



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102112490 A

(43) 申请公布日 2011. 06. 29

(21) 申请号 200980126471. 4

富米考·塔卡达·阿克塞尔罗德

(22) 申请日 2009. 07. 08

(74) 专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司

11127

(30) 优先权数据

代理人 丁香兰 庞东成

61/079, 095 2008. 07. 08 US

61/112, 699 2008. 11. 07 US

61/112, 701 2008. 11. 07 US

(51) Int. Cl.

*C07K 16/28* (2006. 01)

*A61K 39/395* (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 01. 07

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2009/003995 2009. 07. 08

(87) PCT申请的公布数据

W02010/005567 EN 2010. 01. 14

(83) 生物保藏信息

PTA-9549 2008. 10. 15

PTA-9548 2008. 10. 15

PTA-9405 2008. 08. 07

(71) 申请人 昂考梅德药品有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 奥斯丁·L·格尼

蒂莫西·查尔斯·霍伊

莫林·菲奇·布鲁恩斯

权利要求书 5 页 说明书 54 页 附图 6 页

(54) 发明名称

NOTCH1 受体结合剂和其使用方法

(57) 摘要

本发明公开了用于诊断、表征、预后和治疗癌的手段和方法,特别是靶向癌干细胞的手段和方法。本发明提供一种与人类 Notch 受体的胞外域的非配体结合区特异性结合并且抑制肿瘤生长的抗体,以及治疗癌的方法,所述方法包括对受试对象施用所述抗体。

1. 一种分离的抗体,所述抗体与人类 Notch1 受体的胞外域的非配体结合近膜区特异性结合并且抑制肿瘤生长。

2. 如权利要求 1 所述的抗体,其中所述抗体与至少一个其它 Notch 受体的胞外域的非配体结合近膜区特异性结合。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的抗体,其中所述抗体是 Notch1 的拮抗剂。

4. 如权利要求 1 ~ 3 中任一项所述的抗体,其中所述抗体抑制 Notch1 的激活。

5. 如权利要求 1 ~ 4 中任一项所述的抗体,其中所述抗体抑制所述近膜区内的切割。

6. 如权利要求 1 ~ 5 中任一项所述的抗体,其中所述抗体抑制位于所述近膜区内的 S2 位点处的切割。

7. 如权利要求 1 ~ 6 中任一项所述的抗体,其中所述抗体抑制 Notch1 的胞内域 (ICD) 的释放。

8. 如权利要求 1 ~ 7 中任一项所述的抗体,其中所述抗体是 IgA、IgD、IgE、IgG 或 IgM 抗体。

9. 如权利要求 1 ~ 7 中任一项所述的抗体,其中所述抗体是 IgG1 抗体。

10. 如权利要求 1 ~ 7 中任一项所述的抗体,其中所述抗体是 IgG2 抗体。

11. 如权利要求 1 ~ 10 中任一项所述的抗体,其中所述抗体是单克隆抗体。

12. 如权利要求 1 ~ 11 中任一项所述的抗体,其中所述抗体是嵌合抗体。

13. 如权利要求 1 ~ 12 中任一项所述的抗体,其中所述抗体是人源化抗体。

14. 如权利要求 1 ~ 12 中任一项所述的抗体,其中所述抗体是人类抗体。

15. 如权利要求 1 ~ 14 中任一项所述的抗体,其中所述抗体是抗体片段。

16. 如权利要求 1 ~ 15 中任一项所述的抗体,其中所述抗体是单价抗体。

17. 如权利要求 1 ~ 16 中任一项所述的抗体,其中所述 Notch1 受体的非配体结合近膜区包含 SEQ ID NO :2。

18. 如权利要求 1 ~ 17 中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含含有 RGYWIE (SEQ ID NO :15) 的重链 CDR1、含有 QILPGTGRTNYNEKFKG (SEQ ID NO :16) 的重链 CDR2 和含有 FDGNYGYAMDY (SEQ ID NO :17) 的重链 CDR3。

19. 如权利要求 18 所述的抗体,其中所述抗体还包含含有 RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO :18) 的轻链 CDR1、含有 GTNNRAP (SEQ ID NO :19) 的轻链 CDR2 和含有 ALWYSNHWFVGGGTKL (SEQ ID NO. 20) 的轻链 CDR3。

20. 如权利要求 1 ~ 17 中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含含有 RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO :18) 的轻链 CDR1、含有 GTNNRAP (SEQ ID NO :19) 的轻链 CDR2 和含有 ALWYSNHWFVGGGTKL (SEQ ID NO. 20) 的轻链 CDR3。

21. 一种分离的抗体,所述抗体与人类 Notch1 的胞外域的非配体结合近膜区特异性结合,其中所述抗体包含含有 RGYWIE (SEQ ID NO :15) 的重链 CDR1、含有 QILPGTGRTNYNEKFKG (SEQ ID NO :16) 的重链 CDR2 和 / 或含有 FDGNYGYAMDY (SEQ ID NO :17) 的重链 CDR3。

22. 如权利要求 21 所述的抗体,其中所述抗体还包含含有 RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO :18) 的轻链 CDR1、含有 GTNNRAP (SEQ ID NO :19) 的轻链 CDR2 和 / 或含有 ALWYSNHWFVGGGTKL (SEQ ID NO. 20) 的轻链 CDR3。

23. 一种分离的抗体,所述抗体与人类 Notch1 的胞外域的非配体结合近膜区特异性结合,其中所述抗体包含含有 RSSTGAVTTSNYAN(SEQ ID NO:18)的轻链 CDR1、含有 GTNNRAP(SEQ ID NO:19)的轻链 CDR2 和 / 或含有 ALWYSNHWFVGGGTKL(SEQ ID NO.20)的轻链 CDR3。

24. 一种分离的抗体,所述抗体与人类 Notch1 的胞外域的非配体结合近膜区特异性结合,其中所述抗体包含:

(a) 含有 RGYWIE(SEQ ID NO:15)的重链 CDR1、含有 QILPGTGRNTYNEKFKG(SEQ ID NO:16)的重链 CDR2 和含有 FDGNYGYAMDY(SEQ ID NO:17)的重链 CDR3;和 / 或

(b) 含有 RSSTGAVTTSNYAN(SEQ ID NO:18)的轻链 CDR1、含有 GTNNRAP(SEQ ID NO:19)的轻链 CDR2 和含有 ALWYSNHWFVGGGTKL(SEQ ID NO.20)的轻链 CDR3。

25. 一种分离的抗体,所述抗体与人类 Notch1 的胞外域的非配体结合近膜区特异性结合,其中所述抗体包含重链可变区,所述重链可变区包含:(a) 含有 RGYWIE(SEQ ID NO:15)的重链 CDR1,或包含 1、2、3 或 4 个氨基酸取代的其变体;(b) 含有 QILPGTGRNTYNEKFKG(SEQ ID NO:16)的重链 CDR2,或包含 1、2、3 或 4 个氨基酸取代的其变体;和 (c) 含有 FDGNYGYAMDY(SEQ ID NO:17)的重链 CDR3,或包含 1、2、3 或 4 个氨基酸取代的其变体。

26. 如权利要求 25 所述的抗体,所述抗体还包含轻链可变区,所述轻链可变区包含:(a) 含有 RSSTGAVTTSNYAN(SEQ ID NO:18)的轻链 CDR1,或包含 1、2、3 或 4 个氨基酸取代的其变体;(b) 含有 GTNNRAP(SEQ ID NO:19)的轻链 CDR2,或包含 1、2、3 或 4 个氨基酸取代的其变体;和 / 或 (c) 含有 ALWYSNHWFVGGGTKL(SEQ ID NO:20)的轻链 CDR3,或包含 1、2、3 或 4 个氨基酸取代的其变体。

27. 一种分离的抗体,所述抗体与人类 Notch1 的胞外域的非配体结合近膜区特异性结合,其中所述抗体包含轻链可变区,所述轻链可变区包含:(a) 含有 RSSTGAVTTSNYAN(SEQ ID NO:18)的轻链 CDR1,或包含 1、2、3 或 4 个氨基酸取代的其变体;(b) 含有 GTNNRAP(SEQ ID NO:19)的轻链 CDR2,或包含 1、2、3 或 4 个氨基酸取代的其变体;和 / 或 (c) 含有 ALWYSNHWFVGGGTKL(SEQ ID NO:20)的轻链 CDR3,或包含 1、2、3 或 4 个氨基酸取代的其变体。

28. 如权利要求 25 ~ 27 中任一项所述的抗体,其中所述氨基酸取代是保守性氨基酸取代。

29. 一种分离的抗体,所述抗体与人类 Notch1 的胞外域的非配体结合近膜区特异性结合,其中所述抗体结合的所述近膜区内的表位与抗体 52M51 结合的表位相同,所述抗体 52M51 由以 ATCC 专利保藏号 PTA-9405 保藏的杂交瘤细胞系产生。

30. 一种分离的抗体,所述抗体与人类 Notch1 的胞外域的非配体结合近膜区特异性结合并且抑制 Notch1 ICD 的形成,其中所述抗体抑制肿瘤生长。

31. 一种分离的抗体,所述抗体与权利要求 1 ~ 30 中任一项所述的抗体竞争对人类 Notch1 的胞外域的非配体结合近膜区的特异性结合。

32. 一种分离的抗体,所述抗体在竞争性结合检测中与权利要求 1 ~ 30 中任一项所述的抗体竞争对人类 Notch1 的胞外域的非配体结合近膜区的特异性结合。

33. 一种分离的抗体,所述抗体与抗体 52M51 竞争对人类 Notch1 的胞外域的非配体结合近膜区的特异性结合。

34. 一种分离的抗体,所述抗体与人类 Notch1 的胞外域的非配体结合近膜区特异性结合,其中所述抗体包含:(a)与 SEQ ID NO:14 或 SEQ ID NO:24 具有至少 90% 序列同一性的重链可变区;和/或(b)与 SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:28 或 SEQ ID NO:32 具有至少 90% 序列同一性的轻链可变区。

35. 如权利要求 34 所述的抗体,其中所述重链可变区与 SEQ ID NO:14 或 SEQ ID NO:24 具有至少 95% 的序列同一性;和/或(b)所述轻链可变区与 SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:28 或 SEQ ID NO:32 具有至少 95% 的序列同一性。

36. 一种分离的多肽,所述多肽包含:

(a) 具有氨基酸序列 SEQ ID NO:14 或 SEQ ID NO:24 的多肽;和/或

(b) 具有氨基酸序列 SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:28 或 SEQ ID NO:32 的多肽。

37. 如权利要求 36 所述的多肽,其中所述多肽是抗体。

38. 如权利要求 36 所述的多肽,其中所述多肽包含具有氨基酸序列 SEQ ID NO:14 的多肽和具有氨基酸序列 SEQ ID NO:8 的多肽。

39. 如权利要求 36 所述的多肽,其中所述多肽包含具有氨基酸序列 SEQ ID NO:24 的多肽和具有氨基酸序列 SEQ ID NO:28 的多肽。

40. 如权利要求 36 所述的多肽,其中所述多肽包含具有氨基酸序列 SEQ ID NO:24 的多肽和具有氨基酸序列 SEQ ID NO:32 的多肽。

41. 一种抗体,所述抗体包含的重链可变区和轻链可变区与以 ATCC 专利保藏号 PTA-9549 保藏的质粒所编码的多肽相同。

42. 一种由杂交瘤细胞系产生的抗体,所述杂交瘤细胞系以 ATCC 专利保藏号 PTA-9405 保藏。

43. 一种特异性结合人类 Notch1 的抗体,所述抗体包含如权利要求 36 或 37 所述的多肽。

44. 一种特异性结合人类 Notch1 的抗体,所述抗体包含:

含有 SEQ ID NO:14 或 SEQ ID NO:24 的多肽;和

含有 SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:28 或 SEQ ID NO:32 的多肽。

45. 一种药物组合物,所述药物组合物包含权利要求 1 ~ 44 中任一项所述的抗体或多肽和药学上可接受的载体。

46. 一种药物组合物,所述药物组合物包含权利要求 1 ~ 44 中任一项所述的抗体或多肽和至少一种其它抗癌剂。

47. 一种分离的多核苷酸分子,所述多核苷酸分子包含编码权利要求 1 ~ 44 中任一项所述的抗体或多肽的多核苷酸。

48. 一种表达载体,所述表达载体包含权利要求 47 所述的多核苷酸分子。

49. 一种宿主细胞,所述宿主细胞包含权利要求 48 所述的表达载体。

50. 一种宿主细胞,所述宿主细胞包含权利要求 47 所述的多核苷酸分子。

51. 一种杂交瘤细胞系,所述杂交瘤细胞系以 ATCC 专利保藏号 PTA-9405 保藏。

52. 一种细胞系,所述细胞系产生权利要求 1 ~ 44 中任一项所述的抗体。

53. 一种抑制细胞中 Notch1 的活性的方法,所述方法包括使所述细胞与权利要求 1 ~ 44 中任一项所述的抗体或多肽接触。

54. 如权利要求 53 所述的方法,其中所述细胞是肿瘤细胞。
55. 一种抑制受试对象中的肿瘤生长的方法,所述方法包括对所述受试对象施用治疗有效量的权利要求 1 ~ 44 中任一项所述的抗体或多肽。
56. 一种减少受试对象的中包含癌干细胞的肿瘤的致瘤性的方法,所述方法包括对所述受试对象施用治疗有效量的权利要求 1 ~ 44 中任一项所述的抗体或多肽,其中通过所述抗体或多肽的施用而使所述肿瘤中癌干细胞的频率或数量减少。
57. 如权利要求 55 或 56 所述的方法,其中所述肿瘤或肿瘤细胞选自自由乳肿瘤、结直肠肿瘤、肝肿瘤、肾肿瘤、肺肿瘤、胰腺肿瘤、卵巢肿瘤、前列腺肿瘤以及头颈肿瘤组成的组。
58. 一种治疗受试对象中的癌的方法,所述方法包括对所述受试对象施用治疗有效量的权利要求 1 ~ 44 中任一项所述的抗体或多肽。
59. 如权利要求 58 所述的方法,其中所述癌选自自由乳癌、结直肠癌、肝脏癌、肾癌、肝癌、肺癌、胰腺癌、胃肠癌、黑色素瘤、卵巢癌、前列腺癌、宫颈癌、膀胱癌、成胶质细胞瘤以及头颈癌组成的组。
60. 如权利要求 55 ~ 59 中任一项所述的方法,其中所述方法还包括对所述受试对象施用至少一种其它抗癌剂 / 治疗剂。
61. 如权利要求 60 所述的方法,其中所述其它抗癌剂选自自由紫杉醇、伊立替康、吉西他滨和奥沙利铂组成的组。
62. 如权利要求 60 所述的方法,其中所述抗癌剂是其它抗体治疗剂。
63. 如权利要求 62 所述的方法,其中所述其它抗体治疗剂包含与第二 Notch 受体特异性结合的抗体。
64. 如权利要求 62 所述的方法,其中所述其它抗体治疗剂包含与 VEGF 特异性结合的抗体。
65. 如权利要求 62 所述的方法,其中所述其它抗体治疗剂包含与 Notch 受体配体特异性结合的抗体。
66. 如权利要求 65 所述的方法,其中所述 NOTCH 受体配体是 DLL4。
67. 如权利要求 65 所述的方法,其中所述 NOTCH 受体配体是 JAG1。
68. 如权利要求 55 ~ 67 中任一项所述的方法,其中所述抗体与细胞毒性基团缀合。
69. 如权利要求 55 ~ 68 中任一项所述的方法,其中所述抗体的施用与放射治疗一起进行。
70. 如权利要求 55 ~ 59 中任一项所述的方法,其中所述抗体的施用与化学治疗一起进行。
71. 一种抑制受试对象中的肿瘤生长的方法,所述方法包括对所述受试对象施用治疗有效量的抗体,所述抗体与人类 Notch1 的胞外域的非配体结合近膜区特异性结合,其中结合抑制 Notch1 的活性。
72. 如权利要求 71 所述的方法,其中所述肿瘤选自自由乳肿瘤、结直肠肿瘤、肝肿瘤、肾肿瘤、肺肿瘤、胰腺肿瘤、卵巢肿瘤、前列腺肿瘤以及头颈肿瘤组成的组。
73. 如权利要求 71 或 72 所述的方法,其中所述受试对象是人类。
74. 如权利要求 71 ~ 73 中任一项所述的方法,其中所述抗体是 Notch1 的拮抗剂。
75. 如权利要求 71 ~ 73 中任一项所述的方法,其中所述抗体是 IgG1 抗体。

76. 如权利要求 71 ~ 74 中任一项所述的方法,其中所述抗体是 IgG2 抗体。
77. 如权利要求 71 ~ 76 中任一项所述的方法,其中所述抗体是单克隆抗体。
78. 如权利要求 71 ~ 77 中任一项所述的方法,其中所述抗体是嵌合抗体。
79. 如权利要求 71 ~ 78 中任一项所述的方法,其中所述抗体是人源化抗体。
80. 如权利要求 71 ~ 78 中任一项所述的方法,其中所述抗体是人类抗体。
81. 如权利要求 71 ~ 80 中任一项所述的方法,其中所述抗体是抗体片段。
82. 如权利要求 71 ~ 81 中任一项所述的方法,其中所述抗体与细胞毒性剂缀合。
83. 如权利要求 71 ~ 82 中任一项所述的方法,其中所述方法还包括施用适于实现联合治疗的至少一种其它治疗剂。
84. 一种通过减少在含有癌干细胞的肿瘤中的癌干细胞的频率或数量从而减少所述肿瘤的致瘤性的方法,所述方法包括使所述肿瘤与治疗有效量的抑制 Notch1 活性的抗体接触。

## NOTCH1 受体结合剂和其使用方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及包含结合人类 Notch 受体的试剂的组合物和使用所述组合物来表征、诊断和治疗癌和其它疾病的方法。特别地,本发明提供与人类 Notch1 受体的胞外域的非配体结合近膜区特异性结合并抑制肿瘤生长的抗体。本发明还提供治疗癌的方法,所述方法包括施用治疗有效量的抗体,所述抗体与人类 Notch1 受体蛋白的胞外域的非配体结合近膜区特异性结合,并抑制肿瘤生长。

### 背景技术

[0002] 癌是发达国家中死亡的一个主要原因,仅在美国每年就导致超过 500,000 例死亡。在美国每年超过 1 百万人诊断患有癌,并且总体来说据估计超过三分之一的人在其一生中会患上某种形式的癌。虽然存在超过 200 种不同类型的癌,但其中四种 - 乳癌、肺癌、结肠直肠癌和前列腺癌 - 占有新病例的超过一半 (Jemal 等,2003, CancerJ. Clin. 55 : 5-26)。

[0003] 癌起因于控制正常组织发育和维持的机制的失调,并且越来越多地认为干细胞起中心作用 (Beachy 等,2004, Nature 432 324)。正常动物发育期间,大多数组织或所有组织的细胞源自正常的称为干细胞的前体 (Morrison 等,1997, Cell 88 :287-98 ;Morrison 等,1997, Curr. Opin. Immunol. 9-216-21 ;Morrison 等,1995, Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 11 : 35-71)。干细胞是具有以下特征的细胞:(1) 具有广泛的增殖能力;(2) 能够进行不对称细胞分裂从而产生增殖和 / 或发育潜能减少的一种或多种子代;和 (3) 能够进行对称细胞分裂以用于自我更新或自我维持。通过干细胞分化进行的成体细胞更新的众所周知的实例是造血系统,在造血系统中,发育未成熟的前体(造血干细胞和祖细胞)响应于分子信号从而形成各种类型的血细胞和淋巴样细胞。包括肠、乳腺导管系统和皮肤的细胞在内的其它细胞,由在各组织中的小群干细胞不断补充,并且最近的研究表明大多数其它成体组织也拥有干细胞,包括脑。

[0004] 实体瘤由不均一的细胞群组成。例如,乳癌是癌细胞和正常细胞的混合物,包括间叶细胞(间质细胞)、炎性细胞和内皮细胞。癌的经典模型认为表型不同的癌细胞群都具有增殖和产生新肿瘤的能力。在经典模型中,肿瘤细胞的不均一性是由环境因素以及癌细胞内持续进行的突变所致,产生各种致瘤细胞的群体。该模型基于所有的肿瘤细胞群体都会具有某种程度致瘤潜能的想法。(Pandis 等,1998, Genes, Chromosomes & Cancer 12 :122-129 ;Kuukasjrvi 等,1997, Cancer Res. 57 :1597-1604 ;Bonsing 等,1993, Cancer 71 :382-391 ;Bonsing 等,2000, Genes Chromosomes & Cancer 82 :173-183 ;Beerman H 等,1991, Cytometry 12 :147-54 ;Aubele M & WernerM,1999, Analyt. Cell. Path. 19 :53 ;Shen L 等,2000, Cancer Res. 60 :3884)。

[0005] 用于观察到的实体瘤细胞不均一性的替代性模型是实体瘤由“实体瘤干细胞”(或来自于实体瘤的“癌干细胞”)产生,所述“实体瘤干细胞”(或来自于实体瘤的“癌干细胞”)随后通过几轮对称和不对称细胞分裂而进行混乱发育 (chaotic development)。在该干细

胞模型中,实体瘤含有亚类不同且有限(甚至可能是稀少)的细胞,所述细胞与正常“干细胞”的共有性质是它们广泛地增殖,和有效地同时产生另外的实体瘤干细胞(自我更新)和缺乏致瘤潜能的实体瘤的大多数肿瘤细胞。事实上,长寿干细胞群内的突变可以引起癌干细胞的形成,该癌干细胞是肿瘤生长和维持的基础,并且其存在是目前治疗方法失败的原因。

[0006] 癌的干细胞性质首次披露于血癌,急性骨髓性白血病(AML)中(Lapidot等,1994, Nature 367:645-8)。最近已经证明恶性人类乳部肿瘤类似地拥有少量独特的癌干细胞群,其经富集而具有在免疫缺陷小鼠中形成肿瘤的能力。发现与未分级肿瘤细胞相比,ESA+, CD44+, CD24-/low, Lin- 细胞群的致瘤细胞富集 50 倍(Al-Hajj等,2003, PNAS 100:3983-8)。预期分离致瘤性癌细胞的能力允许研究作为这些细胞中致瘤性基础的关键生物学途径,并因此预示为癌症患者开发更好的诊断检验和治疗。本发明正是针对该目的。

[0007] 正常干细胞和癌干细胞都具有增殖和自我更新的能力,因此调节正常干细胞发育的许多基因促进肿瘤发生并不令人惊奇(Reya等综述,2001, Nature 414:105-111和Taipale & Beachy,2001, Nature 411:349-354)。本发明将诸如Notch1等Notch受体鉴定为在癌干细胞的维持中涉及Notch信号传导途径的癌干细胞的标记物,并鉴定为通过消除这些致瘤细胞来治疗癌的靶标。

[0008] Notch信号传导途径是胚胎模式形成、胚后组织维持和干细胞生物学的几种关键调节方式之一。更特别的是,Notch信号传导参与相邻细胞命运之间的侧抑制过程,并且在不对称细胞分裂期间在细胞命运确定中起重要作用。失调的Notch信号传导与许多人类癌有关,在这些癌中Notch信号传导可以改变肿瘤细胞的发育命运,将其维持在未分化的增殖状态(Brennan和Brown,2003, Breast Cancer Res. 5:69)。因此,通过篡夺控制着正常发育和由干细胞群进行的组织修复的体内平衡机制,可以导致癌形成。

[0009] 首先在果蝇突变体中鉴定出Notch受体,所述果蝇突变体患有单倍不足,导致翅缘处的缺刻,而功能丧失型产生胚胎致死“神经性”表型,该表型中表皮细胞命运转变成神经组织(Moohr,1919, Genet. 4:252;Poulson,1937, PNAS 23:133;Poulson,1940, J. Exp. Zool. 83:271)。Notch受体是单跨膜的跨膜受体,在大型胞外域内含有许多串联的表皮生长因子(EGF)-样重复和三个富含半胱氨酸的Notch/LIN-12重复(LNR)(Wharton等,1985, Cell 43:567;Kidd等,1986, Mol. Cell. Biol. 6:3094;Artavanis等综述,1999, Science 284:770)。本文还将LNR和胞外域的另外的约103个氨基酸的C末端尾称为“近膜区”。该区域已知也被称为Notch负调节区(NRR)。

[0010] 哺乳动物Notch受体经过切割以形成成熟受体,然后进行配体结合从而激活下游的信号传导。成熟期间弗林蛋白酶(furin)-样蛋白酶切割Notch受体的前体,从而产生近膜异二聚体,该近膜异二聚体包含结合在一起处于自身抑制状态的非共价连接的细胞外亚基和跨膜亚基。配体结合解除了这种抑制并且诱导Notch受体被ADAM-型金属蛋白酶和 $\gamma$ -分泌酶切割,其中 $\gamma$ -分泌酶将胞内域(ICD)释放到细胞质中,使得其易位到细胞核从而激活基因转录。ADAM进行的切割发生在位于近膜负调节区(NRR)内的非配体结合切割域内(参见图1A)。Notch1受体中该区域包括约氨基酸1427~约氨基酸1732。

[0011] 已经鉴定出4种哺乳动物Notch蛋白(Notch1、Notch2、Notch3和Notch4),这些受体中的突变总是导致发育异常和人类病变,所述发育异常和人类病变包括如以下详述的几



种癌症 (Gridley, 1997, *Mol. Cell. Neurosci.* 9 :103; Joutel & Tournier-Lasserre, 1998, *Semin. Cell. Dev. Biol.* 9 :619-25)。

[0012] Notch 受体受 Delta, Serrated, Lag-2 (DSL) 家族的单次跨膜配体激活。哺乳动物中存在 5 种已知的 Notch 配体: Delta-样 1 (DLL1)、Delta-样 3 (DLL3)、Delta-样 4 (DLL4)、Jagged 1 和 Jagged 2, 其特征在于 DSL 域和在胞外域内的串联的 EGF-样重复。Notch 受体的胞外域与通常位于相邻细胞上的其配体的胞外域相互作用, 导致 Notch 的 2 个蛋白水解切割; 一个由 ADAM (A Disintegrin And Metallopeptidase, 解整合素-金属肽酶) 蛋白酶介导的胞外切割和一个由  $\gamma$  分泌酶介导的跨膜域内的切割。后一切割产生 Notch 胞内域 (ICD), 该 Notch 胞内域然后进入细胞核, 在细胞核中其激活 CBF1, Suppressor of Hairless [Su(H)], Lag-2 (CSL) 家族的转录因子, 上述家族的转录因子作为主要下游效应子增加 Hairy 和 Split 增强子 [E(spl)] 家族的细胞核碱性螺旋-环-螺旋转录因子的转录 (Artavanis 等, 1999, *Science* 284 :770; Brennan 和 Brown, 2003, *Breast Cancer Res.* 5 :69; Iso 等, 2003, *Arterioscler. Thromb. Vase. Biol.* 23 :543)。哺乳动物中还可以存在涉及果蝇中鉴定出的胞质蛋白 Deltex 的替代性细胞内途径 (Martinez 等, 2002, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12 :524-33), 并且该 Deltex-依赖性途径可以起到抑制 Wnt 靶基因表达的作用 (Brennan 等, 1999, *Curr. Biol.* 9 :707-710; Lawrence 等, 2001, *Curr. Biol.* 11 :375-85)。

[0013] 造血干细胞 (HSC) 是体内了解最清楚的干细胞, 并且 Notch 信号传导涉及其正常维持以及白血病转化 (Kopper & Hajdu, 2004, *Pathol. Oncol. Res.* 10 :69-73)。HSC 是稀少的细胞群体, 存在于成体骨髓内的间质小生境 (stromal niche) 中。这些细胞的特征在于独特的基因表达图谱和连续产生更加分化的祖细胞以重建整个造血系统的能力。HSC 和祖细胞中的 Notch1 信号传导的组成型激活能够在体外和长期重建测试中建立了同时产生淋巴样细胞和骨髓细胞的永生化细胞系 (Varnum-Finney 等, 2000, *Nat. Med.* 6 :1278-81), 并且 Jagged1 的存在增加相对于 HSC 富集的人类骨髓细胞群的移植 (Karanu 等, 2000, *J. Exp. Med.* 192 :1365-72)。最近, 已经在体内于 HSC 中证明了 Notch 信号传导, 并且其显示参与抑制 HSC 分化。另外, Notch 信号传导似乎是 Wnt-介导的 HSC 自我更新所需要的 (Duncan 等, 2005, *Nat. Immunol.* 6 :314)。

[0014] Notch 信号传导途径还在神经干细胞的维持中起关键作用, 并且涉及其正常维持和脑癌 (Kopper & Hajdu, 2004, *Pathol. Oncol. Res.* 10 :69-73; Purow 等, 2005, *Cancer Res.* 65. 2353 :2353-63; Hallahan 等, 2004, *Cancer Res.* 64 :7794-800)。神经干细胞在发育期间产生哺乳动物神经系统中的所有神经元细胞和神经胶质细胞, 并且最近已经在成体脑中得到鉴定 (Gage, 2000, *Science* 287 :1433-8)。Notch1 缺陷型小鼠、Notch 靶基因 Hes1、3 和 5 缺陷型小鼠; 和 Notch 信号传导早衰蛋白 1 (PS1) 的调节子缺陷型小鼠显示胚胎神经干细胞数量减少。另外, 在 PS1 杂合小鼠脑中成体神经干细胞减少 (Nakamura 等, 2000, *J. Neurosci.* 20 :283-93; Hitoshi 等, 2002, *Genes Dev.* 16 :846-58)。神经干细胞的减少似乎是由于其过早分化成神经元 (Hatakeyama 等, 2004, *Dev.* 131 :5539-50), 表明 Notch 信号传导调节神经干细胞分化和自我更新。

[0015] 异常 Notch 信号传导涉及许多人类癌。人类中的 Notch1 基因首次在 T-细胞急性淋巴母细胞白血病亚类中鉴定为可导致 Notch 途径激活的易位的基因座 (Ellisen 等, 1991, *Cell* 66 :649-61)。小鼠模型中 T 细胞内的 Notch1 信号传导的组成型激活类似地

产生 T- 细胞淋巴瘤,表明了发病原因 (Robey 等,1996, Cell187 :483-92 ;Pear 等,1996, J. Exp. Med. 183 :2283-91 ;Yan 等,2001, Blood98 :3793-9 ;Bellavia 等,2000, EMBO J. 19 :3337-48)。最近已经发现,产生异常 Notch1 信号传导的 Notch1 点突变、插入和缺失经常存在于儿童和成人 T 细胞急性淋巴母细胞白血病 / 淋巴瘤中 (Pear & Aster, 2004, Curr. Opin. Hematol. 11 :416-33)。

