110			
Arg	Leu	Cys	Gln	His	Gly	Gly	Leu	Cys	Val	Asp	Ala	Gly	Asn	Thr
1115						1120					1125			
His	His	Cys	Arg	Cys	Gln	Ala	Gly	Tyr	Thr	Gly	Ser	Tyr	Cys	Glu
1130						1135					1140			
Asp	Leu	Val	Asp	Glu	Cys	Ser	Pro	Ser	Pro	Cys	Gln	Asn	Gly	Ala
1145						1150					1155			
Thr	Cys	Thr	Asp	Tyr	Leu	Gly	Gly	Tyr	Ser	Cys	Lys	Cys	Val	Ala
1160						1165					1170			
Gly	Tyr	His	Gly	Val	Asn	Cys	Ser	Glu	Glu	Ile	Asp	Glu	Cys	Leu
1175						1180					1185			
Ser	His	Pro	Cys	Gln	Asn	Gly	Gly	Thr	Cys	Leu	Asp	Leu	Pro	Asn
1190						1195					1200			
Thr	Tyr	Lys	Cys	Ser	Cys	Pro	Arg	Gly	Thr	Gln	Gly	Val	His	Cys
1205						1210					1215			
Glu	Ile	Asn	Val	Asp	Asp	Cys	Asn	Pro	Pro	Val	Asp	Pro	Val	Ser
1220						1225					1230			
Arg	Ser	Pro	Lys	Cys	Phe	Asn	Asn	Gly	Thr	Cys	Val	Asp	Gln	Val
1235						1240					1245			
Gly	Gly	Tyr	Ser	Cys	Thr	Cys	Pro	Pro	Gly	Phe	Val	Gly	Glu	Arg
1250						1255					1260			
Cys	Glu	Gly	Asp	Val	Asn	Glu	Cys	Leu	Ser	Asn	Pro	Cys	Asp	Ala
1265						1270					1275			

Arg Gly	Thr Gln Asn Cys Val	Gln Arg Val Asn Asp	Phe His Cys
1280	1285	1290	
Glu Cys	Arg Ala Gly His Thr	Gly Arg Arg Cys Glu	Ser Val Ile
1295	1300	1305	
Asn Gly	Cys Lys Gly Lys Pro	Cys Lys Asn Gly Gly	Thr Cys Ala
1310	1315	1320	
Val Ala	Ser Asn Thr Ala Arg	Gly Phe Ile Cys Lys	Cys Pro Ala
1325	1330	1335	
Gly Phe	Glu Gly Ala Thr Cys	Glu Asn Asp Ala Arg	Thr Cys Gly
1340	1345	1350	
Ser Leu	Arg Cys Leu Asn Gly	Gly Thr Cys Ile Ser	Gly Pro Arg
1355	1360	1365	
Ser Pro	Thr Cys Leu Cys Leu	Gly Pro Phe Thr Gly	Pro Glu Cys
1370	1375	1380	
Gln Phe	Pro Ala Ser Ser Pro	Cys Leu Gly Gly Asn	Pro Cys Tyr
1385	1390	1395	
Asn Gln	Gly Thr Cys Glu Pro	Thr Ser Glu Ser Pro	Phe Tyr Arg
1400	1405	1410	
Cys Leu	Cys Pro Ala Lys Phe	Asn Gly Leu Leu Cys	His Ile Leu
1415	1420	1425	
Asp Tyr	Ser Phe Gly Gly Gly	Ala Gly Arg Asp Ile	Pro Pro Pro
1430	1435	1440	
Leu Ile	Glu Glu Ala Cys Glu	Leu Pro Glu Cys Gln	Glu Asp Ala
1445	1450	1455	
Gly Asn	Lys Val Cys Ser Leu	Gln Cys Asn Asn His	Ala Cys Gly
1460	1465	1470	
Trp Asp	Gly Gly Asp Cys Ser	Leu Asn Phe Asn Asp	Pro Trp Lys
1475	1480	1485	
Asn Cys	Thr Gln Ser Leu Gln	Cys Trp Lys Tyr Phe	Ser Asp Gly
1490	1495	1500	
His Cys	Asp Ser Gln Cys Asn	Ser Ala Gly Cys Leu	Phe Asp Gly
1505	1510	1515	
Phe Asp	Cys Gln Arg Ala Glu	Gly Gln Cys Asn Pro	Leu Tyr Asp

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

Lys Val Ser Glu Ala Ser Lys Lys Lys Arg Arg Glu Pro Leu Gly		
1775	1780	1785
Glu Asp Ser Val Gly Leu Lys Pro Leu Lys Asn Ala Ser Asp Gly		
1790	1795	1800
Ala Leu Met Asp Asp Asn Gln Asn Glu Trp Gly Asp Glu Asp Leu		
1805	1810	1815
Glu Thr Lys Lys Phe Arg Phe Glu Glu Pro Val Val Leu Pro Asp		
1820	1825	1830
Leu Asp Asp Gln Thr Asp His Arg Gln Trp Thr Gln Gln His Leu		
1835	1840	1845
Asp Ala Ala Asp Leu Arg Met Ser Ala Met Ala Pro Thr Pro Pro		
1850	1855	1860
Gln Gly Glu Val Asp Ala Asp Cys Met Asp Val Asn Val Arg Gly		
1865	1870	1875
Pro Asp Gly Phe Thr Pro Leu Met Ile Ala Ser Cys Ser Gly Gly		
1880	1885	1890
Gly Leu Glu Thr Gly Asn Ser Glu Glu Glu Glu Asp Ala Pro Ala		
1895	1900	1905
Val Ile Ser Asp Phe Ile Tyr Gln Gly Ala Ser Leu His Asn Gln		
1910	1915	1920
Thr Asp Arg Thr Gly Glu Thr Ala Leu His Leu Ala Ala Arg Tyr		
1925	1930	1935
Ser Arg Ser Asp Ala Ala Lys Arg Leu Leu Glu Ala Ser Ala Asp		
1940	1945	1950
Ala Asn Ile Gln Asp Asn Met Gly Arg Thr Pro Leu His Ala Ala		
1955	1960	1965
Val Ser Ala Asp Ala Gln Gly Val Phe Gln Ile Leu Ile Arg Asn		
1970	1975	1980
Arg Ala Thr Asp Leu Asp Ala Arg Met His Asp Gly Thr Thr Pro		
1985	1990	1995
Leu Ile Leu Ala Ala Arg Leu Ala Val Glu Gly Met Leu Glu Asp		
2000	2005	2010

Leu Ile Asn Ser His Ala Asp	Val Asn Ala Val Asp	Asp Leu Gly
2015	2020	2025
Lys Ser Ala Leu His Trp Ala	Ala Ala Val Asn Asn	Val Asp Ala
2030	2035	2040
Ala Val Val Leu Leu Lys Asn	Gly Ala Asn Lys Asp	Met Gln Asn
2045	2050	2055
Asn Arg Glu Glu Thr Pro Leu	Phe Leu Ala Ala Arg	Glu Gly Ser
2060	2065	2070
Tyr Glu Thr Ala Lys Val Leu	Leu Asp His Phe Ala	Asn Arg Asp
2075	2080	2085
Ile Thr Asp His Met Asp Arg	Leu Pro Arg Asp Ile	Ala Gln Glu
2090	2095	2100
Arg Met His His Asp Ile Val	Arg Leu Leu Asp Glu	Tyr Asn Leu
2105	2110	2115
Val Arg Ser Pro Gln Leu His	Gly Ala Pro Leu Gly	Gly Thr Pro
2120	2125	2130
Thr Leu Ser Pro Pro Leu Cys	Ser Pro Asn Gly Tyr	Leu Gly Ser
2135	2140	2145
Leu Lys Pro Gly Val Gln Gly	Lys Lys Val Arg Lys	Pro Ser Ser
2150	2155	2160
Lys Gly Leu Ala Cys Gly Ser	Lys Glu Ala Lys Asp	Leu Lys Ala
2165	2170	2175
Arg Arg Lys Lys Ser Gln Asp	Gly Lys Gly Cys Leu	Leu Asp Ser
2180	2185	2190
Ser Gly Met Leu Ser Pro Val	Asp Ser Leu Glu Ser	Pro His Gly
2195	2200	2205
Tyr Leu Ser Asp Val Ala Ser	Pro Pro Leu Leu Pro	Ser Pro Phe
2210	2215	2220
Gln Gln Ser Pro Ser Val Pro	Leu Asn His Leu Pro	Gly Met Pro
2225	2230	2235
Asp Thr His Leu Gly Ile Gly	His Leu Asn Val Ala	Ala Lys Pro
2240	2245	2250

Glu Met 2255	Ala Ala Leu Gly Gly 2260	Gly Gly Arg Leu Ala 2265	Phe Glu Thr
Gly Pro 2270	Pro Arg Leu Ser His 2275	Leu Pro Val Ala Ser 2280	Gly Thr Ser
Thr Val 2285	Leu Gly Ser Ser Ser 2290	Gly Gly Ala Leu Asn 2295	Phe Thr Val
Gly Gly 2300	Ser Thr Ser Leu Asn 2305	Gly Gln Cys Glu Trp 2310	Leu Ser Arg
Leu Gln 2315	Ser Gly Met Val Pro 2320	Asn Gln Tyr Asn Pro 2325	Leu Arg Gly
Ser Val 2330	Ala Pro Gly Pro Leu 2335	Ser Thr Gln Ala Pro 2340	Ser Leu Gln
His Gly 2345	Met Val Gly Pro Leu 2350	His Ser Ser Leu Ala 2355	Ala Ser Ala
Leu Ser 2360	Gln Met Met Ser Tyr 2365	Gln Gly Leu Pro Ser 2370	Thr Arg Leu
Ala Thr 2375	Gln Pro His Leu Val 2380	Gln Thr Gln Gln Val 2385	Gln Pro Gln
Asn Leu 2390	Gln Met Gln Gln Gln 2395	Asn Leu Gln Pro Ala 2400	Asn Ile Gln
Gln Gln 2405	Gln Ser Leu Gln Pro 2410	Pro Pro Pro Pro Pro 2415	Gln Pro His
Leu Gly 2420	Val Ser Ser Ala Ala 2425	Ser Gly His Leu Gly 2430	Arg Ser Phe
Leu Ser 2435	Gly Glu Pro Ser Gln 2440	Ala Asp Val Gln Pro 2445	Leu Gly Pro
Ser Ser 2450	Leu Ala Val His Thr 2455	Ile Leu Pro Gln Glu 2460	Ser Pro Ala
Leu Pro 2465	Thr Ser Leu Pro Ser 2470	Ser Leu Val Pro Pro 2475	Val Thr Ala
Ala Gln 2480	Phe Leu Thr Pro Pro 2485	Ser Gln His Ser Tyr 2490	Ser Ser Pro
Val Asp	Asn Thr Pro Ser His	Gln Leu Gln Val Pro	Glu His Pro

```

2495                2500                2505

Phe Leu Thr Pro Ser Pro Glu Ser Pro Asp Gln Trp Ser Ser Ser
2510                2515                2520

Ser Pro His Ser Asn Val Ser Asp Trp Ser Glu Gly Val Ser Ser
2525                2530                2535

Pro Pro Thr Ser Met Gln Ser Gln Ile Ala Arg Ile Pro Glu Ala
2540                2545                2550

Phe Lys
2555

<210> 57
<211> 2531
<212> EIJOK
<213> Mus musculus

<400> 57

Met Pro Arg Leu Leu Thr Pro Leu Leu Cys Leu Thr Leu Leu Pro Ala
1                5                10                15

Leu Ala Ala Arg Gly Leu Arg Cys Ser Gln Pro Ser Gly Thr Cys Leu
20                25                30

Asn Gly Gly Arg Cys Glu Val Ala Ser Gly Thr Glu Ala Cys Val Cys
35                40                45

Ser Gly Ala Phe Val Gly Gln Arg Cys Gln Asp Ser Asn Pro Cys Leu
50                55                60

Ser Thr Pro Cys Lys Asn Ala Gly Thr Cys His Val Val Asp His Gly
65                70                75                80

Gly Thr Val Asp Tyr Ala Cys Ser Cys Pro Leu Gly Phe Ser Gly Pro
85                90                95

Leu Cys Leu Thr Pro Leu Asp Asn Ala Cys Leu Ala Asn Pro Cys Arg
100               105               110

Asn Gly Gly Thr Cys Asp Leu Leu Thr Leu Thr Glu Tyr Lys Cys Arg
115               120               125

Cys Pro Pro Gly Trp Ser Gly Lys Ser Cys Gln Gln Ala Asp Pro Cys
130               135               140

Ala Ser Asn Pro Cys Ala Asn Gly Gly Gln Cys Leu Pro Phe Glu Ser
145               150               155               160

```

Ser Tyr Ile Cys Arg Cys Pro Pro Gly Phe His Gly Pro Thr Cys Arg
165 170 175

Gln Asp Val Asn Glu Cys Ser Gln Asn Pro Gly Leu Cys Arg His Gly
180 185 190

Gly Thr Cys His Asn Glu Ile Gly Ser Tyr Arg Cys Ala Cys Arg Ala
195 200 205

Thr His Thr Gly Pro His Cys Glu Leu Pro Tyr Val Pro Cys Ser Pro
210 215 220

Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Thr Cys Arg Pro Thr Gly Asp Thr Thr
225 230 235 240

