



(51) МПК
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C07K 16/28 (2019.08); *C07K 16/46* (2019.08); *A61K 39/395* (2019.08); *A61P 1/16* (2019.08); *A61P 13/08* (2019.08)

(21)(22) Заявка: 2017132827, 14.04.2016

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
14.04.2016

Дата регистрации:
28.04.2020

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
16.04.2015 US 62/148,253

(43) Дата публикации заявки: 09.04.2019 Бюл. № 10

(45) Опубликовано: 28.04.2020 Бюл. № 13

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 05.10.2017

(86) Заявка РСТ:
JP 2016/061961 (14.04.2016)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2016/167306 (20.10.2016)

Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Большая Спасская, д. 25,
строение 3, ООО "Юридическая фирма
Городисский и Партнеры"

(72) Автор(ы):

САКАМОТО Йосимаса (JP),
 АДАТИ Юсуке (JP),
 МАЦУИ Дзундзи (JP),
 КАТО Ю (JP),
 ОЗАВА Йоити (JP),
 АБЕ Таканори (JP),
 ИТО Кен (JP),
 НАКАДЗАВА Юя (JP),
 ТАТИНО Со (JP),
 СУДЗУКИ Кацухиса (JP),
 АГАРВАЛА Кисан (JP),
 ХОСИНО Кана (JP),
 КАТАЯМА Масахико (JP)

(73) Патентообладатель(и):

ЭЙСАЙ Ар ЭНД Ди МЕНЕДЖМЕНТ КО,
 ЛТД. (JP)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2532830 C2, 10.11.2014. EP
2307051 B1, 11.02.2015. WO 2013134649 A1,
12.09.2013. WO 2010005566 A2, 14.01.2010.

(54) АНТИТЕЛО К NOTCH4 ЧЕЛОВЕКА

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биохимии, в частности к анти-Notch4 антителу и его Notch4-связывающему фрагменту. Также раскрыта фармацевтическая композиция, содержащая

указанное антитело. Изобретение обладает способностью эффективно лечить заболевания, ассоциированные с Notch4. 2 н. и 18 з.п. ф-лы, 8 ил., 32 табл., 10 пр.

RU 2720280 C2

RU 2720280 C2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
C07K 16/28 (2019.08); *C07K 16/46* (2019.08); *A61K 39/395* (2019.08); *A61P 1/16* (2019.08); *A61P 13/08* (2019.08)

(21)(22) Application: **2017132827, 14.04.2016**

(24) Effective date for property rights:
14.04.2016

Registration date:
28.04.2020

Priority:

(30) Convention priority:
16.04.2015 US 62/148,253

(43) Application published: **09.04.2019 Bull. № 10**

(45) Date of publication: **28.04.2020 Bull. № 13**

(85) Commencement of national phase: **05.10.2017**

(86) PCT application:
JP 2016/061961 (14.04.2016)

(87) PCT publication:
WO 2016/167306 (20.10.2016)

Mail address:
**129090, Moskva, ul. Bolshaya Spasskaya, d. 25,
stroenie 3, OOO "Yuridicheskaya firma
Gorodisskij i Partnery"**

(72) Inventor(s):

**SAKAMOTO, Yoshimasa (JP),
ADACHI, Yusuke (JP),
MATSUI, Junji (JP),
KATO, Yu (JP),
OZAWA, Yoichi (JP),
ABE, Takanori (JP),
ITO, Ken (JP),
NAKAZAWA, Yuya (JP),
TACHINO, Sho (JP),
SUZUKI, Katsuhisa (JP),
AGARWALA, Kishan (JP),
HOSHINO, Kana (JP),
KATAYAMA, Masahiko (JP)**

(73) Proprietor(s):

EISAI R&D MANAGEMENT CO., LTD. (JP)

(54) **HUMAN NOTCH4 ANTIBODY**

(57) Abstract:

FIELD: biochemistry.

SUBSTANCE: invention relates to an anti-Notch4 antibody and its Notch4-binding fragment. What is also disclosed is a pharmaceutical composition containing

said antibody.

EFFECT: invention is able to effectively treat diseases associated with Notch4.

20 cl, 8 dwg, 32 tbl, 10 ex

C 2 0 8 2 0 2 7 2 0 2 8 0 R U

R U 2 7 2 0 2 8 0 C 2

Область техники

[0001]

Настоящее изобретение относится к антителу, которое связывается с Notch4 человека.

Уровень техники

[0002]

Notch представляет собой молекулу, которая участвует в определении пути клеток различных тканей и, как указывают, вовлекается, например, в дифференцировку, пролиферацию и выживаемость на протяжении каждой стадии из стадии раннего развития, эмбриональной стадии, и после рождения. Четыре типа рецепторов, в том числе Notch1, Notch2, Notch3 и Notch4, а также пять типов лигандов, в том числе Jagged1, Jagged2, DLL1, DLL3 и DLL4, представляют семейство Notch. Если рецептор Notch, экспрессируемый на соседней клетке, связывается с лигандом Notch, домен NRR, присутствующий в нижнем внеклеточном домене рецептора, расщепляется с помощью TACE, и из-за структурного изменения внутриклеточного домена, вызванного таким образом, внутриклеточный домен расщепляется γ -секретазой. Внутриклеточный (NIC) домен Notch, образовавшийся в результате, переносится в ядро, образует гетеродимер с фактором транскрипции CSL, и целевые молекулы, такие как представители семейства aHes или семейства Neu, индуцируются и экспрессируются. Эти молекулы по направлению передачи сигнала далее индуцируют и экспрессируют различные гены, и в результате сигнал Notch способствует, например, поддержанию стволовых клеток или клеток-предшественников, дифференцировке, остановке клеточного цикла и определению пути клеток (непатентная литература 1).

[0003]

Также известно, что Notch вовлечен в образование опухолей. О мутации Notch1 вследствие хромосомной транслокации t(7;9) впервые сообщали как о связанной с возникновением острого лимфобластного лейкоза из предшественников Т-клеток (T-ALL). Более того, сайтом инсерции в геноме вируса опухоли молочной железы мышей (MMTV), который является моделью возникновения спонтанной опухоли, как сообщается, является Int3 (внутриклеточный домен Notch4), а также сообщается, что рак эпителиальных клеток, такой как рак молочной железы или рак слюнной железы, индуцируется у трансгенной мыши, если Int3 характеризовался высоким уровнем экспрессии (непатентная литература 2). Также сообщалось, что Notch4 связан с онкогенезом, прогрессированием рака молочной железы (непатентная литература 3), меланомы (непатентная литература 4), рака желудка (непатентная литература 5), В-клеточного острого лимфоцитарного лейкоза (B-ALL) (непатентная литература 6), хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL) (непатентная литература 7), глиомы (непатентная литература 8), гепатоцеллюлярной карциномы (непатентная литература 9), рака легкого (непатентная литература 10), рака почки (непатентная литература 11), саркомы Капоши (непатентная литература 12) или с образованием метастазов при данных типах рака и т. п. у людей.

[0004]

Сигнал Notch также способствует внутриопухолевой неоваскуляризации. Notch1 и Notch4 экспрессируются в качестве рецепторов Notch в васкулярных эндотелиальных клетках, и подтверждается экспрессия DLL4 и Jagged1 как лигандов. Ведущие клетки, находящиеся в самом начале отростков новых кровеносных сосудов, в высокой степени экспрессируют DLL4 со стимуляцией VEGF, и кровеносные сосуды удлиняются путем передачи сигнала на рецептор Notch соседней ведомой клетке. С другой стороны, Jagged1 конкурирует с DLL4 за рецептор Notch и ингибирует связывание DLL4 с рецептором

Notch. Поскольку сигнал от Jagged1 является слабым по сравнению с таковым сигналом от DLL4, сигнал Notch подавляется путем связывания с Jagged1. Интенсивность сигнала Notch регулируется пространственно различающимися паттернами экспрессии этих двух лигандов для контроля неоваскуляризации (непатентная литература 13).

5 [0005]

Сообщалось о продуцировании ингибиторного антитела DLL4, при котором, если сигнал от DLL4 ингибируется ингибиторным антителом к DLL4, то незрелый ангиогенез в отсутствие кровотока усиливается внутри опухоли и индуцируется ингибирование пролиферации опухоли. Это совершенно другое явление, когда ингибитор VEGF
10 ингибирует пролиферацию васкулярных эндотелиальных клеток для подавления ангиогенеза, и сигнал Notch привлекает внимание как новая мишень для ингибиторов неоваскуляризации (непатентная литература 14).

Список цитируемой литературы

[0006]

- 15 [Непатентная литература 1] Radtke et al. (2004), Nature Immunology 5,247-53.
[Непатентная литература 2] Jhappan et al. (1992), Genes Dev. 6,345-55
[Непатентная литература 3] Nagamatsu et al. (2014), Anticancer Res. 34, 69-80
[Непатентная литература 4] Hardy et al. (2010), Cancer Res. 70, 10340-50
[Непатентная литература 5] Qian et al. (2015), Mol Cell Biochem. 401, 165-74
20 [Непатентная литература 6] Nwabo Kamdje et al. (2011), Blood 118, 380-9
[Непатентная литература 7] Nwabo Kamdje et al. (2012), Blood Cancer Journal 2, e73
[Непатентная литература 8] Dell'Albani et al. (2012), Neuro-Oncology 16, 204-16
[Непатентная литература 9] Ahn et al. (2013), Hepatobiliary Pancreat Dis Int. 12, 286-94
[Непатентная литература 10] Justilien et al. (2012), PLoS ONE 7, e35040
25 [Непатентная литература 11] Boo et al. (2009), J Pediatr Surg. 44, 2031-6
[Непатентная литература 12] Curry et al. (2005), Oncogene 24, 6333-44
[Непатентная литература 13] Benedito et al. (2009), Cell 137, 1124-35
[Непатентная литература 14] Ridgway et al. (2006), Nature 444, 1083-7

Краткое описание изобретения

30 **Задачи, решаемые с помощью настоящего изобретения**

[0007]

Целью настоящего изобретения является обеспечение антитела к Notch4 человека или его фрагмента, связывающего Notch4, которые могут обладать нейтрализующей активностью в отношении Notch4 человека, а также фармацевтической композиции,
35 содержащей их в качестве активного ингредиента.

Средства для решения задач

[0008]

В результате обширного исследования для решения вышеупомянутых задач авторы настоящего изобретения успешно получили мышинное антитело к Notch4 человека,
40 которое обладает высокой нейтрализующей активностью и аффинностью связывания в отношении Notch4 человека. Более того, путем определения последовательности участка (CDR), определяющего комплементарность, указанного мышинного антитела к Notch4 человека авторы настоящего изобретения смогли получить гуманизованное антитело, содержащее переменный участок тяжелой и легкой цепей, а также
45 последовательность CDR указанного мышинного антитела к Notch4 человека для осуществления настоящего изобретения.

[0009]

Другими словами, согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение

относится к следующим изобретениям.

(1) Антитело к Notch4 или его фрагмент, связывающий Notch4, содержащие:

(a) CDR 1 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательности под SEQ ID NO: 15 или 16;

5 (b) CDR 2 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательности под SEQ ID NO: 17 или 18;

(c) CDR 3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательности под SEQ ID NO: 19;

10 (d) CDR 1 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательности под SEQ ID NO: 20;

(e) CDR 2 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательности под SEQ ID NO: 21; и

(f) CDR 3 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательности под SEQ ID NO: 22.

15 [0010]

(2) Антитело к Notch4 или его фрагмент, связывающий Notch4, по пункту (1), где указанное антитело или его фрагмент, связывающий Notch4, содержат тяжелую и легкую цепи и выбраны из любого из следующих (i) - (vii):

20 (i) антитела, в котором вариабельный участок указанной тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO. 33, а вариабельный участок указанной легкой цепи содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO. 45,

25 (ii) антитела, в котором вариабельный участок указанной тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO. 35, а вариабельный участок указанной легкой цепи содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO. 45,

30 (iii) антитела, в котором вариабельный участок указанной тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO. 33, а вариабельный участок указанной легкой цепи содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO. 47,

(iv) антитела, в котором вариабельный участок указанной тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO. 35, а вариабельный участок указанной легкой цепи содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO. 49,

35 (v) антитела, в котором вариабельный участок указанной тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO. 33, а вариабельный участок указанной легкой цепи содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO. 51,

40 (vi) антитела, в котором вариабельный участок указанной тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO. 39, а вариабельный участок указанной легкой цепи содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO. 45, и

45 (vii) антитела, в котором вариабельный участок указанной тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO. 35, а вариабельный участок указанной легкой цепи содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO. 47.

[0011]

(3) Антитело к Notch4 или его фрагмент, связывающий Notch4, по пункту (2), где

указанное антитело или его фрагмент, связывающий Notch4, содержит тяжелую и легкую цепи, и переменный участок указанной тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO. 33, а переменный участок указанной легкой цепи содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO. 45.

5 [0012]

(4) Антитело к Notch4 или его фрагмент, связывающий Notch4, по пункту (2), где указанное антитело или его фрагмент, связывающий Notch4, содержит тяжелую и легкую цепи, и переменный участок указанной тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO. 35, а переменный участок указанной легкой цепи

10 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO. 45.
[0013]

(5) Антитело к Notch4 или его фрагмент, связывающий Notch4, по пункту (2), где указанное антитело или его фрагмент, связывающий Notch4, содержит тяжелую и легкую цепи, и переменный участок указанной тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO. 33, а переменный участок указанной легкой цепи

15 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO. 47.
[0014]

(6) Антитело к Notch4 или его фрагмент, связывающий Notch4, по пункту (2), где указанное антитело или его фрагмент, связывающий Notch4, содержит тяжелую и легкую цепи, и переменный участок указанной тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO. 35, а переменный участок указанной легкой цепи

20 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO. 49.
[0015]

(7) Антитело к Notch4 или его фрагмент, связывающий Notch4, по пункту (2), где указанное антитело или его фрагмент, связывающий Notch4, содержит тяжелую и легкую цепи, и переменный участок указанной тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO. 33, а переменный участок указанной легкой цепи

25 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO. 51.
[0016]

(8) Антитело к Notch4 или его фрагмент, связывающий Notch4, по пункту (2), где указанное антитело или его фрагмент, связывающий Notch4, содержит тяжелую и легкую цепи, и переменный участок указанной тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO. 39, а переменный участок указанной легкой цепи

30 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO. 45.
[0017]

(9) Антитело к Notch4 или его фрагмент, связывающий Notch4, по пункту (2), где указанное антитело или его фрагмент, связывающий Notch4, содержит тяжелую и легкую цепи, и переменный участок указанной тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO. 35, а переменный участок указанной легкой цепи

35 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO. 47.
[0018]

(10) Антитело или его фрагмент, связывающий Notch4, по любому из пунктов (1) - (9), где константный участок указанной тяжелой цепи и константный участок указанной легкой цепи содержат последовательность, полученную из человеческого антитела.

40 [0019]

(11) Антитело к Notch4 или его фрагмент, связывающий Notch4, по пункту (10), где константный участок тяжелой цепи предусматривает константный участок человеческого IgG.

[0020]

(12) Антитело к Notch4 или его фрагмент, связывающий Notch4, по пункту (11), где указанный константный участок человеческого IgG представляет собой константный участок человеческого IgG2.

5 [0021]

(13) Антитело к Notch4 или его фрагмент, связывающий Notch4, по пункту (12), где указанное константный участок человеческого IgG2 имеет мутацию V234A и/или G237A.

[0022]

10 (14) Антитело к Notch4 или его фрагмент, связывающий Notch4, по пункту (10), где остаток лизина на карбоксильном конце константного участка указанной тяжелой цепи удален искусственным путем.

[0023]

15 (15) Антитело к Notch4 или его фрагмент, связывающий Notch4, по пункту (10), где константный участок указанной легкой цепи предусматривает константный участок человеческого Igk.

[0024]

(16) Фармацевтическая композиция, содержащая антитело к Notch4 или его фрагмент, связывающий Notch4, по любому из пунктов (1) - (15).

[0025]

20 (17) Фармацевтическая композиция по пункту (16), которая дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель.

[0026]

(18) Фармацевтическая композиция по пункту (17), которая применяется для лечения немелкоклеточного рака легкого.

25 [0027]

(19) Фармацевтическая композиция по пункту (17), которая применяется для лечения рака щитовидной железы.

[0028]

30 (20) Фармацевтическая композиция по пункту (17), которая применяется для лечения рака предстательной железы.

[0029]

(21) Фармацевтическая композиция по пункту (17), которая применяется для лечения гепатоцеллюлярной карциномы.

[0030]

35 Согласно другим вариантам осуществления настоящее изобретение также относится к следующим изобретениям.

(1) Антитело к Notch4 или его фрагмент, связывающий Notch4, где указанное антитело или его фрагмент, связывающий Notch4, содержат тяжелую и легкую цепи и выбраны из любого из следующих (i) - (vii):

40 (i) антитела, в котором переменный участок указанной тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO. 33, а переменный участок указанной легкой цепи содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO. 45,

(ii) антитела, в котором переменный участок указанной тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO. 35, а переменный участок указанной легкой цепи содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO. 45,

(iii) антитела, в котором переменный участок указанной тяжелой цепи содержит

содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO. 51.

[0036]

5 (7') Антитело к Notch4 или его фрагмент, связывающий Notch4, по пункту (1'), где указанное антитело или его фрагмент, связывающий Notch4, содержит тяжелую и легкую цепи, и переменный участок указанной тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO. 39, а переменный участок указанной легкой цепи содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO. 45.

[0037]

10 (8') Антитело к Notch4 или его фрагмент, связывающий Notch4, по пункту (1'), где указанное антитело или его фрагмент, связывающий Notch4, содержит тяжелую и легкую цепи, и переменный участок указанной тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO. 35, а переменный участок указанной легкой цепи содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO. 47.

[0038]

15 (9') Антитело или его фрагмент, связывающий Notch4, по любому из пунктов (1') - (8'), где константный участок указанной тяжелой цепи и константный участок указанной легкой цепи содержат последовательность, полученную из человеческого антитела.

[0039]

20 (10') Антитело или его фрагмент, связывающий Notch4, по пункту (9'), где константный участок тяжелой цепи предусматривает константный участок человеческого IgG.

[0040]

(11') Антитело или его фрагмент, связывающий Notch4, по пункту (10'), где указанный константный участок человеческого IgG представляет собой константный участок человеческого IgG2.

25 [0041]

(12') Антитело или его фрагмент, связывающий Notch4, по пункту (11'), где указанное константное человеческое IgG2 имеет мутацию V234A и/или G237A.

[0042]

30 (13') Антитело или его фрагмент, связывающий Notch4, по пункту (9'), где остаток лизина на карбоксильном конце константного участка указанной тяжелой цепи удален искусственным путем.

[0043]

35 (14') Антитело или его фрагмент, связывающий Notch4, по пункту (9'), где константный участок указанной легкой цепи предусматривает константный участок человеческого Igk.

[0044]

(15') Фармацевтическая композиция, содержащая антитело к Notch4 или его фрагмент, связывающий Notch4, по любому из пунктов (1') - (14').

[0045]

40 (16') Фармацевтическая композиция по пункту (15'), которая дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель.

[0046]

(17') Фармацевтическая композиция по пункту (16'), которая применяется для лечения немелкоклеточного рака легкого.

45 [0047]

(18') Фармацевтическая композиция по пункту (16'), которая применяется для лечения рака щитовидной железы.

[0048]

(19') Фармацевтическая композиция по пункту (16'), которая применяется для лечения рака предстательной железы.

[0049]

5 (20') Фармацевтическая композиция по пункту (16'), которая применяется для лечения гепатоцеллюлярной карциномы.

