



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **101672** (13) **C2**  
(51) МПК (2013.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61P 35/00**

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**

<b>(21)</b> Номер заявки:	<b>а 2011 01442</b>	<b>(72)</b> Винахідник(и):	<b>Герні Остін Л. (US),</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки:	<b>08.07.2009</b>		<b>Геуй Тімоті Чарльз (US),</b>
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на винахід:	<b>25.04.2013</b>		<b>Брунс Морін Фітч (US),</b>
<b>(31)</b> Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	<b>61/079,095, 61/112,701, 61/112,699</b>	<b>(73)</b> Власник(и):	<b>ОНКОМЕД ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ІНК.,</b>
<b>(32)</b> Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	<b>08.07.2008, 07.11.2008, 07.11.2008</b>		<b>800 Chesapeake Drive, Redwood City, CA 94063, United States of America (US)</b>
<b>(33)</b> Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	<b>US, US, US</b>	<b>(74)</b> Представник:	<b>Міхашина Людмила Михайлівна, реєстр. №14</b>
<b>(41)</b> Публікація відомостей про заявку:	<b>12.03.2012, Бюл.№ 5</b>	<b>(56)</b> Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	<b>WO 2007/145840 A2, 21.12.2007</b>
<b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту:	<b>25.04.2013, Бюл.№ 8</b>		<b>WO 2004/094475 A2, 04.11.2004</b>
<b>(86)</b> Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	<b>PCT/US2009/003995, 08.07.2009</b>		<b>DE 44 25 115 A1, 18.01.1996</b>

**(54) АНТИТІЛО, ЩО ЗВ'ЯЗУЄТЬСЯ З РЕЦЕПТОРОМ NOTCH1, І ЙОГО ЗАСТОСУВАННЯ**

**(57) Реферат:**

Винахід стосується виділеного антитіла, яке специфічно зв'язується з нелігандзв'язуючою проксимальною ділянкою мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1 людини та містить:

(a) CDR1 важкого ланцюга, що включає RGYWIE (SEQ ID NO:15), CDR2 важкого ланцюга, що включає QILPGTGRTNYNEKFKG (SEQ ID NO:16), і CDR3 важкого ланцюга, що включає FDGNYGYAMDY (SEQ ID NO:17); та

(b) CDR1 легкого ланцюга, що включає RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:18), CDR2 легкого ланцюга, що включає GTNNRAP (SEQ ID NO:19), і CDR3 легкого ланцюга, що включає ALWYSNHWVFGGGTKL (SEQ ID NO:20).

UA 101672 C2



Галузь техніки, до якої відноситься винахід

Даний винахід відноситься до композицій, що включають агент, який зв'язується з рецептором Notch людини, і до способів застосування вказаних композицій для дослідження, діагностики і лікування рака і інших захворювань. Зокрема, даний винахід відноситься до антитіл, які специфічно зв'язуються з нелігандзв'язуючою проксимальною ділянкою мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1 людини і інгібують зростання пухлини. Даний винахід далі відноситься до способів лікування рака, що включають введення терапевтично ефективної кількості антитіла, яке специфічно зв'язується з нелігандзв'язуючою проксимальною ділянкою мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1 людини і інгібує зростання пухлини.

Рівень техніки

Рак є однією з головних причин смертності в розвинених країнах, від якого в США вмирає більше 500000 осіб на рік. Щороку в США рак діагностується більш ніж в одного мільйона осіб, при цьому встановлено, що більш ніж у 1 людини з 3 впродовж всього життя розвивається яка-небудь форма рака. Не дивлячись на те, що існує більше 200 різних типів рака, на чотири з них, а саме рак молочної залози, рак легень, колоректальний рак і рак передміхурової залози, припадає більше половини всіх нових випадків захворювання раком (Jemal et al., 2003, Cancer J. Clin. 53:5-26).

Рак виникає унаслідок збою у функціонуванні механізмів, регулюючих нормальний розвиток і збереження тканин, при цьому вважається, що головну роль в даному процесі грає збільшення числа стоволових клітин (Beachy et al., 2004, Nature 432:324). В процесі нормального розвитку тварини клітини більшості або всіх тканин утворюються з нормальних попередників, що іменуються стоволовими клітинами (Morrison et al., 1997, Cell, 88:287-98; Morrison et al., 1997, Curr. Opin. Immunol., 9:216-21; Morrison et al., 1995, Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 11:35-71). Стоволові клітини є такими клітинами, які володіють: (1) високим проліферативним потенціалом; (2) здатністю асиметричного поділу клітини з утворенням одного або декількох типів потомства з нижчим проліферативним та/або диференційованим потенціалом; і (3) здатністю симетричного поділу клітини для самовідновлення або самозбереження. Найбільш відомим прикладом відновлення зрілих клітин шляхом диференціювання стоволових клітин є гемопоетична система, в якій диференційовано незрілі попередники (гемопоетичні стоволові клітини і клітини-попередники) реагують на молекулярні сигнали утворенням різних типів клітин крові і лімфоцитів. Інші клітини, включаючи клітини кишечника, системи проток молочної залози і шкіри, постійно заповнюються з невеликої популяції стоволових клітин в кожній тканині, і недавно виконані дослідження дозволяють передбачити, що більшість інших зрілих тканин, включаючи головний мозок, також містять стоволові клітини.

Солідні пухлини складаються з популяцій гетерогенних клітин. Наприклад, рак молочної залози являє собою суміш ракових клітин і нормальних клітин, що включають мезенхімні (стромальні) клітини, клітини запального інфільтрату і ендотеліальні клітини. Класичні моделі раку передбачають, що всі фенотипічно різні популяції ракових клітин володіють здатністю проліферувати і утворювати нову пухлину. У класичній моделі гетерогенності пухлинних клітин виникає під впливом навколишніх чинників, а також в результаті мутацій, що відбуваються в ракових клітинах, унаслідок чого виникає інша популяція онкогенних клітин. Дана модель побудована на припущенні, що всі популяції пухлинних клітин володіють деякою мірою онкогенного потенціалу. (Pandis et al., 1998, Genes, Chromosomes & Cancer 12:122-129; Kuukasjrvi et al., 1997, Cancer Res. 57:1597-1604; Bonsing et al., 1993, Cancer 71:382-391; Bonsing et al., 2000, Genes Chromosomes & Cancer 82: 173-183; Beerman H et al., 1991, Cytometry 12:147-54; Aubele M & Werner M, 1999, Analyt. Cell. Path. 19:53; Shen L et al., 2000, Cancer Res. 60:3884).

Альтернативна модель спостережуваної гетерогенності клітин солідної пухлини передбачає, що солідні пухлини утворюються з "стоволової клітини солідної пухлини" (або "ракової стоволової клітини" солідної пухлини), яка потім хаотично розвивається в результаті циклів симетричного і асиметричного поділу клітини. У даній моделі на основі стоволових клітин солідні пухлини складаються з субпопуляції клітин, що відрізняється і обмеженої (можливо, навіть рідкої), які володіють властивостями нормальних "стоволових клітин", що виражаються в тому, що вони інтенсивно проліферують і ефективно утворюють додаткові стоволові клітини солідної пухлини (самооновлюються), і більшості пухлинних клітин солідної пухлини, в яких відсутній онкогенний потенціал. Дійсно, мутації в довгоживучій популяції стоволових клітин можуть ініціювати утворення ракових стоволових клітин, які забезпечують зростання і збереження пухлин і наявність яких робить неефективними сучасні методи лікування.

Стоволові клітини раку вперше були виявлені в раку крові, гострому мієлолейкозі (AML) (Lapidot et al., 1994, Nature 267:645-8). Згодом було продемонстровано, що злоякісні пухлини молочної залози людини також містять невелику відмінну популяцію ракових стоволових клітин,

володіючих здатністю утворювати пухлини у мишей з імунodefіцитом. Було встановлено, що популяція ESA+, CD44+, CD24-/low, Lin- клітин містить в 50 разів більше онкогенних клітин в порівнянні з нефракціонованими пухлинними клітинами (Al-Hajj et al., 2003, PNAS 100:3983-8). Можливість виділення онкогенних ракових клітин дозволила досліджувати біологічні шляхи, що

5 лежать в основі онкогенності вказаних клітин і, таким чином, створити кращі діагностичні аналізи і методи лікування хворих раком. Даний винахід переслідує саме таку мету.

Нормальні ствові клітини і ракові ствові клітини володіють здатністю проліферувати і самовідновлюватися, тому не дивно, що цілий ряд генів, регулюючих розвиток нормальних ствових клітин, бере участь в онкогенезі (див. огляд в публікаціях Reya et al., 2001, Nature

10 414:105-111 і Taipale & Beachy, 2001, Nature 411:349-354). У даному винаході ідентифікований рецептор Notch, наприклад, Notch1, як маркер ракових ствових клітин, що використовує сигнальний шлях Notch для збереження ракових ствових клітин, і як мішень для лікування рака шляхом знищення вказаних онкогенних клітин.

Сигнальний шлях Notch є одним з декількох важливих регуляторів утворення ембріонального патерну, постембріонального збереження тканин і біології ствових клітин. Зокрема, передача сигналу рецептора Notch визначає процес латерального інгібування суміжних клітин і грає важливу роль у визначенні долі клітин в процесі асиметричного поділу клітин. Нерегульована передача сигналу рецептора Notch асоційована з багатьма типами рака людини, в яких вказаний сигнал може змінювати розвиток пухлинних клітин і зберігати їх в

20 недиференційованому і проліферативному стані (Brennan and Brown, 2003, Breast Cancer Res. 5:69). Таким чином, онкогенезу може передувати захват гомеостатичних механізмів, регулюючих нормальний розвиток і репарацію тканин популяціями ствових клітин (Beachy et al., 2004, Nature 432:324).

Рецептор Notch вперше був ідентифікований в мутантах дрозофіли з гаплонедостатністю, що викликає надрізи по краю крила, при цьому втрата даної функції викликає утворення ембріонального летального "нейрогенного" фенотипу, в якому клітини епідермісу викликають загибель нервової тканини (Moohr, 1919, Genet. 4:252; Poulson, 1937, PNAS 23:133; Poulson, 1940, J. Exp. Zool. 83:271). Рецептор Notch є однопрохідним трансмембранним рецептором, що містить багаточисельні парні повтори, подібні до епідермального чинника зростання (EGF), і три

30 повтори Notch/LIN-12 (LNR) з великим вмістом цистеїну у великому позаклітинному домені (Wharton et al., 1985, Cell 43:567; Kidd et al., 1986, Mol. Cell Biol. 6:3094; огляд в публікації Artavanis et al., 1999, Science 284:770). LNR-повтори і додаткова С-кінцева ділянка, що складається приблизно з 103 амінокислот позаклітинного домену, визначені в даному описі винаходу як "проксимальна ділянка мембрани". Вказана ділянка відома також як негативна регуляторна ділянка рецептора Notch (NRR).

Рецептори Notch ссавців розщеплюються з утворенням зрілого рецептора і подальшим зв'язуванням ліганду, що активує передачу сигналу в нижній ділянці. Фурінподібна протеаза розщеплює попередники рецептора Notch в процесі дозрівання з утворенням розташованих поряд з мембраною гетеродимерів, які включають нековалентне зв'язану позаклітинну

40 субодиночку і трансмембранну субодиночку, що утримуються разом в аутоінгібуючому стані. Зв'язування ліганду порушує таке інгібування і викликає розщеплювання рецептора Notch металлопротеазою типу ADAM і гамма-секретазою, причому гамма-секретаза вивільняє внутріклітинний домен (ICD) в цитоплазму, завдяки чому він переміщується в ядро і активує транскрипцію гена. Розщеплювання під дією ADAM відбувається в нелігандзв'язуючому розщеплюваному домені в негативній регуляторній ділянці (NRR), розташованій поряд з мембраною (див. фиг.1А). У рецепторі Notch1 вказана ділянка охоплює ділянку приблизно від амінокислоти 1427 до амінокислоти 1732.

У ссавців ідентифіковано чотири білка Notch (Notch1, Notch2, Notch3 і Notch4), і мутації у вказаних рецепторах неминуче викликають аномалії розвитку і патології, що включають

50 виникнення декількох типів рака, детально описаних нижче (Gridley, 1997, Mol. Cell Neurosci. 9:103; Joutel & Tournier-Lasserre, 1998, Semin. Cell Dev. Biol. 9:619-25).

Рецептор Notch активується однопрохідними трансмембранними лігандами сімейства Delta, Serrated, Lag-2 (DSL). У ссавців відомо п'ять лігандів Notch: Delta-подібний 1 (DLL1), Delta-подібний 3 (DLL3), Delta-подібний 4 (DLL4), Jagged 1 і Jagged 2, які характеризуються наявністю домену DSL і парних EGF-подібних повторів в позаклітинному домені. Позаклітинний домен рецептора Notch взаємодіє з таким же доменом його лігандів, зазвичай на суміжних клітинах, внаслідок чого відбуваються два протеолітичних розщеплювання Notch; одне позаклітинне розщеплювання, опосередковане протеазою ADAM (дизинтегрин А і металопептидаза), і одне розщеплювання в трансмембранному домені, опосередковане гамма-секретазою. Останнє розщеплювання викликає утворення внутріклітинного домену Notch (ICD), який потім проникає в

60

ядро і активує сімейство чинників транскрипції CBF1, Supressor of Hairless [Su(H)], Lag-2 (CSL), які є основними ефекторами нижньої ділянки, що збільшують транскрипцію основних ядерних чинників транскрипції спіраль-петля-спіраль сімейства Hairy і Enhancer of Split [E(spl)] (Artavanis et al., 1999, Science 284:770; Brennan and Brown, 2003, Breast Cancer Res. 5:69; Iso et al., 2003, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 23:543). У ссавців також можуть бути альтернативні внутріклітинні шляхи, визначувані цитоплазматичним білком Deltex, ідентифікованим в дрозофілі (Martinez et al., 2002, Curr. Opin. Genet. Dev. 12:524-33), і вказаний Deltex-залежний шлях може пригнічувати експресію генів-мішеней Wnt (Brennan et al., 1999, Curr. Biol. 9:707-710; Lawrence et al., 2001, Curr. Biol. 11:375-85).

Гемопоетичні стовлові клітини (HSC) є найбільш вивченими стовловими клітинами в організмі, і передача сигналу Notch визначає їх нормальне існування і лейкозну трансформацію (Korper & Hajdu, 2004, Pathol. Oncol. Res. 10:69-73). HSC являє собою рідку популяцію клітин, що знаходиться в стромальній ніші зрілого кісткового мозку. Вказані клітини характеризуються унікальним профілем експресії генів, а також здатністю постійно утворювати більш диференційовані клітини-попередники для відновлення всієї гемопоетичної системи. Конститутивна активація передачі сигналу Notch в HSC і клітинах-попередниках викликає утворення іморталізованих ліній клітин, які створюють лімфоїдні і мієлоїдні клітини *in vitro* і при виконанні тривалих аналізів по відновленню (Varnum-Finney et al., 2000, Nat. Med. 6:1276-81), і наявність Jagged1 збільшує приєднання популяцій клітин кісткового мозку людини з високим вмістом HSC (Karapu et al., 2000, J. Exp. Med. 192:1365-72). Нещодавно передача сигналу Notch була продемонстрована в HSC *in vivo*, при цьому було показано, що вказаний сигнал бере участь в інгібуванні диференціювання HSC. Крім того, передача сигналу Notch, мабуть, необхідна для Wnt-опосередкованого самовідновлення HSC (Duncan et al., 2005, Nat. Immunol. 6:314).

Сигнальний шлях Notch також грає важливу роль в збереженні нервових стовлових клітин і визначає як нормальний стан, так і виникнення рака головного мозку (Korper & Hajdu, 2004, Pathol. Oncol. Res. 10:69-73; Purow et al., 2005, Cancer Res. 65:2353-63; Hallahan et al., 2004, Cancer Res. 64:7794-800). Нервові стовлові клітини викликають утворення всіх нейронів і гліальних клітин в нервовій системі ссавця в процесі її формування, і нещодавно були ідентифіковані в зрілому головному мозку (Gage, 2000, Science 287:1433-8). У мишей з відсутністю рецептора Notch1, генів-мішеней Notch Hes1, 3 і 5 і регулятора передачі сигналу Notch презеніліну 1 (PS1) спостерігається нижчий вміст ембріональних нервових стовлових клітин. Крім того, в головному мозку гетерозиготних мишей PS1 знаходиться менше зрілих нервових стовлових клітин (Nakamura et al., 2000, J. Neurosci. 20:283-93; Hitoshi et al., 2002, Genes Dev. 16:846-58). Зменшення кількості нервових стовлових клітин, мабуть, викликане їх недостижним диференціюванням в нейрони (Hatakeyama et al., 2004, Dev. 131:5539-50), з чого виходить, що передача сигналу Notch регулює диференціювання і самовідновлення нервових стовлових клітин.

Аберантна передача сигналу Notch має місце в цілому ряду раків людини. Ген Notch1 був вперше ідентифікований у людини в субпопуляції Т-клітинного гострого лімфобластного лейкозу у вигляді переміщеного локуса, що викликає активацію сигнального шляху Notch (Ellisen et al., 1991, Cell 66:649-61). Конститутивна активація передачі сигналу Notch1 в Т-клітинах мишачих моделей аналогічним чином викликає Т-клітинні лімфоми, що вказує на її спонукальну роль (Robey et al., 1996, Cell 87:483-92; Pear et al., 1996, J. Exp. Med. 183:2283-91; Yan et al., 2001, Blood 98:3793-9; Bellavia et al., 2000, EMBO J. 19:3337-48). Нещодавно було виявлено, що в Т-клітинному гострому лімфобластному лейкозі/лімфомі як у дітей, так і у дорослих часто присутні точкові мутації, інсерції і делеції Notch1, що викликають аберантну передачу сигналу Notch1 (Pear & Aster, 2004, Curr. Opin. Hematol. 11:416-33).

Часте введення мишачого вірусу пухлини молочної залози як в локус Notch1 і Notch4 пухлин молочної залози, так і в отримані активовані фрагменти білка Notch спочатку дозволило виявити передачу сигналу Notch в раку молочної залози (Gallahan & Callahan, 1987, J. Virol. 61:66-74; Brennan & Brown, 2003, Breast Cancer Res. 5:69; Politi et al., 2004, Semin. Cancer Biol. 14:341-7). Подальші дослідження з використанням трансгенних мишей підтвердили роль рецептора Notch в розгалуженні проток в процесі нормального розвитку молочної залози і те, що конститутивно активна форма Notch4 в епітеліальних клітинах молочної залози інгібує диференціювання епітелію і викликає онкогенез (Jhappan et al., 1992, Genes & Dev. 6:345-5; Gallahan et al., 1996, Cancer Res. 56:1775-85; Smith et al., 1995, Cell Growth Differ. 6:563-77; Soriano et al., 2000, Int. J. Cancer 86:652-9; Uyttendaele et al., 1998, Dev. Biol. 196:204-17; Politi et al., 2004, Semin. Cancer Biol. 14:341-7). В даний час відомості про роль рецептора Notch в раку молочної залози людини обмежені експресією рецепторів Notch в карциномах молочної залози і

їх кореляцією з результатами клінічних досліджень (Weijzen et al., 2002, Nat. Med. 8:979-86; Parr et al., 2004, Int. J. Mol. Med. 14:779-86). Крім того, надекспресія сигнального шляху Notch була виявлена в раку шийки матки (Zagouras et al., 1995, PNAS 92:6414-8), раку нирки (Rae et al., 2000, Int. J. Cancer 88:726-32), плоскоклітинному раку голови і шиї (Leethanakul et al., 2000, Oncogene 19:3220-4), ендометріальному раку (Suzuki et al., 2000, Int. J. Oncol. 17:1131-9) і нейробластомі (van Limpt et al., 2000, Med. Pediatr. Oncol. 35:554-8), що вказує на можливу роль рецептора Notch в розвитку цілого ряду пухлин. Цікаво відзначити, що передача сигналу рецептора Notch може грати певну роль в збереженні недиференційованого стану Арс-мутантних пухлинних клітин ободової кишки (van Es & Clevers, 2005, Trends in Mol. Med. 11:496-502).

Сигнальний шлях Notch також має відношення до багатьох аспектів розвитку судин, включаючи проліферацію, міграцію, диференціювання гладком'язових клітин, утворення кровоносних судин і артеріально-венозне диференціювання (Iso et al., 2003, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 23:543). Наприклад, гомозиготні нульові мутації в Notch1/4 і Jagged1, а також гетерозиготна втрата DLL4 викликають серйозні, хоча і різні дефекти розвитку артерій і васкуляризації жовткового мішка. Крім того, в ембріонах мишей з відсутністю DLL1 і гіпоморфним рецептором Notch-2 відбувається крововилив, який, мабуть, виникає в результаті поганого розвитку судинних структур (Gale et al., 2004, PNAS, 101:15949-54; Krebs et al., 2000, Genes Dev. 14:1343-52; Xue et al., 1999, Hum. Mol. Genet. 8:723-30; Hrabe de Angelis et al., 1997, Nature 386:717-21; McCright et al., 2001, Dev. 128:491-502). У людини мутації Jagged1 асоційовані з синдромом Алагілле, порушенням розвитку, яке включає дефекти судин, і мутації Notch3 відповідають за спадкову васкулярну деменцію (Cadasil), причиною якої є дефекти гомеостазу судин (Joutel et al., 1996, Nature 383:707-10).

Ідентифікація Notch1, Notch4, DLL1 і DLL4 як генів, експресованих в ракових стоволових клітинах, в порівнянні з нормальним епітелієм молочної залози, дозволяє передбачити, що направлена дія на сигнальний шлях Notch може сприяти знищенню не лише більшості неонкогенних ракових клітин, але також онкогенних клітин, відповідальних за утворення і вторинне виникнення солідних пухлин. Крім того, у зв'язку з важливою роллю розвитку кровоносних судин в процесі утворення і збереження пухлини, направлена дія на сигнальний шлях Notch може також ефективно інгібувати даний процес, позбавляючи ракову пухлину живильних речовин і сприяючи її знищенню.

У науковій літературі описані антитіла проти рецептора Notch і їх можливе використання як протиракової терапії. Див., наприклад, публікації заявок на патент США №№ 2008/0131434 і 2009/0081238, які повністю включені в даний опис винаходу як посилання. Див. також міжнародні публікації №№ WO 2008/057144, WO 2008/076960 і WO 2008/50525.

Суть винаходу

Даний винахід відноситься до агентів, які зв'язуються з нелігандзв'язуючою проксимальною областю мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1, і композицій, таких як фармацевтичні композиції, включаючи вказані агенти. Даний винахід далі відноситься до способів направленої дії вказаними агентами на ракові стоволові клітини. У деяких варіантах здійснення винаходу вказані способи включають зменшення частоти зустрічальності ракових стоволових клітин в пухлині, зменшення числа ракових стоволових клітин в пухлині, зменшення онкогенності пухлини та/або зменшення онкогенності пухлини шляхом зменшення числа або частоти зустрічальності ракових стоволових клітин в пухлині. Даний винахід відноситься також до способів вживання вказаних агентів для лікування рака та/або інгібування зростання пухлини.

Одним об'єктом даного винаходу є антитіло, яке специфічно зв'язується з нелігандзв'язуючою проксимальною областю мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1 (наприклад, рецептора Notch1 людини). У деяких варіантах здійснення винаходу нелігандзв'язуюча проксимальна область мембрани рецептора Notch1 включає ділянку приблизно від амінокислоти 1427 до амінокислоти 1732 рецептора Notch1 людини. У деяких варіантах здійснення винаходу проксимальна область мембрани рецептора Notch1 включає SEQ ID NO:2. У певних варіантах здійснення винаходу антитіло специфічно зв'язується з нелігандзв'язуючою проксимальною ділянкою мембрани позаклітинного домену щонайменше одного додаткового члена сімейства рецепторів Notch.

У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло є антагоністом Notch1. У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло інгібує передачу сигналу рецептором Notch1 або активацію рецептора Notch1. У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло інгібує активність Notch1. У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло інгібує розщеплювання в проксимальній ділянці мембрани. У певних варіантах здійснення винаходу антитіло інгібує розщеплювання рецептора Notch1 (наприклад, розщеплювання металопротеазою на сайті S2) та/або інгібує активацію

рецептора Notch1 в результаті зв'язування ліганду. У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло інгібує вивільнення або утворення внутріклітинного домену (ICD) рецептора Notch1. У певних варіантах здійснення винаходу антитіло інгібує зростання пухлини.

Певні варіанти здійснення винаходу відносяться до антитіла, яке зв'язується з нелігандзв'язуючою проксимальною ділянкою мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1 людини і містить (а) CDR1 важкого ланцюга, що включає RGYWIE (SEQ ID NO:15), CDR2 важкого ланцюга, що включає QILPGTGRTNYNEKFKG (SEQ ID NO:16), та/або CDR3 важкого ланцюга, що включає FDGNYGYYAMDY (SEQ ID NO:17); та/або (b) CDR1 легкого ланцюга, що включає RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:18), CDR2 легкого ланцюга, що включає GTNNRAP (SEQ ID NO:19), та/або CDR3 легкого ланцюга, що включає ALWYSNHWWVFGGGTKL (SEQ ID NO:20). У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло має варіабельну ділянку важкого ланцюга, що включає: (а) CDR1 важкого ланцюга, що включає RGYWIE (SEQ ID NO:15), або його варіант, що включає заміни 1, 2, 3 або 4 амінокислот; (b) CDR2 важкого ланцюга, що включає QILPGTGRTNYNEKFKG (SEQ ID NO:16), або його варіант, що включає заміни 1, 2, 3 або 4 амінокислот; та/або (c) CDR3 важкого ланцюга, що включає FDGNYGYYAMDY (SEQ ID NO:17), або його варіант, що включає заміни 1, 2, 3 або 4 амінокислот. У інших певних варіантах здійснення винаходу антитіло має (або додатково має) варіабельну ділянку легкого ланцюга, що включає: (а) CDR1 легкого ланцюга, що включає RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:18), або його варіант, що включає заміни 1, 2, 3 або 4 амінокислот; (b) CDR2 легкого ланцюга, що включає GTNNRAP (SEQ ID NO:19), або його варіант, що включає заміни 1, 2, 3 або 4 амінокислот; та/або (c) CDR3 легкого ланцюга, що включає ALWYSNHWWVFGGGTKL (SEQ ID NO:20), або його варіант, що включає заміни 1, 2, 3 або 4 амінокислот. У деяких варіантах здійснення винаходу заміни амінокислот є консервативними замінами амінокислот.

Деякі варіанти здійснення винаходу відносяться до антитіла 52M51, продукованому лінією клітин гібридами, депонованої в Американську колекцію типових культур (ATCC), за адресою: 10801 University Boulevard, Manassas, VA, USA, згідно з положеннями Будапештського договору 7 серпня 2008 р. під номером РТА-9405. Деякі варіанти здійснення винаходу відносяться до гуманізованого варіанту антитіла 52M51, 52M51H4L3, кодованому ДНК, депонованої в ATCC згідно з положеннями Будапештського договору 15 жовтня 2008 р. під номером РТА-9549. Деякі варіанти здійснення винаходу відносяться до антитіла, яке зв'язується з тим же епітопом, з яким зв'язується антитіло 52M51.

Іншим об'єктом даного винаходу є антитіло, яке зв'язується з нелігандзв'язуючою проксимальною ділянкою мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1 людини, причому вказане антитіло включає, складається або по суті складається з антитіла "52R43", кодованого ДНК, депонованої в ATCC згідно з положеннями Будапештського договору 15 жовтня 2008 р. під номером РТА-9548. Деякі варіанти здійснення винаходу відносяться до антитіла, яке конкурує з антитілом 52R43 за специфічне зв'язування з нелігандзв'язуючою проксимальною ділянкою мембрани позаклітинного домену Notch1 людини. Даний винахід відноситься також до фармацевтичних композицій, що включає антитіло 52R43, і до способів лікування рака, які включають введення терапевтично ефективної кількості антитіла 52R43.

Певні варіанти здійснення винаходу відносяться до антитіла, яке конкурує з будь-якими антитілами, розглянутими в приведених вище варіантах здійснення винаходу та/або об'єктах, а також в інших об'єктах/варіантах здійснення винаходу, представлених в даному описі винаходу, за специфічне зв'язування з нелігандзв'язуючою проксимальною ділянкою мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1 людини (наприклад, при виконанні конкурентно-зв'язуючого аналізу). Даний винахід відноситься також до фармацевтичних композицій, що включають описані антитіла, і до способів лікування рака, які включають введення терапевтично ефективної кількості вказаних антитіл.

У певних вищезгаданих об'єктах і варіантах здійснення винаходу, а також в інших об'єктах і варіантах здійснення винаходу, представлених в даному описі винаходу, антитіло є рекомбінантним антитілом. У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло є моноклональним антитілом, химерним антитілом, гуманізованим антитілом або людським антитілом. У певних варіантах здійснення винаходу антитіло є фрагментом антитіла. У певних варіантах здійснення винаходу антитіло або фрагмент антитіла є моновалентним, моноспецифічним, двовалентним, біспецифічним або мультиспецифічним. У певних варіантах здійснення винаходу антитіло кон'юговано з цитотоксичною частиною. У певних варіантах здійснення винаходу антитіло є виділеним антитілом. У інших варіантах здійснення винаходу антитіло є по суті чистим антитілом.

Даний винахід відноситься також до фармацевтичних композицій, що включають антитіла по даному винаходу, і до способів лікування рака, які включають введення терапевтично

ефективної кількості антитіл по даному винаходу. У певних варіантах здійснення винаходу фармацевтичні композиції далі включають фармацевтично прийнятний носій.

Іншим об'єктом даного винаходу є поліпептид. У деяких варіантах здійснення винаходу поліпептид є антитілом (наприклад, антитілом, яке специфічно зв'язується з рецептором Notch1), важким ланцюгом або легким ланцюгом антитіла та/або фрагментом антитіла. У деяких варіантах здійснення винаходу поліпептид є виділеним поліпептидом. У певних варіантах здійснення винаходу поліпептид є по суті чистим поліпептидом. У деяких варіантах здійснення винаходу поліпептид включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:28 або SEQ ID NO:32. У деяких варіантах здійснення винаходу поліпептид включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14 або SEQ ID NO:24 і амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:28 або SEQ ID NO:32. У деяких варіантах здійснення винаходу поліпептид включає щонайменше частину амінокислотної послідовності SEQ ID NO:14 або SEQ ID NO:24 та/або щонайменше частину амінокислотної послідовності SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:28 або SEQ ID NO:32. Даний винахід відноситься також до фармацевтичних композицій, що включають поліпептид і фармацевтично прийнятний носій, а також до ліній клітин, що продукують вказаний поліпептид.

У деяких варіантах здійснення винаходу поліпептид включає: (а) поліпептид, що має послідовність, яка щонайменше приблизно на 80 % ідентична SEQ ID NO:14 або SEQ ID NO:24; і (b) поліпептид, що має послідовність, яка щонайменше приблизно на 80 % ідентична SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:28 або SEQ ID NO:32. У певних варіантах здійснення винаходу поліпептид є антитілом (наприклад, антитілом, яке специфічно зв'язується з нелігандзв'язуючою проксимальною ділянкою мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1 людини). У певних варіантах здійснення винаходу поліпептид є поліпептидом, що має послідовність, яка щонайменше приблизно на 85 %, щонайменше приблизно на 90 %, щонайменше приблизно на 95 %, щонайменше приблизно на 98 % або приблизно на 100 % ідентична SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:28 або SEQ ID NO:32. У певних варіантах здійснення винаходу поліпептид включає варіабельну ділянку важкого ланцюга і варіабельну ділянку легкого ланцюга антитіла 52M51. У деяких варіантах здійснення винаходу поліпептид включає варіабельну ділянку важкого ланцюга та/або варіабельну ділянку легкого ланцюга гуманізованого антитіла 52M51. У деяких варіантах здійснення винаходу поліпептид включає варіабельну ділянку важкого ланцюга та/або варіабельну ділянку легкого ланцюга антитіла 52R43.

Іншим об'єктом даного винаходу є молекула полінуклеотиду, що кодує будь-які антитіла та/або поліпептиди по вищезгаданих об'єктах винаходу, а також інших об'єктах/варіантах здійснення винаходу, представлених в даному описі винаходу. У деяких варіантах здійснення винаходу експресуючий вектор включає молекулу полінуклеотиду. У інших варіантах здійснення винаходу клітина-хазяїн включає експресуючий вектор. У деяких варіантах здійснення винаходу клітина-хазяїн є лінією клітин або лінією клітин гібридами. У певних варіантах здійснення винаходу лінія клітин гібридами продукує антитіло 52M51 або гуманізоване антитіло 52M51.

Іншим об'єктом даного винаходу є спосіб інгібування активності рецептора Notch1 в клітині, який включає контактування вказаної клітини з ефективною кількістю будь-якого з антитіл або поліпептидів, описаних в розглянутих вище об'єктах і варіантах здійснення винаходу, а також в інших об'єктах/варіантах здійснення винаходу, представлених в даному описі винаходу. У певних варіантах здійснення винаходу клітина є пухлинною клітиною.

Ще одним об'єктом даного винаходу є спосіб інгібування зростання пухлини у суб'єкта, який включає введення вказаному суб'єктові терапевтично ефективною кількістю будь-якої з антитіл або поліпептидів, описаних в розглянутих вище об'єктах і варіантах здійснення винаходу, а також в інших об'єктах/варіантах здійснення винаходу, представлених в даному описі винаходу. У деяких варіантах здійснення винаходу пухлина включає ракові ствольні клітини. У деяких варіантах здійснення винаходу вказані способи включають направлену дію антитілами на ракові ствольні клітини. У певних варіантах здійснення винаходу вказані способи включають зменшення частоти зустрічальності ракових ствольних клітин в пухлині, зменшення числа ракових ствольних клітин в пухлині, зменшення онкогенності пухлини та/або зменшення онкогенності пухлини шляхом зменшення числа або частоти зустрічальності ракових ствольних клітин в пухлині. У деяких варіантах здійснення винаходу способи включають інгібування активності рецептора Notch1 та/або інгібування зростання пухлини. У певних варіантах здійснення винаходу пухлину вибирають з групи, що складається з пухлини молочної залози, колоректальної пухлини, пухлини печінки, пухлини нирки, пухлини легень, пухлини підшлункової залози, пухлини яєчника, пухлини передміхурової залози і пухлини голови і шиї.



Іншим об'єктом даного винаходу є способи лікування рака у суб'єкта. У деяких варіантах здійснення винаходу вказаний спосіб включає введення суб'єктові терапевтично ефективної кількості будь-якої з антитіл або поліпептидів, описаних в розглянутих вище об'єктах та/або варіантах здійснення винаходу, а також в інших об'єктах/варіантах здійснення винаходу, представлених в даному описі винаходу. У деяких варіантах здійснення винаходу рак, що підлягає лікуванню є раком молочної залози, колоректальним раком, печінковим раком, раком нирки, раком печінки, раком легень, раком підшлункової залози, шлунково-кишковим раком, меланомою, раком яєчника, раком передміхурової залози, раком шийки матки, раком сечового міхура, гліобластомою і раком голови і шиї. У певних вищезгаданих об'єктах або варіантах здійснення винаходу, а також інших об'єктах та/або варіантах здійснення винаходу, представлених в даному описі винаходу, спосіб лікування рака включає інгібування зростання пухлини.

Додатковим об'єктом даного винаходу є спосіб інгібування зростання пухлини у суб'єкта, який включає введення вказаному суб'єктові терапевтично ефективної кількості антитіла, яке специфічно зв'язується з нелігандзв'язуючою проксимальною ділянкою мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1 людини і таким чином інгібує активність Notch1.

Іншим об'єктом даного винаходу є спосіб зменшення онкогенності пухлини, що включає ракові ствові клітини, шляхом зменшення частоти зустрічальності або числа ракових ствовіх клітин в пухлині, який включає контакт пухлини з ефективною кількістю антитіла, що інгібує активність рецептора Notch1.

У певних вищезгаданих об'єктах та/або варіантах здійснення винаходу, а також інших об'єктах або варіантах здійснення винаходу, представлених в даному описі винаходу, вказані способи далі включають введення суб'єктові щонайменше одного додаткового протиракового та/або терапевтичного агента. У певних вищезгаданих об'єктах та/або варіантах здійснення винаходу, а також інших об'єктах або варіантах здійснення винаходу, представлених в даному описі винаходу, антитіло або поліпептид вводять суб'єктові в комбінації з додатковим лікуванням рака. У певних варіантах здійснення винаходу додаткове лікування рака включає променеву терапію, хіміотерапію та/або додаткову терапію антитілами. У певних варіантах здійснення винаходу хіміотерапія включає таксол, іринотекан, гемцитабін та/або оксаліплатин. У певних варіантах здійснення винаходу додаткова терапія антитілами включає використання антитіла, яке специфічно зв'язується з другим рецептором Notch людини (наприклад, Notch2) або з лігандом рецептора Notch людини (наприклад, DLL4 або JAG1). У певних варіантах здійснення винаходу додаткова терапія антитілами включає використання антитіла, яке специфічно зв'язується з VEGF. У певних варіантах здійснення винаходу суб'єкт, що піддається лікуванню, є людиною.

Даний винахід далі відноситься до способу лікування у людини рака, що включає ракові ствові клітини, в якому ракові ствові клітини не характеризуються надекспресією одного або декількох рецепторів Notch, при цьому вказаний спосіб включає введення людині терапевтично ефективної кількості антитіла, яке зв'язується з проксимальною ділянкою мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1 і блокує активацію лігандом рецептора Notch1.