His Glu Cys Ala Cys Leu Pro Gly Phe Ala Gly Gln Asn Cys Glu Glu
245 250 255

Asn Val Asp Asp Cys Pro Gly Asn Asn Cys Lys Asn Gly Gly Ala Cys
260 265 270

Val Asp Gly Val Asn Thr Tyr Asn Cys Arg Cys Pro Pro Glu Trp Thr
275 280 285

Gly Gln Tyr Cys Thr Glu Asp Val Asp Glu Cys Gln Leu Met Pro Asn
290 295 300

Ala Cys Gln Asn Gly Gly Thr Cys His Asn Thr His Gly Gly Tyr Asn
305 310 315 320

Cys Val Cys Val Asn Gly Trp Thr Gly Glu Asp Cys Ser Glu Asn Ile
325 330 335

Asp Asp Cys Ala Ser Ala Ala Cys Phe Gln Gly Ala Thr Cys His Asp
340 345 350

Arg Val Ala Ser Phe Tyr Cys Glu Cys Pro His Gly Arg Thr Gly Leu
355 360 365

Leu Cys His Leu Asn Asp Ala Cys Ile Ser Asn Pro Cys Asn Glu Gly
370 375 380

Ser Asn Cys Asp Thr Asn Pro Val Asn Gly Lys Ala Ile Cys Thr Cys
385 390 395 400

Pro Ser Gly Tyr Thr Gly Pro Ala Cys Ser Gln Asp Val Asp Glu Cys
405 410 415

Ala Leu Gly Ala Asn Pro Cys Glu His Ala Gly Lys Cys Leu Asn Thr
420 425 430

Leu Gly Ser Phe Glu Cys Gln Cys Leu Gln Gly Tyr Thr Gly Pro Arg
435 440 445

Cys Glu Ile Asp Val Asn Glu Cys Ile Ser Asn Pro Cys Gln Asn Asp
450 455 460

Ala Thr Cys Leu Asp Gln Ile Gly Glu Phe Gln Cys Ile Cys Met Pro
465 470 475 480

Gly Tyr Glu Gly Val Tyr Cys Glu Ile Asn Thr Asp Glu Cys Ala Ser
485 490 495

Ser Pro Cys Leu His Asn Gly His Cys Met Asp Lys Ile Asn Glu Phe
500 505 510

Gln Cys Gln Cys Pro Lys Gly Phe Asn Gly His Leu Cys Gln Tyr Asp
515 520 525

Val Asp Glu Cys Ala Ser Thr Pro Cys Lys Asn Gly Ala Lys Cys Leu
530 535 540

Asp Gly Pro Asn Thr Tyr Thr Cys Val Cys Thr Glu Gly Tyr Thr Gly
545 550 555 560

Thr His Cys Glu Val Asp Ile Asp Glu Cys Asp Pro Asp Pro Cys His
565 570 575

Tyr Gly Ser Cys Lys Asp Gly Val Ala Thr Phe Thr Cys Leu Cys Gln
580 585 590

Pro Gly Tyr Thr Gly His His Cys Glu Thr Asn Ile Asn Glu Cys His
595 600 605

Ser Gln Pro Cys Arg His Gly Gly Thr Cys Gln Asp Arg Asp Asn Ser
610 615 620

Tyr Leu Cys Leu Cys Leu Lys Gly Thr Thr Gly Pro Asn Cys Glu Ile
625 630 635 640

Asn Leu Asp Asp Cys Ala Ser Asn Pro Cys Asp Ser Gly Thr Cys Leu
645 650 655

Asp Lys Ile Asp Gly Tyr Glu Cys Ala Cys Glu Pro Gly Tyr Thr Gly
660 665 670

Ser Met Cys Asn Val Asn Ile Asp Glu Cys Ala Gly Ser Pro Cys His

675					680					685						
Asn	Gly	Gly	Thr	Cys	Glu	Asp	Gly	Ile	Ala	Gly	Phe	Thr	Cys	Arg	Cys	
690					695					700						
Pro	Glu	Gly	Tyr	His	Asp	Pro	Thr	Cys	Leu	Ser	Glu	Val	Asn	Glu	Cys	
705					710					715					720	
Asn	Ser	Asn	Pro	Cys	Ile	His	Gly	Ala	Cys	Arg	Asp	Gly	Leu	Asn	Gly	
725					730					735						
Tyr	Lys	Cys	Asp	Cys	Ala	Pro	Gly	Trp	Ser	Gly	Thr	Asn	Cys	Asp	Ile	
740					745					750						
Asn	Asn	Asn	Glu	Cys	Glu	Ser	Asn	Pro	Cys	Val	Asn	Gly	Gly	Thr	Cys	
755					760					765						
Lys	Asp	Met	Thr	Ser	Gly	Tyr	Val	Cys	Thr	Cys	Arg	Glu	Gly	Phe	Ser	
770					775					780						
Gly	Pro	Asn	Cys	Gln	Thr	Asn	Ile	Asn	Glu	Cys	Ala	Ser	Asn	Pro	Cys	
785					790					795					800	
Leu	Asn	Gln	Gly	Thr	Cys	Ile	Asp	Asp	Val	Ala	Gly	Tyr	Lys	Cys	Asn	
805					810					815						
Cys	Pro	Leu	Pro	Tyr	Thr	Gly	Ala	Thr	Cys	Glu	Val	Val	Leu	Ala	Pro	
820					825					830						
Cys	Ala	Thr	Ser	Pro	Cys	Lys	Asn	Ser	Gly	Val	Cys	Lys	Glu	Ser	Glu	
835					840					845						
Asp	Tyr	Glu	Ser	Phe	Ser	Cys	Val	Cys	Pro	Thr	Gly	Trp	Gln	Gly	Gln	
850					855					860						
Thr	Cys	Glu	Val	Asp	Ile	Asn	Glu	Cys	Val	Lys	Ser	Pro	Cys	Arg	His	
865					870					875					880	
Gly	Ala	Ser	Cys	Gln	Asn	Thr	Asn	Gly	Ser	Tyr	Arg	Cys	Leu	Cys	Gln	
885					890					895						
Ala	Gly	Tyr	Thr	Gly	Arg	Asn	Cys	Glu	Ser	Asp	Ile	Asp	Asp	Cys	Arg	
900					905					910						
Pro	Asn	Pro	Cys	His	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Thr	Asp	Gly	Ile	Asn	Thr	
915					920					925						
Ala	Phe	Cys	Asp	Cys	Leu	Pro	Gly	Phe	Gln	Gly	Ala	Phe	Cys	Glu	Glu	
930					935					940						

Asp Ile Asn Glu Cys Ala Ser Asn Pro Cys Gln Asn Gly Ala Asn Cys
 945 950 955 960

Thr Asp Cys Val Asp Ser Tyr Thr Cys Thr Cys Pro Val Gly Phe Asn
 965 970 975

Gly Ile His Cys Glu Asn Asn Thr Pro Asp Cys Thr Glu Ser Ser Cys
 980 985 990

Phe Asn Gly Gly Thr Cys Val Asp Gly Ile Asn Ser Phe Thr Cys Leu
 995 1000 1005

Cys Pro Pro Gly Phe Thr Gly Ser Tyr Cys Gln Tyr Asp Val Asn
 1010 1015 1020

Glu Cys Asp Ser Arg Pro Cys Leu His Gly Gly Thr Cys Gln Asp
 1025 1030 1035

Ser Tyr Gly Thr Tyr Lys Cys Thr Cys Pro Gln Gly Tyr Thr Gly
 1040 1045 1050

Leu Asn Cys Gln Asn Leu Val Arg Trp Cys Asp Ser Ala Pro Cys
 1055 1060 1065

Lys Asn Gly Gly Arg Cys Trp Gln Thr Asn Thr Gln Tyr His Cys
 1070 1075 1080

Glu Cys Arg Ser Gly Trp Thr Gly Val Asn Cys Asp Val Leu Ser
 1085 1090 1095

Val Ser Cys Glu Val Ala Ala Gln Lys Arg Gly Ile Asp Val Thr
 1100 1105 1110

Leu Leu Cys Gln His Gly Gly Leu Cys Val Asp Glu Gly Asp Lys
 1115 1120 1125

His Tyr Cys His Cys Gln Ala Gly Tyr Thr Gly Ser Tyr Cys Glu
 1130 1135 1140

Asp Glu Val Asp Glu Cys Ser Pro Asn Pro Cys Gln Asn Gly Ala
 1145 1150 1155

Thr Cys Thr Asp Tyr Leu Gly Gly Phe Ser Cys Lys Cys Val Ala
 1160 1165 1170

Gly Tyr His Gly Ser Asn Cys Ser Glu Glu Ile Asn Glu Cys Leu
 1175 1180 1185

Ser	Gln	Pro	Cys	Gln	Asn	Gly	Gly	Thr	Cys	Ile	Asp	Leu	Thr	Asn
1190						1195					1200			
Ser	Tyr	Lys	Cys	Ser	Cys	Pro	Arg	Gly	Thr	Gln	Gly	Val	His	Cys
1205						1210					1215			
Glu	Ile	Asn	Val	Asp	Asp	Cys	His	Pro	Pro	Leu	Asp	Pro	Ala	Ser
1220						1225					1230			
Arg	Ser	Pro	Lys	Cys	Phe	Asn	Asn	Gly	Thr	Cys	Val	Asp	Gln	Val
1235						1240					1245			
Gly	Gly	Tyr	Thr	Cys	Thr	Cys	Pro	Pro	Gly	Phe	Val	Gly	Glu	Arg
1250						1255					1260			
Cys	Glu	Gly	Asp	Val	Asn	Glu	Cys	Leu	Ser	Asn	Pro	Cys	Asp	Pro
1265						1270					1275			
Arg	Gly	Thr	Gln	Asn	Cys	Val	Gln	Arg	Val	Asn	Asp	Phe	His	Cys
1280						1285					1290			
Glu	Cys	Arg	Ala	Gly	His	Thr	Gly	Arg	Arg	Cys	Glu	Ser	Val	Ile
1295						1300					1305			
Asn	Gly	Cys	Arg	Gly	Lys	Pro	Cys	Lys	Asn	Gly	Gly	Val	Cys	Ala
1310						1315					1320			
Val	Ala	Ser	Asn	Thr	Ala	Arg	Gly	Phe	Ile	Cys	Arg	Cys	Pro	Ala
1325						1330					1335			
Gly	Phe	Glu	Gly	Ala	Thr	Cys	Glu	Asn	Asp	Ala	Arg	Thr	Cys	Gly
1340						1345					1350			
Ser	Leu	Arg	Cys	Leu	Asn	Gly	Gly	Thr	Cys	Ile	Ser	Gly	Pro	Arg
1355						1360					1365			
Ser	Pro	Thr	Cys	Leu	Cys	Leu	Gly	Ser	Phe	Thr	Gly	Pro	Glu	Cys
1370						1375					1380			
Gln	Phe	Pro	Ala	Ser	Ser	Pro	Cys	Val	Gly	Ser	Asn	Pro	Cys	Tyr
1385						1390					1395			
Asn	Gln	Gly	Thr	Cys	Glu	Pro	Thr	Ser	Glu	Asn	Pro	Phe	Tyr	Arg
1400						1405					1410			
Cys	Leu	Cys	Pro	Ala	Lys	Phe	Asn	Gly	Leu	Leu	Cys	His	Ile	Leu
1415						1420					1425			

Asp	Tyr	Ser	Phe	Thr	Gly	Gly	Ala	Gly	Arg	Asp	Ile	Pro	Pro	Pro
1430						1435					1440			
Gln	Ile	Glu	Glu	Ala	Cys	Glu	Leu	Pro	Glu	Cys	Gln	Val	Asp	Ala
1445						1450					1455			
Gly	Asn	Lys	Val	Cys	Asn	Leu	Gln	Cys	Asn	Asn	His	Ala	Cys	Gly
1460						1465					1470			
Trp	Asp	Gly	Gly	Asp	Cys	Ser	Leu	Asn	Phe	Asn	Asp	Pro	Trp	Lys
1475						1480					1485			
Asn	Cys	Thr	Gln	Ser	Leu	Gln	Cys	Trp	Lys	Tyr	Phe	Ser	Asp	Gly
1490						1495					1500			
His	Cys	Asp	Ser	Gln	Cys	Asn	Ser	Ala	Gly	Cys	Leu	Phe	Asp	Gly
1505						1510					1515			
Phe	Asp	Cys	Gln	Leu	Thr	Glu	Gly	Gln	Cys	Asn	Pro	Leu	Tyr	Asp
1520						1525					1530			
Gln	Tyr	Cys	Lys	Asp	His	Phe	Ser	Asp	Gly	His	Cys	Asp	Gln	Gly
1535						1540					1545			
Cys	Asn	Ser	Ala	Glu	Cys	Glu	Trp	Asp	Gly	Leu	Asp	Cys	Ala	Glu
1550						1555					1560			
His	Val	Pro	Glu	Arg	Leu	Ala	Ala	Gly	Thr	Leu	Val	Leu	Val	Val
1565						1570					1575			
Leu	Leu	Pro	Pro	Asp	Gln	Leu	Arg	Asn	Asn	Ser	Phe	His	Phe	Leu
1580						1585					1590			
Arg	Glu	Leu	Ser	His	Val	Leu	His	Thr	Asn	Val	Val	Phe	Lys	Arg
1595						1600					1605			
Asp	Ala	Gln	Gly	Gln	Gln	Met	Ile	Phe	Pro	Tyr	Tyr	Gly	His	Glu
1610						1615					1620			
Glu	Glu	Leu	Arg	Lys	His	Pro	Ile	Lys	Arg	Ser	Thr	Val	Gly	Trp
1625						1630					1635			
Ala	Thr	Ser	Ser	Leu	Leu	Pro	Gly	Thr	Ser	Gly	Gly	Arg	Gln	Arg
1640						1645					1650			
Arg	Glu	Leu	Asp	Pro	Met	Asp	Ile	Arg	Gly	Ser	Ile	Val	Tyr	Leu
1655						1660					1665			
Glu	Ile	Asp	Asn	Arg	Gln	Cys	Val	Gln	Ser	Ser	Ser	Gln	Cys	Phe