[0016] 小鼠乳腺癌病毒在乳腺癌的 Notch1 和 Notch4 基因座中的频繁插入以及所导致的活化 Notch 蛋白片段首先涉及乳癌中的 Notch 信号传导 (Gallahan & Callahan, 1987, J. Virol. 61. 66-74 ;Brennan & Brown, 2003, Breast Cancer Res. 5 :69, Politi 等, 2004, Semin Cancer Biol. 14 :341-7)。转基因小鼠中的进一步研究已经确认了 Notch 在正常乳腺发育期间的导管分支 (ductal branching) 中的作用,并且在乳房上皮细胞中 Notch4 的组成型激活形式抑制上皮分化和导致肿瘤发生 (Jhappan 等, 1992, Genes & Dev. 6:345-5 ;Gallahan 等, 1996, Cancer Res. 56:1775-85, Smith 等, 1995, Cell Growth Differ 6 :563-77, Soriano 等, 2000, Int. J. Cancer 86 :652-9, Uyttendaele 等, 1998, Dev Biol. 196. 204-17 ; Politi 等, 2004, Semin Cancer Biol. 14 341-7)。目前 Notch 在人类乳癌中作用的证据局限于 Notch 受体在乳癌中的表达及其与临床结果的关联性 (Weijzen 等, 2002, Nat. Med. 8 :979-86, Parr 等, 2004, Int. J. Mol. Med. 14 :779-86)。另外,在宫颈癌 (Zagouras 等, 1995, PNAS 92 :6414-8)、肾细胞癌 (Rae 等, 2000, Int. J. Cancer 88 :726-32)、头颈鳞状细胞癌 (Leethanakul 等, 2000, Oncogene 19 :3220-4)、子宫内膜癌 (Suzuki 等, 2000, Int. J. Oncol. 17 1 131-9) 和神经母细胞瘤 (van Limpt 等, 2000, Med. Pediatr. Oncol. 35 :554-8) 中已经观察到 Notch 途径的过表达,表明 Notch 在许多赘生物的发生中具有潜在作用。令人感兴趣的是,Notch 信号传导可能在结肠的 Ape- 突变赘生性细胞的未分化状态的维持中起作用 (van Es & Clevers, 2005, Trends in Mol. Med. 11 :496-502)。

[0017] Notch 途径还涉及血管发育的多个方面,包括增殖、迁移、平滑肌分化、血管发生和动脉 - 静脉分化 (Iso 等, 2003, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 23 :543)。例如,在动脉发育和卵黄囊血管形成中, Notch1/4 和 Jagged1 的纯合型无效突变以及 DLL4 的杂合丧失导致严重但是可变的缺陷。另外, DLL 1- 缺陷和 Notch-2- 减效小鼠胚胎显示出血,这可能是由于血管结构的不良发育 (Gale 等, 2004, PNAS, 101 :15949-54 ;Krebs 等, 2000, Genes Dev. 14 :1343-52 ;Xue 等, 1999, Hum. Mol. Genet 8 :723-30 ;Hrabe de Angelis 等, 1997, Nature 386 :717-21 ;McCright 等, 2001, Dev. 128 :491-502)。人类中, Jagged 1 的突变与阿拉吉耶综合征 (Alagille syndrome, 一种包括血管缺陷的发育障碍) 相关, Notch 3 的突变是遗传性血管性痴呆 (Cadasil) (其中血管体内平衡有缺陷) 的原因 (Joutel 等, 1996, Nature 383:707-10)。

[0018] 将 Notch1、Notch4、DLL1 和 DLL4 鉴定为在癌干细胞 (相对于正常乳腺上皮) 中表达的基因表明,靶向 Notch 途径不仅能够帮助消除大多数非致瘤性癌细胞,还能够帮助消除负责实体瘤的形成和复发的致瘤性细胞。另外,由于血管发生在肿瘤形成和维持中的显著作用,靶向 Notch 途径还可以有效地抑制血管发生,使癌缺乏营养物,并有助于其消除。

[0019] 已经报道了抗 -Notch 抗体及其作为抗癌治疗剂的可能应用。例如参见美国专利申请公开第 2008/0131434 号和第 2009/0081238 号,通过参考将其中每一篇整体并入本文。还参见国际公开 WO 2008/057144、WO 2008/076960 和 WO 2008/50525。

## 发明内容

[0020] 本发明提供可与 Notch1 受体的胞外域的非配体结合近膜区结合的试剂,以及包含所述试剂的组合物,例如药物组合物。本发明还提供使用所述试剂靶向癌干细胞的方法。在某些实施方式中,所述方法包括减少癌干细胞在肿瘤中的频率,减少癌干细胞在肿瘤中的数量,减少肿瘤的致瘤性,和/或通过减少癌干细胞在肿瘤中的数量或频率来减少肿瘤的致瘤性。本发明还提供在治疗癌和/或抑制肿瘤生长中使用所述试剂的方法。

[0021] 在一方面,本发明提供与 Notch1 受体(例如人类 Notch1)的胞外域的非配体结合近膜区特异性结合的抗体。在某些实施方式中,Notch1 受体的非配体结合近膜区包含人类 Notch1 受体的约氨基酸 1427 ~ 约氨基酸 1732。在某些实施方式中,Notch1 受体的近膜区包含 SEQ ID NO :2。在特定实施方式中,所述抗体与至少一个其它 Notch 受体家族成员的胞外域的非配体结合近膜区特异性结合。

[0022] 在某些实施方式中所述抗体是 Notch1 的拮抗剂。在某些实施方式中,所述抗体通过 Notch1 受体的激活抑制信号传导。在某些实施方式中,所述抗体抑制 Notch1 活性。在某些实施方式中,所述抗体抑制所述近膜区内的切割。在特定实施方式中,所述抗体抑制 Notch1 受体的切割(例如通过金属蛋白酶在 S2 位点的切割)和/或通过配体结合抑制 Notch1 受体的激活。在某些实施方式中,所述抗体抑制 Notch1 的胞内域(ICD)的释放或形成。在特定实施方式中,所述抗体抑制肿瘤生长。

[0023] 在特定实施方式中,本发明提供与人类 Notch1 的胞外域的非配体结合近膜区结合的抗体,所述抗体包含含有 RGYWIE (SEQ ID NO :15) 的重链 CDR1、含有 QILPGTGRTNYNEKFKG (SEQ ID NO :16) 的重链 CDR2 和/或含有 FDGNYGYAMDY (SEQ ID NO :17) 的重链 CDR3 ;和/或 (b) 含有 RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO :18) 的轻链 CDR1、含有 GTNNRAP (SEQ ID NO :19) 的轻链 CDR2 和/或含有 ALWYSNHWFVGGGTKL (SEQ ID NO :20) 的轻链 CDR3。在某些实施方式中,所述抗体包含重链可变区,所述重链可变区包括:(a) 含有 RGYWIE (SEQ ID NO :15) 的重链 CDR1,或包含 1、2、3 或 4 个氨基酸取代的其变体;(b) 含有 QILPGTGRTNYNEKFKG (SEQ ID NO :16) 的重链 CDR2,或包含 1、2、3 或 4 个氨基酸取代的其变体;和/或 (c) 含有 FDGNYGYAMDY (SEQ ID NO :17) 的重链 CDR3,或包含 1、2、3 或 4 个氨基酸取代的其变体。在某些其它实施方式中,所述抗体包含(或还包含)轻链可变区,所述轻链可变区包括:(a) 含有 RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO :18) 的轻链 CDR1,或包含 1、2、3 或 4 个氨基酸取代的其变体;(b) 含有 GTNNRAP (SEQ ID NO :19) 的轻链 CDR2,或包含 1、2、3 或 4 个氨基酸取代的其变体;和/或 (c) 含有 ALWYSNHWFVGGGTKL (SEQ ID NO :20) 的轻链 CDR3,或包含 1、2、3 或 4 个氨基酸取代的其变体。在某些实施方式中,所述氨基酸取代是保守性氨基酸取代。

[0024] 在某些实施方式中,本发明提供通过杂交瘤细胞系产生的抗体,52M51,所述杂交瘤细胞系于 2008 年 8 月 7 日根据布达佩斯条约的规定保藏在位于 10801 University Boulevard, Manassas, VA, USA 的美国典型培养物保藏中心(ATCC),并赋予保藏号 PTA-9405。在某些实施方式中,本发明提供通过 DNA 编码的抗体 52M51 的人源化版本,52M51H4L3,所述 DNA 于 2008 年 10 月 15 日根据布达佩斯条约的规定保藏在 ATCC,并赋予保藏号 PTA-9549。在某些实施方式中,本发明提供的抗体所结合的表位与抗体 52M51 所结合

的表位相同。

[0025] 在另一方面,本发明提供与人类 Notch1 的胞外域的非配体结合近膜区结合的抗体,所述抗体包含由 DNA 编码的抗体“52R43”,或由抗体“52R43”组成,或基本上由抗体“52R43”组成,所述 DNA 于 2008 年 10 月 15 日根据布达佩斯条约的规定保藏在 ATCC,并赋予保藏号 PTA-9548。在某些实施方式中,本发明提供了与 52R43 竞争以与人类 Notch1 的胞外域的非配体结合近膜区特异性结合的抗体。还提供了包含 52R43 的药物组合物和治疗癌的方法,所述方法包括施用治疗有效量的 52R43 抗体。

[0026] 在特定实施方式中,本发明提供了与上述实施方式和 / 或方面,以及本文别处所述其它方面 / 实施方式中所述的任何抗体竞争以与人类 Notch1 的胞外域的非配体结合近膜区特异性结合(例如在竞争性结合检测中)的抗体。还提供了包含本文所述抗体的药物组合物和治疗癌的方法,所述方法包括施用治疗有效量的所述抗体。

[0027] 在上述方面或实施方式、以及本文别处所述其它方面和 / 或实施方式中各项的特定实施方式中,所述抗体是重组抗体。在某些实施方式中,所述抗体是单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体或人类抗体。在特定实施方式中,所述抗体是抗体片段。在特定实施方式中,所述抗体或抗体片段是单价、单特异性、双价、双特异性或多特异性的。在特定实施方式中,所述抗体与细胞毒性基团(cytotoxic moiety)缀合。在特定实施方式中,所述抗体是分离的。在其它实施方式中,所述抗体基本上是纯化的。

[0028] 还提供了包含本文所述抗体的药物组合物和治疗癌的方法,所述方法包括施用治疗有效量的本文所述抗体。在特定实施方式中,所述药物组合物还包含药学上可接受的载体。

[0029] 在另一方面,本发明提供了多肽。在某些实施方式中,多肽是抗体(例如特异性结合 Notch1 的抗体)、抗体的重链或轻链,和 / 或抗体的片段。在某些实施方式中,多肽是分离的。在特定实施方式中,多肽基本上是纯化的。在某些实施方式中,多肽包含氨基酸序列 SEQ ID NO :8、SEQ ID NO :14、SEQ ID NO :24、SEQ ID NO :28 或 SEQ ID NO :32。在某些实施方式中,多肽包含氨基酸序列 SEQ ID NO :14 或 SEQ ID NO :24 和 / 或氨基酸序列 SEQ ID NO :8、SEQ ID NO :28 或 SEQ ID NO :32。在某些实施方式中,多肽包含氨基酸序列 SEQ ID NO :14 或 SEQ ID NO :24 的至少一部分,和 / 或氨基酸序列 SEQ ID NO :8、SEQ ID NO :28 或 SEQ ID NO :32 的至少一部分。还提供了同时包含多肽和药学上可接受的载剂的药物组合物,以及产生所述多肽的细胞系。

[0030] 在某些实施方式中,所述多肽包含:(a) 与 SEQ ID NO :14 或 SEQ ID NO :24 具有至少约 80% 序列同一性的多肽;和 / 或 (b) 与 SEQ ID NO :8、SEQ ID NO :28 或 SEQ ID NO :32 具有至少约 80% 序列同一性的多肽。在特定实施方式中,多肽是抗体(例如,与人类 Notch1 的胞外域的非配体结合近膜区特异性结合的抗体)。在特定实施方式中,所述多肽包含与 SEQ ID NO :14、SEQ ID NO :24、SEQ ID NO :8、SEQ ID NO :28 或 SEQ ID NO :32 具有至少约 85%,至少约 90%,至少约 95%,至少约 98%,或约 100% 序列同一性的多肽。在特定实施方式中,所述多肽包含 52M51 抗体的重链可变区和 / 或轻链可变区。在某些实施方式中,所述多肽包含人源化 52M51 抗体的重链可变区和 / 或轻链可变区。在某些实施方式中,所述多肽包含抗体 52R43 的重链可变区和 / 或轻链可变区。

[0031] 在另一方面,本发明提供编码上述方面以及本文所述其它方面 / 实施方式的任何

抗体和 / 或多肽的多核苷酸分子。在某些实施方式中,表达载体包含所述多核苷酸分子。在其它实施方式中,宿主细胞包含所述表达载体。在某些实施方式中,宿主细胞包含所述多核苷酸分子。在某些实施方式中,所述宿主细胞是细胞系或杂交瘤细胞系。在特定实施方式中,所述杂交瘤细胞系产生 52M51 抗体或人源化 52M51 抗体。

[0032] 在其它方面,本发明提供了抑制细胞中 Notch1 的活性的方法,所述方法包括使所述细胞与有效量的上述方面和实施方式,以及本文别处所述其它方面 / 实施方式中所述的任何抗体或多肽接触。在特定实施方式中,所述细胞是肿瘤细胞。

[0033] 在另一方面,本发明提供了抑制受试对象中肿瘤生长的方法,所述方法包括对受试对象施用治疗有效量的上述方面和实施方式,以及本文别处所述其它方面 / 实施方式中所述的任何抗体或多肽。在某些实施方式中,所述肿瘤包含癌干细胞。在某些实施方式中,所述方法包括使用抗体靶向所述癌干细胞。在特定实施方式中,所述方法包括减少癌干细胞在肿瘤中的频率,减少癌干细胞在肿瘤中的数量,减少肿瘤的致瘤性,和 / 或通过减少癌干细胞在肿瘤中的数量或频率来减少肿瘤的致瘤性。在某些实施方式中,所述方法包括抑制 Notch1 受体的活性和 / 或抑制肿瘤生长。在特定实施方式中,所述肿瘤选自乳肿瘤、结直肠肿瘤、肝肿瘤、肾肿瘤、肺肿瘤、胰腺肿瘤、卵巢肿瘤、前列腺肿瘤以及头颈部肿瘤组成的组。

[0034] 在另一方面,本发明提供一种治疗受试对象的癌的方法。在某些实施方式中,所述方法包括对受试对象施用治疗有效量的上述方面和实施方式,以及本文别处所述其它方面 / 实施方式中所述的任何抗体或多肽。在某些实施方式中,待治疗的癌是乳癌、结直肠癌、肝癌 (hepatic cancer)、肾癌、肝脏癌 (liver cancer)、肺癌、胰腺癌、胃肠癌、黑色素瘤、卵巢癌、前列腺癌、宫颈癌、膀胱癌、成胶质细胞瘤以及头颈部癌。在上述方面或实施方式、以及本文别处所述其它方面和 / 或实施方式中各情况的特定实施方式中,所述治疗癌的方法包括抑制肿瘤生长。

[0035] 在另外方面,本发明提供了抑制受试对象中肿瘤生长的方法,所述方法包括对受试对象施用治疗有效量的与人类 Notch1 的胞外域的非配体结合近膜区特异性结合的抗体,其中结合抑制 Notch1 的活性。

[0036] 在其它方面,本发明提供通过减少癌干细胞在肿瘤中的频率或数量来减少包含癌干细胞的肿瘤的致瘤性的方法,所述方法包括使所述肿瘤与有效量的抑制 Notch1 活性的抗体接触。

[0037] 在上述方面或实施方式、以及本文所述其它方面和 / 或实施方式中各情况的特定实施方式中,所述方法还包括对受试对象施用至少一种其它抗癌剂和 / 或治疗剂。在上述方面或实施方式、以及本文别处所述其它方面和 / 或实施方式中各情况的特定实施方式中,将所述抗体或多肽与用于癌的另一治疗对受试对象组合施用。在特定实施方式中,所述用于癌的另一治疗包括放射治疗、化学治疗和 / 或其它抗体治疗剂。在特定实施方式中,所述化学治疗包括紫杉醇 (taxol)、伊立替康、吉西他滨和 / 或奥沙利铂。在特定实施方式中,所述其它抗体治疗剂是特异性结合第二人类 Notch 受体 (例如, Notch2) 或人类 Notch 受体配体 (例如 DLL4 或 JAG1) 的抗体。在特定实施方式中,所述其它抗体治疗剂是特异性结合 VEGF 的抗体。在特定实施方式中,治疗的受试对象是人。

[0038] 本发明还提供治疗人类的癌的方法,其中包含癌干细胞的所述癌的特征不在于癌

干细胞过表达一种或多种 Notch 受体,所述方法包括对人类施用治疗有效量的抗体,所述抗体与 Notch1 受体的胞外域的近膜区结合并且阻断 Notch1 受体的配体激活。

[0039] 本发明还提供治疗人类的癌的方法,所述方法包括对人类施用治疗有效量的 (a) 结合 Notch1 受体并抑制过表达 Notch 受体的癌干细胞的生长的第一抗体;和 (b) 结合 Notch1 受体并阻断 Notch 受体的配体激活的第二抗体。

[0040] 本发明还提供另一治疗癌的方法,其中所述癌选自自由乳癌、结肠癌、胰腺癌、前列腺癌、肺癌、直肠癌和结直肠癌组成的组,所述方法包括施用治疗有效量的阻断 Notch1 受体的配体激活的抗体。

[0041] 本发明另外提供:结合 Notch1 并阻断 Notch1 受体的配体激活的人源化抗体;包含所述人源化抗体和药学上可接受的载体的组合物;以及包含缀合有细胞毒性剂的人源化抗体的免疫缀合物。

[0042] 另外,本发明提供编码所述人源化抗体的分离的多核苷酸;包含所述核酸的载体;包含所述核酸或载体的宿主细胞;以及生产所述人源化抗体的方法,所述方法包括培养包含所述核酸的宿主细胞,从而表达所述核酸,并且可选地还包括从宿主细胞培养物(例如从宿主细胞培养基)回收所述人源化抗体。

[0043] 本发明还涉及包含与一个或多个加利车霉素分子缀合的结合 Notch 的抗体的免疫缀合物,和所述缀合物在治疗表达 Notch 的癌,例如其中癌细胞过表达 Notch 的癌中的应用。

[0044] 可以使用本发明的治疗组合物(例如,结合 Notch1 受体的胞外域的近膜区的抗体)治疗的实体瘤的实例包括,但不限于肉瘤和癌,例如纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、骨源性肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤因氏瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、胰腺癌、乳癌、卵巢癌、前列腺癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝癌、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎性癌、维尔姆斯瘤、宫颈癌、睾丸瘤、肺癌、小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神经胶质瘤、星形细胞瘤、成神经管细胞瘤、颅咽管瘤、室鼓膜瘤、松果体瘤、成血管细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质瘤、脑膜瘤、黑素瘤、成神经细胞瘤和成视网膜细胞瘤。

[0045] 在根据马库什组或可选择要素的其它分组描述了本发明的方面或实施方式的情况下,本发明不仅包括作为整体列出的整个组,还个别地包括该组的各成员和主要组的所有可能亚组,以及缺少一个或多个组成员的主要组。本发明还预见到明确排除要求保护的发明中任何组成员中的一个或多个。

## 附图说明

[0046] 图 1- 抑制 Notch 信号传导的靶向 Notch 的近膜区的抗体的鉴定。

[0047] (A) Notch 受体和 52M 抗原区的图示。所述 52M 抗原包括 Notch1 受体在受体成熟期间经受弗林蛋白酶切割和在配体结合后经受 ADAM (A Disintegrin And Metalloproteinase, 解整合素-金属肽酶) 蛋白酶切割的区域。随后通过  $\gamma$ -分泌酶进行的加工引起在细胞核中激活基因转录的 Notch 的胞内域 (ICD) 的释放。(B) 在可溶性 Notch 配体 (hDLL4-fc) 和 Notch1 受体抗体存在下所培养的 Notch1-HeLa 细胞生成的荧光素酶水平 (y 轴)。来自带

有或不带有 hDLL4-Fc 的未转染 (NT) 细胞的结果示于 x 轴的最左边。52M Notch1 受体抗体沿着 x 轴显示, 并且与 DBZ (一种 Notch  $\gamma$ -分泌酶抑制剂 (GSI)) 和 21M18 (一种抗 -DLL4 抗体) 比较。荧光素酶活性下降表明, Notch1 受体抗体 52M51、52M63、52M74 和 52M80 都显著地抑制 Notch 信号传导。(C) 在可溶性 Notch 配体 (hDLL4-fc) 和 Notch1 受体抗体存在下所培养的 Notch1-HeLa 细胞生成的荧光素酶水平 (y 轴)。来自带有或不带有 hDLL4-Fc 的未转染 (NT) 细胞的结果示于 x 轴的最左边。52M51 鼠类杂交瘤产生的抗体和人源化变体 52M51-H4/L3 以所示的各种浓度沿着 x 轴显示。荧光素酶活性下降表明, 亲本鼠类抗体 52M51 和人源化变体都显著地抑制 Notch 信号传导。(D) 对表达 Notch1 的 HeLa 细胞进行配体-介导的刺激后的 ICD 形成的蛋白质印迹分析。在不存在 DLL4 配体 (-DLL4) 时产生最小 ICD, 但是 DLL4 的存在刺激形成。虽然存在 DLL4, 但是抗体 52M51、52M63、52M74 和 52M80 将 ICD 形成减少至背景水平。

[0048] 图 2: Notch1 受体抗体 52M51 抑制体内的肿瘤形成。

[0049] (A) 用对照抗体 (正方形)、或抗 Notch1 抗体 52M51 (三角形) 治疗注射有 C8 结肠肿瘤细胞的 NOD/SCID 小鼠, 并且测定肿瘤随时间 (x 轴, 天) 的体积 (y 轴,  $\text{mm}^3$ )。与对照相比, 用 52M51 抗体进行的治疗显著地 ( $p = 0.0006$ ) 抑制肿瘤生长。(B) 对于对照 (左) 或 52M51 (右) 治疗的小鼠在 48 天和 55 天时测定的来自 (A) 中动物的各肿瘤体积测定结果。用线划定各实验组的平均值。(C) 对照抗体 (黑色正方形) 或如图 1B 所示的不抑制 Notch 信号传导的抗 -Notch1 抗体: 52M1 (黑色三角形) 和 52M2 (灰色圆形) 治疗注射有 PE13 乳肿瘤细胞的 NOD/SCID 小鼠。测定肿瘤随时间 (x 轴, 天) 的体积 (y 轴,  $\text{mm}^3$ )。与对照治疗的动物相比时, 用 52M1 和 52M2 进行的治疗不能影响肿瘤生长。(D) 用对照抗体 (正方形) 或如图 1B 所示的不抑制 Notch 信号传导的抗 -Notch1 抗体 52M8 (三角形) 治疗注射有 PE13 乳肿瘤细胞的 NOD/SCID 小鼠。测定肿瘤随时间 (x 轴, 天) 的体积 (y 轴,  $\text{mm}^3$ )。当与对照治疗的动物相比时, 用 52M8 进行的治疗不能影响肿瘤生长。

[0050] 图 3: 抗 -Notch1 受体抗体 52R43 抑制体内的肿瘤生长。

[0051] (A) 用对照抗体 (正方形) 或抗 -Notch1 抗体 52R43 (圆形) 治疗注射有 M2 黑色素瘤肿瘤细胞的 NOD/SCID 小鼠, 并且测定肿瘤随时间 (x 轴, 天) 的体积 (y 轴,  $\text{mm}^3$ )。(B) 用对照抗体 (正方形) 或抗 -Notch1 抗体 52R43 (圆形) 治疗注射有 Lu24 肺肿瘤细胞的 NOD/SCID 小鼠, 并且测定肿瘤随时间 (x 轴, 天) 的体积 (y 轴,  $\text{mm}^3$ )。(C) 用对照抗体 (正方形) 或抗 -Notch1 抗体 52R43 (圆形) 治疗注射有 PN8 胰腺肿瘤细胞的 NOD/SCID 小鼠, 并且测定肿瘤随时间 (x 轴, 天) 的体积 (y 轴,  $\text{mm}^3$ )。(D) 用对照抗体 (正方形)、抗 -Notch1 抗体 52R43 (实心圆形)、紫杉醇 (三角形) 或 52R43 和紫杉醇 (空心圆形) 治疗注射有 T1 乳肿瘤细胞的 NOD/SCID 小鼠, 并且测定肿瘤随时间 (x 轴, 天) 的体积 (y 轴,  $\text{mm}^3$ )。

### 具体实施方式

[0052] 本发明提供了结合一种或多种人类 Notch 受体的新型试剂, 包括但不限于诸如抗体等多肽。所述 Notch- 结合剂包括人类 Notch 受体的拮抗剂。还提供了相关的多肽和多核苷酸, 包含 Notch- 结合剂的组合物, 以及制备 Notch- 结合剂的方法。还提供了使用所述新型 Notch- 结合剂的方法, 例如抑制肿瘤生长和 / 或治疗癌的方法。

[0053] 本发明还鉴定了与人类 Notch1 受体的胞外域的非配体结合近膜区特异性结合并

抑制体内肿瘤生长的分子（例如抗体）。已经将是配体结合充要条件的 Notch 的配体结合区，鉴定为 EGF 重复 11 和 12，表明 Notch 受体的该区在 Notch 信号传导和肿瘤发生中是重要的（Rebay 等，1991，Cell 67 :687 ;Lei 等，2003，Dev. 130-6411，Hambleton 等，2004，Structure 12 :2173）。预料之外的是，已经发现在人类 Notch 受体的胞外域的配体结合域外部结合的抗体抑制体内肿瘤细胞生长（参见美国专利公开第 2008/0131434 号，通过引用将其整体并入本文）。因此，在一种或多种人类 Notch 受体 -Notch1、Notch2、Notch3 和 Notch4- 的胞外域的配体结合域外部结合的抗体具有作为潜在的癌治疗剂的价值。

[0054] 现在已经鉴定出与 Notch1 的胞外域的近膜区特异性结合的单克隆抗体，包括单克隆抗体 52M51（实施例 1）。还产生了人源化 52M51 抗体（实施例 2）。包括 52M51 和 52M51 的人源化变体在内的几种抗体，虽然与 Notch1 在配体结合区外的区域中结合，但是抑制配体 - 诱导的 Notch1 信号传导（实施例 3，图 1B 和图 1C）。现在还已经表明几种抗体抑制 Notch 胞内域（ICD）的形成的能力（实施例 3 和图 1D）。已经发现 52M51 在异种移植物模型中抑制体内肿瘤细胞生长（实施例 5 以及图 2A 和图 2B）。另外，已经发现另一抗体 52R43 在多种异种移植物模型中抑制体内肿瘤细胞生长（实施例 7 和图 3A- 图 3D）。

[0055] 定义

[0056] 本文使用的 Notch 受体的“拮抗剂”是包括部分或全部阻断、抑制或中和 Notch 途径的生物学活性的任何分子的术语。合适的拮抗剂分子特别包括拮抗性抗体或抗体片段。本文使用术语“拮抗剂”来包括部分或全部阻断、抑制活中和 Notch 受体的表达的任何分子。

[0057] 使用术语“抗体”来指通过至少一个位于免疫球蛋白分子的可变区内的抗原识别位点，识别和特异性结合诸如蛋白、多肽、肽、糖类、多核苷酸、脂质或上述物质的组合等靶标的免疫球蛋白分子。如本文所用，该术语包括完整的多克隆抗体、完整的单克隆抗体、抗体片段（例如 Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub> 和 Fv 片段）、单链 Fv (scFv) 突变体、由至少两个完整抗体产生的诸如双特异性抗体等多特异性抗体、单价或单特异性抗体、嵌合抗体、人源化抗体、人类抗体、包含抗体的抗原决定部分的融合蛋白、任何其它包含抗原识别位点的经修饰免疫球蛋白分子，只要所述抗体显示所需的生物活性。基于分别称为  $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\gamma$  和  $\mu$  的抗体重链恒定域的同源性，抗体可以是五个主要种类免疫球蛋白中的任一种：IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM，或其亚类（同型）（例如，IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2）。不同种类的免疫球蛋白具有不同的众所周知的亚基结构和三维构造。抗体可以是裸露的或与诸如毒素、放射性同位素等其它分子缀合。

[0058] 如本文所用，术语“抗体片段”表示完整抗体的一部分，和表示完整抗体的抗原性决定可变区。抗体片段的实例包括，但不限于 Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub> 和 Fv 片段、线性抗体、单链抗体和由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0059] “Fv 抗体”是指含有完整抗原识别和抗原结合位点的最小抗体片段，可以是其中一个重链和一个轻链可变域形成非共价二聚体的双链，也可以是其中一个重链和一个轻链可变域通过柔性肽连接子共价连接的单链 (scFv)，从而使得 2 条链以类似的二聚结构连接。在该构造中各可变域的互补决定区 (CDR) 相互作用从而限定出 Fv 二聚体的抗原结合特异性。作为选择，可以使用单可变域（或 Fv 的一半）来识别和结合抗原，虽然通常而言亲和性较低。



[0060] 本文所用的“单克隆抗体”是指涉及高度特异性识别和结合单抗原决定簇（或表位）的同源性抗体群。这与通常包括针对不同抗原决定簇的不同抗体的多克隆抗体相反。术语“单克隆抗体”包括完整的全长单克隆抗体以及抗体片段（例如，Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv）、单链（scFv）突变体、包含抗体部分的融合蛋白和任何其它包含抗原识别位点的经修饰免疫球蛋白分子。另外，“单克隆抗体”是指以包括但不限于通过杂交瘤、噬菌体选择、重组表达和转基因动物在内的任何数量的方式制得的此类抗体。

[0061] 如本文所用，术语“人源化抗体”是指非人类（例如鼠类）抗体的形式，其为含有最小非人类序列的特异性免疫球蛋白链、嵌合免疫球蛋白或其片段。通常而言，人源化抗体是其中互补决定区（CDR）的残基被非人类物种（例如小鼠、大鼠、兔、仓鼠等）的具有所需特异性、亲和性和/或能力的 CDR 的残基置换的人类免疫球蛋白。在某些情况下，人类免疫球蛋白的 Fv 框架区（FR）残基被来自非人类物种的具有所需特异性、亲和性和/或能力的抗体中的相应残基置换。可以通过在 Fv 框架区中和/或在经置换的非人类残基内取代另外的残基而进一步修饰所述人源化抗体，从而改进和优化抗体特异性、亲和性和/或能力。通常，人源化抗体会包含基本上不少于（all of）至少一个，通常两个或三个可变域，所述可变域含有所有，或基本上所有的与非人类免疫球蛋白对应的 CDR 区，而所有，或基本上所有的 FR 区是人类免疫球蛋白共有序列的 FR 区。所述人源化抗体还可以包含免疫球蛋白（通常为人类免疫球蛋白）恒定区或域（Fc）的至少一部分。用于产生人源化抗体的方法的实例描述于美国专利第 5, 225, 539 号，通过参考将其并入本文。