Даний винахід далі відноситься до способу лікування рака у людини, яка включає введення вказаній людині терапевтично ефективної кількості (а) першого антитіла, яке зв'язується з рецептором Notch1 і інгібує зростання ракових ствовіх клітин, надекспресуючих рецептори Notch; і (b) другого антитіла, яке зв'язується з рецептором Notch і блокує активацію лігандом рецептора Notch.

Даний винахід відноситься також до іншого способу лікування рака, вибраного з групи, що складається з рака молочної залози, ободової кишки, підшлункової залози, передміхурової залози, легень, ректального і колоректального рака, який включає введення терапевтично ефективної кількості антитіла, яке блокує активацію лігандом рецептора Notch1.

Даний винахід додатково відноситься до гуманізованого антитіла, яке зв'язується з Notch1 і блокує активацію лігандом рецептора Notch1; до композиції, що включає гуманізоване антитіло і фармацевтично прийнятний носій; і до імунокон'югату, що включає гуманізоване антитіло, кон'юговане з цитотоксичним агентом.

Крім того, даний винахід відноситься до виділеного полінуклеотиду, що кодує гуманізоване антитіло; до вектора, що включає нуклеїнову кислоту; до клітини-хазяїна, що включає нуклеїнову кислоту або вектор; а також до способу отримання гуманізованого антитіла, який включає культивування клітини-хазяїна, що включає вказану нуклеїнову кислоту, з досягненням експресії нуклеїнової кислоти, і необов'язкове подальше виділення гуманізованого антитіла з культури клітин-хазяїв (наприклад, з культурального середовища клітин-хазяїв).

Даний винахід далі відноситься до імунокон'югату, що включає антитіло, що зв'язується з рецептором Notch, яке кон'юговане з однією або декількома молекулами каліхеаміцину, і до вживання таких кон'югатів для лікування рака, експресуючого рецептори Notch, наприклад, рака, в якому ракові ствольні клітини надекспресують рецептори Notch.

Приклади солідних пухлин, які можна лікувати, використовуючи терапевтичну композицію по даному винаходу, наприклад, антитіло, яке зв'язується з проксимальною ділянкою мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1, включають, не обмежуючись ними, саркоми і карциноми, такі як фібросаркома, міксосаркома, ліпосаркома, хондросаркома, остеогенна саркома, хордома, ангіосаркома, ендотеліосаркома, лімфангіосаркома, лімфангіоендотеліосаркома, синовіома, мезотеліома, пухлина Юінга, лейоміосаркома, рабдоміосаркома, карцинома ободової кишки, рак підшлункової залози, рак молочної залози, рак яєчника, рак передміхурової залози, плоскоклітинний рак, базально-клітинний рак, аденокарцинома, карцинома потової залози, карцинома сальної залози, папілярна карцинома, папілярна аденокарцинома, цистаденокарцинома, медулярна карцинома, бронхогенний рак, нирково-клітинний рак, гепатома, рак жовчної протоки, хоріокарцинома, семінома, ембріональний рак, пухлина Вільмса, рак шийки матки, рак яєчка, рак легень, дрібноклітинний рак легень, рак сечового міхура, епітеліальний рак, гліома, астроцитом, медулобластома, краніофарингіома, епендиміома, пінеалома, гемангіобластома, невринома слухового нерва, олігодендрогліома, менінгіома, меланома, нейробластома і ретинобластома.

У тих випадках, коли об'єкти і варіанти здійснення винаходу описані у вигляді групи Маркуша або іншої групи альтернатив, в об'єм даного винаходу входить не лише вся група, але також кожен член вказаної групи і всі можливі підгрупи основної групи, а також основна група за відсутності одного або декількох членів групи. Даним винаходом також передбачено чітко виражене виключення одного або декількох будь-яких членів групи в заявленому винаході.

Короткий опис креслень

Фігура 1. Ідентифікація антитіл, спрямовано діючих на проксимальну ділянку мембрани рецептора Notch, які інгібують передачу сигналу Notch.

(А) Схематичне зображення рецептора Notch і ділянки антигена 52М. Антиген 52М включає ділянку рецептора Notch1, розщеплювану фурином в процесі дозрівання рецептора і протеазами ADAM (дезінтегрин А і металопротеази) після зв'язування ліганду. Подальший процесинг гамма-секретазою викликає вивільнення внутріклітинного домену (ICD) Notch, який активує транскрипцію гена в ядрі. (В) Рівні люциферази (ось у), виділеної з клітин Notch1-Hela, культивованих у присутності розчинного ліганду Notch (hDLL4-fc) і антитіл проти рецептора Notch1. Результати, отримані для нетрансфецированих (NT) клітин, культивованих в присутності і відсутності hDLL4-Fc, показані зліва на осі х. Антитіла проти антигена 52М рецептора Notch1 показані на осі х порівняно з DBZ, інгібітором гамма-секретази Notch (GSI) і 21M18, антитілом проти DLL4. Всі антитіла 52M51, 52M63, 52M74 і 52M80 проти рецептора Notch1 істотно інгібували передачу сигналу Notch, про що свідчить зниження активності люциферази. (С) Рівні люциферази (ось у), виділеної з клітин Notch1-Hela, культивованих у присутності розчинного ліганду Notch (hDLL4-fc) і антитіл проти рецептора Notch1. Результати, отримані для нетрансфікованих (NT) клітин, культивованих в присутності і відсутності hDLL4-Fc, показані зліва на осі х. Антитіло 52M51, отримане з гібридами миші, і гуманізований варіант 52M51-H4/L3, показані на осі х в різних вказаних концентраціях. Як вихідне мишаче антитіло 52M51, так і гуманізований варіант істотно інгібували передачу сигналу Notch, про що свідчить зниження активності люциферази. (D) Аналіз методом вестерн-блотингу утворення ICD після опосередкованої лігандом стимуляції клітин Hela, експресуючих Notch1. Мінімальна кількість ICD була продукована за відсутністю ліганду DLL4 (-DLL4), але присутність DLL4 стимулювала утворення ICD. Антитіла 52M51, 52M63, 52M74 і 52M80 зменшують утворення ICD до фонових рівнів, не дивлячись на присутність DLL4.

Фігура 2. Антитіло 52M52 проти рецептора Notch1 інгібує утворення пухлини in vivo.

(А) Мишам NOD/SCID, яким були ін'єктовані клітини пухлини ободової кишки C8, вводили контрольне антитіло (квадрати) або антитіло 51M51 проти Notch1 (трикутники) і вимірювали об'єм пухлини (ось у, мм<sup>3</sup>) протягом певного періоду часу (ось х, дні). Введення антитіл 52M51 істотно (p=0,0006) інгібувало зростання пухлини в порівнянні з контрольним антитілом. (В) Об'єм пухлини у тварин по пункту (А) вимірювали на 48-й і 55-й день і порівнювали результати, отримані для контрольних мишей (зліва) і мишей, яким вводили антитіло 52M51 (справа). Лінією відокремлено середнє значення для кожної піддослідної групи. (С) Мишам NOD/SCID, яким були ін'єктовані клітини пухлини молочної залози Pe13, вводили контрольне антитіло (чорні квадрати) або антитіла проти Notch1, які не інгібують передачу сигналу Notch, показані на фігурі 1В: 52M1 (чорні трикутники) і 52M2 (сірі кружки). Об'єм пухлини (ось у, мм<sup>3</sup>) вимірювали

протягом певного періоду часу (ось  $x$ , дні). Введення антитіл 52M1 і 52M2 не впливало на зростання пухлини в порівнянні з тваринами, яким вводили контрольне антитіло. (D) Мишам NOD/SCID, яким були ін'єктовані клітини пухлини молочної залози Pe13, вводили контрольне антитіло (квадрати) або антитіло 52M8 проти Notch1 (трикутники), яке не інгібує передачу сигналу Notch, показане на фігурі 1B. Об'єм пухлини (ось  $y$ ,  $\text{мм}^3$ ) вимірювали протягом визначеного періоду часу (ось  $x$ , дні). Введення антитіла 52M8 не впливало на зростання пухлини в порівнянні з тваринами, яким вводили контрольне антитіло.

Фігура 3. Антитіло 52R43 проти рецептора Notch1 інгібує зростання пухлини *in vivo*.

(A) Мишам NOD/SCID, яким були ін'єктовані клітини меланоми M2, вводили контрольне антитіло (квадрати) або антитіло 52R43 проти Notch1 (кружки) і вимірювали об'єм пухлини (ось  $y$ ,  $\text{мм}^3$ ) протягом певного періоду часу (ось  $x$ , дні). (B) Мишам NOD/SCID, яким були ін'єктовані клітини пухлини легень Lu24, вводили контрольне антитіло (квадрати) або антитіло 52R43 проти Notch1 (кухлі) і вимірювали об'єм пухлини (ось  $y$ ,  $\text{мм}^3$ ) протягом певного періоду часу (ось  $x$ , дні). (C) Мишам NOD/SCID, яким були ін'єктовані клітини пухлини підшлункової залози PN8, вводили контрольне антитіло (квадрати) або антитіло 52R43 проти Notch1 (кружки) і вимірювали об'єм пухлини (ось  $y$ ,  $\text{мм}^3$ ) протягом певного періоду часу (ось  $x$ , дні). (D) Мишам NOD/SCID, яким були ін'єктовані клітини пухлини молочної залози T1, вводили контрольне антитіло (квадрати), антитіло 52R43 проти Notch1 (кружки), таксол (трикутники) або антитіло 52R43 і таксол (окружності) і вимірювали об'єм пухлини (ось  $y$ ,  $\text{мм}^3$ ) протягом певного періоду часу (ось  $x$ , дні).

Детальний опис винаходу

Даний винахід відноситься до нових агентів, які включають, не обмежуючись ними, поліпептиди, такі як антитіла, які зв'язуються з одним або декількома рецепторами Notch людини. Агенти, що зв'язуються з Notch, включають антагоністи рецепторів Notch людини. Даний винахід відноситься також до родинних поліпептидів і полінуклеотидів, композицій, що включають агенти, що зв'язуються з Notch, і способів одержання агентів, що зв'язуються з Notch. Даний винахід далі відноситься до способів використання нових агентів, що зв'язуються з Notch, таким як способи інгібування зростання пухлини та/або лікування рака.

Даний винахід далі відноситься до молекул (наприклад, антитілам), які специфічно зв'язуються з нелігандзв'язуючою проксимальною ділянкою мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1 людини і інгібують зростання пухлини *in vivo*. Лігандзв'язуюча ділянка рецептора Notch, яка необхідна і достатня для зв'язування ліганду, була ідентифікована у вигляді повторів EGF 11 і 12, з чого виходить, що дана ділянка рецептора Notch має важливе значення для передачі сигналу Notch і онкогенезу (Rebay et al., 1991, Cell 67:687; Lei et al., 2003, Dev. 130:6411; Hambleton et al., 2004, Structure 12:2173). Вельми несподівано було встановлено, що антитіла, які зв'язуються за межами лігандзв'язуючої ділянки позаклітинного домену рецептора Notch людини, інгібують зростання пухлинних клітин *in vivo* (див. публікацію патенту США № 2008/0131434, яка повністю включена в даний опис винаходу як посилання). Таким чином, антитіла, які зв'язуються за межами лігандзв'язуючої ділянки позаклітинного домену одного або декількох рецепторів Notch людини, а саме Notch1, Notch2, Notch3 і Notch4, можуть бути корисні як можливі засоби для лікування рака.

В даний час ідентифіковані моноклональні антитіла, які специфічно зв'язуються з проксимальною ділянкою мембрани позаклітинного домену Notch1, включаючи моноклональне антитіло 52M51 (приклад 1). Також створені гуманізовані антитіла 52M51 (приклад 2). Декілька антитіл, у тому числі антитіло 52M51 і гуманізований варіант антитіла 52M51, інгібують індуковану лігандом передачу сигналу Notch1 (приклад 3 і фігура 1B і C), не дивлячись на зв'язування з рецептором Notch1 в ділянці за межами лігандзв'язуючої ділянки. В даний час також продемонстрована здатність декількох антитіл інгібувати утворення внутріклітинного домену (ICD) рецептора Notch (приклад 3 і фігура 1D). Було встановлено, що антитіло 52M51 інгібує зростання пухлинних клітин *in vivo* в моделі ксенотрансплантату (приклад 5 і фігура 2A і B). Крім того, було виявлено, що інше антитіло 52R43 інгібує зростання пухлинних клітин *in vivo* в декількох моделях ксенотрансплантатів (приклад 7 і фігура 3A-D).

Визначення термінів

"Антагоніст" рецептора Notch у використаному тут значенні є терміном, що означає будь-яку молекулу, яка частково або повністю блокує, інгібує або нейтралізує біологічну активність сигнального шляху Notch. Прийнятні молекули антагоністів включають антитіла або фрагменти антитіл. Термін "антагоніст" у використаному тут значенні означає будь-яку молекулу, яка частково або повністю блокує, інгібує або нейтралізує експресію рецептора Notch.

Термін "антитіло" означає молекулу імуноглобуліну, яка розпізнає і специфічно зв'язується з мішенню, такою як білок, поліпептид, пептид, вуглевод, полінуклеотид, ліпід або комбінація

вищезгаданих мішеней і т.д., за допомогою щонайменше одного сайту розпізнавання антигена у варіабельній ділянці молекули імуноглобуліну. У визначення даного терміну входять інтактні поліклональні антитіла, інтактні моноклональні антитіла, фрагменти антитіл (такі як Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> і Fv-фрагменти), одноланцюгові мутанти Fv (scFv), мультиспецифічні антитіла, такі як біспецифічні антитіла, створені щонайменше з двох інтактних антитіл, моновалентні або моносспецифічні антитіла, химерні антитіла, гуманізовані антитіла, людські антитіла, злиті білки, що включають антигеновизначальну частину антитіла, і будь-які інші модифіковані молекули імуноглобуліну, що включають сайт розпізнавання антигена, якщо вказані антитіла володіють необхідною біологічною активністю. Антитіло може відноситися до будь-якого з п'яти основних класів імуноглобулінів: IGA, IGD, IGE, IGG і IGM або їх підкласам (ізотипам) (наприклад, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 і IgA2) на основі ідентичності їх константних ділянок важкого ланцюга, визначуваних відповідно як альфа, дельта, епсилон, гамма і мію. Імуноглобуліни різних класів мають різні і добре відомі структури субодиниць і тривимірні конфігурації. Антитіла можуть бути голими або кон'югованими з іншими молекулами, такими як токсини, радіоізотопи і т. д.

У використаному тут значенні термін "фрагмент антитіла" означає частину інтактного антитіла і служить для визначення антигеновизначальних варіабельних ділянок інтактного антитіла. Приклади фрагментів антитіл включають, не обмежуючись ними, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> і Fv-фрагменти, лінійні антитіла, одноланцюгові антитіла і мультиспецифічні антитіла, утворені з фрагментів антитіл.

Термін "Fv-антитіло" означає мінімальний фрагмент антитіла, який містить повний сайт розпізнавання антигена і антигензв'язуючий сайт або у вигляді двох ланцюгів, в яких варіабельний домен одного важкого і одного легкого ланцюга утворює нековалентно зв'язаний димер, або у вигляді одного ланцюга (scFv), в якому варіабельний домен одного важкого і одного легкого ланцюга ковалентно зв'язаний гнучким пептидним лінкером, завдяки чому два ланцюги утворюють подібну димерну структуру. У даній конфігурації ділянки, що визначають комплементарність, (CDR) кожного варіабельного домену взаємодіють, визначаючи антигензв'язуючу специфічність Fv-димера. Альтернативно для розпізнавання і зв'язування антигена може бути використаний один варіабельний домен (або половина Fv), хоча зазвичай з нижчою афінністю.

Термін "моноклональне антитіло" у використаному тут значенні означає популяцію гомогенних антитіл, що беруть участь у високоспецифічному розпізнаванні і зв'язуванні однієї антигенної детермінанти або епітопа. Цим моноклональні антитіла відрізняються від поліклональних антитіл, які зазвичай включають різні антитіла, направлені проти різних антигенних детермінант. У визначення терміну "моноклональне антитіло" входять як інтактні і непроцесовані моноклональні антитіла, так і фрагменти антитіл (наприклад, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv), одноланцюгові мутанти (scFv), злиті білки, що включають частину антитіла, і будь-які інші модифіковані молекули імуноглобуліну, що включають сайт розпізнавання антигена. Крім того, термін "моноклональне антитіло" означає антитіла, створені будь-якими методами, які включають, не обмежуючись ними, метод гібридом, фаговий відбір, експресію рекомбінантів і трансгенних тварин.

У використаному тут значенні термін "гуманізоване антитіло" означає форми антитіл, відмінних від людських, (наприклад, мишачих), які є специфічними ланцюгами імуноглобулінів, химерними імуноглобулінами або їх фрагментами, що містять мінімальні послідовності, відмінні від людських. Гуманізовані антитіла зазвичай є імуноглобулінами людини, в яких залишки з ділянок, що визначають комплементарність, (CDR), замінені залишками з CDR видів, відмінних від людини (наприклад, миші, щура, кролика, хом'яка і т. д.), які володіють необхідною специфічністю, афінністю та/або потенціалом. В деяких випадках залишки основної Fv-ділянки (FR) імуноглобуліну людини замінені відповідними залишками в антитілі з видів, відмінних від людини, які володіють необхідною специфічністю, афінністю та/або потенціалом. Гуманізоване антитіло може бути далі модифіковане шляхом введення додаткових залишків в основну Fv-ділянку та/або в замінені залишки, відмінні від людських, для поліпшення і оптимізації специфічності, афінності та/або потенціалу антитіла. Як правило, гуманізоване антитіло включає по суті все, зокрема, щонайменше один або зазвичай два або три варіабельних домену, що містять всі або по суті всі CDR-ділянки, які відповідають імуноглобуліну, відмінному від людського, де всі або по суті всі основні ділянки (FR) є ділянками консенсусної послідовності імуноглобуліну людини. Гуманізоване антитіло може також включати щонайменше частину константної ділянки або домену (Fc) імуноглобуліну, який зазвичай є імуноглобуліном людини. Приклади методів, використовуваних для створення гуманізованих антитіл, наведені в патенті США № 5225539, який включений в даний опис винаходу як посилання.

Термін "варіабельна ділянка" антитіла означає варіабельну ділянку легкого ланцюга антитіла або варіабельну ділянку важкого ланцюга антитіла, окремо або в комбінації. Варіабельні ділянки важкого і легкого ланцюга складаються з чотирьох остовних ділянок (FR), з'єднаних трьома ділянками, що визначають комплементарність (CDR), відомими також як гіперваріабельні ділянки. CDR-ділянки в кожному ланцюзі стримуються в безпосередній близькості одна від одної остовними ділянками, при цьому CDR-ділянки з іншого ланцюга сприяють утворенню антигензв'язуючого сайту антитіл. Існують щонайменше два методи визначення CDR-ділянок: (1) метод, заснований на варіабельності послідовностей в різних видах (наприклад, публікація Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda Md.); і (2) метод, заснований на кристалографічних дослідженнях комплексів антиген-антитіло (Al-lazikani et al., 1977, J. Molec. Biol. 273:927-948). Крім того, для визначення CDR-ділянок в даній галузі інколи використовують комбінації двох вказаних методів.

Термін "людське антитіло" у використаному тут значенні означає антитіло, продуковане людиною, або антитіло, що має амінокислотну послідовність, відповідну антитілу, продукованому людиною, яке було отримано будь-якими методами, відомими в даній галузі. У вказане визначення людського антитіла входять інтактні або непродуковані антитіла, їх фрагменти та/або антитіла, що включають щонайменше один поліпептид важкого та/або легкого ланцюга людини, такі як, наприклад, антитіло, що включає поліпептиди легкого ланцюга миші і важкого ланцюга людини.

Термін "химерні антитіла" означає антитіла, в яких амінокислотна послідовність молекули імуноглобуліну виділена з двох або більшого числа видів. Варіабельна ділянка легкого і важкого ланцюгів зазвичай відповідає варіабельній ділянці антитіл, отриманих з одного виду ссавців (наприклад, миші, щура, кролика і т.д.), які володіють необхідною специфічністю, афінністю та/або потенціалом, тоді як константні ділянки гомологічні послідовностям в антитілах, отриманих з іншого виду (зазвичай людини), щоб уникнути імунної відповіді на вказаний вид. У визначення терміну "химерне антитіло" входять моновалентні, двовалентні і полівалентні антитіла.

Терміни "епітоп" або "антигенна детермінанта" мають взаємозамінні значення і означають частину антигену, яка може бути розпізнана і специфічно зв'язана певним антитілом. У антигені, що є поліпептидом, епітопи можуть бути утворені з суміжних амінокислот і несуміжних амінокислот, зв'язаних шляхом третинного укладання білка. Епітопи, утворені з суміжних амінокислот (визначувані також як лінійні епітопи), зазвичай зберігаються в процесі денатурації білка, тоді як епітопи, утворені шляхом третинного укладання (визначувані також як конформаційні епітопи), зазвичай втрачаються в процесі денатурації білка. Епітоп зазвичай включає щонайменше 3 або частіше щонайменше 5 або 8-10 амінокислот, створюючих унікальну просторову конформацію.

Те, що антитіло "вибірково зв'язується" або "специфічно зв'язується" з епітопом або рецептором, означає, що антитіло взаємодіє або зв'язується з епітопом або рецептором частіше, швидше, триваліше, з більшою афінністю або у вигляді комбінації вказаних дій, чим з іншими речовинами, включаючи неродинні білки. Термін "вибірково зв'язується" або "специфічно зв'язується" означає, наприклад, що антитіло зв'язується з білком при значенні  $K_D$ , рівному приблизно 0,1 мМ або менше, інколи приблизно 1 мкМ або менше, інколи приблизно 0,1 мкМ або менше і інколи приблизно 0,01 мкМ або менше. Завдяки ідентичності послідовностей в гомологічних білках в різних видах термін "специфічне зв'язування" може відноситися до антитіла, яке розпізнає рецептор Notch в більш ніж одному вигляді. Очевидно, що в певних варіантах здійснення винаходу антитіло або частина, що зв'язується, яка специфічно зв'язується з першою мішенню, може або не може специфічно зв'язуватися з другою мішенню. Таким чином, "специфічне зв'язування" не обов'язково вимагає (хоча може включати) виняткового зв'язування, тобто зв'язування з однією мішенню. Як правило, але не обов'язково, зв'язування означає специфічне зв'язування.

Конкуренцію між антитілами визначають за допомогою аналізу, при виконанні якого досліджуваний імуноглобулін інгібує специфічне зв'язування еталонного антитіла із загальним антигеном. Відомо багато типів конкурентно-зв'язуючих аналізів, наприклад: твердофазний радіоімунаналіз (RIA) прямого або непрямого зв'язування, твердофазний імунферментний аналіз (EIA) прямого або непрямого зв'язування, конкурентно-зв'язуючий сендвіч-аналіз (див. публікацію Stahl et al., Methods in Enzymology 9:242-253 (1983)); твердофазний імунферментний аналіз прямого зв'язування на основі біотина-авідина (див. публікацію Kirkland et al., J. Immunol. 137:3614-3619 (1986)); твердофазний аналіз прямого зв'язування з міченням, твердофазний сендвіч-аналіз прямого зв'язування з міченням (див. публікацію Harlow

and Lane, "Antibodies, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Press (1988)); твердофазний радіоімуноаналіз прямого зв'язування з міченням при використанні мітки  $^{125}\text{I}$  (див. публікацію Morel et al., Molec. Immunol. 25(1):7-15 (1988)); твердофазний імуноферментний аналіз прямого зв'язування на основі біотина-авідина (Cheung et al., Virology 176:546-552 (1990)); і

5 радіоімуноаналіз прямого зв'язування з міченням (Moldenhauer et al., Scand. J. Immunol. 32:77-82 (1990)). Такий аналіз зазвичай включає використання очищеного антигена, зв'язаного з твердою поверхнею або клітинами, що несуть немічений випробовуваний імуноглобулін і мічений еталонний імуноглобулін. Конкурентне інгібування вимірюють, визначаючи кількість мітки, зв'язаної з твердою поверхнею або клітинами у присутності випробовуваного

10 імуноглобуліну. Випробовуваний імуноглобулін зазвичай присутній в надлишку. Антитіла, ідентифіковані за допомогою конкурентного аналізу (конкуруючі антитіла), включають антитіла, що зв'язуються з тим же епітопом, що і еталонне антитіло, і антитіла, що зв'язуються з суміжним епітопом, розташованим досить близько до епітопа, зв'язаного еталонним антитілом, для утворення стеричної перешкоди. Конкуруюче антитіло, присутнє в надлишку, зазвичай інгібує

15 специфічне зв'язування еталонного антитіла із загальним антигеном щонайменше на 50 % або 75 %.

Терміни "виділений" або "очищений" служать для визначення речовини, яка в основному або по суті не містить компонентів, які зазвичай супроводять її в нативному стані. Чистоту і гомогенність зазвичай визначають методами аналітичної хімії, такими як електрофорез в

20 поліакриламідному гелі або вискоєфективна рідинна хроматографія. Білок (наприклад, антитіло) або нуклеїнова кислота, яка переважає в препараті, є по суті очищеною. Зокрема, в деяких варіантах здійснення винаходу виділена нуклеїнова кислота, що включає ген, відокремлена від відкритих рамок читування, які в природних умовах фланкують ген і кодують білки, відмінні від білка, кодованого даним геном. Виділене антитіло відокремлюють від інших

25 білків, що не є імуноглобулінами, і від інших білків імуноглобуліну, що володіють іншими антигензв'язуючими специфічностями. Даний термін може також означати, що нуклеїнова кислота або білок є чистим щонайменше на 85 %, щонайменше на 95 % і в деяких варіантах здійснення винаходу є чистим щонайменше на 99 %.

У використаному тут значенні терміни "рак" і "раковий" служать для визначення або

30 описують фізіологічний стан у ссавців, при якому популяція клітин характеризується нерегульованим зростанням клітин. Приклади рака включають, не обмежуючись ними, карциному, лімфому, бластоми, саркому і лейкоз. Конкретніші приклади таких типів рака включають, не обмежуючись ними, плоскоклітинний рак, дрібноклітинний рак легень, недрібноклітинний рак легень, аденокарциному легень, епідермоїдний рак легень, рак

35 очеревини, печінково-клітинний рак, шлунково-кишковий рак, рак підшлункової залози, гліобластоми, рак шийки матки, рак яєчника, рак печінки, рак сечового міхура, гепатому, рак молочної залози, рак ободової кишки, колоректальний рак, ендометріальну карциному або рак матки, рак слинної залози, рак нирки, рак печінки, рак передміхурової залози, рак жіночих зовнішніх статевих органів, рак щитовидної залози, карциному печінки і різні типи рака голови і

40 шиї.

Терміни "пухлина" і "новоутворення" у використаному тут значенні означають будь-яку масу тканини, що утворюється в результаті надлишкового зростання або проліферації клітин, доброякісну (неракову) або злоякісну (ракову), включаючи передпухлинні стани.

Терміни "проліферативне порушення" і "проліферативне захворювання" означають

45 порушення, що асоціюються з аномальною проліферацією клітин, такої як рак.

Термін "метастази" у використаному тут значенні означає процес поширення або перенесення рака з місця виникнення в інші частини тіла з утворенням аналогічної ракової поразки в новому місці. "Метастатична" або "метастазуюча" клітина є такою клітиною, яка втрачає зчеплення з сусідніми клітинами і мігрує по кровотоку або лімфі з первинного місця

50 поразки в сусідні структури тіла.

Терміни "ракова стволова клітина", "пухлинна стволова клітина" або "стволова клітина солідної пухлини" мають взаємозамінні значення і означають популяцію клітин солідної пухлини, яка володіє: (1) надмірним проліферативним потенціалом; (2) здатністю асиметричного поділу клітин з утворенням одного або декількох типів диференційованого

55 потомства із зниженим проліферативним або диференційованим потенціалом; і (3) здатністю симетричного поділу клітин для самовідновлення або самозбереження. Вказані властивості "ракових стволових клітин", "пухлинних стволових клітин" або "стволових клітин солідної пухлини" повідомляють вказаним раковим стволовим клітинам здатність утворювати пальповані пухлини при трансплантації мишам з порушеною імунологічною реактивністю в порівнянні з

60 більшістю пухлинних клітин, не здатних утворювати пухлини. Ракові стволові клітини

самооновлюються на відміну від хаотичного диференціювання з утворенням пухлин, що містять клітини аномальних типів, які з часом можуть змінюватися при виникненні мутацій.

Терміни "ракова клітина" або "пухлинна клітина" означають загальну популяцію клітин, виділену з пухлини, що включає як неонкогенні клітини, які складають основну частину популяції пухлинних клітин, так і онкогенні ствовові клітини (ракові ствовові клітини).

У використаному тут значенні термін "онкогенний" служить для визначення функціональних ознак ствовової клітини солідної пухлини, що включають властивості самооновлення (виникнення додаткових онкогенних ракових ствовових клітин) і проліферації з утворенням всіх інших пухлинних клітин (виникнення диференційованих і, отже, неонкогенних пухлинних клітин), що дозволяє ствововим клітинам солідної пухлини утворювати пухлину.

У використаному тут значенні термін "онкогенність" пухлини означає здатність довільного зразка клітин, отриманого з пухлини, утворювати пальповані пухлини при трансплантації мишам з порушеною імунологічною реактивністю.

У використаному тут значенні терміни "раковий маркер ствовових клітин", "маркер ракових ствовових клітин", "маркер пухлинних ствовових клітин" або "маркер ствовових клітин солідної пухлини" означають ген або гени, білок, поліпептид або пептид, експресований геном або генами, рівень експресії якого окремо або в комбінації з іншими генами корельований з присутністю онкогенних ракових клітин в порівнянні з неонкогенними клітинами. Кореляція може відноситися до підвищеної або зниженої експресії гена (наприклад, підвищені або знижені рівні мРНК або пептиду, кодованого даним геном).

Терміни "сигнатура гена ракової ствовової клітини", "сигнатура гена пухлинної ствовової клітини" або "сигнатура ракової ствовової клітини" мають взаємозамінні значення і означають сигнатури генів, що включають гени, диференційовано експресовані в ракових ствовових клітинах в порівнянні з іншими клітинами або популяцією клітин, наприклад, нормальної епітеліальної тканини молочної залози. У деяких варіантах здійснення винаходу сигнатури генів ракових ствовових клітин включають гени, диференційовано експресовані в ракових ствовових клітинах на відміну від нормального епітелію молочної залози, при кратній зміні, наприклад, 2-кратному зменшенні та/або збільшенні експресії, і подальшому обмеженні за допомогою статистичного аналізу, наприклад, з використанням значення Р t-критерію для декількох зразків. У іншому варіанті здійснення винаходу гени, диференційовано експресовані в ракових ствовових клітинах, розділені на сигнатури генів ракових ствовових клітин на основі кореляції їх експресії з вибраним геном у поєднанні з кратною або процентною зміною експресії. Сигнатури ракових ствовових клітин служать для ретроспективного і перспективного прогнозування клінічних змін, які включають, не обмежуючись ними, метастази і смерть.

Термін "генетичний тест" у використаному тут значенні означає аналіз генетичної структури суб'єкта або зразка пухлини суб'єкта. Вказаний аналіз може включати виявлення ДНК, РНК, хромосом, білків або метаболітів з метою виявлення для клінічних цілей спадкових або соматичних генотипів або каріотипів, що мають відношення до захворювання.

У використаному тут значенні терміни "біопсія" або "біопсійна тканина" означають зразок тканини або рідини, яку беруть у суб'єкта з метою визначення вмісту в зразку ракової тканини. У деяких варіантах здійснення винаходу біопсійну тканину або рідину отримують у суб'єкта з підозрінням на рак. Біопсійну тканину або рідину потім досліджують на наявність або відсутність рака.

У використаному тут значенні термін "суб'єкт" означає будь-яка тварина (наприклад, ссавець), яка включає, не обмежуючись ними, людину, приматів окрім людини, гризунів і тому подібних, і може бути реципієнтом конкретного лікування. Терміни "суб'єкт" і "пацієнт" мають взаємозамінні значення і означають суб'єкта, що є людиною.

Термін "фармацевтично прийнятний" служить для визначення речовини, затвердженої або затверджуваної керуючим агентством федерального уряду або уряду штату або вказаного у фармакопеї США або іншої загальноновизнаної фармакопеї для використання при лікуванні тварин, включаючи людину.

Термін "фармацевтично прийнятний наповнювач, носій або ад'ювант" або "прийнятний фармацевтичний носій" означає наповнювач, носій або ад'ювант, який може бути введений суб'єктові разом щонайменше з одним антитілом по даному винаходу і який не порушує фармакологічну активність вказаного антитіла і не є токсичним при введенні в дозах, достатніх для доставки терапевтичної кількості антитіла. Крім того, "фармацевтично прийнятний носій" не викликає імунної реакції у суб'єкта, що є реципієнтом. Приклади носіїв включають, не обмежуючись ними, будь-які стандартні фармацевтичні носії, такі як фізіологічний розчин з фосфатним буфером, вода і різні масляні/водні емульсії. Деякі розчинники для аерозолі або

парентерального введення включають фізіологічний розчин з фосфатним буфером або нормальний (0,9 %) фізіологічний розчин.

Термін "фармацевтично прийнятний носій" означає розчинник, ад'ювант, наповнювач або носій, разом з яким вводять щонайменше одне антитіло по даному винаходу.

Термін "ефективна кількість", "терапевтично ефективна кількість" або "терапевтичний ефект" означає кількість антитіла, поліпептиду, полінуклеотиду, дрібної органічної молекули або іншого лікарського засобу, яке надає ефективну дію при "лікуванні" захворювання або порушення у суб'єкта або ссавця. В разі рака терапевтично ефективна кількість лікарського засобу викликає терапевтичний ефект і, отже, може зменшити число ракових клітин; зменшити онкогенність, частоту зустрічальності онкогенних клітин або онкогенний потенціал; зменшити число або частоту зустрічальності ракових стоволових клітин; зменшити об'єм пухлини; інгібувати або припинити інфільтрацію ракових клітин в периферичні органи, включаючи, наприклад, поширення рака в м'які тканини і кістки; інгібувати і припинити метастазування пухлини; інгібувати і припинити зростання пухлини; ослабити в деякій мірі один або декілька симптомів, обумовлених раком; скоротити захворюваність і смертність; поліпшити якість життя або забезпечити комбінацію таких ефектів. Залежно від міри запобігання зростанню та/або знищенню існуючих ракових клітин, агент, наприклад, антитіло, може бути визначений як цитостатичний та/або цитотоксичний.

Такі терміни як "лікування", "лікувати", "полегшення" або "полегшувати" означають 1) терапевтичні заходи, які дозволяють вилікувати, уповільнити розвиток, ослабити симптоми та/або припинити розвиток діагностованого патологічного стану або порушення, і 2) профілактичні або превентивні заходи, які дозволяють запобігти виникненню або уповільнити розвиток патологічного стану або порушення. Таким чином, суб'єктами, що потребують лікування, є суб'єкти, що вже мають порушення; суб'єкти, схильні до виникнення порушення, і суб'єкти, в яких необхідно запобігти виникненню порушення. Вважається, що "лікування" суб'єкта способами по даному винаходу є успішним, якщо у даного суб'єкта виявлений один або декілька наступних ознак: зменшення числа або повна відсутність ракових клітин; зменшення об'єму пухлини; інгібування або відсутність інфільтрації ракових клітин в периферичні органи, включаючи поширення рака в м'які тканини і кістки; інгібування або відсутність метастазів пухлини; інгібування або відсутність зростання пухлини; ослаблення одного або декількох симптомів, що асоціюються з конкретним раком; скорочення захворюваності і смертності; поліпшення якості життя; зменшення онкогенності; скорочення числа або частоти зустрічальності ракових стоволових клітин або має місце комбінація вказаних ефектів.

У використаному тут значенні терміни "полінуклеотид" або "нуклеїнова кислота" означають полімер, що складається з безлічі нуклеотидних ланок (рибонуклеотид або дезоксирибонуклеотид або споріднені структурні варіанти), зв'язаних фосфодієфірними зв'язками, який включає, не обмежуючись ними, ДНК або РНК. У визначення даного терміну входять послідовності, що включають будь-які відомі аналоги основ ДНК і РНК.

Термін "ген" означає послідовність нуклеїнової кислоти (наприклад, ДНК), яка включає кодуєчі послідовності, необхідні для продукування поліпептиду, попередника або РНК (наприклад, рРНК, тРНК). Поліпептид може бути кодований непроцесованою кодуючою послідовністю або будь-якою частиною кодуючої послідовності при збереженні необхідної активності або функціональних властивостей (наприклад, ферментативної активності, зв'язування ліганду, сигнальної трансдукції, імуногенності і т.д.) непроцесованого поліпептиду або фрагмента. У визначення даного терміну входить також кодуєча область структурного гена і послідовності, розташовані поряд з кодуючою ділянкою з обох 5'- і 3'-кінців на відстані близько 1 т.п.о. або більше від будь-якого кінця, завдяки чому ген відповідає довжині непроцесованої мРНК. У визначення терміну "ген" входять як кДНК, так і геномні форми гена.