1670	1675	1680
Gln Ser Ala Thr Asp Val 1685	Ala Ala Phe Leu Gly 1690	Ala Leu Ala Ser 1695
Leu Gly Ser Leu Asn Ile 1700	Pro Tyr Lys Ile Glu 1705	Ala Val Lys Ser 1710
Glu Pro Val Glu Pro Pro 1715	Leu Pro Ser Gln Leu 1720	His Leu Met Tyr 1725
Val Ala Ala Ala Ala Phe 1730	Val Leu Leu Phe Phe 1735	Val Gly Cys Gly 1740
Val Leu Leu Ser Arg Lys 1745	Arg Arg Arg Gln His 1750	Gly Gln Leu Trp 1755
Phe Pro Glu Gly Phe Lys 1760	Val Ser Glu Ala Ser 1765	Lys Lys Lys Arg 1770
Arg Glu Pro Leu Gly Glu 1775	Asp Ser Val Gly Leu 1780	Lys Pro Leu Lys 1785
Asn Ala Ser Asp Gly Ala 1790	Leu Met Asp Asp Asn 1795	Gln Asn Glu Trp 1800
Gly Asp Glu Asp Leu Glu 1805	Thr Lys Lys Phe Arg 1810	Phe Glu Glu Pro 1815
Val Val Leu Pro Asp Leu 1820	Ser Asp Gln Thr Asp 1825	His Arg Gln Trp 1830
Thr Gln Gln His Leu Asp 1835	Ala Ala Asp Leu Arg 1840	Met Ser Ala Met 1845
Ala Pro Thr Pro Pro Gln 1850	Gly Glu Val Asp Ala 1855	Asp Cys Met Asp 1860
Val Asn Val Arg Gly Pro 1865	Asp Gly Phe Thr Pro 1870	Leu Met Ile Ala 1875
Ser Cys Ser Gly Gly Gly 1880	Leu Glu Thr Gly Asn 1885	Ser Glu Glu Glu 1890
Glu Asp Ala Pro Ala Val 1895	Ile Ser Asp Phe Ile 1900	Tyr Gln Gly Ala 1905
Ser Leu His Asn Gln Thr 1910	Asp Arg Thr Gly Glu 1915	Thr Ala Leu His 1920

Leu	Ala	Ala	Arg	Tyr	Ser	Arg	Ser	Asp	Ala	Ala	Lys	Arg	Leu	Leu
1925						1930					1935			
Glu	Ala	Ser	Ala	Asp	Ala	Asn	Ile	Gln	Asp	Asn	Met	Gly	Arg	Thr
1940						1945					1950			
Pro	Leu	His	Ala	Ala	Val	Ser	Ala	Asp	Ala	Gln	Gly	Val	Phe	Gln
1955						1960					1965			
Ile	Leu	Leu	Arg	Asn	Arg	Ala	Thr	Asp	Leu	Asp	Ala	Arg	Met	His
1970						1975					1980			
Asp	Gly	Thr	Thr	Pro	Leu	Ile	Leu	Ala	Ala	Arg	Leu	Ala	Val	Glu
1985						1990					1995			
Gly	Met	Leu	Glu	Asp	Leu	Ile	Asn	Ser	His	Ala	Asp	Val	Asn	Ala
2000						2005					2010			
Val	Asp	Asp	Leu	Gly	Lys	Ser	Ala	Leu	His	Trp	Ala	Ala	Ala	Val
2015						2020					2025			
Asn	Asn	Val	Asp	Ala	Ala	Val	Val	Leu	Leu	Lys	Asn	Gly	Ala	Asn
2030						2035					2040			
Lys	Asp	Met	Gln	Asn	Asn	Lys	Glu	Glu	Thr	Pro	Leu	Phe	Leu	Ala
2045						2050					2055			
Ala	Arg	Glu	Gly	Ser	Tyr	Glu	Thr	Ala	Lys	Val	Leu	Leu	Asp	His
2060						2065					2070			
Phe	Ala	Asn	Arg	Asp	Ile	Thr	Asp	His	Met	Asp	Arg	Leu	Pro	Arg
2075						2080					2085			
Asp	Ile	Ala	Gln	Glu	Arg	Met	His	His	Asp	Ile	Val	Arg	Leu	Leu
2090						2095					2100			
Asp	Glu	Tyr	Asn	Leu	Val	Arg	Ser	Pro	Gln	Leu	His	Gly	Thr	Ala
2105						2110					2115			
Leu	Gly	Gly	Thr	Pro	Thr	Leu	Ser	Pro	Thr	Leu	Cys	Ser	Pro	Asn
2120						2125					2130			
Gly	Tyr	Leu	Gly	Asn	Leu	Lys	Ser	Ala	Thr	Gln	Gly	Lys	Lys	Ala
2135						2140					2145			
Arg	Lys	Pro	Ser	Thr	Lys	Gly	Leu	Ala	Cys	Gly	Ser	Lys	Glu	Ala
2150						2155					2160			

Lys Asp	Leu Lys Ala Arg	Arg	Lys Lys Ser Gln Asp	Gly Lys Gly
2165		2170		2175
Cys Leu	Leu Asp Ser Ser	Ser	Met Leu Ser Pro Val	Asp Ser Leu
2180		2185		2190
Glu Ser	Pro His Gly Tyr	Leu	Ser Asp Val Ala Ser	Pro Pro Leu
2195		2200		2205
Leu Pro	Ser Pro Phe Gln Gln	Ser	Pro Ser Met Pro	Leu Ser His
2210		2215		2220
Leu Pro	Gly Met Pro Asp Thr	His	Leu Gly Ile Ser	His Leu Asn
2225		2230		2235
Val Ala	Ala Lys Pro Glu Met	Ala	Ala Leu Ala Gly	Gly Ser Arg
2240		2245		2250
Leu Ala	Phe Glu Pro Pro	Pro	Pro Arg Leu Ser	His Leu Pro Val
2255		2260		2265
Ala Ser	Ser Ala Ser Thr Val	Leu	Ser Thr Asn Gly	Thr Gly Ala
2270		2275		2280
Met Asn	Phe Thr Val Gly Ala	Pro	Ala Ser Leu Asn	Gly Gln Cys
2285		2290		2295
Glu Trp	Leu Pro Arg Leu Gln	Asn	Gly Met Val Pro	Ser Gln Tyr
2300		2305		2310
Asn Pro	Leu Arg Pro Gly Val	Thr	Pro Gly Thr Leu	Ser Thr Gln
2315		2320		2325
Ala Ala	Gly Leu Gln His Ser	Met	Met Gly Pro Leu	His Ser Ser
2330		2335		2340
Leu Ser	Thr Asn Thr Leu Ser	Pro	Ile Ile Tyr Gln	Gly Leu Pro
2345		2350		2355
Asn Thr	Arg Leu Ala Thr Gln	Pro	His Leu Val Gln	Thr Gln Gln
2360		2365		2370
Val Gln	Pro Gln Asn Leu Gln	Leu	Gln Pro Gln Asn	Leu Gln Pro
2375		2380		2385
Pro Ser	Gln Pro His Leu Ser	Val	Ser Ser Ala Ala	Asn Gly His
2390		2395		2400

Leu Gly Arg Ser Phe Leu Ser Gly Glu Pro Ser Gln Ala Asp Val
2405 2410 2415

Gln Pro Leu Gly Pro Ser Ser Leu Pro Val His Thr Ile Leu Pro
2420 2425 2430

Gln Glu Ser Gln Ala Leu Pro Thr Ser Leu Pro Ser Ser Met Val
2435 2440 2445

Pro Pro Met Thr Thr Thr Gln Phe Leu Thr Pro Pro Ser Gln His
2450 2455 2460

Ser Tyr Ser Ser Ser Pro Val Asp Asn Thr Pro Ser His Gln Leu
2465 2470 2475

Gln Val Pro Glu His Pro Phe Leu Thr Pro Ser Pro Glu Ser Pro
2480 2485 2490

Asp Gln Trp Ser Ser Ser Ser Pro His Ser Asn Ile Ser Asp Trp
2495 2500 2505

Ser Glu Gly Ile Ser Ser Pro Pro Thr Thr Met Pro Ser Gln Ile
2510 2515 2520

Thr His Ile Pro Glu Ala Phe Lys
2525 2530

<210> 58
<211> 119
<212> БІЛОК
<213> Штучний

<220>
<223> Синтетичний

<400> 58

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

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

Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

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

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

Ala Arg Gly Ser Gly Phe Arg Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 59
<211> 108
<212> БІЛЮК
<213> Штучний

<220>
<223> Синтетичний

<400> 59

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

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

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

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

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

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

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

<210> 60
<211> 119
<212> БІЛЮК
<213> Штучний

<220>
<223> Синтетичний

<400> 60

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

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

Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Arg Ile Asn Pro Pro Asn Gly Ser Ala His Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Ser Gly Phe Arg Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 61
<211> 108
<212> БИЛОК
<213> Штучний

<220>
<223> Синтетичний

<400> 61

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

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

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

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

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

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

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

<210> 62
 <211> 119
 <212> БІЛЮК
 <213> Штучний

<220>
 <223> Синтетичний

<400> 62

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

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

Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Arg Ile Asn Pro Pro Asn Arg Ser Asn Gln Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Ser Gly Phe Arg Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 63
 <211> 108
 <212> БІЛЮК
 <213> Штучний

<220>
 <223> Синтетичний

<400> 63

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

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

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

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

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

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

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

<210> 64
<211> 119
<212> БИЛОК
<213> Штучний

<220>
<223> Синтетичний

<400> 64

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

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

Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

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

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

Ala Arg Gly Ser Gly Phe Arg Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 65
<211> 101
<212> БИЛОК
<213> Штучний

<220>
<223> Синтетичний

<400> 65

```

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

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

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

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

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

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

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

```

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Ізольоване антитіло проти області негативної регуляції (NRR) Notch1, де вказане антитіло зв'язує NRR Notch 1 з $K_d 1 \times 10^{-7}$ або сильніше, і де вказане антитіло у випадку зв'язування з вказаною NRR Notch1 знижує передачу сигналів Notch1, і де антитіло містить HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, де кожна відповідно містить:
 - (i) SEQ ID NO: 7, 8, 9, 1, 2, 6;
 - 10 (ii) SEQ ID NO: 7, 8, 10, 1, 3, 6;
 - (iii) SEQ ID NO: 7, 8, 11, 1, 4, 6 або
 - (iv) SEQ ID NO: 7, 8, 12, 1, 5, 6.
2. Антитіло за п. 1, в якому модифікація являє собою заміну, інсерцію або делецію.
3. Виділене антитіло проти області негативної регуляції (NRR) Notch1, яке знижує передачу сигналів Notch1, де антитіло містить:
 - 15 (i) послідовність HVR-H1, що містить послідовність SEQ ID NO: 1;
 - (ii) послідовність HVR-H2, що містить послідовність SEQ ID NO: 2, 3, 4 або 5;
 - (iii) послідовність HVR-H3, що містить послідовність SEQ ID NO: 6;
 - (iv) послідовність HVR-L1, що містить послідовність SEQ ID NO: 7;
 - 20 (v) послідовність HVR-L2, що містить послідовність SEQ ID NO: 8 і
 - (vi) послідовність HVR-L3, що містить послідовність SEQ ID NO: 9, 10, 11 або 12.
4. Антитіло за п. 3, де антитіло містить HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, де кожна область по порядку містить послідовності SEQ ID NO: 7, 8, 9, 1, 2, 6.
5. Антитіло за п. 3, де антитіло містить HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, де кожна область по порядку містить послідовності SEQ ID NO: 7, 8, 10, 1, 3, 6.
- 25 6. Антитіло за п. 3, де антитіло містить HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, де кожна область по порядку містить послідовності SEQ ID NO: 7, 8, 11, 1, 4, 6.
7. Антитіло за п. 3, де антитіло містить HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, де кожна область по порядку містить послідовності SEQ ID NO: 7, 8, 12, 1, 5, 6.
- 30 8. Антитіло, яке конкурує з антитілом за будь-яким з пп. 4-7 за зв'язування з NRR Notch1.
9. Антитіло за будь-яким з пп. 1-7, яке містить каркасну послідовність, де щонайменше частина каркасної послідовності являє собою консенсусну каркасну послідовність людини.
10. Антитіло за будь-яким з пп. 1-7, де антитіло містить консенсусну каркасну послідовність підгрупи к людини.
- 35 11. Антитіло за будь-яким з пп. 1-7, де антитіло містить консенсусну каркасну послідовність підгрупи III важкого ланцюга людини.
12. Антитіло за п. 11, де антитіло містить заміну в одному або декількох положеннях 71, 73 або 78.

13. Антитіло за п. 12, в якому заміна являє собою одну або декілька з R71A, N73T або N78A.
14. Полінуклеотид, який кодує антитіло за будь-яким з пп. 1-13.
15. Вектор, який містить полінуклеотид за п. 14.
16. Вектор за п. 15, де вектор є експресуючим вектором.
- 5 17. Клітина-хазяїн, яка містить вектор за п. 15 або 16.
18. Клітина-хазяїн за п. 17, де клітина-хазяїн є прокаріотичною клітиною.
19. Клітина-хазяїн за п. 17, де клітина-хазяїн є еукаріотичною клітиною.
20. Клітина-хазяїн за п. 19, де клітина-хазяїн є клітиною ссавця.
21. Спосіб одержання анти-NRR Notch1-антитіла за п. 1, який включає (а) експресію вектора за
- 10 п. 16 у придатній клітині-хазяїні, і (b) витягання антитіла.
22. Спосіб за п. 21, де клітина-хазяїн є прокаріотичною клітиною.
23. Спосіб за п. 21, де клітина-хазяїн є еукаріотичною клітиною.
24. Анти-NRR Notch1-антитіло за будь-яким з пп. 1-13 для застосування як лікарського засобу.
25. Анти-NRR Notch1-антитіло за будь-яким з пп. 1-13 для застосування в способі лікування
- 15 індивідуума, що має порушення, асоційоване з підвищеною передачею сигналів або підвищеною експресією Notch1.
26. Анти-NRR Notch1-антитіло для застосування за п. 25, де вказаним порушенням є злоякісна пухлина, пухлина і/або клітинне проліферативне порушення.
27. Анти-NRR Notch1-антитіло для застосування за п. 26, де вказаною злоякісною пухлиною,
- 20 пухлиною і/або клітинним проліферативним порушенням є рак.
28. Анти-NRR Notch1-антитіло для застосування за п. 25, де вказаним порушенням є нейродегенеративне порушення.
29. Анти-NRR Notch1-антитіло для застосування за п. 25, де порушення включає патологічний стан, асоційований з ангіогенезом.
- 25 30. Анти-NRR Notch1-антитіло для застосування за будь-яким з пп. 25-29, яке додатково включає введення індивідууму ефективної кількості другого лікарського засобу, де першим лікарським засобом є анти-NRR Notch1-антитіло.
31. Анти-NRR Notch1-антитіло для застосування за п. 30, де другим лікарським засобом є інше
- 30 антитіло, хіміотерапевтичний засіб, цитотоксичний засіб, антиангіогенний засіб, імунодепресант, проліки, цитокін, антагоніст цитокіну, цитотоксична променева терапія, кортикостероїд, протиблювотний засіб, протиракова вакцина, анальгетик або інгібуючий ріст засіб.
32. Анти-NRR Notch1-антитіло для застосування за п. 30, де другим лікарським засобом є тамоксифен, летрозол, ексеместан, анастрозол, іринотекан, цетуксимаб, фулвестрант, вінорелбін, ерлотиніб, бевацизумаб, вінкрисдин, іматиніб, сорафеніб, лапатиніб або
- 35 трастузумаб.
33. Анти-NRR Notch1-антитіло для застосування за пп. 30-32, де другий лікарський засіб вводять до або після введення анти-NRR Notch1-антитіла.
34. Анти-NRR Notch1-антитіло для застосування за пп. 30-32, де другий лікарський засіб вводять одночасно з анти-NRR Notch1-антитілом.
- 40 35. Анти-NRR Notch1-антитіло для застосування за пп. 25-34, де вказаним індивідуумом є людина.
36. Анти-NRR Notch1-антитіло для застосування за п. 25, де порушення у індивідуума асоційоване з активуючою мутацією в амінокислотній послідовності Notch1.
- 45 37. Композиція, яка містить анти-NRR Notch1-антитіло за будь-яким з пп. 1-13 і фармацевтичний носій.