[0062] 抗体的“可变区”是指单独的或组合的抗体轻链的可变区和/或抗体重链的可变区。重链和轻链的可变区各由通过三个还称为高变区的互补决定区（CDR）连接的四个框架区（FR）组成。各链中的 CDR 通过 FR 邻近（in close proximity）保持在一起，并且与来自另一链的 CDR 帮助形成抗体的抗原结合位点。至少有两种用于确定 CDR 的技术：(1) 基于跨物种序列变异性的方法（即，Kabat 等，Sequences of Proteins of Immunological Interest，第 5 版，1991，National Institutes of Health, Bethesda Md.）；和 (2) 基于抗原-抗体复合物的晶体学研究的方法（Al-lazikani 等，1997，J. Molec. Biol. 273 :927-948）。另外，本领域有时使用这两种方法的组合来确定 CDR。

[0063] 本文使用的术语“人类抗体”是指由人类产生的抗体或通过使用本领域已知的任何技术制备的具有与由人类产生的抗体相应的氨基酸序列的抗体。人类抗体的该定义包括完整或全长抗体、其片段和/或包含至少一个人类重链和/或轻链多肽的抗体，例如，包含鼠类轻链和人类重链多肽的抗体。

[0064] 术语“嵌合抗体”是指其中免疫球蛋白分子的氨基酸序列源自两个以上物种的抗体。通常而言，轻链和重链的可变区对应于源自一个哺乳动物物种（例如，小鼠、大鼠、兔等）的具有所需特异性、亲和性和/或能力的抗体的可变区，而恒定区与源自另一物种（通常是人类）的抗体中的序列具有同源性，从而避免引发该物种中的免疫应答。术语嵌合抗体包括单价、双价和多价抗体。

[0065] 术语“表位”或“抗原决定簇”在本文中可相互替换地使用，并且是指抗原的能够被特定抗体识别和特异性结合的那部分。当抗原是多肽时，表位可由连续的氨基酸形成和由通过蛋白的三级折叠而并置的不连续氨基酸形成。当蛋白变性时通常会保留由连续的氨基酸形成的表位（还称为线性表位），而当蛋白变性时通常会失去通过三级折叠形成的表位

(还称为构象性表位)。在单独空间构象中表位通常包括至少 3 个,或更经常至少 5 个或 8 个至 10 个氨基酸。

[0066] 抗体与表位或受体“选择性结合”或“特异性结合”是指抗体与该表位或受体的反应或结合比与其它物质(包括不相关蛋白)的反应或结合更频繁、更迅速、持久性更高、亲和性更高或上述情况的某些组合。“选择性结合”或“特异性结合”例如是指,抗体与蛋白结合的  $K_D$  为约 0.1mM 以下,有时为约 1  $\mu$ M 以下,有时为约 0.1  $\mu$ M 以下或有时为约 0.01  $\mu$ M 以下。由于不同物种中同源性蛋白之间的序列同一性,特异性结合可以包括识别超过一个物种中 Notch 受体的抗体。应该理解,在特定实施方式中,与第一靶标特异性结合的抗体或结合部分可以与第二靶标特异性结合或不与第二靶标特异性结合。这样,“特异性结合”不必然地要求(尽管其可以包括)专一性结合,即,与单个靶标的结合。通常而言,但不是必然地,结合是指特异性结合。

[0067] 通过其中所研究的免疫球蛋白抑制参照抗体与通用抗原的特异性结合的检测来确定抗体之间的竞争。已知许多类型的竞争性结合检测,例如:固相直接或间接放射免疫检测(RIA)、固相直接或间接酶免疫检测(EIA)、夹心竞争检测(参见 Stahh 等, *Methods in Enzymology* 9:242-253(1983));固相直接生物素-亲和素 EIA(参见 Kirkland 等, *J. Immunol.* 137:3614-3619(1986));固相直接标记的检测、固相直接标记的夹心检测(参见 Harlow 和 Lane, "Antibodies, A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Press(1988));使用  $^{125}$ I 标签的固相直接标记 RIA(参见 Morel 等, *Molec. Immunol.* 25(1):7-15(1988));固相直接生物素-亲和素 EIA(Cheung 等, *Virology* 176:546-552(1990));和直接标记的 RIA(Moldenhauer 等, *Scand. J Immunol* 32:77-82(1990))。通常而言,所述检测包括使用与固体表面或携带未标记的测试免疫球蛋白和经标记的参照免疫球蛋白中任一细胞结合的经纯化抗原。通过确定在测试免疫球蛋白的存在下与固体表面或细胞结合的标签的量来测定竞争性抑制。通常测试免疫球蛋白是过量存在的。通过竞争检测鉴定出的抗体(竞争性抗体)包括与参照抗体结合相同表位的抗体,和与相邻表位结合的抗体,该相邻表位与参照抗体所结合的表位足够近,从而使得出现空间位阻。通常而言,当竞争性抗体过量存在时,其会将参照抗体与通用抗原的特异性结合抑制至少 50%或 75%。

[0068] 术语“分离的”或“纯化的”是指实质上或基本上不含在该材料的天然状态下通常附带的组分材料。通常使用诸如聚丙烯酰胺凝胶电泳或高效液相色谱等分析化学技术确定纯度和均一性。作为制剂中存在的主要物种(species)的蛋白(例如抗体)或核酸是基本上纯的。特别地,在某些实施方式中,将包含基因的分离的核酸与开放阅读框分离,所述开放阅读框天然地位于所述基因侧翼并且编码除了由所述基因编码的蛋白之外的蛋白。将分离的抗体与其它非免疫球蛋白和其它具有不同抗原结合特异性的免疫球蛋白分离。其还可以指核酸或蛋白具有至少 85%的纯度、具有至少 95%的纯度和在某些实施方式中,具有至少 99%的纯度。

[0069] 如本文所用,术语“癌(cancer)”或“癌性的(cancerous)”是指或描述其中一群细胞的特征在于失调的细胞生长的哺乳动物中的生理状况。癌的实例包括,但不限于,癌、淋巴瘤、母细胞瘤、肉瘤和白血病。更特别地,所述癌的实例包括,但不限于,鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌、肺鳞状细胞癌、腹膜癌、肝细胞癌、胃肠癌、胰腺癌、成胶质细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝脏癌、膀胱癌、肝细胞瘤、乳癌、结肠癌、结直肠癌、子宫内膜癌或

子宫癌、唾液腺癌、肾癌、肝脏癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌和各种类型的头颈癌。

[0070] 本文所用的“肿瘤”和“赘生物”是指任何由过度的细胞生长或增殖导致的组织的团块,其可以是良性的(非癌的)或恶性的(癌的),包括癌前病变。

[0071] 术语“增殖性障碍”和“增殖性疾病”是指与异常细胞增殖有关的障碍,如癌。

[0072] 本文所用的“转移”是指癌从原始位置扩散或转移到身体的其它区域的过程,并且伴随着位于新位置处的类似的癌病变的发生。“转移”或“转移性”细胞是失去与相邻细胞的粘附接触并且经由血流或淋巴从疾病的原发位置迁移从而侵袭邻近的身体结构的细胞。

[0073] 术语“癌干细胞”或“肿瘤干细胞”或“实体瘤干细胞”在本文中可相互替换地使用,并且指具有以下性质的实体瘤的细胞群:(1)具有广泛的增殖能力;(2)能够进行不对称细胞分裂从而产生增殖或发育潜能减少的一种以上分化子代;和(3)能够进行对称分裂以用于自我更新或自我维持。当连续移植到免疫妥协小鼠时,与不能形成肿瘤的大多数肿瘤细胞相比,“癌干细胞”或“肿瘤干细胞”或“实体瘤干细胞”的这些性质赋予这些癌干细胞以形成可察觉的肿瘤的能力。癌干细胞以无序方式进行自我更新而不是分化,从而形成具有异常细胞类型的肿瘤,当发生突变时所述异常细胞类型可以随时间而改变。

[0074] 术语“癌细胞”或“肿瘤细胞”是指源自肿瘤的全部细胞群体,包括占肿瘤细胞群大部分的非致瘤性细胞和致瘤性干细胞(癌干细胞)。

[0075] 如本文所用,“致瘤性的”是指实体瘤干细胞的功能特征,包括自我更新(产生另外的致瘤性癌干细胞)的性质和增殖以产生所有其它肿瘤细胞(产生分化的因而非致瘤性的肿瘤细胞)的性质,从而使实体瘤干细胞形成肿瘤。

[0076] 如本文所用,肿瘤的“致瘤性”是指当连续移植到免疫妥协小鼠时,来自肿瘤的细胞的随机样品形成可察觉的肿瘤的能力。

[0077] 如本文所用,术语“干细胞癌标记”或“癌干细胞标记”或“肿瘤干细胞标记”或“实体瘤干细胞标记”是指基因,或由基因表达的蛋白、多肽、或肽,与非致瘤性细胞相比,所述基因的表达水平(单独或与其它基因组合)与致瘤性癌细胞的存在相关。该相关可以涉及基因的表达增加或减少(例如,mRNA或由所述基因编码的肽的水平增加或减少)。

[0078] 术语“癌干细胞基因标签”或“肿瘤干细胞基因标签”或“癌干细胞标签”在本文中可相互替换地使用,来指包含与其它细胞或细胞群体(例如正常乳腺上皮组织)相比在癌干细胞中差异性表达的基因的基因标签。在某些实施方式中癌干细胞基因标签包含与正常乳腺上皮相比在癌干细胞中差异性表达的基因,所述表达差异成倍变化,例如表达减少/或增加2倍,并且可通过统计学分析,例如根据多个样品间的t检验的P值来进一步限制。在另一实施方式中,将在癌干细胞中差异性表达的基因基于其表达与所选择基因的相关性以及表达改变的倍数或百分比,分成各种癌干细胞基因标签。癌干细胞标签是临床变化方面(包括但不限于转移和死亡)是可回顾和前瞻性预期的。

[0079] 如本文所用术语“遗传测试”是指对患者或患者肿瘤样品的遗传组成进行分析的程序。该分析可以包括检测DNA、RNA、染色体、蛋白或代谢物,从而检测可遗传的或与身体疾病相关的基因型或核型以用于临床目的。

[0080] 如本文所用,术语“活检样”或“活检组织”是指出于确定所述样品是否含有癌组织的目的而从受试对象中取得的组织或流体的样品。在某些实施方式中,由于受试对象疑似患有癌而获得活检组织或流体。然后检查活检组织或流体是否存在癌。

[0081] 如本文所用,术语“受试对象”是指任何动物(例如,哺乳动物),包括但不限于人、非人灵长类动物和啮齿类动物等,其是特定治疗的接收者。通常而言,对于人类受试对象,术语“受试对象”和“患者”在本文中可相互替换地使用。

[0082] “药学上可接受的”是指由联邦或州政府的管理机构已批准或可批准的,或在美国药典或其它公知的药典中列出的,以用于包括人类在内的动物。

[0083] “药学上可接受的赋性剂、载体或佐剂”或“可接受的药物载体”是指可以与本文公开的至少一种抗体一起对受试对象施用的赋性剂、载体或佐剂,并且其不破坏所述抗体的药理学活性,并且当以足以递送治疗量的抗体的剂量进行施用时无毒的。另外,“药学上可接受的载体”在接受者受试对象中不触发免疫应答。实例包括,但不限于任何标准的药物载体,例如磷酸盐缓冲的盐水溶液、水、各种油/水乳液。某些用于气溶胶或胃肠外施用的稀释剂是磷酸盐缓冲的盐水或生理(0.9%)盐水。

[0084] “药学上可接受的载剂”是指与本文公开的至少一种抗体一起施用的稀释剂、佐剂、赋性剂或载体。

[0085] 术语“有效量”或“治疗有效量”或“治疗效果”是指对于“治疗”受试对象或哺乳动物中的疾病或障碍有效的抗体、多肽、多核苷酸、小有机分子或其它药物的量。在癌的情况下,治疗有效量的药物具有治疗效果并因此可以减少癌细胞的数量;降低致癌性、致癌频率或致癌能力;减少癌干细胞的数量或频率,减少肿瘤尺寸;抑制或停止癌细胞向周围器官中的浸润(例如包括癌向软组织和骨中的扩散);抑制和停止肿瘤转移;抑制和停止肿瘤生长;某种程度上减轻与癌有关的一种或多种症状;减少发病率和死亡率;改进生活质量;或所述效应的组合。在诸如抗体等试剂防止生长和/或杀死现有的癌细胞的情况下,可将其称为具有细胞抑制性和/或细胞毒性。

[0086] 诸如“治疗”或“处理”或“要治疗”或“缓解”或“要缓解”等术语是指 1) 治愈、减慢、减轻诊断的病理性状况或障碍的症状,和/或使诊断的病理性状况或障碍的进展停止的治疗措施;和 2) 防止或减缓所靶向的病理性状况或障碍的发展的预防性或防备性措施。因此需要治疗的受试对象包括已经患有疾病的受试对象;有倾向患疾病的受试对象和要预防疾病的受试对象。如果所述患者显示出以下情况的一种或多种,则根据本发明的方法成功地“治疗”了受试对象:癌细胞的数量减少或完全不存在、肿瘤尺寸的减少;对癌细胞向周围器官的浸润(包括癌向软组织和骨的扩散)的抑制或不存在;肿瘤转移的抑制或不存在;肿瘤生长的抑制或不存在;减轻一种或多种与特定癌相关的症状;发病率和致死率降低;生活质量改进;致癌性降低;癌干细胞的数量或频率减少;或上述效应的某些组合。

[0087] 如本文所用,术语“多核苷酸”或“核酸”是指由许多经由磷酸二酯键连接的核苷酸单元(核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸或相关的结构变体)组成的聚合物,包括但不限于,DNA 或 RNA。该术语包括含有 DNA 和 RNA 的任何已知碱基类似物的序列。

[0088] 术语“基因”是指包含产生多肽、前体或 RNA(例如,rRNA,tRNA)所需的编码序列的核酸(例如 DNA)序列。多肽可由全长编码序列或由所述编码序列的任何部分编码,只要保留全长多肽或片段的所需活性或功能性质(例如酶促活性、配体结合、信号转导、免疫原性等)。该术语还包括结构基因的编码区和在任一端以约 1kb 以上的距离与 5' 和 3' 末端的编码区相邻的序列,从而使得所述基因对应于全长 mRNA 的长度。术语“基因”包括 cDNA 和基因的基因组形式。

[0089] 当关于细胞、核酸、蛋白或载体使用时,术语“重组”是指已经通过导入异源核酸或蛋白、改变天然核酸或蛋白而对所述细胞、核酸、蛋白或载体进行修饰,或所述细胞源自如此修饰的细胞。因此,例如重组细胞表达在天然(非重组)形式的细胞内未发现的基因或表达过表达或异常表达(例如表达为非天然存在的片段或剪接变体)的基因。本文的术语“重组核酸”是指以自然中正常未发现的形式、通常通过例如使用聚合酶和内切核酸酶操作核酸,最初在体外形成的核酸。以此方式,实现了不同序列的可操作连接。因此,线性形式的分离的核酸,或通过通常不接合的 DNA 分子进行连接而在体外形成的表达载体,都认为是用于本发明目的的重组体。应该理解,一旦制得重组核酸并将其导入宿主细胞或生物体中,其会非重组(即使用宿主细胞的体内细胞机构而不是体外操作)地复制;但是,所述核酸一旦重组地产生,虽然随后进行非重组地复制,仍然被认为是用于本发明目的的重组体。类似地,“重组蛋白”是使用重组技术(即,通过上述重组核酸的表达)制备的蛋白。

[0090] 如本文所用,使用术语“载体”来指将 DNA 区段从一个细胞转移到另一细胞的核酸分子。载体通常源自质粒、噬菌体或植物病毒或动物病毒。

[0091] 如本文所用,术语“基因表达”是指下述过程:通过基因的“转录”(例如经由 RNA 聚合酶的酶促作用)将基因中编码的遗传信息转化成 RNA(例如, mRNA、rRNA、tRNA 或 snRNA),并且对于编码蛋白的基因,通过 mRNA 的“翻译”转化成蛋白。可以在该过程中的许多阶段对基因表达进行调节。“上调”或“激活”是指增加基因表达产物(例如, RNA 或蛋白)的产生的调节,而“下调”或“抑制”是指减少产生的调节。参与上调或下调的分子(例如转录因子)通常分别称为“激活子”和“抑制子”。

[0092] 术语“多肽”或“肽”或“蛋白”或“蛋白片段”在本文中可相互替换地使用,来指氨基酸残基的聚合物。该术语适用于其中一种或多种氨基酸残基为相应天然存在的氨基酸的人工化学模拟物的氨基酸聚合物,以及天然存在的氨基酸聚合物和非天然存在的氨基酸聚合物。

[0093] 术语“氨基酸”是指天然存在和合成的氨基酸,以及与天然存在的氨基酸功能类似的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸是由遗传密码编码的氨基酸以及稍后经过修饰的那些氨基酸,例如羟脯氨酸、 $\gamma$ -羧基谷氨酸和 O-磷酸丝氨酸。“氨基酸类似物”是指与天然存在的氨基酸具有相同的基本化学结构(例如与氢、羧基、氨基和 R 基团结合的  $\alpha$  碳)的化合物,例如高丝氨酸、正亮氨酸、蛋氨酸亚砷、蛋氨酸甲基硫。所述类似物可具有经修饰的 R 基团(例如正亮氨酸)或经修饰的肽主链,但是保持与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构。“氨基酸模拟物”是指具有与氨基酸的通常化学结构不同的结构,但与天然存在的氨基酸功能类似的化合物。

[0094] “保守性修饰变体”适用于氨基酸和核酸序列。“氨基酸变体”是指氨基酸序列。对于特定的核酸序列,保守性修饰变体是指编码相同或基本上相同的氨基酸序列的那些核酸,或当所述核酸不编码氨基酸序列时,是指基本上相同或相关(例如天然连续)的序列。由于遗传编码的简并性,大量功能上相同的核酸编码大多数蛋白。例如,密码子 GCA、GCC、GCG 和 GCU 都编码氨基酸丙氨酸。因此,在每个由密码子规定丙氨酸的位置,该密码子可以改变成所述相应密码子中的另一个而不会改变所编码的多肽。所述核酸变化是“沉默变化”,其是保守性修饰变化的一种。编码多肽的本文的每个核酸序列也描述了核酸的沉默变化。认识到的是,在某些背景下可以对核酸中的各密码子(除了通常是蛋氨酸的唯一密码

子的AUG,和通常是色氨酸的唯一密码子的TGG)进行修饰以产生功能相同的分子。因此,编码多肽的核酸的沉默变化涉及关于表达产物的所述序列,而不是关于实际的探针序列的所述序列。

[0095] 关于氨基酸序列,认识到的是,在所编码序列中改变、添加或缺失单个氨基酸或小百分比的氨基酸的、对核酸、肽、多肽或蛋白序列进行的各取代、缺失或添加,是“保守性修饰变体”,包括其中改变导致氨基酸被化学上相似的氨基酸取代。提供功能相似的氨基酸的保守性取代表是本领域众所周知的(参见,例如表1)。还可以在Bowie等,1990, Science 247:1306-1310中发现关于哪一种氨基酸变化可能是表型上沉默的指南。所述保守性修饰变体是除了本发明的多态变体、种间同源物和等位基因之外但不排除其的变体。通常而言保守性取代包括:1)丙氨酸(A)、甘氨酸(G);2)天冬氨酸(D)、谷氨酸(E);3)天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q);4)精氨酸(R)、赖氨酸(K),5)异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、蛋氨酸(M)、缬氨酸(V);6)苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W);7)丝氨酸(S)、苏氨酸(T);和8)半胱氨酸(C)、蛋氨酸(M)(参见,例如,Creighton, Proteins(1984))。如所示,变化通常为次要性质,例如不显著影响蛋白的折叠或活性的保守性氨基酸取代。

[0096] 表1. 保守性氨基酸取代

[0097]

起始氨基酸	示例性的保守性取代
丙氨酸	缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甘氨酸、丝氨酸
精氨酸	赖氨酸、组氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺
天冬酰胺	谷氨酰胺、组氨酸、赖氨酸、精氨酸
天冬氨酸	谷氨酸、天冬酰胺
半胱氨酸	丝氨酸、丙氨酸、蛋氨酸
谷氨酰胺	天冬酰胺
谷氨酸	天冬氨酸、谷氨酰胺
甘氨酸	脯氨酸、丙氨酸
组氨酸	天冬酰胺、谷氨酰胺、赖氨酸、精氨酸
异亮氨酸	亮氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、丙氨酸、苯丙氨酸、正亮氨酸
亮氨酸	正亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、丙氨酸、苯丙氨酸
赖氨酸	丙氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸
蛋氨酸	亮氨酸、苯丙氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、半胱氨酸
苯丙氨酸	亮氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、丙氨酸、酪氨酸
脯氨酸	丙氨酸、甘氨酸
丝氨酸	苏氨酸
苏氨酸	丝氨酸
色氨酸	酪氨酸、苯丙氨酸
酪氨酸	色氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸、丝氨酸
缬氨酸	异亮氨酸、蛋氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、丙氨酸、正亮氨酸

[0098]

[0099] 如本说明书和权利要求所用,单数形式的“a”、“an”和“the”包括复数形式,除非上下文明确指出。

[0100] 应该理解每当在本文用词汇“包含”来描述实施方式时,还提供以“组成”和/或“基本上由.....组成”描述的其它类似实施方式。

[0101] 本发明的特定实施方式

[0102] 本发明提供用于研究、诊断、表征和治疗癌的组合物和方法。特别地,在特定实施

方式中,本发明提供了结合 Notch 受体的试剂(包括拮抗剂)和使用所述试剂或拮抗剂来抑制肿瘤生长和治疗人类患者的癌症和其它疾病的方法。在特定实施方式中,所述拮抗剂是与人类 Notch 受体的胞外域的非配体结合区特异性结合的抗体。

[0103] 在一个方面,本发明提供了与人类 Notch1 受体的胞外域的非配体结合近膜区特异性结合的抗体。在某些实施方式中,所述抗体结合包含约氨基酸 1427 ~ 约氨基酸 1732 的人类 Notch1 的区域。在某些实施方式中,所述抗体与包含 SEQ ID NO :2 的区域结合。在特定实施方式中,所述抗体与至少一个其它 Notch 受体的胞外域的非配体结合近膜区特异性结合。

[0104] 在某些实施方式中,所述抗体是人类 Notch1 的拮抗剂。在特定实施方式中,所述抗体抑制 Notch1 途径的配体-诱导的信号传导。在某些实施方式中,所述抗体抑制 Notch1 的活性。在其它实施方式中,所述抗体抑制 Notch1 受体的切割。在某些实施方式中,所述抗体抑制位于胞外域的近膜区内的位点处的 Notch1 的切割。在特定实施方式中,所述抗体抑制 Notch1 的胞内域(ICD)的释放或形成。在其它实施方式中,所述抗体减少包含癌干细胞的肿瘤的致瘤性。在特定实施方式中,所述抗体抑制包含癌干细胞的肿瘤的生长。在特定实施方式中,所述抗体抑制肿瘤的生长。

[0105] 在特定实施方式中,与人类 Notch1 受体的胞外域的近膜区特异性结合并且抑制肿瘤生长的抗体是单克隆抗体。在特定实施方式中,与人类 Notch1 受体的胞外域的近膜区特异性结合的抗体是嵌合抗体,是人源化抗体,是人类抗体,是抗体片段,或者是双特异性抗体。在特定实施方式中,本发明提供产生抗体的杂交瘤,所述抗体与人类 Notch1 受体的胞外域的非配体结合近膜区特异性结合并且抑制肿瘤生长。

[0106] 在另一方面,本发明提供抑制受试对象中肿瘤生长的方法,所述方法包括对受试对象施用治疗有效量的与人类 Notch1 受体蛋白的胞外域的非配体结合近膜区特异性结合的抗体。在某些实施方式中,所述肿瘤包含癌干细胞。在某些实施方式中,所述方法包括使用所述抗体靶向所述癌干细胞。在特定实施方式中,抑制肿瘤生长的方法包括施用治疗有效量的单克隆抗体。在特定实施方式中,抑制肿瘤生长的方法包括施用治疗有效量的嵌合抗体。在特定实施方式中,抑制肿瘤生长的方法包括施用治疗有效量的人源化抗体。在特定实施方式中,抑制肿瘤生长的方法包括施用治疗有效量的人类抗体。

[0107] 在特定实施方式中,抑制肿瘤生长的方法包括减少肿瘤中癌干细胞的频率,减少肿瘤中癌干细胞的数量,降低肿瘤的致瘤性,和/或通过减少肿瘤中癌干细胞的数量或频率来降低肿瘤的致瘤性。在某些实施方式中,抑制肿瘤生长的方法包括抑制 Notch1 受体的活性。在特定实施方式中,所述肿瘤包括,但不限于,乳肿瘤、结直肠肿瘤、肝肿瘤、肾肿瘤、肺肿瘤、胰腺肿瘤、卵巢肿瘤、前列腺肿瘤以及头颈肿瘤。

[0108] 在另一方面,本发明提供需要治疗癌症的受试对象中的癌症的治疗方法,所述方法包括对受试对象施用治疗有效量的与人类 Notch1 受体蛋白的胞外域的非配体结合近膜区特异性结合并且抑制受试对象中肿瘤生长的抗体。在特定实施方式中,治疗癌的方法包括施用治疗有效量的单克隆抗体。在特定实施方式中,治疗癌的方法包括施用治疗有效量的嵌合抗体。在特定实施方式中,治疗癌的方法包括施用治疗有效量的人源化抗体。在特定实施方式中,治疗癌的方法包括施用治疗有效量的人类抗体。

[0109] 在特定实施方式中,治疗癌的方法包括施用治疗有效量的与人类 Notch1 受体的

胞外域的非配体结合近膜区特异性结合并且抑制肿瘤生长的缀合于细胞毒性基团的抗体。在特定实施方式中,治疗癌的方法包括与放射治疗联合施用治疗有效量的任何所述方面和/或实施方式以及本文所述其它方面和/或实施方式的抗体。在特定实施方式中,治疗癌的方法包括与化学治疗联合施用治疗有效量的任何所述方面和/或实施方式以及本文所述其它方面和/或实施方式的抗体。在特定实施方式中,治疗癌的方法包括施用治疗有效量的与人类 Notch1 受体的胞外域的非配体结合近膜区特异性结合并且抑制下述肿瘤的肿瘤生长的抗体,所述肿瘤包括但不限于乳肿瘤、结直肠肿瘤、肺肿瘤、胰腺肿瘤、前列腺肿瘤或头颈肿瘤。

[0110] 在特定实施方式中,治疗癌的方法包括:利用包含抗体的遗传测试鉴定需要治疗的患者,和对所述患者施用治疗有效量的所述抗体,所述抗体与人类 Notch1 受体的胞外域的非配体结合近膜区特异性结合。在特定实施方式中,治疗癌的方法包括利用可检测癌干细胞标签的遗传测试鉴定需要使用可与人类 Notch1 受体的胞外域的非配体结合近膜区特异性结合的抗体治疗的患者,和施用治疗有效量的可与人类 Notch1 受体的胞外域的非配体结合近膜区特异性结合并且抑制肿瘤生长的抗体。

[0111] 在另一方面,本发明提供了鉴定与人类 Notch1 受体的胞外域的非配体结合近膜区结合并且抑制肿瘤生长的分子的方法,所述方法包括:i)使所述分子与人类 Notch1 受体的胞外域的非配体结合近膜区一起温育;ii)确定所述分子是否与人类 Notch1 受体的胞外域的非配体结合近膜区结合;和 iii)确定所述分子是否抑制肿瘤生长。在特定实施方式中,本发明提供鉴定与人类 Notch1 受体的胞外域的非配体结合近膜区结合并且抑制肿瘤生长的分子的方法,所述方法包括:i)使所述分子与包含 SEQ ID NO:2 的人类 Notch1 受体的胞外域的非配体结合近膜区一起温育;ii)确定所述分子是否与包含 SEQ ID NO:2 的人类 Notch1 受体的胞外域的非配体结合近膜区结合;和 iii)确定所述分子是否抑制肿瘤生长。

[0112] 在特定实施方式中,本发明提供包含抗体的药物组合物,所述抗体与人类 Notch1 受体的胞外域的非配体结合近膜区特异性结合并且抑制肿瘤生长。

[0113] 在特定实施方式中,本发明提供抗体的制备方法,所述抗体与人类 Notch1 受体的胞外域的非配体结合近膜区特异性结合并且抑制肿瘤生长。

[0114] 在特定实施方式中,本发明提供编码抗体的分离的核酸,所述抗体与人类 Notch1 受体的胞外域的非配体近膜结合区特异性结合并且抑制肿瘤生长。

[0115] 在特定实施方式中,针对诸如 Notch1 等 Notch 受体的拮抗剂在细胞外对 Notch 受体起作用,或抑制所述 Notch 受体的功能。在特定实施方式中,Notch 受体的拮抗剂是蛋白质性的 (proteinaceous)。在某些实施方式中,Notch1 受体的蛋白质性拮抗剂是可与 Notch1 受体的胞外表位特异性结合的抗体。针对 Notch1 受体的拮抗剂的细胞外结合通过抑制 Notch1 受体的固有激活 (例如激酶活性) 和/或通过空间上抑制例如 Notch 受体与其配体之一的相互作用,从而能够抑制 Notch 受体的信号传导。另外,针对 Notch 受体的拮抗剂的细胞外结合通过例如使 Notch 受体内化和/或减少 Notch 受体的细胞表面运输,从而能够下调 Notch 受体的细胞表面表达。拮抗剂与 Notch 受体的细胞外结合能够抑制 Notch 受体的切割和减少 Notch 的 ICD 的释放。

[0116] 在某些实施方式中,针对 Notch 受体的拮抗剂与 Notch 受体结合并且具有一种或



多种以下效果：抑制肿瘤细胞的增殖、直接在肿瘤细胞中触发细胞死亡或防止肿瘤细胞转移。在特定实施方式中，Notch 受体的拮抗剂经由缀合毒素、化学治疗剂、放射性同位素或其它此类试剂触发细胞死亡。例如，针对 Notch 受体的抗体与通过蛋白内化而在表达 Notch 受体的肿瘤细胞中激活的毒素缀合。在其它实施方式中，Notch 受体的拮抗剂经由抗体依赖性细胞的细胞毒性 (ADCC) 而介导表达 Notch 受体的细胞的细胞死亡。ADCC 涉及通过识别抗体的 Fc 部分的效应细胞进行的细胞裂解。例如，许多淋巴细胞、单核细胞、组织巨噬细胞、粒细胞和嗜酸性粒细胞具有 Fc 受体并且能够介导细胞溶解 (Dillman, 1994, J. Clin. Oncol. 12 :1497)。在某些实施方式中，Notch 受体的拮抗剂是通过激活补体-依赖性细胞毒性 (CDC) 触发表达 Notch 受体的细胞的细胞死亡的抗体。CDC 参与针对抗体的 Fc 部分的血清补体的结合和补体蛋白级联的随后激活，导致细胞膜损伤和最终的细胞死亡。在很大程度上，已知抗体的生物活性由抗体分子的恒定域或 Fc 区确定 (Uananie 和 Benacerraf, 教科书 Immunology, 第 2 版, Williams & Wilkins, 第 218 页 (1984))。不同类别和亚类的抗体在该方面有所不同，正如相同亚类但来自不同物种的抗体一样。人类抗体中，IgM 是结合补体最有效类别的抗体，然后是 IgG1、IgG3 和 IgG2，而 IgG4 在激活补体级联方面似乎非常不足 (Dillman, 1994, J. Clin. Oncol. 12 :1497 ; Jefferis 等, 1998, Immunol. Rev. 163 :59-76)。根据本发明，制备了具有所需生物活性的这些类别的抗体。