Термін "рекомбінантний", використовуваний стосовно клітини, нуклеїнової кислоти, білка або вектора, означає, що дана клітина, нуклеїнова кислота, білок або вектор модифікований шляхом введення гетерологічної нуклеїнової кислоти або білка, зміни нативної нуклеїнової кислоти або білка або що дана клітина отримана з модифікованої таким чином клітини. Таким чином, наприклад, рекомбінантні клітини експресують гени, які не зустрічаються в нативній (нерекомбінантній) формі клітини, або експресують нативні гени, які надекспресовані або аномально експресовані яким-небудь іншим чином, наприклад, експресовані у вигляді неприродних фрагментів або сплайсованих варіантів. Термін "рекомбінантна нуклеїнова кислота" означає нуклеїнову кислоту, спочатку отриману *in vitro*, зазвичай в результаті маніпулювання нуклеїновою кислотою з використанням полімераза і ендонуклеаза, у формі, що не зустрічається в природі. Таким чином досягається функціональне зв'язування різних послідовностей. Так, нуклеїнова кислота, виділена в лінійній формі, або експресуючий вектор,



отриманий *in vitro* шляхом лігування молекул ДНК, які зазвичай не з'єднуються, вважаються рекомбінантними відповідно до мети даного винаходу. Очевидно, що після того, як рекомбінантна нуклеїнова кислота отримана і введена в клітину-хазяїна або організм, вона буде реплікувати нерекомбінантно, тобто з використанням *in vivo* клітинного механізму клітини-хазяїна, а не маніпуляцій *in vitro*; проте, такі нуклеїнові кислоти, спочатку отримані рекомбінантними методами, хоча потім і реплікують нерекомбінантно, все ж вважаються рекомбінантними відповідно до мети даного винаходу. Аналогічним чином термін "рекомбінантний білок" означає білок, отриманий рекомбінантними методами, тобто в результаті експресії рекомбінантної нуклеїнової кислоти, описаної вище.

У використаному тут значенні термін "вектор" означає молекули нуклеїнової кислоти, що переносять сегменти ДНК з однієї клітини в іншу. Вектори часто отримують з плазмід, бактеріофагів, рослинних або тваринних вірусів.

У використаному тут значенні термін "експресія гена" означає процес перетворення генетичної інформації, кодованої геном, в РНК (наприклад, мРНК, рРНК, тРНК або мяРНК) в результаті "транскрипції" гена (наприклад, шляхом ферментативної дії РНК-полімерази), а для генів, кодуючих білок, в білок в результаті "трансляції" мРНК. Експресія гена може регулюватися на багатьох стадіях даного процесу. Термін "посилення" або "активація" означає регуляцію, яка збільшує продукування продуктів експресії гена (наприклад, РНК або білка), тоді як термін "ослаблення" або "репресія" означає регуляцію, яка зменшує продукування. Молекули (наприклад, чинники транскрипції), які беруть участь в посиленні або ослабленні, часто іменуються відповідно "активаторами" або "репресорами".

Терміни "поліпептид", "пептид", "білок" або "фрагмент білка" мають взаємозамінні значення в даному описі винаходу і означають полімер, що складається з амінокислотних залишків. Вказані терміни служать для визначення амінокислотних полімерів, в яких один або декілька амінокислотних залишків є штучними хімічними імітаторами відповідної природної амінокислоти, а також природних амінокислотних полімерів і неприродних амінокислотних полімерів.

Термін "амінокислота" означає природні і синтетичні амінокислоти, а також аналоги і імітатори амінокислот, які функціонують аналогічно природним амінокислотам. Природними амінокислотами є амінокислоти, кодовані генетичним кодом, а також амінокислоти, які пізніше були модифіковані, наприклад, гідроксипролін, гамма-карбоксиглутамат і о-фосфосерин. Термін "аналоги амінокислот" означає сполуки, що мають таку ж основну хімічну структуру, що і природна амінокислота, наприклад, альфа-атом вуглецю, зв'язаний з атомом водню, карбоксильною групою, аміногрупою і R-групою, наприклад, гомосерин, норлейцин, метіонінсульфоксид, метіонінметилсульфоній. Такі аналоги можуть мати модифіковані R-групи (наприклад, норлейцин) або модифіковані пептидні остови, але зберігають основну хімічну структуру, властиву природній амінокислоті. Термін "імітатори амінокислот" означає хімічні сполуки, що мають структуру, яка відрізняється від звичайної хімічної структури амінокислоти, але функціонує аналогічно природній амінокислоті.

Термін "консервативно модифіковані варіанти" відноситься як до амінокислотних послідовностей, так і до послідовностей нуклеїнових кислот. Термін "варіанти амінокислот" відноситься до амінокислотних послідовностей. Що стосується конкретних послідовностей нуклеїнових кислот, то консервативно модифіковані варіанти означають нуклеїнові кислоти, кодуючі ідентичні або по суті ідентичні амінокислотні послідовності, або в тих випадках, коли нуклеїнова кислота не кодує амінокислотну послідовність, означають по суті ідентичні або асоційовані (наприклад, природно суміжні) послідовності. Через виродженість генетичного коду більшість білків кодовано великим числом функціонально ідентичних нуклеїнових кислот. Наприклад, всі кодони GCA, GCC, GCG і GCU кодують амінокислоту аланін. Таким чином, в будь-якому положенні, в якому аланін визначається кодоном, такий кодон може бути замінений іншими відповідними кодонами без зміни кодованого поліпептиду. Такі варіанти нуклеїнових кислот є "мовчазними варіантами", що являють собою один різновид консервативно модифікованих варіантів. Кожна послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид, також описує мовчазні варіанти нуклеїнової кислоти. Відомо, що в певному контексті кожен кодон нуклеїнової кислоти (за винятком AUG, який зазвичай є єдиним кодоном для метіоніну, і TGG, який зазвичай є єдиним кодоном для триптофану) може бути модифікований з утворенням функціонально ідентичної молекули. Таким чином, мовчазні варіанти нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид, мають на увазі в описаній послідовності відносно продукту експресії, але не відносно фактичних послідовностей зонда.

Що стосується амінокислотних послідовностей, то відомо, що окремі заміни, делеції або додавання в послідовності нуклеїнової кислоти, пептиду, поліпептиду або білка, які змінюють,

додають або видаляють одну амінокислоту або невеликий відсоток амінокислот в кодованій послідовності, утворюють "консервативно модифікований варіант", включаючи варіант, в якому зміна являє собою заміну амінокислоти хімічно подібною амінокислотою. У даній галузі добре відомі таблиці консервативних заміни, що включають функціонально подібні амінокислоти. (Див.,  
 5 наприклад, таблицю 1). З керівництвом по заміні амінокислот, які, мабуть, є фенотипично мовчазними, можна ознайомитися в публікації Bowie et al., 1990, Science 247:1306-1310. Такі консервативно модифіковані варіанти доповнюють і не виключають поліморфні варіанти, гомологи і алелі по даному винаходу. Консервативні заміни зазвичай включають: 1) аланін (A), гліцин (G); 2) аспарагінову кислоту (D), глютамінову кислоту (E); 3) аспарагін (N), глютамін (Q); 4)  
 10 аргінін (R), лізин (K); 5) ізолейцин (I), лейцин (L), метіонін (M), валін (V); 6) фенілаланін (F), тірозин (Y), триптофан (W); 7) серин (S), треонін (T) і 8) цистеїн (C), метіонін (M) (див., наприклад, публікацію Creighton, Proteins (1984)). Як вказано, зміни зазвичай мають незначний характер, зокрема, консервативні заміни амінокислот, які істотно не впливають на укладання або активність білка.

Таблиця 1

Консервативні заміни амінокислот

Первинна амінокислота	Типові консервативні заміни
Аланін	Валін, ізолейцин, лейцин, гліцин, серин
Аргінін	Лізин, гістидин, глютамін, аспарагін
Аспарагін	Глютамін, гістидин, лізин, аргінін
Аспарагінова кислота	Глютамінова кислота, аспарагін
Цистеїн	Серин, аланін, метіонін
Глютамін	Аспарагін
Глютамінова кислота	Аспарагінова кислота, глютамін
Гліцин	Пролін, аланін
Гістидин	Аспарагін, глютамін, лізин, аргінін
Ізолейцин	Лейцин, валін, метіонін, аланін, фенілаланін, норлейцин
Лейцин	Норлейцин, ізолейцин, валін, метіонін, аланін, фенілаланін
Лізин	Аргінін, глютамін, аспарагін, гістидин
Метіонін	Лейцин, фенілаланін, ізолейцин, валін, цистеїн
Фенілаланін	Лейцин, валін, ізолейцин, аланін, тірозин
Пролін	Аланін, гліцин
Серин	Треонін
Треонін	Серин
Триптофан	Тірозин, фенілаланін
Тірозин	Триптофан, фенілаланін, треонін, серин
Валін	Ізолейцин, метіонін, лейцин, фенілаланін, аланін, норлейцин

Використані в даному описі винаходу і формулі винаходу форми однини включають форми множини з виключенням тих випадків, коли з контексту ясно виходить зворотне.

Слід зазначити, що варіанти здійснення винаходу, при описі яких використаний термін "що включає", відповідають варіантам здійснення винаходу, аналогічним у всіх інших відносинах, при описі яких використані терміни "що складається з" та/або "по суті, що складається з".

Певні варіанти здійснення даного винаходу

Даний винахід відноситься до композицій і способам їх застосування для дослідження, діагностики, характеристики і лікування рака. Зокрема, певні варіанти здійснення даного  
 25 винаходу відносяться до агентів, що включають антагоністи, які зв'язуються з рецепторами Notch, і до способів застосування вказаних агентів або антагоністів для інгібування зростання пухлини і лікування рака або інших захворювань у людей. У певних варіантах здійснення винаходу антагоністи є антитілами, які специфічно зв'язуються з нелігандзв'язуючою ділянкою позаклітинного домену рецептора Notch людини.

Одним об'єктом даного винаходу є антитіло, яке специфічно зв'язується з нелігандзв'язуючою проксимальною ділянкою мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1 людини. У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло зв'язується з ділянкою Notch1 людини, що охоплює ділянку приблизно від амінокислоти 1427 до амінокислоти 1732. У деяких

5 варіантах здійснення винаходу антитіло зв'язується з ділянкою, що включає SEQ ID NO:2. У певних варіантах здійснення винаходу антитіло специфічно зв'язується з нелігандзв'язуючою проксимальною ділянкою мембрани позаклітинного домену щонайменше одного додаткового рецептора Notch.

У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло є антагоністом рецептора Notch1 людини. У певних варіантах здійснення винаходу антитіло інгібує індуковану лігандом передачу сигналу по сигнальному шляху Notch1. У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло інгібує активність рецептора Notch1. У інших варіантах здійснення винаходу антитіло інгібує розщеплювання рецептора Notch1. У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло інгібує розщеплювання рецептора Notch1 на сайті в проксимальній ділянці мембрани позаклітинного

15 домену. У певних варіантах здійснення винаходу антитіло інгібує вивільнення або утворення внутріклітинного домену (ICD) рецептора Notch1. У інших варіантах здійснення винаходу антитіло зменшує онкогенність пухлини, що містить ракові ствольні клітини. У певних варіантах здійснення винаходу антитіло інгібує зростання пухлини, що містить ракові ствольні клітини. У певних варіантах здійснення винаходу антитіло інгібує зростання пухлини.

У певних варіантах здійснення винаходу антитіло, яке специфічно зв'язується з проксимальною ділянкою мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1 людини і інгібує зростання пухлини, є моноклональним антитілом. У певних варіантах здійснення винаходу антитіло, яке специфічно зв'язується з проксимальною ділянкою мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1 людини, є химерним антитілом, гуманізованим антитілом, людським

25 антитілом, фрагментом антитіла або біспецифічним антитілом. Певні варіанти здійснення винаходу відносяться до гібридоми, що продукує антитіло, яке специфічно зв'язується з нелігандзв'язуючою проксимальною ділянкою мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1 людини і інгібує зростання пухлини.

Іншим об'єктом винаходу є спосіб інгібування зростання пухлини у суб'єкта, який включає введення вказаному суб'єктові терапевтично ефективної кількості антитіла, яке специфічно зв'язується з нелігандзв'язуючою проксимальною ділянкою мембрани позаклітинного домену білка рецептора Notch1 людини. У деяких варіантах здійснення винаходу пухлина містить ракові

30 ствольні клітини. У деяких варіантах здійснення винаходу вказані способи включають направлену дію антитілами на ракові ствольні клітини. У певних варіантах здійснення винаходу спосіб інгібування зростання пухлини включає введення терапевтично ефективної кількості моноклонального антитіла. У певних варіантах здійснення винаходу спосіб інгібування зростання пухлини включає введення терапевтично ефективної кількості химерного антитіла. У певних варіантах здійснення винаходу спосіб інгібування зростання пухлини включає введення терапевтично ефективної кількості гуманізованого антитіла. У певних варіантах здійснення винаходу спосіб інгібування зростання пухлини включає введення терапевтично ефективної

40 кількості людського антитіла.

У певних варіантах здійснення винаходу спосіб інгібування зростання пухлини включає зменшення частоти зустрічальності ракових ствольних клітин в пухлині, зменшення числа ракових ствольних клітин в пухлині, зменшення онкогенності пухлини та/або зменшення онкогенності пухлини в результаті зменшення числа або частоти зустрічальності ракових

45 ствольних клітин в пухлині. У деяких варіантах здійснення винаходу спосіб інгібування зростання пухлини включає інгібування активності рецептора Notch1. У певних варіантах здійснення винаходу пухлина включає, не обмежуючись ними, пухлину молочної залози, колоректальну пухлину, пухлину печінки, пухлину нирки, пухлину легень, пухлину підшлункової залози, пухлину яєчника, пухлину передміхурової залози і пухлину голови і шиї.

Іншим об'єктом даного винаходу є спосіб лікування рака у суб'єкта, що потребує такого лікування, який включає введення суб'єктові терапевтично ефективної кількості антитіла, яке специфічно зв'язується з нелігандзв'язуючою проксимальною ділянкою мембрани позаклітинного домену білка рецептора Notch1 людини і інгібує зростання пухлини у суб'єкта. У певних варіантах здійснення винаходу спосіб лікування рака включає введення терапевтично

55 ефективної кількості моноклонального антитіла. У певних варіантах здійснення винаходу спосіб лікування рака включає введення терапевтично ефективної кількості химерного антитіла. У певних варіантах здійснення винаходу спосіб лікування рака включає введення терапевтично ефективної кількості гуманізованого антитіла. У певних варіантах здійснення винаходу спосіб лікування рака включає введення терапевтично ефективної кількості людського антитіла.

60

У певних варіантах здійснення винаходу спосіб лікування рака включає введення терапевтично ефективної кількості антитіла, кон'югованого з цитотоксичною частиною, яке специфічно зв'язується з нелігандзв'язуючою проксимальною ділянкою мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1 людини і інгібує зростання пухлини. У певних варіантах здійснення винаходу спосіб лікування рака включає введення терапевтично ефективної кількості антитіла по будь-яких об'єктах та/або варіантах здійснення винаходу, а також по інших об'єктах та/або варіантах здійснення винаходу, розглянутих в даному описі винаходу, в комбінації з променевою терапією. У певних варіантах здійснення винаходу спосіб лікування рака включає введення терапевтично ефективної кількості антитіла по будь-яких об'єктах та/або варіантах здійснення винаходу, а також по інших об'єктах і варіантах здійснення винаходу, розглянутих в даному описі винаходу, в комбінації з хіміотерапією. У певних варіантах здійснення винаходу спосіб лікування рака включає введення терапевтично ефективної кількості антитіла, яке специфічно зв'язується з нелігандзв'язуючою проксимальною ділянкою мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1 людини і інгібує зростання пухлини, вибраної з пухлин, які включають, не обмежуючись ними, пухлину молочної залози, колоректальну пухлину, пухлину легень, пухлину підшлункової залози, пухлину передміхурової залози або пухлину голови і шиї.

У певних варіантах здійснення винаходу спосіб лікування рака включає виявлення суб'єктів, що потребують такого лікування, за допомогою генетичного тесту з використанням антитіла, яке специфічно зв'язується з нелігандзв'язуючою проксимальною ділянкою мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1 людини, і введення таким суб'єктам терапевтично ефективної кількості антитіла. У певних варіантах здійснення винаходу спосіб лікування рака включає виявлення суб'єктів, що потребують такого лікування, за допомогою антитіла, яке специфічно зв'язується з нелігандзв'язуючою проксимальною ділянкою мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1 людини, при виконанні генетичного тесту, що дозволяє виявити сигнатуру ракових стоволових клітин, і введення терапевтично ефективної кількості антитіла, яке специфічно зв'язується з нелігандзв'язуючою проксимальною ділянкою мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1 людини і інгібує зростання пухлини.

Іншим об'єктом даного винаходу є спосіб ідентифікації молекули, яка зв'язується з нелігандзв'язуючою проксимальною ділянкою мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1 людини і інгібує зростання пухлини, що включає: i) інкубацію молекули з нелігандзв'язуючою проксимальною ділянкою мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1 людини; ii) визначення здатності молекули зв'язуватися з нелігандзв'язуючою проксимальною ділянкою мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1 людини; та iii) визначення здатності молекули інгібувати зростання пухлини. Певні варіанти здійснення винаходу відносяться до способу ідентифікації молекули, яка зв'язується з нелігандзв'язуючою проксимальною ділянкою мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1 людини і інгібує зростання пухлини, що включає: i) інкубацію молекули з нелігандзв'язуючою проксимальною ділянкою мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1 людини, що включає SEQ ID NO:2; ii) визначення здатності молекули зв'язуватися з нелігандзв'язуючою проксимальною ділянкою мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1 людини, що включає SEQ ID NO:2; та iii) визначення здатності молекули інгібувати зростання пухлини.

Певні варіанти здійснення даного винаходу відносяться до фармацевтичної композиції, що включає антитіло, яке специфічно зв'язується з нелігандзв'язуючою проксимальною ділянкою мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1 людини і інгібує зростання пухлини.

Певні варіанти здійснення даного винаходу відносяться до способу одержання антитіла, яке специфічно зв'язується з нелігандзв'язуючою проксимальною ділянкою мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1 людини і інгібує зростання пухлини.

Певні варіанти здійснення даного винаходу відносяться до виділеної нуклеїнової кислоти, що кодує антитіло, яке специфічно зв'язується з нелігандзв'язуючою проксимальною ділянкою мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1 людини і інгібує зростання пухлини.

У певних варіантах здійснення винаходу антагоністи рецептора Notch, такого як Notch1, діють позаклітинно, інгібуючи або впливаючи на функцію рецептора Notch. У певних варіантах здійснення винаходу антагоніст рецептора Notch є білковим антагоністом. У деяких варіантах здійснення винаходу білкові антагоністи рецептора Notch1 є антитілами, які специфічно зв'язуються з позаклітинним епітопом рецептора Notch1. Позаклітинне зв'язування антагоніста рецептора Notch1 може інгібувати передачу сигналу рецептора Notch шляхом інгібування активації (наприклад, активації кіназою) рецептора Notch1 та/або шляхом стеричного інгібування взаємодії рецептора Notch з одним з його лігандів. Крім того, позаклітинне зв'язування антагоніста рецептора Notch може ослаблювати експресію рецептора Notch на

поверхні клітини, наприклад, в результаті інтерналізації рецептора Notch, та/або зменшувати переміщення рецептора Notch по поверхні клітини. Позаклітинне зв'язування антагоніста з рецептором Notch може інгібувати розщеплювання рецептора Notch і зменшувати вивільнення ICD рецептора Notch.

5 У деяких варіантах здійснення винаходу антагоністи рецептора Notch зв'язуються з рецептором Notch і надають одну або декілька наступних дій: інгібують проліферацію пухлинних клітин, запускають процес загибелі клітини безпосередньо в пухлинних клітинах або запобігають метастазуванню пухлинних клітин. У певних варіантах здійснення винаходу антагоністи рецептора Notch запускають процес загибелі клітини за допомогою кон'югованого  
10 токсину, хіміотерапевтичного засобу, радіоізотопу або іншого подібного агента. Наприклад, антитіло проти рецептора Notch може бути кон'юговано з токсином, який активується в пухлинних клітинах, експресуючих рецептор Notch, в результаті інтерналізації білка. У інших варіантах здійснення винаходу антагоністи рецептора Notch опосередковують загибель клітини, експресуючої рецептор Notch, за допомогою антитілозалежної клітинно-опосередкованої цитотоксичності (ADCC). ADCC викликає лізис клітин ефекторними клітинами, які розпізнають Fc-частину антитіла. Багато лімфоцитів, моноцитів, тканинних макрофагів, гранулоцитів і еозинофілів, наприклад, мають Fc-рецептори і можуть опосередковувати цитоліз (Dillman, 1994, J. Clin. Oncol. 12:1497). У деяких варіантах здійснення винаходу антагоніст рецептора Notch є антитілом, яке запускає процес загибелі клітини, експресуючої рецептор Notch, шляхом  
20 активації комплементозалежної цитотоксичності (CDC). Cdc викликає зв'язування сироваткового комплементу з Fc-частиною антитіла і подальшу активацію білкового каскаду комплементу, що приводить до руйнування клітинної мембрани і зрештою до загибелі клітини. Відомо, що біологічна активність антитіл визначається в значній мірі константними доменами або Fc-ділянкою молекули антитіла (Uananeu and Benacerraf, Textbook of Immunology, 2nd Edition, William & Wilkins, p. 218 (1984)). Антитіла різних класів і підкласів відрізняються в цьому відношенні так само, як антитіла одного і того ж підкласу, але з різних видів. З людських антитіл IgM є найбільш ефективним класом антитіл, зв'язуючих комплемент, а після нього IgG1, IgG3 та IgG2, при цьому IgG4, мабуть, володіє недостатньою активністю для активації шляху активації комплементу (Dillman, 1994, J. Clin. Oncol. 12:1497; Jefferis et al., 1998, Immunol. Rev. 163:59-76).  
25 Відповідно до даного винаходу отримують антитіла вказаних класів, що володіють необхідною біологічною активністю.

Можна досліджувати здатність будь-якого конкретного антитіла проти рецептора Notch опосередковувати лізис клітини-мішені шляхом активації комплементу та/або ADCC. Клітини, що представляють інтерес, вирощують і мітять *in vitro*; антитіло додають до культури клітин в  
35 комбінації з сироватковим комплементом або імунокомпетентними клітинами, які можуть бути активовані комплексами антиген-антитіло. Цитоліз клітин-мішеней визначають, наприклад, по вивільненню мітки з лізованих клітин. Фактично антитіла можна досліджувати, використовуючи власну сироватку суб'єкта як джерело комплементу та/або імунокомпетентних клітин. Антитіло, здатне активувати комплемент або опосередковувати ADCC при дослідженні *in vitro*, може бути використане в терапевтичних цілях для лікування конкретного суб'єкта.  
40

У певних варіантах здійснення винаходу агент або антагоніст, що зв'язується з рецептором Notch, є антитілом, яке не володіє однією або декількома ефекторними функціями. Наприклад, в деяких варіантах здійснення винаходу антитіло не володіє антитілозалежною клітинно-опосередкованою цитотоксичністю (ADCC) та/або комплементозалежною цитотоксичністю (CDC).  
45 У певних варіантах здійснення винаходу антитіло не зв'язується з Fc-рецептором та/або чинниками комплементу. У певних варіантах здійснення винаходу антитіло не володіє ефекторною функцією.

У інших варіантах здійснення винаходу антагоністи рецептора Notch можуть побічно запускати процес загибелі клітини, інгібуючи розвиток кровоносних судин. Розвиток кровоносних судин являє собою процес утворення нових кровоносних судин з раніше існуючих судин і є основним процесом, необхідним для нормального зростання, наприклад, під час розвитку ембріона, загоєння ран і у відповідь на овуляцію. Зростання солідної пухлини більш ніж на 1-2 мм<sup>2</sup> також вимагає розвитку кровоносних судин для доставки живильних речовин і кисню, без яких пухлинні клітини гинуть. Таким чином, в певних варіантах здійснення винаходу антагоніст рецептора Notch спрямовано впливає на клітини судин, експресуючі рецептор Notch, які включають, наприклад, ендотеліальні клітини, гладком'язові клітини або компоненти позаклітинного матриксу, необхідні для утворення судин. У інших варіантах здійснення винаходу антагоніст рецептора Notch інгібує передачу сигналу чинника зростання, необхідну для рекрутинга, збирання, збереження або виживання клітин судин.  
50  
55

Даний винахід відноситься до різних поліпептидів, які включають, не обмежуючись ними, антитіла і фрагменти антитіл. У певних варіантах здійснення винаходу поліпептид є виділеним поліпептидом. У певних альтернативних варіантах здійснення винаходу поліпептид є по суті чистим.

5 У певних варіантах здійснення винаходу поліпептиди по даному винаходу можуть бути рекомбінантними поліпептидами, природними поліпептидами або синтетичними поліпептидами, що включають послідовність SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:28 або SEQ ID NO:32 (за наявності або відсутності вказаних сигнальних послідовностей).

10 Даний винахід відноситься до поліпептиду, що включає важкий ланцюг та/або легкий ланцюг відповідно в SEQ ID NO:10 і SEQ ID NO:4 (за наявності або відсутності вказаних передбачуваних сигнальних послідовностей). У певних варіантах здійснення винаходу поліпептид є антитілом. У певних варіантах здійснення винаходу поліпептид специфічно зв'язується з нелігандзв'язуючою проксимальною ділянкою мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1 людини.

15 Даний винахід далі відноситься до поліпептиду, що включає SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:28 або SEQ ID NO:32 та/або SEQ ID NO:14 або SEQ ID NO:24. У певних варіантах здійснення винаходу поліпептид включає послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга, що включає SEQ ID NO:8, і послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга, що включає SEQ ID NO:14. У певних варіантах здійснення винаходу поліпептид включає послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга, що включає SEQ ID NO:28, і послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга, що включає SEQ ID NO:24. У певних варіантах здійснення винаходу поліпептид включає послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга, що включає SEQ ID NO:32, і послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга, що включає SEQ ID NO:24. У певних варіантах здійснення винаходу поліпептид є антитілом. У певних варіантах здійснення винаходу поліпептид специфічно зв'язується з нелігандзв'язуючою проксимальною ділянкою мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1 людини.

У даній галузі відомо, що деякі амінокислотні послідовності по даному винаходу можуть бути змінені без істотного впливу на структуру або функцію білка. При внесенні таких змін в послідовності слід пам'ятати, що в білку є важливі ділянки, що визначають активність. Таким чином, в об'єм даного винаходу далі входять варіанти поліпептидів, що володіють значною активністю. Такі мутанти включають делеції, інсерції, інверсії, повтори і заміни. Ознайомитися із замінами амінокислот, які, мабуть, є фенотипічно мовчазними, можна в публікації Bowie, J.U., et al., "Deciphering the Message in Protein Sequences: Tolerance to Amino Acid Substitutions." Science 1990, 247:1306-1310.

35 Таким чином, фрагменти, похідні або аналоги поліпептидів по даному винаходу можуть бути такими фрагментами, похідними або аналогами, в яких: (i) один або декілька амінокислотних залишків замінено консервативними або неконсервативними амінокислотними залишками (часто консервативним амінокислотним залишком), і такий замінений амінокислотний залишок може бути або не бути залишком, кодованим генетичним кодом; або (ii) один або декілька амінокислотних залишків включають заміну групу; або (iii) зрілий поліпептид гібридизований з іншою сполукою, такою як сполука, що збільшує час напівжиття поліпептиду (наприклад, поліетиленгліколь); або (iv) додаткові амінокислоти гібридизовані із зрілим поліпептидом, наприклад, з лідерною або секреторною послідовністю або послідовністю, використовуваною для очищення зрілого поліпептиду або пробілковою послідовністю. Вважається, що такі фрагменти, похідні і аналоги входять в об'єм даного винаходу.

Особливий інтерес представляють заміни заряджених амінокислот іншою зарядженою амінокислотою і нейтральними або негативно зарядженими амінокислотами. Останні амінокислоти дозволяють отримати білки з меншим позитивним зарядом. Вельми бажано запобігти агрегації білків. Агрегація білків не лише викликає втрату активності, але також створює проблеми при одержанні фармацевтичних препаратів, оскільки такі агрегати можуть бути імуногенними. (Pinckard et al., Clin. Exp. Immunol. 1967, 2:331-340; Robbins et al., Diabetes 1987, 36:838-845; Cleland et al., Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Systems 1993, 10:307-377).

Число виконаних заміни амінокислот, звичайно, залежить від багатьох чинників, включаючи чинники, вказані в даному описі винаходу. У певних варіантах здійснення винаходу число заміни для будь-якого даного поліпептиду не повинне перевищувати 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10 або 3.

55 Поліпептиди по даному винаходу включають поліпептиди SEQ ID NO:14, а також поліпептиди, які щонайменше на 90 % подібні (у певних випадках послідовності ідентичні щонайменше на 90 %) до поліпептидів SEQ ID NO:14 і щонайменше на 95 % подібні (у певних випадках послідовності ідентичні щонайменше на 95 %) до поліпептидів SEQ ID NO:14, і в інших варіантах здійснення винаходу поліпептиди, які щонайменше на 96 %, 97 %, 98 % або 99 %

подібні (у певних випадках послідовності ідентичні на 96 %, 97 %, 98 % або 99 %) до поліпептидів SEQ ID NO:14. Поліпептиди по даному винаходу включають поліпептиди SEQ ID NO:8, а також поліпептиди, які щонайменше на 90 % подібні (у певних випадках послідовності ідентичні щонайменше на 90 %) до поліпептидів SEQ ID NO:8 і щонайменше на 95 % подібні (у певних випадках послідовності ідентичні щонайменше на 95 %) до поліпептидів SEQ ID NO:8, і в інших варіантах здійснення винаходу поліпептиди, які щонайменше на 96 %, 97 %, 98 % або 99 % подібні (у певних випадках послідовності ідентичні на 96 %, 97 %, 98 % або 99 %) до поліпептидів SEQ ID NO:8. Як відомо у даній галузі, "подібність" двох поліпептидів визначають, порівнюючи амінокислотну послідовність і консервативні заміни амінокислот одного поліпептиду з послідовністю другого поліпептиду.

Фрагменти або частини поліпептидів по даному винаходу можуть бути використані для отримання відповідного непроцесованого поліпептиду методом синтезу пептидів; тому фрагменти можуть бути використані як проміжні продукти для одержання непроцесованих поліпептидів. Фрагменти або частини поліпептидів по даному винаходу можуть бути використані для синтезу непроцесованих поліпептидів по даному винаходу.

У певних варіантах здійснення винаходу фрагмент білків по даному винаходу є частиною або всім білком, здатним зв'язуватися з білком рецептора Notch1. Вказаний фрагмент володіє високою афінністю до рецептора Notch або ліганду рецептора Notch1. Певні фрагменти злитих білків є фрагментами білків, що включають щонайменше частину зв'язуючого домену Notch поліпептидного агента або антагоніста, гібридизованого щонайменше з частиною константної ділянки імуноглобуліну. Афінність зазвичай знаходиться в межах від близько  $10^{-11}$  до  $10^{-12}$  М, хоча значення афінності може значно змінюватися при використанні фрагментів різної величини в межах від  $10^{-7}$  до  $10^{-13}$  М. В деяких варіантах здійснення винаходу фрагмент складається приблизно з 10-110 амінокислот і включає зв'язуючий домен Notch поліпептидного агента або антагоніста, зв'язаного щонайменше з частиною константної ділянки імуноглобуліну.

Поліпептиди і аналоги можуть бути далі модифіковані шляхом введення додаткових хімічних частин, які зазвичай не є частиною білка. Похідні частини можуть покращувати розчинність, біологічний час напівжиття та/або абсорбцію білка. Вказані частини можуть також зменшувати або усувати будь-які небажані побічні ефекти білка і тому подібні. З оглядом хімічних частин можна ознайомитися в публікації Remington's Pharmaceutical Sciences, 20th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (2000).

Виділені поліпептиди, розглянуті в даному описі винаходу, можуть бути отримані будь-яким прийнятним методом, відомим в даній галузі. Такими методами є будь-які методи від прямого синтезу білків до створення послідовності ДНК, що кодує виділені поліпептидні послідовності, і експресії таких послідовностей в прийнятному трансформованому хазяїні.

Деякі варіанти здійснення винаходу відносяться до методу рекомбінантних ДНК, відповідно до якого послідовність ДНК отримують, виділяючи або синтезуючи послідовність ДНК, кодуєючої білок дикого типу, що становить інтерес. Така послідовність може бути необов'язково піддана сайт-специфічному мутагенезу з утворенням її функціональних аналогів. Див., наприклад, публікацію Zoeller et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 1984, 81:5662-5066 і патент США № 4588585. Іншим методом створення послідовності ДНК, кодуєючої поліпептид, що становить інтерес, є хімічний синтез в синтезаторі олігонуклеотидів. Такі олігонуклеотиди можуть бути створені на основі амінокислотної послідовності необхідного поліпептиду з вибором тих кодонів, які лічать для клітини-хазяїна, в якій буде продукований рекомбінантний поліпептид, що становить інтерес.

Стандартні методи можуть бути використані для синтезу виділеної поліпептидної послідовності, кодуєючої виділений поліпептид, що становить інтерес. Наприклад, повна амінокислотна послідовність може бути використана для створення гена, транскрибованого у зворотному напрямі. Крім того, може бути синтезований олігомер ДНК, що містить нуклеотидну послідовність, кодуєючу конкретний виділений поліпептид. Наприклад, можна синтезувати і потім лігувати декілька дрібних олігонуклеотидів, кодуєючих частини необхідного поліпептиду. Окремі олігонуклеотиди зазвичай містять 5'- або 3'-кінцеві сегменти, що перекриваються, для комплементарного збирання.

Зібрані (шляхом синтезу, сайтнаправленого мутагенезу або іншим методом) мутанти послідовності ДНК, кодуєючі певний виділений поліпептид, що становить інтерес, вводять в експресуючий вектор і функціонально зв'язують з регулюючою експресією послідовністю, придатною для експресії білка в бажаному хазяїні. Правильність збирання можна підтвердити шляхом секвенування нуклеїнової кислоти, рестрикційного картування і експресії біологічно активного поліпептиду в прийнятному хазяїні. Як добре відомо в даній галузі, для отримання високих рівнів експресії трансформованого гена в хазяїні вказаний ген функціонально зв'язують з

транскрипційними і трансляційними послідовностями, що регулюють експресію, які є функціонально активними у вибраному експресуючому хазяїні.

Даний винахід відноситься до виділених антитіл проти нелігандзв'язуючої проксимальної ділянки мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1. Антитіло або фрагмент антитіла може бути будь-яким моноклональним або поліклональним антитілом, яке специфічно розпізнає проксимальну ділянку мембрани позаклітинного домену Notch1. Деякі варіанти здійснення винаходу відносяться до моноклональних антитіл або їх фрагментів, які специфічно зв'язуються з проксимальною ділянкою мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1 людини по даному винаходу. У деяких варіантах здійснення винаходу моноклональні антитіла або їх фрагменти є химерними або гуманізованими антитілами, які специфічно зв'язуються з проксимальною ділянкою мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1 людини по даному винаходу. У інших варіантах здійснення винаходу моноклональні антитіла або їх фрагменти є людськими антитілами, які специфічно зв'язуються з проксимальною ділянкою мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1 людини по даному винаходу.

Антитіла проти проксимальної ділянки мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1 знаходять застосування в експериментальних, діагностичних і терапевтичних методах, розглянутих в даному описі винаходу. У певних варіантах здійснення винаходу антитіла по даному винаходу використовують для виявлення експресії рецептора Notch1 в біологічних зразках, таких як, наприклад, біопсійна тканина суб'єкта, плевральний випіт або проба крові. З біопсійної тканини можуть бути отримані гістологічні зрізи, використовувані для виявлення білка за допомогою імуофлуоресценції або імуногістохімії. Альтернативно із зразка можуть бути виділені окремі клітини і використані для виявлення експресії білка на фіксованих або живих клітинах за допомогою аналізу FACS. Крім того, антитіла можуть бути використані на білкових матрицях для виявлення експресії рецептора Notch1, наприклад, на пухлинних клітинах, в клітинних лізатах або в інших зразках білка. У інших варіантах здійснення винаходу антитіла по даному винаходу використовують для інгібування зростання пухлинних клітин, здійснюючи контактування антитіл з пухлинними клітинами при виконанні клітинних аналізів *in vitro* або в тваринних моделях *in vivo*. У інших варіантах здійснення винаходу антитіла використовують для лікування рака у людини шляхом введення терапевтично ефективної кількості антитіла проти проксимальної ділянки мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1.

Поліклональні антитіла можуть бути отримані будь-яким відомим методом. Поліклональні антитіла утворюються в результаті імунізації тварини (наприклад, кролика, щура, миші, кози, осла і т.д.) шляхом декількох підшкірних або внутрішньоочеревинних ін'єкцій спорідненого антигена (очищеного пептидного фрагмента, непроцесованного рекомбінантного білка, злитого білка і т.д.), необов'язково кон'югованого з гемоціаніном лімфи равлика (KLH), сироватковим альбуміном і т.д., розведеного в стерильному фізіологічному розчині і об'єднаного з ад'ювантом (наприклад, з повним або неповним ад'ювантом Фрейнда) з утворенням стійкої емульсії. Поліклональне антитіло потім виділяють з крові, асцитичної рідини і подібних рідин імунізованої тварини. Отриману кров коагулюють, сироватку декантують, очищають центрифугуванням і аналізують відносно титру антитіл. Поліклональні антитіла можуть бути очищені від сироватки або асцитичної рідини стандартними методами, відомими в даній галузі, які включають афінну хроматографію, іонообмінну хроматографію, гель-електрофорез, діаліз і т.д.