№ клону	H1										
	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	
Антитіло A	G	F	T	F	S	S	Y	W	I	H	
Антитіло A-1	G	F	T	F	S	S	Y	W	I	H	
Антитіло A-2	G	F	T	F	S	S	Y	W	I	H	
Антитіло A-3	G	F	T	F	S	S	Y	W	I	H	

№ клону	H2																	
	49	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
Антитіло A	A	R	I	N	P	S	N	G	S	T	N	Y	A	D	S	V	K	G
Антитіло A-1	A	R	I	N	P	P	N	G	S	A	H	Y	A	D	S	V	K	G
Антитіло A-2	A	R	I	N	P	P	N	R	S	N	Q	Y	A	D	S	V	K	G
Антитіло A-3	A	R	I	N	P	A	N	G	S	T	R	Y	A	D	S	V	K	G

№ клону	H3												
	93	94	95	96	97	98	99	100	A	B	101	102	
Антитіло A	A	R	G	S	G	F	R	W	V	M	D	Y	
Антитіло A-1	A	R	G	S	G	F	R	W	V	M	D	Y	
Антитіло A-2	A	R	G	S	G	F	R	W	V	M	D	Y	
Антитіло A-3	A	R	G	S	G	F	R	W	V	M	D	Y	

Fig. 1-1

№ клону		L1										
		24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
Антитіло	A	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A
Антитіло	A-1	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A
Антитіло	A-2	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A
Антитіло	A-3	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A

№ клону		L2						
		50	51	52	53	54	55	56
Антитіло	A	S	A	S	F	L	Y	S
Антитіло	A-1	S	A	S	F	L	Y	S
Антитіло	A-2	S	A	S	F	L	Y	S
Антитіло	A-3	S	A	S	F	L	Y	S

№ клону		L3							
		89	90	91	92	93	94	95	96
Антитіло	A	Q	Q	S	Y	T	T	P	P
Антитіло	A-1	Q	Q	S	Y	T	T	P	A
Антитіло	A-2	Q	Q	F	Y	T	T	P	S
Антитіло	A-3	Q	Q	S	F	S	T	P	A

Фіг. 1-2

ФІГУРА 2

Антитіло А

HC

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWIHWVRQAPGKGLEWV
ARINPSNGSTNYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSGFRWVMDYWGQ
GTLVTVSS (SEQ ID NO:58)

LC

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSR
FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:59)

Антитіло А-1

HC

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWIHWVRQAPGKGLEWVARINPPNGSAH
YADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSGFRWVMDYWGQGTTLTVSS
(SEQ ID NO:60)

LC

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSR
FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYTTPATFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:61)

Антитіло А-2

HC

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWIHWVRQAPGKGLEWVARINPPNRSNQ
YADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSGFRWVMDYWGQGTTLTVSS
(SEQ ID NO:62)

LC

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSR
FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQFYTTPSTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:63)

Антитіло А-3

HC

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWIHWVRQAPGKGLEWVARINPANGSTR
YADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSGFRWVMDYWGQGTTLTVSS
(SEQ ID NO:64)

LC

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSR
FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSFSTPATFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:65)

I	A	QVQLVQSGAEVKKKPGASVKVSCKASGYTFT	-H1-	WVRQAPGQGLEWMG	-H2-
	B	QVQLVQSGAEVKKKPGASVKVSCKAS	-H1-	WVRQAPGQGLEWM	-H2-
	C	QVQLVQSGAEVKKKPGASVKVSCKAS	-H1-	WVRQAPGQGLEWM	-H2-
	D	QVQLVQSGAEVKKKPGASVKVSCKAS	-H1-	WVRQAPGQGLEWM	-H2-
II					
	A	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSVS	-H1-	WIRQPPGKGLEWIG	-H2-
	B	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVS	-H1-	WIRQPPGKGLEWI	-H2-
	C	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVS	-H1-	WIRQPPGKGLEWI	-H2-
	D	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVS	-H1-	WIRQPPGKGLEWI	-H2-
III					
	A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	-H1-	WVRQAPGKGLEWVS	-H2-
	B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-
	C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-
	D	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-
Акцептор					
	A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK	-H1-	WVRQAPGKGLEWVS	-H2-
	B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-
	C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-
Другой акцептор					
	A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK	-H1-	WVRQAPGKGLEWVS	-H2-
	B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-
	C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-
	D	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-

Fig. 3A

Секвенция	Секвенция	Секвенция	Секвенция
I			
RVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGT L V T V S S	SEQ ID NO:19
RVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGT L V T V S S	SEQ ID NO:20
RVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA	-H3-	WGQGT L V T V S S	SEQ ID NO:21
RVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC	-H3-	WGQGT L V T V S S	SEQ ID NO:22
II			
RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR	-H3-	WGQGT L V T V S S	SEQ ID NO:23
RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR	-H3-	WGQGT L V T V S S	SEQ ID NO:24
RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCA	-H3-	WGQGT L V T V S S	SEQ ID NO:25
RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC	-H3-	WGQGT L V T V S S	SEQ ID NO:26
III			
RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGT L V T V S S	SEQ ID NO:27
RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGT L V T V S S	SEQ ID NO:28
RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA	-H3-	WGQGT L V T V S S	SEQ ID NO:29
RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	-H3-	WGQGT L V T V S S	SEQ ID NO:30
Акцептор			
RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCS	-H3-	WGQGT L V T V S S	SEQ ID NO:31
RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCS	-H3-	WGQGT L V T V S S	SEQ ID NO:32
RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCS	-H3-	WGQGT L V T V S S	SEQ ID NO:33
Другой акцептор			
RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGT L V T V S S	SEQ ID NO:34
RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGT L V T V S S	SEQ ID NO:35
RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCA	-H3-	WGQGT L V T V S S	SEQ ID NO:36
RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC	-H3-	WGQGT L V T V S S	SEQ ID NO:37

Fig. 3B

kv1 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC -L1- WYQQKPGKAPKLLIY
 kv2 DIVMTQSPFLSLPVTGPGEPAISIC -L1- WYLQKPGQSPQLLIY
 kv3 EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC -L1- WYQQKPGQAPRLLIY
 kv4 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC -L1- WYQQKPGQPPLLIY

kv1 -L2- GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC -L3- FGQGTKVEIK SEQ ID NO:38
 kv2 -L2- GVPDRFSGSGSGTDFTLTKISRVEAEDVGVYYC -L3- FGQGTKVEIK SEQ ID NO:39
 kv3 -L2- GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC -L3- FGQGTKVEIK SEQ ID NO:40
 kv4 -L2- GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC -L3- FGQGTKVEIK SEQ ID NO:41

Fig. 4

Каркасні послідовності легкого ланцюга huMAb4D5-8

LC-FR1 ¹Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys²³ (SEQ ID NO:15)
 LC-FR2 ³⁵Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr⁴⁹ (SEQ ID NO:16)
 LC-FR3 ⁵⁷Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys⁸⁸ (SEQ ID NO:17)
 LC-FR4 ⁹⁸Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys¹⁰⁷ (SEQ ID NO:18)

Каркасні послідовності важкого ланцюга huMAb4D5-8

HC-FR1 ¹Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser²⁵ (SEQ ID NO:42)
 HC-FR2 ³⁶Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val⁴⁸ (SEQ ID NO:43)
 HC-FR3 ⁶⁶Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn⁸³ Ser^{83a} Leu^{83b} Arg^{83c} Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys⁹² (SEQ ID NO:44)
 HC-FR4 ¹⁰³Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser¹¹³ (SEQ ID NO:45)

Fig. 5

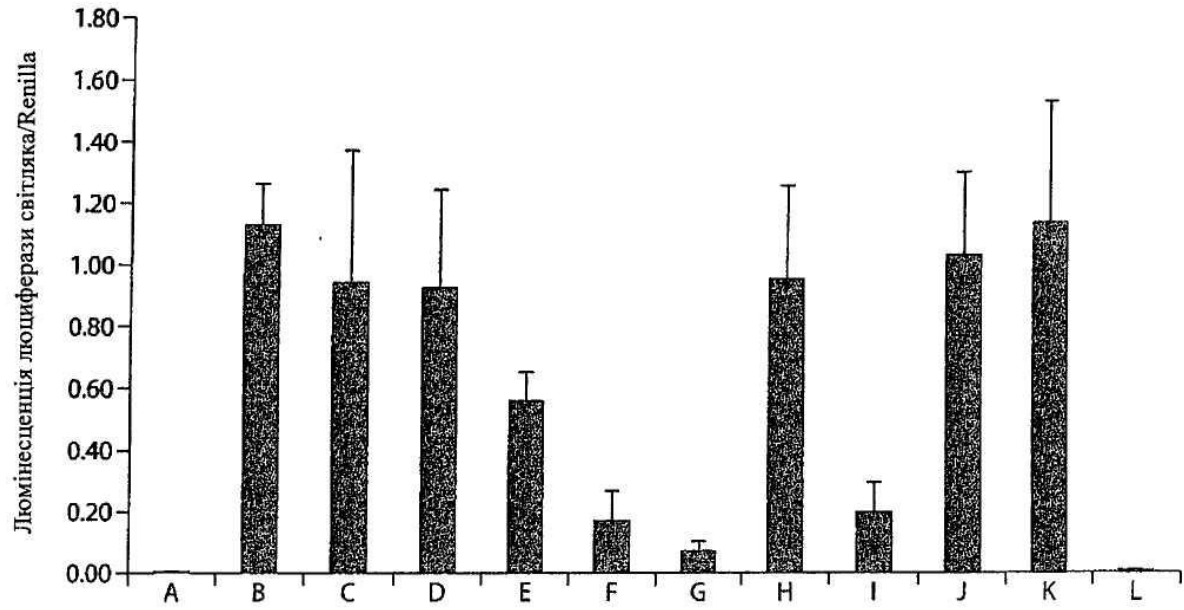
Каркасні послідовності легкого ланцюга huMAb4D5-8, модифіковані в положенні 66 (підкреслено)

- LC-FR1 ¹Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys²³ (SEQ ID NO:15)
- LC-FR2 ³⁵Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr⁴⁹ (SEQ ID NO:16)
- LC-FR3 ⁵⁷Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys⁸⁸ (SEQ ID NO:46)
- LC-FR4 ⁹⁸Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys¹⁰⁷ (SEQ ID NO:18)

Каркасні послідовності важкого ланцюга huMAb4D5-8, модифіковані в положеннях 71, 73 і 78 (підкреслено)

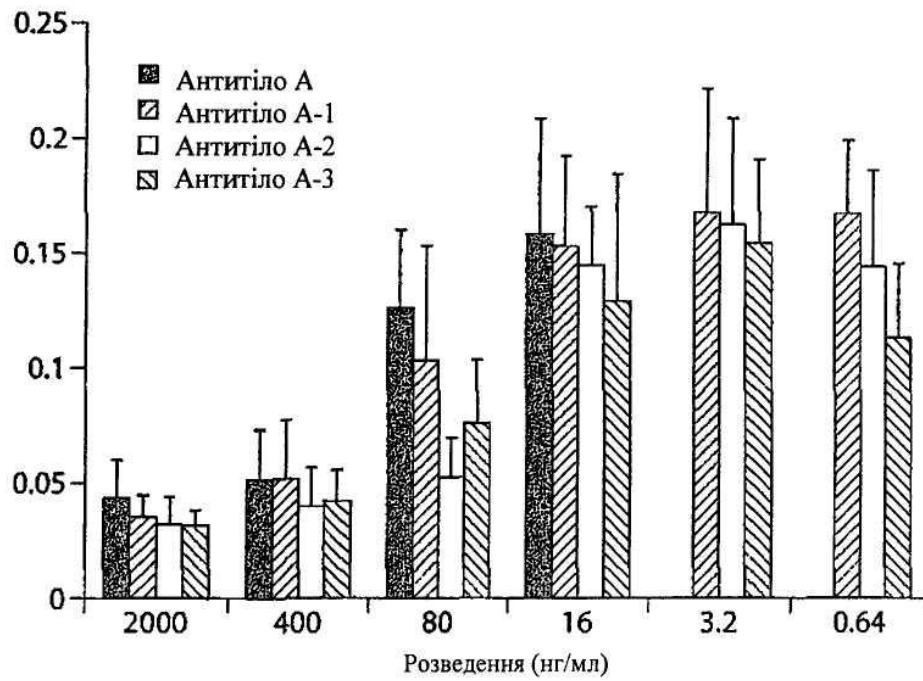
- HC-FR1 ¹Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser²⁵ (SEQ ID NO:42)
- HC-FR2 ³⁶Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val⁴⁸ (SEQ ID NO:43)
- HC-FR3 ⁶⁶Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn⁸³ Ser^{83a} Leu^{83b} Arg^{83c} Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys⁹² (SEQ ID NO:47)
- HC-FR4 ¹⁰³Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser¹¹³ (SEQ ID NO:45)