[0050]

Согласно другим вариантам осуществления настоящее изобретение, кроме того, относится к следующим изобретениям.

10 (1'') Антитело к Notch4 или его фрагмент, связывающий Notch4, где указанное антитело или его фрагмент, связывающий Notch4, содержит тяжелую и легкую цепи, и переменный участок указанной тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO. 33, а переменный участок указанной легкой цепи содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO. 45.

[0051]

15 (2'') Антитело к Notch4 или его фрагмент, связывающий Notch4, где указанное антитело или его фрагмент, связывающий Notch4, содержит тяжелую и легкую цепи, и переменный участок указанной тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO. 35, а переменный участок указанной легкой цепи содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO. 45.

20 [0052]

(3'') Антитело к Notch4 или его фрагмент, связывающий Notch4, где указанное антитело или его фрагмент, связывающий Notch4, содержит тяжелую и легкую цепи, и переменный участок указанной тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO. 33, а переменный участок указанной легкой цепи

25 [0053]

(4'') Антитело к Notch4 или его фрагмент, связывающий Notch4, где указанное антитело или его фрагмент, связывающий Notch4, содержит тяжелую и легкую цепи, и переменный участок указанной тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO. 35, а переменный участок указанной легкой цепи

30 [0054]

(5'') Антитело к Notch4 или его фрагмент, связывающий Notch4, где указанное антитело или его фрагмент, связывающий Notch4, содержит тяжелую и легкую цепи, и переменный участок указанной тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO. 33, а переменный участок указанной легкой цепи

35 [0055]

(6'') Антитело к Notch4 или его фрагмент, связывающий Notch4, где указанное антитело или его фрагмент, связывающий Notch4, содержит тяжелую и легкую цепи, и переменный участок указанной тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO. 39, а переменный участок указанной легкой цепи

40 [0056]

(7'') Антитело к Notch4 или его фрагмент, связывающий Notch4, где указанное антитело или его фрагмент, связывающий Notch4, содержит тяжелую и легкую цепи, и переменный участок указанной тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO. 35, а переменный участок указанной легкой цепи

содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO. 47.

[0057]

(8") Антитело или его фрагмент, связывающий Notch4, по любому из пунктов (1") - (7"), где константный участок указанной тяжелой цепи и константный участок указанной легкой цепи содержат последовательность, полученную из человеческого антитела.

[0058]

(9") Антитело или его фрагмент, связывающий Notch4, по пункту (8"), где константный участок тяжелой цепи предусматривает константный участок человеческого IgG.

[0059]

(10") Антитело или его фрагмент, связывающий Notch4, по пункту (9"), где указанный константный участок человеческого IgG представляет собой константный участок человеческого IgG2.

[0060]

(11") Антитело или его фрагмент, связывающий Notch4, по пункту (10"), где указанное константное место человеческого IgG2 имеет мутацию V234A и/или G237A.

[0061]

(12") Антитело или его фрагмент, связывающий Notch4, по пункту (10"), где остаток лизина на карбоксильном конце константного участка указанной тяжелой цепи удален искусственным путем.

[0062]

(13") Антитело или его фрагмент, связывающий Notch4, по пункту (8"), где константный участок указанной легкой цепи предусматривает константный участок человеческого Igk.

[0063]

(14") Фармацевтическая композиция, содержащая антитело к Notch4 или его фрагмент, связывающий Notch4, по любому из пунктов (1") - (13").

[0064]

(15") Фармацевтическая композиция по пункту (14"), которая дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель.

[0065]

(16") Фармацевтическая композиция по пункту (15"), которая применяется для лечения немелкоклеточного рака легкого.

[0066]

(17") Фармацевтическая композиция по пункту (15"), которая применяется для лечения рака щитовидной железы.

[0067]

(18") Фармацевтическая композиция по пункту (15"), которая применяется для лечения рака предстательной железы.

[0068]

(19") Фармацевтическая композиция по пункту (15"), которая применяется для лечения гепатоцеллюлярной карциномы.

[0069]

Изобретение с любой комбинацией одной или нескольких характеристик по настоящему изобретению, перечисленных выше, также охватывается объемом настоящего изобретения.

Краткое описание графических материалов

[0070]

На фигуре 1 показана взаимосвязь концентрации антитела В и значения

относительной люминесценции (%).

На фигуре 2 показан противоопухолевый эффект и эффект подавления перфузии крови антителом В на ксенотрансплантатной модели Calu6. На фигуре 2А показано изменение относительного объема опухоли (RTV) для каждой группы с введением в хвостовую вену IgG в дозе 10 мг/кг для контроля или антитела В в дозе 1, 3 или 10 мг/кг на ксенотрансплантатной модели Calu6 (N=8, среднее±стандартная погрешность). На фигуре 2В показан результат определения площади флуоресценции Hoeschst для опухолей, отобранных в конце теста с введением (день 8) (N=8, среднее±стандартная погрешность) (* $P < 0,05$ против контрольной группы с введением IgG (критерий Даннета)).

На фигуре 3 показан противоопухолевый эффект комбинированного применения антитела В и цисплатина на мышинной модели подкожной трансплантации Calu6. Изменение относительного объема опухоли (RTV) в контрольной (не получавшей лечение) группе, группе с введением антитела В (с введением дважды в неделю в хвостовую вену), группе с введением цисплатина (с однократным введением в хвостовую вену) и группе с комбинированным введением антитела В (с введением дважды в неделю в хвостовую вену)+цисплатин (однократное введение в хвостовую вену) (N=4, среднее стандартная±погрешность) (*: $P < 0,05$ против контрольной группы (t-критерий Стьюдента, день 8, день 24), #: $P < 0,05$ группа с введением 10 мг/кг цисплатина против группы с комбинированным введением антитело В+цисплатин (t-критерий Стьюдента, день 36)).

На фигуре 4 показан противоопухолевый эффект, обусловленный комбинированным применением антитела В и ленватиниба мезилата на ксенотрансплантатной модели клеточной линии рака щитовидной железы FTC238 человека. Изменение относительного объема опухоли (RTV) (N=5, среднее±стандартная погрешность) в контрольной (не получавшей лечение) группе, группе с введением антитела В (с введением дважды в неделю в хвостовую вену), группе с введением ленватиниба мезилата (с пероральным введением один раз в сутки) и группе с комбинированным введением антитело В (с введением дважды в неделю в хвостовую вену)+ленватиниба мезилат (с пероральным введением один раз в сутки) (*: $P < 0,05$ против контрольной группы (t-критерий Стьюдента, день 13), #: $P < 0,05$ группа с введением одного средства против группы с комбинированным введением антитело В+ленватиниба мезилат (t-критерий Стьюдента, день 13)).

На фигуре 5 показан противоопухолевый эффект комбинированного применения антитела В и паклитаксела на ксенотрансплантатной модели клеточной линии рака предстательной железы DU145 человека. Изменение объема опухоли (TV) в контрольной (не получавшей лечение) группе, группе с введением антитела В (с введением дважды в неделю в хвостовую вену), группе с введением паклитаксела (с введением один раз в сутки в течение 5 суток в хвостовую вену) и группе с комбинированным введением антитело В (введение дважды в неделю в хвостовую вену)+паклитаксел (с введением один раз в сутки в течение 5 суток в хвостовую вену) (N=4, среднее±стандартная погрешность) (*: $P < 0,05$ против контрольной группы (t-критерий Стьюдента, день 57)), #: $P < 0,05$ группа с введением одного средства против группы с комбинированным введением антитело В+паклитаксел (t-критерий Стьюдента, день 57).

На фигуре 6 показан противоопухолевый эффект, обусловленный комбинированным применением антитела В и ленватиниба мезилата на ксенотрансплантатной модели гепатоцеллюлярной карциномы, полученной от пациента-человека. Изменение объема опухоли (TV) в контрольной группе (3 мМ HCl), группе, получавшей ленватиниба

мезилат (10 мг/кг), группе, получавшей сорафениба тозилат (30 мг/кг), и группе, получавшей ленватиниба мезилат (10 мг/кг) плюс антитело В (0,5 мг/мышь) (N=10, среднее±погрешность) (*: $P < 0,05$ против контрольной группы, непарный t-критерий Стьюдента, день 13).

5 На фигуре 7 показана взаимосвязь концентрации антитела В и значения относительной люминесценции (%). На графике показано среднее значение результатов трех независимых тестов, и планка погрешностей показывает его стандартное отклонение.

На фигуре 8 показана перекрытая сенсограмма взаимодействия антитела В и доменов Notch NRR человека. (A) Notch1-NRR-SEAP-His человека, (B) Notch2-NRR-SEAP-His человека, (C) Notch3-NRR-SEAP-His человека и (D) Notch4-NRR-SEAP-His человека.

Описание вариантов осуществления

[0071]

Представленное в данном документе антитело может относиться к иммуноглобулиновой молекуле, которая может специфически связываться с мишенью, такой как сахар, полинуклеотид, липид, полипептид и белок, посредством по меньшей мере одного сайта распознавания антигена, расположенного в вариабельном участке иммуноглобулиновой молекулы. Антитело может относиться к полностью поликлональному или моноклональному антителу.

20 [0072]

Антитело может принадлежать к любому классу, такому как IgG, IgA или IgM (или их подклассу) и т. д., и не ограничивается конкретным классом. Иммуноглобулины разделяют на различные классы в зависимости от аминокислотной последовательности константного участка тяжелой цепи (иногда называемой цепью H) антитела Существует пять основных классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, некоторые из которых могут быть дополнительно разделены на подклассы (изотипы), такие как IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂. Константные участки тяжелой цепи, соответствующие различным классам иммуноглобулинов, называются α , δ , ϵ , γ , и μ , соответственно. Более того, типы легкой цепи (иногда называемой цепью L) антитела включают в себя λ и κ цепи.

30 [0073]

Согласно одному аспекту антитело к Notch4 человека по настоящему изобретению может представлять собой антитело IgG, например антитело IgG₁ или антитело IgG₂ и т. д. Более того, в некоторых случаях антитело к Notch4 по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент может быть в виде мономера, димера или мультимера.

[0074]

Антигенсвязывающий фрагмент представленного в данном документе антитела особенно не ограничивается, если он является функциональным и структурным фрагментом указанного антитела и сохраняет способность связывания с антигеном, который может быть связан указанным антителом. Примеры антигенсвязывающего фрагмента антитела включают в себя без ограничения Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, одноцепочечный (ScFv), их варианты, белок слияния, содержащий часть антитела, другие модифицированные структуры иммуноглобулиновой молекулы, содержащей сайт распознавания антигена, и т. п.

45 [0075]

Антигенсвязывающий фрагмент антитела может быть получен, например, путем

протеолитического расщепления полного антитела, или может быть получен непосредственно с помощью рекомбинантной клетки-хозяина (например, эукариотической, такой как дрожжевая клетка, растительная клетка, клетка насекомого или клетка млекопитающего, или прокариотической, такой как *E. coli*). Например, F(ab')₂-фрагмент может быть образован путем отбора Fab'-SH-фрагментов непосредственно из *E. coli* и воздействия ими на химическую связь. F(ab')₂ также может быть образован с использованием лейциновой "застежки" GCN4, которая обеспечивает сборку молекулы F(ab')₂. Более того, может быть использован автоматический синтезатор при получении scFv с помощью технологии химического синтеза.

Подходящая плаزمид, содержащая полинуклеотид, кодирующий scFv, может быть введена в подходящую клетку-хозяина (например, эукариотическую, такую как дрожжевая клетка, растительная клетка, клетка насекомого или клетка млекопитающего, или прокариотическую, такую как *E. coli*) при получении scFv с помощью технологии генетической рекомбинации. Полинуклеотид, кодирующий представляющий интерес scFv, может быть получен с помощью хорошо известной манипуляции, такой как лигирование полинуклеотидов. Полученный в результате scFv может быть выделен с использованием стандартной технологии очистки белка, хорошо известной из уровня техники.

[0076]

Вариабельный участок антитела может означать вариабельный участок легкой цепи антитела и/или вариабельный участок тяжелой цепи антитела, а константный участок антитела может означать константный участок легкой цепи антитела и/или константный участок тяжелой цепи антитела. Каждый вариабельный участок тяжелой и легкой цепей состоит из четырех каркасных участков (FR), соединенных тремя CDR, также известными как гипервариабельные участки. CDR в каждой цепи удерживается поблизости от FR и вместе с CDR в другой цепи участвует в образовании антигенсвязывающего сайта в антителе. Технологии определения CDR предусматривают без ограничения, например, (1) подход, основанный межвидовой вариабельности последовательностей (такой как в Kabat et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda MD); и (2) подход, основанный на исследовании кристаллической структуры комплексов антиген-антитело (Al-lazikani et al., 1997 J. Molec. Biol. 273:927-948). Эти и другие подходы могут быть использованы в комбинации.

[0077]

Термин "специфически связывается с" является термином, хорошо известным специалистам в данной области, и способы определения специфического связывания антитела и т. п. с антигеном или эпитопом, также хорошо известны. Например, следует учитывать, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с эпитопом в Notch4, могут связываться с указанным эпитопом в Notch4 с более высокой аффинностью и активностью связывания, быстрее и/или с большей продолжительностью, чем с другим эпитопом или отличными от эпитопа сайтами. Однако антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с первой мишенью, не исключаются из специфического связывания со второй мишенью.

[0078]

Моноклональное антитело может означать антитело, которое получают из популяции практически однородных антител. Другими словами, отдельные антитела, содержащиеся в этой популяции, являются идентичными, за исключением возможного присутствия

небольшого количества существующих в природе мутантов. Моноклональные антитела направляются на один антигенный сайт и являются высокоспецифическими. Кроме того, в отличие от типичного поликлонального антитела, которое нацеливается на разные антигены или разные эпитопы, каждое моноклональное антитело нацеливается на один эпитоп антигена. Определение "моноклональное" указывает на свойство антитела, которое получают из популяции практически однородных антител, и оно не должно истолковываться как ограниченное необходимостью получения антител конкретным способом.

[0079]

Антителом к Notch4 по настоящему изобретению или его антигенсвязывающим фрагментом может быть химерное антитело, гуманизированное антитело, человеческое антитело, антитело отличного от человека млекопитающего (такого как мышь, крыса, кролик, корова, лошадь и коза) или его антигенсвязывающий фрагмент. Химерным антителом является антитело, которое имеет, например, переменный участок не являющегося человеческим (например, мышинового или крысиного) антитела, введенного в константный участок человеческого антитела, и может относиться, например, к антителу, в котором переменный участок получен из не являющегося человеческим антитела, а константный участок получен из человеческого антитела.

Гуманизированным антителом является антитело, которое имеет, например, гиперпеременный участок (также называемый участком (CDR), определяющим комплементарность) не являющегося человеческим антитела, введенный в человеческое антитело, и может относиться, например, к антителу, в котором CDR получен из не являющегося человеческим антитела, а другие участки антитела получены из человеческого антитела. Следует отметить, что в соответствии с настоящим изобретением граница между химерным антителом и гуманизированным антителом не должна быть обязательно четкой, и антитело может находиться в состоянии, которое может называться как химерным антителом, так и гуманизированным антителом.

[0080]

Совершенно очевидно, что представленное выше химерное или гуманизированное антитело, которое было соответствующим образом модифицировано (например, путем модификации антитела или частичных замены, добавления или делеции в аминокислотной последовательности антитела) с сохранением при этом функции указанного антитела (или с добавлением или улучшением функции указанного антитела) также охватывается антителом по настоящему изобретению. Более конкретно, антитело, модифицированное с помощью технологии POTELLIGENT™ для усиления активности антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (ADCC) антитела, связанного с мишенью, антитело, модифицированное с помощью технологии COMPLEGENT™ для усиления активности комплементзависимой цитотоксичности (CDC) антитела, или антитело, модифицированное с помощью комбинированного применения этих технологий, также охватываются объемом настоящего изобретения. Более того, антитело с лизином (Lys), расположенным на карбоксильном конце (С-конце) тяжелой цепи, удаленной искусственным способом, таким как генетическая модификация, для уменьшения неоднородности антител, полученных с помощью антителопродуцирующих клеток, также охватывается объемом настоящего изобретения. Кроме того, биспецифическое антитело, имеющее антителосвязывающий сайт, содержащий последовательность CDR антитела по настоящему изобретению, вместе с антигенсвязывающим сайтом, которые связывается с другим антигеном (Kontermann (2012), mAbs 4, 182-97), также охватывается объемом настоящего изобретения.

[0081]

Антитело к Notch4 по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент при необходимости могут быть модифицированы. Модификацией антитела к Notch4 по настоящему изобретению или его антигенсвязывающего фрагмента может
5 быть модификация, которая изменяет (а) трехмерную структуру аминокислотной последовательности в модифицированном участке, такую как листовая или спиральная конформация; (b) заряд или состояние гидрофобности молекулы по целевому сайту или (с) эффект модификации в объеме боковой цепи, или модификация, при которой эти изменения не являются четко выраженными.

10 [0082]

Модификация антитела к Notch4 по настоящему изобретению или его антигенсвязывающего фрагмента может быть достигнута, например, путем замены, делеции, добавления и т. д. конфигурирующих аминокислотных остатков.

[0083]

15 Аминокислота в данном документе используется в самом широком своем смысле и включает в себя не только встречающиеся в природе аминокислоты, такие как серин (Ser), аспарагин (Asn), валин (Val), лейцин (Leu), изолейцин (Ile), аланин (Ala), тирозин (Tyr), глицин (Gly), лизин (Lys), аргинин (Arg), гистидин (His), аспарагиновая кислота (Asp), глутаминовая кислота (Glu), глутамин (Gln), треонин (Thr), цистеин (Cys), метионин
20 (Met), фенилаланин (Phe), триптофан (Trp) и пролин (Pro), а также не встречающиеся в природе аминокислоты, такие как варианты и производные аминокислот. Специалистам в данной области, естественно, будет понятно с учетом данного широкого определения, что примеры аминокислот в данном документе включают в себя L-аминокислоты; D-аминокислоты; химически модифицированные аминокислоты, такие как варианты и
25 производные аминокислот; аминокислоты, которые не являются материалами, конфигурирующими белки *in vivo*, такие как норлейцин, β -аланин и орнитин; и химически синтезированные соединения, обладающие свойствами аминокислот, хорошо известных специалистам в данной области. Примеры не встречающейся в природе аминокислоты включают в себя α -метиламинокислоты (такие как α -метилаланин), D-аминокислоты
30 (такие как D-аспарагиновая кислота и D-глутаминовая кислота), подобные гистидину аминокислоты (такие как 2-амино-гистидин, β -гидрокси-гистидин, гомогистидин, α -фторметил-гистидин, и α -метил-гистидин), аминокислоты с избытком метилена в боковой цепи ("гомо" аминокислоты) и аминокислоты, в которых карбоксилатная функциональная группа аминокислоты в боковой цепи замещена сульфонатной группой
35 (такие как цистеиновая кислота).

[0084]

Остатки встречающихся в природе аминокислот могут быть разделены, например, на следующие группы на основании общих свойств боковой цепи:

(1) гидрофобные: Met, Ala, Val, Leu и Ile;

40 (2) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser и Thr;

(3) кислые: Asp и Glu;

(4) основные: Asn, Gln, His, Lys и Arg;

(5) остатки, которые влияют на ориентацию цепи: Gly и Pro; и

(6) ароматические: Trp, Tyr и Phe.