Моноклональні антитіла можуть бути отримані методами гібридом, описаними в публікації Kohler and Milstein, 1975, *Nature*, 256: 495-497. При використанні методу гібридом мишу, хом'яка або інше прийнятне тварину-хазяїна імунізують вищеописаним методом для продукування лімфоцитами антитіл, які специфічно зв'язуються з імунізуючим антигеном. Альтернативно лімфоцити можуть бути імунізовані *in vitro*. Після імунізації лімфоцити виділяють і гібридизують з прийнятною лінією мієломних клітин, використовуючи, наприклад, поліетиленгліколь, для утворення клітин гібридами, які потім можуть бути відокремлені від негібридизованих лімфоцитів і мієломних клітин. Гібридами, що продукують моноклональні антитіла, специфічно направлені проти вибраного антигену, при визначенні методом імуопреципітації, імуоблотингу або конкурентно-зв'язуючого аналізу *in vitro*, такого як радіоімуноаналіз (RIA) або твердофазний імуоферментний аналіз (ELISA), потім можуть бути розмножені стандартними методами культивування *in vitro* (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, 1986) або *in vivo* у вигляді асцитичних пухлин у тварини. Моноклональні антитіла потім можуть бути очищені від культурального середовища або асцитичної рідини методами, описаними вище для поліклональних антитіл.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу антитіло є антитілом, яке специфічно зв'язується з нелігандзв'язуючою проксимальною ділянкою мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1 людини. У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло включає



варіабельну ділянку важкого ланцюга, послідовність якого щонайменше на 90 % ідентична SEQ ID NO:14; та/або варіабельну ділянку легкого ланцюга, послідовність якого щонайменше на 90 % ідентична SEQ ID NO:8. У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло включає варіабельну ділянку важкого ланцюга, послідовність якого щонайменше на 95 % ідентична SEQ ID NO:14; та/або варіабельну ділянку легкого ланцюга, послідовність якого щонайменше на 95 % ідентична SEQ ID NO:8. У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло є моноклональним антитілом або фрагментом антитіла.

Певні варіанти здійснення винаходу відносяться до антитіла, яке зв'язується з нелігандзв'язуючою проксимальною ділянкою мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1 людини і містить CDR1 важкого ланцюга, що включає RGYWIE (SEQ ID NO:15), CDR2 важкого ланцюга, що включає QILPGTGRTNYNEKFKG (SEQ ID NO:16), та/або CDR3 важкого ланцюга, що включає FDGNYGYYAMDY (SEQ ID NO:17). У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло далі містить CDR1 легкого ланцюга, що включає RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:18), CDR2 легкого ланцюга, що включає GTNNRAP (SEQ ID NO:19), та/або CDR3 легкого ланцюга, що включає ALWYSNHWVFGGGTKL (SEQ ID NO:20). У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло містить CDR1 важкого ланцюга, що включає RGYWIE (SEQ ID NO:15), CDR2 важкого ланцюга, що включає QILPGTGRTNYNEKFKG (SEQ ID NO:16), та/або CDR3 важкого ланцюга, що включає FDGNYGYYAMDY (SEQ ID NO:17); і CDR1 легкого ланцюга, що включає RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:18), CDR2 легкого ланцюга, що включає GTNNRAP (SEQ ID NO:19), та/або CDR3 легкого ланцюга, що включає ALWYSNHWVFGGGTKL (SEQ ID NO:20). У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, що включає: (а) CDR1 важкого ланцюга, що включає RGYWIE (SEQ ID NO:15), або його варіант, що включає заміни 1, 2, 3 або 4 амінокислот; (b) CDR2 важкого ланцюга, що включає QILPGTGRTNYNEKFKG (SEQ ID NO:16), або його варіант, що включає заміни 1, 2, 3 або 4 амінокислот; та/або (c) CDR3 важкого ланцюга, що включає FDGNYGYYAMDY (SEQ ID NO:17), або його варіант, що включає заміни 1, 2, 3 або 4 амінокислот. У інших варіантах здійснення винаходу антитіло містить варіабельну ділянку легкого ланцюга, що включає: (а) CDR1 легкого ланцюга, що включає RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:18), або його варіант, що включає заміни 1, 2, 3 або 4 амінокислот; (b) CDR2 легкого ланцюга, що включає GTNNRAP (SEQ ID NO:19), або його варіант, що включає заміни 1, 2, 3 або 4 амінокислот; та/або (c) CDR3 легкого ланцюга, що включає ALWYSNHWVFGGGTKL (SEQ ID NO:20), або його варіант, що включає заміни 1, 2, 3 або 4 амінокислот. У деяких варіантах здійснення винаходу заміни амінокислот є консервативними замінами амінокислот.

Деякі варіанти здійснення винаходу відносяться до антитіла 52M51, продукованому лінією клітин гібридоми, депонованої в ATCC згідно з положеннями Будапештського договору 7 серпня 2008 р. під номером РТА-9405. У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло є гуманізованим варіантом антитіла 52M51. У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло є гуманізованим варіантом антитіла 52M51 "52M51H4L3", кодованим ДНК, депонованою в ATCC згідно з положеннями Будапештського договору 15 жовтня 2008 р. під номером РТА-9549. У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло є гуманізованим варіантом антитіла 52M51 "52M51H4L4". Деякі варіанти здійснення винаходу відносяться до антитіла, яке зв'язується з тим же епітопом, з яким зв'язується антитіло 52M51. Інші варіанти здійснення винаходу відносяться до антитіла, яке конкурує з будь-якими антитілами, описаними в розглянутих вище варіантах здійснення винаходу та/або об'єктах, а також в інших об'єктах/варіантах здійснення винаходу, представлених в даному описі винаходу, за специфічне зв'язування з нелігандзв'язуючою проксимальною ділянкою мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1 людини. Даний винахід відноситься також до фармацевтичних композицій, що містять антитіла по даному винаходу, і до способів лікування рака, які включають введення терапевтично ефективної кількості вказаних антитіл.

Деякі варіанти здійснення винаходу відносяться до антитіла 52R43, кодованому ДНК, депонованою в ATCC згідно з положеннями Будапештського договору 15 жовтня 2008 р. під номером РТА-9548. Деякі варіанти здійснення винаходу відносяться до антитіла, яке зв'язується з тим же епітопом, з яким зв'язується антитіло 52R43. Деякі варіанти здійснення винаходу відносяться до антитіла, яке включає одну, дві, три, чотири, п'ять та/або шість CDR-ділянок антитіла 52R43. Інші варіанти здійснення винаходу відносяться до антитіла, яке конкурує з антитілом 52R43. Даний винахід відноситься також до фармацевтичних композицій, що містять антитіла по даному винаходу, і до способів лікування рака, які включають введення терапевтично ефективної кількості вказаних антитіл.

Альтернативно моноклональні антитіла можуть бути також отримані методами рекомбінантних ДНК, описаними в патенті США № 4816567. Полінуклеотиди, кодуєчі

моноклональне антитіло, виділяють із зрілих в-клітин або клітин гібридами за допомогою ПЦР із зворотною транскрипцією (RT-ПЦР), використовуючи олігонуклеотидні затравки, які специфічно ампліфікують гени, кодуєчі важкий і легкий ланцюги антитіла, при визначенні їх послідовності стандартними методами. Виділені полінуклеотиди, кодуєчі важкий і легкий ланцюги, потім клонують в прийнятні експресуючі вектори, які трансфікують в клітини-хазяїні, такі як клітини *E. coli*, клітини COS мавп, клітини яєчника китайського хом'яка (CHO) або мієломні клітини, які інакше не продукують білок імуноглобуліну. Клітини-хазяї досліджують відносно продукування моноклонального антитіла і відбирають антитіла з необхідною специфічністю. Крім того, рекомбінантні моноклональні антитіла або їх фрагменти необхідного вигляду можуть бути виділені з бібліотек відображення на фагі, описаних в науковій літературі (McCafferty et al., 1990, *Nature*, 348:552-554; Clackson et al., 1991, *Nature*, 352:624-628; and Marks et al., 1991, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597).

Полінуклеотиди, кодуєчі моноклональне антитіло, можуть бути далі модифіковані різними методами рекомбінантних ДНК з метою створення альтернативних антитіл. У деяких варіантах здійснення винаходу константні домени легкого і важкого ланцюгів, наприклад, мишачого моноклонального антитіла можуть бути замінені 1) такими ж ділянками людського антитіла з утворенням химерного антитіла або 2) поліпептидом, що не є імуноглобуліном, з утворенням гібридного антитіла. У інших варіантах здійснення винаходу константні ділянки усикають або видаляють з утворенням необхідного фрагмента моноклонального антитіла. Крім того, для оптимізації специфічності, афінності і т.д. моноклонального антитіла може бути використаний сайтнаправлений або високощільний мутагенез варіабельної ділянки.

Як правило, модифіковані антитіла, придатні для використання в даному винаході, можуть бути отримані або виділені з будь-якого антитіла. Вихідне антитіло або антитіло-попередник або його фрагмент, використовуваний для створення модифікованих антитіл, може бути мишачим, людським, химерним, гуманізованим антитілом, антитілом примату окрім людини або приматизованим антитілом. У інших варіантах здійснення винаходу модифіковані антитіла по даному винаходу можуть включати конструкції одноланцюгових антитіл (описані в патенті США № 5892019, який включений в даний опис винаходу як посилання), що містять змінні константні домени, розглянуті в даному описі винаходу. У об'єм даного винаходу входять будь-які з вказаних типів антитіл, модифікованих відповідно до даного опису винаходу.

Відповідно до даного винаходу методи можуть бути адаптовані для продукування одноланцюгових антитіл, специфічних до поліпептиду по даному винаходу (див. патент США № 4946778). Крім того, методи можуть бути адаптовані для створення Fab-експресуючих бібліотек (Huse et al., 1989, *Science*, 246:1275-1281), що забезпечують швидку і ефективну ідентифікацію моноклональних Fab-фрагментів з необхідною специфічністю відносно рецептора Notch або його похідних, фрагментів, аналогів або гомологів. Фрагменти антитіл, що містять ідіотипи для поліпептиду по даному винаходу, можуть бути отримані методами, відомими в даній галузі, і включають, не обмежуючись ними: (в) F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент, отриманий шляхом розщеплювання молекули антитіла пепсином; (b) Fab-фрагмент, отриманий шляхом відновлення дисульфідних містків F(ab')<sub>2</sub>-фрагмента, (c) Fab-фрагмент, отриманий шляхом обробки молекули антитіла папаїном і відновником, і (d) Fv-фрагменти.

Біспецифічні антитіла також входять в об'єм даного винаходу. Біспецифічні антитіла є моноклональними, переважно людськими або гуманізованими, антитілами, які володіють специфічністю зв'язування щонайменше з двома різними антигенами.

У даній галузі відомі методи отримання біспецифічних антитіл. Наприклад, в даному випадку одна із специфічностей зв'язування відноситься до антигенного поліпептиду по даному винаходу (рецептор Notch1 або його фрагмент), тоді як другою мішенню зв'язування є будь-який інший антиген, який переважно є білком на поверхні клітини, рецептором або субодиницею рецептора. Одержання біспецифічних антитіл рекомбінантними методами засноване на коекспресії двох пар важкого ланцюга/легкого ланцюга імуноглобуліну, в яких два важкі ланцюги володіють різними специфічностями (Milstein and Cuellar, *Nature* 1983, 305:537-539). Завдяки довільному вибору важких і легких ланцюгів імуноглобуліну вказані гібридами (квадроми) продукують потенційну суміш десяти різних молекул антитіла, з яких лише одна має правильну біспецифічну структуру. Правильну молекулу зазвичай очищають за допомогою афінної хроматографії.

Варіабельні домени антитіла з потрібними специфічностями зв'язування можуть бути гібридизовані з послідовностями константних доменів імуноглобуліну. Гібридизацію виробляють з константним доменом важкого ланцюга імуноглобуліну, що включає щонайменше частину шарнірної ділянки, C<sub>H</sub>2 та C<sub>H</sub>3 ділянок. Перша константна ділянка (C<sub>H</sub>1) важкого ланцюга, що містить сайт, необхідний для зв'язування легкого ланцюга, може бути присутньою щонайменше

в одному з гібридів. ДНК, кодує гібриди важкого ланцюга імуноглобуліну, і за бажання легкий ланцюг імуноглобуліну, вводять в окремі експресуючі вектори і котрансфікують в прийнятний організм-хазяїн. Детальніший опис створення біспецифічних антитіл приведений в публікації Suresh et al., *Methods in Enzymology* 1986, 121:210.

Біспецифічні антитіла можуть бути отримані у вигляді непроцесованих антитіл або фрагментів антитіл. У науковій літературі описані методи одержання біспецифічних антитіл з фрагментів антитіл. Наприклад, біспецифічні антитіла можуть бути отримані шляхом хімічного зв'язування. Крім того, в публікації Brennan et al., *Science* 1985, 229:81 описаний метод протеолітичного розщеплювання інтактних антитіл з утворенням  $F(ab'')_2$ -фрагментів.

Крім того,  $Fab'$ -фрагменти можуть бути безпосередньо виділені з *E. coli* і хімічно зв'язані з утворенням біспецифічних антитіл (Shalaby et al., *J. Exp. Med.* 1992, 175:217-225). Вказані методи можуть бути використані для одержання молекули  $F(ab')_2$  повністю гуманізованого біспецифічного антитіла.

У об'єм даного винаходу також входять антитіла з більш ніж двома валентностями. Наприклад, можуть бути отримані триспецифічні антитіла (Tutt et al., 1991, *J. Immunol.* 147:60).

Даний винахід також відноситься до біспецифічних антитіл, які розпізнають проксимальну ділянку мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1. Біспецифічні антитіла є антитілами, здатними специфічно розпізнавати і зв'язуватися щонайменше з двома різними епітопами. Різні епітопи можуть знаходитися в одній молекулі (наприклад, в одному рецепторі Notch1) або в різних молекулах, при цьому, наприклад, антитіла можуть специфічно розпізнавати і зв'язуватися з рецептором Notch1, а також з 1) ефекторною молекулою на лейкоциті, такою як Т-клітинний рецептор (наприклад, CD3) або Fc-рецептор (наприклад, CD64, CD32 або CD16) або 2) цитотоксичним агентом, детально описаним нижче. Біспецифічні антитіла можуть бути інтактними антитілами або фрагментами антитіл. У даній галузі відомі методи одержання біспецифічних антитіл (Millstein et al., 1983, *Nature*, 305:537-539; Brennan et al., 1985, *Science*, 229:81; Suresh et al., 1986, *Methods in Enzymol.* 121:120; Traunecker et al., 1991, *EMBOJ* 10:3655-3659; Shalaby et al., 1992, *J. Exp. Med.*, 175:217-225; Kostelny et al., 1992, *J. Immunol.*, 148:1547-1553; Gruber et al., 1994, *J. Immunol.*, 152:5368; і патент США № 5731168).

Типові біспецифічні антитіла можуть зв'язуватися з двома різними епітопами, при цьому щонайменше один з епітопів знаходиться в поліпептиді по даному винаходу. Альтернативно антигензв'язуючий домен молекули імуноглобуліну може бути об'єднаний з доменом, що зв'язується із запускаючою молекулою на лейкоциті, такою як молекула Т-клітинного рецептора (наприклад, CD2, CD3, CD28 або B7) або Fc-рецептори для IgG, з тим, щоб сфокусувати механізми захисту клітини на клітині, експресуючої конкретний антиген. Біспецифічні антитіла можуть бути також використані для доставки цитотоксичних агентів до клітин, експресуючих певний антиген. Вказані антитіла містять антигензв'язуючий домен і домен, який зв'язує цитотоксичний агент або хелатор, мічений радіоізотопом, такий як EOTUBE, DPTA, DOTA або TETA.

У об'єм даного винаходу входять також гетерокон'югатні антитіла. Гетерокон'югатні антитіла складаються з двох ковалентно зв'язаних антитіл. Такі антитіла, наприклад, було запропоновано використовувати для направленої дії імунокомпетентних клітин на небажані клітини (патент США № 4676980). Такі антитіла можуть бути отримані *in vitro* відомими методами хімії синтезу білків з використанням перехреснозшивальних агентів. Наприклад, імунотоксини можуть бути створені в результаті виконання реакції дисульфідного обміну або утворення тіоефірного зв'язку. Приклади реагентів, придатних для вказаної мети, включають імінотіолат і метил-4-меркаптобутиримідат.

Відповідно до цілей даного винаходу слід зазначити, що модифіковані антитіла можуть включати варіабельну ділянку будь-якого типу, яка забезпечує зв'язування антитіла з проксимальною ділянкою мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1. У даному зв'язку варіабельна ділянка може бути отримана у ссавця будь-якого типу, в якого може бути викликана гуморальна відповідь і утворені імуноглобуліни проти необхідного опухолеспецифічного антигену. Варіабельна ділянка модифікованих антитіл може, наприклад, належати людині, миші, примату окрім людини (наприклад, мавпам *Simulagus*, макакам і т.д.), або може бути виділена з люпину. У деяких варіантах здійснення винаходу, як варіабельна ділянка, так і константна ділянка модифікованих імуноглобулінів належить людині. У інших варіантах здійснення винаходу варіабельні ділянки сумісних антитіл (зазвичай отримані з джерела, відмінного від людини) можуть бути створені або специфічно скомбіновані для поліпшення властивостей зв'язування або зменшення імуногенності молекули. У даному зв'язку варіабельні ділянки, придатні для використання в даному винаході, можуть бути гуманізовані або змінені яким-небудь іншим чином шляхом включення перенесених амінокислотних послідовностей.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу моноклональне антитіло проти проксимальної ділянки мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1 є гуманізованим антитілом. Гуманізовані антитіла є антитілами, що містять у варіабельних ділянках мінімальні послідовності з антитіл, відмінних від людських (наприклад, мишачих антитіл). Такі антитіла використовують в терапевтичних цілях для зменшення антигенності і реакцій НАМА (людського антитіла проти мишачого антитіла) при введенні людині. На практиці гуманізовані антитіла зазвичай є людськими антитілами з мінімальним числом або повною відсутністю послідовностей, відмінних від людських. Людське антитіло є антитілом, продукованим людиною, або антитілом, що має амінокислотну послідовність, відповідну антитілу, продукованому людиною.

Гуманізовані антитіла можуть бути отримані різними методами, відомими в даній галузі. Антитіло може бути гуманізоване шляхом заміни CDR людського антитіла такою ж ділянкою антитіла, відмінного від людського (наприклад, миші, щура, кролика, хом'яка і т. д.), що володіє необхідною специфічністю, афінністю та/або потенціалом (Jones et al., 1986, *Nature*, 321:522-535; Riechmann et al., 1988, *Nature*, 332:323-327; Verhoeven et al., 1988, *Science*, 239:1534-1536). Гуманізоване антитіло може бути далі модифіковане шляхом введення додаткового залишку в основну Fv-ділянку та/або в замінені залишки, відмінні від людських, для поліпшення і оптимізації специфічності, афінності та/або потенціалу антитіла.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу антитіло є гуманізованим антитілом, яке специфічно зв'язується з нелігандзв'язуючою проксимальною ділянкою мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1 людини. У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло включає варіабельну ділянку важкого ланцюга, послідовність якого щонайменше на 90 % ідентична SEQ ID NO:24; та/або варіабельну область легкого ланцюга, послідовність якого щонайменше на 90 % ідентична SEQ ID NO:28 або SEQ ID NO:32. У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло включає варіабельну ділянку важкого ланцюга, послідовність якого щонайменше на 95 % ідентична SEQ ID NO:24, та/або варіабельну ділянку легкого ланцюга, послідовність якого щонайменше на 95 % ідентична SEQ ID NO:28 або SEQ ID NO:32.

У деяких варіантах здійснення винаходу гуманізоване антитіло включає варіабельну ділянку важкого ланцюга SEQ ID NO:24 і варіабельну ділянку легкого ланцюга SEQ ID NO:28. У деяких варіантах здійснення винаходу гуманізоване антитіло включає варіабельну ділянку важкого ланцюга SEQ ID NO:24 і варіабельну ділянку легкого ланцюга SEQ ID NO:32.

Людські антитіла можуть бути отримані різними методами, відомими в даній галузі. Можуть бути створені іморталізовані В-лімфоцити людини, імунізовані *in vitro* або виділені у імунізованого суб'єкта, що продукує антитіло проти антигена-мішені (див., наприклад, публікації Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boemer et al., 1991, *J. Immunol.* 147(1):86-95; і патент США № 5750373). Крім того, людське антитіло може бути вибрано з бібліотеки фагів, експресуючої людські антитіла (Vaughan et al., 1996, *Nature Biotechnology*, 14:309-314; Sheets et al., 1998, *PNAS*, 95:6157-6162; Hoogenboom and Winter, 1991, *J. Mol. Biol.*, 227:381; Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581). Гуманізовані антитіла можуть бути також отримані у трансгенних мишей, що містять локуси імуноглобуліну людини, які здатні в результаті імунізації продукувати повний спектр людських антитіл без продукування ендogenous імуноглобуліну. Наприклад, в науковій літературі описано, що гомозиготна делеція гена сполучної ділянки ( $J_H$ ) важкого ланцюга антитіла у химерних і гаметичних мутантних мишей викликає повне інгібування продукування ендogenous антитіл. Перенесення гаметичного гена імуноглобуліну людини гаметичним мутантним мишам викликає продукування людських антитіл при антигенній стимуляції. (Див., наприклад, публікації Jakobovits et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551; Jakobovits et al., 1993, *Nature*, 362:255-258; Bruggemann et al., 1993, *Year in Immuno.* 7:33; патенти США №№ 5545807, 5545806, 5569825, 5625126, 5633425 і 5661016).

Альтернативно для продукування людських антитіл і фрагментів антитіл *in vitro* з набору генів варіабельного (V) домену імуноглобуліну, отриманого у неімунізованих донорів, може бути використаний метод відображення на фагі. Відповідно до даного методу гени V-домену антитіла клонують в рамці в ген мажорного або мінорного білка оболонки нитчастого бактеріофага, такого як M13 або fd, і відображують у вигляді функціональних фрагментів антитіла на поверхні фагової частки. Оскільки нитчаста частка містить копію одноланцюгової ДНК генома фага, вибір на основі функціональних властивостей антитіла дозволяє також вибрати ген, кодуючий антитіло, що володіє вказаними властивостями. Таким чином, фаг імітує деякі властивості В-клітини. Відображення на фагі може бути виконане в різних форматах. Для відображення на фагі можна використовувати декілька джерел сегментів V-гена. Всілякі антитіла проти оксазолону були виділені з невеликої довільної комбінаторної бібліотеки V-генів, отриманих з

селезінки імунізованих мишей. Можна створити набір V-генів, отриманих у неімунізованих людей-донорів, і виділити антитіла до різних антигенів (включаючи аутоантигени).

Як було вказано вище, людські антитіла можуть бути утворені *in vitro* активованими В-клітинами (див. патенти США №№ 5567610 і 5229275).

Слід зазначити, що введення всіх варіабельних доменів, відмінних від людських, в константні ділянки людини дозволяє отримати "класичні" химерні антитіла. У контексті даної заявки термін "химерні антитіла" означає будь-яке антитіло, в якому імунореактивна ділянка або сайт отримані або виділені з першого виду, і константна ділянка (яка може бути інтактною, неповною або модифікованою відповідно до даного винаходу) отримана з другого виду. У деяких варіантах здійснення винаходу антигензв'язуюча ділянка або сайт отримують з джерела, відмінного від людського (наприклад, миші), і константна ділянка належить людині. Хоча на імунотипову специфічність варіабельної ділянки зазвичай не впливає джерело, константна ділянка людини, мабуть, у меншій мірі викликає імунну відповідь людини, чим константна ділянка джерела, відмінного від людського.

Варіабельні домени важкого і легкого ланцюгів змінюють шляхом щонайменше часткової заміни однієї або декількох CDR-ділянок і, при необхідності, часткової заміни основної ділянки і зміни послідовності. Хоча CDR-ділянки можуть бути отримані з антитіла того ж класу або навіть підкласу, що і антитіло, з якого були виділені основні ділянки, можна передбачити, що CDR-ділянки будуть виділені з антитіла іншого класу і переважно з антитіла іншого виду. Слід зазначити, що не обов'язково замінювати всі CDR-ділянки повними CDR-ділянками з варіабельної ділянки донора для перенесення антигензв'язуючої здатності одного варіабельного домену в іншій. Швидше потрібно перенести лише ті залишки, які необхідні для збереження активності антигензв'язуючого сайту. З врахуванням пояснень, приведених в патентах США №№ 5585089, 5693761 і 5693762, можна отримати функціональне антитіло із зниженою імунотиповістю шляхом звичайного експериментування або методом проб і помилок, відомим в даній галузі.

Не дивлячись на зміни варіабельної ділянки, слід зазначити, що модифіковані антитіла по даному винаходу включають антитіла або їх імунореактивні фрагменти, в яких щонайменше частина одного або декількох доменів константної ділянки видалена або змінена яким-небудь іншим чином з досягненням необхідних біохімічних характеристик, таких як краща локалізація пухлини або менший час напівжиття в кров'яному руслі, в порівнянні з антитілом, що володіє приблизно такою ж імунотиповістю і що включає нативну або незмінену константну ділянку. У деяких варіантах здійснення винаходу константна ділянка модифікованих антитіл включає константну ділянку людини. Модифікації константної ділянки, сумісні із даним винаходом, включають додавання, делеції або заміни однієї або декількох амінокислот в одному або декількох доменах. Тобто модифіковані антитіла по даному винаходу можуть включати зміни або модифікації одного або декількох з трьох константних доменів важкого ланцюга (CH1, CH2 або CH3) та/або константного домену легкого ланцюга (CL). Деякі варіанти здійснення винаходу відносяться до модифікованих константних ділянок, в яких один або декілька доменів частково або повністю видалені. У інших варіантах здійснення винаходу модифіковані антитіла включають конструкції з видаленими доменами або варіанти, в яких видалений весь CH2 домен (конструкції  $\Delta$ CH2). У інших варіантах здійснення винаходу видалений домен константної ділянки замінений коротким амінокислотним спейсером (наприклад, з 10 залишків), який забезпечує деяку молекулярну гнучкість, що зазвичай повідомляється відсутністю константною ділянкою.

У даній галузі відомо, що, окрім конфігурації, константна ділянка опосередкує декілька ефекторних функцій. Наприклад, зв'язування компонента C1 комплексу з антитілами активує систему комплексу. Активація комплексу має важливе значення для опсонізації і лізису патогенних організмів клітини. Активація комплексу також стимулює запальну реакцію і може опосередковувати аутоімунну гіперчутливість. Крім того, антитіла зв'язуються з клітинами за допомогою Fc-ділянки, при цьому сайт Fc-рецептора в Fc-ділянки антитіла зв'язується з Fc-рецептором (FcR) на клітині. Існує ряд Fc-рецепторів, специфічних для різних класів антитіл, включаючи IgG (гамма-рецептори), IgE (епсилон-рецептори), IgA (альфа-рецептори) і IgM (мю-рецептори). Зв'язування антитіла з Fc-рецепторами на поверхні клітини запускає ряд важливих і всіляких біологічних реакцій, що включають поглинання і руйнування часток, покритих антитілом, кліренс імунних комплексів, лізис клітин-мішеней, покритих антитілом, клітинами-кілерами (іменовані антителозалежною клітинно-опосередкованою цитотоксичністю або ADCC), вивільнення медіаторів запалення, перенесення через плаценту і регуляцію продукування імуноглобуліну. Хоча в деякій мірі вивчені різні Fc-рецептори і сайти рецепторів, все ще багато що не відомо про їх локалізацію, структуру і функціонування.

Не обмежуючи об'єм даного винаходу, можна передбачити, що антитіла, що включають константні ділянки, модифіковані відповідно до даного винаходу, виконують змінні ефекторні функції, які у свою чергу впливають на біологічний профіль введеного антитіла. Наприклад, делеція або інактивація (за допомогою точкових мутацій або інших засобів) домену константної ділянки може зменшувати зв'язування Fc-рецептором циркулюючого модифікованого антитіла, що збільшує вірогідність локалізації пухлини. У інших випадках модифікації константної ділянки, сумісні із даним винаходом, можуть опосередковувати зв'язування комплементу і, таким чином, скорочувати час напівжиття в кров'яному руслі і неспецифічне зв'язування кон'югованого цитотоксину. Інші модифікації константної ділянки можуть бути використані для усунення дисульфільних зв'язків або олігосахаридних частин, що дозволяє краще локалізувати пухлину завдяки вищій антигенній специфічності або гнучкості антитіла. Аналогічним чином модифікації константної ділянки відповідно до даного винаходу можуть бути легко виконані добре відомими біохімічними методами або методами молекулярної інженерії.

Слід зазначити, що можуть бути створені модифіковані антитіла з можливістю гібридизації СН3 домену безпосередньо з шарнірною ділянкою відповідних модифікованих антитіл. У інших конструкціях може бути бажано ввести пептидний спейсер між шарнірною ділянкою і модифікованими СН2 та/або СН3 доменами. Наприклад, можуть бути експресовані сумісні конструкції, в яких СН2 домен видалений і СН3 домен, що залишився, (модифікований або немодифікований) сполучений з шарнірною ділянкою спейсером з 5-20 амінокислот. Такий спейсер може бути доданий, наприклад, для гарантії того, що регуляторні елементи константного домену залишаються вільними і доступними або шарнірна ділянка залишається гнучкою. Проте слід зазначити, що амінокислотні спейсери в деяких випадках можуть бути імуногенними і викликати небажану імунну реакцію проти даної конструкції. Тому будь-який спейсер, що вводиться в конструкцію, має бути відносно неімуногенним, або навіть може бути взагалі видалений при необхідності збереження необхідних біохімічних властивостей модифікованих антитіл.

Окрім делеції всіх доменів константної ділянки, може бути бажано отримати антитіла по даному винаходу шляхом часткової делеції або заміни декількох або навіть однієї амінокислоти. Наприклад, мутація однієї амінокислоти у вибраній ділянці СН2 домену може бути достатньою для істотного зменшення зв'язування Fc і, отже, для поліпшення локалізації пухлини. Аналогічним чином може бути бажано просто видалити ту частину одного або декількох доменів константної ділянки, яка контролює модульовану ефекторну функцію (наприклад, зв'язування комплементу CLQ). Такі часткові делеції константних ділянок можуть покращувати вибрані характеристики антитіла (час напівжиття в кров'яному руслі) при збереженні інших необхідних функцій, що асоціюються з даним інтактним доменом константної ділянки. Крім того, як було вказано вище, константні ділянки розглянутих антитіл можуть бути модифіковані в результаті мутації або заміни однієї або декількох амінокислот, що підсилюють профіль створеної конструкції. У даному відношенні можна усунути активність збереженого сайту зв'язування (наприклад, зв'язування Fc) і при цьому зберегти конфігурацію і імуногенний профіль модифікованого антитіла. Інші варіанти здійснення винаходу можуть включати додавання однієї або декількох амінокислот в константну ділянку для посилення необхідних характеристик, таких як ефекторна функція, або приєднання більшого числа цитотоксинів або вуглеводів. У таких варіантах здійснення винаходу може бути бажано вставити або реплікувати конкретні послідовності, виділені з вибраних доменів константної ділянки.

У певних варіантах здійснення винаходу може бути бажано використовувати фрагмент антитіла, а не інтактне антитіло, наприклад, для кращого проникнення в пухлину. Відомі різні методи отримання фрагментів антитіл. Такі фрагменти традиційно отримують в результаті протеолітичного розщеплювання інтактних антитіл (див., наприклад, публікації Morimoto et al., 1993, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 і Brennan et al., 1985, Science, 229:81). Проте в даний час вказані фрагменти продукують рекомбінантні клітини-хазяї, описані вище. Таким чином, Fab-, Fv- і scFv-фрагменти антитіл можуть бути експресовані і секретовані з E. coli або інших клітин-хазяїв, що дозволяє отримувати вказані фрагменти у великих кількостях. Альтернативно такі фрагменти антитіл можуть бути виділені з вищеописаних бібліотек відображення антитіл на фагі. Фрагменти антитіл можуть бути також лінійними антитілами, описаними, наприклад, в патенті США

№ 5641870, і можуть бути моноспецифічними або біспецифічними. Фахівцеві в даній галузі мають бути відомі інші методи отримання фрагментів антитіл.

Крім того, може бути бажано, особливо в разі фрагментів антитіл, модифікувати антитіло для збільшення часу напівжиття в кров'яному руслі. Дана мета може бути досягнута, наприклад, шляхом введення у фрагмент антитіла збереженого епітопа зв'язування рецептора шляхом

мутації відповідної ділянки у фрагменті антитіла або шляхом введення епітопа в пептидну мітку, яку потім гібридизують з фрагментом антитіла біля кінця або в середині (наприклад, шляхом синтезу ДНК або пептиду).

Даний винахід далі відноситься до варіантів і еквівалентів, які по суті гомологічні химерним, гуманізованим і людським антитілам або фрагментам антитіл, розглянутих в даному описі винаходу. Вказані варіанти і еквіваленти можуть містити, наприклад, мутації у вигляді консервативних замінів, тобто замінів однієї або декількох амінокислот подібними амінокислотами. Наприклад, консервативна заміна являє собою заміну амінокислоти іншою амінокислотою з того ж загального класу, наприклад, заміну однієї кислоти амінокислоти іншою кислотою амінокислотою, однієї основної амінокислоти іншою основною амінокислотою або однієї нейтральної амінокислоти іншою нейтральною амінокислотою. У даній галузі відомі цілі, що переслідуються консервативною заміною амінокислот.

Даний винахід відноситься також до імунокон'югатів, що включають антитіло, кон'юговане з цитотоксичним агентом. Цитотоксичні агенти включають хіміотерапевтичні засоби, інгібітори зростання, токсини (наприклад, ферментативний активний токсин бактерійного, грибового, рослинного або тваринного походження або їх фрагменти), радіоактивні ізотопи (тобто радіокон'югати) і т.д. Хіміотерапевтичні засоби, використовувані при створенні таких імунокон'югатів, включають, наприклад, метотрексат, адриаміцин, доксорубіцин, мелфалан, мітоміцин С, хлорамбуцил, даунорубіцин або інші знову створювані засоби. Ферментативно активні токсини і їх фрагменти, які можуть бути використані в даному винаході, включають дифтерійний  $\alpha$ -ланцюг, активні фрагменти дифтерійного токсину, що не зв'язуються,  $\alpha$ -ланцюг екзотоксину,  $\alpha$ -ланцюг рицину,  $\alpha$ -ланцюг абрину,  $\alpha$ -ланцюг модецину, альфа-сарцин, білки *Aleurites fordii*, білки діантину, білки *Phytolacca americana* (PAPI, PPII і PAP-S), інгібітор *Momordica charantia*, курцин, кротин, інгібітор *Saponaire officinalis*, гелонін, митогелін, рестриктоцин, феноміцин, еноміцин і трикотецени. У деяких варіантах здійснення винаходу антитіла можуть бути кон'юговані з радіоізотопами, такими як  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{105}\text{Rh}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{186}\text{Re}$  та  $^{188}\text{Re}$  за допомогою цілого ряду добре відомих хелатоутворювачів або прямого мічення. У інших варіантах здійснення винаходу розглянуті композиції можуть включати антитіла, зв'язані з лікарськими засобами, проліками або лімфокинами, такими як інтерферон. Кон'югати антитіла і цитотоксичного агента отримують, використовуючи різні біфункціональні агенти, що зв'язуються з білком, такі як N-сукцинімідил-3-(2-піридилдитіол) пропіонат (SPDP), імінотіолан (IT), біфункціональні похідні складних імідоефірів (такі як гідрохлорид диметиладипімідату), активні складні ефіри (такі як дисукцинімідилсуберат), альдегіди (такі як глутаровий альдегід), бісазидосполуки (такі як біс(п-азидобензоїл) –гександіамін), похідні бісдіазонію (такі як біс(п-діазонійбензоїл)етилендіамін), діїзоціанати (такі як толуол-2,6-діїзоціанат) і бісактивні сполуки фтору (такі як 1,5-дифтор-2,4-динітробензол). Можуть бути використані кон'югати антитіла і однієї або декількох дрібних молекул токсинів, таких як каліхеаміцин, майтанзиноїди, трихотен і CC1065, і похідних вказаних токсинів, що володіють активністю токсину. У деяких варіантах здійснення винаходу може бути утворений комплекс модифікованих антитіл з іншими імунологічно активними лігандами (наприклад, антитілами або їх фрагментами), в яких отримана молекула зв'язується як з пухлинною клітиною, так і ефекторною клітиною, такою як Т-клітина.

Незалежно від методів отримання необхідних кількостей, антитіла по даному винаходу можуть бути використані в будь-яких кон'югованих (тобто у вигляді імунокон'югата) або некон'югованих формах. Альтернативно антитіла по даному винаходу можуть бути використані в некон'югованій або "голій" формі, щоб направити природні захисні механізми суб'єкта, що включають комплементзалежну цитотоксичність (CDC) і антителозалежну клітинно-опосередковану цитотоксичність (ADCC), на знищення злоякісних клітин. Вибір кон'югованого або некон'югованого модифікованого антитіла залежить від типу і стадії рака, вживання супутнього лікування (наприклад, хіміотерапії або променевої терапії) і стану суб'єкта. Бажано, щоб фахівець міг легко зробити такий вибір з врахуванням даного опису винаходу.