[0117] 可以测定针对 Notch 受体的任何特定抗体通过补体激活和 / 或 ADCC 介导靶细胞的裂解的能力。使目的细胞在体外生长和进行标记；向细胞培养物添加所述抗体以及通过抗原抗体复合物而激活的血清补体或免疫细胞。例如通过来自被裂解的细胞的标记的释放检测靶细胞的细胞溶解。事实上，可以使用患者自身血清作为补体和 / 或免疫细胞的来源对抗体进行筛选。然后可以将将在体外测试中能够激活补体或介导 ADCC 的抗体治疗性用于该特定患者。

[0118] 在特定实施方式中，Notch 结合剂或拮抗剂是不具有一种或多种效应子功能的抗体。例如，在某些实施方式中，所述抗体不具有抗体依赖性细胞的细胞毒性 (ADCC) 活性，和 / 或不具有补体依赖性细胞毒性 (CDC) 活性。在特定实施方式中，所述抗体不与 Fc 受体和 / 或补体因子结合。在特定实施方式中，所述抗体不具有效应子功能。

[0119] 在其它实施方式中，Notch 受体的拮抗剂通过抑制血管发生可间接触发细胞死亡。血管发生是通过新血管从已有脉管形成的过程，并且是在例如胚胎发育、伤口愈合和排卵反应期间的正常生长所需的基础过程。大于  $1\text{mm}^2 \sim 2\text{mm}^2$  的实体瘤生长也需要血管发生来供应营养物和氧，否则肿瘤细胞就会死亡。因此在特定实施方式中，Notch 受体的拮抗剂靶向表达 Notch 受体的血管细胞，例如内皮细胞、平滑肌细胞或血管组装所需的细胞外基质的组分。在其它实施方式中，Notch 受体的拮抗剂抑制血管细胞募集 (recruitment)、组装、维持或存活所需的生长因子信号传导。

[0120] 本发明提供各种多肽，包括但不限于抗体或抗体的片段。在特定实施方式中，所述多肽是分离的。在特定的替代性实施方式中，所述多肽基本上是纯的。

[0121] 在特定实施方式中，本发明的多肽可以是包含序列 SEQ ID NO :8、SEQ ID NO :14、SEQ ID NO :24、SEQ ID NO :28 或 SEQ ID NO :32 (带有或不带有指出的信号序列) 的重组多肽、天然多肽或合成多肽。

[0122] 本发明提供了包含 SEQ ID NO :10 和 / 或 SEQ ID NO :4 (带有或不带有指出的推

定信号序列)中分别提供的重链和/或轻链的多肽。在特定实施方式中,所述多肽是抗体。在特定实施方式中,所述多肽特异性结合人类Notch1受体的胞外域的非配体结合近膜区。

[0123] 本发明还提供包含 SEQ ID NO :8、SEQ ID NO :28 或 SEQ ID :N032,和/或 SEQ ID NO :14 或 SEQ ID NO :24 的多肽。在特定实施方式中,所述多肽包含含有 SEQ ID NO :8 的可变轻链序列和含有 SEQ ID NO :14 的可变重链序列。在特定实施方式中,所述多肽包含含有 SEQ ID NO :28 的可变轻链序列和含有 SEQ ID NO :24 的可变重链序列。在特定实施方式中,所述多肽包含含有 SEQ ID NO :32 的可变轻链序列和含有 SEQ ID NO :24 的可变重链序列。在特定实施方式中,所述多肽是抗体。在特定实施方式中,所述多肽特异性结合人类Notch1受体的胞外域的非配体结合近膜区。

[0124] 本领域承认可以对本发明的某些氨基酸序列进行变化而不会显著影响蛋白的结构或功能。如果关注序列上的所述差异,应该记得在蛋白上存在确定活性的关键区域。因此,本发明还包括显示基本活性的多肽的改变。此类突变包括缺失、插入、倒置、重复和类型取代。可以在 Bowie, J.U. 等, " Deciphering the Message in Protein Sequences : Tolerance to Amino Acid Substitutions, " Science 1990,247-1306-1310 中发现关于哪一种氨基酸变化可能是表型上沉默的指南。

[0125] 因此,本发明多肽的片段、衍生物或类似物可以是:(i) 其中一个或多个氨基酸残基被保守性或非保守性氨基酸残基(经常是保守性氨基酸残基)取代的多肽的片段、衍生物或类似物,并且这种取代的氨基酸残基可以是或可以不是由遗传密码所编码的氨基酸;或(ii) 其中一个或多个氨基酸残基包括取代基的多肽的片段、衍生物或类似物;或(iii) 其中成熟多肽与另一化合物融合的多肽的片段、衍生物或类似物,所述化合物例如是增加所述多肽的半衰期的化合物(例如聚乙二醇);或(iv) 其中另外的氨基酸与成熟多肽融合的多肽的片段、衍生物或类似物,例如前导序列或分泌序列或用于对成熟多肽或前蛋白序列进行纯化的序列。这种片段、衍生物或类似物被视为在本文教导的范围之内。

[0126] 特别感兴趣的是带电氨基酸被另一带电氨基酸和被中性或带负电氨基酸取代。后者产生正电荷减少的蛋白质。高度期望的是防止凝集。蛋白的凝集不仅导致活性丧失,由于其具有免疫原性,在制备药物制剂时也有问题。(Pinckard 等,Clin Exp Immunol. 1967,2 : 331-340,Robbins 等,Diabetes 1987,36 :838-845 ;Cleland 等 Crit. RevTherapeutic Drug Carrier Systems 1993,10 :307-377)。

[0127] 当然,进行的氨基酸取代的数量取决于许多因素,包括本文所述的那些因素。在特定实施方式中,对于任何给定的多肽,取代的数量不超过 50 个、40 个、30 个、25 个、20 个、15 个、10 个或 3 个。

[0128] 本发明的多肽包括多肽 SEQ ID NO :14 和与多肽 SEQ ID NO :14 具有至少 90% 相似性(在某些时候具有至少 90% 序列同一性)的多肽和与多肽 SEQ ID NO :14 具有至少 95% 相似性(在某些时候具有至少 95% 序列同一性)的多肽,以及在其它实施方式中,与多肽 SEQ ID NO :14 具有至少 96%、97%、98% 或 99% 相似性(在某些时候具有 96%、97%、98% 或 99% 序列同一性)的多肽。本发明的多肽包括多肽 SEQ ID NO :8 和与多肽 SEQ ID NO :8 具有至少 90% 相似性(在某些时候具有至少 90% 序列同一性)的多肽和与多肽 SEQ ID NO :8 具有至少 95% 相似性(在某些时候具有至少 95% 序列同一性)的多肽,以及在其它实施方式中,与多肽 SEQ ID NO :8 具有至少 96%、97%、98% 或 99% 相似性(在某些时候具

有 96%、97%、98% 或 99% 序列同一性) 的多肽。本领域已知, 通过将 一个多肽的氨基酸序列和其保守性氨基酸取代与第二多肽的序列进行比较来确定两个多肽之间的“相似性”。

[0129] 使用本发明多肽的片段或部分可以通过肽合成来生产相应 的全长多肽; 因此可以将所述片段用作生产全长多肽的中间体。本发明多核苷酸的片段或部分可用于合成本发明的全长多核苷酸。

[0130] 在特定实施方式中, 本发明蛋白的片段是能够与 Notch1 受体蛋白结合的蛋白的部分或全部。该片段对 Notch 受体或 Notch 受体的配体具有高亲和性。融合蛋白的某些片段是包含与免疫球蛋白的至少部分恒定区融合的所述多肽试剂或拮抗剂的至少部分 Notch 结合域的蛋白片段。亲和性通常为约  $10^{-11}\text{M} \sim 10^{-12}\text{M}$ , 不过亲和性可以随着片段尺寸的不同而从  $10^{-7}\text{M} \sim 10^{-13}\text{M}$  显著变化。在某些实施方式中, 所述片段长度为约 10 ~ 110 个氨基酸, 并且包含与免疫球蛋白的至少部分恒定区连接的多肽试剂或拮抗剂的 Notch 结合域。

[0131] 可以对所述多肽和类似物进一步进行修饰以含有正常情况下不是所述蛋白部分的其它化学基团 (chemical moieties)。衍生的基团可以改善蛋白的溶解度、生物半衰期和 / 或吸附。该基团还可以减少或消除所述蛋白的任何不期望的副作用等。可以在雷明顿药典 (Remington's Pharmaceutical Sciences), 第 20 版, Mack Publishing Co., Easton, PA (2000) 中发现关于化学基团的综述。

[0132] 可以通过本领域已知的任何合适的方法生产本文所述的分离的多肽。所述方法从直接蛋白合成方法, 到构建编码分离的多肽序列的 DNA 序列并在合适的经转化宿主中表达这些序列。

[0133] 在重组方法的某些实施方式中, 通过分离或合成编码野生型目的蛋白的 DNA 序列来构建 DNA 序列。可选的是, 可以通过位点特异性突变来对所述序列进行诱变从而提供其功能类似物。参见, 例如 Zoeller 等, Proc-Nat Acad. Sci. USA 1984, 81 :5662-5066 和美国专利第 4, 588, 585 号。另一构建编码目的多肽的 DNA 序列的方法通过使用寡核苷酸合成仪的化学合成进行。可以基于所需多肽的氨基酸序列和选择在会产生重组目的多肽的宿主细胞中受偏爱的那些密码子来设计所述寡核苷酸。

[0134] 可以应用标准方法来合成编码分离的目的多肽的分离的多核苷酸序列。例如, 可以使用完整氨基酸序列来构建反译 (back-translated) 基因。另外, 可以合成含有编码特定分离的多肽的核苷酸序列的 DNA 寡聚物。例如, 可以合成几种编码所需多肽的各部分的小型寡核苷酸并将其连接。各寡核苷酸通常含有 5' 或 3' 突出端以用于互补组装。

[0135] 一旦进行组装 (通过合成、定点突变或另一方法), 则将编码特定的分离的目的多肽的突变 DNA 序列插入表达载体中并可操作地连接至适合在所需宿主中表达蛋白的表达控制序列。可以通过核苷酸测序、限制酶作图和 在合适宿主中表达生物活性多肽来确认合适的组装。如本领域众所周知, 为了在宿主中获得转染基因的高表达水平, 将该基因可操作地连接至转录和翻译表达控制序列, 该表达控制序列在所选表达宿主中具有功能。

[0136] 本发明提供针对 Notch1 受体的胞外域的非配体结合近膜区的分离的抗体。所述抗体, 或抗体片段可以是特异性识别 Notch1 的胞外域的近膜区的任何单克隆抗体或多克隆抗体。在某些实施方式中, 本发明提供与本文所述的人类 Notch1 的胞外域的近膜区特异性结合的单克隆抗体, 或其片段。在某些实施方式中, 所述单克隆抗体, 或其片段是与本文所述的人类 Notch1 受体的胞外域的近膜区特异性结合的嵌合抗体或人源化抗体。在其它

实施方式中,所述单克隆抗体,或其片段是与本文所述的人类 Notch1 受体的胞外域的近膜区特异性结合的人类抗体。

[0137] 发现针对 Notch1 受体的胞外域的近膜区的抗体可用于本文所述的实验、诊断和治疗方法。在特定实施方式中,使用本发明的抗体来检测生物样品中 Notch1 受体的表达,所述生物样品例如为患者组织活检物、胸腔积液或血液样品。可以对组织活检物进行切片并且使用例如免疫荧光或免疫组织化学法检测蛋白。作为选择,分离来自样品的个体细胞,并通过 FACS 分析在固定细胞或活细胞上检测蛋白表达。另外,可以在蛋白阵列上使用所述抗体来检测例如肿瘤细胞上、细胞裂解物中或其它蛋白样品中的 Notch1 受体的表达。在其它实施方式中,在体外基于细胞的检测中或在体内动物模型中,通过使本发明的抗体与肿瘤细胞接触,从而使用所述抗体来抑制肿瘤细胞的生长。在其它实施方式中,通过施用治疗有效量的针对 Notch1 受体的胞外域的近膜区的抗体,从而使用抗体来治疗人类患者中的癌。

[0138] 可以通过任何已知方法制备多克隆抗体。通过用相关抗原(经纯化的肽片段、全长重组蛋白、融合蛋白等)的多次皮下或腹膜内注射对动物(例如兔、大鼠、小鼠、羊、驴等)进行免疫来产生多克隆抗体,所述相关抗原可选地与匙孔血蓝蛋白(KLH)、血清白蛋白等缀合、稀释于无菌盐水并与佐剂(例如完全或不完全弗氏佐剂)组合以形成稳定的乳液。然后从如此免疫的动物的血液和腹水等中回收多克隆抗体。使收集的血液凝固,离心血清,通过离心使其澄清,并且测定抗体滴度。可以根据本领域的标准方法从血清或腹水中纯化多克隆抗体,所述标准方法包括亲和色谱、离子交换色谱、凝胶电泳、透析等。

[0139] 使用杂交瘤方法制备单克隆抗体,所述杂交瘤方法例如 Kohler 和 Milstein, 1975, Nature 256 :495-497 中所述的方法。使用杂交瘤方法,如上所述对小鼠、仓鼠或其它合适的宿主动物进行免疫,从而通过与免疫抗原特异性结合的淋巴细胞引起抗体的产生。作为选择,可以在体外对淋巴细胞进行免疫。免疫后,分离淋巴细胞,并使用例如聚乙二醇将其与合适的骨髓瘤细胞系融合,从而形成杂交瘤细胞,然后将该杂交瘤细胞从未融合的淋巴细胞和骨髓瘤细胞中选择出。然后可以使用标准方法(Goding, 单克隆抗体: Principles and Practice, Academic Press, 1986)进行体外培养或在动物中体内地作为腹水肿瘤使产生特异性针对所选择抗原的单克隆抗体的杂交瘤增殖,所述所选择抗原通过免疫沉淀、免疫印迹,或通过诸如放射免疫检测(RIA)或酶联免疫吸附检测(ELISA)等体外结合检测确定。然后可以按照关于以上多克隆抗体所述从培养基或腹水流体中对单克隆抗体进行纯化。

[0140] 在本发明的某些实施方式中,所述抗体是与人类 Notch1 受体的胞外域的非配体结合近膜区特异性结合的抗体。在某些实施方式中,所述抗体包含与 SEQ ID NO :14 具有至少 90% 序列同一性的重链可变区;和/或与 SEQ ID NO :8 具有至少 90% 序列同一性的轻链可变区。在某些实施方式中,所述抗体包含与 SEQ ID NO :14 具有至少 95% 序列同一性的重链可变区;和/或与 SEQ ID NO :8 具有至少 95% 序列同一性的轻链可变区。在某些实施方式中,所述抗体是单克隆抗体或抗体片段。

[0141] 在特定实施方式中,本发明提供了一种抗体,所述抗体结合人类 Notch1 的胞外域的非配体结合近膜区,并且包含含有 RGYWIE(SEQ ID NO :15)的重链 CDR1、含有 QILPGTGRTNYNEKFKG(SEQ ID NO :16)的重链 CDR2、和/或含有 FDGNYYAMDY(SEQ ID

NO:17) 的重链 CDR3。在某些实施方式中,所述抗体还包含含有 RSSTGAVTTSNYAN(SEQ ID NO:18) 的轻链 CDR1、含有 GTNNRAP(SEQ ID NO:19) 的轻链 CDR2 和 / 或含有 ALWYSNHWFVGGGTKL(SEQ ID NO:20) 的轻链 CDR3。在某些实施方式中,所述抗体包含含有 RGYWIE(SEQ ID NO:15) 的重链 CDR1、含有 QILPGTGRNTYNEKFKG(SEQ ID NO:16) 的重链 CDR2 和 / 或含有 FDGNYGYAMDY(SEQ ID NO:17) 的重链 CDR3;以及含有 RSSTGAVTTSNYAN CDR1(SEQ ID NO:18) 的轻链、含有 GTNNRAP(SEQ ID NO:19) 的轻链 CDR2 和 / 或含有 ALWYSNHWFVGGGTKL(SEQ ID NO:20) 的轻链 CDR3。在某些实施方式中,所述抗体包含重链可变区,所述重链可变区包含:(a) 含有 RGYWIE(SEQ ID NO:15) 的重链 CDR1,或包含 1、2、3 或 4 个氨基酸取代的其变体;(b) 含有 QILPGTGRNTYNEKFKG(SEQ ID NO:16) 的重链 CDR2,或包含 1、2、3 或 4 个氨基酸取代的其变体;和 / 或 (c) 含有 FDGNYGYAMDY(SEQ ID NO:17) 的重链 CDR3,或包含 1、2、3 或 4 个氨基酸取代的其变体。在其他实施方式中,所述抗体包含轻链可变区,所述轻链可变区包含:(a) 含有 RSSTGAVTTSNYAN(SEQ ID NO:18) 的轻链 CDR1,或包含 1、2、3 或 4 个氨基酸取代的其变体;(b) 含有 GTNNRAP(SEQ ID NO:19) 的轻链 CDR2,或包含 1、2、3 或 4 个氨基酸取代的其变体;和 / 或 (c) 含有 ALWYSNHWFVGGGTKL(SEQ ID NO:20) 的轻链 CDR3,或包含 1、2、3 或 4 个氨基酸取代的其变体。在某些实施方式中,所述氨基酸取代是保守性氨基酸取代。

[0142] 在某些实施方式中,本发明提供由杂交瘤细胞系产生的抗体 52M51,所述杂交瘤细胞系于 2008 年 8 月 7 日根据布达佩斯条约的规定保藏在 ATCC,保藏号为 PTA-9405。在某些实施方式中,所述抗体是 52M51 的人源化版本。在某些实施方式中,所述抗体是通过 DNA 编码的抗体 52M51 的人源化版本“52M51 H4L3”,所述 DNA 于 2008 年 10 月 15 日根据布达佩斯条约的规定保藏在 ATCC,保藏号为 PTA-9549。在某些实施方式中,所述抗体是 52M51 的人源化版本“52M51 H4L4”。在某些实施方式中,本发明提供了与抗体 52M51 所结合的表位相同的表位相结合的抗体。在其它实施方式中,本发明提供了与上述实施方式和 / 或方面,以及本文别处所述其它方面 / 实施方式中所述的任何抗体竞争对人类 Notch1 受体的胞外域的非配体结合近膜区的特异性结合的抗体。还提供了包含所述抗体的药物组合物和治疗癌的方法,所述方法包括施用治疗有效量的所述抗体。

[0143] 在某些实施方式中,本发明提供 DNA 编码产生的抗体 52R43,所述 DNA 于 2008 年 10 月 15 日根据布达佩斯条约的规定保藏在 ATCC,保藏号为 PTA-9548。在某些实施方式中,本发明提供了与抗体 52R43 所结合的表位相同的表位相结合的抗体。在某些实施方式中,本发明提供了包含 52R43 的 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个和 / 或 6 个 CDR 的抗体。在其它实施方式中,本发明提供与 52R43 竞争的抗体。还提供了包含所述抗体的药物组合物和治疗癌的方法,所述方法包括施用治疗有效量的所述抗体。

[0144] 作为选择还可以使用美国专利第 4,816,567 号中所述的重组 DNA 方法制备单克隆抗体。例如通过 RT-PCR 使用特异性扩增编码所述抗体的重链和轻链的基因的寡核苷酸引物,从成熟 B 细胞或杂交瘤细胞中分离编码单克隆抗体的多核苷酸,并且使用常规方法确定其序列。然后将编码重链和轻链的分离的多核苷酸克隆到合适的表达载体中,然后将其转染到宿主细胞中,所述宿主细胞未被转染时就不产生免疫球蛋白,例如大肠杆菌细胞、猿 COS 细胞、中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞或骨髓瘤细胞。对宿主细胞进行单克隆抗体产生的筛选,并且选择具有所需特异性的抗体。另外,可以从所述噬菌体展示文库中分离所需物种的

重组单克隆抗体或其片段 (McCafferty 等, 1990, *Nature*, 348: 552-554 ; Clackson 等, 1991, *Nature*, 352 : 624-628, 和 Marks 等, 1991, *J. Mol. Biol.* , 222 : 581-597)。

[0145] 可以使用重组 DNA 技术以多种不同的方式对编码单克隆抗体的多核苷酸进行进一步修饰, 从而产生替代性的抗体。在某些实施方式中, 例如小鼠单克隆抗体的轻链和重链的恒定域可以 1) 被例如人类抗体的那些区域取代从而产生嵌合抗体或 2) 被非免疫球蛋白多肽取代从而产生融合抗体。在其它实施方式中, 将所述恒定区截短或除去从而产生单克隆抗体的所需抗体片段。另外, 可使用可变区的定点突变或高密度突变来优化单克隆抗体的特异性、亲和性等。

[0146] 通常而言, 可以从任何抗体获得或衍生出可用于本发明的修饰抗体。另外, 用于产生所述经修饰抗体的亲本抗体或前体抗体, 或其片段, 可以是鼠类的、人类的、嵌合的、人源化的、非人灵长类的或灵长源化的。在其它实施方式中, 本发明的经修饰抗体可以包括具有本文所述的经改变的恒定域的单链抗体构建体 (例如美国专利第 5, 892, 019 号中公开的, 通过参考将其并入本文)。因此, 根据本文教导修饰的这些类型抗体中的任何抗体都与本发明相容。

[0147] 根据本发明, 使技术适于生产对本发明的多肽具有特异性的单链抗体 (参见美国专利第 4, 946, 778 号)。另外, 可使方法适于构建 Fab 表达文库 (Huse 等, 1989, *Science*, 246 : 1275-1281), 从而允许快速有效地鉴定对 Notch 或其衍生物、片段、类似物或同源物的具有所需特异性的单克隆 Fab 片段。可以通过本领域技术生产含有对本发明多肽是独特型的抗体片段, 所述片段包括, 但不限于: (a) 通过胃蛋白酶消化抗体分子产生的  $F(ab')_2$  片段; (b) 通过还原  $F(ab')_2$  片段的二硫键产生的 Fab 片段; (c) 通过用木瓜蛋白酶和还原剂处理抗体分子产生的 Fab 片段, 和 (d) Fv 片段。

[0148] 双特异性抗体也在本发明的范围之内。双特异性抗体是对至少两个不同抗原具有结合特异性的单克隆抗体, 优选是人类或人源化抗体。

[0149] 本领域已知制备双特异性抗体的方法。例如, 在本案中, 结合特异性之一是对于本发明的抗原性多肽 (Notch1 或其片段), 而第二结合靶标是任何其它抗体, 并且有利地是细胞表面蛋白, 或受体或受体亚基。双特异性抗体的重组生产是基于两个免疫球蛋白重链 / 轻链对的共表达, 其中所述两个重链具有不同的特异性 (Milstein 和 Cuello, *Nature* 1983, 305 : 537-539)。由于免疫球蛋白重链和轻链的随机分配, 这些杂交瘤 (四源杂交瘤) 产生十种不同抗体分子的潜在混合物, 其中仅一种具有正确的双特异性结构。通常通过亲和色谱实现对正确分子的纯化。

[0150] 可以将具有所需结合特异性的抗体可变域与免疫球蛋白恒定域序列融合。融合物具有免疫球蛋白重链恒定域, 包括至少部分铰链、CH2 和 CH3 区。含有轻链结合所需位点的第一重链恒定区 (CH1) 可以存在于至少一个融合物中。将编码免疫球蛋白重链融合物和如果需要的话, 免疫球蛋白轻链的 DNA, 插入到单独的表达载体中, 并将其共转染到合适的宿主生物体中。在 Suresh 等, *Methods in Enzymology* 1986, 121 : 210 中可以发现产生双特异性抗体的更详细描述。

[0151] 可以将双特异性抗体制备成全长抗体或抗体片段。在该文献中已经描述了用于从抗体片段产生双特异性抗体的技术。例如, 可以使用化学键制备双特异性抗体。另外, Brennan 等, *Science* 1985, 229 : 81 描述了其中将完整抗体进行蛋白水解切割以产生

F(ab')<sub>2</sub> 片段的步骤。

[0152] 另外,可以直接从大肠杆菌回收 Fab' 片段,并对其进行化学偶联以形成双特异性抗体 (Shalaby 等, J. Exp. Med. 1992, 175 :217-225)。这些方法可用于生产全长人源化双特异性抗体 F(ab')<sub>2</sub> 分子。

[0153] 还涉及具有超过两价的抗体。例如,可以制备三特异性抗体 (Tutt 等, 1991, J. Immunol. 147 :60)。

[0154] 本发明还包含特异性识别 Notch1 受体的胞外域的近膜区的双特异性抗体。双特异性抗体是能够特异性识别和结合至少两个不同表位的抗体。不同的表位可以位于同一分子 (例如同一个 Notch1) 内或位于不同的分子上,以使得例如所述抗体可以特异性识别和结合 Notch1 受体,以及,例如 1) 白细胞上的效应分子,例如 T 细胞受体 (如 CD3) 或 Fc 受体 (如 CD64、CD32 或 CD 16) 或 2) 以下详细描述细胞毒性剂。双特异性抗体可以是完整抗体或抗体片段。用于制备双特异性抗体的技术是本领域常见的 (Millstein 等, 1983, Nature, 305 :537-539 ;Brennan 等, 1985, Science, 229 :81 ;Suresh 等, 1986, Methods in Enzymol., 121 :120 ;Traunecker 等, 1991, EMBO J., 10 :3655-3659 ;Shalaby 等, 1992, J. Exp. Med., 175 :217-225 ;Kostelny 等, 1992, J. Immunol., 148 :1547-1553 ;Gruber 等, 1994, J. Immunol., 152 :5368 ;和美国专利第 5, 731, 168 号)。

[0155] 示例性的双特异性抗体可以与两个不同的表位结合,其中至少一个表位源自本发明的多肽。作为选择,免疫球蛋白分子的抗-抗原性臂可以与可结合位于白细胞上的触发分子的臂组合,从而将细胞防御机制集中到表达特定抗原的细胞,所述触发分子例如 T 细胞受体分子 (例如 CD2、CD3、CD28 或 B7),或 IgG 的 Fc 受体。还可使用双特异性抗体来将细胞毒性剂导向表达特定抗原的细胞。这些抗体拥有抗原结合臂和结合诸如 EOTUBE、DPTA、DOTA 或 TETA 等细胞毒性剂或放射性核素螯合剂的臂。

[0156] 异源缀合抗体 (heteroconjugate antibody) 也在本发明的范围之内。异源缀合抗体由两个共价结合的抗体组成。例如,已经提出所述抗体可使免疫细胞靶向不想要的细胞 (美国专利 4, 676, 980)。设想的是可以使用合成蛋白质化学中的已知方法在体外制备所述抗体,所述合成蛋白质化学包括涉及交联剂的合成蛋白质化学。例如,可以利用二硫键交换反应或通过形成硫醚键来构建免疫毒素。用于该目的的合适试剂的实例包括亚氨基硫醇盐 (或酯) (iminothiolate) 和甲基-4-巯基丁亚氨酸盐 (或酯)。

[0157] 为了本发明的目的,应该意识到经修饰抗体可以包括任何类型的可变区,所述可变区提供所述抗体与 Notch1 受体的胞外域的近膜区的结合。在这点上,所述可变区可以包括或源自任何类型的哺乳动物,可以诱导所述哺乳动物发动体液应答和产生针对所需肿瘤相关抗原的免疫球蛋白。因此,经修饰抗体的可变区可以是例如人类、鼠类、非人灵长类 (如食蟹猴、猕猴等) 或狼来源。在某些实施方式中经修饰免疫球蛋白的可变区和恒定区是人类的。在其它实施方式中,可以对相容性抗体的可变区 (通常源自非人类来源) 进行工程化或特异性剪裁,从而改善结合性质或减少所述分子的免疫原性。在这点上,可以对本发明所用的可变区进行人源化,或通过包含所引入的氨基酸序列而进行改变。

[0158] 在本发明的某些实施方式中,针对 Notch1 受体的胞外域的近膜区的单克隆抗体是人源化抗体。人源化抗体是在可变区内含有来自非人类 (例如鼠类) 抗体的最小序列的抗体。当对人类受试对象施用所述抗体时,治疗学上使用所述抗体来减少免疫原性和

HAMA(人抗鼠抗体)应答。实际上,人源化抗体通常是具有最小非人类序列至不含非人类序列的人类抗体。人类抗体是由人类产生的抗体或具有与由人类产生的抗体相应的氨基酸序列的抗体。

[0159] 可以使用本领域已知的各种技术生产人源化抗体。可以通过用具有所需特异性、亲和性和/或能力的非人类抗体(例如小鼠、大鼠、兔、仓鼠等)的CDR取代人类抗体的CDR而使抗体人源化(Jones等,1986, Nature, 321:522-525;Riechmann等,1988, Nature, 332:323-327;Verhoeyen等,1988, Science, 239:1534-1536)。可以通过在Fv框架区中和/或在已置换的非人类残基内取代另外的残基而进一步对所述人源化抗体进行修饰,从而改进和优化抗体特异性、亲和性和/或能力。

[0160] 在本发明的某些实施方式中,所述抗体是与人类Notch1受体的胞外域的非配体结合近膜区特异性结合的人源化抗体。在某些实施方式中,所述抗体包含与SEQ ID NO:24具有至少90%序列同一性的重链可变区;和/或与SEQ ID NO:28或SEQ ID NO:32具有至少90%序列同一性的轻链可变区。在某些实施方式中,所述抗体包含与SEQ ID NO:24具有至少95%序列同一性的重链可变区,和/或与SEQ ID NO:28或SEQ ID NO:32具有至少95%序列同一性的轻链可变区。

[0161] 在某些实施方式中,所述人源化抗体包含SEQ ID NO:24的重链可变区,和SEQ ID NO:28的轻链可变区。在某些实施方式中,所述人源化抗体包含SEQ ID NO:24的重链可变区,和SEQ ID NO:32的轻链可变区。

[0162] 可以使用本领域已知的各种技术直接制备人类抗体。可以产生体外免疫的或分离自经免疫个体的永生化人B淋巴细胞,所述经免疫个体产生针对靶抗原的抗体(参见,例如,Cole等, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, 第77页(1985);Boemer等,1991, J. Immunol., 147(1)86-95;和美国专利第5,750,373号)。另外,所述人类抗体可以选自噬菌体文库,其中该噬菌体文库表达人类抗体(Vaughan等,1996, Nature Biotechnology, 14:309-314;Sheets等,1998, PNAS, 95:6157-6162;Hoogenboom和Winter,1991, J. Mol. Biol., 227:381;Marks等,1991, J. Mol. Biol., 222:581)。还可以在含有人类免疫球蛋白基因座的转基因小鼠中制备人源化抗体,当免疫时,在不存在内源性免疫球蛋白产生的情况下所述人类免疫球蛋白基因座能够产生全部指令集(repertoire)的人类抗体。例如,已经描述了在嵌合的种系突变小鼠中使抗体重链连接区(JH)基因的纯合缺失导致完全抑制内源性抗体的产生。将人类种系免疫球蛋白基因阵列转移到所述种系突变小鼠中会导致当抗原挑战时人类抗体的产生。(参见,例如, Jakobovits等,1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551;Jakobovits等,1993, Nature, 362:255-258;Bruggemann等,1993, Year in Immunol. 7:33;美国专利5,545,807;5,545,806;5,569,825;5,625,126;5,633,425和5,661,016。