45 [0085]

Неконсервативная замена аминокислотной последовательности, конфигурирующей антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, может быть выполнена путем обмена аминокислоты, которая принадлежит к одной из этих групп, на аминокислоту, которая

принадлежит к другой группе. Более консервативная замена может быть выполнена путем обмена аминокислоты, которая принадлежит к одной из этих групп, на другую аминокислоту, которая принадлежит к той же группе. Подобным образом может быть выполнена делеция или замена в аминокислотной последовательности.

5 [0086]

Модификацией аминокислоты, конфигурирующей антигено или его антигенсвязывающий фрагмент, может быть, например, посттрансляционная модификация, такая как гликозилирование с помощью сахара, ацетилирование или фосфорилирование. Антигено может быть гликозилировано по консервативному положению в своем константном участке. Гликозилирование антигена, как правило, является либо N-связанным, либо O-связанным. N-связанное означает связывание сахарного фрагмента с боковой цепью аспарагинового остатка. Трипептидные последовательности аспарагин-X-серин, аспарагин-X-треонин и аспарагин-X-цистеин (где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от пролина) являются последовательностями распознавания для ферментативного добавления сахарного фрагмента к боковой цепи аспарагина. Сайт потенциального гликозилирования присутствует, если одна из этих трипептидных последовательностей присутствует в антигене или его антигенсвязывающем фрагменте. O-связанным гликозилированием может быть связывание либо N-ацетилгалактозамина, галактозы, либо ксилозы с гидроксикаминокислотой (такой как серин или треонин), а в некоторых случаях может быть связывание с 5-гидроксипролином или 5-гидроксилизинном. Условие гликозилирования (например, если гликозилирование выполняют с биологическим средством, типом клетки-хозяина или клеточной средой, pH и т. п.) может быть соответствующим образом выбрано специалистом в данной области в соответствии с целью.

25 [0087]

Антигено к Notch4 в соответствии с настоящим изобретением или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть дополнительно модифицированы в соответствии с общими техническими принципами, хорошо известными специалистам в данной области, с помощью других способов модификации отдельно или в комбинации.

30 [0088]

Антигено к Notch4 по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть получены способом, хорошо известным специалистам в данной области. Например, антигено может быть получено с помощью гибридомы, которая продуцирует антигено к Notch4 по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент, или с помощью интеграции гена, кодирующего антигено к Notch4 по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент, в вектор экспрессии и введения указанного вектора экспрессии, например, в клетки E. coli, клетки обезьяны COS, клетки яичника китайского хомячка (CHO) и т. п.

40 [0089]

Антигеном к Notch4 по настоящему изобретению или его антигенсвязывающим фрагментом могут быть такие, которые выделены или очищены в соответствии со способами, хорошо известными специалистам в данной области. В данном документе "выделенный" или "очищенный" означает искусственное выделение или очистку из естественного состояния. Если молекула или композиция встречается в природе, то она является "выделенной" или "очищенной", если ее изменили или удалили из ее исходной среды, или и первое, и второе. Примеры способа выделения или очистки включают в себя без ограничения электрофорез, молекулярно-биологические, иммунологические

или хроматографические средства, особенно, ионообменную хроматографию, гидрофобную хроматографию или обращенно-фазовую HPLC хроматографию, или изоэлектрическое фокусирование.

[0090]

5 Способом, используемым для измерения связывающего свойства (такого как аффинность связывания и перекрестная реактивность) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с антигеном, может быть способ, хорошо известный специалистам в данной области. Например, аффинность связывания может быть измерена с помощью без ограничения биосенсора Biacore™, биосенсора KinExA,
10 сцинтилляционного анализа сближения, ELISA, иммуноанализа ORIGEN (от IGEN), проточной цитометрии, гашения флуоресценции, переноса флуоресценции, дрожжевого дисплея и/или иммуноокрашивания. Нейтрализующая активность антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в отношении связывания Notch4 с его лигандом может быть измерена с помощью без ограничения биосенсора Biacore™, ELISA и/или проточной
15 цитометрии. Нейтрализующая активность антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в отношении сигнала трансдукции, который индуцируется внутри организма человека из-за связывания Notch4 с его лигандом, или в отношении ответа в виде молекулярной экспрессии или функционального изменения клетки может быть измерена без ограничения, например, следующими способами: (i) анализ с геном-репортером,
20 который выявляет вариацию в экспрессии молекулы по направлению передачи сигнала Notch, (ii) вестерн-блоттинг, который выявляет расщепление Notch4 TNF- α превращающим ферментом (TACE) или γ -селектазой, (iii) окрашивание иммунных клеток, который выявляет ядерный импорт внутриклеточного домена Notch (NIC), и (iv) оценку клеточной функциональности, в которой используют нормальную клетку,
25 такую как сосудистая эндотелиальная клетка, или раковую клетку, которая экспрессирует Notch4.

[0091]

Согласно одному аспекту настоящее изобретение может относиться к фармацевтической композиции, содержащей антитело к Notch4 по настоящему
30 изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент.

[0092]

Фармацевтическая композиция, содержащая антитело к Notch4 по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент в водной или сухой препаративной форме, может дополнительно содержать фармацевтически приемлемый носитель,
35 наполнитель и/или стабилизатор. Примеры приемлемого носителя, наполнителя или стабилизатора включают в себя солевой раствор; буфер, такой как фосфорная кислота, лимонная кислота и другие органические кислоты; антиоксидант, в том числе аскорбиновую кислоту; низкомолекулярный полипептид; белок (такой как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулин); гидрофильный полимер,
40 такой как поливинилпирролидон; аминокислоту; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, в том числе глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующее средство, такое как EDTA; сахароспирты, такие как маннит или сорбит; противоион, который образует соль, такой как натрий; или неионогенное поверхностно-активное вещество, такое как TWEEN™, PLURONICS™ или PEG.

[0093]

45 Фармацевтическая композиция, содержащая антитело к Notch4 по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент, может быть инкапсулирована, например, в микрокапсулу, в коллоидальную систему доставки лекарственного средства

(такую как липосома, альбуминовая микросфера, микроэмульсия, наночастица или нанокапсула) или в макроэмульсию. При необходимости введения препарата с замедленным высвобождением антитела, обладающего свойством высвобождения, подходящим для любого заболевания, при котором требуется введение антитела, может
5 быть предусмотрено микроинкапсулирование антитела. Примеры матрицы замедленного высвобождения включают в себя сложный полиэфир, гидрогель (такой как поли(2-гидроксиэтил-метакрилат) или поли(виниловый спирт)), полимолочные кислоты, сополимер L-глутаминовой кислоты и γ этил-L-глутамат, неразлагаемый этилен-винилацетат, разлагаемый сополимер молочной кислоты и гликолевой кислоты, такой
10 как LUPRON DEPOT™ (инъекционная микросфера, состоящая из сополимера молочной кислоты и гликолевой кислоты и леупролидацетата), и поли-D-(-)-3-гидроксимасляная кислота.

[0094]

Препарат, используемый для *in vivo* введения, должен быть стерильным. Этого
15 можно легко достичь путем фильтрации через стерильную фильтрующую мембрану.

[0095]

Фармацевтическая композиция, содержащая антитело к Notch4 по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент, имеет потенциал в отношении применимости в лечении немелкоклеточного рака легкого, рака щитовидной железы,
20 рака предстательной железы или гепатоцеллюлярной карциномы. Другими словами, другой аспект настоящего изобретения может относиться к способу лечения немелкоклеточного рака легкого, рака щитовидной железы, рака предстательной железы или гепатоцеллюлярной карциномы, предусматривающему стадию введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела к Notch4 по настоящему
25 изобретению или его антигенсвязывающего фрагмента. Более того, другой аспект настоящего изобретения может относиться к применению антитела к Notch4 по настоящему изобретению или его антигенсвязывающего фрагмента для изготовления терапевтического лекарственного средства против немелкоклеточного рака легкого, рака щитовидной железы, рака предстательной железы или гепатоцеллюлярной
30 карциномы.

[0096]

Антитело к Notch4 по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент, используемые для лечения немелкоклеточного рака легкого, рака щитовидной железы, рака предстательной железы или гепатоцеллюлярной карциномы,
35 предпочтительно представляет собой антитело, которое распознает внеклеточный домен в Notch4. Например, антитело к Notch4 по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент может представлять собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с любым сайтом в положениях 24-1447 в аминокислотной последовательности Notch4 человека,
40 представленной под SEQ ID NO. 1. В аминокислотной последовательности Notch4 человека, представленной под SEQ ID NO. 1, положения 1-23 представляют собой сигнальную последовательность, а положения 1448-2003 представляют собой трансмембранный домен и внутриклеточный домен.

[0097]

Антитело к Notch4 по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть использованы в терапевтическом способе отдельно или в комбинации с другими средствами или композициями. Например, антитело к Notch4 по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть введены

в одно и то же или в разное время с другим противораковым средством. Такая комбинированная терапия предусматривает комбинированное введение (два или более средств содержатся в одном и том же или в отдельном препарате) и отдельное введение (например, в одно и то же время или непрерывно). При отдельном введении двух или более средств введение антитела к Notch4 по настоящему изобретению или его антигенсвязывающего фрагмента можно осуществлять до или после сопутствующего терапевтического способа. Противораковое средство, которое может быть использовано в комбинации с антителом к Notch4 по настоящему изобретению или его антигенсвязывающим фрагментом, может представлять собой, например, противораковое средство, которое является эффективным в лечении немелкоклеточного рака легкого, рака щитовидной железы, рака предстательной железы или гепатоцеллюлярной карциномы. Примеры такого противоракового средства могут включать в себя без ограничения цисплатин, ленватиниб и паклитаксел. Примеры фармацевтической композиции для такой комбинированной терапии могут включать в себя без ограничения фармацевтическую композицию, содержащую антитело к Notch4 по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент и цисплатин, фармацевтическую композицию, содержащую антитело к Notch4 по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент и ленватиниб, и фармацевтическую композицию, содержащую антитело к Notch4 по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент и паклитаксел.

[0098]

Субъект для введения фармацевтической композиции, содержащей антитело к Notch4 по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент, не является ограниченным, и настоящее изобретение может быть использовано для млекопитающего (такого как человек, свинья, корова, обезьяна, бабуин, собака, кот, крыса и мышь). Однако люди могут не быть субъектом, если это не является предпочтительным.

[0099]

Способ введения фармацевтической композиции, содержащей антитело к Notch4 по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент, субъекту (такой как путь введения, дозировка, частота введения за сутки и время введения) не является ограниченным, и может быть соответствующим образом определен специалистом в данной области (таким как врач) в соответствии с состоянием здоровья субъекта, степенью заболевания, типом средства, используемого в комбинации, и т. п.

[0100]

Специалистам в данной области известно, что если это не является технически противоречащим, любой один или несколько или все аспекты, описываемые в данном документе, могут быть соответствующим образом объединены для осуществления настоящего изобретения. Кроме того, специалистам в данной области известно, что пока это не является технически противоречащим, предпочтительно, чтобы любой и все предпочтительные или выгодные аспекты, описываемые в данном документе, были соответствующим образом объединены для осуществления настоящего изобретения.

[0101]

Все раскрытия литературных источников, цитируемых в данном документе, следует считать четко процитированными в данном документе посредством ссылки, и специалисты в данной области смогут цитировать и узнавать содержание раскрытия, относящегося к данным литературными источникам, в качестве части настоящего описания согласно контексту данного документа без отступления от сути и объема настоящего изобретения.

[0102]

Литературные источники, упоминаемые в настоящем документе, представлены исключительно с целью раскрытия связанной технологии, предшествующей дате подачи настоящей заявки, и не должны рассматриваться как признание того, что авторы настоящего изобретения не имеют приоритетного права на указанные раскрытия по причинам более раннего изобретения или по любой другой причине. Все описания этих литературных источников основываются на информации, доступной авторам настоящей заявки, и не является признанием того, что эти описания верны.

[0103]

Термины, используемые в настоящем документе, применяются для описания конкретных вариантов осуществления и не предназначены для ограничения настоящего изобретения.

[0104]

Термин "содержать", используемый в данном документе, если содержание явно не означает, что подразумевается иное, означает наличие описываемых объектов (таких как компоненты, стадии, элементы или числа) и не исключает наличие других объектов (таких как компоненты, стадии, элементы или числа). Термин "состоять из" охватывает аспекты, описываемые терминами "состоять из" и/или "состоять, по сути, из".

[0105]

Термин "нейтрализующая активность", используемый в данном документе, означает активность ингибирования связывания Notch4 с его лигандом и/или активность ингибирования трансдукции сигнала, которая индуцируется внутри организма человека связыванием Notch4 с его лигандом, или ответа в виде молекулярной экспрессии, или функционального изменения клетки.

[0106]

Если не указано иное, все термины, используемые в данном документе (в том числе технические и научные термины), имеют те же значения, которые широко известны специалистам в области технологии, к которой относится настоящее изобретение. Используемые в данном документе термины, если явно не указано иное, следует понимать, как имеющие значения, соответствующие значениям в данном документе и в соответствующих областях техники, и не следует считать имеющими упрощенные или чрезмерно формальные значения.

[0107]

Такие термины, как первый и второй, используются для выражения различных элементов, и следует отметить, что эти элементы не ограничиваются самими этими терминами. Эти термины используются исключительно с целью отделения одного элемента от другого, и, например, можно описывать первый элемент как второй элемент, и, подобным образом, описывать второй элемент как первый элемент, без отступления от объема настоящего изобретения.

[0108]

Числовые значения, используемые в данном документе для указания содержания компонента или диапазона числовых значений и т. п., если явно не указано, следует понимать как модифицированные термином "приблизительно". Например, если явно не указано, "4°C" означает "приблизительно 4°C", и специалисты в данной области естественно смогут логично определить его степень в соответствии с техническими общими принципами и контекстом настоящего описания.

[0109]

Если четко не указано, что контекст подразумевает иное, при использовании в

описании и формуле изобретения данного документа следует учитывать, что каждый аспект, представленный в форме единственного числа также может иметь форму множественного числа, если это не является технически противоречивым, и наоборот.

[0110]

5 Далее настоящее изобретение будет подробно описано со ссылкой на примеры. Однако настоящее изобретение может быть осуществлено с помощью различных аспектов, и не должно истолковываться как ограничиваемое примерами, описываемыми в данном документе. Специалисты в соответствующей области техники смогут
10 осуществить настоящее изобретение с различными модификациями, добавлениями, делециями, заменой и т. п. без изменения сути или объема настоящего изобретения.

Примеры

[0111]

Пример 1: получение моноклонального антитела к Notch4 человека

[0112]

15 Получение мышиноного моноклонального антитела к Notch4 человека

Для получения моноклонального антитела к Notch4 человека (№ доступа в Genbank NP_004548,3) (SEQ ID NO. 1) мышей Balb/c иммунизировали тремя повторами EGF и негативным регуляторным участком (NRR) из Notch4 человека (положения 1046-1445 в SEQ ID NO. 1), слитыми с секреторной щелочной фосфатазой (SEAP) и гистиридиновой
20 меткой (далее конструкция называется "3EGF-NRR-SEAP-His Notch4 человека").

[0113]

Белок 3EGF-NRR-SEAP-His Notch4 человека получали с помощью следующих стадий: сначала конструировали вектор экспрессии pcDNA3.1-Notch4 человека-3EGF-NRR-SEAP-His. Три повтора EGF и NRR из Notch4 человека амплифицировали путем ПЦР
25 и субклонировали в сайт SfiI/NotI в pcDNA3.1 (Invitrogen/LifeTechnologies), имеющий последовательность ДНК, кодирующую сигнальную последовательность I_gk, SEAP и гистиридиновую метку. Далее вектором экспрессии pcDNA3.1-Notch4 человека-3EGF-NRR-SEAP-His трансфицировали клетки НЕК293 EBNA (Invitrogen/LifeTechnologies) с помощью TransIT-LT1 (TAKARA). Через 6 дней инкубации (5% CO₂, 37°C) собирали культуральный
30 супернатант. Белок 3EGF-NRR-SEAP-His Notch4 человека очищали с помощью колонки Protino (MACHEREY-NAGEL).

[0114]

Двадцать микрограмм указанного белка 3EGF-NRR-SEAP-His Notch4 человека смешивали с таким же количеством адьюванта GERBU (GERBU Biotechnik GmbH) и
35 подкожно вводили инъекцией мышам Balb/c в подушечки лап. Три дополнительных инъекции проводили в дни 3, 7 и 10. Мышей умерщвляли на следующий день и отбирали периферические лимфатические узлы. Половину каждого из периферических лимфатических узлов трансплантировали мышам SCID. Клетки лимфатических узлов получали из оставшейся половины каждого лимфатического узла и сливали с клетками
40 миеломы P3U1 в соотношении 5:1 в присутствии GenomeONE-CF (Ishihara Sangyo Kaisha, Ltd.). Указанные слитые клетки культивировали в 96-луночном пластиковом планшете. Через 7 дней инкубации (5% CO₂, 37°C) собирали культуральный супернатант.

[0115]

Десять микрограмм белка 3EGF-NRR-SEAP-His Notch4 человека внутривенно вводили
45 указанным мышам SCID в ходе трансплантации лимфатического узла в день трансплантации и через 6 дней после трансплантации. Через три дня после заключительной иммунизации клетки периферических лимфатических узлов отбирали, сливали, как описывается выше, и культивировали.

[0116]

Получали мышинные моноклональные антитела из 8 клонов с помощью вышеупомянутых стадий. Из них отбирали наиболее предпочтительное лидерное антитело (6-3-А6) на основании Notch4-специфической активности ингибирования сигнала и активности связывания с мышинным Notch4 и Notch4 человека.

[0117]

Анализ последовательности мышинового моноклонального антитела к Notch4 человека (6-3-А6)

Последовательность ДНК, кодирующую тяжелую и легкую цепи клона 6-3-А6, амплифицировали с помощью 5'-RACE (быстрой амплификации 5'-концов для концов кДНК). Полную РНК получали из указанной гибридомы с помощью TRIZOL (Invitrogen/LifeTechnologies) и обрабатывали с использованием ДНКазы (QIAGEN, набор ДНКаз, не содержащий РНКаз). Получали двухнитевую кДНК из указанной полной РНК с использованием набора для синтеза кДНК (TAKARA). 5'-адаптор, полученный путем отжига ad29S (ACATCACTCCGT (SEQ ID NO. 2)) и ad29AS (ACGGAGTGATGTCCGTC GACGTATCTCTGCGTTGATACTTCAGCGTAGCT (SEQ ID NO. 3)), добавляли к указанной кДНК. Полученную кДНК амплифицировали с помощью 5'-прямого праймера (праймера 5'-PCR4, AGCTACGCTGAAGTATCAACGCAGAG (SEQ ID NO. 4)), а 3' обратный праймер (GCCAGTGGATAGACTGATGG (SEQ ID NO. 5) использовали для амплификации тяжелой цепи мышинового IgG1, и GATGGATACAGTTGGTGCAGC (SEQ ID NO. 6) использовали для амплификации легкой цепи мышинового Igk). Указанную амплифицированную кДНК вставляли в вектор pCR2.1 (Invitrogen/LifeTechnologies). Последовательность гена анализировали с помощью ABI3130XL. В следующей таблице представлена аминокислотная последовательность, кодируемая последовательностью гена, идентифицированной с помощью данного анализа.