Зв'язування двох антитіл з одним і тим же епітопом в результаті розпізнавання ідентичних епітопів або, що стерично перекриваються, можна визначити за допомогою конкурентних аналізів. Для визначення конкурентного зв'язування може бути використаний будь-який метод, відомий фахівцям в даній галузі (наприклад, імуноаналізи, розглянуті в даному описі винаходу).

Антитіла по даному винаходу можуть бути досліджені відносно імуноспецифічного зв'язування будь-яким методом, відомим в даній галузі. Імуноаналізи, які можуть бути використані для вказаної мети, включають, не обмежуючись ними, конкурентні і неконкурентні аналізи, що виконуються такими методами як Biacore, FACS, імунофлуоресценція, імуноцитохімія, вестерн-блотинг, радіоімуноаналіз, ELISA, імуноферментний сендвіч-аналіз,

імунопреципітація, реакція на преципітин, реакція на преципітин з дифузією в гелі, імунодифузний аналіз, аналіз аглютинації, фіксація комплементу, імунорадіометричний аналіз, флуоресцентний імуноаналіз і імуноаналіз з використанням білка А. Такі аналізи є стандартними і добре відомі в даній галузі (див., наприклад, публікацію Ausubel et al., eds., 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol.1, John Wiley & Sons, Inc., New York, яка повністю включена в даний опис винаходу як посилання).

У деяких варіантах здійснення даного винаходу імуноспецифічність антитіла проти проксимальної ділянки мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1 людини визначають методом ELISA. Аналіз ELISA включає отримання антигену, сенсibilізацію лунк 96-лункового титраційного мікропланшету антигеном, введення в лунку антитіла проти маркера ракових стоволових клітин, кон'югованого із виявленою сполукою, такою як ферментативний субстрат (наприклад, пероксидаза хрину або лужна фосфатаза), інкубацію протягом певного періоду часу і виявлення наявності антигену. Альтернативно антитіло проти проксимальної ділянки мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1 людини не кон'югує із виявленою сполукою, а додають в лунку друге кон'юговане антитіло, яке розпізнає антитіло проти проксимальної ділянки мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1 людини. Крім того, замість сенсibilізації лунки антигеном лунка може бути сенсibilізована антитілом проти проксимальної ділянки мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1 людини, і після введення в сенсibilізовану лунку антигену у вказану лунку може бути додане друге антитіло, кон'юговане із виявленою сполукою. Фахівцям в даній галузі відомо, що параметри аналізу ELISA можуть бути змінені для посилення виявленого сигналу або в аналіз ELISA можуть бути внесені інші зміни, відомі в даній галузі (див., наприклад, публікацію Ausubel et al., eds., 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York at 11.2.1).

Афінність зв'язування антитіла з проксимальною ділянкою мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1 і міра взаємодії антиген-антитіло можна визначити за допомогою конкурентно-зв'язуючих аналізів. Одним прикладом конкурентно-зв'язуючого аналізу є радіоімуноаналіз, що включає інкубацію міченого антигену (наприклад,  $^3\text{H}$  або  $^{125}\text{I}$ ), його фрагмента або варіанта з антитілом, що представляє інтерес, у присутності зростаючих кількостей неміченого антигену з подальшим виявленням антитіла, зв'язаного з міченим антигеном. Афінність антитіла проти проксимальної ділянки мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1 людини і міру зв'язування можна визначити на основі даних, отриманих в результаті аналізу графіка Скатчарда. У деяких варіантах здійснення винаходу використаний кінетичний аналіз Біасоре для визначення міри зв'язування антитіла проти проксимальної ділянки мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1 людини. Кінетичний аналіз Біасоре включає аналіз зв'язування і дисоціації антитіла з чіпів, що містять імобілізований антиген, наприклад, рецептори Notch1, імобілізовані на їх поверхні.

Певні варіанти здійснення винаходу відносяться до виділених полінуклеотидів, кодуючих поліпептид, що включає антитіло або його фрагмент проти нелігандзв'язуючої проксимальної ділянки мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1 людини. Термін "полінуклеотид, кодуючий поліпептид" означає полінуклеотид, що містить лише кодуючі послідовності для поліпептиду, а також полінуклеотид, що містить додаткові кодуючі та/або некодуючі послідовності. Полінуклеотиди по даному винаходу можуть бути у формі РНК або у формі ДНК. ДНК включає кДНК, геномну ДНК і синтетичну ДНК і може бути дволанцюговою або одноланцюговою; одноланцюгова ДНК може являти собою кодуючий ланцюг або некодуючий (антисмисловий) ланцюг. Полінуклеотиди по даному винаходу можуть бути у формі РНК або у формі ДНК, яка включає кДНК, геномну ДНК і синтетичну ДНК. ДНК може бути дволанцюговою або одноланцюговою, і одноланцюгова ДНК може являти собою кодуючий ланцюг або некодуючий (антисмисловий) ланцюг.

Даний винахід далі відноситься до варіантів вищеописаних полінуклеотидів, кодуючих фрагменти, аналоги і похідні. Варіант полінуклеотиду може бути природним алельним варіантом полінуклеотиду або неприродним варіантом полінуклеотиду.

Як було вказано вище, полінуклеотид може мати кодуючу послідовність, яка є природним алельним варіантом кодуючої послідовності розглянутих поліпептидів. Як відомо в даній галузі, алельний варіант є альтернативною формою полінуклеотидної послідовності, що включає заміну, делецію або додавання одного або декількох нуклеотидів, які по суті не змінюють функцію кодованого поліпептиду.

Даний винахід відноситься також до полінуклеотидів, в яких кодуюча послідовність для зрілого поліпептиду може бути гібридизована в тій же рамці зчитування з полінуклеотидом, що підсилює експресію і секрецію поліпептиду з клітини-хазяїна, наприклад, з лідерною послідовністю, що функціонує як секреторна послідовність, що контролює перенесення



поліпептиду з клітини. Поліпептид, що має лідерну послідовність, є передбілком і може містити лідерну послідовність, розщеплену клітиною-хазяїном з утворенням зрілої форми поліпептиду. Полінуклеотиди можуть також кодувати пробілок, що є зрілим білком, і додаткові 5'-кінцеві амінокислотні залишки. Зрілий білок, що має пропослідовність, є пробілком і являє собою неактивною формою білка. Після розщеплювання пропослідовності залишається активний зрілий білок. Таким чином, наприклад, полінуклеотид по даному винаходу може кодувати зрілий білок або білок, що має пропослідовність, або білок, що має як пропослідовність, так і передпослідовність (лідерну послідовність).

Полінуклеотиди по даному винаходу можуть також мати кодуючу послідовність, гібридизовану в рамці зчитування з маркерною послідовністю, яка дозволяє очистити поліпептид по даному винаходу. Маркерна послідовність може являти собою гексагистидинову мітку, що доставляється вектором pQE-9 для очищення зрілого поліпептиду, гібридизованого з маркером, в разі бактерійного хазяїна, або, наприклад, маркерна послідовність може являти собою гемаглютининову (HA) мітку при використанні клітин-хазяїв ссавця, наприклад, клітин COS-7. На-мітка відповідає епітопу, виділеному з білка гемаглютинину вірусу грипу (Wilson et al., 1984, Cell 37:767).

Інші варіанти здійснення винаходу відносяться до виділених молекул нуклеїнової кислоти, що включають полінуклеотид, що має нуклеотидну послідовність, яка щонайменше на 90 %, 95 % ідентична і в деяких варіантах здійснення винаходу щонайменше на 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентична розглянутим послідовностям. У деяких варіантах здійснення винаходу полінуклеотиди мають нуклеотидну послідовність, яка щонайменше на 90 % ідентична SEQ ID NO:3, 5, 7, 9, 11, 13, 21, 25 або 29 (за наявності або відсутності сигнальної послідовності). У деяких варіантах здійснення винаходу полінуклеотиди мають нуклеотидну послідовність, яка щонайменше на 90 % ідентична SEQ ID NO:7 або 13. Деякі варіанти здійснення винаходу відносяться до полінуклеотиду, який гібридизує з полінуклеотидом, кодуючим поліпептиди SEQ ID NO:4, 6, 8, 10, 12, 14, 22, 23, 24, 26, 27, 28, 30, 31 або 32. У деяких варіантах здійснення винаходу полінуклеотиди гібридизують з полінуклеотидами SEQ ID NO:3, 5, 7, 9, 11, 13, 21, 25 або 29. У деяких варіантах здійснення винаходу полінуклеотиди гібридизують в строгих умовах гібридизації.

У використаному тут значенні фрази "гібридизує", "вибірково гібридизує" або "специфічно гібридизує" означають зв'язування або утворення дуплексу молекули лише з конкретною нуклеотидною послідовністю в строгих умовах гібридизації при знаходженні послідовності в складній суміші (наприклад, бібліотека ДНК або РНК). Див., наприклад, публікації Andersen (1998) *Nucleic Acid Hybridization*, Springer-Verlag; Ross (ed. 1997) *Nucleic Acid Hybridization*, Wiley.

У використаному тут значенні фраза "строгі умови гібридизації" означає умови, в яких зонд гібридизує з послідовністю-мішенню, зазвичай в складній суміші нуклеїнової кислоти, а не з іншими послідовностями. Строгі умови залежать від послідовності і можуть бути різними в різних обставинах. Довші послідовності специфічно гібридизують при вищих температурах. З детальним керівництвом по гібридизації нуклеїнових кислот можна ознайомитися в публікації Tijssen, *Techniques in Biochemistry and Molecular Biology – Hybridization with Nucleic Probes*, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays" (1993). Строгі умови зазвичай вибирають так, щоб температура була приблизно на 5-10°C нижче за температуру плавлення ( $T_m$ ) для конкретної послідовності при певній іонній силі.  $T_m$  означає температуру (при певній іонній силі, рН і концентрації нуклеїнової кислоти), при якій 50 % зондів, комплементарних мішені, рівноважно гібридизують з послідовністю-мішенню (оскільки послідовності-мішені присутні в надлишку, при  $T_m$  50 % зондів характеризуються рівноважною зайнятістю). Строгі умови є такими умовами, при яких концентрація солі менше приблизно 1,0 М іона натрію, зазвичай концентрація іонів натрію (або інших солей) складає від близько 0,01 до 1,0 М при рН 7,0-8,3 і температурі рівна щонайменше приблизно 30°C для коротких зондів (наприклад, 10-50 нуклеотидів) і щонайменше приблизно 60°C для довгих зондів (наприклад, більше 50 нуклеотидів). Строгі умови можуть бути також створені при додаванні дестабілізуючих агентів, таких як формамід. При гібридизації в умовах підвищеної жорсткості позитивний сигнал щонайменше в два рази більше фонового сигналу або в 10 разів більше сигналу фонові гібридизації. Типові умови підвищеної жорсткості або строгі умови гібридизації включають: інкубацію в 50 % формаміду, 5-кратній кількості SSC і 1 % SDS при 42°C або інкубацію в 5-кратній кількості SSC і 1 % SDS при 65°C при виконанні промивання в 0,2-кратній кількості SSC і 0,1 % SDS при 65°C. При виконанні ПЦР температура, рівна приблизно 36°C, типова для ампліфікації в умовах зниженої жорсткості, хоча температури гібридизації можуть змінюватися від близько 32°C до близько 48°C залежно від довжини затравки. Для ампліфікації за допомогою ПЦР в умовах підвищеної жорсткості температура зазвичай дорівнює приблизно

62°C, хоча температури гібридизації в умовах підвищеної жорсткості можуть знаходитися в межах від близько 50°C до близько 65°C залежно від довжини і специфічності затравки. Типові умови циклу ампліфікації в умовах підвищеної і зниженої жорсткості включають фазу денатурації при 90°C-95°C протягом 30-120 секунд, фазу гібридизації протягом 30-120 секунд і фазу подовження при температурі близько 72°C протягом 1-2 хвилин.

Полінуклеотид, що має нуклеотидну послідовність, яка щонайменше, наприклад, на 95 % "ідентична" еталонній нуклеотидній послідовності, є полінуклеотидом, нуклеотидна послідовність якого ідентична еталонній послідовності за винятком наявності в послідовності полінуклеотиду до п'яти точкових мутацій на кожні 100 нуклеотидів еталонної нуклеотидної послідовності. Іншими словами, щоб отримати полінуклеотид, що має нуклеотидну послідовність, яка щонайменше на 95 % ідентична еталонній нуклеотидній послідовності, до 5 % нуклеотидів в еталонній послідовності можна видалити або замінити іншими нуклеотидами, або в еталонну послідовність можна ввести до 5 % нуклеотидів від загального числа нуклеотидів в еталонній послідовності. Вказані мутації еталонної послідовності можуть знаходитися в положеннях аміно- або карбоксикінців еталонної нуклеотидної послідовності або в будь-яких місцях між вказаними кінцевими положеннями у вигляді окремих мутацій, розподілених між нуклеотидами в еталонній послідовності, або у вигляді однієї або декількох суміжних груп в еталонній послідовності.

Те, що будь-яка конкретна молекула нуклеїнової кислоти щонайменше на 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентична еталонній послідовності, можна визначити стандартними методами, використовуючи відомі комп'ютерні програми, такі як програма Bestfit (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711). У програмі Bestfit використаний алгоритм локальної гомології, описаний в публікації Smith and Waterman, *Advances in Applied Mathematics*, 2:482-489 (1981), для знаходження кращого гомологічного сегменту в двох послідовностях. При використанні програми Bestfit або будь-якої іншої програми порівняльного аналізу послідовностей для визначення того, що конкретна послідовність, наприклад, на 95 % ідентична еталонній послідовності по даному винаходу, параметри задають з можливістю обчислення процентного значення ідентичності впродовж всієї довжини еталонної нуклеотидної послідовності при допуску розривів в гомології до 5 % від загального числа нуклеотидів в еталонній послідовності.

Варіанти полінуклеотидів можуть містити зміни в кодуючих ділянках, некодуючих ділянках або в тих і інших разом. У деяких варіантах здійснення винаходу варіанти полінуклеотидів містять зміни, які викликають мовчазні заміни, додавання або делеції, але не змінюють властивості або активності кодованого поліпептиду. У деяких варіантах здійснення винаходу варіанти нуклеотидів утворюються в результаті мовчазних замін унаслідок виродженості генетичного коду. Варіанти полінуклеотидів можуть бути створені з різними цілями, наприклад, для оптимізації експресії кодонів для певного хазяїна (заміна кодонів в мРНК людини на кодони, переважно бактерійним хазяїном, таким як *E. coli*).

Поліпептиди по даному винаходу можуть бути рекомбінантними поліпептидами, природними поліпептидами або синтетичними поліпептидами, що включають антитіло або його фрагмент, проти нелігандзв'язуючої проксимальної ділянки мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1 людини. У даній галузі відомо, що деякі амінокислотні послідовності по даному винаходу можуть бути змінені без значного впливу на структуру або функцію білка. Таким чином, даний винахід далі відноситься до варіантів поліпептидів, які володіють значною активністю або включають ділянки антитіла або його фрагмента проти проксимальної ділянки мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1 людини. Такі мутанти включають делеції, інсерції, інверсії, повтори і заміни.

Поліпептиди і полінуклеотиди по даному винаходу отримують у виділеній формі і інколи очищеними до гомогенного стану.

Виділені поліпептиди по даному винаходу можуть бути отримані будь-яким прийнятним методом, відомим в даній галузі. Такі методи включають різні методи від прямого синтезу білків до створення послідовності ДНК, кодуєчої виділені поліпептидні послідовності і експресуючої вказані послідовності в прийнятному трансформованому хазяїні. Наприклад, кДНК можна отримати, досліджуючи бібліотеку кДНК людини за допомогою міченого фрагмента ДНК, кодуєчого поліпептид (наприклад, нуклеотид SEQ ID NO:1), і ідентифікуючи позитивні клони за допомогою ауторадіографії. Подальші цикли очищення і гібридизації виконують стандартними методами.

У деяких варіантах здійснення винаходу, що відносяться до методу рекомбінантних ДНК, послідовність ДНК створюють шляхом виділення і синтезу послідовності ДНК, кодуєчої білок дикої типу, що становить інтерес. Послідовність може бути необов'язково піддана сайт-

специфічному мутагенезу для отримання її функціональних аналогів. (Див., наприклад, публікацію Zoeller et al., 1984, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 81: 5662-5066 і патент США № 4588585). Іншим методом створення послідовності ДНК, кодує поліпептид, що становить інтерес, є хімічний синтез в синтезаторі олігонуклеотидів. Такі олігонуклеотиди можуть бути

5 створені на основі амінокислотної послідовності необхідного поліпептиду з вибором тих кодонів, які можуть бути бажані в клітині-хазяїні, в якій буде продукований рекомбінантний поліпептид, що становить інтерес.

Виділена полінуклеотидна послідовність, кодує виділений поліпептид, що становить інтерес, може бути синтезована стандартними методами. Наприклад, повна амінокислотна

10 послідовність може бути використана для створення гена, трансльованого у зворотному напрямі. Крім того, може бути синтезований олігомер ДНК, що містить нуклеотидну послідовність, кодує конкретний виділений поліпептид. Наприклад, можна синтезувати і потім лігувати декілька дрібних олігонуклеотидів, кодує частини необхідного поліпептиду. Окремі олігонуклеотиди зазвичай містять 5'- або 3'-кінцеві сегменти, що перекриваються, для

15 комплексного збирання.

Зібрані (шляхом синтезу, сайтнаправленого мутагенезу або іншим методом) мутантні послідовності ДНК, кодує певний виділений поліпептид, що становить інтерес, вводять в експресуючий вектор і функціонально зв'язують з регулюючою експресію послідовністю, придатною для експресії білка в бажаному хазяїні. Правильність збирання можна підтвердити

20 шляхом секвенування нуклеїнової кислоти, рестрикційного картування і експресії біологічно активного поліпептиду в прийнятному хазяїні. Як добре відомо в даній галузі, для досягнення високих рівнів експресії трансфікованого гена в хазяїні вказаний ген функціонально зв'язують з транскрипційними та трансляційними послідовностями, регулюючими експресію, які є функціонально активними у вибраному експресуючому хазяїні.

Рекомбінантні експресуючі вектори використовують для ампліфікації і експресії ДНК, кодує поліпептидні гібриди маркерів ракових стоволових клітин. Рекомбінантні експресуючі вектори являють собою конструкції реплікованої ДНК, включає синтетичні або виділені з кДНК фрагменти ДНК, кодує поліпептидний гібрид маркера ракової стоволової клітини або біоеквівалентний аналог, функціонально зв'язаний з прийнятними елементами, регулюючими

30 транскрипцію або трансляцію, виділеними з генів ссавців, мікробів, вірусів або комах. Транскрипційна ланка зазвичай має структуру, що складається з (1) генетичного елемента або елементів, регулює експресію гена, наприклад, промоторів або енхансерів транскрипції, (2) структурної або кодує послідовності, яка транскрибована в мРНК і трансльована в білок, і (3) відповідних послідовностей, ініціює і термінує транскрипцію і трансляцію, які детально описані нижче. Такі регуляторні елементи можуть включати операторну послідовність, регулює транскрипцію. Вектору може бути додатково повідомлена здатність реплікувати в хазяїні, зазвичай забезпечує ориджином реплікації, і введений селектує ген для

35 полегшення розпізнавання трансформантів. Ділянки ДНК є функціонально зв'язаними, коли вони функціонально споріднені один одному. Наприклад, ДНК для сигнального пептиду (секреторна лідерна послідовність) функціонально зв'язана з ДНК для поліпептиду, якщо вона експресована у вигляді попередника, що бере участь в секреції поліпептиду; промотор функціонально зв'язаний з кодує послідовністю, якщо він регулює транскрипцію послідовності; або сайт зв'язування рибосоми функціонально зв'язаний з кодує послідовністю, якщо його положення робить можливою трансляцію. Термін "функціонально зв'язаний" зазвичай має значення "суміжний" і в разі секреторних лідерних послідовностей має значення "суміжний і в рамці читування". Структурні елементи, призначені для використання в дріжджових експресуючих системах, включають лідерну послідовність, що забезпечує позаклітинну секрецію клітиною-хазяїном трансльованого білка. Альтернативно в тих випадках, коли рекомбінантний білок експресований без лідерної або транспортної послідовності, він

40 може включати N-кінцевий залишок метіоніну. Вказаний залишок може бути необов'язково відщеплений від експресованого рекомбінантного білка з утворенням кінцевого продукту.

Вибір регулює експресію послідовності і експресуючого вектора залежить від вибору хазяїна. Може бути використане велике число комбінацій експресуючого хазяїна/вектора. Прийнятні експресуючі вектори для еукаріотичних хазяїв включають, наприклад, вектори, що

55 містять регулює експресію послідовності з SV40, бичачого вірусу папіломи, аденовірусу і цитомегаловірусу. Прийнятні експресуючі вектори для бактерійних хазяїв включають відомі бактерійні плазмідні, такі як плазмідні з *Escherichia coli*, у тому числі pCR1, pBR322, pMB9 і їх похідні, і плазмідні для ширшого круга хазяїв, такі як M13 і нитчасті одноланцюгові ДНК-що містять фаги.

Прийнятні клітини-хазяї для експресії білка маркера ракових стоволових клітин включають прокаріоти, дріжджі, комах або вищі еукаріотичні клітини. Прокаріоти включають грамнегативні або грампозитивні організми, наприклад, *E. coli* або бацили. Вищі еукаріотичні клітини включають лінії клітин ссавців, описані нижче. Можуть бути також використані безклітинні системи трансляції. Відповідні клонуючі і експресуючі вектори, призначені для використання в бактерійних, грибних, дріжджових клітинах-хазяїнах і клітинах-хазяїнах ссавців, описані в публікації Pouwels et al. (Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, N.Y., 1985), яка включена в даний опис винаходу як посилання.

Різні системи культур клітин ссавців або комах також ефективно використовуються для експресії рекомбінантного білка. Рекомбінантні білки можуть бути експресовані в клітинах ссавців, тому що такі білки зазвичай правильно укладені, відповідним чином модифіковані і є повністю функціональними. Приклади прийнятних ліній клітин-хазяїв ссавців включають лінії клітин COS-7 нирки мавпи, описані в публікації Gluzman (1981, Cell, 23:175), і інші лінії клітин, здатні експресувати відповідний вектор, у тому числі, наприклад, клітини L, C127, 3T3, клітини яєчника китайського хом'яка (CHO), лінії клітин HeLa і BHK. Експресуючі вектори ссавців можуть включати нетранскрибовані елементи, такі як ориджин реплікації, прийнятний промотор і енхансер, зв'язаний з експресуючим геном, і інші 5'- або 3'-кінцеві нетранскрибовані послідовності і 5'- або 3'-кінцеві нетрансльовані послідовності, такі як необхідні сайти зв'язування рибосоми, сайт поліаденілювання, донорські і акцепторні сайти сплайсингу і послідовності, термінуючи транскрипцію. Бакуловірусні системи, призначені для продукування гетерологічних білків в клітинах комах, розглянуті в публікації Luckow and Summers, 1988, Bio/Technology, 6:47.

Білки, продуковані трансформованим хазяїном, можуть бути очищені будь-яким прийнятним методом. Такі стандартні методи включають хроматографію (наприклад, іонообмінну хроматографію, афінну хроматографію і витіснювальну хроматографію), центрифугування, диференційовану розчинність або будь-які інші стандартні методи очищення білків. До білка можуть бути приєднані афінні мітки, такі як гексагистидин, домен зв'язування мальтози, послідовність оболонки вірусу грипу і глутатіон-S-трансферазу, що дозволяють легко виробити очищення в результаті проходження через відповідну колонку для афінної хроматографії. Виділені білки можуть бути також досліджені у фізичному відношенні за допомогою таких методів як протеоліз, ядерний магнітний резонанс і рентгенівська кристалографія.

Наприклад, супернатанти систем, секретуючих рекомбінантний білок в культуральне середовище, спочатку можуть бути концентровані за допомогою комерційно доступного фільтру для концентрування білка, наприклад, що ультрафільтруючого пристроя Amicon або Millipore Pellicon. Концентрат, отриманий на стадії концентрування, може бути нанесений на прийнятну очищуючу матрицю. Альтернативно може бути використана аніонообмінна смола, наприклад, матриця або субстрат, що має бічні діетиламіноетильні (DEAE) групи. Матриці можуть бути акриламідними, агарозними, декстрановими, целюлозними або інших типів, зазвичай вживаних для очищення білків. Альтернативно може бути виконана стадія катіонного обміну. Прийнятні катіонообмінники містять різні нерозчинні матриці, включаючи сульфопропильні або карбоксиметильні групи. І нарешті, для подальшого очищення рекомбінантного білка або композиції на основі Fc-фрагмента проти білка ракових стоволових клітин може бути виконана одна або декілька стадій вискоефективної рідинної хроматографії з оберненою фазою (RP-ВЕРЖХ) при використанні гідрофобного середовища для RP-ВЕРЖХ, наприклад, силікагелю, що має бічні метильні або інші аліфатичні групи. Для отримання гомогенного рекомбінантного білка можуть бути використані деякі або всі вищезгадані стадії очищення в різних комбінаціях.

Рекомбінантний білок, продукований в бактерійній культурі, зазвичай виділяють шляхом початкової екстракції з клітинного дебриса з подальшим виконанням однієї або декількох стадій концентрації, висолювання, водної іонообмінної або витіснювальної хроматографії. Кінцеве очищення може бути вироблене за допомогою вискоефективної рідинної хроматографії (ВЕРЖХ). Мікробні клітини, використані для експресії рекомбінантного білка, можуть бути зруйновані будь-яким стандартним методом, що включає циклічне заморожування-відтавання, обробку ультразвуком, механічне руйнування або використання агентів для лізису клітин.

Даний винахід відноситься також до способів інгібування зростання онкогенних клітин, експресуючих маркер ракових стоволових клітин, за допомогою антагоністів маркера ракових стоволових клітин по даному винаходу. У деяких варіантах здійснення винаходу спосіб інгібування зростання онкогенних клітин, експресуючих маркер ракових стоволових клітин, наприклад, рецептор Notch1, включає контактування клітини з антагоністом маркера ракових стоволових клітин *in vitro*. Наприклад, лінію іморталізованих клітин або лінію ракових клітин, експресуючих маркер ракових стоволових клітин, культивують в середовищі, в яке додають

антагоніст маркера експресованих ракових стоволових клітин для інгібування зростання клітин. У деяких варіантах здійснення винаходу пухлинні клітини, що включають пухлинні ствові клітини, виділяють із зразка, отриманого у суб'єкта, такого як, наприклад, біопсія тканина, плевральний випіт або проба крові, і культивують в середовищі, в яке додають антагоніст маркера ракових стоволових клітин для інгібування зростання клітин. У деяких варіантах здійснення винаходу антагоніст є антитілом, яке специфічно розпізнає епітоп білка маркера ракових стоволових клітин. Наприклад, антитіла проти білка маркера ракових стоволових клітин можуть бути додані в культуральне середовище виділених ракових стоволових клітин для інгібування зростання клітин.

У деяких варіантах здійснення винаходу спосіб інгібування зростання онкогенних клітин, експресуючих маркер ракових стоволових клітин, включає контактування клітини з антагоністом маркера ракових стоволових клітин *in vivo*. У деяких варіантах здійснення винаходу спосіб інгібування зростання онкогенних клітин, експресуючих рецептор Notch1, включає контактування клітин з антитілом, який специфічно зв'язується з нелігандзв'язуючою проксимальною ділянкою мембрани рецептора Notch1 людини. У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло інгібує зростання онкогенних клітин, пригнічуючи активність Notch1. У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло інгібує зростання онкогенних клітин, пригнічуючи індуквану лігандом передачу сигналу рецептора Notch1. У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло інгібує зростання онкогенних клітин, блокуючи розщеплювання рецептора Notch1. У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло інгібує зростання онкогенних клітин, зменшуючи частоту зустрічальності або число ракових стоволових клітин в пухлині.

У певних варіантах здійснення винаходу контактування онкогенної клітини з антагоністом маркера ракових стоволових клітин здійснюють в тваринній моделі. Наприклад, ксенотрансплантати, експресуючі маркер ракових стоволових клітин, вирощують у мишей з порушеною імунологічною реактивністю (наприклад, у мишей NOD/SCID), яким вводять антагоніст маркера ракових стоволових клітин для інгібування зростання пухлини. У деяких варіантах здійснення винаходу ракові ствові клітини, експресуючі маркер ракових стоволових клітин, виділяють із зразка, отриманого у суб'єкта, такого як, наприклад, біопсія тканина, плевральний випіт або проба крові, і ін'єктують мишам з порушеною імунологічною реактивністю, яким потім вводять антагоніст маркера ракових стоволових клітин для інгібування зростання пухлинних клітин. У деяких варіантах здійснення винаходу антагоніст маркера ракових стоволових клітин вводять одночасно або через короткий проміжок часу після введення тварині онкогенних клітин для запобігання зростання пухлини. У інших варіантах здійснення винаходу антитіло проти маркера ракових стоволових клітин вводять у вигляді терапевтичного засобу після того, як онкогенні клітини виростуть до певного розміру.

Даний винахід далі відноситься до фармацевтичних композицій, що включають антитіла, поліпептиди або інші агенти, які спрямовано впливають на маркер ракових стоволових клітин. Вказані фармацевтичні композиції використовують для інгібування зростання пухлини, зростання пухлинних клітин і лікування рака у людей.

Препарати отримують з можливістю зберігання і використання, об'єднуючи очищений антагоніст (наприклад, антитіло) по даному винаходу з фармацевтично прийнятним носієм (наприклад, носієм, наповнювачем і т.д.). (Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition, Mack Publishing, 2000). Фармацевтично прийнятні носії включають, не обмежуючись ними, нетоксичні буфери, такі як фосфат, цитрат і інші органічні кислоти; солі, такі як хлорид натрію; антиоксиданти, що включають аскорбінову кислоту і метіонін; консерванти, такі як хлорид октадецилдиметилбензиламонію, хлорид гексаметонію, хлорид бензалконію, хлорид бензетонію, феноловий, бутиловий або бензиловий спирт, алкілпарабени, такі як метил- або пропілпарабен, катехол, резорцин, циклогексанол, 3-пентанол і м-крезол; низькомолекулярні поліпептиди (менш приблизно 10 амінокислотних залишків); білки, такі як сироватковий альбумін, желатин або імуноглобуліни; гідрофільні полімери, такі як полівінілпіролідон; амінокислоти, такі як гліцин, глютамін, аспарагін, гістидин, аргінін або лізин; вуглеводи, такі як моносахариди, дисахариди, глюкоза, маноза або декстрини; хелатотворні агенти, такі як EDTA; цукру, такі як цукроза, маніт, трегалоза або сорбіт; солетворні противоіони, такі як натрій; комплекси металів, такі як Zn-білкові комплекси; та/або неіоногенні поверхнево-активні речовини, такі як ТВІН або поліетиленгліколь (PEG).

Фармацевтична композиція по даному винаходу може бути введена будь-якими способами, вживаними для місцевого або системного лікування. Введення може бути місцевим (наприклад, нанесення на слизисті оболонки, що включає вагінальне і ректальне введення) у вигляді черезшкірних пластрів, мазей, лосьйонів, кремів, гелів, крапель, супозиторіїв, аерозолів, рідин і порошків; легеневим, таким як інгаляція або інсуфляція порошків або аерозолів (наприклад, за

допомогою розпилювача), внутрішньотрахеальним, інтраназальним, епідермальним і черезшкірним; пероральним; парентеральним, включаючим внутрішньовенні, внутрішньоартеріальні, внутрішньопухлинні, підшкірні, внутрішньочеревинні або внутрішньом'язові ін'єкції або вливання; або внутрічерепним, таким як інтратекальне або інтравентрикулярне введення.

Терапевтичний препарат може являти собою стандартну лікарську форму. Такі препарати включають пігулки, пілюлі, капсули, порошки, гранули, розчини або суспензії у водних або неводних середовищах, або супозиторії для перорального, парентерального або ректального введення і препарати для інгаляції. У твердих композиціях, таких як пігулки, основний активний інгредієнт змішують з фармацевтичним носієм. Стандартні інгредієнти, що входять до складу пігулки, включають кукурудзяний крохмаль, лактозу, цукрозу, сорбіт, тальк, стеаринову кислоту, стеарат магнію, дикальційфосфат або камеді і інші розчинники (наприклад, воду) з утворенням твердої попередньої композиції, що містить гомогенну суміш сполуки по даному винаходу або її нетоксичної фармацевтично прийнятної солі. Тверду попередню композицію потім ділять на стандартні лікарські форми по даному винаходу. На пігулки, пілюлі і т.д. новий композиції може бути нанесене покриття або який-небудь інший захисний шар для отримання лікарської форми пролонгованої дії. Наприклад, пігулка або пілюля може включати внутрішню композицію, покриту зовнішнім компонентом. Крім того, два компоненти можуть бути розділені ентросолюбільним шаром, який перешкоджає дезінтеграції і дозволяє внутрішньому компоненту пройти без руйнування через шлунок або забезпечує пролонговану дію. Такі ентросолюбільні шари і покриття можуть бути виготовлені з різних матеріалів, що включають цілий ряд полімерних кислот і сумішей полімерних кислот з такими речовинами, як шелак, цетиловий спирт і ацетат целюлози.

Фармацевтичні препарати включають антитіла по даному винаходу в комплексі з ліпосомами (Epstein et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688; Hwang et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4030 і патенти США №№ 4485045 і 4544545). Ліпосоми із збільшеним часом перебування в кровотоці описані в патенті США № 5013556. Деякі ліпосоми можуть бути отримані при випаровуванні в колонці з оберненою фазою ліпідної композиції, що включає фосфатидилхолін, холестерин і фосфатидилетаноламін, що є похідним Peg (PEG-PE). Ліпосоми екструдують через фільтри з певним розміром пор, отримуючи при цьому ліпосоми з необхідним діаметром.

Антитіла можуть бути також поміщені в мікрокапсули. Такі мікрокапсули отримують, наприклад, методами коацервації або міжфазної полімеризації, наприклад, гідроксиметилцелюлозні або желатинові мікрокапсули і поліметилметакрилатні мікрокапсули отримують відповідно в колоїдних системах доставки лікарських засобів (наприклад, ліпосоми, альбумінові мікросфери, мікроемulsії, наночастки і нанокапсули) або в макроемulsіях, описаних в публікації Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 20th Ed., Mack Publishing (2000).

Крім того, можуть бути отримані препарати пролонгованої дії. Прийнятні приклади препаратів пролонгованої дії включають напівпроникні матриці з твердих гідрофобних полімерів, що містять антитіла, які являють собою формовані вироби (наприклад, плівки або мікрокапсули). Приклади матриць, що забезпечують пролонговану дію, включають складні поліефіри, гідрогелі, такі як полі-2-гідроксіетилметакрилат або полівініловий спирт, полілактиди (патент США № 3773919), сополімери L-глутамінової кислоти і 7-етил-L-глутамату, нерозкладаний етиленвінілацетат, розкладані сополімери молочної кислоти і гліколевої кислоти, такі як LUPRON DEPOT TM (ін'єковані мікросфери, що складаються з сополімеру молочної кислоти і гліколевої кислоти і лейпролідацетату), ізобутират ацетату цукрози і полі-D(-)-3-гідроксимасляну кислоту. У деяких варіантах здійснення винаходу антитіла можуть бути використані для лікування різних станів, що характеризуються експресією та/або підвищеною реакцією клітин на маркер ракових стоволових клітин. Зокрема, передбачається, що антитіла проти маркера ракових стоволових клітин, наприклад, Notch1, можуть бути використані для лікування проліферативних порушень, які включають, не обмежуючись ними, доброякісні і злоякісні пухлини нирки, печінки, сечового міхура, молочної залози, шлунку, яєчника, ободової кишки, прямої кишки, передміхурової залози, легень, жіночих зовнішніх статевих органів, щитовидної залози, голови і шиї, головного мозку (гліобластома, астроцити, медулобластома і т.д.), крові і лімфи (лейкози і лімфоми).

У деяких варіантах здійснення винаходу лікування включає комбіноване введення антитіла або іншого агента по даному винаходу і хіміотерапевтичного засобу або коктейлю з декількох різних хіміотерапевтичних засобів. Лікування антитілом може бути вироблене до, одночасно або після введення хіміотерапевтичних засобів. Хіміотерапевтичні засоби, які можуть бути

використані в даному винаході, включають хімічні речовини або лікарські засоби, відомі в даній галузі і комерційно доступні, такі як доксорубіцин, 5-фторурацил, цитозинарабінозид ("Ara-C"), циклофосфамід, тіотепа, бусульфан, цитоксин, таксол, метотрексат, цисплатин, мелфалан, вінбластин і карбоплатин. Комбіноване введення може включати спільне введення в одному фармацевтичному препараті або в окремих препаратах, послідовне введення у будь-якому порядку, але зазвичай протягом періоду часу, що забезпечує одночасний прояв біологічної активності всіх активних агентів. Такі хіміотерапевтичні препарати зазвичай вводять відповідно до схем введення, вказаних в інструкціях виробників або визначених емпіричним шляхом. Схеми введення таких хіміотерапевтичних препаратів також описані в публікації Chemotherapy Service, Ed. M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, Md. (1992).