[0163] 作为选择,噬菌体展示技术可用于体外从来自未经免疫供体的免疫球蛋白可变(V)域基因指令集(repertoire)中生产人类抗体和抗体片段。根据该技术,将抗体V域基因在框架内克隆到诸如M13或fd等丝状噬菌体的主要或次要外壳蛋白基因中,并且作为功能抗体片段展示在噬菌体颗粒的表面上。由于丝状颗粒含有噬菌体基因组的单链DNA拷贝,基于抗体的功能性质的选择还导致编码展示这些性质的抗体的基因的选择。因此,该噬菌体模拟B细胞的某些性质。可以以各种形式进行噬菌体展示。对于噬菌体展示可使用几



种来源的 V- 基因区段。已经从源自经免疫小鼠的脾的 V 基因的小随机组合文库中分离出抗噁唑酮抗体的各种阵列。可以构建来自未经免疫人类供体的 V 基因的指令集,并且可以分离针对抗原(包括自体抗原)的各种阵列的抗体。

[0164] 如上讨论,还可以通过体外激活的 B 细胞产生人类抗体(参见美国专利第 5,567,610 号和第 5,229,275 号)。

[0165] 应该意识到将整个非人类可变域移植到人类恒定区会产生“经典”嵌合抗体。在本申请的情况下,术语“嵌合抗体”用来指任何其中免疫反应区或位点获自或源自第一物种,并且恒定区(根据本发明其可以是完整、部分或经修饰的)获自第二物种。在某些实施方式中,抗原结合区或位点会来自非人类来源(例如小鼠),并且恒定区是人类的。虽然可变区的免疫原性特异性通常不受其来源影响,与来自非人类来源的恒定区相比,人类恒定区更不可能引发人类受试对象的免疫应答。

[0166] 通过至少部分置换一个或多个 CDR,以及必要时通过部分框架区置换和序列变化,可改变重链和轻链中的可变区。虽然所述 CDR 可以源自与框架区所源自的抗体相同类别或甚至相同亚类的抗体,可以设想所述 CDR 源自不同类别的抗体,并且优选源自不同物种的抗体。必须强调为了将一个可变域的抗原结合能力转移到另一个可变域,不需要将全部 CDR 用来自供体可变区的完整 CDR 置换。相反,可以仅需要转移对于维持抗原结合位点活性所必需的那些残基。根据美国专利第 5,585,089 号、5,693,761 号和 5,693,762 号中提出的解释,在本领域内可以很好地通过进行常规实验或通过试错试验以获得免疫原性降低的功能抗体。

[0167] 虽然对可变区进行了改变,但应该意识到本发明的经修饰抗体会包含下述抗体或其免疫反应性片段:其中一个或多个恒定区结构域的至少一部分已经缺失或改变从而提供所需生化特性,例如当与包含天然或未经改变恒定区的免疫原性近似相同的抗体相比,肿瘤定位增加或血清半衰期减少。在某些实施方式中,经修饰抗体的恒定区会包含人类恒定区。与本发明相容的对恒定区的修饰包括在一个或多个域中的一个或多个氨基酸的添加、缺失或取代。即,本文所述的经修饰抗体可以包含对三个重链恒定区(CH1、CH2 或 CH3)和/或轻链恒定区(CL)中的一个或多个进行改变或修饰。在本发明的某些实施方式中涉及其中一个或多个域部分或完全缺失的经修饰恒定区。在其它实施方式中经修饰抗体会包含其中除去整个 CH2 域的域缺失构建体或变体( $\Delta$ CH2 构建体)。在其它实施方式中省略的恒定区域会被短的氨基酸间隔子(例如 10 个残基)置换,所述间隔子提供通常由缺少的恒定区赋予的某些分子柔性。

[0168] 除了其构造之外,本领域已知恒定区介导几种效应子功能。例如,补体的 C1 组分与抗体的结合激活补体系统。补体的激活在细胞病原体的调理作用和裂解中是重要的。补体的激活还刺激炎症反应,并且还可以涉及自体免疫超敏性。另外,抗体经由 Fc 区与细胞结合,伴随着位于抗体 Fc 区上的 Fc 受体位点与位于细胞上的 Fc 受体(FcR)结合。存在许多对不同种类的抗体具有特异性的 Fc 受体,包括 IgG( $\gamma$  受体)、IgE( $\epsilon$  受体)、IgA( $\alpha$  受体)和 IgM( $\mu$  受体)。抗体与位于细胞表面上 Fc 受体的结合触发许多重要的各种生物应答,包括抗体包被颗粒的内吞和破坏、免疫复合物的清除、抗体包被靶细胞被杀伤细胞裂解(称为抗体依赖性细胞介导的细胞毒性,或 ADCC)、炎症介体的释放、胎盘转移和免疫球蛋白产生的控制。虽然已经对各种 Fc 受体和受体位点研究到某种程度,关于其定位、结构和

功能仍然存在许多未知。

[0169] 虽然不限制本发明的范围,据信包含本文所述进行修饰的恒定区的抗体提供经改变的效应子功能,这进而影响所施用抗体的生物特征。例如,恒定区结构域的缺失或失活(通过点突变或其它方式)可以减少 Fc 受体与循环的经修饰抗体的结合,由此增加肿瘤定位。在其它情况下,可以的是,与本发明相容的恒定区修饰缓和补体结合并且由此减少血清半衰期和缀合细胞毒素的非特异性结合。还可使用恒定区的其它修饰来消除双硫键或寡糖基团,从而由于抗原特异性或抗体柔性增加而增强定位。类似地,使用众所周知的生化或分子工程化技术可以容易地进行根据本发明对恒定区的修饰。

[0170] 应该注意可以对经修饰抗体进行工程化以将 CH3 域直接融合到各经修饰抗体的铰链区。在其它构建体中理想的是在铰链区和经修饰 CH2 和 / 或 CH3 域之间提供肽间隔子。例如,可以表达相容性构建体,所述构建体中 CH2 域已经缺失,并且剩余的 CH3 域(经修饰或未经修饰)与具有 5 ~ 20 个氨基酸的间隔子的铰链区结合。例如,可以添加所述间隔子,从而确保恒定域的调节元件保持自由并且是可接触的,或确保铰链区保持柔性。但是,应该注意在某些情况下,可以证明氨基酸间隔子具有免疫原性,并且引发不想要的针对所述构建体的免疫应答。因此,如果可以维持经修饰抗体的所需生化质量,则向构建体添加的任何间隔子是相对非免疫原性的,甚至可以一起省略。

[0171] 除了缺失整个恒定区结构域之外,应意识到可以通过几个甚至单个氨基酸的部分缺失或取代来提供本发明的抗体。例如,在 CH2 域的所选区域中单个氨基酸的突变可能足以实质地减少 Fc 结合并由此增加肿瘤定位。类似地,理想的是可简单地缺失一个或多个控制待调节的效应子功能(例如补体 CLQ 结合)的恒定区结构域的部分。恒定区的所述部分缺失可以改善抗体的所选特性(血清半衰期),同时使与受试对象恒定区结构域有关的其它所需功能保持完整。另外,如上所述,可以通过增强所得构建体性质的一个或多个氨基酸的突变或取代而对所公开抗体的恒定区进行修饰。在这点上,可以破坏由保守结合位点提供的活性(例如 Fc 结合),同时基本上保持经修饰抗体的构造和免疫原性特征。其它实施方式还包括将一个或多个氨基酸添加到恒定区,从而增强诸如效应子功能等所需特性或提供更多的细胞毒素或糖类粘附。在所述实施方式中可以期望插入或复制源自所选恒定区结构域的特异性序列。

[0172] 在本发明的特定实施方式中,可以期望使用抗体片段而不是完整抗体,来例如增加肿瘤渗透。已知用于生产抗体片段的各种技术。常规上,这些片段经由蛋白水解消化完整抗体衍生(例如 Morimoto 等,1993, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24 :107-117 和 Brennan 等,1985, *Science*, 229 :81)。但是,现在这些片段通常通过如上所述的重组宿主细胞直接产生。因此 Fab、Fv 和 scFv 抗体片段可以都在大肠杆菌或其它宿主细胞中表达和分泌,从而允许生产大量的这些片段。作为选择,可以从本文讨论的抗体噬菌体文库中分离所述抗体片段。所述抗体片段还可以例如是美国专利第 5,641,870 号中所述的线性抗体,并且可以是单特异性或双特异性的。对于本领域技术人员而言用于生产抗体片段的其它技术是显而易见的。

[0173] 特别在抗体片段的情况下,还可以期望对抗体进行修饰从而增加其血清半衰期。这可以通过下述方式实现:例如通过在抗体片段中合适区域的突变从而将补救受体(salvage receptor)结合表位引入到抗体片段中,或通过所述表位引入到肽标签中,然

后所述肽标签与在任一端或在中间的抗体片段融合（例如通过 DNA 或肽合成）。

[0174] 本发明还包括与本文提出的嵌合抗体、人源化抗体和人类抗体，或其抗体片段基本上同源的变体或等效物。这些可以含有例如，保守性取代突变，即一个或多个氨基酸被类似的氨基酸取代。例如，保守性取代是指氨基酸被同一总种类的另一氨基酸取代，例如，一个酸性氨基酸被另一酸性氨基酸取代，一个碱性氨基酸被另一碱性氨基酸取代或一个中性氨基酸被另一中性氨基酸取代。保守性氨基酸取代所指含义是本领域众所周知的。

[0175] 本发明还涉及包含与细胞毒性剂缀合的免疫缀合物。细胞毒性剂包括化学治疗剂、生长抑制剂、毒素（例如细菌、真菌、植物或动物来源的酶促活性毒素，或其片段）、放射性同位素（即放射缀合物）等。用于产生此类免疫缀合物的化学治疗剂包括，例如，氮甲蝶呤、阿霉素、多柔比星、美法仑、丝裂霉素 C、苯丁酸氮芥、道诺红菌素或其它嵌入剂。可以使用的酶促活性毒素和其片段包括白喉 A 链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素 A 链、蓖麻毒蛋白 A 链、相思豆毒蛋白 A 链、蒴莲根毒蛋白 A 链、 $\alpha$ -八叠球菌素、油桐 (*Aleurites fordii*) 蛋白、石竹素蛋白、美国商陆蛋白 (PAPI、PAPII 和 PAP-S)、苦瓜 (*Momordica charantia*) 抑制剂、麻风树毒素、巴豆毒素、肥皂草 (*Saponaire officinalis*) 抑制剂、白树毒素、有丝分裂毒素 (mitogellin)、局限曲菌素、酚霉素、依诺霉素和新月毒素。在某些实施方式中，可以使用许多众所周知的螯合剂或直接标记法使所述抗体与诸如  $^{90}\text{Y}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{105}\text{Rh}$ 、 $^{153}\text{Sm}$ 、 $^{67}\text{Cu}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ 、 $^{166}\text{Ho}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{186}\text{Re}$  和  $^{188}\text{Re}$  等放射性同位素缀合。在其它实施方式中，所公开的组合物可以包含与药物、前药或诸如干扰素等淋巴因子偶联的抗体。可以使用各种双官能蛋白偶联剂制备抗体和细胞毒性剂的缀合物，所述双功能蛋白偶联剂例如 N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶二硫代)丙酸酯 (SPDP)、亚氨基硫烷 (IT)、亚氨酸酯的双官能衍生物（例如二甲基己二亚氨基酯 HCL）、活性酯（例如二琥珀酰亚胺辛二酸酯）、醛（例如戊二醛）、双叠氮化合物（例如双（对叠氮苯甲酰）己二胺）、双重氨基衍生物（例如双（对重氮苯甲酰）-乙二胺）、二异氰酸酯（例如亚甲苯 2,6-二异氰酸酯）和双活性氟化合物（例如 1,5-二氟-2,4-二硝基苯）。还可以使用抗体与一种或多种小分子毒素的缀合物，所述小分子毒素例如加利车霉素、美登醇、单端孢霉烯 (trichothene) 和 CC1065，以及具有毒素活性的这些毒素的衍生物。在某些实施方式中，经修饰抗体可以与其它免疫活性配体（例如抗体或其片段）复合，其中所得分子与瘤细胞和诸如 T 细胞等效应细胞都结合。

[0176] 无论如何获得可用量，本发明的抗体可以以许多缀合（即免疫缀合物）或未缀合形式中的任一种使用。作为选择，本发明抗体可以以未缀合或“裸”形式使用，从而利用受试对象的天然防御机制以消除恶性细胞，所述天然防御机制包括补体依赖性细胞毒性 (CDC) 和抗体依赖性细胞毒性 (ADCC)。选择使用缀合或未缀合的经修饰抗体取决于癌的种类和阶段、附加治疗（例如化学治疗或外部辐射）的使用和患者情况。应意识到考虑到本文的教导，能够容易地进行所述选择。

[0177] 竞争检测可用于确定两个抗体是否通过识别相同或空间上重叠的表位而结合同一表位。可以使用本领域技术人员已知的用于确定竞争性结合的任何方法（例如，本文别处所述的免疫检测）。

[0178] 可以通过本领域已知的任何方法检测本发明抗体的免疫特异性结合。可以使用的免疫检测包括，但不限于使用下述技术的竞争性和非竞争性检测系统：如 Biacore 分析、FACS 分析、免疫荧光、免疫细胞化学、蛋白质印迹分析、放射免疫检测、ELISA、“夹心”免疫

检测、免疫沉淀检测、沉淀素反应、凝胶扩散沉淀素反应、免疫扩散检测、凝集检测、补体固定检测、免疫放射度检测、荧光免疫检测和蛋白 A 免疫检测。所述检测在本领域中是常规的并且是众所周知的（参见，例如 Ausubel 等，eds, 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, 第 1 卷, John Wiley & Sons, Inc., New York, 本文通过参考并入其全文）。

[0179] 在本发明的某些实施方式中，使用 ELISA 确定针对人类 Notch1 受体的胞外域的近膜区的抗体的免疫特异性。ELISA 检测包括：制备抗原，用抗原包被 96 孔微量滴定板的孔，向所述孔中添加与诸如酶的底物（例如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶）等可检测化合物缀合的针对癌干细胞标记物的抗体，温育一段时间，并且检测所述抗原的存在。作为选择，针对人类 Notch1 受体的胞外域的近膜区的抗体不与可检测化合物缀合，而是向所述孔中添加识别针对人类 Notch1 受体的胞外域的近膜区的抗体的第二缀合抗体。另外，代替用抗原包被所述孔的是，可以用针对人类 Notch1 受体的胞外域的近膜区的抗体包被所述孔，并且在向经包被的孔中添加抗原后添加与可检测化合物缀合的第二抗体。本领域中已知经改编而可以增加检出信号的参数，并且本领域还已知 ELISA 的其它变化形式（参见例如 Ausubel 等，eds, 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, 第 1 卷, John Wiley & Sons, Inc., New York at 11.2.1）。

[0180] 可以通过竞争结合检测确定抗体与 Notch1 受体的胞外域的近膜区的结合亲和力和抗体抗原相互作用的解离率 (off-rate)。竞争结合检测的一个实例是放射免疫检测，所述放射免疫检测包括在增加量的未标记抗原的存在下使经标记抗原（例如  $^3\text{H}$  或  $^{125}\text{I}$ ）或其片段或变体与目的抗体一起温育，然后检测与经标记抗原结合的抗体。可以从根据斯卡恰特作图分析获得的数据确定针对人类 Notch1 受体的胞外域的近膜区的抗体的亲和力和结合解离率。在某些实施方式中，使用 Biacore 动力学分析来确定针对人类 Notch1 受体的胞外域的近膜区的抗体的结合速率和解离率。Biacore 动力学分析包括分析抗体与表面上固定有诸如 Notch1 受体等抗原的芯片的结合和解离。

[0181] 在特定实施方式中，本发明包括分离的多核苷酸，所述分离的多核苷酸编码包含针对人类 Notch1 受体的胞外域的非配体结合近膜区的抗体或其片段的多肽。术语“编码多肽的多核苷酸”包括仅含有所述多肽的编码序列的多核苷酸以及含有另外的编码和 / 或非编码序列的多核苷酸。本发明的多核苷酸可以是 RNA 形式或 DNA 的形式。DNA 包括 cDNA、基因组 DNA 和合成 DNA；并且可以是双链或单链的，并且如果是单链可以是编码链或非编码（反义）链。本发明的多核苷酸可以是 RNA 形式或 DNA 的形式，所述 DNA 包括 cDNA、基因组 DNA 和合成 DNA。所述 DNA 可以是双链或单链的，并且如果是单链可以是编码链或非编码（反义）链。

[0182] 本发明还涉及编码片段、类似物和衍生物的上文所述多核苷酸的变体。所述多核苷酸的变体可以是所述多核苷酸的天然存在的等位变体或所述多核苷酸的非天然存在的变体。

[0183] 如上文指出，所述多核苷酸可以具有编码序列，所述编码序列是所公开多肽的编码序列的天然存在的等位变体。本领域已知，等位变体是具有一个或多个核苷酸的取代、缺失或添加的多核苷酸序列的替代形式，其基本上不改变所编码多肽的功能。

[0184] 本发明还包括多核苷酸，所述多核苷酸中成熟多肽的编码序列融合在有助于多肽表达和从宿主细胞分泌的多核苷酸的同一阅读框中，所述有助于多肽表达和从宿主细胞

分泌的多核苷酸例如有前导序列,其充当用于控制所述细胞的多肽的转运的分泌序列。具有前导序列的多肽是前蛋白 (preprotein),并且可以使前导序列被宿主细胞切割,从而形成所述多肽的成熟形式。所述多核苷酸还可以编码蛋白原 (proprotein),所述蛋白原是成熟蛋白加上另外的 5' 氨基酸残基。具有序列原 (prosequence) 的成熟蛋白是蛋白原,并使是蛋白的失活形式。序列原被切割时,保留活性成熟蛋白。因此,例如,本发明的多肽可以编码成熟蛋白,或编码具有序列原的蛋白,或编码同时具有序列原和前序列 (presequence, 前导序列) 的蛋白。

[0185] 本发明的多核苷酸还可以具有与标记物序列框内融合的编码序列,所述标记物序列允许对本发明的多肽进行纯化。所述标记物序列可以是 pQE-9 载体提供的六聚组氨酸标签,从而在细菌宿主的情况下提供对与所述标记物融合的成熟多肽的纯化,或例如,当使用诸如 COS-7 细胞等哺乳动物宿主时,所述标记物序列可以是血凝素 (HA) 标签。HA 标签对应于源自流感病毒血凝素蛋白的表位 (Wilson 等,1984, Cell 37 :767)。

[0186] 本发明的其它实施方式包括分离的核酸分子,所述分离的核酸分子包含具有与所公开的序列具有至少 90% 同一性、95% 同一性、以及某些实施方式中至少 96%、97%、98% 或 99% 同一性的核苷酸序列的多核苷酸。在某些实施方式中,所述多核苷酸具有与 SEQ ID NO :3、5、7、9、11、13、21、25 或 29 (带有或不带有信号序列) 具有至少 90% 同一性的核苷酸序列。在某些实施方式中,所述多核苷酸具有与 SEQ ID NO :7 或 13 具有至少 90% 同一性的核苷酸序列。在某些实施方式中,本发明提供与编码多肽 SEQ ID NO :4、6、8、10、12、14、22、23、24、26、27、28、30、31 或 32 的多核苷酸杂交的多核苷酸。在某些实施方式中,所述多核苷酸与多核苷酸 SEQ ID NO :3、5、7、9、11、13、21、25 或 29 杂交。在某些实施方式中,所述多核苷酸在严谨杂交条件下杂交。

[0187] 如本文所用,术语“杂交”或“选择性杂交”或“特异性杂交”是指当特定的核苷酸序列存在于复杂混合物 (例如, DNA 或 RNA 的文库) 中时,分子仅与该特定的核苷酸序列在严谨杂交条件下杂交或形成双链 (duplexing)。参见,例如 Andersen (1998) *Nucleic Acid Hybridization* Springer-Verlag ; Ross (1997 年编辑) *Nucleic Acid Hybridization* Wiley。

[0188] 如本文所用,短语“严谨杂交条件”是指探针与其靶亚序列 (subsequence) 通常以核酸的复杂混合物形式杂交,但不与其它序列杂交的条件。严谨条件是序列依赖性的,并且在不同环境下是不同的。较长的序列在较高的温度下特异性杂交。在 Tijssen, *Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Probes*, " Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays " (1993) 中可发现核酸杂交的详尽指南。通常而言,在规定的离子强度下将严谨条件选择成比特定序列的热溶解温度 ( $T_m$ ) 低约  $5^{\circ}\text{C} \sim 10^{\circ}\text{C}$ 。 $T_m$  是 (在规定的离子强度、pH 和核酸浓度下) 在该温度下平衡时 50% 的与靶标互补的探针与靶序列杂交时的温度 (因为靶序列过量存在,在  $T_m$  下,平衡时 50% 的探针被占据)。严谨条件是 pH 为 7.0 ~ 8.3 时盐浓度低于约 1.0M 钠离子,通常是约 0.01M ~ 1.0M 钠离子浓度 (或其它盐),对于短探针 (例如 10 ~ 50 个核苷酸) 温度是至少约  $30^{\circ}\text{C}$ ,对于长探针 (例如,大于 50 个核苷酸) 温度是至少约  $60^{\circ}\text{C}$ 。还可以添加诸如甲酰胺等去稳定剂来实现严谨条件。对于高严谨杂交,阳性信号是背景的至少两倍,或背景杂交的 10 倍。示例性的高严谨性或严谨杂交条件

包括:50%甲酰胺,5×SSC和1%SDS,在42℃温育或5×SSC和1%SDS在65℃下温育,在0.2×SSC和0.1%SDS中于65℃下洗涤。对于PCR,对于低严谨扩增温度通常是约36℃,不过根据引物长度退火温度可以是约32℃~约48℃。对于高严谨PCR扩增,温度通常是约62℃,不过根据引物长度和特异性高严谨退火温度可以是约50℃~约65℃。用于高严谨扩增和低严谨扩增的典型循环条件包括90℃~95℃的变性阶段30秒~120秒,退火阶段持续30秒~120秒,以及约72℃延伸阶段1分钟~2分钟。

[0189] 具有与参照核苷酸序列具有至少例如95%“同一性”的核苷酸序列的多核苷酸,是指该多核苷酸的核苷酸序列与参照序列相似,不同之处在于该多核苷酸序列可以在参照核苷酸序列的每100个核苷酸中包括最多5个点突变。换言之,为了获得具有与参照核苷酸序列具有至少95%同一性的核苷酸序列的多核苷酸,参照序列中最多5%的核苷酸可以缺失或被其他核苷酸取代,或数量最多是参照序列中总核苷酸5%的核苷酸可以插入参照序列中。参照序列的这些突变可以出现在参照核苷酸序列的氨基或羧基末端位置,或这些末端位置之间的任何地方,单独散布在参照序列内的核苷酸中,或位于参照序列内的一个或多个连续基团中。

[0190] 实际上,常规上使用诸如Bestfit程序等已知的计算机程序可以确定任何特定的核酸分子是否与参照序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性(Wisconsin Sequence Analysis Package,用于Unix的第8版本,Genetics Computer Group,University Research Park,575 Science Drive, Madison, WI 53711)。Bestfit使用Smith和Waterman,Advances in Applied Mathematics 2:482489(1981)的局部同源性算法,来发现两个序列之间的同源性最佳区段。当然,当使用Bestfit或任何其它序列比对程序来确定特定序列是否与本发明的参照序列具有例如95%同一性时,对参数进行设定,使得在参照核苷酸序列的全长上计算同一性百分比,并且允许同源性的空位最多是参照序列中核苷酸总数的5%。

[0191] 多核苷酸变体可以含有编码区和/或非编码区的改变。在某些实施方式中多核苷酸变体含有产生沉默取代、添加或缺失,但不改变所编码多肽的性质或活性。在某些实施方式中,由于遗传编码的简并性通过沉默取代而产生核苷酸变体。可以出于各种原因生产多核苷酸变体,从而例如对特定宿主优化密码子表达(将人类mRNA中密码子改变为诸如大肠杆菌等细菌宿主偏好的密码子)。

[0192] 本发明的多肽可以是重组多肽、天然多肽或合成多肽,上述多肽包含针对人类Notch1受体的胞外域的非配体结合近膜区的抗体,或其片段。本领域承认可以改变本发明的某些氨基酸序列而不会显著影响蛋白的结构或功能。因此,本发明还包括多肽的变体,所述变体显示基本活性或包括针对人类Notch1受体的胞外域的近膜区的抗体,或其片段的区域。此类突变包括缺失、插入、倒置、重复和类型取代。

[0193] 本发明的多肽和多核苷酸以分离形式提供,并且有时经纯化以使其具有均一性。

[0194] 可以通过本领域已知的任何合适的方法生产本文所述分离的多肽。所述方法从直接蛋白合成方法,到构建编码分离的多肽序列的DNA序列,并且在合适的经转化宿主中表达这些序列。例如,可以通过用编码多肽的经标记的DNA片段(例如,核苷酸SEQ ID NO:1)筛选人类cDNA文库,并且通过放射自显影鉴定阳性克隆,从而获得cDNA。使用常规方法进行其它轮次的噬斑纯化和杂交。

[0195] 在重组方法的某些实施方式中,通过分离或合成编码野生型目的蛋白的 DNA 序列来构建 DNA 序列。可选的是,可以通过位点特异性突变来对所述序列进行诱变从而提供其功能类似物。(参见,例如 Zoeller 等,1984,Proc-Nat Acad Sci USA,81:5662-5066 和美国专利第 4,588,585 号。构建编码目的多肽的 DNA 序列的另一方法通过使用寡核苷酸合成仪的化学合成进行。可以基于所需多肽的氨基酸序列和选择在会产生重组目的多肽的宿主细胞中偏好的那些密码子来设计所述寡核苷酸。

[0196] 可以应用标准方法来合成编码分离的目的多肽的分离的多核苷酸序列。例如,可以使用完整氨基酸序列来构建反译 (back-translated) 基因。另外,可以合成含有编码特定分离的多肽的核苷酸序列的 DNA 寡聚物。例如,可以合成几种编码所需多肽的一部分的小型寡核苷酸并将其连接。各寡核苷酸通常含有 5' 或 3' 突出端以用于互补组装。

[0197] 一旦进行组装(通过合成、定点突变发生或另一方法),则将编码特定的分离的目的多肽的突变 DNA 序列插入表达载体并可操作地连接至适合在所需宿主中表达所述蛋白的表达控制序列。可以通过核苷酸测序、限制酶切作图和合适宿主中表达生物活性多肽来确认合适的组装。如本领域众所周知,为了在宿主中获得转基因的高表达水平,将该基因可操作地连接至转录和翻译表达控制序列,该表达控制序列在所选表达宿主中具有功能。

[0198] 使用重组表达载体来扩增和表达编码癌干细胞标记多肽融合物的 DNA。重组表达载体是可复制的 DNA 构建体,其具有编码癌干细胞标记多肽融合物或生物等效类似物的合成或 cDNA 来源的 DNA 片段,所述 DNA 片段与源自哺乳动物、微生物、病毒或昆虫基因的合适的转录或翻译调节元件可操作地连接。如以下详细描述,转录单元通常包括以下组件的组装体:(1) 在基因表达中具有调节作用的遗传元件,例如,转录启动子或增强子,(2) 转录为 mRNA 并且翻译成蛋白的结构或编码序列,和 (3) 合适的转录和翻译启动和终止序列。所述调节元件可以包括用于控制转录的操作子序列。在宿主中复制的能力通常由复制原点赋予,并且可以另外引入便于识别转化体的选择基因。当 DNA 区域相互功能上相关时,将它们可操作地连接。例如,如果信号肽(分泌前导)的 DNA 表达为参与多肽分泌的前体,则信号肽(分泌前导)的 DNA 可操作地与多肽的 DNA 可操作地连接;如果启动子控制编码序列的转录,则启动子与编码序列可操作地连接;或如果核糖体结合位点经定位而允许翻译,则核糖体结合位点与编码序列可操作地连接。通常,可操作地连接意味着是连续的,并且在分泌前导区的情况下,意味着连续并且在阅读框中。旨在在酵母表达系统中使用的结构元件包括能够使宿主细胞将翻译蛋白分泌到胞外的前导序列。作为选择,当表达不具有前导序列或转运序列的重组蛋白时,其可以包括 N 末端蛋氨酸残基。可选地是可以随后从表达重组蛋白中切割下该残基以提供最终产物。

[0199] 表达控制序列和表达载体的选择取决于宿主的选择。可以使用各种表达宿主/载体组合。对于真核宿主有用的表达载体包括,例如,包含来自 SV40、牛乳头状瘤病毒、腺病毒和巨细胞病毒的表达控制序列的载体。对于细菌宿主有用的表达载体包括已知的细菌质粒,例如包括 pCR1、pBR322、pMB9 和其衍生物等在内的来自大肠杆菌的质粒,以及诸如 M13 和丝状单链 DNA 噬菌体等广宿主范围质粒。

[0200] 用于表达癌干细胞标记蛋白的合适的宿主细胞包括原核生物、酵母、昆虫或高级真核细胞。原核生物包括革兰氏阴性生物体或革兰氏阳性生物体,例如大肠杆菌或杆菌。

高级真核细胞包括如下所述哺乳动物来源的已建立细胞系。还可以使用无细胞翻译系统。Pouwels 等描述了与细菌、真菌、酵母和哺乳动物细胞宿主一起使用的合适的克隆和表达载体 (Cloning Vectors-A Laboratory Manual, Elsevier, N. Y., 1985), 在此通过参考并入其相关内容。

[0201] 有利的是还使用各种哺乳动物或昆虫细胞培养系统来表达重组蛋白。可以在哺乳动物细胞中进行重组蛋白的表达, 因为所述蛋白通常正确地折叠、合适地修饰和具有完全功能。合适的哺乳动物宿主细胞系的实例包括 Gluzman (1981, Cell, 23 :175) 所述的猴肾细胞的 COS-7 系, 和能够表达合适载体的其它细胞系, 包括例如 L 细胞、C127、3T3、中国仓鼠卵巢 (CHO)、HeLa 和 BHK 细胞系。哺乳动物表达载体可以包含与待表达基因连接的诸如复制原点、合适的启动子和增强子等非转录元件和其它 5' 或 3' 侧翼非转录序列, 以及诸如必需的核糖体结合位点、聚腺苷酸化位点、剪接供体和受体位点以及转录终止序列等 5' 或 3' 非翻译序列。用于在昆虫细胞中产生异源性蛋白的杆状病毒系统由 Luckow 和 Summers, 1988, Bio/Technology, 6 :47 综述。