[0118]

Таблица 1. Аминокислотная последовательность мышинового антитела к Notch4 человека (6-3-А6)

Название	Последовательность
Вариабельный участок тяжелой цепи (SEQ ID NO. 7)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFSSYGMSWVRQTPDKRLELVATINSNGGRT YYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLSKSEDTAMYCARDQGFAYWGQGLTLTVSA
Вариабельный участок легкой цепи (SEQ ID NO. 8)	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVGTAVAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHTG VPDRFTGSGSGTDFLTISNVQSEDLADYFCQYSSYPWTFGGGKLEIK

[0119]

Таблица 2. Последовательность нуклеиновой кислоты мышинового антитела к Notch4 человека (6-3-А6)

Название	Последовательность
Вариабельный участок тяжелой цепи (SEQ ID NO. 9)	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTG TGCAGCCTCTGGATCACTTTCAGTAGCTATGGCATGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCAGACAAGAG GCTGGAGTTGGTCGCAACCATTAATAGTAATGGTGGTAGAACCTATTATCCAGACAGTGTGAAGG GCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACCCTGTACCTGCAAAATGAGCAGTCTGAAG TCTGAGGACACAGCCATGATTACTGTGCAAGAGACCAGGGTTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGAC TCTGGTCACTGTCTCTGCA
Вариабельный участок легкой цепи (SEQ ID NO. 10)	GACATTGTGATGACCCAGTCTCACA AATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCATCAC CTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGGTACTGCTGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGGCAATCTC CTAAACTACTGATTTACTGGGCATCCACCCGGCACACTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTG GATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATTAGCAATGTGCAGTCTGAAGACTTGGCAGATTATTCT GTCAGCAATATAGCAGCTATCCGTGGACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA

[0120]

Получение химерного антитела к Notch4 человека и гуманизированного антитела к Notch4 человека

С помощью ПЦР с перекрывающимися праймерами последовательность гена
 переменного участка тяжелой цепи 6-3-А6 связывали с последовательностью гена
 константного участка человеческого IgG2, имеющего мутации V234А и G237А, в качестве
 тяжелой цепи, а последовательность гена переменной области легкой цепи 6-3-А6
 связывали с последовательностью гена константного участка человеческого Igk в
 качестве легкой цепи для получения последовательности ДНК, кодирующей химерное
 антитело. Как используется в данном документе, "V234А" представляет собой мутацию,
 при которой валин в положении 234 заменяется аланином, и "G237А" представляет
 собой мутацию, при которой глицин в положении 237 заменяется аланином.

Последовательность, полученную в результате, встраивали в векторы экспрессии
 (pEE6.4 для тяжелой цепи и pEE12.4 для легкой цепи, Lonza). В следующих таблицах
 представлены аминокислотные и нуклеотидные последовательности химерного антитела.

[0121]

Таблица 3. Аминокислотная последовательность химерного антитела к Notch4
 человека

Название	Последовательность (вариабельный участок указан жирным шрифтом , а CDR, определяемые с помощью методики определения по Кэбату, в вариабельном участке <u>подчеркнуты</u>)
Тяжелая цепь (SEQ ID NO. 11)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSSYGM <u>SVWRQTPDKRLELVATINSNGGR</u> TYYPDSVKGR FTISRDN <u>AKNTLYLQMS</u> SLKSEDTAMUYCARDQGE <u>FAYWGQGLTVVSAASTKGPSVFLAPCSRST</u> SESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL <u>TS</u> GVHTFPAVLQSSGLYSLSSV <u>TVPSNFGTQTYTCNV</u> DHKPSNTKVDK <u>TV</u> VERKCCVECP <u>PCAPPA</u> AAPS <u>VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV</u> QFNWYVDG <u>VEVHN</u> AKTKPREEQFN <u>STFRVSVSLTVVH</u> QDWL <u>NGKEYKCKVSNKGLPAIEK</u> TISK TKGQPREPQVY <u>TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK</u> TTTPM <u>LDSDGSFF</u> LYSKLTVDKSRW <u>QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u>
Легкая цепь (SEQ ID NO. 12)	DIVMTQSHKFM <u>STSVGDRV</u> SITCKASQD <u>VGTAVA</u> WYQQKPGQSP <u>KLLIYWASTRHTGVPDR</u> FTGSG SGTDF <u>TLTISNVQSEDLADYFCQ</u> QYSSYP <u>WTFGGG</u> TKLEIK <u>R</u> TV <u>A</u> APSVF <u>FPPSDEQLKSGTASVVC</u> LLN <u>FPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK</u> D <u>STYLSL</u> S <u>TLT</u> L <u>SKADY</u> E <u>KHKVYACEVTHQ</u> GLSSP <u>VTKSFNRGEC</u>

[0122]

Таблица 4. Последовательность нуклеиновой кислоты химерного антитела к Notch4
 человека

Название	Последовательность (вариабельный участок указан жирным шрифтом)
Тяжелая цепь (SEQ ID NO. 13)	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAGCTATGGCATGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCAGACAAG AGGCTGGAGTTGGTCGCAACCATTAATAGTAATGGTGGTAGAACCTATTATCCAGACAGTGTGA AGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACAACCCCTGACCTGCAAAATGAGCAGTCT GAAGTCTGAGGACACAGCCATGTATTACTGTGCAAGAGACCAGGGTTTTGCTTACTGGGGCCAA GGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCAGCTAGCACAAAAGGCCCTCTGTCTTCCCTCTGGCTCCCTG CTCCGCTCCACCTCCGAGTCCACTGCGCTCTGGGCTGTCTGGTCAAGGATTACTTCCCTGAGC CAGTCACTGTGAGTTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGAGTCCACACATTTCCCGCTGTGCT GCAGAGCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCTAGTGTGGTCAACCGTCCCTCAAGCAATTCGGGACTC AGACCTATACATGCAACGTGGACCATAAGCCATCTAATACTAAGGTCGATAAAACCGTGGAGC GAAAATGCTGCGTGGAATGCCACCTTGTCTCTGCTCCACCAGCCGCTGCACCAAGCGTGTTCCT GTTTCTCCAAAGCCCAAAGACACACTGATGATCAGCAGAACTCCTGAGGTCACCTGCGTGGTC GTGGACGTGTCCACGAGGATCCGGAAGTCCAGTTAACTGGTACGTGGATGGGGTCCGAAGTGC ATAATGCAAAGACTAAACCTCGGGAGGAACAGTTCAACTCTACCTTTAGAGTCTGTAGTGTGCT GACAGTCTGCACCAGGACTGGCTGACGGAAAGGAGTATAAGTGCAAAGTGTCTAATAAGGG CCTGCCCGCCCTATCGAGAAAACAATTAGTAAGACTAAAGGCCAGCCAAGGGAACCCAGGT GTACACACTGCCCCCTAGTCGCGAGGAAATGACAAAAGAACAGGTCTCACTGACTTGTCTGGTG AAAGGGTTCTATCCATCCGACATTCGCCGTGGAGTGGGAATCTAATGGACAGCCCGAAAACAATT ACAAGACCACACCCATGCTGGACAGCGATGGATCCTTCTTTCTGTATTCAAAGCTGACCGT GGATAAAAGCCGGTGGCAGCAGGCAATGCTTTTCTGCTGTGTGATGCACGAAGCCCTGCAC AACCTACACTCAGAAGTCCCTGTCTCCCTGTCTGTCGCAATGA
Легкая цепь (SEQ ID NO. 14)	GACATTGTGATGACCCAGTCTCACAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCA G <u>ATCA</u> CCTGCAAGGCCAGTCAAGGATGTGGGTA <u>CTGCTGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGGCAATC</u> TCCTAAACTACTGATTACTGGGCATCCACCCGGCACACTGGAGTCCCTGATCGCTTCA AGGCA GTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATTAGCAATGTGCAGTCTGAAAGACTTGGCAGATTA TTTCTGTCAAGCAATATAGCAGTATCCGTGGACGTTCCGGTGGAGGCCAAGGCTGGAATCAAAAC GTACGTCGCGCCCTCCGTGTTATTTTTCTCCATCTGACGAACAGCTGAAGAGTGGGACC GCCTCCGTGGTGTGCTGTGACAAATTTCTACCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAAGTGC ACAACGCTCTGCAGTCTGGCAATAGTCAGGAGTCAGTGACTGAACAGGACAGCAAGGATTC CAATTTCTGTAGCTCCACCCTGACACTGAGCAAAGCAGATTACGAAAAGCACAAAGTCTATGC CTGCGAAGTGACCCACCAGGGGCTGAGCAGTCCAGTACCAAGTCTTTAACAGGGGAGAGTG TTGA

[0123]

Антитело гуманизировали путем трансплантации CDR из мышинового антитела 6-3-А6 в переменный участок человеческого антитела. Аминокислотную последовательность мышинового антитела 6-3-А6 нумеровали согласно системе нумерации по Кэбату с использованием программного обеспечения Abysis (лицензированного UCL) и на основании этой нумерации указанную CDR определяли согласно методу определения по Кэбату или методу определения AbM для идентификации CDR. В следующих таблицах представлены аминокислотные и нуклеотидные последовательности CDR 6-3-А6.

[0124]

Таблица 5. Аминокислотная последовательность CDR 6-3-А6

Название	Последовательность
CDR 1 тяжелой цепи (определение по Кэбату) (SEQ ID NO. 15)	SYGMS
CDR 1 тяжелой цепи (Определение по AbM) (SEQ ID NO. 16)	GFTFSSYGMS
CDR 2 тяжелой цепи (определение по Кэбату) (SEQ ID NO. 17)	TINSNGGRITYYPDSVKG
CDR 2 тяжелой цепи (определение по AbM) (SEQ ID NO. 18)	TINSNGGRITY
CDR 3 тяжелой цепи (SEQ ID NO. 19)	DQGFAY
CDR 1 легкой цепи (SEQ ID NO. 20)	KASQDVGTAVA
CDR 2 легкой цепи (SEQ ID NO. 21)	WASTRHT
CDR 3 легкой цепи (SEQ ID NO. 22)	QQYSSYPWT

[0125]

Таблица 6. Последовательность нуклеиновой кислоты CDR 6-3-А6

Название	Последовательность
CDR 1 тяжелой цепи (определение по Кэбату) (SEQ ID NO. 23)	AGCTATGGCATGTCT
CDR 1 тяжелой цепи (определение по AbM) (SEQ ID NO. 24)	GGATTCACTTTTCAGTAGCTATGGCATGTCT
CDR 2 тяжелой цепи (определение по Кэбату) (SEQ ID NO. 25)	ACCATTAATAGTAATGGTGGTAGAACCTATTATCCAGACAGTGTGAAGGGC
CDR 2 тяжелой цепи (определение по AbM) (SEQ ID NO. 26)	ACCATTAATAGTAATGGTGGTAGAACCTAT
CDR 3 тяжелой цепи (SEQ ID NO. 27)	GACCAGGGTTTTGCTTAC
CDR 1 легкой цепи (SEQ ID NO. 28)	AAGGCCAGTCAGGATGTGGGTACTGCTGTAGCC
CDR 2 легкой цепи (SEQ ID NO. 29)	TGGGCATCCACCCGGCACACT
CDR 3 легкой цепи (SEQ ID NO. 30)	CAGCAATATAGCAGCTATCCGTGGACG

[0126]

На основании гомологии высокой степени с каркасным участком (FR) в 6-3-А6 FR человеческого антитела, IGKV1-27*1 или IGKV3-15*1 и JK1 для легкой цепи, и IGHV3-64*01 и JH4 для тяжелой цепи выбирали в качестве FR гуманизированного антитела.

Затем прогностическую модель 3D-структуры мышинового 6-3-А6 использовали для прогнозирования аминокислоты в FR, которая взаимодействует с аминокислотой в CDR и трансплантируется вместе с CDR. Константный участок человеческого IgG2 с мутациями V234A и G237A и с С-концевым остатком лизина или без него, а также человеческий Igκ использовали в качестве константного участка тяжелой и легкой цепей. НК1, НК2 и НК3 конструировали в виде тяжелой цепи гуманизированного антитела, в которое трансплантировали CDR, определенную согласно методу определения по Кэбату, HA1 и HA2 конструировали в виде тяжелой цепи гуманизированного антитела, в которое трансплантировали CDR, определенную согласно методу определения AbM, L1, L2 и L5 конструировали в виде легкой цепи гуманизированного антитела, в котором использовали IGKV1-27*1 и JK1, а L3, L4 и L6 конструировали в виде легкой цепи гуманизированного антитела, в котором использовали IGKV3-15*1 и JK1. В следующих таблицах представлены аминокислотные и нуклеотидные последовательности переменного участка гуманизированного антитела, константного участка человеческого IgG2 с мутациями V234A и G237A и с С-концевым остатком лизина или без него, а также человеческого Igκ.

[0127]

Таблица 7

Аминокислотная последовательность и последовательность нуклеиновой кислоты переменного участка тяжелой цепи гуманизированного антитела к Notch4 человека (НК1)

Название	Последовательность (CDR, определяемые в соответствии с методом определения по Кэбату, подчеркнуты)
Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO. 31)	EVQIVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMSWVRQAPGKGLYVSTINSNGGRITYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMGSLRAEDMAVYYCARDQGFAYWGQGLTLTVSS
Последовательность нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO. 32)	GAGGTGCAGCTGGTTCGAGAGCGGAGGGGGCTGGTGCAGCCAGGAGGGTCTCTGAGGCTGAGTTGCGCCGCTTCAGGCTTCACCTTCAGCTCCTACGGGATGTCTTGGGTGCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGACTGGAGTATGTCAGCACCATCAACTCCAATGGAGGCCGAACATACTATCCTGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACATATCTCTAGAGATAACAGTAAGAACACCCTGTACTGCAGATGGGCAGCCTGAGAGCAGAAGACATGGCCGTCTACTATTGTGCAAAGGGATCAGGGATTCGCATACTGGGGACAGGGAACTCTGGTGACCGTCTCAAGC

[0128]

Таблица 8

Аминокислотная последовательность и последовательность нуклеиновой кислоты переменного участка тяжелой цепи гуманизированного антитела к Notch4 человека (НК2)

Название	Последовательность (CDR, определяемые в соответствии с методом определения по Кэбату, подчеркнуты)
Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO. 33)	EVQIVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMSWVRQAPGKGLYVSTINSNGGRITYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMGSLRAEDMAVYYCARDQGFAYWGQGLTLTVSS
Последовательность нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO. 34)	GAAGTGCAGCTGGTTCGAGAGCGGGGAGGGCTGGTGCAGCCAGGAGGGTCTCTGAGGCTGAGTTGCGCCGCTTCAGGCTTCACCTTCAGCTCCTACGGGATGTCTTGGGTGCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGACTGGAGCTGGTCAGCACCATCAACTCCAATGGAGGCCGAACATACTATCCTGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACATATCTCTAGAGATAACAGTAAGAACACCCTGTACTGCAGATGGGCAGCCTGAGAGCAGAAGACATGGCCGTCTACTATTGTGCCCCGAGATCAAGGGTTCGCTTATTGGGGACAGGGGACACTGGTGACCGTGAGCAGC

[0129]

Таблица 9

Аминокислотная последовательность и последовательность нуклеиновой кислоты переменного участка тяжелой цепи гуманизированного антитела к Notch4 человека (НК3)

Название	последовательности (CDR, определяемые в соответствии с методом определения Кэбата, <u>подчеркнуты</u>)
Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO. 35)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMSWVRQAPGKGLEIVATINSNGGRTYYPDSVKGR FTISRDN SKNTLYLQMGSLKAEDMAVYYCARDQGEAYWGQGLTVTVSS
5 Последовательность нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO. 36)	GAAGTGCAGCTGGTTCGAGAGTGGGGGAGGCCTGGTGCAGCCAGGAGGGTCTCTGAGGCT GAGTTGCGCCGCTTCAGGCTTCACCTTCAGCTCCTACGGGATGTCCTGGGTGCGCCAGGCT CCAGGAAAGGACTGGAGCTGGTTCGCCACCATCAACTCTAATGGAGGCCGAACATACTAT CCTGACAGTGTGAAGGGCCGGTTCATATTAGCAGAGATAACTCCAAAAATACCTGTAT CTGCAGATGGGCAGCCTGAAGGCAGAAGACATGGCCGTCTACTATTGTGCTC GGGATCAGGGGTTTCGCCTATTGGGGGCAGGGGACTCTGGTCACTGTCTCTCC

[0130]

Таблица 10

Аминокислотная последовательность и последовательность нуклеиновой кислоты
вариабельного участка тяжелой цепи гуманизированного антитела к Notch4 человека
(HA1)

Название	Последовательность (CDR, определяемые в соответствии с методом определения AbM, <u>подчеркнуты</u>)
15 Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO. 37)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMSWVRQAPGKGL EYVSTINSNGGRTYYANS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMGSLRAEDMAVYYCARDQGEAYWGQGLTVTVSS
20 Последовательность нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO. 38)	GAAGTGCAGCTGGTTCGAATCTGGGGGGGGACTGGTGCAGCCAGGAGGGTCTCTGAGGCTGA GTTGCGCCGCTTCAGGCTTCACCTTCAGCTCCTACGGGATGTCCTGGGTGCGCCAGGCTCCT GGGAAGGACTGGAGTATGTCAGCACCATCAACTCCAATGGAGGCCGAACATACTATGCCA ACTCCGTGAAGGGCCGGTTCATCTCTAGAGACAACAGTAAGAACACCCTGTACCTGCA GATGGGCAGCCTGAGAGCAGAAGATATGGCCGTCTACTATTGTGCTC GGGATCAGGGCTTTGCTTATTGGGGACAGGGGACACTGGTCACCGTCTCTCCTC

[0131]

Таблица 11

Аминокислотная последовательность и последовательность нуклеиновой кислоты
вариабельного участка тяжелой цепи гуманизированного антитела к Notch4 человека
(HA2)

Название	Последовательность (CDR, определяемые в соответствии с методом определения AbM, <u>подчеркнуты</u>)
30 Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO. 39)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMSWVRQAPGKGLEIVSTINSNGGRTYYANSVKGR FTISRDN SKNTLYLQMGSLRAEDMAVYYCARDQGEAYWGQGLTVTVSS
Последовательность нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO. 40)	GAGGTGCAGCTGGTTCGAATCCGGGGGGGGCTGGTGCAGCCAGGAGGGTCTCTGAGGCTGA GTTGCGCCGCTTCAGGCTTCACCTTCAGCTCCTACGGGATGTCCTGGGTGCGCCAGGCTCCT GGGAAGGACTGGAGCTGGTTCAGCACCATCAACTCCAATGGAGGCCGAACATACTATGCCA ACTCCGTGAAGGGCCGGTTCATCTCTAGAGACAACAGTAAGAACACCCTGTATCTGCA GATGGGCAGCCTGAGAGCAGAAGATATGGCCGTCTACTATTGTGCTC GGGATCAGGGCTTCGCCTACTGGGGGCAGGGAACACTGGTCACCGTCTCTCCTCA

[0132]

Таблица 12

Аминокислотная последовательность и последовательность нуклеиновой кислоты
вариабельного участка легкой цепи гуманизированного антитела к Notch4 человека
(L1)

Название	Последовательность (CDR, определяемые в соответствии с методом определения по Кэбату, <u>подчеркнуты</u>)
45 Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO. 41)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDVTAVAWYQQKPKPKLLIYWASTRHTGVPSRFSG SGSGTDFLTITSSLPEDVATYYCQQYSSYPWTFGQGTKVEIK
Последовательность нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO. 42)	GACATTCAGATGACACAGAGCCCTTATCTCTGAGTGCATCAGTGGGAGACAGGGTCA TCACATGCAAAGCCAGCCAGGATGTGGGAACCGCAGTCGCTTGGTACCAGCAGAAGCCCGG GAAAGTGCCTAAGCTGCTGATCTACTGGGCTAGTACCGGCACACTGGCGTCCCATCCAGA TTCAGCGGCTCCGGGTCTGGAACCGACTTFACTCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCCGAGGA TGTGGCCACATACTATT GCCAGCAGTATTCATCTTATCCTTGGACCTTCGGACAGGGAACAAAAGTGGAAATCAAA