Хіміотерапевтичні засоби, придатні для використання в даному винаході, також включають, не обмежуючись ними, алкілувальні агенти, такі як тіотепа і циклофосфамід (цитоксан); алкілсульфонати, такі як бусульфан, імпротульфан і піпосульфан; азириди, такі як бензодопа, карбоксон, метуредопа і уредопа; етиленіміни і метиламеламіни, що включають алтретамін, триетилномеламін, триетилномеламід, триетилномеламід і азотистий іприт триметилномеламіну, такий як хлорамбуцил, хлорнафазин, хлорфосфамід, естрамустин, іфосфамід, мехлоретамін, гідрохлорид оксиду мехлоретаміну, мелфалан, новембіцин, фенестерин, преднімустин, трофосфамід, урацилізотіоціанова кислота; нітрозомочевини, такі як кармустин, хлорзотоцин, фотемустин, ломустин, німустин, ранімустин; антибіотики, такі як аклаціномізин, актиноміцин, аутраміцин, азасерин, блеоміцини, кактиноміцин, каліхеаміцин, карабіцин, каміноміцин, карзинофілін, хромоміцини, дактиноміцин, даунорубіцин, деторубіцин, 6-діазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубіцин, епірубіцин, езорубіцин, ідарубіцин, марцеломіцин, мітоміцини, мікофенольна кислота, ногаламіцин, олівоміцини, 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 денотерин, метотрексат, птероптерин, триметрексат; аналоги пурину, такі як флударабін, 6-меркаптопурин, тіаміприн, тіоганін; аналоги піримідину, такі як анцитабін, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабін, дидезоксіуридин, доксифлуридин, еноцитабін, флоксуридин, 5-FU; андрогени, такі як калустерон, пропіонат дромостанолону, епітіостанол, мепітіостан, тестолактон; адреноблокуючі засоби, такі як аміноглутетимід, мітотан, трилостан; наповнювач фолієвої кислоти, такий як фролінова кислота; ацеглатон; альдофосфамідглікозид; амінолевулінова кислота; амсакрин; бестрабуцил; бісантрен; едотраксат; дефофамін; демеколцин; діазиксон; елформітин; ацетат еліптинію; етоглуцид; нітрат галію; гідроксимочевина; лентинан; лонідамін; мітогуазон; мітоксантрон; мопідамол; нітракрин; пентостатин; фенамет; пірарубіцин, подофілінова кислота; 2-етилгідразид; прокарбазин; PSK; разоксан; сизофуран; спірогерманій; тенуазонова кислота; триазиксон; 2,2',2"-трихлортриетиламін; уретан; віндезин; дакарбазин; маномустин; мітобронітол; мітолактон; піпоброман; гацитозин; арабінозид ("Ara-C"); циклофосфамід; тіотепа; таксоїди, наприклад, паклітаксел (TAXOL, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) і доксетаксел (Taxotere, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France); хлорамбуцил; гемцитабін; 6-тіоганін; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платини, такі як цисплатин і карбоплатин; вінбластин; платина; етопозид (VP-16); іфосфамід; мітоміцин C; мітоксантрон; вінкрисин; вінорелбін; навелбін; новантрон; теніпозид; дауноміцин; аміноптерин; кселода; ібандронат; CPT11; інгібітор топоізомерази RFS 2000; диформетилорнітин (DMFO); ретиноева кислота; еспераміцини; капєцитабін; і фармацевтично прийнятні солі, кислоти або похідні будь-яких з вищезгаданих речовин. Хіміотерапевтичні засоби також включають антигормональні засоби, які регулюють або інгібують дію гормонів на пухлини, такі як антиестрогени, що включають, наприклад, тамоксифен, ралоксифен, 4(5)-імідазоли, інгібуючі ароматазу, 4-гідрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон і тореміфен (фарестон); і антиандрогени, такі як флутамід, нілутамід, бікалутамід, лейпролід і гoserелін; і фармацевтично прийнятні солі, кислоти і похідні будь-яких з вищезгаданих речовин.

У певних варіантах здійснення даного винаходу хіміотерапевтичний засіб є інгібітором топоізомерази. Інгібітори топоізомерази є хіміотерапевтичними засобами, які перешкоджають дії ферменту топоізомерази (наприклад, топоізомерази I або II). Інгібітори топоізомерази включають, не обмежуючись ними, гідрохлорид доксорубіцину, цитрат даунорубіцину, гідрохлорид мітоксантрону, актиноміцин D, етопозид, гідрохлорид топотекану, теніпозид (VM-26) та іринотекан.

У певних варіантах здійснення даного винаходу хіміотерапевтичний засіб є антиметаболітом. Антиметаболіт є хімічною речовиною, структура якої подібна до метаболіту, необхідному для нормальних біохімічних реакцій, але досить відрізняється, щоб перешкоджати

виконанню однієї або декількох нормальних функцій клітин, таких як поділ. Антиметаболіти включають, не обмежуючись ними, гемцитабін, фторурацил, капецитабін, натрій-метотрексат, ралітрексед, пеметрексед, тегафур, цитозинарабінозид, тіогуанін (GlaxoSmithKline), 5-азацитидин, 6-меркаптопурин, азатіоприн, 6-тіогуанін, пентостатин, фосфат флударабіну і кладрибін, а також фармацевтично прийнятні солі, кислоти або похідні будь-яких з вищезгаданих речовин.

У інших варіантах здійснення винаходу лікування включає введення антитіла або іншого агента по даному винаходу і спільне проведення променевої терапії. Лікування антитілом може бути вироблене до, одночасно або після променевої терапії. Будь-які схеми проведення променевої терапії можуть бути визначені кваліфікованим лікарем.

У інших варіантах здійснення винаходу лікування може включати спільне введення антитіл по даному винаходу з іншими антитілами проти додаткових опухолеспецифічних антигенів, які включають, не обмежуючись ними, антитіла, що зв'язуються з рецептором EGF (EGFR) (ербітукс®), рецептором erb2 (HER2) (герцептин®) і ендотеліальним чинником зростання судин (VEGF) (авастин®). Крім того, лікування може включати введення одного або декількох цитокінів, може супроводитися хірургічним видаленням ракових клітин та/або будь-якою іншою терапією, яка є необхідною на думку лікаря.

Відповідна доза антитіла або іншого агента по даному винаходу, використовувана для лікування захворювання, залежить від типу захворювання, що підлягає лікуванню, тягарю та перебігу захворювання, сприйнятливості захворювання до лікування, введення антитіла в терапевтичних або профілактичних цілях, попередньої терапії, історії хвороби суб'єкта і інших чинників, що враховуються лікарем. Антитіло або агент може бути введений один раз або у вигляді серії введень на протязі від декількох днів до декількох місяців, до одужання або ослаблення симптомів захворювання (наприклад, зменшення об'єму пухлини). Оптимальні схеми введення можуть бути визначені з врахуванням накопичення лікарського засобу в організмі суб'єкта і можуть залежати від відносної ефективності конкретного антагоніста. Лікар може легко визначити оптимальні дози, способи введення і частоту повторного введення. Як правило, доза складає від 0,01 мкг до 100 мг/кг маси тіла і може бути введена один або кілька разів на день, тиждень, місяць або рік. Лікар може визначити частоту повторного введення на основі виміряного часу знаходження антитіла або агента в організмі суб'єкта і концентрації антитіла або агента в біологічних рідинах або тканинах.

Даний винахід відноситься до набору, що включає антитіла по даному винаходу, які можуть бути використані для здійснення способів, розглянутих в даному описі винаходу. У деяких варіантах здійснення винаходу набір включає щонайменше одне очищене антитіло проти маркера ракових стоволових клітин в одній або декількох ємкостях. У деяких варіантах здійснення винаходу набір включає щонайменше одне очищене антитіло проти нелігандзв'язуючої проксимальної ділянки мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1 людини в одній або декількох ємкостях. У деяких варіантах здійснення винаходу набір включає антитіло 52M51 або гуманізований варіант антитіла 52M51. У деяких варіантах здійснення винаходу набір включає антитіло 52R43. У деяких варіантах здійснення винаходу набір містить всі компоненти, необхідні та/або достатні для виконання аналізу по виявленню захворювання, у тому числі всі контрольні речовини, керівництва по виконанню аналізів і будь-яке необхідне програмне забезпечення для виконання аналізів і представлення результатів. Фахівцям в даній галузі повинно бути зрозуміло, що антитіла по даному винаходу можуть бути легко включені в один з описаних наборів, добре відомих в даній галузі.

Певні варіанти здійснення даного винаходу відносяться до способу ідентифікації молекули, яка зв'язується з нелігандзв'язуючою проксимальною ділянкою мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1 людини і інгібує зростання пухлини, що включає: i) інкубацію молекули з нелігандзв'язуючою проксимальною ділянкою мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1 людини; ii) визначення здатності молекули зв'язуватися з проксимальною ділянкою мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1 людини і iii) визначення здатності молекули інгібувати зростання пухлини. Молекули, які специфічно зв'язуються з проксимальною ділянкою мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1 людини, включають, не обмежуючись ними, поліпептиди і антитіла.

Скринінг може бути виконаний будь-яким прийнятним методом, відомим в даній галузі. У певних варіантах здійснення винаходу скринінг виконують *in vitro*. У деяких варіантах здійснення винаходу клітини, експресуючі нелігандзв'язуючу проксимальну ділянку мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1 людини, інкубують з міченою молекулою і за допомогою аналізу FACS визначають специфічне зв'язування міченої молекули з проксимальною ділянкою мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1 людини. У деяких



варіантах здійснення винаходу нелігандзв'язуючу проксимальну ділянку мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1 людини експресують шляхом відображення на фагі і ідентифікують молекули, які специфічно зв'язуються з проксимальною ділянкою мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1 людини. Інші прийнятні методи ідентифікації молекул, які специфічно зв'язуються з нелігандзв'язуючою проксимальною ділянкою мембрани рецептора Notch1 людини, включають, не обмежуючись ними, ELISA, вестерн-блотинг (або імуноблотинг) і гібридизацію двох дріжджів.

Молекули, які специфічно зв'язуються з нелігандзв'язуючою проксимальною ділянкою мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1 людини, потім досліджують відносно інгібування зростання пухлинних клітин. Дослідження може бути виконане будь-яким прийнятним методом, відомим в даній галузі. У певних варіантах здійснення винаходу молекули, які специфічно зв'язуються з проксимальною ділянкою мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1 людини, досліджують відносно здатності інгібувати зростання пухлини *in vitro*. У деяких варіантах здійснення винаходу молекули, які специфічно зв'язуються з проксимальною ділянкою мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1 людини, інкубують з пухлинними клітинами в культурі, визначають проліферацію пухлинних клітин у присутності молекули, яка специфічно зв'язується з проксимальною ділянкою мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1 людини, і отриманий результат порівнюють з пухлинними клітинами, інкубованими з незв'язуючою контрольною молекулою. У певних варіантах здійснення винаходу молекули, які специфічно зв'язуються з нелігандзв'язуючою проксимальною ділянкою мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1 людини, досліджують відносно здатності інгібувати зростання пухлини *in vivo*. У певних варіантах здійснення винаходу молекули, які специфічно зв'язуються з проксимальною ділянкою мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1 людини, ін'єктують в тваринну модель ксенотрансплантату, визначають зростання пухлин у тварин, підданих дії молекул, які специфічно зв'язуються з проксимальною ділянкою мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1 людини, і отриманий результат порівнюють з тваринами, яким вводили незв'язуючу контрольну молекулу.

#### Приклади

##### Приклад 1

Були створені антитіла проти нелігандзв'язуючої ділянки рецептора Notch1, зокрема, проти нелігандзв'язуючої проксимальної ділянки мембрани позаклітинного домену. У певних варіантах здійснення винаходу рекомбінантні поліпептидні фрагменти позаклітинного домену Notch1 людини були отримані у вигляді антигенів для продукування антитіл. Був використаний стандартний метод рекомбінантних ДНК для виділення полінуклеотидів, що кодують проксимальну ділянку мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1 людини, що складається з амінокислот 1427-1732 (SEQ ID NO:1). Вказані полінуклеотиди окремо лігували в рамці біля N-кінця з Fc-фрагментом людини і гістидиновою міткою і клонували в переносувальний плазмідний вектор для опосередкованої бакуловірусом експресії в клітинах комах. Для отримання рекомбінантних клітин комах, експресуючих поліпептид Notch1, відповідний проксимальний ділянку мембрани, що включає амінокислоти 1427-1732 (SEQ ID NO:2), використовували стандартні методи трансфекції, інфікування і культивування клітин (O'Reilly et al., 1994, Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual, Oxford: Oxford University Press).

Поліпептид проксимальної ділянки мембрани рецептора Notch1 (амінокислоти 1427-1732 рецептори Notch1) очищали від лізатів клітин комах за допомогою афінної хроматографії з використанням хелату білка A і  $Ni^{++}$ , відомою фахівцям в даній галузі. Очищений поліпептид проксимальної ділянки мембрани рецептора Notch1 діалізували проти PBS (pH=7), концентрували приблизно до 1 мг/мл і стерилізували фільтруванням, отримуючи при цьому препарат для імунізації.

Мишей (n=3) імунізували очищеним білком антигену Notch1 (Antibody Solutions; Mountain View, CA) стандартними методами. Кров, отриману у окремих мишей, досліджували приблизно через 70 днів після первинної імунізації відносно розпізнавання антигену за допомогою аналізів Elisa і FACS (розглянутих в даному описі винаходу). Дві тварини з найвищими титрами антитіл були відібрані для повторної імунізації антигеном, після чого виділяли клітини селезінки для отримання гібридоми. Клітини гібридоми культивували в кількості 1 клітини/лунку на 96-лункових планшетах і супернатант з кожної лунки досліджували за допомогою аналізів ELISA і FACS відносно поліпептиду проксимальної ділянки мембрани рецептора Notch1. Було відібрано декілька гібридом з високим титром антитіл, які розмножували в статичній культурі в колбі. Антитіла очищали від супернатанту гібридом за допомогою хроматографії на агарозі з

використанням білка А або білка G. Очищені моноклональні антитіла знову досліджували за допомогою описаного аналізу FACS. Було виділено декілька антитіл, які розпізнавали проксимальну ділянку мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1 людини. Лінія клітин гібридоми, експресуюча антитіло 52M51, депонувала в ATCC згідно з положеннями

5 Будапештського договору 7 серпня 2008 р. під номером РТА-9405. Були визначені нуклеотидні і прогнозовані білкові послідовності важкого ланцюга (SEQ ID NO:9 і 10) і легкого ланцюга (SEQ ID NO:3 і 4) антитіла 52M51.

#### Людські антитіла

У альтернативних варіантах здійснення винаходу людські антитіла, які специфічно

10 розпізнають нелігандзв'язуючу проксимальну ділянку мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1, отримують методом відображення на фагі. У певних варіантах здійснення винаходу бібліотеку синтетичних антитіл, що містить варіабельні домени людських антитіл, досліджують відносно специфічного і високоафінного розпізнавання антигену рецептора Notch1, розглянутого в даному описі винаходу. У певних варіантах здійснення винаходу досліджують

15 бібліотеку відображення на фагі Fab-фрагментів людини, використовуючи серію рекомбінантних білків, включаючих нелігандзв'язуючу проксимальну ділянку мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1. У першому циклі фагові частки, що відображають Fab-фрагмент, в кількості  $2 \times 10^{13}$  інкубують з рекомбінантним білком (пасивно імунізованим), неспецифічний фаг вимивають і специфічний фаг елюють при низькому значенні рН (клітини) або за допомогою DTT (рекомбінантний білок). F+ бактерії TG1 інфікують елюованим продуктом, рятують фагом-хелпером і індують відображення Fab-фрагмента за допомогою IPTG (0,25 мМ). Вказаний процес повторюють впродовж двох додаткових циклів і при виконанні третього циклу досліджують за допомогою аналізу ELISA відносно пасивно імунізованого антигену (5 мкг/мл).

20

Кластери CDR в бібліотеці специфічно замінюють за допомогою спеціальних

25 фланкувальних сайтів рестрикції для оптимізації антитіла. Оптимізовані варіабельні ділянки людини потім клонують в експресуючий вектор Ig, що містить важкий ланцюг і легкий капанцюг IgG1 людини для експресії людських антитіл в клітинах CHO.

#### Картування епітопів

Для ідентифікації антитіл, які специфічно розпізнають нелігандзв'язуючу проксимальну

30 ділянку мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1, виробляють картування епітопів. У певних варіантах здійснення винаходу експресуючі плазмідні вектори ссавців, що включають промотор CMV вгорі від полінуклеотидів, кодуючих фрагменти позаклітинного домену Notch1, у вигляді злитих білків Fc-ділянки, створюють стандартними методами рекомбінантних ДНК. У певних варіантах здійснення винаходу картування епітопів антитіл серії 52M, що зв'язуються з

35 нелігандзв'язуючою ділянкою, виконують, використовуючи ряд злитих білків і делецій проксимальної ділянки мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1 людини, що охоплює ділянку приблизно від амінокислоти 1427 до амінокислоти 1732. Вказані рекомбінантні злиті білки експресують в тимчасово трансфікованих клітинах HEK 293, з яких збирають кондиціоноване середовище через двадцять чотири-сорок вісім годин після трансфекції для виконання аналізу ELISA.

40

У певних варіантах здійснення винаходу фрагменти злитих білків Notch1 відокремлюють на гелі для SDS-PAGE і зондують антитілами проти Fc-ділянки для виявлення присутності всіх злитих білків реагуючих з антитілами проти Notch1, з метою визначення доменів, розпізнаваних кожним антитілом проти Notch.

45 Для ідентифікації специфічних епітопів в позаклітинних доменах, розпізнаваних антитілом проти Notch1, використовують систему SPOT (Sigma Genosys, The Woodlands, TX). Синтезують декілька лінійних пептидів, що складаються з 10 залишків, які перекриваються однією амінокислотою і охоплюють весь позаклітинний домен Notch1, і ковалентно зв'язують з целюлозною мембраною методом синтезу SPOT. Мембрану заздалегідь інкубують протягом 8

50 годин при кімнатній температурі з блокуючим буфером і гібридизують з антитілом протягом ночі при 4°C. Далі мембрану промивають, інкубують з вторинним антитілом, кон'югованим з пероксидазою хрину (HRP) (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ), повторно промивають і візуалізують розчином для прояву сигналу, що містить 3-аміно-9-етилкарбазол. Таким чином визначають специфічні епітопи, розпізнавані антитілом.

#### Химерні антитіла

Після ідентифікації моноклональних антитіл, які специфічно розпізнають нелігандзв'язуючу проксимальну ділянку мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1, вказані антитіла модифікують для усунення імунної реакції людського антитіла проти мишачого антитіла (НАМА), що виникає при використанні антитіл гризунів як терапевтичних агентів. Варіабельні ділянки

60 важкого ланцюга і легкого ланцюга вибраного моноклонального антитіла виділяють за

допомогою ПЦР із зворотною транскрипцією (RT-ПЦР) з клітин гібридами і лігують в рамці з константними ділянками важкого ланцюга і легкого капа-ланцюга IgG1 людини в експресуючих векторах ссавців. Альтернативно використовують експресуючий вектор Ig людини, такий як TCAE 5.3, який містить гени константної ділянки важкого ланцюга і легкого капа-ланцюга IgG1 людини в одній плазміді (Preston et al., 1998, *Infection & Immunity* 66:4137-42). Експресуючі вектори, кодуєчі химерні важкий і легкий ланцюги, котрансфікують в клітини яєчника китайського хом'яка (CHO) для продукування химерного антитіла. Імунореактивність і афінність химерних антитіл порівнюють з вихідними мишачими антитілами за допомогою аналізів ELISA і FACS.

#### Гуманізовані антитіла

Оскільки лікування химерними антитілами часто є антигенним, викликаючим імунну реакцію людського антитіла проти химерного антитіла (НАСА), химерні антитіла проти нелігандзв'язуючої проксимальної ділянки мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1 можуть вимагати подальшої гуманізації. Для отримання гуманізованих антитіл методами рекомбінантних ДНК створюють три короткі гіперваріабельні послідовності або ділянки, що визначають комплементарність, (CDR) вищеописаних варіабельних доменів важкого і легкого ланцюгів химерного антитіла, які вводять в остовну ділянку варіабельного домену відповідно послідовностей важкого і легкого ланцюгів людини і потім клонують в експресуючий вектор ссавця для експресії в клітинах CHO. Імуногенність і афінність гуманізованих антитіл порівнюють з вихідними химерними антитілами за допомогою аналізів ELISA і FACS. Крім того, можна використовувати сайтнаправлений або високощільний мутагенез варіабельної ділянки для оптимізації специфічності, афінності і т.д. гуманізованого антитіла.

#### Приклад 2

Були створені гуманізовані антитіла проти проксимальної ділянки мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1 людини. Варіабельні домени мишачого моноклонального антитіла 52M51 були виділені і секвеновані з лінії клітин гібридами за допомогою виродженої ПЦР в основному відповідно до опису, приведеного в публікаціях Larrick J.M., et al., 1989, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 160:1250 і Jones, S.T. & Bendig, M.M., 1991, *Bio/Technology* 9:88. Остовні ділянки варіабельної ділянки важкого і легкого ланцюгів людини, мабуть, подібні в структурному відношенні амінокислотним послідовностям вихідного антитіла 52M51, були визнані як еталонні остовні ділянки людини при створенні нових синтетичних остовних ділянок. Для ідентифікації остовних ділянок людини, що володіють схожістю з остовними ділянками мишачого антитіла 52M51, прогнозовані білкові послідовності, кодовані  $V_H$  і  $V_L$  варіабельними доменами мишачого антитіла 52M51, порівнюють з послідовностями людського антитіла, кодованими експресованою кДНК людини, шляхом пошуку за допомогою програми BLAST людської послідовності, депонованої в GenBank. Експресовані послідовності кДНК людини (наприклад, під номерами DA975021, DB242412 в GenBank) і гаметичні  $V_H$  домени (наприклад, IGHV1-24) були відібрані за допомогою вказаного методу для подальшого аналізу в процесі створення остовних ділянок важкого ланцюга. Аналогічним чином експресовані послідовності кДНК людини (наприклад, під номерами CD709370, CD707373 в Genbank) і гаметичні  $V_L$  домени (наприклад, IGLV7-46, IGLV8-61) були використані при створенні остовних ділянок легкого ланцюга.

Було досліджено значення відмінностей амінокислот між важкими ланцюгами гуманізованої остовної ділянки-кандидата і варіабельним доменом важкого ланцюга і варіабельними доменами легкого ланцюга мишачого моноклонального антитіла 52M51, після чого було вирішено, що кожна відмінність в положенні сприяє правильному укладанню ланцюга і функціонуванню варіабельного домену. Вказаний аналіз супроводився дослідженням розчинених кристалічних структур інших фрагментів антитіла (наприклад, структури Fab 2E8, описаної в публікації Trakhanov et al., *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 1999, 55:122-28, а також кристалічних структур інших білків (наприклад, структури білків 1ADQ і 1GIG в банку даних)). Структури були змодельовані за допомогою програмного забезпечення, включаючого Jmol, швидкий PDB і Rymol. В увагу було взято можливий вплив амінокислоти в даному положенні на упаковку остовної ділянки з  $\beta$ -укладанням, взаємодія між варіабельними доменами важкого і легкого ланцюгів, міра дії розчинника на бічні ланцюги амінокислоти і вірогідність того, що амінокислота впливатиме на положення петель CDR. В результаті виконаного аналізу було виявлено і хімічно синтезовано дев'ять ланцюгів-кандидатів  $V_H$  ділянки, злитих в рамці з константною ділянкою IgG2 людини, і вісім ланцюгів-кандидатів  $V_L$  ділянки, злитих в рамці з C1 константною ділянкою IgL людини. Важкі ланцюги-кандидати включають: i) синтетичну остовну ділянку, створену подібно до природних остовних ділянок людини, і ii) CDR-ділянки вихідного мишачого антитіла 52M51.

Функціональність кожного варіанту-кандидата гуманізованого важкого і легкого ланцюга досліджували шляхом котрансфекції в клітині ссавців. Кожен з дев'яти вищеописаних важких

ланцюгів-кандидатів гуманізованого антитіла 52M51 котрансфікували в клітини НЕК 293 з кДНК легкого ланцюга мишачого антитіла 52M51 і аналізували кондиціоноване середовище за допомогою аналізу ELISA відносно активності зв'язування Notch1. Був відібраний варіант важкого ланцюга антитіла 52M51, що характеризується найбільш стійким зв'язуванням. Даний варіант "52M51-H4" (SEQ ID NO:22) містить, окрім мишачих CDR-ділянок, зміни в 3 положеннях Vh-ділянки остовної ділянки, положення Кабата 20, 48 і 71, в порівнянні з типовою остовною ділянкою людини (наприклад, IGHV1-24). Гуманізований важкий ланцюг 52M51-H4 потім котрансфікували в клітини НЕК 293 з кожним з восьми гуманізованих легких ланцюгів-кандидатів і кондиціоноване середовище знов аналізували відносно зв'язування антигену методом ELISA. Для подальшого дослідження були вибрані два варіанти легкого ланцюга "2M51 L3" (SEQ ID NO:26) і "52M51 L4" (SEQ ID NO:30), які, як було встановлено, характеризуються кращим зв'язуванням в порівнянні з іншими кандидатами. Варіант 52M51-L3 містить, окрім мишачих CDR-ділянок, зміну в 1 положенні остовної ділянки в положенні 49 Кабата в порівнянні з типовою остовною ділянкою людини (наприклад, IGLV7-46). Було створено два гуманізованих варіантних антитіла, 52M51H4L3 і 52M51H4L4. Антитіло 52M51H4L3 кодовано ДНК, депонованою в ATCC згідно з положеннями Будапештського договору 15 жовтня 2008 р. під номером РТА-9549.

Афінність до рецептора Notch1 людини і миші визначали в пристрої Biacore 2000. Реконбінантні білки Notch1 людини і миші імобілізували на чіпі CM5 стандартними хімічними методами на основі аміну (NHS/EDC). Антитіло в різних концентраціях наносили на поверхні білка і протягом певного часу реєстрували кінетичні дані. Дані корелювали, використовуючи спільне глобальне емпіричне рівняння для отримання констант дисоціації ( $K_d$ , нМ) для кожного рецептора Notch1 (таблиця 2).

Таблиця 2

Константи дисоціації IgG ( $K_d$ )

Антитіло	Рецептор Notch1 людини (нМ)	Рецептор Notch1 миші (нМ)
52M51	2,86	Не зв'язується
52M51H4L3	4,33	Не зв'язується
52M51H4L4	7,35	Не зв'язується

#### Приклад 3

##### Передача сигналу рецептора Notch

У певних варіантах здійснення винаходу визначали здатність антитіл проти рецептора Notch1 блокувати опосередковану лігандом передачу сигналу рецептора Notch. У певних варіантах здійснення винаходу клітини HeLa, створені з можливістю надекспресії рецептора Notch1 (Notch1-Hela), які культивували в середовищі DMEM, що містить антибіотики і 10 % FCS, котрансфікували 1) люциферазою світляка pGL4 8X CBS, що містить реагуючий на Notch промотор вгорі від гена-репортера люциферази, для виміру рівнів сигналу Notch у відповідь на дію ліганду DLL4; і 2) репортерною люциферазою Renilla (Promega; Madison, WI) як внутрішній контроль ефективності трансфекції. Трансфіковані клітини поміщали на культуральні планшети, сенсibilізовані протягом ночі 200 нг/лунку білка hDLL4-fc, після чого в культуральне середовище додавали антитіла до рецептора Notch1. Рівні люциферази вимірювали через сорок вісім годин після трансфекції, використовуючи подвійний набір для аналізу люциферази (Promega; Madison, WI), при цьому активність люциферази світляка нормалізували до активності люциферази Renilla. Таким чином визначали здатність антитіл інгібувати активацію сигнального шляху Notch1. Антитіла 52M51, 52M63, 52M74 і 52M80, створені проти проксимальної ділянки мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1 людини (фиг.1А), значно зменшували активність люциферази, що свідчило про нижчу передачу сигналу рецептора Notch1, в порівнянні з іншими антитілами проти рецептора Notch1 (фиг.1В). Крім того, гуманізований варіант антитіла 52M51, варіант 52M51 H4/I3, зменшував активність люциферази з такою ж ефективністю (фиг.1С).

##### Активация рецептора Notch і утворення внутріклітинного домену (ICD)

В результаті розщеплювання рецепторів Notch фурином, ADAM і гама-секретазою утворюється внутріклітинний домен (ICD) рецептора Notch, який запускає передачу сигналу з нижньої ділянки рецептора Notch в ядро. У певних варіантах здійснення винаходу здатність антитіл проти рецептора Notch1 блокувати опосередковану лігандом активацію рецептора

визначали за допомогою аналізу методом вестерн-блотингу. Клітини Notch1-Hela вирощували в суспензійній культурі в середовищі 293-SMII (Gibco). Культивовані клітини переносили на 96-лункові планшети, на яких вибрані лунки були заздалегідь сенсibilізовані злитим білком DLL4-fc людини (2 мкг/мл) в середовищі DMEM, що містить 2 % FBS і 1 мкМ MG132 (Calbiochem). У культуральне середовище додавали антитіла, створені проти проксимальної ділянки мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1 людини, і клітини інкубували при 37°C протягом п'яти годин. Потім вміст лунок відсмоктували, і клітини повторно суспендували в 2-кратній кількості робочого буфера, що містить SDS. Зразки обробляли ультразвуком при кімнатній температурі, аналізували методом SDS-PAGE і вестерн-блотингу, використовуючи антитіло, специфічне до розщепленого ICD рецептора Notch1 відповідно до рекомендацій виробника (Cell Signaling Technology). Антитіло 52M51 і антитіла 52M63, 52M74 і 52M80 істотно інгібували утворення ICD після стимуляції лігандом (фиг.1D).

#### Приклад 4

Запобігання зростанню пухлини *in vivo* за допомогою антитіл проти нелігандзв'язуючої ділянки рецептора Notch

Пухлинні клітини із зразка суб'єкта, перенесені у вигляді ксенотрансплантатів мишам, використовували для ін'єкції піддослідним тваринам. Пухлини, отримані в компанії OncoMed Pharmaceuticals раніше описаними методами (див. публікації Al-Hajj et al., 2003; Dalerba et al., 2007), включали: UM-PE13 і T3 (клітини рака молочної залози), Омп-с9, Омп-с8, Омп-с6 і Colo-205 (клітини пухлини ободової кишки) і Омп-рп4 (клітини рака підшлункової залози). Пухлинну тканину видаляли в стерильних умовах, розрізали на дрібні шматочки, повністю подрібнювали стерильними лезами і отримували зависи окремих клітин шляхом ферментативного розщеплювання і механічного руйнування. Отримані шматочки пухлини змішували з ультрарозривною колагеназою III в культуральному середовищі (200-250 одиниць колагенази на мл) і інкубували при 37°C протягом 3-4 годин, піпетуючи вгору і вниз за допомогою 10 мл піпетки кожні 15-20 хвилин. Розщеплені клітини фільтрували через 45 мкл нейлонове сито, промивали RPMI/20 % FBS і двічі промивали HBSS. Дисоційовані пухлинні клітини підшкірно ін'єктували мишам NOD/SCID у віці 6-8 тижнів, щоб викликати зростання пухлини. Клітини пухлини молочної залози UM-PE13 і T3 в кількості 50000 клітин в 100 мкл ін'єктували в жирове тіло правої молочної залози (n=20) разом з імплантацією гранули естрогену. Клітини пухлини ободової кишки Омп-с9 в кількості 50000 клітин в 100 мкл ін'єктували в ділянку правого боку (n=20). Клітини пухлини ободової кишки Омп-с8 в кількості 10000 клітин в 100 мкл ін'єктували в ділянку правого боку (n=10). Клітини пухлини ободової кишки Омп-с6 в кількості 10000 клітин в 100 мкл ін'єктували в ділянку правого боку (n=10). Всі пухлинні клітини ін'єктували в суміші з PBS (без магнію або кальцію) і матригелем BD (BD Biosciences) відносно 1:1.

Через три дні після введення пухлинних клітин починали вводити антитіло. Кожній тварині внутрішньочеревно (i.p.) вводили 10 мг/кг антитіл проти Notch1 або PBS як контрольну речовину двічі на тиждень на протязі загалом 6-8 тижнів. Тваринам, яким були введені клітини Pe13, робили ін'єкції в жирове тіло верхньої правої молочної залози окрім ін'єкцій гранул естрогену. Тваринам, яким були введені клітини C9, C8 або C6, робили ін'єкції в правий нижній сектор живота. Об'єм пухлини визначали двічі на тиждень.

У певних варіантах здійснення винаходу антитіла проти проксимальної ділянки мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1 людини досліджували відносно дії на утворення пухлин молочної залози. Клітини пухлини молочної залози Pe13 (50000 клітин/одну ін'єкцію) імплантували підшкірно в жирове тіло молочної залози. Через два дні після імплантації клітин тваринам внутрішньочеревно вводили контрольне антитіло або антитіла 52M, такі як 52M1, 52M2 і 52M8 (які не володіли здатністю інгібувати передачу сигналу Notch, див. фиг.1B), в дозі 10 мг/кг двічі на тиждень. Введення антитіл, не інгібуючих Notch1, не надавало дії на зростання пухлини в порівнянні з тваринами, яким вводили контрольне антитіло (фиг.2C і 2D). У певних варіантах здійснення винаходу тваринам, яким були ін'єктовані клітини пухлини молочної залози Pe13, внутрішньочеревно вводили контрольне антитіло або антитіло 52M51 в дозі 10 мг/кг двічі на тиждень. Об'єм пухлини вимірювали двічі на тиждень і визначали дію антитіла 52M51 на зростання пухлини молочної залози.

У альтернативних варіантах здійснення винаходу дисоційовані пухлинні клітини спочатку сортували на онкогенні і неонкогенні клітини на основі маркерів на поверхні клітин і потім ін'єктували піддослідним тваринам. Пухлинні клітини, дисоційовані відповідно до приведенного вище опису, двічі промивали фізіологічним розчином з буфером HEPES (HBSS), що містить 2 % термоінактивованої телячої сироватки (HICS), і ресуспендували в кількості  $10^6$  клітин на 100 мкл. Додавали антитіла і клітини інкубували протягом 20 хвилин на льоду, після чого двічі промивали HBSS/2 % HICS. Були використані антитіла проти ESA (Biomed, Foster City, CA),

проти CD44, проти CD24 і маркерів лінії диференціювання CD2, CD3, CD10, CD16, CD18, CD31, CD64 і CD140b (збирально визначуваних як Lin; PharMingen, San Jose, CA). Антитіла кон'югували з фторохромами для позитивного або негативного відбору клітин, експресуючих вказані маркери. Мишачі клітини видаляли, здійснюючи відбір проти H2kd+ клітин, і мертві клітини видаляли, використовуючи фарбник для визначення життєздатності клітин 7AAD. Проточну цитометрію виконували в пристрої FACS Vantage (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Профілі бічного і прямого розсіювання використовували для видалення скупчень клітин. Виділені ESA+, CD44+, CD24-/low, Lin- онкогенні клітини потім підшкірно ін'єктували мишам NOD/SCID, щоб викликати зростання пухлини.

#### Приклад 5

Лікування пухлин in vivo за допомогою антитіл проти рецептора Notch1

Пухлинні клітини із зразка суб'єкта (біопсійна тканина солідної пухлини або плевральний випіт), перенесені у вигляді ксенотрансплантатів мишам, були отримані для повторного перенесення піддослідним тваринам. Пухлинну тканину видаляли в стерильних умовах, розрізали на дрібні шматочки, повністю подрібнювали стерильними лезами і отримували зависи окремих клітин шляхом ферментативного розщеплювання і механічного руйнування. Дисоційовані пухлинні клітини потім підшкірно ін'єктували мишам NOD/SCID в жирове тіло молочної залози в разі пухлин молочної залози або в бік в разі інших пухлин, щоб викликати зростання пухлини. У певних варіантах здійснення винаходу виділяли, як було детально описано вище, і ін'єктували ESA+, CD44+, CD24-/low, Lin- онкогенні клітини.

У певних варіантах здійснення винаходу тільки що виділені клітини пухлини ободової кишки C8 (225 клітин/тварину) підшкірно імплантували мишам NOD/SCID. Після ін'єкції пухлинних клітин у тварин контролювали зростання пухлини. Пухлини вирощували протягом 48 днів до досягнення середнього об'єму, рівного приблизно 210 мм<sup>3</sup>, після чого тварин довільно розподіляли в дві групи (n=10 в групі). Тваринам внутрішньочеревно вводили контрольне антитіло або антитіло, що зв'язується з проксимальною ділянкою мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1 людини, 52M51, (10 мг/кг) двічі на тиждень. Об'єм пухлини вимірювали на 55-й, 57-й і 62-й день. У тварин, яким вводили антитіло 52M51, було відмічено статистично значиме (p=0,0006) інгібування зростання пухлини в порівнянні з тваринами, яким вводили контрольне антитіло (фіг.2A і 2B).

В кінці введення антитіла пухлини збирають для подальшого аналізу. У деяких варіантах здійснення винаходу частину пухлини аналізують імуофлуоресцентним методом для визначення проникнення антитіла в пухлину і реакції пухлини. Частина кожної пухлини, отриманої у мишей, яким вводили антитіло проти рецептора Notch1 і контрольне антитіло, швидко заморожують в рідкому азоті, занурюють в О.С.Т і розрізають на криостаті у вигляді 10 мкм зрізів для предметних стекол. Альтернативно частину кожної пухлини фіксують у формаліні, заливають парафіном і розрізають на мікротомі у вигляді 10 мкм зрізів для предметних стекол. Зрізи повторно фіксують і інкубують з антитілами, міченими хромофором, які специфічно розпізнають ін'єктовані антитіла, з метою виявлення антитіл проти рецептора Notch1 або контрольних антитіл, присутніх в біопсійній тканині. Крім того, антитіла, які дозволяють виявити різні пухлинні клітини і рекрутовані пухлиною клітини, такі як, наприклад, антитіла проти кадгерину VE (CD144) або антитіла проти PECAM-1 (CD31), можна використовувати для виявлення ендотеліальних клітин судин, антитіла проти альфа-актина гладких м'язів можна використовувати для виявлення гладком'язових клітин судин, антитіла проти Ki67 можна використовувати для виявлення проліферуючих клітин, аналізи TUNEL можна використовувати для виявлення вмираючих клітин і антитіла проти внутріклітинного домену (ICD) фрагменту рецептора Notch можна використовувати для виявлення передачі сигналу Notch з метою оцінки дії лікування антитілами на розвиток кровоносних судин, зростання пухлини і морфологію пухлини.