[0202] 可以根据任何合适的方法对由经转化宿主产生的蛋白进行纯化。所述标准方法包括色谱 (例如离子交换色谱、亲和色谱和分级柱 (sizing column) 色谱)、离心、差别溶解度或通过用于蛋白纯化的任何其它标准方法。诸如六聚组氨酸、麦芽糖结合域、流感病毒外壳序列和谷胱甘肽-S-转移酶等亲和标签可以与蛋白连接, 从而允许通过合适的亲和柱容易地进行纯化。使用诸如蛋白水解、核磁共振和 X-射线晶体学也可以物理地表征分离的蛋白。

[0203] 例如, 可以首先使用商购的蛋白浓缩过滤器, 例如 Amicon 或 Milhpore Pellicon 超滤装置对来自将重组蛋白分泌到培养基中的系统的上清液进行浓缩。浓缩步骤后, 将浓缩物施加到合适的纯化基质。作为选择, 可以使用阴离子交换树脂, 例如具有下垂的二乙氨基乙基 (DEAE) 基团的基质或基底。所述基质可以是丙烯酰胺、琼脂糖、葡聚糖、纤维素或蛋白纯化中常用的其它种类。作为选择, 可以使用阳离子交换步骤。合适的阳离子交换器包括各种含有磺丙基或羧甲基的不溶性基质。最后, 可以使用一种或多种反相高效液相色谱 (RP-HPLC) 步骤来进一步纯化重组蛋白或癌干细胞蛋白-Fc 组合物, 所述反相高效液相色谱步骤采用诸如具有下垂甲基或其它脂肪族基团的硅胶等疏水性 RP-HPLC 介质。还可以以各种组合使用上述纯化步骤中的一些或全部, 从而提供均一性的重组蛋白。

[0204] 细菌培养物中产生的重组蛋白通常通过起始提取从细胞团块中分离, 然后是一步或多步浓缩、盐析、水性离子交换或尺寸排阻色谱步骤。对于最后的纯化步骤可以使用高效液相色谱 (HPLC)。可以通过任何常规方法破坏重组蛋白表达中所用的微生物细胞, 包括冷冻-解冻循环、超声处理、机械破坏或是使用细胞裂解剂。

[0205] 本发明还提供使用本文所述癌干细胞标记物的拮抗剂来抑制表达癌干细胞标记物的致瘤性细胞生长的方法。在某些实施方式中, 抑制表达癌干细胞标记物 (例如 Notch1 受体) 的致瘤性细胞生长的方法, 包括使细胞与癌干细胞标记物的拮抗剂体外接触。例如, 在添加有所表达癌干细胞标记物的拮抗剂的培养基中培养表达癌干细胞标记物的永生化细胞系或癌细胞系, 从而抑制细胞生长。在某些实施方式中, 将包含肿瘤干细胞的肿瘤细胞从诸如组织活检、胸腔积液或血液样品等患者样品中分离, 并在添加有癌干细胞标记物的拮抗剂的培养基中培养, 从而抑制细胞生长。在某些实施方式中, 所述拮抗剂是特异性识别



癌干细胞标记物蛋白的表位的抗体。例如,可以向分离的癌干细胞的培养基中添加针对癌干细胞标记物蛋白的抗体,从而抑制细胞生长。

[0206] 在某些实施方式中,抑制表达癌干细胞标记物的致癌性细胞生长的方法包括使细胞与癌干细胞标记物的拮抗剂体内接触。在某些实施方式中,抑制表达 Notch1 的致癌性细胞的生长方法包括使细胞与特异性结合人类 Notch1 受体的非配体结合近膜区的抗体接触。在某些实施方式中,所述抗体通过抑制 Notch1 的活性抑制致癌性细胞的生长。在某些实施方式中,所述抗体通过抑制配体诱导的 Notch1 信号传导抑制致癌性细胞的生长。在某些实施方式中,所述抗体通过抑制 Notch1 的切割抑制致癌性细胞的生长。在某些实施方式中,所述抗体通过减少癌干细胞在肿瘤中的频率或数量抑制致癌性细胞的生长。

[0207] 在特定实施方式中,在动物模型中进行致癌性细胞与癌干细胞标记物的拮抗剂的接触。例如,使表达癌干细胞标记物的异种移植物在免疫妥协小鼠(例如 NOD/SCID 小鼠)中生长,对所述免疫妥协小鼠施用癌干细胞标记物的拮抗剂从而抑制肿瘤生长。在某些实施方式中,表达癌干细胞标记物的癌干细胞从诸如组织活检、胸腔积液或血液样品等患者样品中分离,并注入免疫妥协小鼠,然后对所述免疫妥协小鼠施用癌干细胞标记物的拮抗剂,从而抑制肿瘤细胞生长。在某些实施方式中,在将致癌性细胞导入动物的同时,或稍后不久施用癌干细胞标记的物拮抗剂,从而预防肿瘤生长。在其它实施方式中,在致癌性细胞已经生长至特定尺寸之后施用作为治疗剂的针对癌干细胞标记物的抗体。

[0208] 本发明还提供包含靶向癌干细胞标记物的抗体、多肽或其它试剂的药物组合物。发现这些药物组合物可用于抑制肿瘤生长、肿瘤细胞生长和治疗人类患者中的癌。

[0209] 通过将本发明的经纯化拮抗剂(例如,抗体)与药学上可接受的载剂(例如载体、赋形剂等)组合,制备用于贮存和使用的制剂(Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 第 20 版, Mack Publishing, 2000)。合适的药学上可接受的载剂包括,但不限于诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸等无毒缓冲剂;诸如氯化钠等盐;包括抗坏血酸和蛋氨酸在内的抗氧化剂;诸如十八烷基二甲基苄基氯化铵等防腐剂;六甲氯铵;苯扎氯铵;苜蓿素氯铵;苯酚、丁醇或苯甲醇;诸如尼泊金甲酯或尼泊金丙酯等尼泊金烷基酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚;低分子量多肽(小于约 10 个氨基酸);诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白等蛋白;诸如聚乙烯吡咯烷酮等亲水性聚合物;诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸等氨基酸;诸如单糖、二糖、葡萄糖、甘露糖、糊精等糖类;诸如 EDTA 等螯合剂;诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇等糖;诸如钠等成盐对离子;诸如 Zn-蛋白复合物等金属复合物;和/或诸如吐温或聚乙二醇(PEG)等非离子表面活性剂。

[0210] 可以以用于局部治疗或系统性治疗的任何方式施用本发明的药物组合物。施用可以是局部的(例如施用至黏膜,包括阴道递送和直肠递送),诸如透皮贴剂、膏剂、洗剂、霜剂、凝胶、滴剂、栓剂、喷剂、液体和粉末;例如通过吸入或吹入粉末或气溶胶(包括通过喷雾器)等肺递送、气管内、鼻内、表皮和透皮递送;口服;包括静脉内、动脉内、肿瘤内、皮下、腹膜内或肌肉内注射或输注等胃肠外递送;或诸如脑膜内或脑室内等颅内递送。

[0211] 治疗制剂可以是单位剂量形式。所述制剂包括用于口服、胃肠外或直肠施用或用于通过吸入施用的片剂、丸剂、胶囊剂、粉末剂、颗粒剂、水中或非水性介质中的溶液或悬浮液、或栓剂。在诸如片剂等固体组合物中主要活性成分与药物载体混合。常规的制片成分

包括玉米淀粉、乳糖、蔗糖、山梨醇、滑石、硬脂酸、硬脂酸镁、磷酸二钙或树胶和其它稀释剂（例如水），从而形成含有本发明化合物或其无毒药理学上可接受的盐的均匀混合物的固体预制剂组合物。然后所述固体预制剂组合物再分成本文所述种类的单位剂型。可以对该新型组合物的片剂、丸剂等进行包衣或配制，从而提供具有延长作用优点的剂型。例如，所述片剂或丸剂可以包括被外部组分覆盖的内部组分。另外，两种组分可以通过肠溶层分隔，所述肠溶层用于抵抗崩解，并且允许内部组分完整地通过胃或延迟释放。对于所述肠溶层或包衣可以使用各种材料，所述材料包括许多聚合酸和聚合酸的混合物，所述材料是虫漆、十六烷醇和乙酸纤维素。

[0212] 药物制剂包括与脂质体复合的本发明的抗体 (Epstein 等, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82 :3688 ;Hwang 等, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77 4030, 和美国专利第 4, 485, 045 和 4, 544, 545 号)。具有延长循环时间的脂质体公开于美国专利第 5, 013, 556 号。可以利用脂质组合物通过反相蒸发生产某些脂质体, 脂质组合物包含磷脂酰胆碱、胆固醇和 PEG- 衍生的磷脂酰乙醇胺 (PEG-PE)。将脂质体通过规定孔径的过滤器挤出, 从而产生具有所需直径的脂质体。

[0213] 还可以将所述抗体包埋在微胶囊中。例如根据 Remington, The Science and Practice of Pharmacy 第 20 版 Mack Publishing (2000) 所述, 在胶体药物递送系统 (例如, 脂质体、白蛋白微球、微乳液、纳米颗粒和纳米胶囊) 中或在大乳液中分别通过凝聚技术或通过界面聚合, 从而制备所述微胶囊, 例如羟甲基纤维素或明胶 - 微胶囊或聚-(甲基丙烯酸甲酯) 微胶囊。

[0214] 另外可以制备缓释制剂。缓释制剂的合适实例包括含有抗体的由固体疏水性聚合物制成的半透性基质, 所述基质是成型物的形式 (例如膜或微胶囊)。缓释基质的实例包括聚酯、诸如聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯) 或聚(乙烯醇) 等水凝胶、聚交酯 (美国专利第 3, 773, 919 号), L- 谷氨酸和 7 乙基-L- 谷氨酰胺的共聚物、不可降解乙烯-乙酸乙烯酯、诸如 LUPRON DEPOT™ (由乳酸乙醇酸共聚物以及乙酸亮丙瑞林组成的可注射微球) 等可降解乳酸-乙醇酸共聚物、蔗糖乙酸异丁酸酯和聚-D(-)-3-羟基丁酸。在某些实施方式中可以使用所述抗体来治疗特征在于表达癌干细胞标记物和 / 或细胞对癌干细胞标记物的应答性增加的各种疾病。特别地, 设想使用癌干细胞标记物 (例如 Notch1) 的抗体来治疗增殖性疾病, 所述疾病包括但不限于, 肾、肝、膀胱、乳腺、胃、卵巢、结肠、直肠、前列腺、肺、外阴、甲状腺、头颈部、脑 (成胶质细胞瘤、星形细胞瘤、成髓细胞瘤等)、血液和淋巴 (白血病和淋巴瘤) 的良性肿瘤和恶性肿瘤。

[0215] 在某些实施方式中, 所述治疗包括将本发明的抗体或其它试剂与化学治疗剂或多种不同的化学治疗剂的混合物联合施用。可以在施用化学治疗剂之前、同时或之后进行使用抗体的治疗。本发明涉及的化学治疗剂包括本领域已知并且可商购的化学物质或药物, 例如多柔比星、5- 氟尿嘧啶、胞嘧啶阿拉伯糖苷 (" Ara-C" )、环磷酰胺、噻替派、白消安、胞毒素 (cytoxine)、紫杉醇、氮甲蝶呤、顺铂、美法仑、长春碱和卡铂。联合施用可以包括以单一药物制剂或使用分开制剂的共施用, 或以任何顺序但通常在一段时间内的连续施用, 从而使得所有活性剂可以同时发挥其生物活性。可以根据制造商说明书或根据经验确定, 来使用用于所述化学治疗剂的制剂和给药方案。用于所述化学治疗的制剂和给药方案还描述于 Chemotherapy Service Ed., M. C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, Md. (1992)。

[0216] 用于本发明的化学治疗剂还包括,但不限于,诸如噻替派和环磷酰胺(Cytoxan)等烷基化剂;诸如白消安、英丙舒凡和哌泊舒凡等烷基磺酸酯;诸如苯佐替派(benzodopa)、卡波醌、美妥替哌(meturedopa)和乌瑞替派(uredopa)等氮丙啶;包括六甲蜜胺、三亚乙基蜜胺、三亚乙基磷酰胺(trietylenephosphoramidate)、三亚乙基硫代磷酰胺(triethylenethiophosphoramidate)和三羟甲蜜胺(trimethylolomelamime)氮芥在内的乙烯亚胺和甲基蜜胺(methylamelamines),所述三羟甲蜜胺(trimethylolomelamime)氮芥例如苯丁酸氮芥、萘氮芥、氯代环磷酰胺、雌氮芥、异环磷酰胺、氮芥、盐酸甲氧氮芥、美法仑、新氮芥、胆甾醇对苯乙酸氮芥、泼尼氮芥、曲磷胺、尿嘧啶氮芥;诸如卡莫司汀、氯脲霉素(chlorozotocin)、福莫司汀、洛莫司汀、尼莫司汀、雷莫司汀等硝基脲;诸如阿克拉霉素、放线菌素、安曲霉素(authramycin)、重氮丝氨酸、博来霉素、放线菌素C、加利车霉素、卡柔比星(carubicin)、洋红霉素(caminomycin)、嗜癌素、色霉素、更生霉素、道诺红菌素、地托比星(detorubicin)、6-重氮-5-氧-L-正亮氨酸、多柔比星、表柔比星、依索比星、伊达比星、麻西罗霉素、丝裂霉素、霉酚酸、诺加霉素、橄榄霉素、培洛霉素、紫菜霉素、嘌呤霉素、三铁阿霉素、罗多比星、链黑菌素、链佐星、杀结核菌素、乌苯美司、净司他丁、佐柔比星等抗生素;诸如氨甲蝶呤和5-氟尿嘧啶(5-FU)等抗代谢药;诸如二甲叶酸、氨甲蝶呤、蝶罗呤、三甲曲沙等叶酸类似物;诸如氟达拉滨、6-巯基嘌呤、硫咪嘌呤、硫鸟嘌呤等嘌呤类似物;诸如安西他滨、阿扎胞苷、6-阿扎尿苷、卡莫氟、阿糖胞苷、二脱氧尿苷、去氧氟尿苷、依诺他滨、氟尿苷、5-FU等嘧啶类似物;诸如卡鲁睾酮、丙酸甲雄烷酮、环硫雄醇、美雄烷、睾内酯等雄激素;诸如氨鲁米特、米托坦、曲洛司坦等抗肾上腺药;诸如亚叶酸(frolic acid)等叶酸补充剂;醋葡萄醛内酯;醛磷酰胺糖苷;氨基乙酰丙酸;安吡啶;百托布(bestrabucil);比山群;依达曲沙、得福安(defofamine);脱羧秋水仙碱;地吡醌;艾福敏(elformithine);依利醋铵(elliptinium acetate);依托格鲁;硝酸镓;羟基脲;香菇多糖;氯尼达明;米托胍脲;米托蒽醌;莫派达醇;二胺硝吡啶;喷司他丁;蛋氨酸;吡柔比星;鬼臼酸;2-乙基酰肼;丙卡巴肼;PSK;雷佐生;西索菲兰(sizofuran);锗螺胺;细交链孢菌酮酸;三亚胺醌;2,2',2''-三氯三乙胺;乌拉坦;长春地辛;达卡巴嗪;甘露氮芥;二溴甘露醇;二溴卫矛醇;哌泊溴烷;加胞嘧啶(gacytosine);阿拉伯糖苷("Ara-C")、环磷酰胺、噻替派;诸如紫杉醇(TAXOL、Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ.)和多西他赛(Taxotere, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France)等紫杉烷;苯丁酸氮芥;吉西他滨;6-硫鸟嘌呤;巯基嘌呤;氨甲蝶呤;诸如顺铂和卡铂等铂类似物;长春碱;铂;足叶乙甙(VP-16);异环磷酰胺;丝裂霉素C;米托蒽醌;长春新碱;长春瑞滨;异长春花碱;诺消灵(novantrone);替尼泊苷;道诺霉素;氨蝶呤;希罗达;伊班膦酸盐;CPT11;拓扑异构酶抑制剂RFS2000;二氟甲基鸟氨酸(DMFO);视黄酸;埃斯波霉素;卡培他滨;和上述任何一种的药学上可接受的盐、酸或衍生物。化学治疗剂还包括用于调节或抑制激素对肿瘤的作用的抗激素剂,如抗雌激素剂,包括例如,三苯氧胺、雷洛昔芬(raloxifene)、芳香化酶抑制性4(5)-咪唑、4-羟基三苯氧胺、曲沃昔芬、雷洛昔芬盐酸盐(keoxifene)、LY117018、奥那司酮和托瑞米芬(Fareston);以及抗雄激素剂,如氟他米特、尼鲁米特、比卡鲁胺、亮丙瑞林和戈舍瑞林;和上述任何一种的药学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0217] 在特定实施方式中,所述化学治疗剂是拓扑异构酶抑制剂。拓扑异构酶抑制剂是干扰拓扑异构酶(例如拓扑异构酶I或II)作用的化学治疗剂。拓扑异构酶抑制剂包括,

但不限于, 盐酸多柔比星, 道诺红菌素柠檬酸盐、盐酸米托蒽醌、放线菌素 D、足叶乙甙、盐酸托泊替康、替尼泊苷 (VM-26) 和伊立替康。

[0218] 在特定实施方式中, 所述化学治疗剂是抗代谢药。抗代谢药是具有以下结构的化学药品, 所述结构与正常生化反应所需的代谢物类似, 但是不同之处足够干扰细胞的一种或多种正常功能, 例如细胞分裂。抗代谢药包括, 但不限于, 吉西他滨、氟尿嘧啶、卡培他滨、氨甲蝶呤钠、雷替曲塞 (ralitrexed)、培美曲塞、喃氟啶、胞嘧啶阿拉伯糖苷、硫鸟嘌呤 (GlaxoSmithKline)、5- 氮胞苷、6- 巯基嘌呤、咪唑硫嘌呤、6- 硫鸟嘌呤、喷司他丁、氟达拉滨磷酸盐和克拉屈滨, 以及这些中任何一种的药学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0219] 在其它实施方式中, 所述治疗包括将本发明的抗体或其它试剂与放射治疗联合施用。可以在施用放射治疗之前、同时或之后使用抗体进行治疗。可以根据熟练从业者的确定来使用所述放射治疗的任何给药方案。

[0220] 在其它实施方式中, 所述治疗包括将本发明的抗体与针对与其它肿瘤相关抗原的其它抗体联合施用, 所述其它抗体包括, 但不限于, 与 EGF 受体 (EGFR) (Erbbitux®)、erbB2 受体 (HER2) (Herceptin®) 和血管内皮生长因子 (VEGF) (Avastin®) 结合的抗体。另外, 治疗可以包括施用一种或多种细胞因子, 可以伴随着外科手术除去癌细胞; 和 / 或治疗医师确信必须的任何其它治疗。

[0221] 对于所述疾病的治疗, 本发明的抗体或其它试剂的合适剂量取决于待治疗疾病的类型, 疾病的严重性和进展, 疾病的应答性, 是否为了治疗或预防目的施用所述抗体、之前的治疗、患者临床史等, 所有这些都由治疗医师判断。所述抗体或试剂可以施用一次, 或在持续几天到几个月的一系列治疗中施用, 或直到治愈, 或直到达到疾病状态消退 (例如肿瘤尺寸减少)。最佳给药方案可以由对患者体内的累积药物的测定来计算, 并且可以根据拮抗剂的相对效力而变化。施用医师可以容易地确定最佳剂量、给药方法和重复速率。通常, 剂量为  $0.01 \mu\text{g} \sim 100\text{mg}$  / 千克体重, 并且可以每天、每周、每月或每年给予 1 次或多次。治疗医师可以基于体液或组织中抗体或试剂的测定的停留时间和浓度估算给药的重复速率。

[0222] 本发明提供试剂盒, 所述试剂盒包含本文所述的抗体, 并可用于执行本发明的方法。在某些实施方式中, 试剂盒在一个或多个容器中包含至少一种经纯化的针对癌干细胞标记物的抗体。在某些实施方式中, 试剂盒在一个或多个容器中包含至少一种经纯化的针对人类 Notch1 受体的胞外域的非配体结合近膜区的抗体。在某些实施方式中, 试剂盒包含抗体 52M51 或 52M51 的人源化变体。在某些实施方式中, 试剂盒包含抗体 52R43。在某些实施方式中, 所述试剂盒含有所有对执行检测分析而言必须和 / 或充分的组分, 包括所有对照、用于执行检测的指导和用于分析和呈现结果的任何必需的软件。本领域技术人员会容易地意识到, 可以容易地将本发明的公开抗体引入本领域已知的已建立的试剂盒形式之一。

[0223] 在特定实施方式中, 本发明提供鉴定与人类 Notch1 受体的胞外域的非配体结合近膜区结合并且抑制肿瘤生长的分子的方法, 所述方法包括: i) 使所述分子与人类 Notch1 受体的胞外域的非配体结合近膜区一起温育; ii) 确定所述分子是否与人类 Notch1 受体的胞外域的近膜区结合; 和 iii) 确定所述分子是否抑制肿瘤生长。特异性结合人类 Notch1 受体的胞外域的近膜区的分子包括, 但不限于多肽和抗体。

[0224] 可以使用本领域已知的任何合适的方法进行筛选。在特定实施方式中,在体外进行筛选。在某些实施方式中,使表达人类 Notch1 受体的胞外域的非配体结合近膜区的细胞与经标记分子一起温育,并且通过 FACS 分析确定经标记分子与人类 Notch1 受体的胞外域的近膜区的特异性结合。在某些实施方式中,通过噬菌体展示表达人类 Notch1 受体的胞外域的非配体结合近膜区,并且鉴定与人类 Notch1 受体的胞外域的近膜区特异性结合的分子。用于鉴定与人类 Notch1 受体的非配体结合近膜区特异性结合的分子的其它适合的方法包括,但不限于,ELISA ;蛋白质(或免疫)印迹 ;和酵母双杂交。

[0225] 然后测试与人类 Notch1 受体的胞外域的非配体结合近膜区特异性结合的分子对肿瘤细胞生长的抑制。可以使用本领域已知的任何合适的方法进行测试。在特定实施方式中,对与人类 Notch1 受体的胞外域的近膜区特异性结合的分子测试体外抑制肿瘤生长的能力。在某些实施方式中,使与人类 Notch1 受体的胞外域的近膜区特异性结合的分子与培养物中的肿瘤细胞一起温育,确定在与人类 Notch1 受体的胞外域的近膜区特异性结合的分子的存在下肿瘤细胞的增殖,并且将其与非结合对照分子一起温育的肿瘤细胞进行比较。在特定实施方式中,对与人类 Notch1 受体的胞外域的非配体结合近膜区特异性结合的分子测试体内抑制肿瘤生长的能力。在特定实施方式中,将与人类 Notch1 受体的胞外域的近膜区特异性结合的分子注入动物异种移植物模型中,确定用与人类 Notch1 受体的胞外域的近膜区特异性结合的分子治疗的动物中的肿瘤生长,并且将其与用非结合对照分子治疗的动物进行比较。

[0226] 实施例

[0227] 实施例 1

[0228] 针对 Notch1 的非配体结合区,特别是针对胞外域的非配体结合近膜区产生抗体。在特定实施方式中,产生人类 Notch1 胞外域的重组多肽片段作为用于抗体产生的抗原。使用标准重组 DNA 技术来分离编码人类 Notch1 氨基酸序列 1427 ~ 1732 的胞外域的近膜区的多核苷酸 (SEQ ID NO. 1)。使这些多核苷酸独自在 N 末端框架内连接至人类 Fc 和组氨酸标签,并且克隆到转移质粒载体中,以用于在昆虫细胞中进行杆状病毒介导的表达。使用标准转染、感染和细胞培养方案来产生表达与包含氨基酸 1427 ~ 1732 的近膜区相对应的相应 Notch1 多肽 (SEQ ID NO :2) 的重组昆虫细胞 (O' Reilly 等,1994,Baculovirus Expression Vectors :A Laboratory Manual,Oxford :Oxford University Press)。

[0229] 使用本领域技术人员已知的蛋白 A 和 Ni<sup>++</sup> 螯合亲和色谱从昆虫细胞裂解物中纯化对 Notch1 近膜区 (Notch1 氨基酸 1472 ~ 1732) 多肽。用 PBS (pH = 7) 对经纯化的 Notch1 近膜区多肽进行透析,浓缩到约 1mg/ml,并在制备中无菌过滤以进行免疫。

[0230] 使用标准技术以经纯化的 Notch1 抗原蛋白 (抗体溶液 ;Mountain View,CA) 对小鼠 (n = 3) 进行免疫。使用 ELISA 和 FACS 分析 (如本文所述) 在初始免疫后约 70 天筛选个体小鼠的血液对抗原的识别。选择具有最高抗体滴度的两只动物以用于最终的抗原增强,其后分离脾细胞以用于杂交瘤产生。以每孔 1 个细胞在 96 孔板中将杂交瘤细胞铺板,通过 ELISA 和 FACS 分析对各孔的上清液进行针对 Notch1 近膜区多肽的筛选。选择几个具有高抗体滴度的杂交瘤,并且在静态瓶培养中扩增。使用蛋白 A 或蛋白 G 琼脂糖色谱从杂交瘤上清液中纯化抗体。再次通过本发明所述的 FACS 测试经纯化的单克隆抗体。分离出几种识别人类 Notch1 的胞外域的近膜区的抗体。将表达抗体 52M51 的杂交瘤细胞系于 2008

年 8 月 7 日根据布达佩斯条约的规定保藏在 ATCC, 并赋予 ATTC 专利保藏号 PTA-9405。确定抗体 52M51 的重链 (SEQ ID NO :9 和 10) 和轻链 (SEQ ID NO :3 和 4) 的核苷酸序列和预测的蛋白序列。

#### [0231] 人类抗体

[0232] 在替代性实施方式中, 使用噬菌体展示技术分离特异性识别 Notch1 受体的胞外域的非配体结合近膜区的人类抗体。在特定实施方式中, 筛选可特异性和高亲和性识别本文所述的 Notch 受体抗原的含有人类抗体可变域的合成抗体。在特定实施方式中, 使用一系列包含 Notch1 受体的胞外域的非配体结合近膜区的重组蛋白对人类 Fab 噬菌体展示文库进行筛选。简言之, 在第 1 轮中使  $2 \times 10^{13}$  Fab 展示噬菌体颗粒与重组蛋白 (经被动固定) 一起温育, 洗掉非特异的噬菌体, 然后用低 pH (细胞) 或 DTT (重组蛋白) 洗脱特异性噬菌体。使用洗脱产物来感染 TG1 F+ 细菌, 用辅助噬菌体进行援助 (rescue), 然后用 IPTG (0.25mM) 诱导 Fab 展示。将该过程重复另外两轮, 然后在针对被动固定抗原 ( $5 \mu\text{g/ml}$ ) 的 ELISA 中筛选第 3 轮。

[0233] 经由侧翼限制性位点对文库中的 CDR 盒进行特异性交换, 以用于抗体优化。然后将经优化的人类可变区克隆到含有人类 IgG1 重链和  $\kappa$  轻链的 Ig 表达载体中, 以用于在 CHO 细胞中表达人类抗体。

#### [0234] 表位作图

[0235] 为了鉴定特异性识别 Notch1 受体胞外域的非配体结合近膜区的抗体, 进行表位作图。在特定实施方式中, 使用标准重组 DNA 技术产生哺乳动物表达质粒载体, 所述质粒载体包含在编码作为 Fc 融合蛋白的细胞外 Notch1 域的片段的多核苷酸上游的 CMV 启动子。在特定实施方式中, 使用一系列融合蛋白和从约氨基酸 1427 ~ 约氨基酸 1732 的人类 Notch1 的胞外域的近膜区的缺失体, 完成 52M 系列的非配体结合区抗体的表位作图。这些重组融合蛋白在瞬时转染的 HEK 293 细胞中表达, 在转染后 24 小时 ~ 48 小时从所述 HEK 293 细胞收集条件培养基以用于 ELISA。

[0236] 在特定实施方式中, 在 SDS-PAGE 凝胶上分离 Notch1 融合蛋白片段, 并且使用检测所有融合蛋白存在的抗 Fc 抗体相对于检测由各抗 Notch 抗体识别的域的各抗 Notch 抗体进行探查。

[0237] 为了鉴定在由针对 Notch1 的抗体识别的胞外域内的特异性表位, 使用 SPOT 系统 (Sigma Genosys, The Woodlands, TX)。合成一系列有 1 个氨基酸重叠并覆盖整个 Notch1 胞外域的 10 个残基的线性肽, 并使用 SPOT 合成技术将其与纤维素膜共价结合。使所述膜与封闭缓冲液在室温下预温育 8 小时, 然后在  $4^{\circ}\text{C}$  下与抗体杂交过夜。然后洗涤所述膜, 与缀合有辣根过氧化物酶 (HRP) (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ) 的二抗一起温育, 再次洗涤, 并且使用含有 3-氨基-9-乙基咪唑的信号显影液使其可视化。由此确定由抗体识别的特定表位。

#### [0238] 嵌合抗体

[0239] 鉴定出特异性识别 Notch1 受体的胞外域的非配体结合近膜区的单克隆抗体后, 对这些抗体进行修饰, 从而克服当使用啮齿动物抗体作为治疗剂时的人类抗-小鼠抗体 (HAMA) 免疫应答。通过 RT-PCR 从杂交瘤细胞分离所选择单克隆抗体的重链和轻链的可变区, 并在哺乳动物表达载体中将其分别框架内连接至人类 IgG1 重链和  $\kappa$  轻链恒定区。作

为选择,使用诸如 TCAE 5.3 等人类 Ig 表达载体,该表达载体在同一质粒中含有人类 IgG1 重链和  $\kappa$  轻链恒定区基因 (Preston 等,1998, *Infection & Immunity*66 4137-42)。然后将编码嵌合重链和轻链的表达载体共转染到中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞,以用于嵌合抗体生产。通过 ELISA 和 FACS 将嵌合抗体的免疫反应性和亲和性与亲本鼠类抗体比较。

#### [0240] 人源化抗体

[0241] 由于嵌合抗体治疗剂仍然经常具有抗原性,产生人类抗-嵌合抗体 (HACA) 免疫应答,因此可能需要对针对 Notch1 受体的胞外域的非配体结合近膜区的嵌合抗体进行进一步人源化。为了产生人源化抗体,使用重组 DNA 技术将上述嵌合抗体重链和轻链可变域的三个短的高可变序列,或互补决定区 (CDR) 分别工程化到人类重链和轻链序列的可变域框架中,然后克隆到哺乳动物表达载体以用于在 CHO 细胞中表达。通过 ELISA 和 FACS 将人源化抗体的免疫反应性和亲和性与亲本嵌合抗体比较。另外,可使用可变区的定点突变或高密度突变发生来优化人源化抗体的特异性、亲和性等。