[0133]

Таблица 13

Аминокислотная последовательность и последовательность нуклеиновой кислоты
вариабельного участка легкой цепи гуманизированного антитела к Notch4 человека
(L2)

5

Название	Последовательность (CDR, определяемые в соответствии с методом определения по Кэбату, подчеркнуты)
Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO. 43)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCKASQDVGTAVAWYQOKPGKVPKLLIYWASTRHTGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPEDVATYFCQQYSSYPWTFGQGTKVEIK
Последовательность нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO. 44)	GATATTCAGATGACTCAGAGCCCCTCCTCTCTGAGTGCATCAGTGGGAGACAGGGTCACCA TCACATGCAAAGCCAGCCAGGATGTGGGAACCGCAGTCGCTTGGTACCAGCAGAAAGCCCGG GAAAGTGCCTAAGCTGCTGATCTACTGGGCTAGTACACGGCACACTGGCGTCCCATCCAGA TTCAGCGGCTCCGGGTCTGGAACCGACTTACTCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCCGAGGA TGTGGCCACATACTTCT GCCAGCAGTATTCATCCTATCCTTGGACCTTCGGACAGGGAACAAAGTGGAGATTAAG

10

[0134]

Таблица 14

Аминокислотная последовательность и последовательность нуклеиновой кислоты
вариабельного участка легкой цепи гуманизированного антитела к Notch4 человека
(L3)

15

Название	Последовательность (CDR, определяемые в соответствии с методом определения по Кэбату, подчеркнуты)
Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO. 45)	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQDVGTAVAWYQOKPGQAPRLLIYWASTRHTGIPARFSG SGSGTEFTLTISSLQSEDFAWYFCQQYSSYPWTFGQGTKVEIK
Последовательность нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO. 46)	GAAATTGTGATGACCCAGTCTCCC GCCACTGTCTGTGAGTCCAGGAGAGAGGGCAACTC TGCTTTGCAAGGCCAGTCAGGACGTGGGAACCGCAGTCGCTTGGTACCAGCAGAAACCCGG GCAGGCTCCTCGGCTGCTGATCTATTGGGCATCCACTCGGCACACCGGCATTCCCAGGAT TCTCAGGCAGCGGTCGGGAACAGAGTTTACCCTGACAATCAGCTCCCTGCAGAGCGAAGA TTTCGCTGTCTACTATT GCCAGCAGTATCTAGTTATCCTTGGACATTCGGCCAGGGAACAAAAGTGGAAATCAAA

20

25

[0135]

Таблица 15

Аминокислотная последовательность и последовательность нуклеиновой кислоты
вариабельного участка легкой цепи гуманизированного антитела к Notch4 человека
(L4)

30

Название	Последовательность (CDR, определяемые в соответствии с методом определения по Кэбату, подчеркнуты)
Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO. 47)	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQDVGTAVAWYQOKPGQAPRLLIYWASTRHTGIPARFSG SGSGTEFTLTISSLQSEDFAWYFCQQYSSYPWTFGQGTKVEIK
Последовательность нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO. 48)	GAAATCGTGATGACCCAGAGCCCCGCAACACTGTCTGTGAGTCCAGGAGAGAGGGCAACTC TGCTTTGCAAGGCCAGTCAGGACGTGGGAACCGCAGTCGCTTGGTACCAGCAGAAACCCGG GCAGGCTCCTCGGCTGCTGATCTATTGGGCATCCACTCGGCACACCGGCATTCCCAGGAT TCTCAGGCAGCGGTCGGGAACAGAGTTTACCCTGACAATCAGCTCCCTGCAGAGCGAAGA TTTCGCTGTCTACTTTT GCCAGCAGTATTCATCCTATCCTTGGACCTTCGGACAGGGAACAAAAGTGGAAATCAAA

35

40

[0136]

Таблица 16

Аминокислотная последовательность и последовательность нуклеиновой кислоты
вариабельного участка легкой цепи гуманизированного антитела к Notch4 человека
(L5)

45

Название	Последовательность (CDR, определяемые в соответствии с методом определения по Кэбату, подчеркнуты)
Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO. 49)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCKASQDVGTAVAWYQOKPGKSPKLLIYWASTRHTGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPEDVATYFCQQYSSYPWTFGQGTKVEIK

Последовательность нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO. 50)	GATATCCAGATGACCCAGTCCCCAAGCTCCCTGTCCGCATCTGTGGGCGACCGGGTACC ATTACATGTAAAGCCAGTCAGGATGTGGGAACAGCCGTCGCTTGGTACCAGCAGAAGCCC GGCAAATCTCCTAAGCTGTGTATCTATTGGGCTTCCACACGGCACACTGGCGTGCCTCTA GATTCAGTGGCTCAGGGAGCGGAACAGACTTACTCTGACATTTCTAGTCTGCAGCCAG AGGATGTGGCAACTACTTCT GCCAGCAGTACTCAAGCTATCCCTGGACCTTTGGCCAGGGGACAAAAGTCGAAATCAAG
--	--

5 [0137]

Таблица 17

Аминокислотная последовательность и последовательность нуклеиновой кислоты
вариабельного участка легкой цепи гуманизированного антитела к Notch4 человека
(L6)

10

Название	Последовательность (CDR, определяемые в соответствии с методом определения по Кэбату, подчеркнуты)
Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO. 51)	EIVMTQSPATLSVSPGERATL SCKASQDVTAVAWY QQKPGQSPRLLIYWASTRHTGIPARFSG SGSGTEFTLTISLSQSEDFAVYFCQQYSSYPWTFGQGTKVEIK
Последовательность нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO. 52)	GAAATCGTGATGACCCAGAGCCCCGCAACACTGTCTGTGAGTCCAGGAGAGAGGGCAACTC TGTCTTGCAAGGCCAGTCAGGACGTGGGAACCGCAGTCGCTTGGTACCAGCAGAAACCCGG GCAGTCTCCTCGGCTGCTGATCTATTGGGCATCCACTCGGCACACCGGCATTCGCCCGCAGAT TCTCAGGCAGCGGTCCGGAACAGAGTTTACCCTGACAATCAGCTCCCTGCAGAGCGAAGA TTTCGCTGTCTACTTTT GCCAGCAGTATTCATCCTATCCTTGGACCTTCGGACAGGGAACAAAAGTGAAATCAAA

15

[0138]

Таблица 18

Аминокислотная последовательность и последовательность нуклеиновой кислоты
константного участка человеческого IgG2 с мутациями V234A и G237A и С-концевым
ЛИЗИНОМ

20

Название	Последовательность
Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO. 53)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTEFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTKVERKCCVECPCCPAPPAAPSFLFPPKPKDNL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSFLTVVHQDW LNGKEYKCKVSNKGLPAIEKTIKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSHFLYSLKLVTKSRWQKGNVFSCSVMHREALHNYTQKS LSLSPGK
Последовательность нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO. 54)	GCTAGCACAAAAGGCCCTCTGTCTTCCCTCTGGCTCCCTGCTCCCGCTCCACCTCCGAGTC CACTGCCGCTCTGGGCTGTCTGGTCAAGGATTACTTCCCTGAGCCAGTCACTGTGAGTTGGA ACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGAGTCCACACATTTCCCGCTGTGCTGCAGAGCTCCGGCCTG TACTCCCTGTCTAGTGTGGTCAACGTCCTTCAAGCAATTTCCGGACTCAGACCTATACATG CAACGTGGACCATAAGCCATCTAATACTAAGGTCGATAAAAACCGTGGAGCGAAAATGCTGC GTGGAATGCCACCTTGTCTGCTCCACCAGCCGCTGCACCAAGCGTGTCTCTGTTTCTCC AAAGCCCAAAGACACTGATGATCAGCAGAACTCCTGAGGTCACTGCGTGTCTGTTGAC GTGTCCACGAGGATCCCGAAGTCCAGTTTAACTGGTACGTGGATGGGGTTCGAAGTGCATA ATGCAAAGACTAAACCTCGGGAGGAACAGTTCAACTCTACCTTTAGAGTCGTGAGTGTCT GACAGTCGTGCACCAGGACTGGCTGACGGAAAGGAGTATAAGTGCAAAAGTGTCTAATAAG GGCTGCCCGCCCTATCGAGAAAACAATTAGTAAGACTAAAGGCCAGCCAAGGGAACCCC AGGTGTACACACTGCCCCCTAGTTCGCGAGGAAATGACAAAAGAACCAGGTCTCACTGACTTG TCTGGTGAAAGGGTTCTATCCATCCGACATTGCCGTGGAGTGGGAATCTAATGGACAGCCC GAAAACAATTACAAGACCACACCACCCATGCTGGACAGCGATGATCCTTCTTCTGTATTG AAAGCTGACCGTGGATAAAAGCCGGTGGCAGCAGGCAATGTCTTTTCTGCTCTGTGATG CACGAAGCCCTGCACAACCACTACTCAGAAAGTCCCTGTCCCTGTCTCTGGCAAATGA

25

30

35

[0139]

Таблица 19

Аминокислотная последовательность и последовательность нуклеиновой кислоты
константного участка человеческого IgG2 с мутациями V234A и G237A и без С-концевого
ЛИЗИНА

40

Название	Последовательность
Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO. 55)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTEFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTKVERKCCVECPCCPAPPAAPSFLFPPKPKDNL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSFLTVVHQDW LNGKEYKCKVSNKGLPAIEKTIKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSHFLYSLKLVTKSRWQKGNVFSCSVMHREALHNYTQKS LSLSPG

45

5	Последовательность нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO. 56)	GCTAGCACAAAAGGCCCTCTGTCTTCCCTCTGGCTCCCTGCTCCCGCTCCACCTCCGAGTCACTGCCGCTCTGGGCTGTCTGGTCAAGGATTACTTCCCTGAGCCAGTCACTGTGAGTTGGA ACTCAGGCGCCTGACCAGCGGAGTCCACACATTTCCCGCTGTGCTGCAGAGCTCCGGCCTG TACTCCCTGTCTAGTGTGGTCCACCGTGCCTTCAAGCAATTTCCGGGACTCAGACCTATACATG CAACGTGGACCATAAGCCATCTAATACTAAGGTCGATAAAAACCGTGGAGCGAAAATGCTGC GTGGAATGCCACCTTGTCTGCTCCACCAGCCGCTGCACCAAGCGTGTCTCTGTTTCTCC AAAGCCCAAAGACACACTGATGATCAGCAGAACTCTGAGGTCACCTGCGTGGTCTGCTGGAC GTGTCCCACGAGGATCCCGAAGTCCAGTTTAACTGGTACGTGGATGGGGTGAAGTGCATA ATGCAAAGACTAAACCTCGGGAGGAACAGTTCAACTCTACCTTTAGAGTCGTGAGTGTGCT GACAGTCGTGCACCAGGACTGGCTGAACGAAAGGAGTATAAGTGCAAAGTGTCTAATAAG GGCTGCCCGCCCTATCGAGAAAACAATTAGTAAGACTAAAGGCCAGCCAAGGGAACCCC AGGTGTACACACTGCCCCCTAGTTCGCGAGGAAATGACAAAGAACCAGGTCTCACTGACTTG TCTGGTGAAGGGTCTATCCATCCGACATTGCCGTGGAGTGGGAATCTAATGGACAGCCC GAAAACAATTACAAGACCACACCACCCATGCTGGACAGCGATGGATCCTTCTTTCTGTATT AAAGCTGACCGTGGATAAAAAGCCGTTGGCAGCAGGGCAATGCTTTTCTGCTCTGTGATG CACGAAGCCCTGCACAACCACTACTCAGAAGTCCCTGTCCCTGTCTCCTGGCTGA
---	--	---

[0140]

Таблица 20

Аминокислотная последовательность и последовательность нуклеиновой кислоты константного участка человеческого Igk

Название	Последовательность
15 Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO. 57)	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
20 Последовательность нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO. 58)	CGTACGGTCGCGCCCTCCGTGTTTATTTTCTCCATCTGACGAACAGCTGAAGAGTGG GACCGCCTCCGTGGTGTGCCTGCTGAACAATTTCTACCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGG AAAGTCGACAACGCTCTGCAGTCTGGCAATAGTCAGGAGTCAGTACTGAACAGGACAGCA AGGATTCCACCTATTCTCTGAGCTCCACCCTGACACTGAGCAAAGCAGATTACGAAAAGCA CAAAGTCTATGCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGGCTGAGCAGTCCAGTGACCAAGTCCCTT AACAGGGGAGAGTGTGA

[0141]

Последовательности гена варибельного участка этих гуманизированных антител синтезировали с помощью GenScript USA Inc. и встраивали в константный участок человеческого IgG2 с или без C-концевого лизина или pcDNA3.3 (Invitrogen), содержащего последовательность ДНК, кодирующую константный участок человеческого Igk. Указанными векторами экспрессии трансфицировали клетки FreeStyle 293-F (Invitrogen) с использованием системы экспрессии FreeStyle 293 (Invitrogen) для получения антител. Супернатант собирали и очищали с помощью белка А (GE Healthcare).

[0142]

Полноразмерные (варибельный участок+константный участок) последовательности гена гуманизированных антител оптимизировали подобным образом, полностью синтезировали с помощью GenScript USA Inc. и встраивали тяжелую цепь в pEE6.4, а легкую цепь в pEE12.4 (Lonza). Эти векторы экспрессии использовали, как описывается выше, для получения антител. Оптимизированные нуклеотидные последовательности гуманизированных антител представлены в следующих таблицах.

[0143]

Таблица 21

Оптимизированная последовательность нуклеиновой кислоты тяжелой цепи гуманизированного антитела к Notch4 человека (варибельный участок НК2+ константный участок человеческого IgG2 с мутациями V234A и G237A и без C-концевого лизина)

Название	Последовательность
45 Последовательность нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO. 59)	GAAGTGCAGCTGGTTCGAATCTGGGGGGGGTCTGGTGCAGCCAGGCGGATCCCTGAGACTGA GCTGCGCCGCTTCTGGGTTACATTTTCCAGTACGGCATGTCTGGGTCCGCCAGGCTCCA GGCAAAGGACTGGAGCTGGTGAGTACAATCAACTCAAATGGGGGTCGAACCTACTATCCCG ACTCCGTGAAGGGCAGGTTCACTATTTCCCGGGATAACAGCAAAAATACCCTGTACCTGCA GATGGGGTCCCTGCGAGCTGAAGACATGGCAGTGTACTATTGTGCCCGTGTATCAGGGTTTCG CTTATTGGGGCAGGGTACTCTGGTACCCTGTCTAGTGTCTTACCAAGGGACCATCCGTG TTCCCACTGGCACCATGCTCCCGGAGCACATCTGAGAGTACTGCAGCCCTGGGCTGTCTGGT

	GAAGGACTATTTCCCTGAACACAGTCACAGTGAGCTGGAACCTCTGGCGCACTGACAAGCGGA GTCCACACTTTTCTGCGCGTGTGCAGTCATCCGGCCTGTACTCTCTGAGCTCTGTGGTCACT GTCCCCAGTTCAAATTTCCGGAACCTCAGACCTATACATGCAACGTGGACCATAAGCCTAGCA ATACCAAGGTCGATAAAAACAGTGGAGCGTAAATGCTGCGTGGAAATGCCACCTTGCCAGC ACCACCAGCTGCAGCCCCCTCCGTGTTCTGTTTCTCCAAAGCCAAAAGACACCCTGATGA TCTCTAGAACCCCGAGGTCACATGCGTGGTCTGGACGTGAGTCACGAGGATCCTGAAGT CCAGTTAACTGGTACGTGGATGGCGTCAAGTGCATAATGCCAAGACAAAACCAAGAGAG GAACAGTTCAACTCAACCTTTCGCGTCTGTCCGTGCTGACAGTCTGCACCAGGATGGCT GAACGGCAAGGAGTATAAGTGCAAAGTGTCCAATAAGGGACTGCCCGCTCCTATCGAGAAA ACTATTTCCAAGACCAAAGGACAGCCTAGGGAACCACAGGTGTACTCTGCCCCCTTCCC GGGAGGAAATGACTAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGTTCTATCCTAG TGACATTGCCGTGGAGTGGGAATCAAATGGTCAGCCAGAGAACAATTACAAGACCACACCA CCCATGCTGGACAGTGATGGCTCATTCTTTCTGTATAGCAAGCTGACCCTCGATAAATCTAG GTGGCAGCAGGGAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAAGCACTGCACAACCATTAC ACCAGAAATCCCTGAGCCTGTCCCCGGCTGA
--	--

5

10

[0144]

Таблица 22

Оптимизированная последовательность нуклеиновой кислоты тяжелой цепи гуманизированного антитела к Notch4 человека (вариабельный участок НК3+ константный участок человеческого IgG2 с мутациями V234A и G237A и без С-концевого лизина)

15

Название	Последовательность
Последовательность нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO. 60)	GAGGTGCAGCTGGTCGAGTCCGGGGGGGGTCTGGTGCAGCCAGGAGGATCCCTGAGGCT GAGCTGCGCCGCTTCTGGGTTACATTTTCCAGCTACGGCATGTCCTGGGTCCGGCAGGCA CCAGGCAAGGGACTGGAGCTGGTGGCCACAATCAACAGTAATGGGGGTAGAACTTACTA TCCCAGCTCAGTGAAGGGCAGGTTCACTATTAGTCGGGATAACTCAAAAAATACCTGTA CCTGCAGATGGGGTCCCTGAAGGCTGAAGACATGGCAGTGTACTATTGTGCCCGCGATCA GGGTTTTCGCTTATTGGGGGCGAGGTTACTCTGGTCAACCGTGTCTAGTGCCTCCACCAAAGGG CCCAGCGTGTTCCTGCTCCCTGCTCCCGAAGCACATCTGAGAGTACTGCAGCCCTGG GCTGTCTGGTGAAGGACTATTTCCCTGAACACAGTCACAGTGAGCTGGAACCTCTGGCGCT GACATCTGGAGTCCACACTTTTCTGCACTGTCAGTGCAGTCACTCCGGCCTGTACTCCTGAGC TCTGTGGTCACTGTCCCAAGTTCAAATTTCCGGAACCTCAGACCTATACATGCAACGTGGACC ATAAACCTAGCAATACCAAGGTGATAAAAACAGTGGAGCGGAAGTGTGTGGAATGC CCACCTTGTCCAGCTCCACCAGCTGCAGCCCCCTTCTGTGTTCTGTTTCTCCAAAGCCAA AAGACACCCTGATGATCAGCAGGACCCCGAGGTCACATGTGTGTCGTGGACGTGTCTC ACGAGGATCCTGAAAGTCCAGTTAACTGGTACGTGGATGGCGTCAAGTGCATAATGCAA AGACAAAACCAAGAGAGGAACAGTTCAACTTACCTTTCGCGTCTGAGTGTGCTGACAG TCGTGCACCAGGATTTGGCTGAACGGCAAGGAGTATAAGTGCAAAGTGTCCAATAAGGGA CTGCCCGCCCCTATCGAGAAAACCTATTAGCAAGACCAAAGGACAGCCTCGAGAACCACAG GTGTACACTCTGCCCCCTAGTCTGTGAGGAAATGACTAAGAACCAGGTTCCCTGACCTGT TGGTGAAGGGTTCTATCCTAGCGACATGCGGTGGAGTGGGAATCTAATGGTCAGCCAG AGAACAAATACAAGACCACACCACCCATGCTGGACAGTGATGGCTCATTCTTTCTGTATT AAAGCTGACCCTCGATAAATCCAGGTGGCAGCAGGGAATGTGTTTTCATGCTCCCGTGT GCACGAAGCCCTGCACAACCATTACACCCAGAAGAGCCTGTCCCTGAGCCCCGGCTGA