Визначають також дію антитіла проти рецептора Notch1 на експресію гена пухлинної клітини. Повну РНК екстрагують з частини кожної пухлини, отриманої у мишей, яким вводили антитіло проти Notch1 і контрольне антитіло, і використовують для виконання кількісного аналізу методом ПЦР із зворотною транскрипцією (RT-ПЦР). Рівні експресії Notch1, компонентів сигнального шляху Notch, а також раніше ідентифікованих маркерів ракових стоволових клітин, наприклад, CD44, аналізують відносно обов'язкового гена GAPDH як внутрішній контроль. Таким чином визначають зміни експресії гена пухлинних клітин при введенні антитіла проти рецептора Notch1.

Крім того, визначають дію антитіла проти рецептора Notch1 на присутність ракових стоволових клітин в пухлині. Зразки пухлини, отримані у мишей, яким вводили антитіло проти рецептора Notch1 і контрольне антитіло, розрізають на дрібні шматочки, повністю подрібнюють

стерильними лезами і отримують зависи окремих клітин шляхом ферментативного розщеплювання і механічного руйнування. Дисоційовані пухлинні клітини потім аналізують за допомогою аналізу FACS на наявність онкогенних ракових стоволових клітин на основі експресії ESA+, CD44+, CD24-/low, Lin-маркерів на поверхні клітин, як було описано вище.

Потім можна визначити онкогенність клітин, виділених на основі експресії ESA+, CD44+, CD24-/low, Lin- маркерів після введення антитіла проти рецептора Notch1. 5000, 1000, 500 і 100 ESA+, CD44+, CD24-/low, Lin- ракових стоволових клітин, виділених у мишей, яким вводили антитіло проти рецептора Notch1, повторно підшкірно ін'єктують мишам NOD/SCID в жирове тіло молочної залози. Таким чином визначають онкогенність ракових стоволових клітин на основі числа ін'єктованих клітин, необхідних для співставного утворення пухлини.

На відміну від ефективності антитіла 52M51 in vivo, яке інгібує передачу сигналу Notch1, було виявлено, що у вищеописаній моделі ксенотрансплантату ободової кишки деякі інші антитіла, які розпізнають проксимальну ділянку мембрани рецептора Notch1, але не інгібують передачу сигналу Notch1, не надають протипухлинної дії in vivo в моделі ксенотрансплантату молочної залози. Антитіла 52M1, 52M2 і 52M8, які, як було встановлено, не інгібують передачу сигналу Notch (приклад 3 і фігура 1B), ін'єктували мишам NOD/SCID, яким раніше ін'єктували клітини пухлини молочної залози PE13. Всі антитіла 52M1, 52M2 і 52M8 не впливали на зростання пухлини в моделі ксенотрансплантату в порівнянні з тваринами, яким вводили контрольне антитіло (фігура 2C (52M1, 52M2) і фігура 2D (52M8)).

#### Приклад 6

Лікування рака у людини за допомогою антитіл проти рецептора Notch

У даному прикладі описані способи лікування рака за допомогою антитіл проти рецептора Notch шляхом направленої дії на пухлини, що включають ракові стоволові клітини та/або пухлинні клітини, в яких була виявлена експресія рецептора Notch.

Наявність експресії маркера ракових стоволових клітин можна спочатку визначити шляхом біопсії тканини. Пухлинні клітини, отримані з біопсійної тканини суб'єкта, в якого був діагностований рак, видаляють в стерильних умовах. У деяких варіантах здійснення винаходу біопсійну тканину відразу ж заморожують в рідкому азоті, занурюють в О.С.Т і розрізають на криостаті у вигляді 10 мкм зрізів для предметних стекол. Альтернативно біопсійну тканину фіксують у формаліні, заливають парафіном і розрізають на мікротомі у вигляді 10 мкм зрізів для предметних стекол. Зрізи інкубують з антитілами проти рецептора Notch для виявлення експресії білка. Крім того, можна визначити наявність ракових стоволових клітин. Зразки біопсійної тканини розрізають на дрібні шматочки, повністю подрібнюють стерильними лезами і піддають клітини ферментативному розщеплюванню і механічному руйнуванню для отримання зависи окремих клітин. Дисоційовані пухлинні клітини потім інкубують з антитілами проти ESA, CD44, CD24, Lin і рецептора Notch1, щоб виявити ракові стоволові клітини, і наявність ESA+, CD44+, CD24-/low, Lin-, Notch+ пухлинних стоволових клітин визначають за допомогою проточної цитометрії, детально описаної вище.

Хворих раком, в яких діагностовані пухлини, експресуючі рецептори Notch, лікують антитілами проти рецептора Notch. Гуманізовані або людські моноклональні антитіла проти рецептора Notch, отримані відповідно до приведеного вище опису, очищають і об'єднують з фармацевтично прийнятним носієм в PBS для ін'єкцій. Суб'єктам вводять антитіла проти рецептора Notch один раз на тиждень протягом щонайменше 10 тижнів, але в певних випадках один раз на тиждень протягом щонайменше приблизно 14 тижнів. Антитіло вводять у фармацевтично ефективній дозі від близько 2 до близько 100 мг/мл і в певних випадках від близько 5 до близько 40 мг/мл. Антитіло можна вводити до, одночасно або після стандартних схем проведення променевої терапії або хіміотерапії з використанням одного або декількох хіміотерапевтичних засобів, таких як оксалиплатин, фторурацил, лейковорин або стрептозоцин. Стан здоров'я суб'єктів контролюють, щоб визначити протипухлинну реакцію, що викликається таким лікуванням, наприклад, що виражається в регресії пухлини, зменшенні випадків появи нових пухлин, слабкішій експресії пухлинного антигена, меншому числі ракових стоволових клітин, або за допомогою інших методів оцінки прогнозу розвитку захворювання.

#### Приклад 7

Додаткові дослідження лікування пухлин in vivo за допомогою антитіл проти рецептора Notch1

У одному варіанті здійснення винаходу клітини меланоми M2 (10000) підшкірно ін'єктували мишам NOD/SCID. Пухлини вирощували протягом 35 днів до досягнення об'єму, рівного приблизно 110 мм<sup>3</sup>. Мишей, що несуть пухлини, довільно розподіляли на дві групи (n=10) і вводили контрольне антитіло або антитіло проти рецептора Notch1 52R43. Антитіла вводили в дозі 10 мг/кг двічі на тиждень. Об'єми пухлин вимірювали у вказані дні. Як показано на фігурі 3A,

введення антитіла проти рецептора Notch1 52R43 викликало зменшення зростання пухлини в порівнянні з контрольною групою ( $p=0,02$ ).

У одному варіанті здійснення винаходу клітини пухлини легень Lu24 (30000) підшкірно ін'єктували мишам NOD/SCID. Пухлини вирощували протягом 35 днів до досягнення об'єму, рівного приблизно  $205 \text{ мм}^3$ . Мишей, що несуть пухлини, довільно розподіляли на дві групи ( $n=8$ ) і вводили контрольне антитіло або антитіло проти рецептора Notch1 52R43. Антитіла вводили в дозі 10 мг/кг двічі на тиждень. Об'єми пухлин вимірювали у вказані дні. Як показано на фігурі 3В, введення антитіла проти рецептора Notch1 52R43 викликало зменшення зростання пухлини в порівнянні з контрольною групою ( $p=0,04$ ).

У одному варіанті здійснення винаходу клітини пухлини підшлункової залози PN8 (50000) підшкірно ін'єктували мишам NOD/SCID. Пухлини вирощували протягом 27 днів до досягнення об'єму, рівного приблизно  $115 \text{ мм}^3$ . Мишей, що несуть пухлини, довільно розподіляли на дві групи ( $n=8$ ) і вводили контрольне антитіло або антитіло проти рецептора Notch1 52R43. Антитіла вводили в дозі 10 мг/кг двічі на тиждень. Об'єми пухлин вимірювали у вказані дні. Як показано на фігурі 3С, введення антитіла проти рецептора Notch1 52R43 викликало зменшення зростання пухлини в порівнянні з контрольною групою ( $p=0,005$ ).

У одному варіанті здійснення винаходу клітини пухлини молочної залози T1 (300000) підшкірно ін'єктували мишам NOD/SCID. Пухлини вирощували протягом 27 днів до досягнення об'єму, рівного приблизно  $130 \text{ мм}^3$ . Мишей, що несуть пухлини, довільно розподіляли на чотири групи ( $n=10$ ) і вводили контрольне антитіло, антитіло проти рецептора Notch1 52R43, таксол або комбінацію антитіла 52R43 і таксола. Антитіла вводили в дозі 15 мг/кг один раз на тиждень і таксол вводили в дозі 12 мг/кг один раз на тиждень. Об'єми пухлин вимірювали у вказані дні. Як показано на фігурі 3D, введення антитіла проти рецептора Notch1 52R43 викликало зменшення зростання пухлини в порівнянні з контрольною групою ( $p<0,0001$ ) і комбіноване введення викликало зменшення зростання пухлини в порівнянні з введенням одного таксола ( $p=0,001$ ).

Всі публікації і патенти, приведені в даному описі винаходу, включені в опис винаходу як посилання. Фахівцям в даній галузі мають бути очевидні різні модифікації і варіанти описаного способу і системи по даному винаходу, що не виходять за межі суті і об'єму винаходу. Не дивлячись на те, що даний винахід був описаний у зв'язку з конкретними варіантами здійснення, має бути зрозуміло, що заявлений винахід не повинен бути необґрунтовано обмежений такими конкретними варіантами здійснення. Дійсно в об'єм нижченаведеної формули винаходу входять різні модифікації описаних варіантів здійснення винаходу, очевидні фахівцям у відповідних галузях.



## ПОСЛІДОВНОСТІ

SEQ ID NO:1

5 Полінуклеотид, кодуючий амінокислоти 1427-1732 рецептора Notch1

[illegible]

SEQ ID NO:2

### Амінокислоти 1427-1732 рецептора Notch1

HILDYSFGGGAGRDI PPPLIEEACELPECQEDAGNKVCSLQCNNHACGWDGGDCSLNFND  
PWKNCTQSLQCWKYFSDGHCDSDCNSAGCLFDGFDCCRAEGQCNPLYDQYCKDHFSDGHC  
DQGCNSAECEWDGLDCAEHVPERLAAGTLVVVVLMPPQLRNSSFHFLRELSRVLHTNVV  
FKRDAHGQQMIFPYYGREEELRKHPIKRAAEGWAAPDALLGQVKASLLPGGSEGGRRRRE  
LDPMDVGRSIVYLEIDNRQCVQASSQCFQSATDVAAFLGALASLGSLNIPYKIEAVQSET  
VEPPPP

10      Послідовності мишачого антитіла 52M51

SEQ ID NO:3

Полінуклеотидна послідовність легкого ланцюга антитіла 52M51 (передбачувана сигнальна послідовність підкреслена)

ATGGCCTGGATTTCAC TTATACTCTCTCCTGGCTCTCAGCTCAGGGGCCATTTCCAG  
GCTGTTGTGACTCAGGAATCTGCACTCACCATCACCTGGTGAAACAGTCACACTCACT

TGTCGCTCAAGTACTGGGGCTGTTACAAGTAACTACGCCAACTGGGTCCAAGAAAA  
 CCTGATCATTTATTCACTGGTCTAATAGGTGGTACCAACAACCGAGCTCCAGGTGTTCTT  
 GCCAGATTCTCAGGCTCCCTGATTGGAGACAAGGCTGCCCTCACCATCACAGGGGCACAG  
 ACTGAGGATGAGGCAATATATTTCTGTGCTCTATGGTACAGCAACCACTGGGTGTTCTGGT  
 GGAGGAACCAAACTGACTGTCCTAGGCCAGCCCAAGTCTTCGCCATCAGTCACCCTGTTT  
 CCACCTTCTCTGAAGAGCTCGAGACTAACAAGGCCACACTGGTGTGTACGATCACTGAT  
 TTCTACCCAGGTGTGGTGACAGTGGACTGGAAGGTAGATGGTACCCCTGTCACTCAGGGT  
 ATGGAGACAACCCAGCCTTCCAAACAGAGCAACAACAAGTACATGGCTAGCAGCTACCTG  
 ACCCTGACAGCAAGAGCATGGGAAAGGCATAGCAGTTACAGCTGCCAGGTCACTCATGAA  
 GGTCACACTGTGGAGAAGAGTTTGTCCCGTGTGACTGTTCTAG

SEQ ID NO:4

Амінокислотна послідовність легкого ланцюга антитіла 52M51 (передбачувана сигнальна послідовність підкреслена)

MAWISLILSLLALSSGAISQAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEK  
 PDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNHWVFG  
 GGTKLTVLGQPKSSPSVTLFPPSSELETNKATLVCTITDFYPGVVTVDWKVDGTPVTQG  
 METTQPSKQSNKYMSSYLTLTARAWERHSSYSQVTHEGHTVEKSLSRADCS

5

SEQ ID NO:5

Полінуклеотидна послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга антитіла 52M51 (передбачувана сигнальна послідовність підкреслена)

ATGGCCTGGATTTCACTTATACTCTCTCTCCTGGCTCTCAGCTCAGGGGCCATTTCCAG  
 GCTGTTGTGACTCAGGAATCTGCACTCACCACATCACCTGGTGAACAGTCACACTCACT  
 TGTCGCTCAAGTACTGGGGCTGTTACAAGTAACTACGCCAACTGGGTCCAAGAAAA  
 CCTGATCATTTATTCACTGGTCTAATAGGTGGTACCAACAACCGAGCTCCAGGTGTTCTT  
 GCCAGATTCTCAGGCTCCCTGATTGGAGACAAGGCTGCCCTCACCATCACAGGGGCACAG  
 ACTGAGGATGAGGCAATATATTTCTGTGCTCTATGGTACAGCAACCACTGGGTGTTCTGGT  
 GGAGGAACCAAACTGACTGTCCTAGGC

10

SEQ ID NO:6

Амінокислотна послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга антитіла 52M51 (передбачувана сигнальна послідовність підкреслена)

MAWISLILSLLALSSGAISQAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEK  
 PDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNHWVFG  
 GGTKLTVLGQPKSSPSVTLFPPSSELETNKATLVCTITDFYPGVVTVDWKVDGTPVTQG

SEQ ID NO:7

15

Полінуклеотидна послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга антитіла 52M51 без передбачуваної сигнальної послідовності

CAGGCTGTTGTGACTCAGGAATCTGCACTCACCACATCACCTGGTGAACAGTCACACTC  
 ACTTGTCGCTCAAGTACTGGGGCTGTTACAAGTAACTACGCCAACTGGGTCCAAGAA  
 AACCTGATCATTTATTCACTGGTCTAATAGGTGGTACCAACAACCGAGCTCCAGGTGTT  
 CCTGCCAGATTCTCAGGCTCCCTGATTGGAGACAAGGCTGCCCTCACCATCACAGGGGCA  
 CAGACTGAGGATGAGGCAATATATTTCTGTGCTCTATGGTACAGCAACCACTGGGTGTTCT  
 GGTGGAGGAACCAAACTGACTGTCCTAGGC

SEQ ID NO:8

Амінокислотна послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга антитіла 52M51 без передбачуваної сигнальної послідовності

QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNNRAPGV

PARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNHWVFGGGTKLTVLG

5 SEQ ID NO:9

Полінуклеотидна послідовність важкого ланцюга антитіла 52M51 (передбачувана сигнальна послідовність підкреслена)

ATGGAATGGACCTGGGTCTTTCTCTTCCTCCTGTCAGTAACTGCAGGTGTCCACTCCCAG

GTTTCAGCTGCAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGATGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGATATCC

TGCAAGGCTGCTGGCTACACAATGAGAGGCTACTGGATAGAGTGGATAAAGCAGAGGCCT

GGACATGGCCTTGAGTGGATTGGACAGATTTTACCTGGAAGTGGGAGAACTAACTACAAT

GAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTCAGTGCAGATACATCCTCCAACACAGCCAACATG

CAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCCGTCTATTACTGTGCAAGATTTGATGGT

AACTACGGTTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGATCCTCAGTCACCGTCTCCTCA

GCCAAAACGACACCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCCCTGGATCTGCTGCCCAAACATAAC

TCCATGGTGACCCCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACC

TGGAAGTCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCCTGCAGTCTGAC

CTCTACACTCTGAGCAGCTCAGTGACTGTCCCCTCCAGCCCTCGGCCCAGCGAGACCGTC

ACCTGCAACGTTGCCACCCCGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGTGCCCAGG

GATTGTGGTTGTAAGCCTTGCAATATGTACAGTCCCAGAAGTATCATCTGTCTTCATCTTC

CCCCCAAAGCCCAAGGATGTCTCACCATTACTCTGACTCCTAAGGTCACGTGTGTTGTG

GTAGACATCAGCAAGGATGATCCCGAGGTCCAGTTCAGCTGGTTTGTAGATGATGTGGAG

GTGCACACAGCTCAGACGCAACCCCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACTTTCCGCTCAGTC

AGTGAACTTCCCATCATGCACCAGGACTGGCTCAATGGCAAGGAGTTCAAATGCAGGGTC

AACAGTGCAGCTTTCCTGCCCCCATCGAGAAAACCATATCCAAAACCAAAGGCAGACCG

AAGGCTCCACAGGTGTACACCATTCACCTCCCAAGGAGCAGATGGCCAAGGATAAAGTC

AGTCTGACCTGCATGATAACAGACTTCTTCCCTGAAGACATAACAGTGGAGTGGCAGTGG

AATGGGCAGCCAGCGGAGAACTACAAGAACACTCAGCCCATCATGAACACGAATGGCTCT

TACTTCGTCTACAGCAAGCTCAATGTGCAGAAGAGCAACTGGGAGGCAGGAAATACTTTC

ACCTGCTCTGTGTTACATGAGGGCCTGCACAACCACCATACTGAGAAGAGCCTCTCCAC

TCTCCTGGTAAATGA

10

## SEQ ID NO:10

Амінокислотна послідовність важкого ланцюга антитіла 52M51 (передбачувана сигнальна послідовність підкреслена)

MEWTWVFLFLLSVTAGVHSQVQLQQSGAELMKPGASVKISCKAAGYTMRGYWIEWIKQRP  
 GHGLEWIGQILPGTGRTNYNEKFKGKATFTADTSSNTANMQLSSLTSEDSAVYYCARFDG  
 NYGYAMDYWGQGSSVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVT  
 WNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSPRPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPR  
 DCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITITLTPKVTCTVVDISKDDPEVQFSWFVDDVE  
 VHQAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRP  
 KAPQVYTI PPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMNNTNGS  
 YFVYSKLVNQSKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHTEKSLSHSPGK

5

## SEQ ID NO:11

Полінуклеотидна послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга антитіла 52M51 (передбачувана сигнальна послідовність підкреслена)

ATGGAATGGACCTGGGTCTTTCTCTTCCTCCTGTGAGTAAGTGCAGGTGTCCACTCCAG  
 GTTCAGCTGCAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGATGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGATATCC  
 TGCAAGGCTGCTGGCTACACAATGAGAGGCTACTGGATAGAGTGGATAAAGCAGAGGCCT  
 GGACATGGCCTTGAGTGGATTGGACAGATTTTACCTGGAAGTGGGAGAACTAACTACAAT  
 GAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTCAGTGCAGATACATCCTCCAACACAGCCAACATG  
 CAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCCGTCTATTACTGTGCAAGATTTGATGGT  
 AACTACGGTTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGATCCTCAGTCACCGTCTCCTCA

10

## SEQ ID NO:12

Амінокислотна послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга антитіла 52M51 (передбачувана сигнальна послідовність підкреслена)

MEWTWVFLFLLSVTAGVHSQVQLQQSGAELMKPGASVKISCKAAGYTMRGYWIEWIKQRP  
 GHGLEWIGQILPGTGRTNYNEKFKGKATFTADTSSNTANMQLSSLTSEDSAVYYCARFDG  
 NYGYAMDYWGQGSSVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVT

## SEQ ID NO:13

15

Полінуклеотидна послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга антитіла 52M51 без передбачуваної сигнальної послідовності

CAGGTTCAAGCTGCAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGATGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGATA  
 TCCTGCAAGGCTGCTGGCTACACAATGAGAGGCTACTGGATAGAGTGGATAAAGCAGAGG  
 CCTGGACATGGCCTTGAGTGGATTGGACAGATTTTACCTGGAAGTGGGAGAACTAACTAC  
 AATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTCAGTGCAGATACATCCTCCAACACAGCCAAC  
 ATGCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCCGTCTATTACTGTGCAAGATTTGAT  
 GGTAACACGGTTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGATCCTCAGTCACCGTCTCC  
 TCA

## SEQ ID NO:14

20

Амінокислотна послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга антитіла 52M51 без передбачуваної сигнальної послідовності

QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKAAGYTMRGYWIEWIKQRP  
 GHGLEWIGQILPGTGRTNY  
 NEKFKGKATFTADTSSNTANMQLSSLTSEDSAVYYCARFDG  
 NYGYAMDYWGQGSSVTVS  
 SA

SEQ ID NO:15  
 CDR1 важкого ланцюга антитіла 52M51  
 RGYWIE

5 SEQ ID NO:16  
 CDR2 важкого ланцюга антитіла 52M51  
 QILPGTGRTNYNEKFKG

SEQ ID NO:17  
 CDR3 важкого ланцюга антитіла 52M51  
 FDGNYGYAMDY

10 SEQ ID NO:18  
 CDR1 легкого ланцюга антитіла 52M51  
 RSSTGAVTTSNYAN

SEQ ID NO:19  
 CDR2 легкого ланцюга антитіла 52M51

15 GTNNRAP

SEQ ID NO:20  
 CDR3 легкого ланцюга антитіла 52M51  
 ALWYSNHWVFGGGTKL

Послідовності гуманізованого антитіла 52M51

20 SEQ ID NO:21  
 Полінуклеотидна послідовність важкого ланцюга варіанту 52M51-H4 (передбачувана  
 сигнальна послідовність підкреслена)

ATGGATTGGACATGGAGGGTGTTCCTGCCTCCTCGCTGTGGCTCCTGGAGTCCTGAGCCAG  
 GTCCAGCTCGTCCAGAGCGGGGCTGAAGTCAAGAAGCCTGGCGCTAGCGTCAAAATCAGC  
 TGTAAGGTCAGCGGATACACACTGAGGGGATACTGGATCGAGTGGGTGAGGCAGGCTCCA  
 GGAAAGGGCCTGGAATGGATCGGCCAGATCCTGCCTGGAACCGGAAGGACAAATTACAAT  
 GAGAAGTTTAAGGGAAGGGTCACAATGACAGCAGACACAAGCACAGACACAGCTTATATG  
 GAACTCAGCTCCCTCAGATCCGAGGACACCGCTGTCTACTATTGTGCCAGGTTTCGATGGA  
 AATTACGGATACTATGCCATGGATTACTGGGGACAGGGGACAACGGTCACCGTGAGCTCA  
 GCCAGCACAAAGGGGCCCTAGCGTCTTCCCTCTGGCTCCCTGCAGCAGGAGCACCAGCGAG  
 AGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTG  
 TGGAACTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCAGCTGTCTTACAGTCTCTCA  
 GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACC  
 TACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGC  
 AAATGTTGTGTGCGAGTGCCACCGTGCCAGCACCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTC  
 CTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACAGTGC  
 GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC  
 GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGT  
 GTGGTCAGCGTCTCACCCTTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGC  
 AAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAGGG  
 CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAAC  
 CAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG  
 GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGAC  
 GGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC  
 GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTC  
 TCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

SEQ ID NO:22

Амінокислотна послідовність важкого ланцюга варіанту 52M51-H4 (передбачувана сигнальна послідовність підкреслена)

MDWTWRVFCLLAVAPGVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKVSGYTLRGYWIEWVRQAP  
 GKGLEWIGQILPGTGRITNYNEKFKGRVTMTADTSTDYAYMELSSLRSEDYVYYCARFDG  
 NYGYYAMDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS  
 WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYTCNVDPHKPSNTKVDKTVR  
 KCCVECPPEPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDG  
 VEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKG  
 QPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSD  
 GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

5

SEQ ID NO:23

Амінокислотна послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга варіанту 52M51-H4 (передбачувана сигнальна послідовність підкреслена)

MDWTWRVFCLLAVAPGVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKVSGYTLRGYWIEWVRQAP  
 GKGLEWIGQILPGTGRTNYNEKFVKGRVTMTADTSTDYAYMELSSLRSEDYAVYYCARFDG  
 NYGYYAMDYWGQGTTVTVSSA

SEQ ID NO:24

Амінокислотна послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга варіанту 52M51-H4 без передбачуваної сигнальної послідовності

QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKVSGYTLRGYWIEWVRQAPGKGLEWIGQILPGTGRTNY  
 NEKFVKGRVTMTADTSTDYAYMELSSLRSEDYAVYYCARFDGNYGYYAMDYWGQGTTVTVS

5

SA

SEQ ID NO:25

Полінуклеотидна послідовність легкого ланцюга варіанту 52M51-L3 (передбачувана сигнальна послідовність підкреслена)

ATGAGCGTCCCTACAATGGCTTGGATGATGCTCCTGCTGGGACTCCTGGCTTATGGAAGC  
 GGAGTGGATAGCCAGGCCGTCGTCACACAGGAACCTAGCCTCACCCTTAGCCCTGGAGGA  
 ACAGTCACACTGACCTGTAGGAGCTCCACAGGAGCTGTGACAACAAGCAATTACGCTAAC  
 TGGTTCACAGCAGAAGCCCGGTCAAGCCCCTAGAACCCTCATCGGCGGCACCAATAACAGA  
 GCTCCCGGAGTCCCCGCCAGGTTCTCCGGCTCCCTCCTGGGTGGCAAGGCTGCTCTGACA  
 CTCAGCGGTGCCAGCCAGAGGATGAAGCGGAGTACTACTGTGCACTGTGGTACAGCAAC  
 CATTTGGGTTTTTCGGAGGCGGAACAAAGTTAACCGTCTCGGGCAGCCTAAGGCTGCTCCT  
 AGCGTCACACTGTTCCCCCATCTAGCGAGGAGCTGCAGGCTAACAAGGCAACCCTCGTC  
 TGCCTGGTTAGCGACTTCTACCCTGGCGCTGTCACAGTGGCCTGGAAAGCTGACGGCTCC  
 CCTGTGAAAGTTGGCGTCGAAACCACAAAGCCTTCTAAGCAGAGCAATAATAAATATGCC  
 GCAAGCTCCTACCTCTCCCTGACTCCTGAGCAGTGGAAAAGCCATAGGAGCTACTCCTGC  
 CGGGTCACACACGAAGGAAGCACAGTGGAAAAGACAGTCGCCCCTGCTGAGTGTAGCTGA

10

SEQ ID NO:26

Амінокислотна послідовність легкого ланцюга варіанту 52M51-L3 (передбачувана сигнальна послідовність підкреслена)

MSVPTMAWMMLLLGLLAYGSGVDSQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYAN  
 WFQQKPGQAPRTLIGGTNNRAPGVPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSN  
 HWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLVSDFYPGAFTVAWKADGS  
 PVKVGVEETTKPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCRVTHEGSTVEKTVAPAECS

SEQ ID NO:27

15

Амінокислотна послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга варіанту 52M51-L3 (передбачувана сигнальна послідовність підкреслена)

MSVPTMAWMMLLLGLLAYGSGVDSQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYAN  
 WFQQKPGQAPRTLIGGTNNRAPGVPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSN  
 HWVFGGGTKLTVLG

SEQ ID NO:28

20

Амінокислотна послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга варіанту 52M51-L3 без передбачуваної сигнальної послідовності

SGVDSQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWFQQKPGQAPRTLIGGTNN  
 RAPGVPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVLG

SEQ ID NO:29

Полінуклеотидна послідовність легкого ланцюга варіанту 52M51-L4 (передбачувана сигнальна послідовність підкреслена)

ATGAGCGTCCCTACAATGGCTTGGATGATGCTCCTGCTGGGACTCCTGGCTTATGGAAGC  
 GGAGTGGATAGCCAGACCGTCGTCACACAGGAACCTAGCTTTTCCGTTAGCCCTGGAGGA  
 ACAGTCACACTGACCTGTAGGAGCTCCACAGGAGCTGTGACAACAAGCAATTACGCTAAC  
 TGGTATCAGCAGACTCCCGGTCAAGCCCCCTAGAACCCTCATCGGCGGCACCAATAACAGA  
 GCTCCCGGAGTCCCCGACAGGTTCTCCGGCTCCATCCTGGGAAATAAAGCTGCTCTGACA  
 ATCACAGGTGCCCAGGCTGACGATGAAAGCGACTACTACTGTGCACTGTGGTACAGCAAC  
 CATTGGGTTTTTCGGAGGCGGAACAAAGTTAACCGTCCTCGGGCAGCCTAAGGCTGCTCCT  
 AGCGTCACACTGTTCCCCCATCTAGCGAGGAGCTGCAGGCTAACAAAGGCAACCCTCGTC  
 TGCCTGGTTAGCGACTTCTACCCTGGCGCTGTCACAGTGGCCTGGAAAGCTGACGGCTCC  
 CCTGTGAAAGTTGGCGTCGAAACCACAAAGCCTTCTAAGCAGAGCAATAATAATATGCC  
 GCAAGCTCCTACCTCTCCCTGACTCCTGAGCAGTGGAAAAGCCATAGGAGCTACTCCTGC  
 CGGGTCACACACGAAGGAAGCACAGTGGAAAAGACAGTCGCCCCTGCTGAGTGTAGCTGA  
 SEQ ID NO:30

Амінокислотна послідовність легкого ланцюга варіанту 52M51-L4 (передбачувана сигнальна послідовність підкреслена)

MSVPTMAWMMLLLGLLAYGSGVDSQTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYAN  
 WYQQTGQAPRTLIGGTNNRAPGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDES DYICALWYSN  
 HWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLVSDFYPGAVTVAWKADGS  
 PVKVGVEETKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCRVTHEGSTVEKTVAPAECS

5

SEQ ID NO:31

Амінокислотна послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга варіанту 52M51-L4 (передбачувана сигнальна послідовність підкреслена)

MSVPTMAWMMLLLGLLAYGSGVDSQTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYAN  
 WYQQTGQAPRTLIGGTNNRAPGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDES DYICALWYSN

10

HWVFGGGTKLTVLG

SEQ ID NO:32

Амінокислотна послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга варіанту 52M51-L4 без передбачуваної сигнальної послідовності

SGVDSQTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWYQQTGQAPRTLIGGTNN  
 RAPGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDES DYICALWYSNHWVFGGGTKLTVLG



## ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> ОНКОМЕД ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ІНК. (Oncomed Pharmaceuticals, Inc.)  
 ГЕРНІ Остін, Л. (GURNEY, Austin, L.)  
 ГЕУЙ Тімоті, Чарльз (HOEY, Timothy, Charles)  
 БРУНС Морін, Фітч (BRUHNS, Maureen, Fitch)  
 АКСЕЛЬБРОД Фуміко, Такада (AXELROD, Fumiko, Takada)

<120> Агенти, що зв'язуються з рецептором NOTCH1, і способи їх вживання

<130> 2293.049PC04

<140> PCT/US2009/003995  
 <141> 2009-07-08

<150> US 61/112,701  
 <151> 2008-11-07

<150> US 61/112,699  
 <151> 2008-11-07

<150> US 61/079,095  
 <151> 2008-07-08

<160> 32

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1  
 <211> 918  
 <212> ДНК  
 <213> Homo sapiens

<400> 1  
 cacatcctgg actacagctt cgggggtggg gccgggcgcg acatcccccc gccgctgata 60  
 gaggaggcgt gcgagctgcc cgagtgccag gaggacgcgg gcaacaaggt ctgcagcctg 120  
 cagtgcaaca accacgcgtg cggctgggac gccggtgact gctccctcaa cttcaatgac 180  
 ccctggaaga actgcacgca gtctctgcag tgctggaagt acttcagtga cggccactgt 240  
 gacagccagt gcaactcagc cggctgcctc ttgcagcgtt ttgactgccg gcgtgcggaa 300  
 ggccagtgca accccctgta cgaccagtag tgcaaggacc acttcagcga cgggcactgc 360  
 gaccagggct gcaacagcgc ggagtgcgag tgggacgggc tggactgtgc ggagcatgta 420  
 cccgagaggc tggcgcccg cagcctggtg gtggtggtgc tgatgccgcc ggagcagctg 480  
 cgcaacagct ccttccactt cctgcgggag ctgagccgcg tgctgcacac caacgtggtc 540  
 ttcaagcgtg acgcacacgc ccagcagatg atcttccctt actacggccg cgaggaggag 600  
 ctgcgcaagc accccatcaa gcgtgccgcc gagggtggg ccgcacctga cggcctgctg 660  
 ggccaggtga aggcctcgct gctccctggt gccagcgagg gtgggcggcg gcggagggag 720  
 ctggacccca tggacgtccg cggctccatc gtctacctgg agattgacaa ccggcagtgt 780  
 gtgcaggcct cctgcagtg cttccagagt gccaccgacg tggccgcatt cctgggagcg 840  
 ctgcctcgc tgggcagcct caacatcccc tacaagatcg aggccgtgca gaggtagacc 900

gtggagccgc cccgcgcg

918

<210> 2  
<211> 306  
<212> BIJOK  
<213> Homo sapiens

<400> 2

His Ile Leu Asp Tyr Ser Phe Gly Gly Gly Ala Gly Arg Asp Ile Pro  
1 5 10 15

Pro Pro Leu Ile Glu Glu Ala Cys Glu Leu Pro Glu Cys Gln Glu Asp  
20 25 30

Ala Gly Asn Lys Val Cys Ser Leu Gln Cys Asn Asn His Ala Cys Gly  
35 40 45

Trp Asp Gly Gly Asp Cys Ser Leu Asn Phe Asn Asp Pro Trp Lys Asn  
50 55 60

Cys Thr Gln Ser Leu Gln Cys Trp Lys Tyr Phe Ser Asp Gly His Cys  
65 70 75 80

Asp Ser Gln Cys Asn Ser Ala Gly Cys Leu Phe Asp Gly Phe Asp Cys  
85 90 95

Gln Arg Ala Glu Gly Gln Cys Asn Pro Leu Tyr Asp Gln Tyr Cys Lys  
100 105 110

Asp His Phe Ser Asp Gly His Cys Asp Gln Gly Cys Asn Ser Ala Glu  
115 120 125

Cys Glu Trp Asp Gly Leu Asp Cys Ala Glu His Val Pro Glu Arg Leu  
130 135 140

Ala Ala Gly Thr Leu Val Val Val Val Leu Met Pro Pro Glu Gln Leu  
145 150 155 160

Arg Asn Ser Ser Phe His Phe Leu Arg Glu Leu Ser Arg Val Leu His  
165 170 175

Thr Asn Val Val Phe Lys Arg Asp Ala His Gly Gln Gln Met Ile Phe  
180 185 190

Pro Tyr Tyr Gly Arg Glu Glu Glu Leu Arg Lys His Pro Ile Lys Arg  
195 200 205

Ala Ala Glu Gly Trp Ala Ala Pro Asp Ala Leu Leu Gly Gln Val Lys  
210 215 220

Ala Ser Leu Leu Pro Gly Gly Ser Glu Gly Gly Arg Arg Arg Arg Glu  
225 230 235 240

Leu Asp Pro Met Asp Val Arg Gly Ser Ile Val Tyr Leu Glu Ile Asp  
245 250 255

Asn Arg Gln Cys Val Gln Ala Ser Ser Gln Cys Phe Gln Ser Ala Thr  
260 265 270

Asp Val Ala Ala Phe Leu Gly Ala Leu Ala Ser Leu Gly Ser Leu Asn  
275 280 285

Ile Pro Tyr Lys Ile Glu Ala Val Gln Ser Glu Thr Val Glu Pro Pro  
290 295 300

Pro Pro  
305

<210> 3  
<211> 705  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Синтетичний легкий ланцюг антитіла 52M51

<400> 3  
atggcctgga tttaacttat actctctctc ctggctotca gctcaggggc catttcccag 60  
gctgttgtga ctcaaggaatc tgcactcacc acatcacctg gtgaaacagt cacactcact 120  
tgtcgctcaa gtactggggc tgttacaact agtaactacg ccaactgggt ccaagaaaaa 180  
cctgatcatt tattoactgg tctaataagt ggtaccaaca accgagctcc aggtgttcct 240  
gccagattct caggctccct gattggagac aaggctgccc tcaccatcac aggggcacag 300  
actgaggatg aggcaatata tttctgtgct ctatgtgtaca gcaaccactg ggtgttcggt 360  
ggaggaacca aactgactgt cctaggccag cccaagtctt cgccatcagt caccctgttt 420  
ccaccttct ctgaagagct cgagactaac aaggccacac tgggtgtgtac gatcactgat 480  
ttctaccag gtgtggtgac agtggactgg aaggtagatg gtaccctgt cactcagggt 540  
atggagacaa ccagccttc caaacagagc aacaacaagt acatggctag cagctacctg 600  
accctgacag caagagcatg ggaaaggcat agcagttaca gctgccaggt cactcatgaa 660  
ggtcacactg tggagaagag tttgtcccgt gctgactgtt cctag 705