Fig. 6

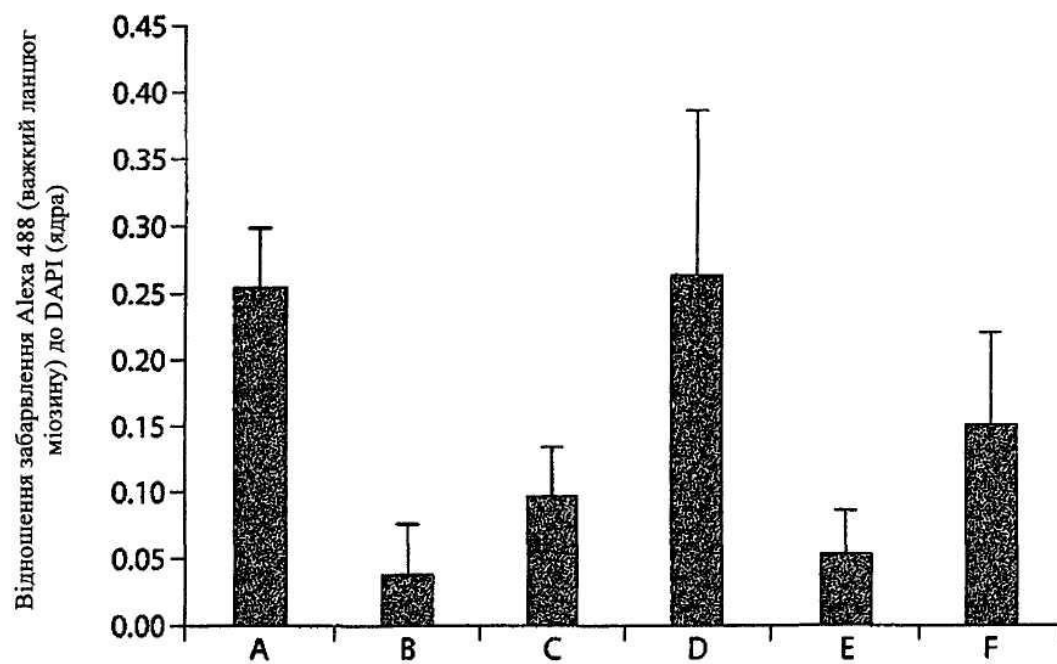


Фіг. 7

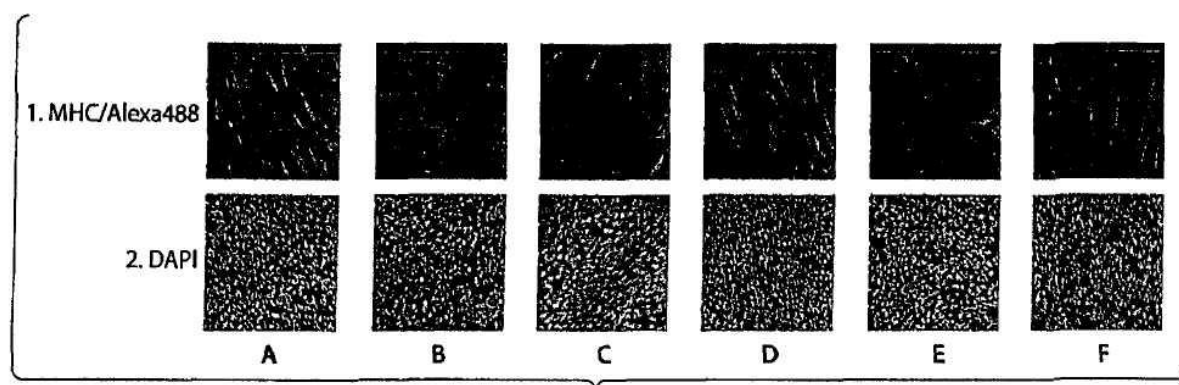
Порівняння варіантів антитіл



Фіг. 8



Фіг. 9



Фіг. 10

Ідентичність 90,7% при поєднанні 2556 залишків; 1,0%

Людина	1	MPPLLAPLLCLALLPALAARGPRCSQPGETCLNGGKCEAANGTEACVCGGAFVGPQRQDP	
Миша	1	MPRLLTPLLCLTLLPALAARGLRCSQPSGTCLNGGRCEVASGTEACVCSGAFVGPQRQDS	
		*** **	
		Сигнальний пептид	EGF1
Людина	61	NPCLSTPCKNAGTCHVVDRRGVADYACSCALGFSGPLCLTPLDNACLTPCRNGGTCDLL	
Миша	61	NPCLSTPCKNAGTCHVVDHGGTVDYACSCPLGFSGPLCLTPLDNACLANPCRNGGTCDLL	

		EGF2	EGF3
Людина	121	TLTEYKCRCPGWSGKSCQQAADPCASNPCANGGQCLPFEASYICHCPPSFHGPTCRQDVN	
Миша	121	TLTEYKCRCPGWSGKSCQQAADPCASNPCANGGQCLPFESSYICRCPGFHGPTCRQDVN	

		EGF4	
Людина	181	ECGQKPGLCRHGGTCHNEVGSYRCVCRATHTGPNCRPYVPCSPSPCQNGGTCRPTGDTV	
Миша	181	ECSQNPGLCRHGGTCHNEIGSYRCACRATHTGPHCELPHYVPCSPSPCQNGGTCRPTGDTT	
		** *	
		EGF5	EGF6
Людина	241	HECACLPGFTGQNCENIDDCPGNNCKNGGACVDGVNTYNCRCPPFWTGQYCTEDVDECQ	
Миша	241	HECACLPGFAGQNCENVDDCPGNNCKNGGACVDGVNTYNCRCPPFWTGQYCTEDVDECQ	

		EGF7	EGF8
Людина	301	LMPNACQNGGTCHNTHGGYNCVCVNGWTGEDCSENIDDCASAACTHGATCHDRVASFYCE	
Миша	301	LMPNACQNGGTCHNTHGGYNCVCVNGWTGEDCSENIDDCASAACTHGATCHDRVASFYCE	

		EGF9	
Людина	361	CPHGRTGLLCHLNDACISNPCNEGSNCDTNPVNGKAICTCPSGYTGFPACSQDVDECSLGA	
Миша	361	CPHGRTGLLCHLNDACISNPCNEGSNCDTNPVNGKAICTCPSGYTGFPACSQDVDECSLGA	

		EGF10	EGF11
Людина	421	NPCEHAGKCINTLGSFECQCLQGYTGPRCEIDVNECVSNPCQNDATCLDQIGFQICMP	
Миша	421	NPCEHAGKCLNTLGSFECQCLQGYTGPRCEIDVNECVSNPCQNDATCLDQIGFQICMP	

		EGF12	
Людина	481	GYEGVHCEVNTDECASSPCLHNGRCLDKINEFQCECPTGFTGHLCOYDVDECASTPCKNG	
Миша	481	GYEGVYCEINTDECASSPCLHNGHCLDKINEFQCECPTGFTGHLCOYDVDECASTPCKNG	

		EGF13	EGF14
Людина	541	AKCLDGPNTYTCVCTEGYTGTGHEVDIDECDPDPCHYGSKDG VATFTCLCRPGYTGHHC	
Миша	541	AKCLDGPNTYTCVCTEGYTGTGHEVDIDECDPDPCHYGSKDG VATFTCLCQPGYTGHHC	

		EGF15	
Людина	601	ETNINECSSQPCRHHGGTCQDRDNAYLCFLKGTGPNCEINLDDCASSPCDSGTCLDKID	
Миша	601	ETNINECHSQPCRHHGGTCQDRDNAYLCFLKGTGPNCEINLDDCASNPCDSGTCLDKID	

		EGF16	EGF17

Фіг. 11-1

Людина	661	GYECACEPGYTGSMCNINIDECAGNPCHNGGTCEDGINGFTCRCPGYHDPTCLSEVNEC	
Миша	661	GYECACEPGYTGSMCNVNIDECAGSPCHNGGTCEDGIAGFTCRCPGYHDPTCLSEVNEC	
		*****	*****
		EGF18	EGF19
Людина	721	NSNPCVHGACRDSLNGYKCDPWSGTNCDINNNECESNPCVNGGTCKDMTSGYVCTCR	
Миша	721	NSNPCIHGACRDGLNGYKCDAPGWSGTNCDINNNECESNPCVNGGTCKDMTSGYVCTCR	
		*****	*****
		EGF20	
Людина	781	EGFSGPNCQTNINECASNPCLNQGTICDDVAGYKCNCLLPYTGATCEVVLAPCAPSPCRN	
Миша	781	EGFSGPNCQTNINECASNPCLNQGTICDDVAGYKCNCLLPYTGATCEVVLAPCATSPCKN	
		*****	*****
		EGF21	EGF22
Людина	841	GGECROSEDYESFSCVCPTGWQGTCEVDINECVLSPCRHGASCQNTGGYRCHCQAGYS	
Миша	841	SGVCKESEDYESFSCVCPTGWQGTCEVDINECVKSPCRHGASCQNTNGSYRCLCQAGYT	
		* *	* * *
		EGF23	
Людина	901	GRNCETDIDDCRPNPCHNGGCTDGINAFCDCLPGFRGTFCEEDINECASDPCRNAGNC	
Миша	901	GRNCESDIDDCRPNPCHNGGCTDGINAFCDCLPGFQGAFCEDINECASNPCQNGANC	
		*****	*****
		EGF24	EGF25
Людина	961	TDCVDSYTCTCPAGFSGIHCENNTPDCTESSCFNGGTCVDGINSFTCLCPPGFTGSYCOH	
Миша	961	TDCVDSYTCTCPVGFNGIHCENNTPDCTESSCFNGGTCVDGINSFTCLCPPGFTGSYCOY	
		*****	*****
		EGF26	
Людина	1021	DVNECDSQPC LHGGTCQDGC SYRCTCPQGYTGPNCONLVHWCSSPCKNGGKCWQHTQ	
Миша	1021	DVNECDSRPLHGGTCQDSYGTCTCPQGYTGLNCONLVRWCDAPCKNGGRCWQHTNTQ	
		*****	*****
		EGF27	EGF28
Людина	1081	YRCECPSGWTGLYCDVPSVSCEVAAQRQGV DVARLCQHGGCLVDAGNTHHCRCQAGYTGS	
Миша	1081	YHCECRSGWTGVNCDVLSVSCEVAAQKRGIDVTLLCQHGGCLVDEGDKHYCHCQAGYTGS	
		* * *	* * *
		EGF29	
Людина	1141	YCEDLVDECSPPCQNGATCTDYLGGYSCKCVAGYHGVCNSEEIDECLSHPCQNGGTCLD	
Миша	1141	YCEDEVDECSNP CQNGATCTDYLGGFSCKCVAGYHGSNCSEEINECLSQPCQNGGTCLD	
		*****	*****
		EGF30	EGF31
Людина	1201	LPNTYKCS CPRGTQGVHCEINVDDCNPPVDPVSRSPKCFNNGTCVDQVGGYSCTCPPGFV	
Миша	1201	LTNSYKCS CPRGTQGVHCEINVDDCHPPLDPASRSPKCFNNGTCVDQVGGYTCTCPPGFV	
		* *	* * *
		EGF32	Імуноген (початок)
Людина	1261	GERCEGDVNECLSNPCDARGTQNCVQRVNDFHCECRAGHTGRRCESVINGCKGPKCKNGG	
Миша	1261	GERCEGDVNECLSNPCDPRGTQNCVQRVNDFHCECRAGHTGRRCESVINGCRGKPKCKNGG	
		*****	*****
		EGF33	EGF34

Fig. 11-2

Людина	1321	TCAVASNTARGFICKCPAGFEGATCENDARTCGSLRCLNGGTCISGPRSP TCLCLGPF
Миша	1321	VCAVASNTARGFICKCPAGFEGATCENDARTCGSLRCLNGGTCISGPRSP TCLCLGSFTG

		EGF35
Людина	1381	PECQFPASSPCLGGNPCYNQGTCEPTSESPFYRCLCPAKFNGLLCHILDYSFGGGAGRDI
Миша	1381	PECQFPASSPCVGSNPCYNQGTCEPTSENFYRCLCPAKFNGLLCHILDYSFTGGAGRDI

		EGF36
Людина	1441	PPPLIEEACELPECQEDAGNKVCSLQCNHACGWDGGDCSLNFNDPWKNCTQSLQCWKYF
Миша	1441	PPPQIEEACELPECQVDAGNKVCNLQCNHACGWDGGDCSLNFNDPWKNCTQSLQCWKYF

		LNR_A LNR_B
Людина	1501	SDGHCDSDQNSAGCLFDGFDQRAEGQCNPLYDQYCKDHFS
Миша	1501	SDGHCDSDQNSAGCLFDGFDQTEGQCNPLYDQYCKDHFS

		LNR_C
Людина	1561	CAEHVPERLAAGTLVVVVLPPEQLRNSSFHFLRELSRVLHTNVVFKRDAHQQMIFPY
Миша	1561	CAEHVPERLAAGTLVLVLLPPDQLRNSSFHFLRELSHVLHTNVVFKRDAQQOMIFPY

		HD-N
Людина	1621	GREEELRKHPKRAAEGWAAPDALLGQVKASLLPGGSEGGRRRRELDPMRVRSIVYLEI
Миша	1621	GHEEELRKHPKIRSTVGWAT-----SSLLPGTS-GGRQRRELDPMRDIRGSIVYLEI
		* ***** *
		S1↑ HD-C
		Імуноген (кінець)
Людина	1681	DNRQCVQASSQCFQSATDVA AFLGALASLGS LNIPYKIEAVQSETVEPPPPAQLHFMVYA
Миша	1671	DNRQCVQSSSQCFQSATDVA AFLGALASLGS LNIPYKIEAVKSEPVEPPLPSQLHLMVYA

		S2↑ TM
Людина	1741	AAAFVLLFFVGCGLVLLSRKRRRQHGLWFPEGFKVSEASKKKRREPLGEDSVGLKPLKNA
Миша	1731	AAAFVLLFFVGCGLVLLSRKRRRQHGLWFPEGFKVSEASKKKRREPLGEDSVGLKPLKNA