20

25

30

[0145]

Таблица 23

Оптимизированная последовательность нуклеиновой кислоты тяжелой цепи гуманизированного антитела к Notch4 человека (вариабельный участок НА2+ константный участок человеческого IgG2 с мутациями V234A и G237A и без С-концевого лизина)

35

Название	Последовательность
Последовательность нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO. 61)	GAAGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGGGGGGGGGTGGTGCAGCCTGGCGGATCCCTGAGACTGA GCTGCGCCGCTTCTGGGTTACATTTTCCAGCTACGGCATGTCCTGGGTCCGCCAGGCACCA GGCAAGGGACTGGAGCTGGTGAAGTACAATCAACTCAAAATGGGGGTGCAACTTACTATGCTA ACTCCGTGAAGGGCAGGTTCACTATTTCCTGGGACAACAGCAAAAATACCTGTACTGCA GATGGGGTCCCTGCGAGCTGAAGACATGGCAGTGTACTATTGTGCCCGTGTACAGGGTTTCG CTTATTGGGGGCGAGGTTACTCTGGTCAACCGTGTCTAGTGTCTTACCAAGGGGCCAGTGTG TTTCCACTGGCACCCCTGCTCCCGAGCACATCTGAGAGTACTGCAGCCTGGGGCTGTGGT GAAGGATTATTTCCCTGAACACAGTCACAGTGAGCTGGAACCTCTGGCGCACTGACAAGCGGA GTCCACACTTTTCTGCGCGTGTGCAGTCATCCGGCCTGTACTCTCTGAGCTCTGTGGTCACT GTCCCCAGTTCAAATTTCCGGAACCTCAGACCTATACATGCAACGTGGACCATAAGCCTAGCA ATACCAAGGTCGATAAAAACAGTGGAGCGTAAATGCTGTGTGGAATGCCACCTTGCCAGC TCCACCAGCTGCAGCCCCCTTCTGTGTTCTGTTTCTCCAAAGCCAAAAGACACCCTGATGA TCTCTAGAACCCCGAGGTCACATGTGTGGTCTGGACGTGAGTCACGAGGATCCAGAAGT CCAGTTAACTGGTACGTGGATGGCGTCAAGTGCATAAATGCAAAGACAAAACCCAGAGAG GAACAGTTCAACTCAACCTTTCGCGTCTGTCCGTGCTGACAGTCTGTGCACCAGGATGGCT GAACGGCAAGGAGTATAAGTGCAAAGTGTCCAATAAGGGACTGCCCGCCCCTATCGAGAAA ACTATTTCCAAGACCAAAGGACAGCCTAGGGAACCACAGGTGTACTCTGCCCTTCCCCTTCCC GGGAGGAAATGACTAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGTTCTATCCTAG

40

45

	TGACATTGCCGTGGAGTGGGAATCAAATGGTCAGCCAGAGACAATTACAAGACCACACCA CCCATGCTGGACAGTGATGGCTCATTCTTTCTGTATAGCAAGCTGACCGTCGATAAATCTAG GTGGCAGCAGGGAAATGTGTTTTTCATGCTCCGTGATGCACGAAGCCCTGCACAACCACTAC ACACAGAAAAGCCTGAGCCTGAGCCCCGGCTGA
--	---

[0146]

5 Таблица 24

Оптимизированная последовательность нуклеиновой кислоты легкой цепи гуманизированного антитела к Notch4 человека (вариабельный участок L3+константный участок человеческого Igk)

10	Название	Последовательность
15	Последовательность нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO. 62)	GAAATCGTGATGACTCAGTCCCCCGCTACACTGAGCGTGTCTCCCGGAGAGAGCTACTC TGTCTTGCAAGGCAAGTCAGGACGTGGGAACTGCAGTCGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGG ACAGGCACCACGACTGCTGATCTATTGGGCTAGTACAAGGCACACTGGCATTCTGCCCGG TTCAGTGGCTCAGGATCCGGGACAGAGTTACCCTGACAATCTCCAGCCTGCAGTCCGAAG ATTTGCTGTGTACTATTGCCAGCAGTACTCTAGTTATCCTTGGACSTTTGGTCAGGGCACA AAGGTCGAGATCAAACGAACCGTGGCCGCTCCAAGCGTCTTCATTTTTCCSCCTTCTGACGA ACAGCTGAAGTCAGGTACAGCCTCCGTGGTCTGTCTGCTGAACAATTTTACCCAAGGGAG GCAAAGGTGCAAGTGGAAAGTCGATAACGCCCTGCAGAGCGGCAATTTCCAGGAGAGTGTGA CTGAACAGGACTCAAAGGATTCACCTATAGCCTGTCTCATCCACTCTGACCCTGAGCAAAGCT GACTACGAAAAGCATAAAGTGTATGCATGTGAAGTCACACACCAGGGTCTGAGTTCTCCAG TCACCAAATCTTTAATAGAGGCGAGTGTGA

[0147]

20 Таблица 25

Оптимизированная последовательность нуклеиновой кислоты легкой цепи гуманизированного антитела к Notch4 человека (вариабельный участок L4+константный участок человеческого Igk)

25	Название	Последовательность
30	Последовательность нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO. 63)	GAAATCGTGATGACCCAGTCTCCTGCTACACTGAGCGTGTCTCCCGGAGAGAGACTACTCT GTCTTGCAAGGCAAGTCAGGACGTGGGAACTGCAGTCGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGA CAGGCACCACGACTGCTGATCTATTGGGCTAGTACAAGGCACACTGGCATTCTGCCCGGT CAGTGGCTCAGGATCCGGGACAGAGTTACCCTGACAATCTCCAGCCTGCAGTCCGAAGAT TTGCTGTGTACTTTTGGCAGCAGTACTCTAGTTATCCTTGGACSTTCGGTCAGGGCACA GGTCGAGATCAAACGAACCGTGGCCGCTCCAAGCGTCTTCATTTTTCCSCCTTCTGACGAAC AGCTGAAGTCAGGTACAAGCTCCGCTGGTCTGTCTGCTGAACAATTTTACCCAAGGGAGGCA AAGGTGCAAGTGGAAAGTCGATAACGCCCTGCAGAGCGGCAATTTCCAGGAGAGTGTGACTG AACAGGACTCAAAGGATTCACCTATAGCCTGTCTCATCCACTCTGACCCTGAGCAAAGCTGA CTACGAAAAGCATAAAGTGTATGCATGTGAAGTCACACACCAGGGTCTGTCCAGTCCAGTC ACCAAATCTTTAATCGGGGAGAGTGTGA

[0148]

35 Таблица 26

Оптимизированная последовательность нуклеиновой кислоты легкой цепи гуманизированного антитела к Notch4 человека (вариабельный участок L5+константный участок человеческого Igk)

40	Название	Последовательность
45	Последовательность нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO. 64)	GATATTCAGATGACCCAGTCTCCTTCCAGCCTGTCTGCAAGTGTGGGAGACAGGGTACCAT CACATGCAAAGCCTCCAGGATGTGGGAACCGCAGTCGCCTGGTACCAGCAGAAAGCCAGGG AAAAGCCCAAGCTGCTGATCTACTGGGCTTCTACCAGGCACACAGGCGTGCCAAGTCGGT TCTCAGGCTCCGGAAGCGGGACCGACTTACTCTGACCATCTCCAGCCTGCAGCCTGAGGAT GTGGCAACATACTTCTGCCAGCAGTACTCTAGTTATCCATGGACTTTTGGTCAGGGCACC AGTCGAGATCAAGAGAAGTGTGGCCGCTCCCTCCGCTTTCATTTTTCCSCCTAGCGACGAAC AGCTGAAGAGTGGTACAGCCTCAGTGGTCTGTCTGCTGAACAATTTTACCCTAGGGAGGCT AAAGTGCAGTGGAAAGTCGATAACGCACTGCAGTCTGGCAATAGTCAGGAGTCAAGTACAG AACAGGACTCCAAAGATAGCACTTATTCTCTGTCTATCCACTGACTGTCTAAGGCCGAC TACGAAAAGCATAAAGTGTATGCTTGTGAGGTCACACACCAGGGTCTGAGCAGTCCAGTCA CCAAGAGCTTTAACCAGGAGAGTGTGA

[0149]

45 Таблица 27

Оптимизированная последовательность нуклеиновой кислоты легкой цепи гуманизированного антитела к Notch4 человека (вариабельный участок L6+константный

участок человеческого Igk)

Название	Последовательность
5 Последовательность нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO. 65)	GAAATCGTGATGACCCAGTCTCCTGCTACACTGAGCGTGTCTCCCGGAGAGAGACTACTCT GTCTTGCAAGGCAAGTCAGGACGTGGGAACGCAGTCGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGG CAGAGTCCCGCCTGCTGATCTATTGGGCCTCCACAAGGCACACTGGCATTCTGCTCGGTT CAGTGGCTCAGGATCCGGGACAGAGTTTACCTGACAATCTCCAGCCTGCAGAGCGAAGAT TTCGCCGTGTACTTTTGGCCAGCAGTACTCTAGTTATCCTTTGGACCTTCGGTCAGGGCACA GGTCGAGATCAAACGAACCGTGGCCGCTCCAAGCGTCTTCATTTTCCSCCTTCTGACGAAC AGCTGAAGTCAGGTACAGCTTCCGTGGTCTGTCTGCTGAACAATTTTACCCAAGGGAGGCA AAGGTGCAGTGGAAAGTCGATAACGCCCTGCAGAGCGGCAATTCTCAGGAGAGTGTGACTG AACAGGACTCAAAGGATCCACCTATAGCCTGTATCCACTCTGACCCTGTCTAAAGCTGAC TACGAAAAGCATAAAGTGTATGCATGTGAAGTCACCCACCAGGGGCTGAGTAGTCCAGTCA 10 CCAAGAGTTTTAATCGGGGCGAGTGTGA

[0150]

В следующих примерах эксперименты выполняли с антителами, содержащими аминокислотную последовательность CDR антитела 6-3-А6, определяемого в примере 1.

15 Для удобства конкретные антитела, используемые в следующем примере, будут обозначаться как "антитело А", "антитело В", "антитело С", "антитело D", "антитело Е", "антитело F" и "антитело G."

В антителе А переменный участок тяжелой цепи предусматривает переменный участок тяжелой цепи НК2, описываемой в примере 1, и переменный участок легкой цепи предусматривает переменный участок легкой цепи L3, описываемой в примере 1.

В антителе В переменный участок тяжелой цепи предусматривает переменный участок тяжелой цепи НК3, описываемой в примере 1, и переменный участок легкой цепи предусматривает переменный участок легкой цепи L3, описываемой в примере 1.

В антителе С переменный участок тяжелой цепи предусматривает переменный участок тяжелой цепи НК2, описываемой в примере 1, и переменный участок легкой цепи предусматривает переменный участок легкой цепи L4, описываемой в примере 1.

В антителе D переменный участок тяжелой цепи предусматривает переменный участок тяжелой цепи НК3, описываемой в примере 1, и переменный участок легкой цепи предусматривает переменный участок легкой цепи L5, описываемой в примере 1.

В антителе Е переменный участок тяжелой цепи предусматривает переменный участок тяжелой цепи НК2, описываемой в примере 1, и переменный участок легкой цепи предусматривает переменный участок легкой цепи L6, описываемой в примере 1.

В антителе F переменный участок тяжелой цепи предусматривает переменный участок тяжелой цепи НА2, описываемой в примере 1, и переменный участок легкой цепи предусматривает переменный участок легкой цепи L3, описываемой в примере 1.

В антителе G переменный участок тяжелой цепи предусматривает переменный участок тяжелой цепи НК3, описываемой в примере 1, и переменный участок легкой цепи предусматривает переменный участок легкой цепи L4, описываемой в примере 1.

Следует отметить, что в антителах А-Г лизин (Lys), который располагается на С-конце тяжелой цепи обычного человеческого антитела, удален.

[0151]

Пример 2: нейтрализующая активность антитела к Notch4 человека

[0152]

Нейтрализующую активность антитела к Notch4 человека (антитела В) оценивали анализом с геном-репортером люциферазы Notch4-GAL4. Данный эксперимент представляет собой экспериментальную систему, с помощью которой оценивают трансдукцию сигнала, специфического для Notch4, путем оценки люциферазной активности при стимулировании линии клеток b.end3, в которую вводят модифицированный ген, имеющий часть внутриклеточного домена Notch4, замещенную GAL4 ДНК-связывающим доменом, а также вектор экспрессии слитого гена между GAL4 UAS и Luciferase 2CP (далее называемой "репортерной клеткой"), с помощью DLL4, который представляет собой лиганд Notch.

[0153]

Рекомбинантный человеческий DLL4 (R&D Systems, 1506-D4-050/CF) растворяли в PBS для получения 10 мкг/мл раствора (далее раствор DLL4). В плоскодонном 96-луночном белом планшете (Greiner, 655083) распределяли 50 мкл/лунка (500 нг/лунка) раствора DLL4 и 50 мкл/лунка PBS для лунок без стимуляции и оставляли на ночь при 4°C для обеспечения перехода DLL4 в твердую фазу в 96-луночном белом планшете. Репортерные клетки суспендировали в культуральной среде D-MEM, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS) и пенициллин/стрептомицин, с получением клеточной суспензии при 1×10^5 /мл. Каждую лунку с DLL4 в твердой фазе промывали три раза с помощью PBS и высевали 50 мкл/лунка (5000 клеток/лунка) клеточной суспензии. Разбавления антитела к Notch4 человека (конечные концентрации: 0, 0,00064, 0,0032, 0,016, 0,08, 0,4, 2 и 10 мкг/мл) или человеческого IgG2к (SIGMA, I5404, конечная концентрация 10 мкг/мл) добавляли по 50 мкл и культивировали при 37°C в течение 22 часов. Люциферазную активность репортерных клеток оценивали с помощью Steady-Glo Assay System (Promega, E2510) следующим образом.

[0154]

Сто микролитров раствора Steady-Glo добавляли в каждую лунку после культивирования, перемешивали, а затем оставляли при комнатной температуре на 30 минут. Люминесценцию измеряли с помощью планшет-ридера Multilabel Plate Reader (Envision 2102-0020, Perkin Elmer). Относительную люминесценцию (%) вычисляли по измеренному значению люминесценции в соответствии со следующей формулой.

[0155]

Относительная люминесценция (%) = (интенсивность люминесценции в лунке с образцом - средняя интенсивность люминесценции в лунках без стимуляции) / (средняя интенсивность люминесценции в контрольных лунках - средняя интенсивность люминесценции в лунках без стимуляции).

[0156]

На фигуре 1 показана взаимосвязь концентрации антитела В и относительного значения люминесценции (%). На графике на фигуре 1 показано среднее значение результатов трех независимых тестов, и планка погрешностей показывает его стандартное отклонение. IC50 составляла 0,011 мкг/мл (95% CI; 0,0036-0,034).

[0157]

Далее подобные эксперименты выполняли для множества антител к Notch4 человека, в том числе для антитела В (антитела А, антитела В, антитела С, антитела D, антитела Е, антитела F и антитела G) и измеряли нейтрализующую активность антител.

[0158]

Рекомбинантный человеческий DLL4 (R&D Systems, 1506-D4-050/CF) растворяли в PBS для получения 10 мкг/мл раствора (далее раствор DLL4). В плоскодонном 96-

луночном белом планшете (Greiner, 655083) распределяли 50 мкл/лунка (500 нг/лунка) раствора DLL4 и 50 мкл/лунка PBS для лунок без стимуляции и оставляли на ночь при 4°C для обеспечения перехода DLL4 в твердую фазу в 96-луночном белом планшете. Репортерные клетки суспендировали в культуральной среде D-MEM, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS) и пенициллин/стрептомицин, с получением клеточной суспензии при 1×10^5 /мл. Каждую лунку с DLL4 в твердой фазе промывали три раза с помощью PBS и высевали 50 мкл/лунка (5000 клеток/лунка) клеточной суспензии. Каждое разбавление антитела к Notch4 человека (конечные концентрации: 0 и 10 мкг/мл) или человеческого IgG2к (SIGMA, I5404, конечная концентрация: 10 мкг/мл) добавляли по 50 мкл и культивировали при 37°C в течение 22 часов. Люциферазную активность репортерных клеток оценивали с помощью системы Dual luc-Glo Assay System (Promega, E2940) следующим образом.

[0159]

Сто микролитров раствора Dual-Glo Luciferase Substrate добавляли в каждую лунку после культивирования, перемешивали, а затем оставляли при комнатной температуре на 20 минут. Люминесценцию люциферазы светляка измеряли с помощью планшет-ридера Multilabel Plate Reader (Envision 2102-0020, Perkin Elmer). Затем добавляли 100 мкл раствора Dual-Glo Stop & Glo Substrate в каждую лунку, перемешивали, а затем оставляли при комнатной температуре на 20 минут. Люминесценцию люциферазы Renilla измеряли с помощью планшет-ридера Multilabel Plate Reader (Envision 2102-0020, Perkin Elmer). Относительную люминесценцию в каждой лунке (люциферазы светляка/люциферазы Renilla) вычисляли из соотношения значений люминесценции. Кроме того, относительную люминесценцию (%) вычисляли из каждого рассчитанного значения с использованием следующей формулы и оценивали ингибиторную активность каждого антитела в отношении сигнала Notch4.

[0160]

Относительная люминесценция (%) = (средняя относительная люминесценция в лунках с образцом - средняя относительная люминесценция в лунках без стимуляции) / (средняя относительная люминесценция в контрольных лунках - средняя относительная люминесценция в лунках без стимуляции).

[0161]

Ингибиторная активность каждого антитела в отношении сигнала Notch4 (тесты выполняли при концентрации 10 мкг/мл) описывается в приведенной ниже таблице 28.

[0162]

В приведенной ниже таблице, например, описание "НК2L3 (Lys-)" означает, что переменный участок тяжелой цепи гуманизированного антитела к Notch4 человека, используемого в эксперименте, представляет собой переменный участок тяжелой цепи НК2 гуманизированного антитела к Notch4 человека в примере 1, переменный участок легкой цепи представляет собой переменный участок легкой цепи L3 гуманизированного антитела к Notch4 человека в примере 1, а лизин (Lys), расположенный на С-конце тяжелой цепи обычного человеческого антитела, в данном антителе удален.

[0163]

Таблица 28

45

Образец	Цепь H/L	% контроля	S.D.	p-значение
Антитело А	НК2L3 (Lys-)	0,1	3,2	5,9E-11
Антитело В	НК3L3 (Lys-)	10,8	11,4	8,3E-07
Антитело С	НК2L4 (Lys-)	-9,9	14,0	8,0E-07

Антитело D	НК3L5 (Lys-)	21	8	1,8E-07
Антитело E	НК2L6 (Lys-)	5	3	1,7E-11
Антитело F	НА2L3 (Lys-)	17	5	3,5E-09
Антитело G	НК3L4 (Lys-)	13	9	2,4E-07

[0164]

Пример 3: кинетический анализ связывания гуманизированного антитела к Notch4 с рекомбинантным белковым доменом Notch4-NRR

[0165]

Кинетический анализ взаимодействия доменов Notch4-NRR человека, яванского макака, мыши и крысы с антителом В выполняли с помощью BIACORE. Антитело В очищали аффинной хроматографией с белком А из культурального супернатанта стабильной линии клеток СНО, трансфицированной антителом В. Домены Notch4-NRR человека, обезьяны, мыши и крысы получали в виде белков слияния с секреторной щелочной фосфатазой (SEAP) и 10 х гистидиновой меткой. Генами этих белков трансфицировали клетки Expi293F в Opti-MEM (INVITROGEN) с использованием ExpiFectamine 293. Эти клетки культивировали в среде Expi293 Expression Medium (INVITROGEN). Вкратце, клетки разбавляли до $7,5 \times 10^7$ клеток/25,5 мл и трансфицировали с помощью реагента ExpiFectamine 293 в день 0. Через приблизительно 16 часов после трансфекции в каждую колбу добавляли 150 мкл ExpiFectamine 293 Transfection Enhancer 1 и 1,5 мл ExpiFectamine 293 Transfection Enhancer 2. Супернатант отбирали в день 4. Эти антигены очищали с помощью колонки Ni-NTA Superflow (QIAGEN). Взаимодействие анализировали, как описывается ниже. Очищенное антитело В захватывали антителом к Fc человеческого IgG, фиксированным на сенсорном чипе CM5 (GE Healthcare). Очищенные белки слияния Notch4-NRR вводили в сенсорный чип при 8 различных концентрациях и регистрировали их взаимодействие и диссоциацию согласно инструкциям изготовителя.