<210> 4  
<211> 234  
<212> БІЛОК  
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний легкий ланцюг антитіла 52M51

<400> 4

Met Ala Trp Ile Ser Leu Ile Leu Ser Leu Leu Ala Leu Ser Ser Gly  
1 5 10 15

Ala Ile Ser Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser  
20 25 30

Pro Gly Glu Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val  
35 40 45

Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu  
50 55 60

Phe Thr Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val Pro  
65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile  
85 90 95

Thr Gly Ala Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp  
100 105 110

Tyr Ser Asn His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
115 120 125

Gly Gln Pro Lys Ser Ser Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser  
130 135 140

Glu Glu Leu Glu Thr Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Thr Ile Thr Asp  
145 150 155 160

Phe Tyr Pro Gly Val Val Thr Val Asp Trp Lys Val Asp Gly Thr Pro  
165 170 175

Val Thr Gln Gly Met Glu Thr Thr Gln Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn  
180 185 190

Lys Tyr Met Ala Ser Ser Tyr Leu Thr Leu Thr Ala Arg Ala Trp Glu  
195 200 205

Arg His Ser Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly His Thr Val  
210 215 220

Glu Lys Ser Leu Ser Arg Ala Asp Cys Ser

225

230

<210> 5  
<211> 387  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Синтетичний легкий ланцюг антитіла 52M51

<400> 5  
atggcctgga ttctacttat actctctctc ctggctctca gctcaggggc catttcccag 60  
gctgttgatga ctccaggaatc tgcactcacc acatcacctg gtgaaacagt cacactcact 120  
tgtcgctcaa gtactggggc tgttacaact agtaactacg ccaactgggt ccaagaaaaa 180  
cctgatcatt tattcactgg totaataggt ggtaccaaca accgagctcc aggtgttcct 240  
gccagattct caggtccct gattggagac aaggctgccc tcaccatcac aggggcacag 300  
actgaggatg aggcaatata ttctgtgct ctatggtaca gcaaccactg ggtgttcggt 360  
ggaggaacca aactgactgt cctaggc 387

<210> 6  
<211> 180  
<212> БІЛОК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Синтетичний легкий ланцюг антитіла 52M51

<400> 6  
Met Ala Trp Ile Ser Leu Ile Leu Ser Leu Leu Ala Leu Ser Ser Gly  
1 5 10 15  
Ala Ile Ser Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser  
20 25 30  
Pro Gly Glu Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val  
35 40 45  
Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu  
50 55 60  
Phe Thr Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val Pro  
65 70 75 80  
Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile  
85 90 95  
Thr Gly Ala Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp  
100 105 110

Tyr Ser Asn His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
115 120 125

Gly Gln Pro Lys Ser Ser Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser  
130 135 140

Glu Glu Leu Glu Thr Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Thr Ile Thr Asp  
145 150 155 160

Phe Tyr Pro Gly Val Val Thr Val Asp Trp Lys Val Asp Gly Thr Pro  
165 170 175

Val Thr Gln Gly  
180

<210> 7  
<211> 330  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Синтетичний легкий ланцюг антитіла 52M51

<400> 7  
caggctgttg tgactcagga atctgcactc accacatcac ctggtgaaac agtcacactc 60  
acttgtcgct caagtactgg ggctgttaca actagtaact acgccaactg ggtccaagaa 120  
aaacctgata atttattcac tggctctaata ggtgggtacca acaaccgagc tccaggtgtt 180  
cctgccagat tctcaggctc cctgattgga gacaaggctg cctcaccat cacaggggca 240  
cagactgagg atgaggcaat atatttctgt gctctatggt acagcaacca ctgggtgttc 300  
ggtggaggaa ccaaactgac tgcctaggc 330

<210> 8  
<211> 110  
<212> БІЛОК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Синтетичний легкий ланцюг антитіла 52M51

<400> 8

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

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

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly  
35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe  
50 55 60

Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala  
65 70 75 80

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

His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
100 105 110

<210> 9  
<211> 1395  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Синтетичний легкий ланцюг антитіла 52M51

<400> 9  
atggaatgga cctgggtctt tctcttctc ctgtcagtaa ctgcagggtg coactcccag 60  
gttcagctgc agcagctctg agctgagctg atgaagcctg gggcctcagt gaagatatcc 120  
tgcaaggctg ctggctacac aatgagaggc tactggatag agtggataaa gcagaggcct 180  
ggacatggcc ttgagtggat tggacagatt ttacctggaa ctgggagaac taactacaat 240  
gagaagttca agggcaaggc cacattcact gcagatacat cctccaacac agccaacatg 300  
caactcagca gcctgacatc tgaggactct gccgtctatt actgtgcaag atttgatggt 360  
aactacgggt actatgctat ggactactgg ggtcaaggat cctcagtcac cgtctcctca 420  
gccaaaacga ccccccatc tgtctatcca ctggcccctg gatctgctgc caaaactaac 480  
tccatggtga ccctgggatg cctgggtcaag ggctatttcc ctgagccagt gacagtgacc 540  
tggaactctg gatccctgtc cagcgggtg cagaccttcc cagctgtcct gcagtctgac 600  
ctctacactc tgagcagctc agtgactgtc ccctccagcc ctcgcccag cgagaccgtc 660  
acctgcaacg ttgcccaccc ggccagcagc accaagggtg acaagaaaat tgtgcccagg 720  
gattgtggtt gtaagccttg catatgtaca gtcccagaag tatcatctgt cttcatcttc 780  
ccccaaaagc ccaaggatgt cctcaccatt actctgactc ctaaggtcac gtgtgttggtg 840  
gtagacatca gcaaggatga tcccgaggtc cagttcagct ggtttgtaga tgatgtggag 900  
gtgcacacag ctgagacgca accccgggag gagcagttca acagcacttt ccgctcagtc 960  
agtgaacttc ccacatgca ccaggactgg ctcaatggca aggagttcaa atgcagggtc 1020  
aacagtgcag ctttccctgc ccccatcgag aaaaccatat ccaaaaccaa aggcagaccg 1080  
aaggctccac aggtgtacac cattccacct cccaaggagc agatggccaa ggataaagtc 1140

agtctgacct gcatgataac agacttcttc cctgaagaca taacagtgga gtggcagtgg 1200  
aatgggcagc cagcggagaa ctacaagaac actcagccca tcatgaacac gaatggctct 1260  
tacttcgtct acagcaagct caatgtgcag aagagcaact gggaggcagg aaatactttc 1320  
acctgctctg tgttacatga gggcctgcac aaccaccata ctgagaagag cctctccac 1380  
tctcctggta aatga 1395

<210> 10  
<211> 464  
<212> БІЛОК  
<213> Штучна послідовність  
<220>  
<223> Синтетичний важкий ланцюг антитіла 52M51  
<400> 10

Met Glu Trp Thr Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly  
1 5 10 15  
Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys  
20 25 30  
Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ala Gly Tyr Thr Met  
35 40 45  
Arg Gly Tyr Trp Ile Glu Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu  
50 55 60  
Glu Trp Ile Gly Gln Ile Leu Pro Gly Thr Gly Arg Thr Asn Tyr Asn  
65 70 75 80  
Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn  
85 90 95  
Thr Ala Asn Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val  
100 105 110  
Tyr Tyr Cys Ala Arg Phe Asp Gly Asn Tyr Gly Tyr Tyr Ala Met Asp  
115 120 125  
Tyr Trp Gly Gln Gly Ser Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr  
130 135 140  
Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn  
145 150 155 160  
Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro  
165 170 175



Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr  
180 185 190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val  
195 200 205

Thr Val Pro Ser Ser Pro Arg Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val  
210 215 220

Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg  
225 230 235 240

Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser  
245 250 255

Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu  
260 265 270

Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro  
275 280 285

Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala  
290 295 300

Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val  
305 310 315 320

Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe  
325 330 335

Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
340 345 350

Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile  
355 360 365

Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys  
370 375 380

Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp  
385 390 395 400

Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asn  
405 410 415

Thr Asn Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser  
420 425 430

Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly  
435 440 445

Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys  
450 455 460

<210> 11  
<211> 420  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Синтетичний важкий ланцюг антитіла 52M51

<400> 11  
atggaatgga cctgggtctt tctcttcctc ctgtcagtaa ctgcaggtgt ccaactcccag 60  
gttcagctgc agcagctctgg agctgagctg atgaagcctg gggcctcagt gaagatatcc 120  
tgcaaggctg ctggctacac aatgagaggc tactggatag agtggataaa gcagaggcct 180  
ggacatggcc ttgagtggat tggacagatt ttacctggaa ctgggagaac taactacaat 240  
gagaagttca agggcaaggc cacattcact gcagatacat cctccaacac agccaacatg 300  
caactcagca gcctgacatc tgaggactct gccgtctatt actgtgcaag atttgatggt 360  
aactacggtt actatgctat ggactactgg ggtcaaggat cctcagtcac cgtctcctca 420

<210> 12  
<211> 180  
<212> БІЛОК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Синтетичний важкий ланцюг антитіла 52M51

<400> 12

Met Glu Trp Thr Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly  
1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys  
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ala Gly Tyr Thr Met  
35 40 45

Arg Gly Tyr Trp Ile Glu Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu  
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Gln Ile Leu Pro Gly Thr Gly Arg Thr Asn Tyr Asn  
65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn

	85		90		95										
Thr	Ala	Asn	Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val
			100					105					110		
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Phe	Asp	Gly	Asn	Tyr	Gly	Tyr	Tyr	Ala	Met	Asp
		115					120					125			
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Ser	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Lys	Thr	Thr
	130					135					140				
Pro	Pro	Ser	Val	Tyr	Pro	Leu	Ala	Pro	Gly	Ser	Ala	Ala	Gln	Thr	Asn
145					150				155					160	
Ser	Met	Val	Thr	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro
				165					170					175	
Val	Thr	Val	Thr												
			180												

<210> 13  
 <211> 363  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Синтетичний важкий ланцюг антитіла 52M51

<400> 13	
cagggttcagc tgcagcagtc tggagctgag ctgatgaagc ctggggcctc agtgaagata	60
tcttgcaagg ctgctggcta cacaatgaga ggctactgga tagagtggat aaagcagagg	120
cctggacatg gccttgagtg gattggacag attttacctg gaactgggag aactaactac	180
aatgagaagt tcaagggcaa ggccacattc actgcagata catcctccaa cacagccaac	240
atgcaactca gcagcctgac atctgaggac tctgccgtct attactgtgc aagatttgat	300
ggtaactaag gttactatgc tatggactac tggggccaag gatcctcagt caccgtctcc	360
tca	363

<210> 14  
 <211> 122  
 <212> БІЛОК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Синтетичний важкий ланцюг антитіла 52M51

<400> 14

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ala Gly Tyr Thr Met Arg Gly Tyr  
20 25 30

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

Gly Gln Ile Leu Pro Gly Thr Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe  
50 55 60

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

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

Ala Arg Phe Asp Gly Asn Tyr Gly Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly  
100 105 110

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

<210> 15  
<211> 6  
<212> БІЛОК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Синтетичний важкий ланцюг антитіла CDR1

<400> 15

Arg Gly Tyr Trp Ile Glu  
1 5

<210> 16  
<211> 17  
<212> БІЛОК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Синтетичний важкий ланцюг антитіла CDR2

<400> 16

Gln Ile Leu Pro Gly Thr Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 17  
<211> 12  
<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний важкий ланцюг антитіла CDR3

<400> 17

Phe Asp Gly Asn Tyr Gly Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr  
1 5 10

<210> 18

<211> 14

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний легкий ланцюг антитіла CDR1

<400> 18

Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn  
1 5 10

<210> 19

<211> 7

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний легкий ланцюг антитіла CDR2

<400> 19

Gly Thr Asn Asn Arg Ala Pro  
1 5

<210> 20

<211> 16

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний легкий ланцюг антитіла CDR3

<400> 20

Ala Leu Trp Tyr Ser Asn His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu  
1 5 10 15

<210> 21

<211> 1401

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний важкий ланцюг антитіла 52M51

<400> 21

atggattgga catggagggt gttctgcctc ctcgctgtgg ctcctggagt cctgagccag 60

```

gtccagctcg tccagagcgg ggctgaagtc aagaagcctg gcgctagcgt caaaatcagc 120
tgtaagggtca gcggtatac actgagggga tactggatcg agtgggtgag gcaggctcca 180
ggaaaggggcc tggaatggat cggccagatc ctgcctggaa ccggaaggac aaattacaat 240
gagaagttta agggaagggt cacaatgaca gcagacacaa gcacagacac agcttatatg 300
gaactcagct ccctcagatc cgaggacacc gctgtctact attgtgccag gttcgatgga 360
aattacggat actatgccat ggattactgg ggacagggga caacggtcac cgtgagctca 420
gccagcacia agggccctag cgtcttccct ctggctccct gcagcaggag caccagcgag 480
agcacagccg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggg gacgggtgctg 540
tggaactcag gcgctctgac cagcggcgtg cacaccttcc cagctgtcct acagtcctca 600
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcaacttcgg caccagacc 660
tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagac agttgagcgc 720
aaatgttgtg tcgagtgcgc accgtgcccc gcaccacctg tggcaggacc gtcagtcttc 780
ctcttcccc caaaacccaa ggacacctc atgatctccc ggacctctga ggtcacgtgc 840
gtggtggtgg acgtgagcca cgaagacccc gaggtccagt tcaactggta cgtggacggc 900
gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagcca cgggaggagc agttcaacag cacgttccgt 960
gtggtcagcg tcctcaccgt tgtgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc 1020
aaggctctca acaaaggcct ccagccccc atcgagaaaa ccatctccaa aaccaaaggg 1080
cagccccgag aaccacaggt gtacacctg ccccatccc gggaggagat gaccaagaac 1140
caggtcagcc tgacctgctt ggtcaaaggc ttctacccca gcgacatgc cgtggagtgg 1200
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacac ctcccatgct ggactccgac 1260
ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 1320
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 1380
tcctgtctc cgggtaaatg a 1401

```

<210> 22  
 <211> 466  
 <212> БІЛОК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Синтетичний важкий ланцюг антитіла 52M51

<400> 22

Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Cys Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly  
 1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys  
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Leu  
35 40 45

Arg Gly Tyr Trp Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Gln Ile Leu Pro Gly Thr Gly Arg Thr Asn Tyr Asn  
65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp  
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val  
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Phe Asp Gly Asn Tyr Gly Tyr Tyr Ala Met Asp  
115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys  
130 135 140

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu  
145 150 155 160

Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro  
165 170 175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr  
180 185 190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val  
195 200 205

Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn  
210 215 220

Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg  
225 230 235 240

Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly  
245 250 255

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile  
260 265 270

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu  
275 280 285

Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His  
290 295 300

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg  
305 310 315 320

Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys  
325 330 335

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu  
340 345 350

Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr  
355 360 365

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu  
370 375 380

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp  
385 390 395 400

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met  
405 410 415

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp  
420 425 430

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His  
435 440 445

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
450 455 460

Gly Lys  
465

<210> 23  
<211> 141  
<212> БІЛОК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Синтетичний важкий ланцюг антитіла 52M51

<400> 23

Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Cys Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly  
1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys



```

                20                25                30
Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Leu
   35                40                45
Arg Gly Tyr Trp Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
   50                55                60
Glu Trp Ile Gly Gln Ile Leu Pro Gly Thr Gly Arg Thr Asn Tyr Asn
   65                70                75                80
Glu Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp
   85                90                95
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
  100                105                110
Tyr Tyr Cys Ala Arg Phe Asp Gly Asn Tyr Gly Tyr Tyr Ala Met Asp
  115                120                125
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala
  130                135                140

<210>  24
<211>  122
<212>  БІЛОК
<213>  Штучна послідовність

<220>
<223>  Синтетичний важкий ланцюг антитіла 52M51

<400>  24
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
  1                5                10                15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Leu Arg Gly Tyr
  20                25                30
Trp Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
  35                40                45
Gly Gln Ile Leu Pro Gly Thr Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
  50                55                60
Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
  65                70                75                80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
  85                90                95

```

Ala Arg Phe Asp Gly Asn Tyr Gly Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly  
100 105 110

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

<210> 25  
<211> 720  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Синтетичний легкий ланцюг антитіла 52M51  
<400> 25

```
atgagcgtcc ctacaatggc ttggatgatg ctctgctgg gactcctggc ttatggaagc 60
ggagtggata gccaggccgt cgtcacacag gaacctagcc tcaccgttag ccctggagga 120
acagtcacac tgacctgtag gagctccaca ggagctgtga caacaagcaa ttacgctaac 180
tggttccagc agaagcccgg tcaagcccct agaaccctca tcggcggcac caataacaga 240
gctcccggag tccccgccag gttctccggc tccctcctgg gtggcaaggc tgctctgaca 300
ctcagcggtg cccagccaga ggatgaagcg gagtactact gtgactgtg gtacagcaac 360
cattgggttt tcggaggcgg aacaaagtta accgtcctcg ggcagcctaa ggctgctcct 420
agcgtcacac tgttccccc atctagcgag gagctgcagg ctaacaaggc aaccctcgtc 480
tgcctgggta gcgacttcta ccctggcgct gtcacagtgg cctggaaaagc tgacggctcc 540
cctgtgaaag ttggcgtcga aaccacaaag ccttctaagc agagcaataa taaatatgcc 600
gcaagctcct acctctccct gactcctgag cagtggaaaa gccataggag ctactcctgc 660
cgggtcacac acgaaggaag cacagtggaa aagacagtcg cccctgctga gtgtagctga 720
```

<210> 26  
<211> 239  
<212> БІЛОК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Синтетичний легкий ланцюг антитіла 52M51  
<400> 26

Met Ser Val Pro Thr Met Ala Trp Met Met Leu Leu Leu Gly Leu Leu  
1 5 10 15

Ala Tyr Gly Ser Gly Val Asp Ser Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro  
20 25 30

Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser  
35 40 45

Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Phe Gln Gln  
50 55 60

Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Thr Leu Ile Gly Gly Thr Asn Asn Arg  
65 70 75 80

Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys  
85 90 95

Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr  
100 105 110

Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr  
115 120 125

Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu  
130 135 140

Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val  
145 150 155 160

Cys Leu Val Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys  
165 170 175

Ala Asp Gly Ser Pro Val Lys Val Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser  
180 185 190

Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr  
195 200 205

Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Arg Val Thr His  
210 215 220

Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Ala Glu Cys Ser  
225 230 235

<210> 27

<211> 134

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний легкий ланцюг антитіла 52M51

<400> 27

Met Ser Val Pro Thr Met Ala Trp Met Met Leu Leu Leu Gly Leu Leu  
1 5 10 15

Ala Tyr Gly Ser Gly Val Asp Ser Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro  
20 25 30

Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser  
35 40 45

Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Phe Gln Gln  
50 55 60

Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Thr Leu Ile Gly Gly Thr Asn Asn Arg  
65 70 75 80

Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys  
85 90 95

Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr  
100 105 110

Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr  
115 120 125

Lys Leu Thr Val Leu Gly  
130

<210> 28  
<211> 115  
<212> БІЛОК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Синтетичний легкий ланцюг антитіла 52M51

<400> 28

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

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

Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly  
35 40 45

Gln Ala Pro Arg Thr Leu Ile Gly Gly Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly  
50 55 60

Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu  
65 70 75 80

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

Leu Trp Tyr Ser Asn His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr  
100 105 110

Val Leu Gly  
115

<210> 29  
<211> 720  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Синтетичний легкий ланцюг антитіла 52M51

<400> 29  
atgagcgtcc ctacaatggc ttggatgatg ctccctgctgg gactcctggc ttatggaagc 60  
ggagtggata gccagaccgt cgtcacacag gaacctagct ttcccgtag ccctggagga 120  
acagtcacac tgacctgtag gagctccaca ggagctgtga caacaagcaa ttacgctaac 180  
tggtatcagc agactcccgg tcaagcccct agaaccctca tcggcggcac caataacaga 240  
gctcccggag tccccgacag gttctccggc tccatcctgg gaaataaagc tgctctgaca 300  
atcacagggtg cccagggtga cgatgaaagc gactactact gtgactgtg gtacagcaac 360  
cattgggttt tcggaggcgg aacaaagtta accgtcctcg ggcagcctaa ggctgctcct 420  
agcgtcacac tgttcccccc atctagcgag gagctgcagg ctaacaaggc aaccctcgtc 480  
tgccctggta gcgacttcta ccctggcgct gtcacagtgg cctggaaagc tgacggctcc 540  
cctgtgaaag ttggcgctga aaccacaaag ccttctaagc agagcaataa taaatatgcc 600  
gcaagctcct acctctccct gactcctgag cagtggaaaa gccataggag ctactcctgc 660  
cgggtcacac acgaaggaag cacagtggaa aagacagtcg cccctgctga gtgtagctga 720

<210> 30  
<211> 239  
<212> БІЛОК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Синтетичний легкий ланцюг антитіла 52M51

<400> 30

Met Ser Val Pro Thr Met Ala Trp Met Met Leu Leu Leu Gly Leu Leu  
1 5 10 15

Ala Tyr Gly Ser Gly Val Asp Ser Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro  
20 25 30

Ser Phe Ser Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser  
35 40 45

Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Tyr Gln Gln  
50 55 60

Thr Pro Gly Gln Ala Pro Arg Thr Leu Ile Gly Gly Thr Asn Asn Arg  
65 70 75 80

Ala Pro Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ile Leu Gly Asn Lys  
85 90 95

Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Asp Asp Glu Ser Asp Tyr  
100 105 110

Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr  
115 120 125

Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu  
130 135 140

Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val  
145 150 155 160

Cys Leu Val Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys  
165 170 175

Ala Asp Gly Ser Pro Val Lys Val Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser  
180 185 190

Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr  
195 200 205

Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Arg Val Thr His  
210 215 220

Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Ala Glu Cys Ser  
225 230 235

<210> 31  
<211> 134  
<212> БІЛОК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Синтетичний легкий ланцюг антитіла 52M51

<400> 31

Met Ser Val Pro Thr Met Ala Trp Met Met Leu Leu Leu Gly Leu Leu  
1 5 10 15

Ala Tyr Gly Ser Gly Val Asp Ser Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro  
20 25 30

Ser Phe Ser Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser  
35 40 45

Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Tyr Gln Gln  
50 55 60

Thr Pro Gly Gln Ala Pro Arg Thr Leu Ile Gly Gly Thr Asn Asn Arg  
65 70 75 80

Ala Pro Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ile Leu Gly Asn Lys  
85 90 95

Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Asp Asp Glu Ser Asp Tyr  
100 105 110

Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr  
115 120 125

Lys Leu Thr Val Leu Gly  
130

<210> 32  
<211> 115  
<212> БІЛОК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Синтетичний легкий ланцюг антитіла 52M51

<400> 32

Ser Gly Val Asp Ser Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Phe Ser  
1 5 10 15

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

Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly  
35 40 45

Gln Ala Pro Arg Thr Leu Ile Gly Gly Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly  
50 55 60

Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ile Leu Gly Asn Lys Ala Ala Leu  
65 70 75 80

Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Asp Asp Glu Ser Asp Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Leu Trp Tyr Ser Asn His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr  
100 105 110

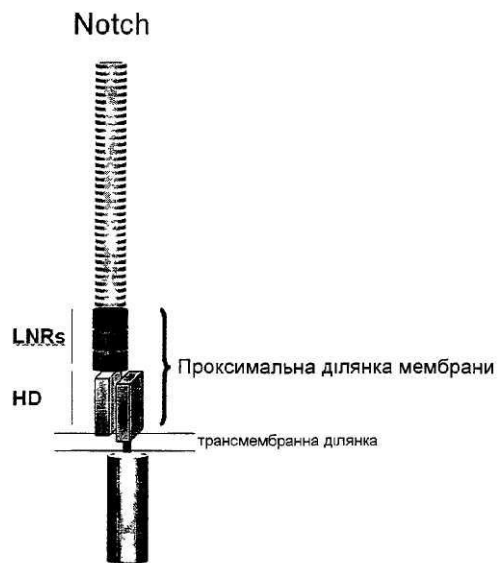
Val Leu Gly  
115

## ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Виділене антитіло, яке специфічно зв'язується з нелігандзв'язуючою проксимальною ділянкою мембрани позаклітинного домену рецептора Notch1 людини, при цьому вказане антитіло містить:
  - (a) CDR1 важкого ланцюга, що включає RGYWIE (SEQ ID NO:15), CDR2 важкого ланцюга, що включає QILPGTGRTNYNEKFKG (SEQ ID NO:16), і CDR3 важкого ланцюга, що включає FDGNYGYAMDY (SEQ ID NO:17); та
  - (b) CDR1 легкого ланцюга, що включає RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:18), CDR2 легкого ланцюга, що включає GTNNRAP (SEQ ID NO:19), і CDR3 легкого ланцюга, що включає ALWYSNHWVFGGGTKL (SEQ ID NO:20).
2. Виділене антитіло за п. 1, яке містить:
  - (a) варіабельну ділянку важкого ланцюга, що має послідовність, яка щонайменше на 90 % ідентична SEQ ID NO:14 або SEQ ID NO:24; та
  - (b) варіабельну ділянку легкого ланцюга, що має послідовність, яка щонайменше на 90 % ідентична SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:28 або SEQ ID NO:32.
3. Виділене антитіло за п. 2, яке містить:
  - (a) варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO:24; та
  - (b) варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO:28.
4. Антитіло за будь-яким з пп. 1-3, яке є рекомбінантним антитілом, моноклональним антитілом, химерним антитілом, біспецифічним антитілом, гуманізованим антитілом, антитілом людини або фрагментом антитіла.
5. Виділене антитіло, продуковане лінією клітин гібридами, депонованої в АТСС як патентний депозит під номером РТА-9405.
6. Фармацевтична композиція, що містить антитіло за будь-яким з пп. 1-5.
7. Застосування антитіла відповідно до будь-якого з пп. 1-5 для виготовлення лікарського засобу для лікування раку.
8. Застосування за п. 7, яке **відрізняється** тим, що лікування раку включає введення принаймні одного додаткового терапевтичного агента.
9. Застосування за п. 8, яке **відрізняється** тим, що зазначений додатковий терапевтичний агент є хіміотерапевтичним агентом.

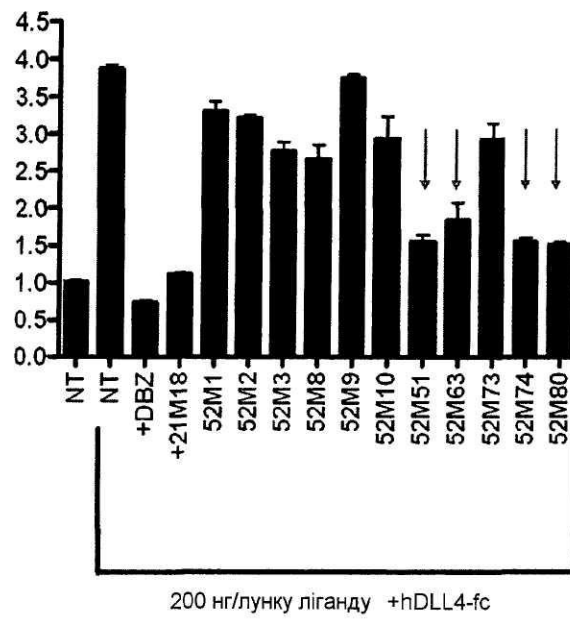


1A

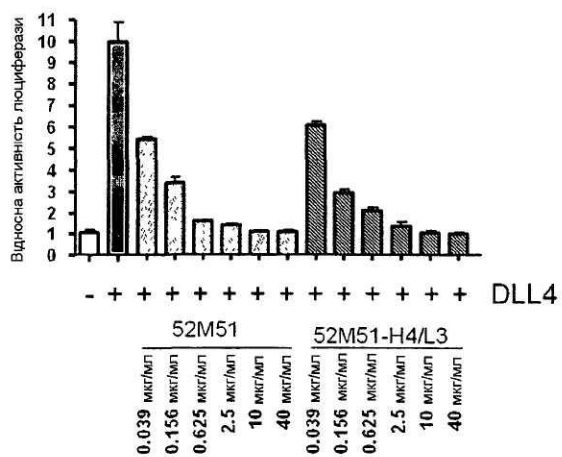


ФІГ. 1

1B

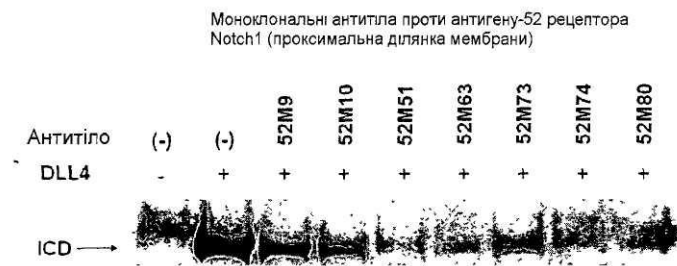


1C



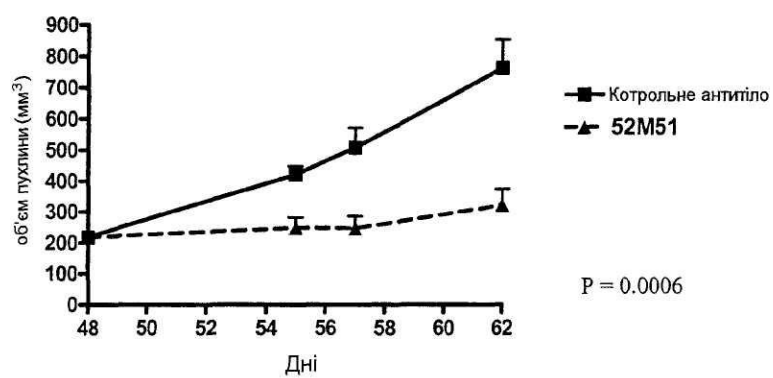
ФІГ.1

1D

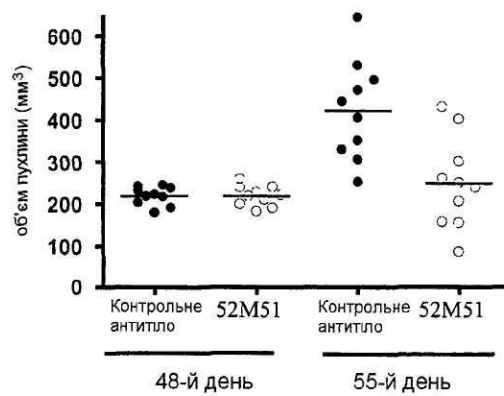


ФІГ.1

2A

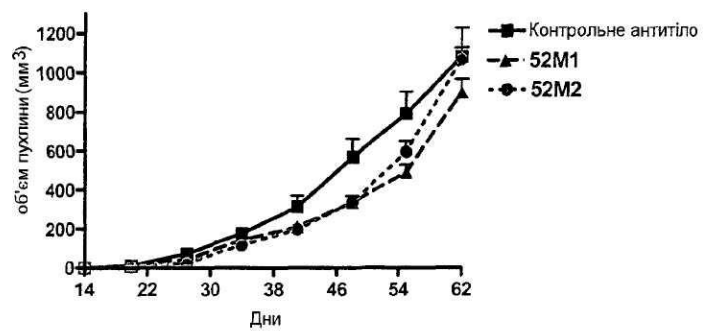


2B

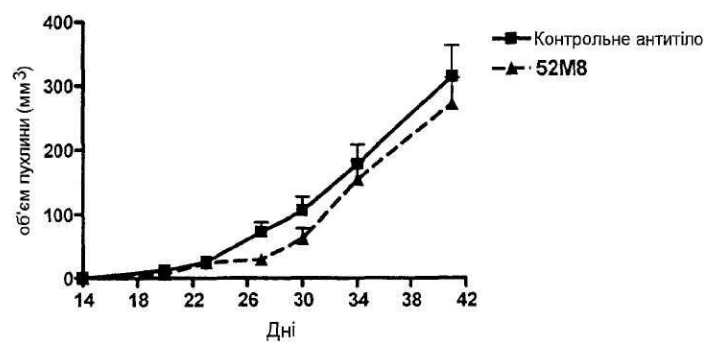


ФІГ.2

2C

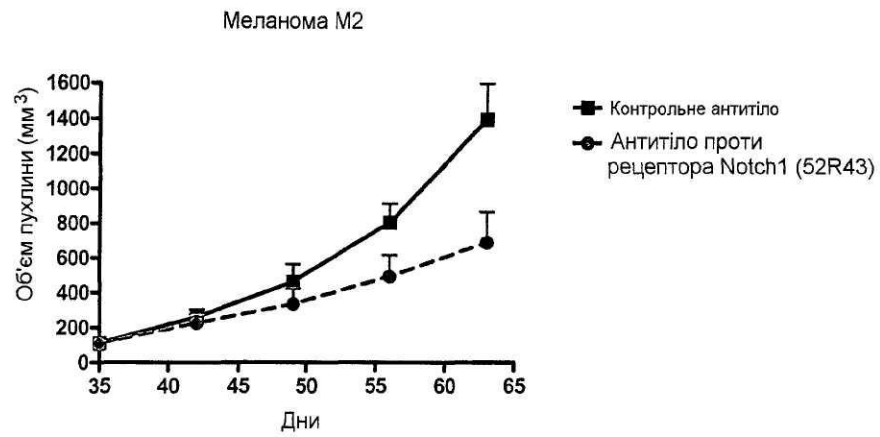


2D

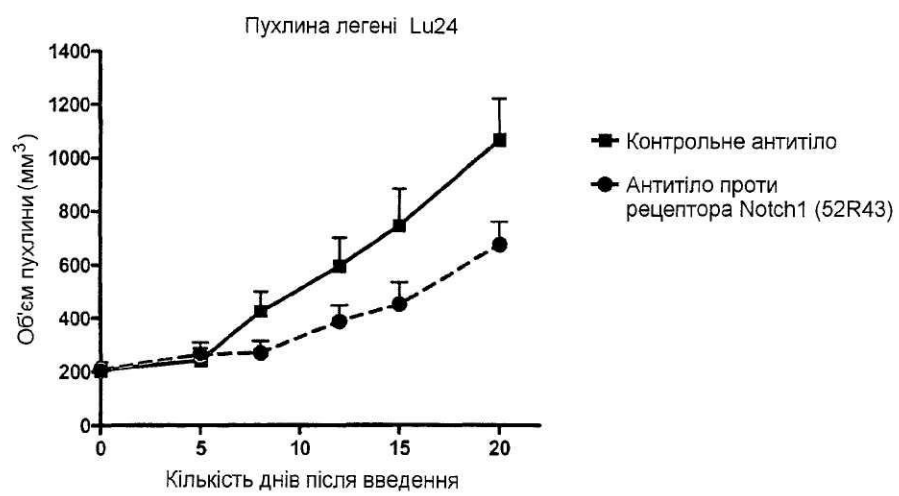


ФІГ.2

3A

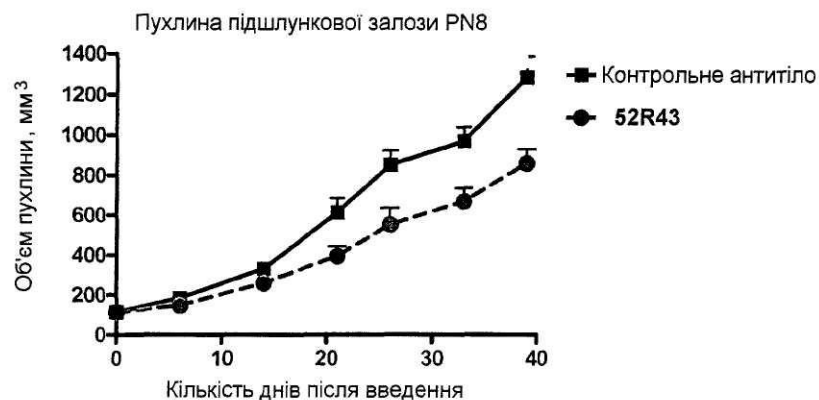


3B

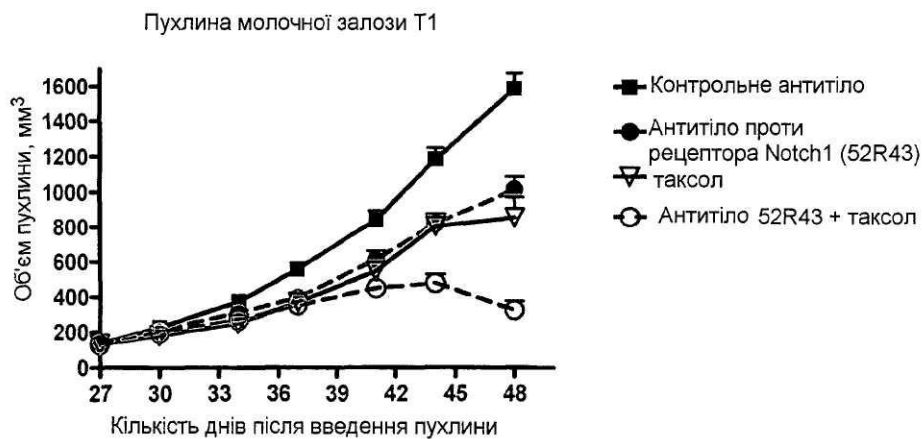


ФІГ.3

3C



3D



ФІГ.3

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