Людина	1801	SDGALMDDNQNEWGDEDELETKKFRFEEPVVLPDLDDQTDHRQWTOQHLDAA DLRMSAMAP
Миша	1791	SDGALMDDNQNEWGDEDELETKKFRFEEPVVLPDLSDQTDHRQWTOQHLDAA DLRMSAMAP

Людина	1861	TPPQGEVDADCMDVNVRGPDGFTPLMIASCSGGLETGNSEEEEDAPAVISDFIYQGASL
Миша	1851	TPPQGEVDADCMDVNVRGPDGFTPLMIASCSGGLETGNSEEEEDAPAVISDFIYQGASL

Людина	1921	HNQTDRTGETALHLAARYSRSDAAKRLLEASADANIQDNMGRTPLHAAVSADAQGVFQIL
Миша	1911	HNQTDRTGETALHLAARYSRSDAAKRLLEASADANIQDNMGRTPLHAAVSADAQGVFQIL

Fig. 11-3

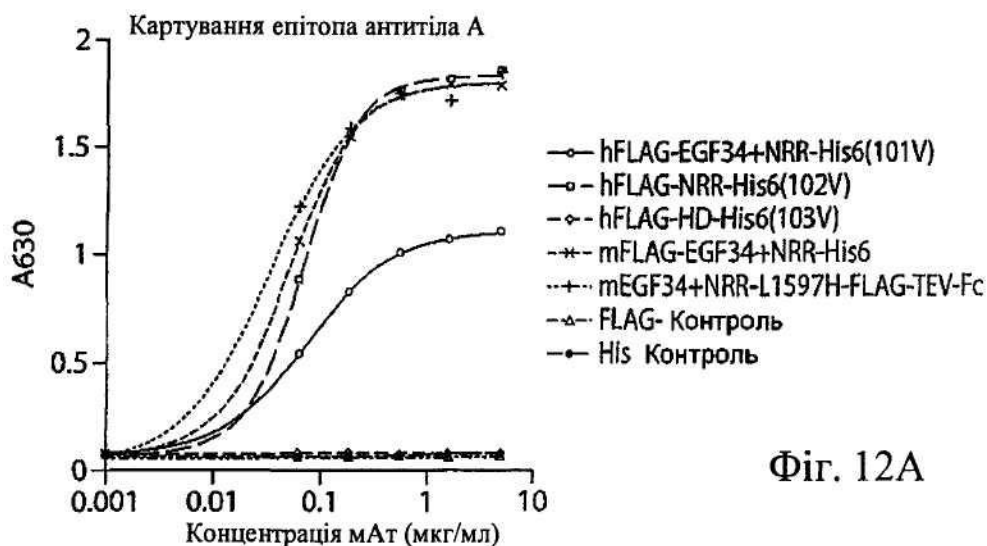
Людина	1981	IRNRATDLARMHDGTTPLILAARLAVEGMLEDLINSHADVNAVDDLGKSALHWAAAVNN
Миша	1971	LRNRATDLARMHDGTTPLILAARLAVEGMLEDLINSHADVNAVDDLGKSALHWAAAVNN

Людина	2041	VDAAVVLLKNGANKDMQNNREETPLFLAAREGSYETAKVLLDHFANRDITDHMDRLPRDI
Миша	2031	VDAAVVLLKNGANKDMQNNKEETPLFLAAREGSYETAKVLLDHFANRDITDHMDRLPRDI

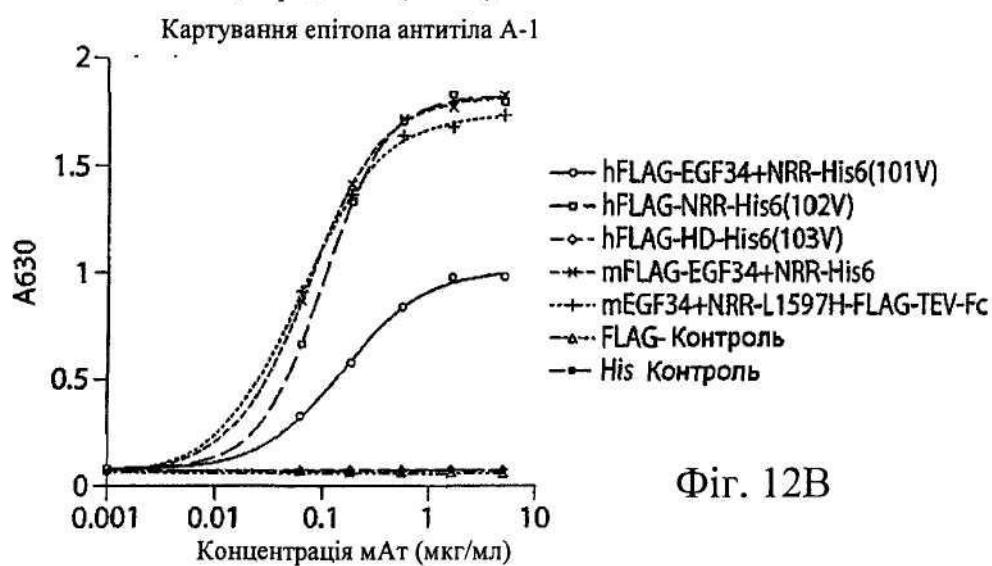
Людина	2101	AQERMHHDIVRLLEYNLVRSPQLHGAPLGGTPTLSPPLCSPNGYLGSLKPGVQGGKVRK
Миша	2091	AQERMHHDIVRLLEYNLVRSPQLHGATLGGTPTLSPPLCSPNGYLGSLKPGVQGGKVRK

Людина	2161	PSSKGLACGSKEAKDLKARRKKSQDGKGCILDSSGMLSPVDSLESHPGYLSDVASPPLLP
Миша	2151	PSTKGLACGSKEAKDLKARRKKSQDGKGCILDSSGMLSPVDSLESHPGYLSDVASPPLLP
		** *****
Людина	2221	SPFQQSPSVPLNHLPGMPDTHLGIGHLNVAAPKEMAALGGGRLAFETGPPRLSHLPVAS
Миша	2211	SPFQQSPSMPLSHLPMPDTHLGISHLNVAAPKEMAALAGGSRLAFEPPLPRLSHLPVAS
		***** ** *****
Людина	2281	GTSTVLGSSSGGALNFTVGGSTSLNGQCEWLSRLQSGMVPNQYNPLRGSVAPGPLSTQAP
Миша	2271	SASTVLSTNGTGAMNFTVGAPASLNGQCEWLRLQNGMVPNQYNPLRPGVTPGTLSTQAA
		**** ** *****
Людина	2341	SLQHGMVGPLHSSLAASALSQMMSYQGLPSTRLATQPHLVQTQQVQPQNLQMQQQNLQPA
Миша	2331	GLQHSMGPLHSSLSTNTLSPII-YQGLEPNTLATQPHLVQTQQVQPQNLQQLQPQNLQP-
		*** * ***** ** *****
Людина	2401	NIQQQQSLQPPPPPPQPHLGVSAAAGHLGRSFLSGEPSQADVQPLGPSSSLAVHTILPQE
Миша	2389	-----PSQPHLSVSSAANGHLGRSFLSGEPSQADVQPLGPSSSLPVHTILPQE
		* **** *****
Людина	2461	SPALPTSLPSSLVPPVTAQFLTPPSQHSYSS-PVDNTPSHQLQVPEHPFLTPSPESPDQ
Миша	2436	SQALPTSLPSSMVPPMTTQFLTPPSQHSYSSPVDNTPSHQLQVPEHPFLTPSPESPDQ
		* *****
Людина	2520	WSSSSPHSNVSDWSEGVSSPPTSMQSQIARIEAFK
Миша	2496	WSSSSPHSNISDWSEGISSPPTTMSQITHIEAFK