#### [0242] 实施例 2

[0243] 产生针对人类 Notch1 的胞外域的近膜区的人源化抗体。基本上按照 Larrick, J. M. 等 (1989, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 160 :1250) 和 Jones, S. T. & Bendig, M. M. (1991, *Bio/Technology* 9 :88 等) 所述,使用简并 PCR 从杂交瘤系中分离鼠类单克隆抗体 52M51 的可变域,并且测序。然后将与亲本 52M51 抗体氨基酸序列可能结构上类似的人类重链和轻链可变框架区视为参照人类框架区,以帮助指导新型合成框架的设计。为了鉴定与 52M51 鼠类框架类似的人类框架区,使用 BLAST 检索储存在 Genbank 中的人类序列,将由 52M51 的 VH 和 VL 鼠类可变域编码的预测蛋白序列与由所表达的人类 cDNA 表达而编码的人类抗体序列比较。使用该方法,选择出所表达的人类 cDNA 序列 (例如 genbank DA975021、DB242412) 和种系 Vh 域 (例如 IGHV1-24) 以用于在设计重链框架时进一步分析。类似地,在设计轻链框架时考虑所表达的人类 cDNA 序列 (例如 genbank CD709370、CD707373) 和种系 V1 (例如 IGLV7-46、IGLV8-61)。

[0244] 评价候选人源化框架重链和亲本鼠类单克隆抗体 52M51 重链可变域以及轻链可变域之间的氨基酸差异的可能重要程度,并且作出位置中的各差异是否有助于可变域的正确折叠和功能的判断。通过其它抗体片段的解析出的晶体结构 (例如, Trakhanov 等, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 1999, 55 :122-28 描述的 Fab 2E8 结构,以及其它蛋白晶体结构 (例如,蛋白数据库结构 IADQ 和 IGIG)) 的检查指导该分析。使用包括 Jmol、快速 PDB 和 Pymol 在内的计算机软件对结构建模。需要考虑的有:位于给定位置的氨基酸对  $\beta$ -片层框架的填充的潜在影响、重链和轻链可变域之间的相互作用、氨基酸侧链的溶剂暴露程度和氨基酸影响 CDR 环的定位的可能性。从该分析看出,构想了 9 个与人类 IgG2 恒定区框架内融合的候选 V<sub>H</sub> 链和 8 个与人类 IgLC1 恒定区框架内融合的的候选 V<sub>L</sub> 链,并进行化学合成。候选重链包括:i) 设计成模拟天然人类框架的合成框架和 ii) 亲本 52M51 鼠类抗体 CDR。

[0245] 通过共转染到哺乳动物细胞测试各候选变体人源化重链和轻链的功能性。将上述 9 个候选人源化 52M51 重链的每一个与鼠类 52M51 轻链 cDNA 共转染到 HEK 293 细胞中,并且通过 ELISA 检测条件培养基的 Notch1 结合活性。选择显示最牢固结合的 52M51 重链变体。与实例人类框架 (例如 IGHV 1-24) 相比,除了鼠类 CDR 之外,该变体“52M51-H4” (SEQ ID

NO :22) 含有在 Vh 框架内的 3 个框架位置 (Kabat 位 20, 48 和 71) 的变化。然后将 52M51-H4 人源化重链与 8 个候选人源化轻链的每个共转染到 HEK. 293 细胞中, 通过 ELISA 再次检测条件培养基的抗原结合。发现两个轻链变体“2M51 L3”(SEQ ID NO :26) 和“52M51 L4”(SEQ ID NO :30) 比其它候选物展示更好的结合, 将其选出以用于进一步研究。与实例人类框架 (例如, IGLV7-46) 相比, 除了鼠类 CDR 之外, 变体 52M51-L3 含有在 Kabat 位 49 的 1 个框架位的变化。开发出两个人源化变体抗体, 52M51H4L3 和 52M51 H4L4。52M51 H4L3 由 DNA 编码, 该 DNA 于 2008 年 10 月 15 日根据布达佩斯条约的规定保藏在位于 ATCC, 并赋予保藏号 PTA-9549。

[0246] 使用 Biacore 2000 仪器确定人类和小鼠 Notch1 的亲合性。简言之, 使用标准的基于胺的化学法 (NHS/EDC) 在 CM5 芯片上固定重组人类和小鼠 Notch1 蛋白。将不同浓度的抗体注射在所述蛋白表面上, 并且收集动力学随时间的数据。使用联立全拟合方程对数据进行拟合, 从而产生各 Notch1 的解离常数 (KD, nM) (表 2)。

[0247] 表 2

[0248]

抗体	IgG 解离常数(K <sub>D</sub> )	
	人类 Notch1(nM)	小鼠 Notch1(nM)
52M51	2.86	NB
52M51H4L3	4.33	NB
52M51 H4L4	7.35	NB

[0249] 实施例 3

[0250] Notch 受体信号传导

[0251] 在特定实施方式中, 确定 Notch1 受体抗体阻断配体介导的 Notch 信号传导的能力。在特定实施方式中, 使在补充有抗生素和 10% FCS 的 DMEM 中培养的经工程化而过表达 Notch1 的 HeLa 细胞 (Notch1-HeLa) 与 :1) 用以测定应答于 DLL4 配体的 Notch 信号传导水平的含有在萤火虫荧光素酶报道基因上游的 Notch 应答性启动子的 pGL48×CBS 萤火虫荧光素酶共转染 ; 和 2) 用于以测定转染效率的作为内部对照的 Renilla 荧光素酶报道子 (Promega ; Madison, WI) 进行共转染。向用 200ng/ 孔 hDLL4-fc 蛋白过夜包被的培养板中添加经转染的细胞, 然后向细胞培养基中添加针对 Notch1 的抗体。转染后 48 小时, 使用双荧光素酶检测试剂盒 (Promega ; Madison, WI) 测定荧光素酶水平, 将萤火虫荧光素酶活性对 Renilla 荧光素酶活性进行标准化。从而确定抗体抑制 Notch1 途径的能力。与其它 Notch1 抗体相比, 针对人类 Notch1 的胞外域的近膜区 (图 1A) 产生的抗体 52M51、52M63、52M74 和 52M80 显著地减少荧光素酶活性, 表明 Notch1 信号传导减少 (图 1B)。另外, 在减少荧光素酶活性方面, 抗体 52M51 的人源化变体, 变体 52M51H4/L3 展示类似的效力 (图 1C)。

[0252] Notch 受体激活和 ICD 形成

[0253] Notch 受体被弗林蛋白酶、ADAM 和  $\gamma$ -分泌酶进行切割导致 Notch 胞内域 (ICD) 的形成, 然后 ICD 触发细胞核中的下游 Notch 信号传导。在特定实施方式中, 通过蛋白质印迹分析确定 Notch1 受体抗体阻断配体介导的受体激活的能力。使 Notch1-HeLa 细胞在 293-SMII 培养基 (Gibco) 中以悬浮培养形式生长。将培养的细胞转移到 96 孔板, 所述板中已经用在补充有 2% FBS 和 1  $\mu$  M MG 132 (Calbiochem) 的 DMEM 中的人类 DLL4-fc 融合蛋白 (2  $\mu$  g/ml) 对选择孔进行预包被。向细胞培养基添加针对人类 Notch1 的胞外域的近膜区产



生的抗体,使细胞在 37°C 下温育 5 小时。然后对孔进行抽吸,使细胞再悬浮于 2×SDS 运行缓冲液中。在室温下对样品进行超声处理,然后进行 SDS-PAGE 并且根据制造商建议(Ce11 Signaling Technology)使用对切割的 Notch1 ICD 具有特异性的抗体进行蛋白质印迹分析。52M51 以及 52M63、52M74 和 52M80 都显著地抑制配体刺激后 ICD 的产生(图 1D)。

#### [0254] 实施例 4

[0255] 使用非配体结合区抗 Notch 受体抗体预防体内肿瘤生长

[0256] 制备已经作为在小鼠中的异种移植物传代的来自患者样品的肿瘤细胞以用于注射到实验动物中。根据之前所述的粘附步骤(参见 Al-Hajj 等,2003 ;Dalerba 等,2007) 在 OncoMed Pharmaceuticals 处建立肿瘤,该肿瘤包括:UM-PE 13 和 T3(乳癌细胞)、OMP-C9、OMP-C8、OMP-C6 和 Colo-205(结肠肿瘤细胞);和 OMP-PN4(胰腺癌细胞)。在无菌条件下移取肿瘤组织,切成小块,使用无菌刀片彻底切碎,并且通过酶促消化和机械破坏获得单细胞悬浮液。使所得的肿瘤小块与超纯胶原酶 III 在培养基(200 ~ 250 单位的胶原酶/mL)中混合,并且在 37°C 下温育 3 ~ 4 小时,每 15 ~ 20 分钟通过 10mL 移液管上下移液。使经消化细胞通过 45u1 尼龙筛过滤,用 RPMI/20% FBS 洗涤,并用 HBSS 洗涤 2 次。然后将解离的肿瘤细胞皮下注射至 6 ~ 8 周的 NOD/SCID 小鼠,从而引发肿瘤生长。对于 UM-PE13 和 T3 乳癌细胞,将 100u1 中的 50,000 个细胞注入右侧乳腺脂肪垫(n = 20),并伴随着植入雌激素团块。对于 OMP-C9 结肠肿瘤细胞,将 100u1 中的 50,000 个细胞注入右肋腹区域(n = 20)。对于 OMP-C8 结肠肿瘤细胞,将 100u1 中的 10,000 个细胞注入右肋腹区域(n = 10)。对于 OMP-C6 结肠肿瘤细胞,将 100u1 中的 10,000 个细胞注入右肋腹(n = 10)。将所有肿瘤细胞在 PBS(无镁和钙)和 BD 基质胶(BD Biosciences)的 1 : 1 比例的混合物中注入。

[0257] 肿瘤细胞注射后 3 天,开始抗体治疗。每周两次使各经注射的动物腹膜内(i. p.)接受 10mg/kg 抗 Notch1 抗体或作为对照的 PBS,总共 6 ~ 8 个周。除了雌激素团块注射之外,注射有 PE13 细胞的动物接受在右上乳腺脂肪垫的注射。注射有 C9、C8 或 C6 细胞的动物在腹部的右下象限接受注射。每周两次评估肿瘤尺寸。

[0258] 在特定实施方式中,测试针对人类 Notch1 的胞外域的近膜区的抗体对乳肿瘤形成的影响。将 PE 13 乳肿瘤细胞(50,000 细胞每次注射)皮下植入乳腺脂肪垫。细胞植入后 2 天,用对照抗体或 52M 抗体 52M1、52M2 和 52M8(其没有抗 Notch 信号传导能力,参见图 1B)以 10mg/kg 每周两次腹膜内给药对进行动物治疗。与对照治疗的动物相比,使用非 Notch1 抑制剂抗体的治疗对肿瘤生长没有影响(图 2C 和 2D)。在特定实施方式中,使用对照抗体或 52M51 以 10mg/kg 每周两次腹膜内给药对注射有 PE13 乳肿瘤细胞的动物进行治疗。每周两次测定肿瘤体积,确定 52M51 对乳肿瘤生长的影响。

[0259] 在替代性实施方式中,在注射入实验动物之前,基于细胞表面标记物首先将解离的肿瘤细胞分选成致瘤性细胞和非致瘤性细胞。特别地,用含有 2% 热灭活小牛血清(HICS)的 HEPES 缓冲的盐水溶液(HBSS)洗涤如上所述解离的肿瘤细胞 2 次,并使其以 10<sup>6</sup> 细胞每 100u1 再悬浮。添加抗体,使细胞在冰上温育 20 分钟,然后用 HBSS/2% HICS 洗涤。抗体包括抗 -ESA(Biomed, Foster City, CA),抗 -CD44,抗 -CD24 和 Lineage 标记物抗 -CD2、-CD3、-CD10、-CD16、-CD18、-CD31、-CD64 和 -CD140b(总称为 Lin;PharMingen, San Jose, CA)的抗体。将抗体直接与荧光染料缀合,从而阳性或阴性选择表达这些标记物的细胞。通过针对 H2Kd+ 细胞进行选择消除小鼠细胞,并且通过使用活力染料 7AAD 消除死细胞。在

FACSVantage (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) 上进行流式细胞术。使用侧向散射和正向散射特征来消除细胞块 (cell clump)。然后将分离的 ESA+, CD44+, CD24-/low, Lin- 致癌性细胞皮下注入 NOD/SCID 小鼠以引发肿瘤生长。

[0260] 实施例 5

[0261] 使用抗 Notch1 受体抗体体内治疗肿瘤

[0262] 制备已经作为在小鼠中的异种移植传代的来自患者样品 (实体瘤活检物或胸腔积液) 的肿瘤细胞以用于再传代到实验动物中。移取肿瘤组织, 切成小块, 使用无菌刀片完全切碎, 并且通过酶促消化和机械破坏获得单细胞悬浮液。然后对于乳肿瘤, 将解离的肿瘤细胞皮下注入 NOD/SCID 小鼠的乳腺脂肪垫中, 或对于非乳肿瘤, 注入胁腹中, 以引发肿瘤生长。在特定实施方式中, 根据以上详细描述, 分离 ESA+, CD44+, CD24-/low, Lin- 致癌性肿瘤细胞并进行注射。

[0263] 在特定实施方式中, 将新分离的 C8 结肠瘤细胞 (225 个细胞每只动物) 皮下植入 NOD/SCID 小鼠。肿瘤细胞注射后, 监视动物的肿瘤生长。使肿瘤生长 48 天直到它们达到约  $210\text{mm}^3$  的平均尺寸并且随机分成两组 ( $n = 10$  每组)。用对照抗体或与人类 Notch1 的胞外域的近膜区结合的抗体, 52M51, 治疗所述动物, 每周两次腹膜内给药 (10mg/kg)。在第 55、57 和 62 天评估肿瘤尺寸。与对照治疗的动物相比, 用 52M51 治疗的动物显示统计学显著的 ( $p = 0.0006$ ) 对肿瘤生长的抑制 (图 2A 和 2B)。

[0264] 抗体治疗的终点时, 收获肿瘤以用于进一步分析。在某些实施方式中, 通过免疫荧光对肿瘤的一部分进行分析, 从而评估抗体至肿瘤中的渗透和肿瘤反应。将来自抗 Notch1 受体治疗的小鼠和对照抗体治疗的小鼠的各收获的肿瘤的一部分在液氮中快速冷冻, 包埋在 O. C. T. 中并且在低温保持器上切成在载玻片上的  $10\ \mu\text{m}$  切片。作为选择, 对各肿瘤的一部分进行福尔马林固定、石蜡包埋和在切片机上切成在载玻片上的  $10\ \mu\text{m}$  切片。使切片进行后固定和与特异性识别注射抗体的生色团标记的抗体一起温育, 从而检测在肿瘤活检物中存在的抗 Notch1 受体或对照抗体。此外, 可以使用检测不同肿瘤和肿瘤募集细胞 (recruited cell) 类型的抗体来评价抗体治疗对血管发生、肿瘤生长和肿瘤形态的影响, 所述抗体例如有: 检测血管内皮细胞的抗 -VE 钙粘蛋白 (CD 144) 或抗 -PECAM-1 (CD31) 抗体、检测血管平滑肌细胞的抗 -平滑肌  $\alpha$  - 肌动蛋白抗体、检测增殖细胞的抗 Ki67 抗体、检测染色细胞的 TUNEL 检测和检测 Notch 信号传导的抗胞内域 (ICD) Notch 片段抗体。

[0265] 还评价抗 Notch1 受体抗体治疗对肿瘤细胞基因表达的影响。从来自 Notch1 抗体治疗的小鼠和对照抗体治疗的小鼠的各收获肿瘤的一部分提取总 RNA, 并用于定量 RT-PCR。相对于作为内部对照的持家基因 GAPDH, 分析 Notch1 的表达水平、Notch 信号传导途径的组分, 所述组分包括, 以及之前鉴定的癌干细胞标记, 包括, 例如 CD44。由此确定当 Notch1 受体抗体治疗时肿瘤细胞基因表达的变化。

[0266] 另外, 评价抗 Notch1 受体抗体治疗对肿瘤中癌干细胞的存在的影响。将来自 Notch1 抗体治疗的小鼠以及对照抗体治疗的小鼠的肿瘤切成小块, 使用无菌刀片完全切碎, 并且通过酶促消化和机械破坏获得单细胞悬浮液。然后通过 FACS 分析基于如上详细所述的 ESA+, CD44+, CD24-/low, Lin- 表面细胞标记物表达对解离的肿瘤细胞分析致癌性癌干细胞的存在。

[0267] 然后可以在抗 Notch1 抗体治疗后评估基于 ESA+, CD44+, CD24-/low, Lin- 表达而

分离的细胞的致癌性。将 5,000、1,000、500 和 100 个来自 Notch1 抗体治疗的小鼠和对照抗体治疗的小鼠的 ESA<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD24<sup>-/low</sup>, Lin<sup>-</sup> 癌干细胞皮下再注入 NOD/SCID 小鼠的乳腺脂肪垫中。由此确定以持续肿瘤形成所需注射细胞的数量计的癌干细胞的致癌性。

[0268] 与 52M51 的体内功效相反,发现在如上所述结肠异种移植物模型中抑制 Notch1 信号传导的抗体、某些其它识别 Notch1 的近膜区但不抑制 Notch1 信号传导的抗体在乳腺异种移植物模型中不具有体内抗肿瘤功效。将抗体 52M51、52M2 和 52M8 (已经发现其中每个抗体不明显地抑制 Notch 信号传导 (实施例 3 和图 1B)), 注入之前已经注射有 PE13 乳肿瘤细胞的 NOD/SCID 小鼠中。与对照治疗的动物抗体相比,52M51、52M2 和 52M8 中每个抗体不影响异种移植物模型中的肿瘤生长 (图 2C(52M1, 52M2) 和图 2D(52M8))。

[0269] 实施例 6

[0270] 使用抗 Notch 受体抗体治疗人类癌

[0271] 该实施例描述使用针对 Notch 受体的抗体以靶向包含癌干细胞和 / 或肿瘤细胞的肿瘤而治疗癌的方法,所述癌干细胞和 / 或肿瘤细胞中已经检测出 Notch 受体表达。

[0272] 可以首先从肿瘤活检物中确定癌干细胞标记物表达的存在。在无菌条件下从诊断患有癌的患者中移取来自活检物的肿瘤细胞。在某些实施方式中,将组织活检物在液氮中新鲜冷冻,包埋在 O. C. T. 中,并且在低温保持器上切成在载玻片上的 10  $\mu$  m 切片。作为选择,对组织活检物进行福尔马林固定、石蜡包埋和在切片机上切成在载玻片上的 10  $\mu$  m 切片。使切片与针对 Notch 受体的抗体一起温育以检测蛋白表达。另外,可以确定癌干细胞的存在。将组织活检样切成小块,使用无菌刀片完全切碎,并且使细胞经受酶促消化和机械破坏,从而获得单细胞悬浮液。然后使解离的肿瘤细胞与抗 -ESA、-CD44、-CD24、-Lin 和 -Notch1 抗体一起温育以检测癌干细胞,通过如上详细描述的流程式细胞术确定 ESA<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD24<sup>-/low</sup>, Lin<sup>-</sup>, Notch<sup>+</sup> 肿瘤干细胞的存在。

[0273] 用抗 Notch 受体抗体治疗诊断其肿瘤表达 Notch 受体的癌症患者。对如上所述产生的人源化或人类单克隆抗 Notch 受体抗体进行纯化,并与合适的药物载体一起配制在注射用 PBS 中。每周 1 次用 Notch 抗体治疗患者,持续至少 10 周,但在某些情况下每周一次,持续至少约 14 周。每次施用抗体应该为约 2mg/ml ~ 约 100mg/ml 的药学有效剂量,在某些情况下为约 5mg/ml ~ 约 40mg/ml。可以在标准放射治疗方案或化学治疗方案之前、同时或之后施用抗体,所述化学治疗方案使用一种或多种化学治疗剂,例如奥沙利铂、氟尿嘧啶、甲酰四氢叶酸或链佐星。例如基于肿瘤消退、新肿瘤发生率的减少、肿瘤抗原表达下降、癌干细胞的数量下降或评价疾病预后的其它手段,对患者进行监视以确定所述治疗是否导致抗肿瘤应答。

[0274] 实施例 7

[0275] 使用抗 Notch 受体抗体体内治疗肿瘤的其它研究

[0276] 在一个实施方式中,将 M2 黑素瘤细胞 (10,000) 皮下注入 NOD-SCID 小鼠。使肿瘤生长 35 天直到它们达到约 110mm<sup>3</sup> 的体积。将荷瘤的小鼠随机分成两组 (n = 10),并用对照抗体或抗 Notch1 抗体 52R43 治疗。所述抗体以 10mg/kg 每周给药两次。在指定日期测定肿瘤体积。如图 3A 所示,相对于对照组,使用 52R43 进行的抗 Notch1 治疗使肿瘤生长减少 (p = 0.02)。

[0277] 在一个实施方式中,将 Lu24 肺肿瘤细胞 (30,000) 皮下注入 NOD-SCID 小鼠。使肿

瘤生长 35 天直到它们达到约  $205\text{mm}^3$  的体积。将荷瘤的小鼠随机分成两组 ( $n = 8$ ), 并用对照抗体或抗 Notch1 抗体 52R43 治疗。所述抗体以  $10\text{mg}/\text{kg}$  每周给药两次。在指定日期测定肿瘤体积。如图 3B 所示, 相对于对照组, 使用 52R43 进行的抗 Notch1 治疗使肿瘤生长减少 ( $p = 0.04$ )。

[0278] 在一个实施方式中, 将 PN8 胰腺肿瘤细胞 (50,000) 皮下注入 NOD-SCID 小鼠。使肿瘤生长 27 天直到它们达到约  $115\text{mm}^3$  的体积。将荷瘤的小鼠随机分成两组 ( $n = 8$ ), 并用对照抗体或抗 Notch1 抗体 52R43 治疗。所述抗体以  $10\text{mg}/\text{kg}$  每周给药两次。在指定日期测定肿瘤体积。如图 3C 所示, 相对于对照组, 使用 52R43 进行的抗 Notch1 治疗使肿瘤生长减少 ( $p = 0.005$ )。

[0279] 在一个实施方式中, 将 T1 乳肿瘤细胞 (300,000) 皮下注入 NOD-SCID 小鼠。使肿瘤生长 27 天直到它们达到约  $130\text{mm}^3$  的体积。将荷瘤的小鼠随机分成 4 组 ( $n = 10$ ), 并用对照抗体、抗 Notch1 52R43、紫杉醇或 52R43 和紫杉醇的组合进行治疗。抗体以  $15\text{mg}/\text{kg}$  每周给药 1 次, 紫杉醇以  $12\text{mg}/\text{kg}$  每周给药 1 次。在指定日期测定肿瘤体积。如图 3D 所示, 使用 52R43 进行的抗 Notch1 治疗相对于对照组减少肿瘤生长 ( $p < 0.0001$ ), 组合组相对于单独的紫杉醇减少肿瘤生长 ( $p = 0.001$ )。

[0280] 通过引用将以上说明书所提及的所有出版物和专利并入本文。对本领域技术人员而言, 对本发明所述方法和系统作出各种改进和变化是显而易见的, 无需背离本发明的范围和精神。虽然已经结合具体实施方式描述了本发明, 但应该理解, 要求保护的本发明不应不适当地限于所述具体实施方式。实际上, 对相关领域技术人员而言显而易见的是, 对实施本发明所述模式作出各种改进也应处于以下权利要求的范围之内。

[0281] 序列

[0282] SEQ ID NO :1

[0283] 编码氨基酸 1427 ~ 1732 的 Notch1 多核苷酸。

[0284]



TGTCGCTCAAGTACTGGGGCTGTTACAAGTACTACGCCAAGTCCGGTCCAAGAAAA  
 CCTGATCATTATTCACTGGTCTAATAGGTGGTACCAACAACCGAGCTCCAGGTGTTCCCT  
 GCCAGATTCTCAGGCTCCCTGATTGGAGACAAGGCTGCCCTCACCATCACAGGGGCACAG  
 ACTGAGGATGAGGCAATATATTTCTGTGCTCTATGGTACAGCAACCCTGGGTGTTCCGGT  
 GGAGGAACCAAAGTACTGCTCCTAGGCCAGCCCAAGTCTTCGCCATCAGTCACCCTGTTT  
 CCACCTTCTCTGAAGAGCTCGAGACTAACAAGGCCACACTGGTGTGTACGATCACTGAT  
 TTCTACCCAGGTGTGGTGACAGTGGACTGGAAGGTAGATGGTACCCCTGTCACTCAGGGT  
 ATGGAGACAACCCAGCCTTCCAAACAGAGCAACAACAAGTACATGGCTAGCAGCTACCTG  
 ACCCTGACAGCAAGAGCATGGGAAAGGCATAGCAGTTACAGCTGCCAGGTCACTCATGAA  
 GGTCACACTGTGGAGAAGAGTTTGTCCCGTGTGACTGTTCCCTAG

[0293] SEQ ID NO :4

[0294] 52M51 轻链氨基酸序列（推定的信号序列加下划线）

[0295]

MAWISLILSLLALSSCAISQAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEK  
 PDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNHVWVFG  
 GGTCLTVLGQPKSSPSVTLFPPSSBELETNKATLVCTITDFYPGVVTVDWKVDGTPVTQG  
 METTQPSKQSNKYMSSYLTLTARAWERHSSYSQVTHEGHTVEKSLSRADCS

[0296] SEQ ID NO :5

[0297] 52M51 轻链可变区多核苷酸序列（推定的信号序列加下划线）

[0298]

ATGGCCTGGATTTCACTTATACTCTCTCCTGGCTCTCAGCTCAGGGGCCATTTCCAG  
 GCTGTTGTGACTCAGGAATCTGCACTCACCACATCACCTGGTGAAACAGTCACACTCACT  
 TGTCGCTCAAGTACTGGGGCTGTTACAAGTACTACGCCAAGTCCGGTCCAAGAAAA  
 CCTGATCATTATTCACTGGTCTAATAGGTGGTACCAACAACCGAGCTCCAGGTGTTCCCT  
 GCCAGATTCTCAGGCTCCCTGATTGGAGACAAGGCTGCCCTCACCATCACAGGGGCACAG  
 ACTGAGGATGAGGCAATATATTTCTGTGCTCTATGGTACAGCAACCCTGGGTGTTCCGGT  
 GGAGGAACCAAAGTACTGCTCCTAGGC

[0299] SEQIDNO :6

[0300] 52M51 轻链可变区氨基酸序列（推定的信号序列加下划线）

[0301]

MAWISLILSLLALSSGAISSQAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEK  
 PDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNHVWVFG  
 GGTCLTVLGQPKSSPSVTLFPPSSBELETNKATLVCTITDFYPGVVTVDWKVDGTPVTQG

[0302] SEQ ID NO :7

[0303] 52M51 轻链可变区多核苷酸序列，不带有推定的信号序列

[0304]

CAGGCTGTTGTGACTCAGGAATCTGCACTCACCACATCACCTGGTGAAACAGTCACACTC  
 ACTTGTGCGTCAAGTACTGGGGCTGTTACAAGTAACTACGCCAACTGGGTCCAAGAA  
 AAACCTGATCATTTATTCACTGGTCTAATAGGTGGTACCAACAACCGAGCTCCAGGTGTT  
 CCTGCCAGATTCTCAGCCTCCCCTGATTGGAGACAAGGCTGCCCTCACCATCACAGGGGCA  
 CAGACTGAGGATGAGGCAATATATTTCTGTGCTCTATGGTACAGCAACCACTGGGTGTTT  
 GGTGGAGGAACCAAACCTGACTGTCCTAGGC

[0305] SEQ ID NO :8

[0306] 52M51 轻链可变区氨基酸序列,不带有推定的信号序列

[0307]

QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNNRAPGV  
 PARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEALYFCALWYSNHWVFGGGTKLTVLG

[0308] SEQIDNO :9

[0309] 52M51 重链多核苷酸序列 (推定的信号序列加下划线)

[0310]

ATGGAATGGACCTGGGTCTTTCTCTTCTCCTCCTGTCAGTAACTGCAGGTGTCCACTCCCAG  
 GTTCAGCTGCAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGATGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGATATCC  
 TGCAAGGCTGCTGGCTACACAATGAGAGGCTACTGGATAGAGTGGATAAAGCAGAGCCCT  
 GGACATGGCCTTGAGTCGATTGGACAGATTTTACCTGGAACCTGGGAGAACTAACTACAAT  
 GAGAAGTTC AAGGGCAAGGCCACATTCACTGCAGATACATCCTCCAACACAGCCAACATG  
 CAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCCGTCTATTA CTGTGCAAGATTTGATGGT  
 AACTACGGTTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGATCCTCAGTCACCGTCTCCTCA  
 GCCAAAACGACACCCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCCTGGATCTGCTGCCAAACTAAC  
 TCCATGGTGACCCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACC  
 TGGA ACTCTGGATCCCTGTCCAGCGCTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTGTCAGTCTGAC  
 CTCTACACTCTGAGCAGCTCAGTACTGTCCCCTCCAGCCCTCGGCCCAGCGAGACCGTC  
 ACCTGCAACGTTGCCACCCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGTGCCCAGG  
 GATTGTGGTTGTAAGCCTTGCATATGTACAGTCCAGAACTATCATCTGTCTTCATCTTC  
 CCCCCAAGCCCAAGGATGTCTCACCATTACTCTGACTCCTAAGGTACAGTGTGTGTG  
 GTAGACATCAGCAAGGATGATCCCGAGGTCCAGTTCAGCTGGTTTGTAGATGATGTGGAG  
 GTGCACACAGCTCAGACGCAACCCCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACTTTCCGCTCAGTC  
 AGTGA ACTTCCCATCATGCACCAGGACTGGCTCAATGGCAAGGAGTTC AAATGCAGGGTC  
 AACAGTGCAGCTTTCCCTGCCCCCATCGAGAAAACCATATCCAAAACCAAAGGCAGACCG  
 AAGGCTCCACAGGTGTACACCATTCACCTCCCAAGGAGCAGATGGCCAAGGATAAAGTC  
 AGTCTGACCTGCATGATAACAGACTTCTTCCCTGAAGACATAACAGTGGAGTGGCAGTGG  
 AATGGGCAGCCAGCGGAGAACTACAAGAACA CT CAGCCCATCATGAACACGAATGGCTCT  
 TACTTCGTCTACAGCAAGCTCAATGTGCAGAAGAGCAACTGGGAGGCAGGAAATACTTTC

[0311]

ACCTGCTCTGTGTTACATGAGGGCCTGCACAACCACCATACTGAGAAGAGCCTCTCCAC  
 TCTCCTGGTAAATGA

[0312] SEQ ID NO :10

[0313] 52M51 重链氨基酸序列（推定的信号序列加下划线）

[0314]

MEWTWVFLFLLSVTAGVHSQVQLQQSGAELMKPGASVKISCKAAGYTMRGYWIEWIKQRP  
 GHGLEWIGQILPGTGRNTNYNEKFKGKATFTADTSSNTANMQLSSLTSEDSAVYYCARFDG  
 NYGYYAMDYWGQSSVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVT  
 WNSGSLSSGVHTFFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSPPRSETVTCNVAHPASSTKVDKKI VFR  
 DCGCKPCICTVPEVSSVFIFFPKPKDVLITITLTPKVTCTVVDISKDDPEVQFSWFVDDVE  
 VHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAPPAPIEKTISKTKGRF  
 KAPQVYTI PPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPI MNTNGS  
 YFVYSKLVNPKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNNHTEKSLSHSPGK

[0315] SEQ ID NO :11

[0316] 52M51 重链可变区多核苷酸序列（推定的信号序列加下划线）

[0317]

ATGGAATGGACCTGGGTCTTTCTCTTCCTCCTGTCAGTAACTGCAGGTGTCCACTCCCAG  
 GTTCAGCTGCAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGATGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGATATCC  
 TGCAAGGCTGCTGGCTACACAATGAGAGGCTACTGGATAGAGTGGATAAAGCAGAGGCCT  
 GGACATGGCCTTGAGTGGATTGGACAGATTTTACCTGGAACTGGGAGAACTAACTACAAT  
 GAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTCAGTGCAGATACATCCTCCAACACAGCCAACATG  
 CAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCCGTCTATTACTGTGCAAGATTTGATGGT  
 AACTACGGTTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGATCCTCAGTCACCGTCTCCTCA

[0318] SEQ ID NO :12

[0319] 52M51 重链可变区氨基酸序列（推定的信号序列加下划线）

[0320]

MEWTWVFLFLLSVTAGVRSQVQLQQSGAELMKPGASVKISCKAAGYTMRGYWIEWIKQRP  
 GHGLEWIGQILPGTGRNTNYNEKFKGKATFTADTSSNTANMQLSSLTSEDSAVYYCARFDG  
 NYGYYAMDYWGQSSVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVT

[0321] SEQ ID NO :13

[0322] 52M51 重链可变区多核苷酸序列，不带有推定的信号序列

[0323]

CAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGATGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGATA  
 TCCTGCAAGGCTGCTGGCTACACAATGAGAGGCTACTGGATAGAGTGGATAAAGCAGAGG  
 CCTGCACATGGCCTTGAGTGGATTGGACAGATTTTACCTGGAACTGGGAGAACTAACTAC  
 AATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTCAGTGCAGATACATCCTCCAACACAGCCAAC  
 ATGCCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCCGTCTATTACTGTGCAAGATTTGAT  
 GCTAACTACGGTTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGATCCTCAGTCACCGTCTCC  
 TCA

[0324] SEQ ID NO :14

[0325] 52M51 重链可变区氨基酸序列，不带有推定的信号序列



[0326]

QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKAAGYTMRGYWIIEWIKQRPGHGLEWIGQILPGTGRTNY  
 NEKFKGKATFTADTSSNTANMQLSSLTSEDSAVYYCARFDGNYGYIAMDYWGQGSSVTVS  
 SA

[0327] SEQ ID NO :15

[0328] 52M51 重链 CDR1

[0329]

RGYWIE

[0330] SEQ ID NO :16

[0331] 52M51 重链 CDR2

[0332]

QILPGTGRTNYNEKFKG

[0333] SEQ ID NO :17

[0334] 52M51 重链 CDR3

[0335]

FDGNYGYIAMDY

[0336] SEQ ID NO :18

[0337] 52M51 轻链 CDR1

[0338]

RSSTGAVTTSNYAN

[0339] SEQ ID NO :19

[0340] 52M51 轻链 CDR2

[0341]

GTNNRAP

[0342] SEQ ID NO :20

[0343] 52M51 轻链 CDR3

[0344]

ALWYSNHWVPGGGTKL

[0345] 人源化 52M51 序列:

[0346] SEQ ID NO :21

[0347] 52M51-H4 重链多核苷酸序列 (推定的信号序列加下划线)

[0348]

ATGGATTGGACATGGAGGGTGTTCCTGCCTCCTCGCTGTGGCTCCTGGAGTCCTGAGCCAG  
 GTCCAGCTCGTCCAGAGCGGGGCTGAAGTCAAGAAGCCTGGCGCTAGCGTCAAAATCAGC  
 TGTAAAGGTGAGCGGATACACACTGAGGGGATACTGGATCGAGTGGGTGAGGCAGGCTCCA  
 GGAAAGGGCCTGGAATGGATCGGCCAGATCCTGCCTGGAAACCGGAAGGACAAATTACAAT  
 GAGAAGTTTAAAGGGAAGGGTCACAATGACAGCAGACACAAGCACAGACACAGCTTATATG  
 GAACTCAGCTCCCTCAGATCCGAGGACACCGCTGTCTACTATTGTGCCAGGTTCCGATGGA  
 AATTACGGATACTATGCCATGGATTACTGGGGACAGGGGACAACGGTCBCCGTGAGCTCA  
 GCCAGCACAAAGGGCCCTAGCGTCTTCCCTCTGGCTCCCTGCAGCAGGAGCACCAGCGAG  
 AGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCAGAAACCGGTGACCGTGTG  
 TGGAACTCAGGCGCTCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTACAGTCTCTCA  
 GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACC  
 TACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGC  
 AAATGTTGTGTCGAGTGCCACCGTGCACAGCACCACCTGTGGCAGGACCGTCACTCTTC  
 CTCTTCCCCCAAACCCAAAGGACACCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTCACTGTC  
 GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTCAACTGGTACGTGGACGGC  
 GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACCGGAGGAGCAGTTC AACAGCACGTTCCGT  
 GTGGTCAACGCTCCTCACCGTGTGTCACAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGC  
 AAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGG  
 CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAAC  
 CAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG  
 GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATAACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGAC  
 GGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC  
 GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACCGCAGAAGAGCCTC  
 TCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

[0349] SEQ ID NO :22

[0350] 52M51H4 重链氨基酸序列（推定的信号序列加下划线）

[0351]

MDWTWRVFCLLAVAPGVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKVSGYTLRGYWIEWVRQAP  
 GKGLEWIGQILPGTGRITNYNEKPKGRVTMTADTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCARFDG  
 NYGYYAMDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS  
 WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVR  
 KCCVECPPCPAPFVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDG  
 VEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKG  
 QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSD  
 GSFPLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0352] SEQ ID NO :23

[0353] 52M51-H4 重链可变区氨基酸序列（推定的信号序列加下划线）

[0354]

MDWTWRVFCLLAVAPGVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKVSGYTLRGYWIEWVRQAP  
 GKGLEWIGQILPGTGRNTNYNEKFKGRVTMTADTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCARFDG  
 NYGYYAMDYWGQGTITVTVSSA

[0355] SEQ ID NO :24

[0356] 52M51-H4 重链可变区氨基酸序列,不带有推定的信号序列

[0357]

QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKVSGYTLRGYWIEWVRQAPGKGLEWIGQILPGTGRNTNY  
 NEKFKGRVTMTADTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCARFDGNYGYYAMDYWGQGTITVTVS  
 SA

[0358] SEQ ID NO :25

[0359] 52M51-L3 轻链多核苷酸序列(推定的信号序列加下划线)

[0360]

ATGAGCGTCCCTACAATGGCTTGGATGATGCTCCTGCTGGGACTCCTGGCTTATGGAAGC  
 GGAGTGGATAGCCAGGCCGTCGTACACAGGAACCTAGCCTCACCGTTAGCCCTGGAGGA  
 ACAGTCACACTGACCTGTAGGAGCTCCACAGGAGCTGTGACAACAAGCAATTACGCTAAC  
 TGGTTCACAGCAGAAGCCCGGTCAAGCCCCTAGAACCCTCATCGGCGGCACCAATAACAGA  
 GCTCCCGGAGTCCCCCGCCAGGTTCTCCGGCTCCCTCCTGGGTGGCAAGGCTGCTCTGACA  
 CTCAGCGGTGCCAGCCAGAGGATGAAGCGGAGTACTACTGTGCACTGTGGTACAGCAAC  
 CATTGGGTTTTCGGAGGCGGAACAAAGTTAACCGTCCCTCGGGCAGCCTAAGGCTGCTCCT  
 AGCGTCACACTGTTCCCCCATCTAGCGAGGAGCTGCAGGCTAACAAGGCAACCCTCGTC  
 TGCCTGGTTAGCGACTTCTACCCTGGCGCTGTACAGTGGCCTGGAAAGCTGACGGCTCC  
 CCTGTGAAAGTTGGCGTCGAAACCACAAAGCCTTCTAAGCAGAGCAATAATAAATATGCC  
 GCAAGCTCCTACCTCTCCCTGACTCCTGAGCAGTGGAAAAGCCATAGGAGCTACTCCTGC  
 CCGGTACACACGAAGGAAGCACAGTGGAAAAGACAGTCCCCCTGCTGAGTGTAGCTGA

[0361] SEQ ID NO :26

[0362] 52M51-L3 轻链氨基酸序列(推定的信号序列加下划线)

[0363]

MSVPTMAWMMLLLGLLAYGSGVDSQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYAN  
 WFQQKPGQAPRTLIGGTNNRAPGVPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSN  
 HWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLVSDFYPGAFTVAVKADGS  
 PVKVGVEITKPSKQSNKYAASSYLSLTPQWKSQRSYSRVTHEGSTVEKTVAPAEC

[0364] SEQ ID NO :27

[0365] 52M51-L3 轻链可变区氨基酸序列(推定的信号序列加下划线)

[0366]

MSVPTMAWMMLLLGLLAYGSGVDSQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYAN  
 WFQQKPGQAPRTLIGGTNNRAPGVPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSN  
 HWVFGGGTKLTVLG

[0367] SEQ ID NO :28

[0368] 52M51-L3 轻链可变区氨基酸序列,不带有推定的信号序列

[0369]

SGVDSQAVVTQEPSLTVSPGCTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWFQQKPGQAPRTLIGGTNN  
RAPGVPARFSGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNHVWVFGGGTKLTVLG

[0370] SEQ ID NO :29

[0371] 52M51-L4 轻链多核苷酸序列 (推定的信号序列加下划线)

[0372]

ATGAGCGTCCCTACAATGGCTTGGATGATGCTCCTGCTGGGACTCCTGGCTTATGGAAGC  
GGAGTGGATAGCCAGACCGTCGTCACACAGGAACCTAGCTTTTCCGTTAGCCCTGGAGGA  
ACAGTCACACTGACCTGTAGGAGCTCCACAGGAGCTGTGACAACAAGCAATTACGCTAAC  
TGGTATCAGCAGACTCCCGGTCAAGCCCTAGAACCTCATCGGCGGCACCAATAACAGA  
GCTCCCGGAGTCCCGACAGGTTCTCCGGCTCCATCCTGGGAAATAAAGCTGCTCTGACA  
ATCACAGGTGCCAGGCTGACGATGAAAGCGACTACTACTGTGCACTGTGGTACAGCAAC  
CATTGGTTTTTCGGAGGCGGAACAAAGTTAAACCGTCCCTCGGCAGCCTAAGGCTGCTCCT  
AGCGTCACACTGTTCCCCCATCTAGCGAGGAGCTGCAGGCTAACAAGGCAACCCTCGTC  
TGCTGTTAGCGACTTCTACCTGGCGCTGTACAGTGGCCTGGAAAGCTGACGGCTCC  
CCTGTGAAAGTTGGCGTCGAAACCACAAAGCCTTCTAAGCAGAGCAATAATAAATATGCC  
GCAAGCTCCTACCTCTCCCTGACTCCTGAGCAGTGGAAAAGCCATAGGAGCTACTCCTGC  
CGGGTCACACACGAAGGAAGCACAGTGGAAAAGACAGTCGCCCCTGCTGAGTGTAGCTGA

[0373] SEQ ID NO :30

[0374] 52M51-L4 轻链氨基酸序列 (推定的信号序列加下划线)

[0375]

MSVPTMANMMLLLGLLAYGSGVDSQTVVTQEPSFSVSPGCTVTLTCSRSTGAVTTSNYAN  
WYQQT PGQAPRTLIGGTNNRAPGV PDRFSGS ILGNKAALTI TGAQADDES DYICALWYSN  
HWVFGGGTKLTVLG QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLVSDFYPGA VTVAWKADGS  
FVKVGVETTKPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKS HRSYSCRVTHEGSTVEKTVAPAECS

[0376] SEQ ID NO :31

[0377] 52M51-L4 轻链可变区氨基酸序列 (推定的信号序列加下划线)

[0378]

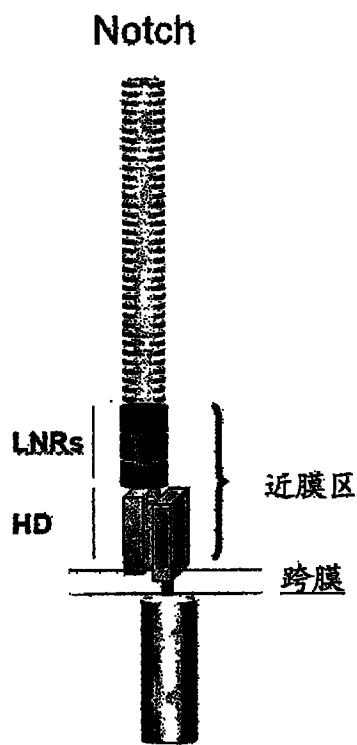
MSVPTMANMMLLLGLLAYGSGVDSQTVVTQEPSFSVSPGCTVTLTCSRSTGAVTTSNYAN  
WYQQT PGQAPRTLIGGTNNRAPGV PDRFSGS ILGNKAALTI TGAQADDES DYICALWYSN  
HWVFGGGTKLTVLG

[0379] SEQ ID NO :32

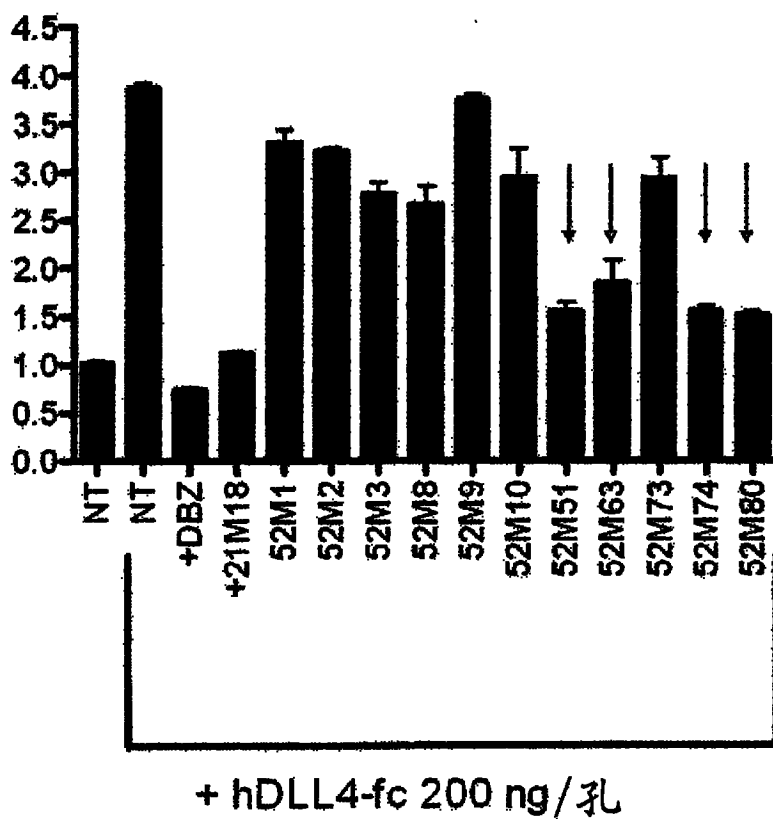
[0380] 52M51-L4 轻链可变区氨基酸序列, 不带有推定的信号序列

[0381]

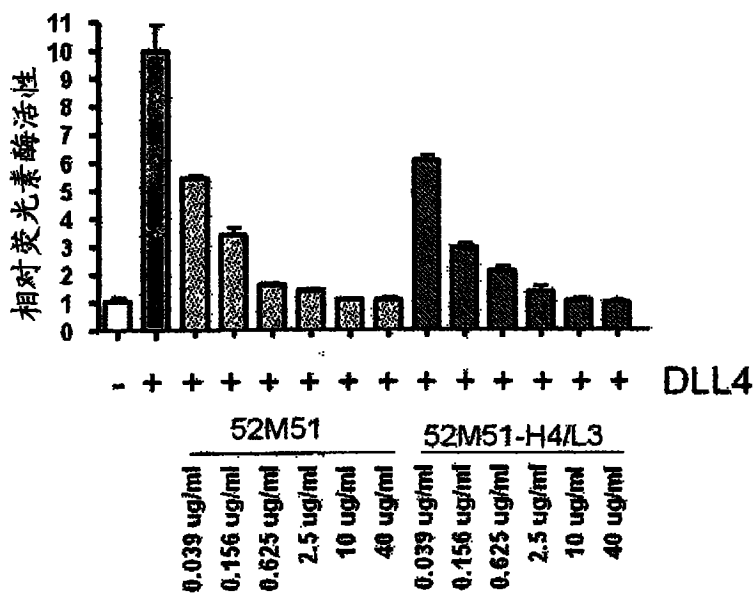
SGVDSQTVVTQEPSFSVSPGCTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWYQQT PGQAPRTLIGGTNN  
RAPGV PDRFSGS ILGNKAALTI TGAQADDES DYICALWYSNHVWVFGGGTKLTVLG



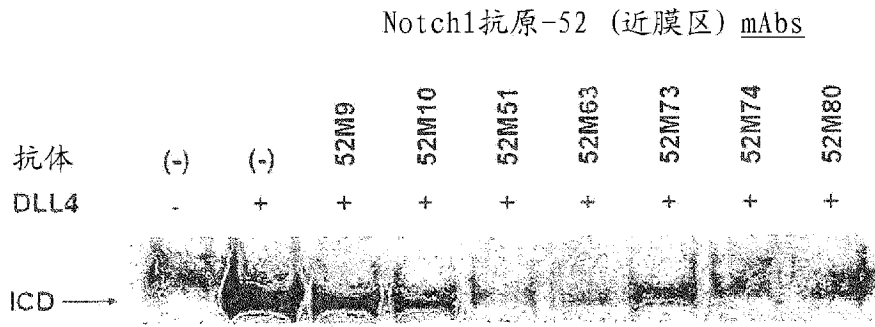
1A



1B

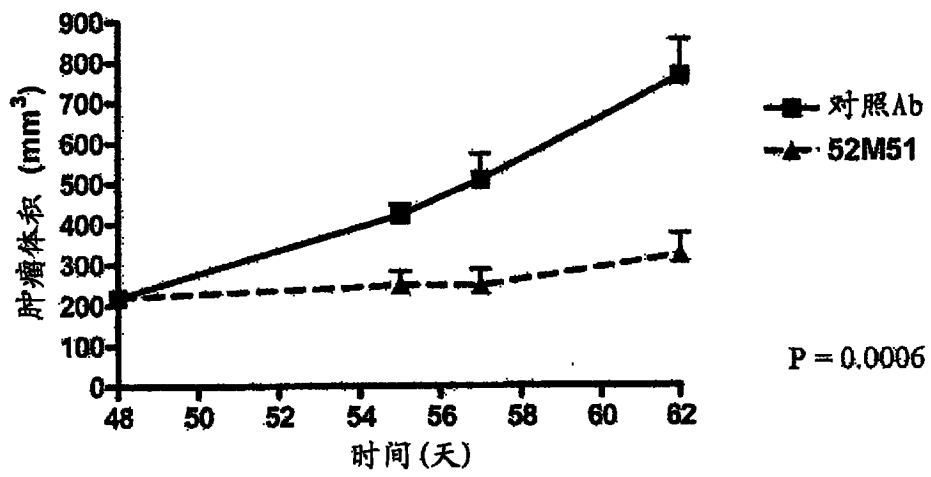


1C

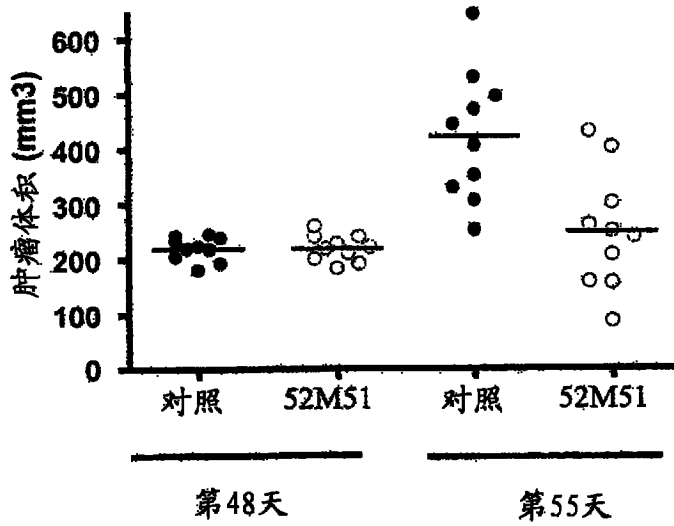


1D

图 1



2A



2B

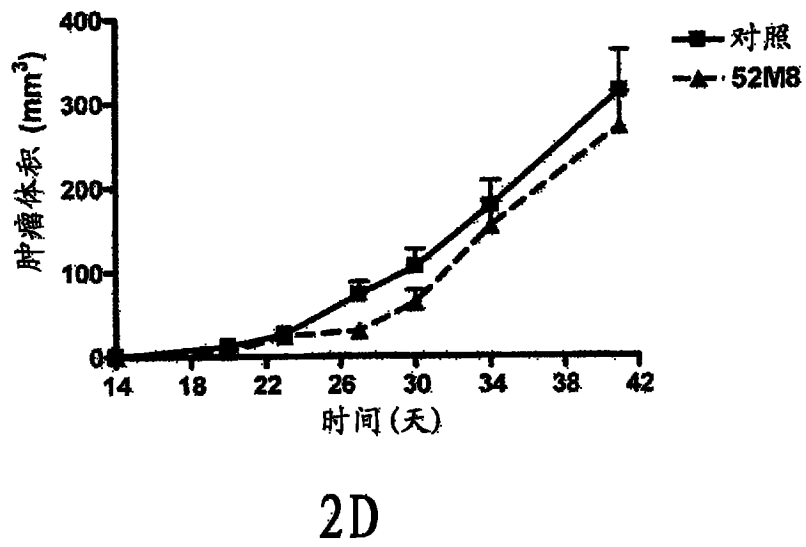
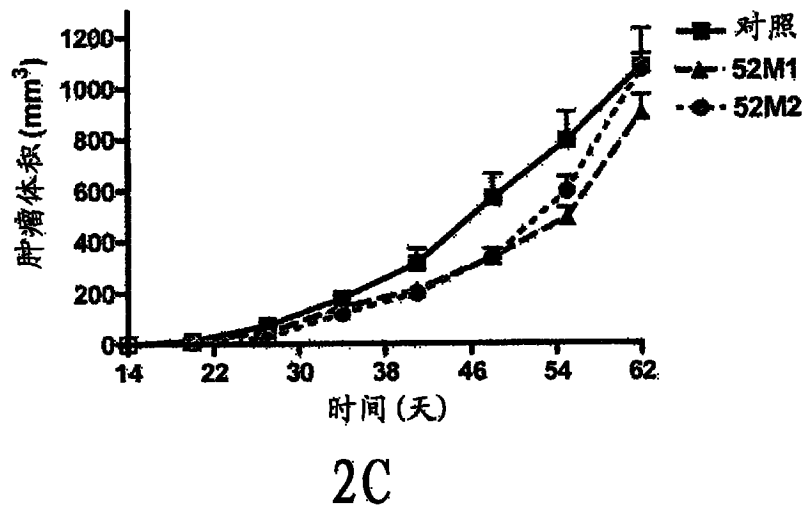
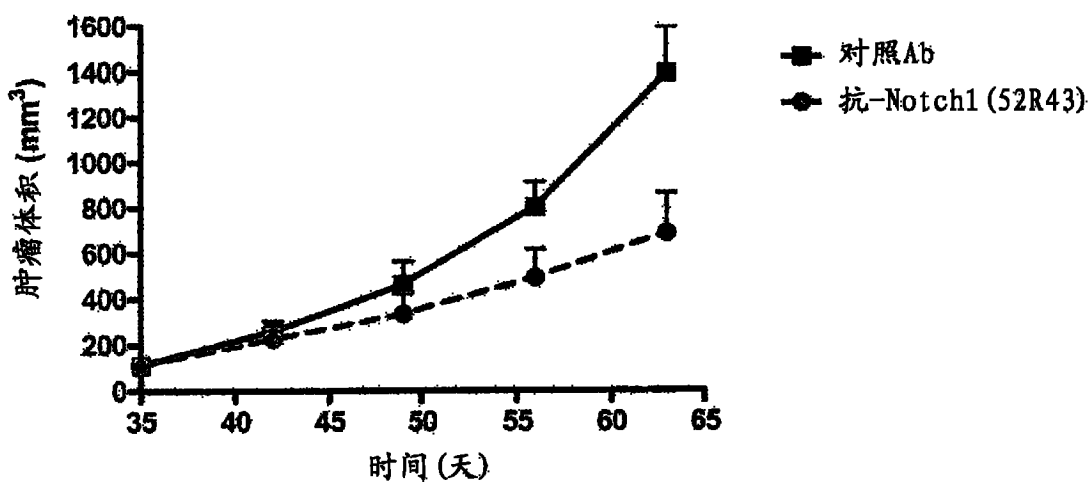


图 2

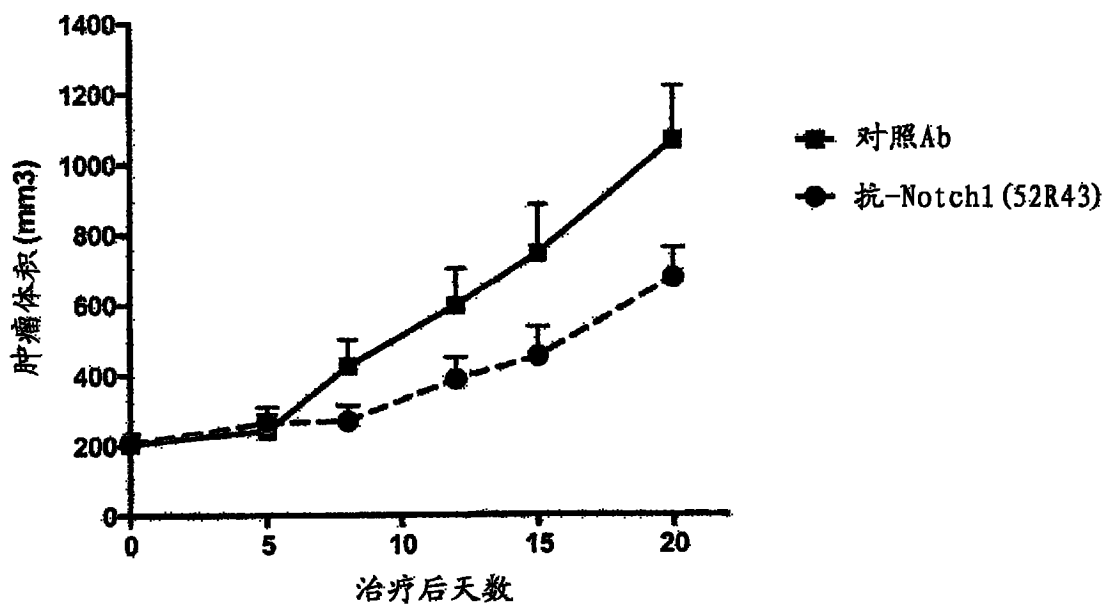


### M2黑色素瘤



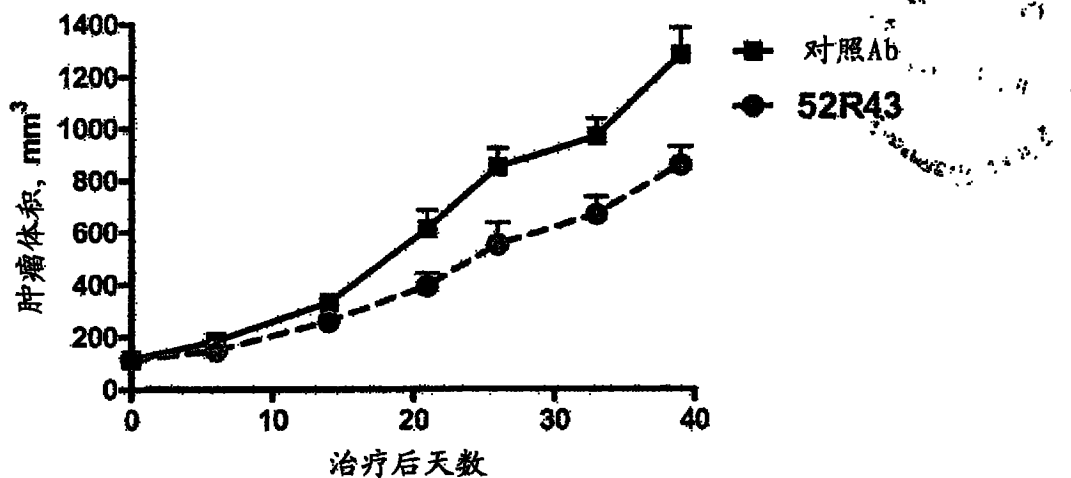
3A

### Lu24肺癌肿瘤



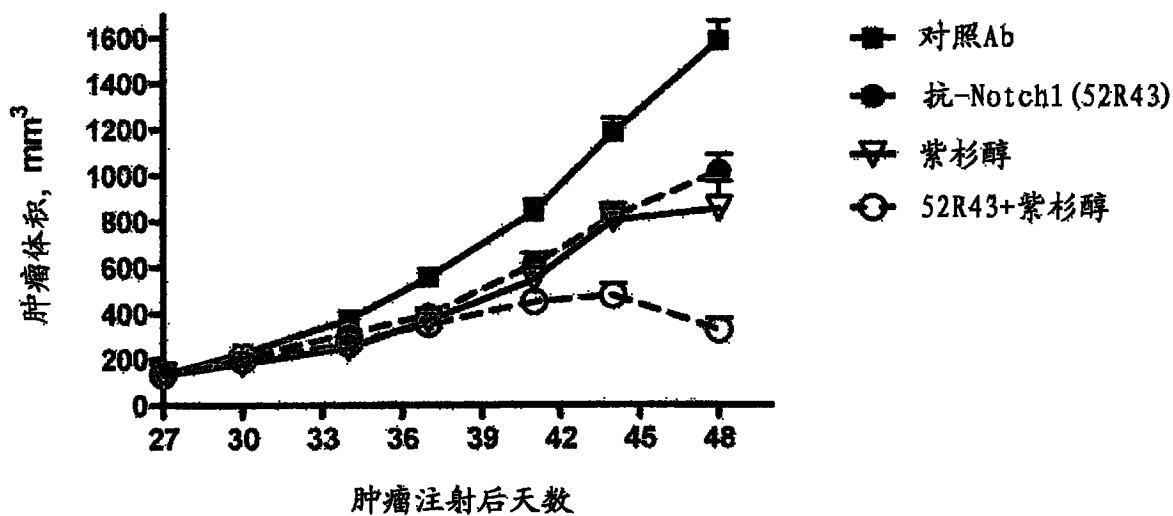
3B

PN8胰腺癌肿瘤



3C

T1乳癌肿瘤



3D

图 3