[0166]

Таблица 29. Вычисляемые кинетические параметры антитела В

Белок	Ka (1/Мс)	Kd (1/с)	KD (M)
Notch4-NRR человека	3,17E+05	1,18E-03	3,74E-09
Notch4-NRR яванского макака	2,95E+05	1,06E-03	3,62E-09
Notch4-NRR мыши	6,01E+05	7,27E-03	1,12E-08
Notch4-NRR крысы	н.д.	н.д.	н.д.

[0167]

Кинетический анализ других ингибиторных гуманизированных антител к Notch4 выполняли следующим образом. Белки слияния на основе Fc-домена Notch4-NRR человека экспрессировали с помощью линии клеток СНО. Антиген в культуральном супернатанте захватывался антителом к Notch4 человека, фиксированным на сенсорном чипе CM5, который распознает разные эпитопы Notch4 человека. Затем гуманизированное антитело к Notch4 человека вводили в сенсорный чип при различных концентрациях. Его взаимодействие и константы диссоциации вычисляли согласно инструкциям изготовителя. Результаты приведены в таблице 30.

[0168]

В приведенной ниже таблице, например, описание "НК2L3 (Lys-)" означает, что переменный участок тяжелой цепи гуманизированного антитела к Notch4 человека, используемого в эксперименте, представляет собой переменный участок тяжелой цепи НК2 гуманизированного антитела к Notch4 человека в примере 1, переменный участок легкой цепи представляет собой переменный участок легкой цепи L3

гуманизованного антитела к Notch4 человека в примере 1, а лизин (Lys), расположенный на С-конце тяжелой цепи обычного человеческого антитела, в данном антителе удален. Отсутствие описания "(Lys-)" означает, что Lys, расположенный на С-конце тяжелой цепи человеческого антитела, не удален.

5 [0169]

Таблица 30

Рассчитанные кинетические параметры гуманизованных ингибиторных антител к Notch4 по отношению к белку слияния Notch4-NRR человека

Образец	Цепь Н/Л	Ka (1/Мс)	Kd (1/с)	KD (М)	Rmax1 (RU)
Антитело А	HK2L3(Lys-)	1,62E+06	8,89E-04	5,55E-10	33,4
Антитело В	HK3L3(Lys-)	1,66E+06	7,10E-04	4,41E-10	26,2
Антитело С	HK2L4(Lys-)	1,91E+06	1,06E-03	5,56E-10	35,9
Антитело D	HK3L5(Lys-)	1,82E+06	8,63E-04	4,75E-10	37
Антитело E	HK2L6(Lys-)	2,23E+06	1,15E-03	5,19E-10	28,9
Антитело F	HA2L3(Lys-)	1,55E+06	1,36E-03	9,82E-10	20,2
Антитело G	HK3L4(Lys-)	1,78E+06	1,11E-03	6,33E-10	29,2

[0170]

Подобные приведенным в вышеупомянутой таблице 30 результаты экспериментов, выполняемых с дополнительными антителами, представлены в таблице 31.

20 [0171]

Таблица 31

№	Конструкция НЛ	ka (усредненное)	kd (усредненное)	KD (усредненное)	N	
6-3-А6	Исходная	2,35E+06	7,42E-04	3,21E-10	9	
37	HK3L3(Lys-)	2,48E+06	8,22E-04	3,31E-10	2	
34	HK2L3(Lys-)	5,05E+06	1,24E-03	3,95E-10	2	
31	HA2L3(Lys-)	3,50E+06	8,94E-04	4,34E-10	2	
39	HK3L5(Lys-)	2,10E+06	1,09E-03	5,29E-10	5	
15	HK2L5	2,07E+06	1,12E-03	5,49E-10	6	
20	HK3L5	1,72E+06	1,02E-03	6,01E-10	6	
30	HA2L5	2,49E+06	1,36E-03	6,12E-10	6	
36	HK2L5(Lys-)	1,93E+06	1,13E-03	6,17E-10	5	
41	HK2L6(Lys-)	1,87E+06	1,15E-03	6,20E-10	3	
14	HK2L4	1,89E+06	1,17E-03	6,34E-10	6	
13	HK2L3	1,62E+06	1,09E-03	6,82E-10	6	
35	HK2L4(Lys-)	1,81E+06	1,27E-03	7,15E-10	5	
28	HA2L3	1,95E+06	1,37E-03	7,27E-10	6	
29	HA2L4	2,33E+06	1,69E-03	7,38E-10	6	
19	HK3L4	1,61E+06	1,20E-03	7,55E-10	6	
38	HK3L4(Lys-)	1,86E+06	1,24E-03	7,60E-10	5	
42	HK3L6(Lys-)	1,51E+06	1,14E-03	7,66E-10	3	
33	HA2L5(Lys-)	2,01E+06	1,50E-03	7,76E-10	3	
40	HA2L4(Lys-)	2,43E+06	1,62E-03	8,30E-10	5	
40	HA2L6(Lys-)	1,83E+06	1,51E-03	8,38E-10	3	
18	HK3L3	1,22E+06	1,04E-03	8,97E-10	6	
17	HK3L2	1,13E+06	1,45E-03	1,29E-09	4	
12	HK2L2	1,23E+06	1,57E-03	1,38E-09	4	
27	HA2L2	1,63E+06	2,22E-03	1,41E-09	4	
45	16	HK3L1	7,83E+05	1,33E-03	1,76E-09	4
26	HA2L1	9,49E+05	1,66E-03	1,76E-09	4	
10	HK1L5	2,72E+06	4,89E-03	1,78E-09	3	
11	HK2L1	8,75E+05	1,60E-03	1,84E-09	4	
9	HK1L4	2,78E+06	1,18E-02	4,34E-09	2	

8	HK1L3	3,71E+06	1,96E-02	4,87E-09	2
25	HA1L5	6,36E+06	4,52E-02	7,20E-09	2
24	HA1L4	1,18E+07	1,13E-01	9,54E-09	1
23	HA1L3	3,57E+07	5,24E-01	1,47E-08	1
22	HA1L2	6,49E+05	1,22E-02	1,86E-08	2
21	HA1L1	6,15E+04	2,79E-02	4,53E-07	1

[0172]

Пример 4: *in vivo* фармакологический тест с использованием антитела к Notch4 человека (противоопухолевый эффект и эффект подавления антителом В перфузии крови на ксенотрансплантатной модели Calu6)

[0173]

Линию клеток Calu6 немелкоклеточного рака легкого человека (№ в ATCC HTB-56), культивируемую в культуральной среде EMEM, содержащей 10% FBS, заменимые аминокислоты MEM, натрия пируват и пенициллин/стрептомицин, получали с концентрацией $1,6 \times 10^8$ клеток/мл с культуральной средой EMEM и смешивали с Matrigel™ (№ по каталогу CORNING 354234) при 1:1 для получения клеточной суспензии $8,0 \times 10^7$ клеток/мл. Дозу 0,1 мл подкожно трансплантировали в правый задний дорсальный участок голым мышам возрастом 6 недель (CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj, самки, CHARLES RIVER LABORATORIES JAPAN, INC.). Через двадцать восемь дней после трансплантации измеряли опухоль по малой и большой осям с помощью электронного цифрового штангенциркуля (DIGIMATIC™ CALIPER, Mitsutoyo Corporation) и объем опухоли (TV) вычисляли по следующей расчетной формуле.

[0174]

$TV \text{ (мм}^3\text{)} = \text{большая ось (мм)} \times \text{малая ось (мм)} \times \text{малая ось (мм)} / 2.$

[0175]

Выполняли рандомизацию на основании объема опухоли в первый день введения так, чтобы среднее значение объемов опухоли было приблизительно равным в группах. Антитело В разбавляли непосредственно перед введением так, что соотношение раствора среды (25 мМ гистидина, 250 мМ сахарозы и 0,05% Tween80 (pH 5,3)) и солевого раствора составляло 1:9 с получением 0,1, 0,3 и 1,0 мг/мл оцениваемых образцов (группа с введением 1, 3 и 10 мг/кг, соответственно). Оцениваемые образцы вводили путем инъекции в хвостовую вену при дозировке 0,2 мл/20 г массы тела мыши дважды в неделю (в день 1 и день 4, если считать день распределения по группам как день 1). Для контрольной группы 11,6 мг/мл контрольного IgG (ChromPure Human IgG, полная молекула, Jackson ImmunoResearch Laboratories, № по каталогу 009-000-003) разбавляли с помощью PBS до 1,0 мг/мл и вводили путем инъекции в хвостовую вену в дозе 0,2 мл/20 г массы тела мыши (объем введения 10 мг/кг). Эксперимент выполняли с 8 мышами на группу. Относительный объем опухоли (RTV) вычисляли для каждой группы, получавшей контрольный IgG, и группы с введением антитела В по следующей формуле и показали на фигуре 2А.

[0176]

$RTV = \text{объем опухоли в день измерения} / \text{объем опухоли в начале введения}.$

[0177]

Антитело В демонстрировало значительный противоопухолевый эффект при всех дозировках на ксенотрансплантатной модели Calu6.

[0178]

Перфузию крови в опухоли оценивали путем определения флуоресценции с помощью ядерного окрашивания клеток вокруг кровеносных сосудов флуоресцентным красителем

(Hoechst), вводимым в хвостовую вену (Funahashi et al. (2014), Cancer Sci., 105(10), 1334-42.). После измерения диаметра опухоли в последний день теста 10 мг/мл Hoechst 33342 (Life technologies, № по каталогу H3570) разбавляли до 2 х с помощью PBS и 5,0 мг/мл разбавленного Hoechst 33342 вводили в хвостовую вену в дозе 0,1 мл/животное. Мышей подвергали эвтаназии путем цервикальной дислокации через 5 минут после инъекции Hoechst, и отобранные опухоли заливали OCT Compound (Sakura Finetek Japan Co., Ltd., № по каталогу 4583) для получения замороженных блоков.

[0179]

Кровеносные сосуды опухоли в замороженных срезах подвергали иммунофлуоресцентному окрашиванию антителом к CD31 (конъюгированным с FITC, BD Pharmingen, № по каталогу 553372) и флуоресценцию Hoechst в участках кровеносных сосудов опухоли (по 5 на опухоль) фотографировали с помощью флуоресцентного микроскопа BIOREVO (KEYENCE, BZ-9000). Hoechst-позитивный участок определяли с помощью программного обеспечения для анализа изображений (Lumina Vision ver 2.2.2, MITANI CORPORATION) и усредненное для каждого опухолевого среза вычисляли и показали на фигуре 2В.

[0180]

Антитело В демонстрировало значительный эффект подавления перфузии крови при всех дозировках на ксенотрансплантатной модели Calu6.

[0181]

Пример 5: комбинированное применение антитела В и цисплатина на ксенотрансплантатной модели Calu6

[0182]

Линию клеток Calu6 немелкоклеточного рака легкого человека (№ в ATCC HTB-56), культивируемую в культуральной среде EMEM, содержащей 10% FBS и пенициллин/стрептомицин, получали при концентрации $1,2 \times 10^8$ клеток/мл с культуральной средой EMEM и смешивали с Matrigel™ (№ по каталогу CORNING 354234) при 1:1 для получения клеточной суспензии $6,0 \times 10^7$ клеток/мл. Дозу 0,1 мл подкожно трансплантировали в правый задний дорсальный участок голым мышам возрастом 7 недель (CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj, самки, CHARLES RIVER LABORATORIES JAPAN, INC.). Через двадцать семь дней после трансплантации измеряли опухоль по малой и большой осям с помощью электронного цифрового штангенциркуля (DIGIMATIC™ CALIPER, Mitsutoyo Corporation) и объем опухоли (TV) вычисляли по следующей расчетной формуле.

[0183]

Объем опухоли TV (мм^3) = большая ось (мм) x малая ось (мм) x малая ось (мм) / 2.

[0184]

Выполняли рандомизацию на основании объема опухоли в первый день введения так, чтобы среднее значение объемов опухоли было приблизительно равным в группах. Для антитела В 10,34 мг/мл раствора (среда: 25 мМ фосфата, 200 мМ трегалозы и 0,05% Tween80 (pH 5,5)) разбавляли PBS непосредственно перед введением для получения раствора с концентрацией 2,5 мг/мл и вводили его путем внутривенной инъекции при дозировке 0,2 мл (500 мкг)/животное, дважды в неделю в течение 5 недель. Цисплатин вводили один раз в первый день введения путем введения в хвостовую вену при дозировке 10 мг/кг. Эксперимент выполняли с 4 мышами на группу. Относительный объем опухоли (RTV) вычисляли для каждой контрольной (не получавшей лечение) группы, группы с введением антитела В, группы с введением цисплатина и группы с комбинированным введением антитело В+цисплатин согласно следующей формуле и

показали на фигуре 3.

[0185]

$RTV = \text{объем опухоли в день измерения} / \text{объем опухоли в начале введения}$.

[0186]

5 Комбинированное применение антитела В и цисплатина демонстрировало существенно превышающий противоопухолевый эффект по сравнению с цисплатином отдельно на ксенотрансплантатной модели Calu6.

[0187]

10 Пример 6: комбинированное применение антитела В и ленватиниба мезилата на ксенотрансплантатной модели FTC238

[0188]

15 Линию клеток FTC238 рака щитовидной железы человека (приобретенную в Sumitomo Dainippon Pharma Co., Ltd.), культивируемую в культуральной среде DMEM/F12 HAM (1:1), содержащей 10% FBS и пенициллин/стрептомицин, получали при концентрации
 20 $1,2 \times 10^8$ клеток/мл с культуральной средой DMEM/F12 HAM (1:1) и смешивали с Matrigel™ (CORNING № по каталогу 354234) при 1:1 для получения клеточной суспензии $6,0 \times 10^7$ клеток/мл. Дозу 0,1 мл подкожно трансплантировали в правый бок голым мышам возрастом 7 недель (CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj, самки, CHARLES RIVER LABORATORIES JAPAN, INC.) Через восемь дней после трансплантации измеряли опухоль по малой и
 25 большой осям с помощью электронного цифрового штангенциркуля (DIGIMATIC™ CALIPER, Mitsutoyo Corporation) и объем опухоли (TV) вычисляли по следующей расчетной формуле.

[0189]

25 Объем опухоли TV (мм^3) = большая ось (мм) x малая ось (мм) x малая ось (мм) / 2.

[0190]

30 Выполняли рандомизацию на основании объема опухоли в первый день введения так, чтобы среднее значение объемов опухоли было приблизительно равным в группах. Для антитела В 10,8 мг/мл антитела В (среда: 25 mM гистидина и 250 mM сахарозы (pH 5,3)) разбавляли непосредственно перед введением раствором среды с получением 2,5
 35 мг/мл антитела В и вводили его путем инъекции в хвостовую вену при дозировке 0,2 мл (500 мкг)/животное, дважды в неделю в течение 2 недель. Ленватиниба мезилат перорально вводили при дозировке 10 мг/кг, один раз в день в течение 12 дней. Эксперимент выполняли с 5 мышами на группу. Относительный объем опухоли (RTV) вычисляли для каждой контрольной (не получавшей лечение) группы, группы с
 40 введением антитела В, группы с введением ленватиниба мезилата и группы с комбинированным введением антитела В+ленватиниба мезилат согласно следующей формуле и показали на фигуре 4.

[0191]

40 $RTV = \text{объем опухоли в день измерения} / \text{объем опухоли в начале введения}$.

[0192]

45 Комбинированное применение антитела В и ленватиниба мезилата демонстрировало существенно превышающий противоопухолевый эффект по сравнению с антителом В, вводимым отдельно, или ленватиниба мезилатом отдельно на ксенотрансплантатной модели FTC238.

[0193]

Пример 7: комбинированное применение мышинового антитела 6-3-А6 и паклитаксела на ксенотрансплантатной модели DU145

[0194]

Линию клеток DU145 рака предстательной железы человека (№ в ATCC HTB-81), культивируемую в культуральной среде RPMI1640, содержащей 10% FBS, натрия пируват, 2-меркаптоэтанол и пенициллин/стрептомицин, получали при концентрации
 5 $6,0 \times 10^7$ клеток/мл с культуральной средой RPMI1640. Дозу 0,1 мл подкожно трансплантировали в правый бок голым мышам возрастом 6 недель (CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj, самки, CHARLES RIVER LABORATORIES JAPAN, INC.). Через двадцать четыре дня после трансплантации измеряли опухоль по малой и большой осям с помощью
 10 электронного цифрового штангенциркуля (DIGIMATIC™ CALIPER, Mitsutoyo Corporation) и объем опухоли TV вычисляли по следующей расчетной формуле.

[0195]

Объем опухоли TV (мм^3) = большая ось (мм) x малая ось (мм) x малая ось (мм)/2.

[0196]

Выполняли рандомизацию на основании объема опухоли в первый день введения так, чтобы среднее значение объемов опухоли было приблизительно равным в группах. Для 6-3-А6 5,11 мг/мл 6-3-А6 (среда: PBS) разбавляли PBS непосредственно перед
 15 введением с получением 2,5 мг/мл 6-3-А6 и вводили его путем инъекции в хвостовую вену в дозировке 0,2 мл (500 мкг)/животное, дважды в неделю в течение 4 недель. Паклитаксел вводили путем введения в хвостовую вену в дозе 20 мг/кг, один раз в день
 20 в течение 5 дней. Эксперимент выполняли с 4 мышами на группу. Объем опухоли (TV) каждой из контрольной (не получавшей лечение) группы, группы с введением 6-3-А6, группы с введением паклитаксела и группы с комбинированным введением 6-3-А6+ паклитаксел показан на фигуре 5.

[0197]

Комбинированное применение 6-3-А6 и паклитаксела демонстрировало существенно превышающий противоопухолевый эффект по сравнению с 6-3-А6 отдельно или паклитакселом отдельно на ксенотрансплантатной модели DU145.

[0198]

Пример 8: комбинация антитела В с ленватиниба мезилатом на ксенотрансплантатной модели гепатоцеллюлярной карциномы, полученной от пациента.

[0199]

Для проверки противоопухолевого эффекта антитела В в отношении гепатоцеллюлярной карциномы (HCC), LI0050, использовали полученную от пациента
 35 ксенотрансплантатную модель NuPrime® (Crown Bioscience Inc.). LI0050 представляет собой мышиную модель, инокулированную первичными опухолевыми тканями от пациента-женщины с HCC, которая, как сообщалось, устойчива к сорафенибу (публикация международной патентной заявки WO2015/031604).

Фрагменты опухоли от исходных мышей LI0050 собирали и фрагмент диаметром
 40 2-4 мм инокулировали подкожно в правый бок голым мышам BALB/c для развития опухоли. Размер опухоли измеряли в двух направлениях с использованием штангенциркуля и объем опухоли (TV) вычисляли по следующей расчетной формуле.