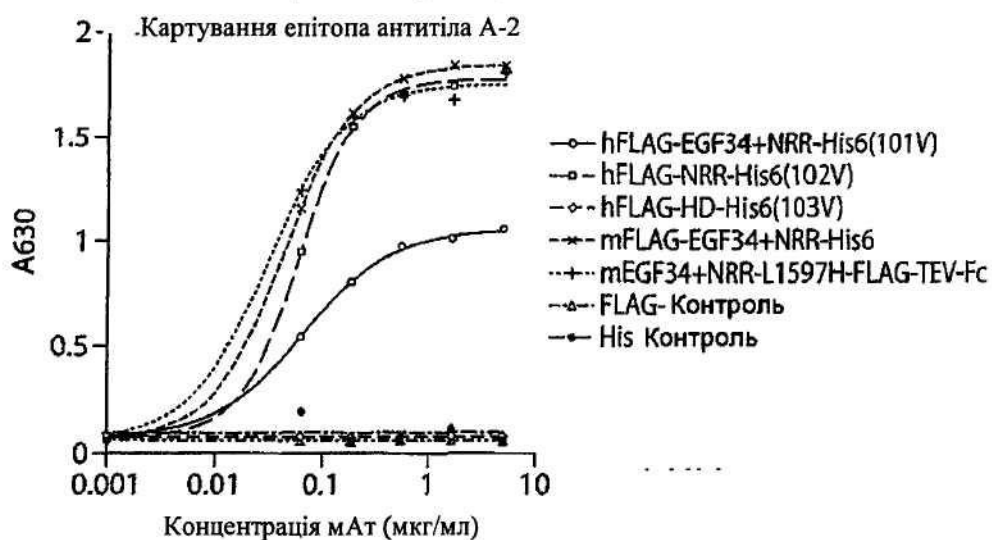
Fig. 11-4



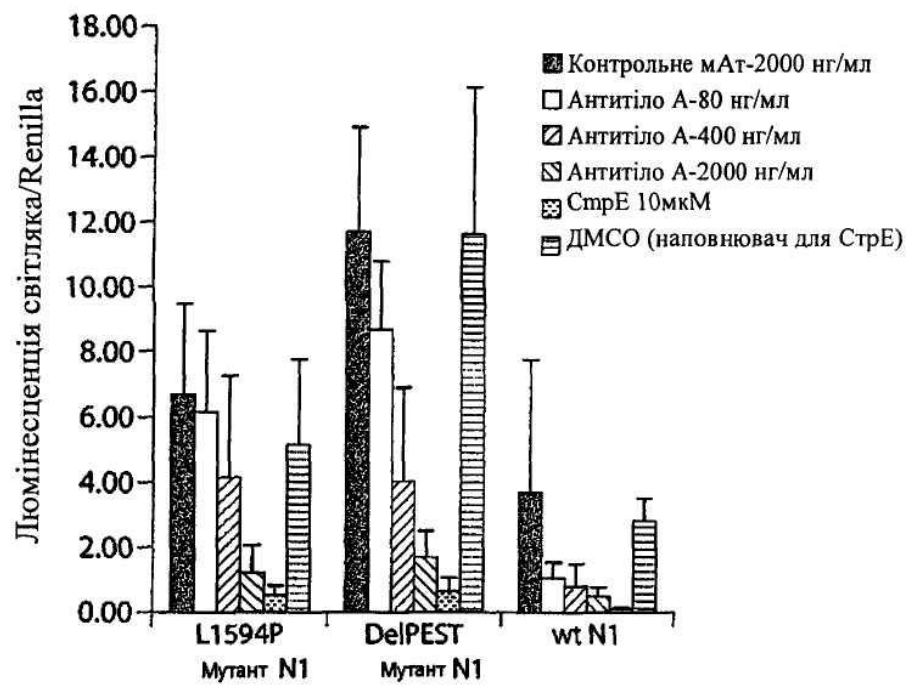
Фіг. 12А



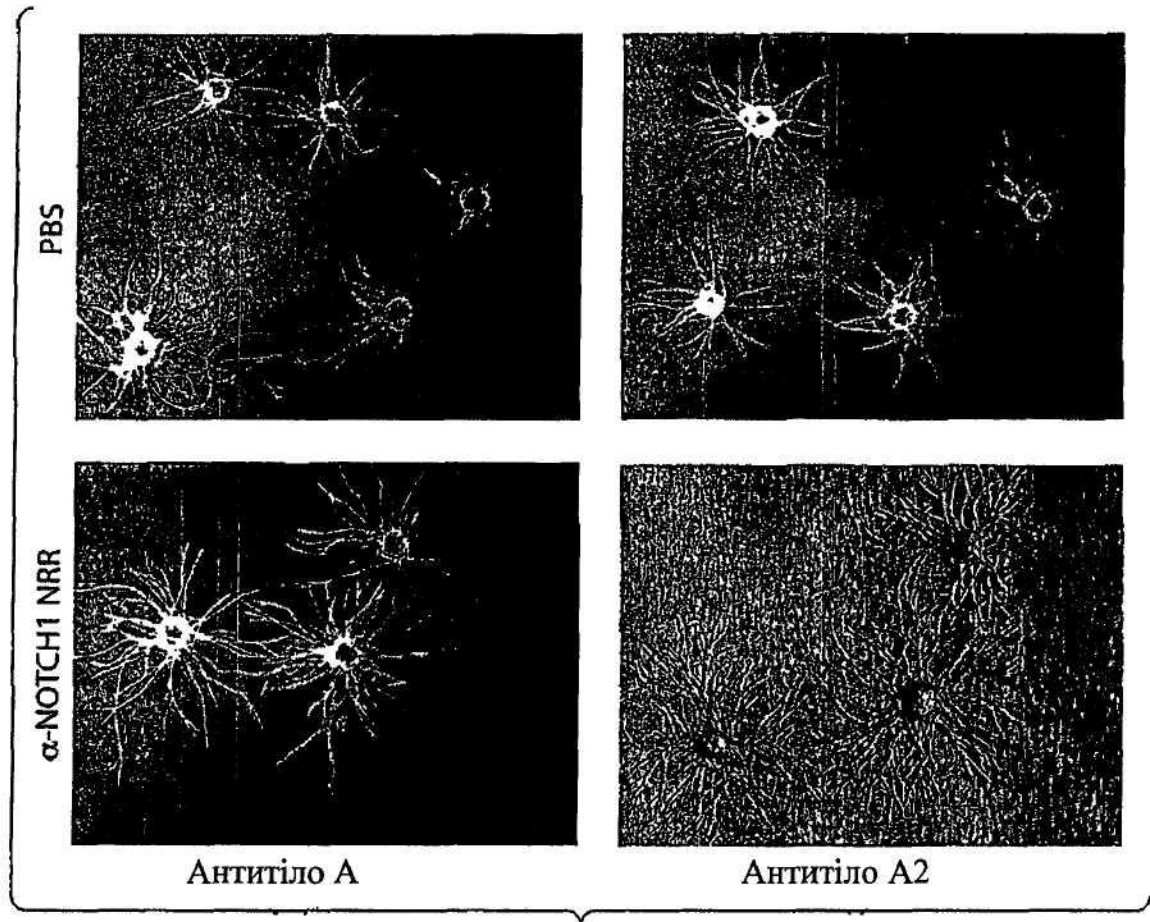
Фіг. 12В



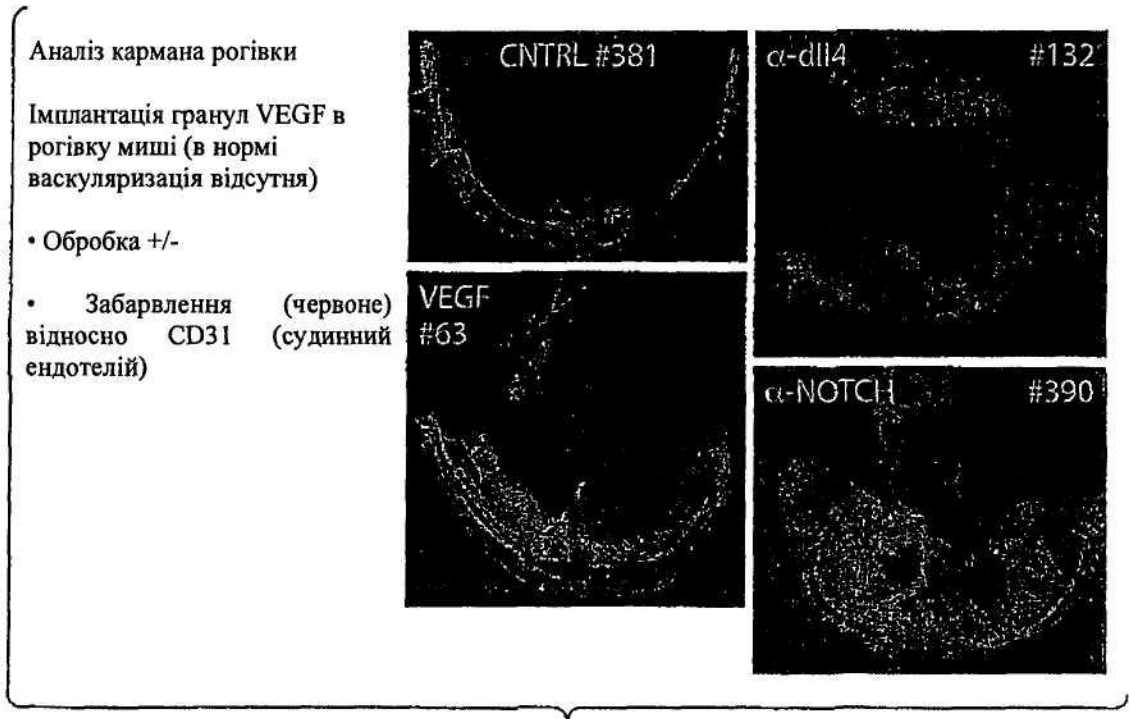
Фіг. 12С



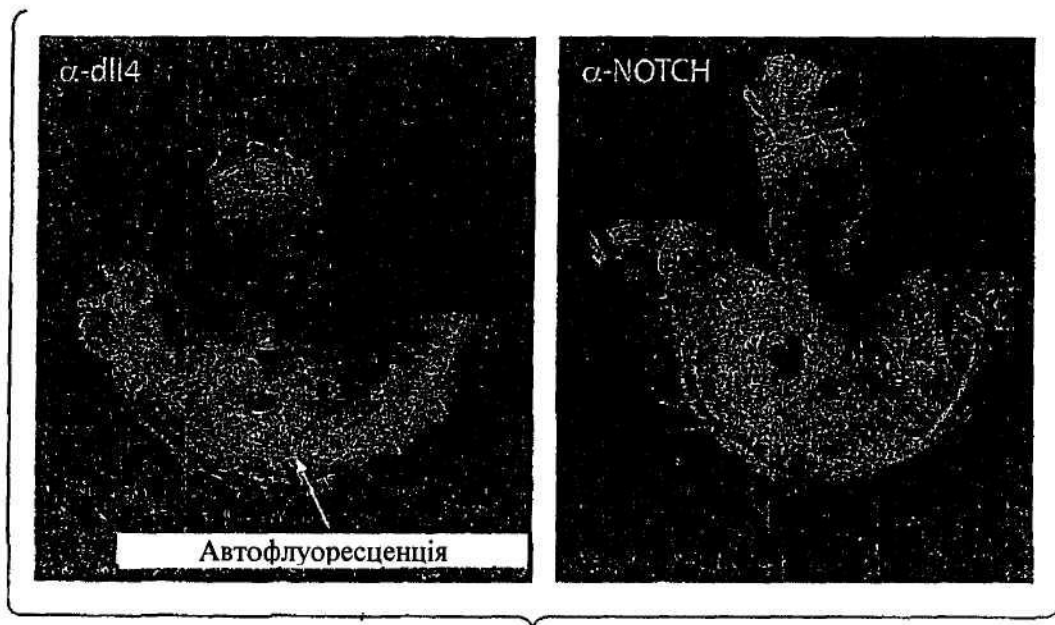
Фіг. 13



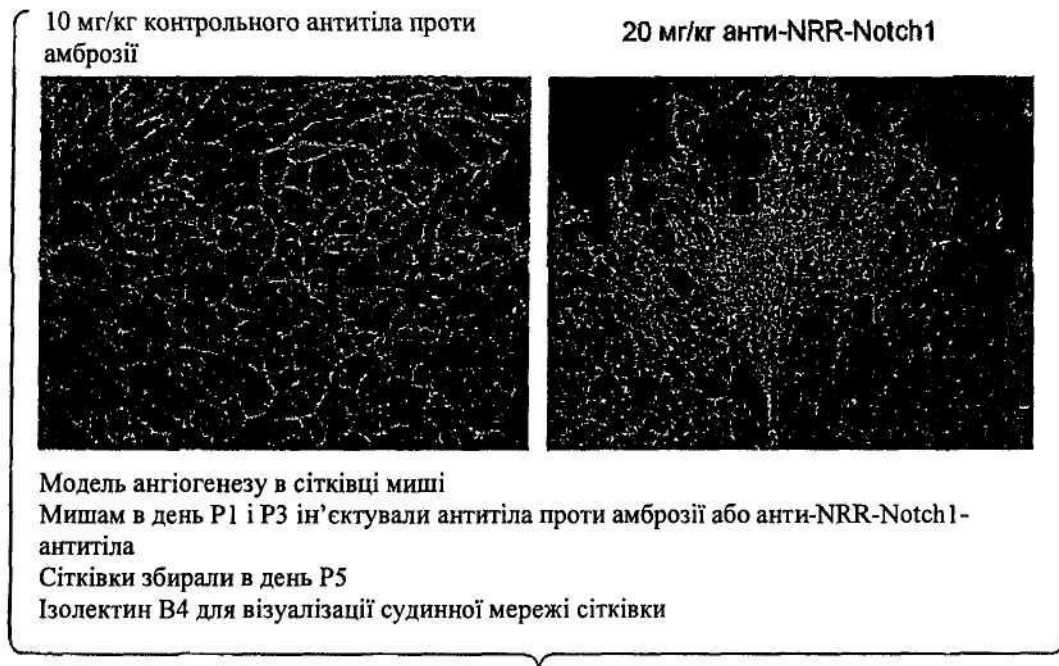
Фіг. 14А



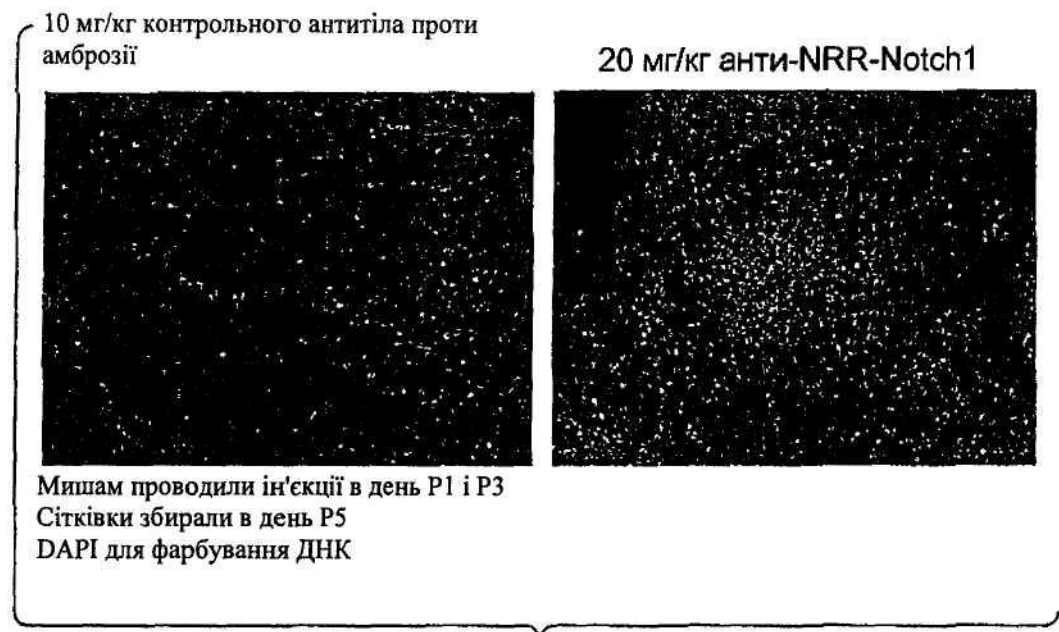
Фіг. 14В



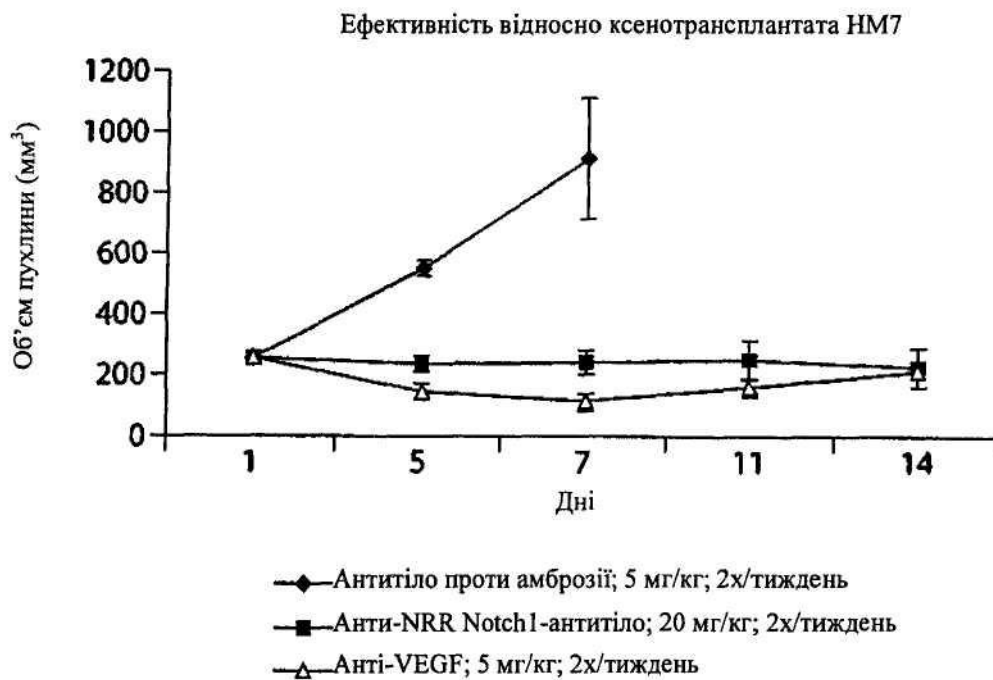
Фіг. 14С



Фіг. 14D

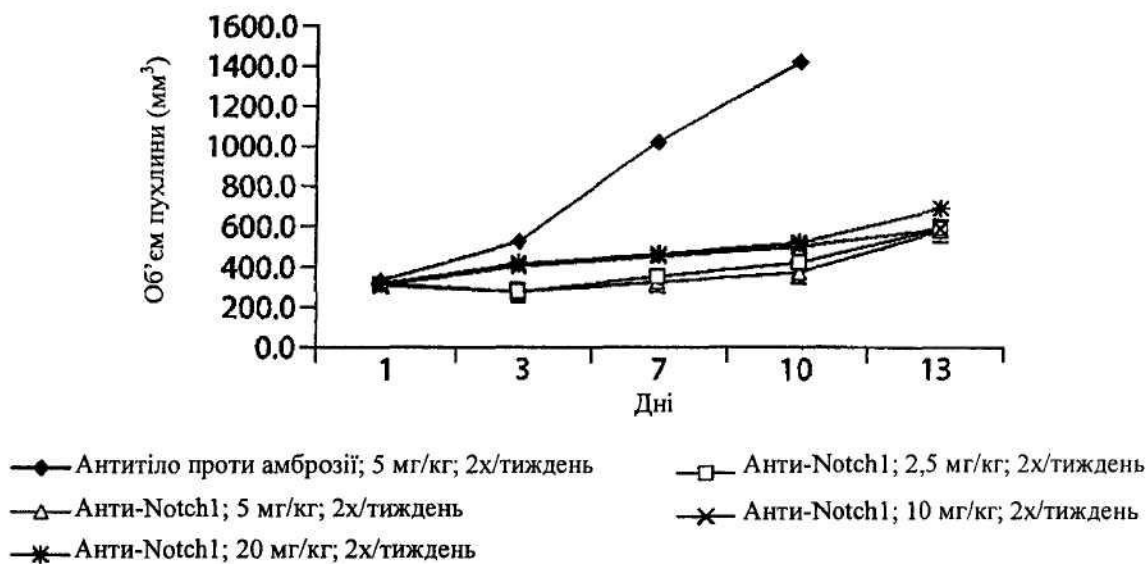


Фіг. 14E



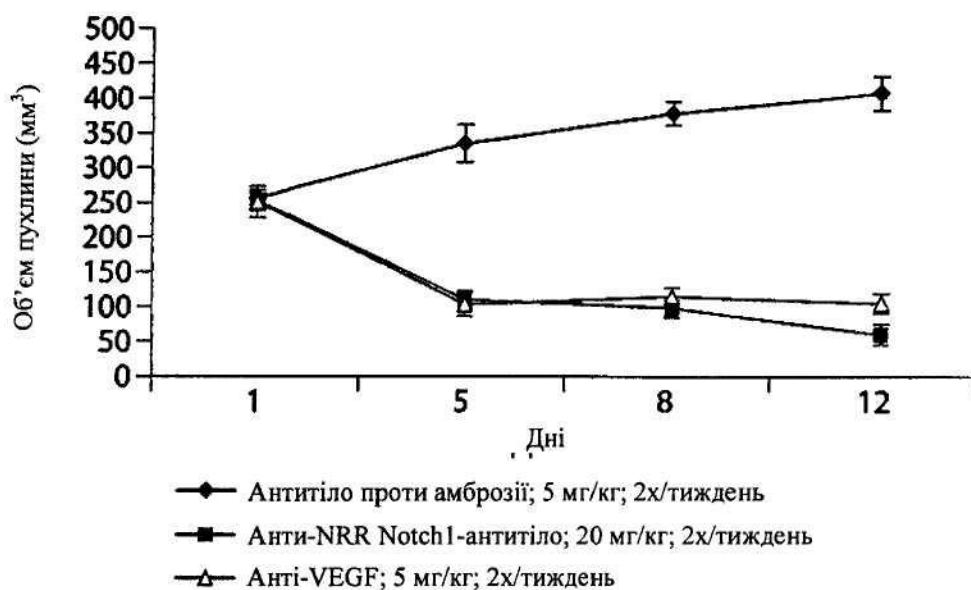
Фіг. 15А

Доза-відповідь для НМ7
(2,5-20 мг/кг; 2х/тиждень)



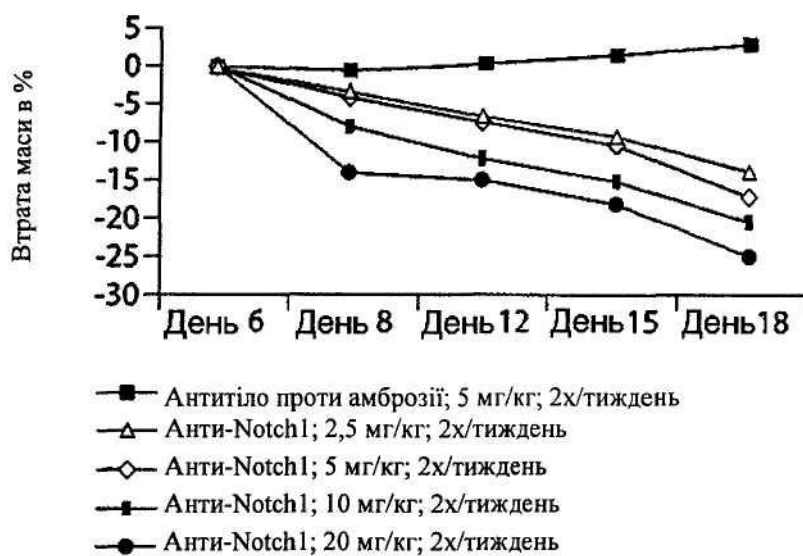
Фіг. 15В

Ефективність відносно ксенотрансплантата CALU6



Фіг. 15C

Анти-NRR-NI викликає втрату маси (модель NM7)



Фіг. 15D

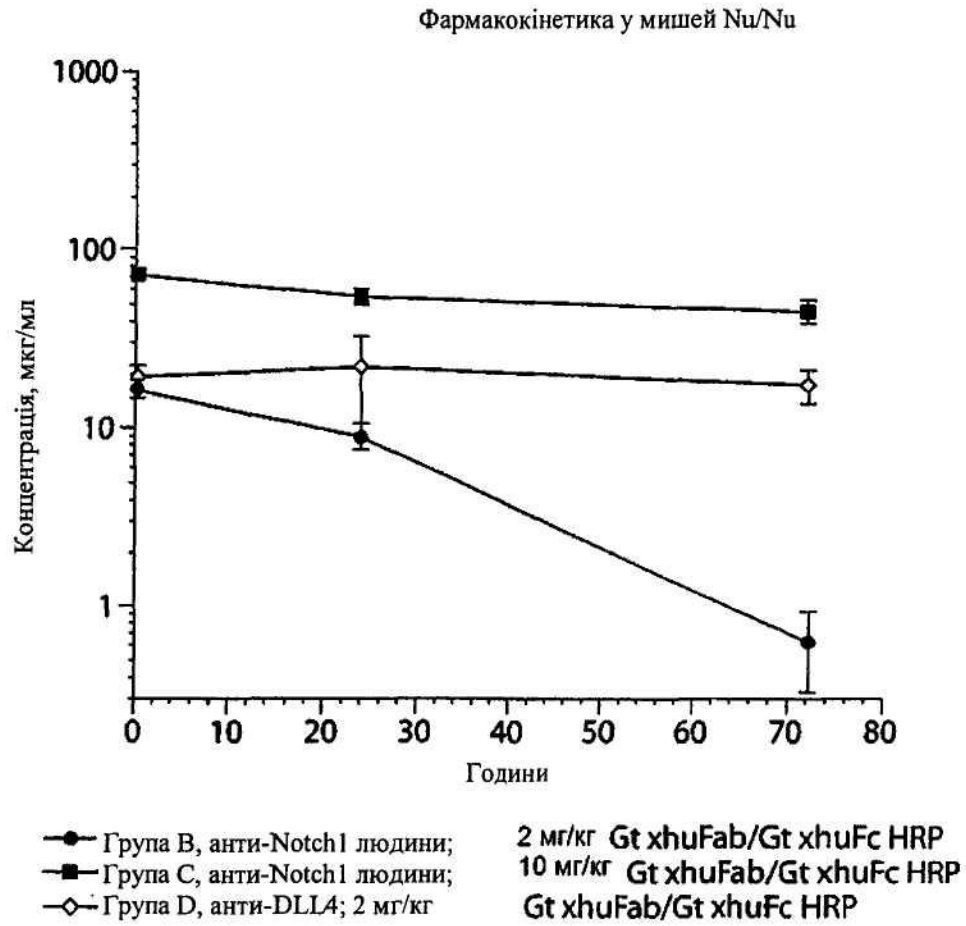
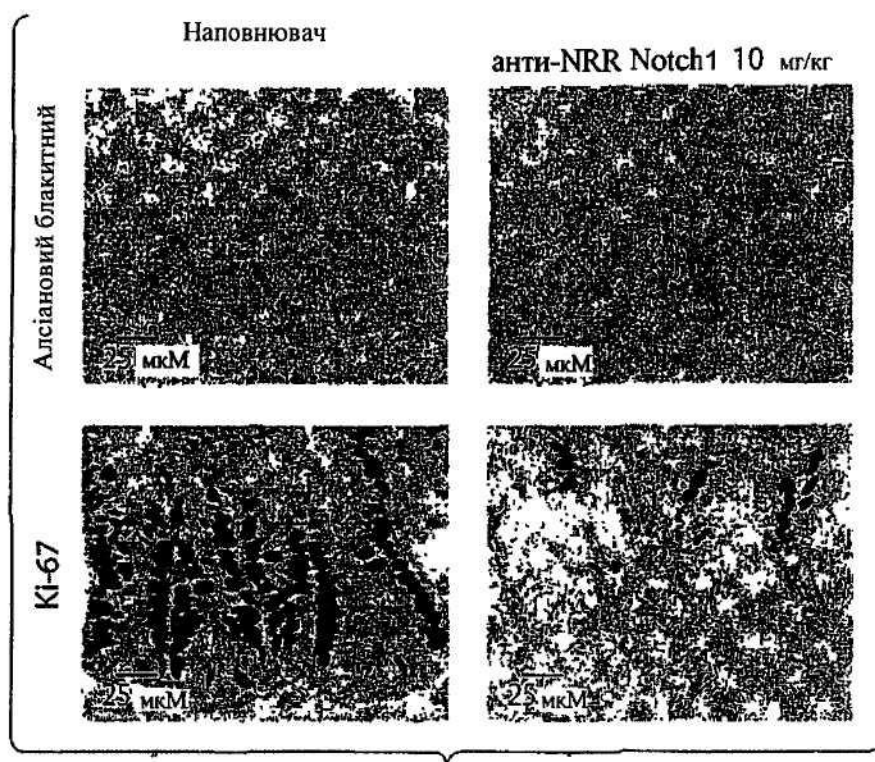
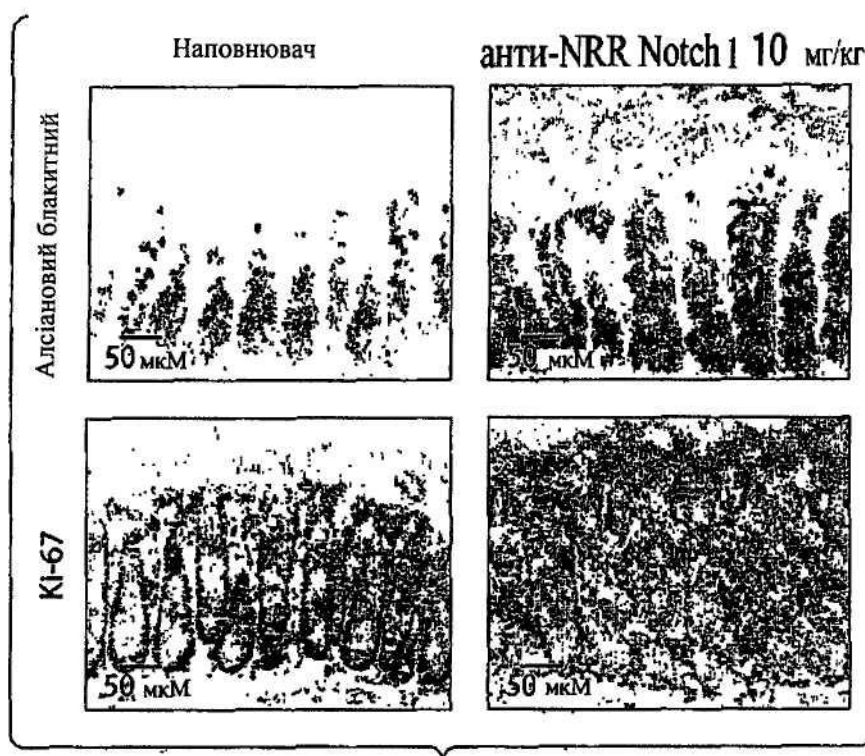


Fig. 15E



Фіг. 16А



Фіг. 16В

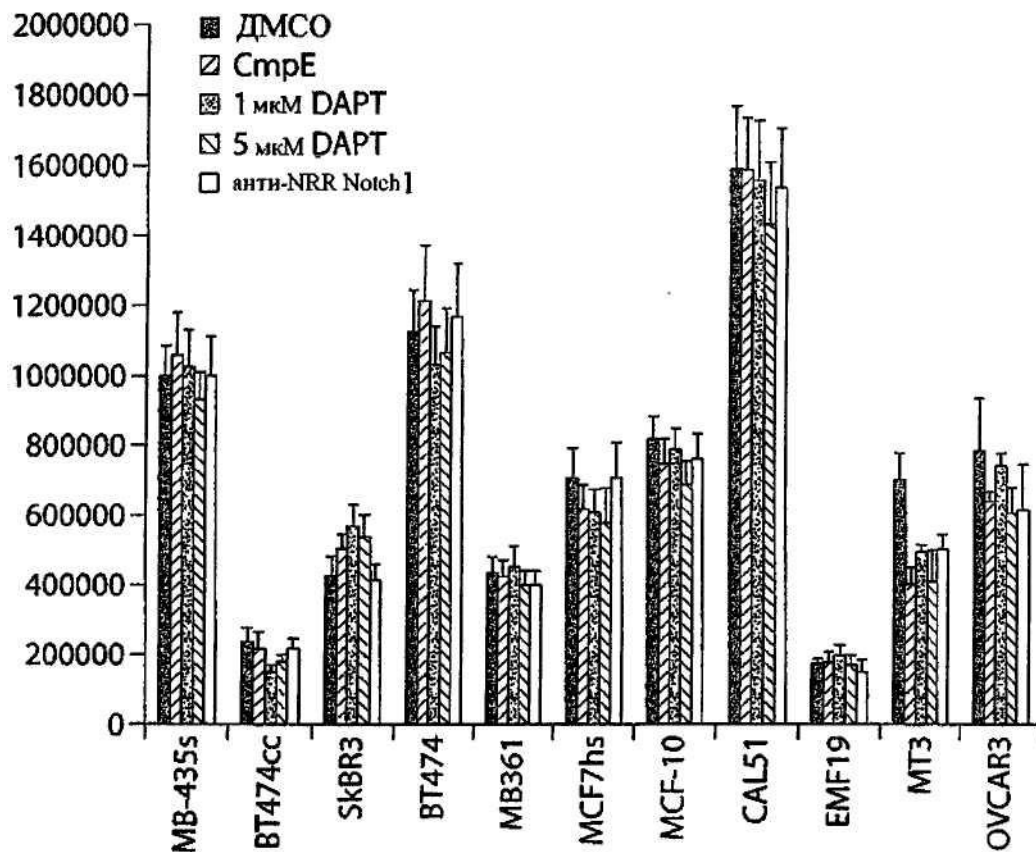


Fig. 17

Комп'ютерна верстка М. Мацело

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