[0200]

Объем опухоли TV (мм^3) = большая ось (мм) x малая ось (мм) x малая ось (мм)/2.

[0201]

Лечение начинали при достижении среднего размера опухоли приблизительно 192 мм^3 . Выполняли рандомизацию на основании объема опухоли в первый день введения так, чтобы среднее значение объемов опухоли было приблизительно равным в группах.

Каждая группа состояла из 10 мышей. День рандомизации отмечали как день 0. От дня 0 до дня 13 мышей каждой группы обрабатывали один раз в день каждым из (i) контроля (3 мМ HCl), (ii) ленватиниба мезилата (10 мг/кг), (iii) сорафениба тозилата (30 мг/кг) или (iv) ленватиниба мезилата (10 мг/кг) плюс антитело В (0,5 мг/мышь).

5 Для сравнения двух групп использовали t-критерий для независимых выборок.
[0202]

Комбинация антитела В и ленватиниба мезилата демонстрировала существенно превышающий противоопухолевый эффект по сравнению с контрольной группой.
[0203]

10 Пример 9: сравнение ингибиторной активности поликлонального антитела к Notch4 человека и антитела В в отношении сигнала
[0204]

Далее ингибиторные активности поликлонального антитела к Notch4 человека (Santa Cruz, SC8643, далее N-17) и антитела В в отношении сигнала сравнивали с помощью системы анализа с геном-репортером люциферазы Notch4-GAL4.
15 [0205]

Использовали Slide-A-Lyzer (Thermo scientific, 66333) для выполнения диализа при 4°C в течение 8 часов в PBS для удаления азидата натрия, содержащегося в N-17. После концентрирования диализированного раствора N-17 на Amicon Ultra (Millipore, 20 UFC503096) концентрацию измеряли с помощью микроспектрофотометра (Nano Drop, Thermo).
[0206]

Рекомбинантный человеческий DLL4 (R&D Systems, 1506-D4-050/CF) растворяли в PBS для получения 10 мкг/мл раствора (далее в данном документе раствор DLL4). В 25 плоскодонном 96-луночном белом планшете (Greiner, 655083) распределяли 50 мкл/лунка (500 нг/лунка) раствора DLL4 и 50 мкл/лунка PBS для лунок без стимуляции и оставляли на ночь при 4°C для обеспечения перехода DLL4 в твердую фазу в 96-луночном белом планшете. Репортерные клетки суспендировали в культуральной среде D-MEM, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS) и пенициллин/стрептомицин, с получением клеточной суспензии при 1×10^5 /мл. Каждую лунку с DLL4 в твердой фазе промывали три раза с помощью PBS и высевали 50 мкл/лунка (5000 30 клеток/лунка) клеточной суспензии. После диализа/концентрирования разведения N-17 или разведения антитела В разбавляли культуральной средой (конечные концентрации: 0, 0,01, 0,1, 1 и 10 мкг/мл) добавляли по 50 мкл и культивировали при 35 37°C в течение 22 часов. Люциферазную активность репортерных клеток оценивали с помощью Steady-Glo Assay System (Promega, E2510) следующим образом.
[0207]

Сто микролитров раствора Steady-Glo добавляли в каждую лунку после культивирования, перемешивали, а затем оставляли при комнатной температуре на 30 40 минут. Люминесценцию измеряли с помощью планшет-ридера Multilabel Plate Reader (Envision 2102-0020, Perkin Elmer). Относительную люминесценцию вычисляли по измеренному значению люминесценции в соответствии со следующей формулой.
[0208]

Относительная люминесценция (%) = (интенсивность люминесценции в лунке с образцом - средняя интенсивность люминесценции в лунках без стимуляции) / (средняя интенсивность люминесценции в контрольных лунках - средняя интенсивность люминесценции в лунках без стимуляции).
45 [0209]

На фигуре 7 показана взаимосвязь концентрации антитела В и относительного значения люминесценции (%). На графике на фигуре 7 показано усредненное значение результатов трех независимых тестов, и планка погрешностей показывает его стандартное отклонение. Ингибиторную активность в отношении сигнала подтверждали для антитела В, но для N-17 ингибиторную активность N-17 в отношении сигнала Notch4 не наблюдали в диапазоне исследуемых концентраций.

[0210]

Пример 10: анализ кинетических показателей связывания между антителом В и рекомбинантным растворимым доменом Notch NRR человека

10 [0211]

Анализ кинетических показателей с использованием ВІАscore Т100 выполняли для определения взаимодействия домена NRR изотипов Notch человека (Notch1, Notch2, Notch3 и Notch4) и антитела В. Антитело В очищали от культурального супернатанта линии клеток CHO, стабильно экспрессирующей антитело В, с последующим применением аффинной хроматографии с белком А, анионообменной хроматографии Capto Q и катионообменной хроматографии UNOsphere S. Создавали белки слияния домена Notch1 NRR человека (№ доступа в Genbank 017617; положения в последовательности 1307-1733), домена Notch2 NRR человека (№ доступа в Genbank 024408; положения в последовательности 1239-1650), домена Notch3 NRR человека (№ доступа в Genbank 000435; положения в последовательности 1246-1641) и домена Notch4 NRR человека (№ доступа в Genbank NP_004548,3; положения в последовательности 1046-1445) с секреторной щелочной фосфатазой (SEAP), гемагглютининовой (НА) меткой и гистидиновой меткой (x 10) и очищали их с помощью колонки HisTrap™ Fast Flow (GE Healthcare). Взаимодействие между антителом В и доменом NRR каждого из изотипов Notch человека измеряли следующим способом. Очищенное антитело В захватывали антителом к Fc человеческого IgG, фиксированным на сенсорном чипе CM5 (GE Healthcare). Очищенный домен NRR каждого изотипа Notch человека вводили в сенсорный чип при 6 различных концентрациях и наблюдали взаимодействие и диссоциацию антителом согласно инструкции по эксплуатации.

30 [0212]

Перекрывающаяся сенсограмма взаимодействия и вычисляемые кинетические параметры показаны на фигуре 8 и в таблице 32.

[0213]

Таблица 32

35 Вычисляемые кинетические параметры взаимодействия между антителом В и белками слияния Notch4-NRR человека

Образец	Ka (1/Мс)	Kd (1/с)	KD (M)
Notch1-NRR-SEAP-НА-His человека	н.д.	н.д.	н.д.
Notch2-NRR-SEAP-НА-His человека	н.д.	н.д.	н.д.
Notch3-NRR-SEAP-НА-His человека	н.д.	н.д.	н.д.
Notch4-NRR-SEAP-НА-His человека	2,72E+04	8,31E-04	3,05E-08

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> EISAI R&D MANAGEMENT CO., LTD.
 <120> АНТИТЕЛО К NOTCH4 ЧЕЛОВЕКА
 <130> ESAP1402F
 <150> US 62/148,253
 <151> 2015-04-16
 <160> 65

<170> PatentIn версия 3.5
 <210> 1
 <211> 2003
 <212> БЕЛЮК
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 1
 Met Gln Pro Pro Ser Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 Cys Val Ser Val Val Arg Pro Arg Gly Leu Leu Cys Gly Ser Phe Pro
 10 20 25 30
 Glu Pro Cys Ala Asn Gly Gly Thr Cys Leu Ser Leu Ser Leu Gly Gln
 35 40 45
 Gly Thr Cys Gln Cys Ala Pro Gly Phe Leu Gly Glu Thr Cys Gln Phe
 50 55 60
 15 Pro Asp Pro Cys Gln Asn Ala Gln Leu Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys
 65 70 75 80
 Gln Ala Leu Leu Pro Ala Pro Leu Gly Leu Pro Ser Ser Pro Ser Pro
 85 90 95
 Leu Thr Pro Ser Phe Leu Cys Thr Cys Leu Pro Gly Phe Thr Gly Glu
 20 100 105 110
 Arg Cys Gln Ala Lys Leu Glu Asp Pro Cys Pro Pro Ser Phe Cys Ser
 115 120 125
 Lys Arg Gly Arg Cys His Ile Gln Ala Ser Gly Arg Pro Gln Cys Ser
 130 135 140
 25 Cys Met Pro Gly Trp Thr Gly Glu Gln Cys Gln Leu Arg Asp Phe Cys
 145 150 155 160
 Ser Ala Asn Pro Cys Val Asn Gly Gly Val Cys Leu Ala Thr Tyr Pro
 165 170 175
 Gln Ile Gln Cys His Cys Pro Pro Gly Phe Glu Gly His Ala Cys Glu
 30 180 185 190
 Arg Asp Val Asn Glu Cys Phe Gln Asp Pro Gly Pro Cys Pro Lys Gly
 195 200 205
 Thr Ser Cys His Asn Thr Leu Gly Ser Phe Gln Cys Leu Cys Pro Val
 210 215 220
 35 Gly Gln Glu Gly Pro Arg Cys Glu Leu Arg Ala Gly Pro Cys Pro Pro
 225 230 235 240
 Arg Gly Cys Ser Asn Gly Gly Thr Cys Gln Leu Met Pro Glu Lys Asp
 245 250 255
 Ser Thr Phe His Leu Cys Leu Cys Pro Pro Gly Phe Ile Gly Pro Asp
 40 260 265 270
 Cys Glu Val Asn Pro Asp Asn Cys Val Ser His Gln Cys Gln Asn Gly
 275 280 285
 Gly Thr Cys Gln Asp Gly Leu Asp Thr Tyr Thr Cys Leu Cys Pro Glu
 290 295 300
 45 Thr Trp Thr Gly Trp Asp Cys Ser Glu Asp Val Asp Glu Cys Glu Thr
 305 310 315 320
 Gln Gly Pro Pro His Cys Arg Asn Gly Gly Thr Cys Gln Asn Ser Ala
 325 330 335

RU 2 720 280 C2

	Gly	Ser	Phe	His	Cys	Val	Cys	Val	Ser	Gly	Trp	Gly	Gly	Thr	Ser	Cys
				340					345					350		
	Glu	Glu	Asn	Leu	Asp	Asp	Cys	Ile	Ala	Ala	Thr	Cys	Ala	Pro	Gly	Ser
			355					360					365			
5	Thr	Cys	Ile	Asp	Arg	Val	Gly	Ser	Phe	Ser	Cys	Leu	Cys	Pro	Pro	Gly
		370					375					380				
	Arg	Thr	Gly	Leu	Leu	Cys	His	Leu	Glu	Asp	Met	Cys	Leu	Ser	Gln	Pro
	385					390					395					400
	Cys	His	Gly	Asp	Ala	Gln	Cys	Ser	Thr	Asn	Pro	Leu	Thr	Gly	Ser	Thr
10					405					410					415	
	Leu	Cys	Leu	Cys	Gln	Pro	Gly	Tyr	Ser	Gly	Pro	Thr	Cys	His	Gln	Asp
					420					425				430		
	Leu	Asp	Glu	Cys	Leu	Met	Ala	Gln	Gln	Gly	Pro	Ser	Pro	Cys	Glu	His
			435					440						445		
15	Gly	Gly	Ser	Cys	Leu	Asn	Thr	Pro	Gly	Ser	Phe	Asn	Cys	Leu	Cys	Pro
			450					455					460			
	Pro	Gly	Tyr	Thr	Gly	Ser	Arg	Cys	Glu	Ala	Asp	His	Asn	Glu	Cys	Leu
	465					470						475				480
	Ser	Gln	Pro	Cys	His	Pro	Gly	Ser	Thr	Cys	Leu	Asp	Leu	Leu	Ala	Thr
20					485						490				495	
	Phe	His	Cys	Leu	Cys	Pro	Pro	Gly	Leu	Glu	Gly	Gln	Leu	Cys	Glu	Val
				500						505				510		
	Glu	Thr	Asn	Glu	Cys	Ala	Ser	Ala	Pro	Cys	Leu	Asn	His	Ala	Asp	Cys
			515					520						525		
25	His	Asp	Leu	Leu	Asn	Gly	Phe	Gln	Cys	Ile	Cys	Leu	Pro	Gly	Phe	Ser
		530					535						540			
	Gly	Thr	Arg	Cys	Glu	Glu	Asp	Ile	Asp	Glu	Cys	Arg	Ser	Ser	Pro	Cys
	545					550					555					560
	Ala	Asn	Gly	Gly	Gln	Cys	Gln	Asp	Gln	Pro	Gly	Ala	Phe	His	Cys	Lys
30					565						570				575	
	Cys	Leu	Pro	Gly	Phe	Glu	Gly	Pro	Arg	Cys	Gln	Thr	Glu	Val	Asp	Glu
				580						585				590		
	Cys	Leu	Ser	Asp	Pro	Cys	Pro	Val	Gly	Ala	Ser	Cys	Leu	Asp	Leu	Pro
			595					600						605		
35	Gly	Ala	Phe	Phe	Cys	Leu	Cys	Pro	Ser	Gly	Phe	Thr	Gly	Gln	Leu	Cys
		610						615					620			
	Glu	Val	Pro	Leu	Cys	Ala	Pro	Asn	Leu	Cys	Gln	Pro	Lys	Gln	Ile	Cys
	625					630					635					640
	Lys	Asp	Gln	Lys	Asp	Lys	Ala	Asn	Cys	Leu	Cys	Pro	Asp	Gly	Ser	Pro
40					645						650				655	
	Gly	Cys	Ala	Pro	Pro	Glu	Asp	Asn	Cys	Thr	Cys	His	His	Gly	His	Cys
			660							665				670		
	Gln	Arg	Ser	Ser	Cys	Val	Cys	Asp	Val	Gly	Trp	Thr	Gly	Pro	Glu	Cys
			675					680						685		
45	Glu	Ala	Glu	Leu	Gly	Gly	Cys	Ile	Ser	Ala	Pro	Cys	Ala	His	Gly	Gly
		690					695						700			
	Thr	Cys	Tyr	Pro	Gln	Pro	Ser	Gly	Tyr	Asn	Cys	Thr	Cys	Pro	Thr	Gly
	705					710						715				720

RU 2 720 280 C2

	Gly Gly	Leu Cys	Leu Pro	Ser	Pro Lys	Pro Gly	Phe	Pro Pro	Arg				
	1100			1105			1110						
	Cys Ala	Cys Leu	Ser Gly	Tyr	Gly Gly	Pro Asp	Cys	Leu Thr	Pro				
	1115			1120			1125						
5	Pro Ala	Pro Lys	Gly Cys	Gly	Pro Pro	Ser Pro	Cys	Leu Tyr	Asn				
	1130			1135			1140						
	Gly Ser	Cys Ser	Glu Thr	Thr	Gly Leu	Gly Gly	Pro	Gly Phe	Arg				
	1145			1150			1155						
	Cys Ser	Cys Pro	His Ser	Ser	Pro Gly	Pro Arg	Cys	Gln Lys	Pro				
10	1160			1165			1170						
	Gly Ala	Lys Gly	Cys Glu	Gly	Arg Ser	Gly Asp	Gly	Ala Cys	Asp				
	1175			1180			1185						
	Ala Gly	Cys Ser	Gly Pro	Gly	Gly Asn	Trp Asp	Gly	Gly Asp	Cys				
	1190			1195			1200						
15	Ser Leu	Gly Val	Pro Asp	Pro	Trp Lys	Gly Cys	Pro	Ser His	Ser				
	1205			1210			1215						
	Arg Cys	Trp Leu	Leu Phe	Arg	Asp Gly	Gln Cys	His	Pro Gln	Cys				
	1220			1225			1230						
	Asp Ser	Glu Glu	Cys Leu	Phe	Asp Gly	Tyr Asp	Cys	Glu Thr	Pro				
20	1235			1240			1245						
	Pro Ala	Cys Thr	Pro Ala	Tyr	Asp Gln	Tyr Cys	His	Asp His	Phe				
	1250			1255			1260						
	His Asn	Gly His	Cys Glu	Lys	Gly Cys	Asn Thr	Ala	Glu Cys	Gly				
	1265			1270			1275						
25	Trp Asp	Gly Gly	Asp Cys	Arg	Pro Glu	Asp Gly	Asp	Pro Glu	Trp				
	1280			1285			1290						
	Gly Pro	Ser Leu	Ala Leu	Leu	Val Val	Leu Ser	Pro	Pro Ala	Leu				
	1295			1300			1305						
	Asp Gln	Gln Leu	Phe Ala	Leu	Ala Arg	Val Leu	Ser	Leu Thr	Leu				
30	1310			1315			1320						
	Arg Val	Gly Leu	Trp Val	Arg	Lys Asp	Arg Asp	Gly	Arg Asp	Met				
	1325			1330			1335						
	Val Tyr	Pro Tyr	Pro Gly	Ala	Arg Ala	Glu Glu	Lys	Leu Gly	Gly				
	1340			1345			1350						
35	Thr Arg	Asp Pro	Thr Tyr	Gln	Glu Arg	Ala Ala	Pro	Gln Thr	Gln				
	1355			1360			1365						
	Pro Leu	Gly Lys	Glu Thr	Asp	Ser Leu	Ser Ala	Gly	Phe Val	Val				
	1370			1375			1380						
	Val Met	Gly Val	Asp Leu	Ser	Arg Cys	Gly Pro	Asp	His Pro	Ala				
40	1385			1390			1395						
	Ser Arg	Cys Pro	Trp Asp	Pro	Gly Leu	Leu Leu	Arg	Phe Leu	Ala				
	1400			1405			1410						
	Ala Met	Ala Ala	Val Gly	Ala	Leu Glu	Pro Leu	Leu	Pro Gly	Pro				
	1415			1420			1425						
45	Leu Leu	Ala Val	His Pro	His	Ala Gly	Thr Ala	Pro	Pro Ala	Asn				
	1430			1435			1440						
	Gln Leu	Pro Trp	Pro Val	Leu	Cys Ser	Pro Val	Ala	Gly Val	Ile				
	1445			1450			1455						

RU 2 720 280 C2

	Leu	Leu	Ala	Leu	Gly	Ala	Leu	Leu	Val	Leu	Gln	Leu	Ile	Arg	Arg
	1460						1465					1470			
	Arg	Arg	Arg	Glu	His	Gly	Ala	Leu	Trp	Leu	Pro	Pro	Gly	Phe	Thr
	1475						1480						1485		
5	Arg	Arg	Pro	Arg	Thr	Gln	Ser	Ala	Pro	His	Arg	Arg	Arg	Pro	Pro
	1490						1495						1500		
	Leu	Gly	Glu	Asp	Ser	Ile	Gly	Leu	Lys	Ala	Leu	Lys	Pro	Lys	Ala
	1505						1510						1515		
10	Glu	Val	Asp	Glu	Asp	Gly	Val	Val	Met	Cys	Ser	Gly	Pro	Glu	Glu
	1520						1525						1530		
	Gly	Glu	Glu	Val	Gly	Gln	Ala	Glu	Glu	Thr	Gly	Pro	Pro	Ser	Thr
	1535						1540						1545		
	Cys	Gln	Leu	Trp	Ser	Leu	Ser	Gly	Gly	Cys	Gly	Ala	Leu	Pro	Gln
	1550						1555						1560		
15	Ala	Ala	Met	Leu	Thr	Pro	Pro	Gln	Glu	Ser	Glu	Met	Glu	Ala	Pro
	1565						1570						1575		
	Asp	Leu	Asp	Thr	Arg	Gly	Pro	Asp	Gly	Val	Thr	Pro	Leu	Met	Ser
	1580						1585						1590		
20	Ala	Val	Cys	Cys	Gly	Glu	Val	Gln	Ser	Gly	Thr	Phe	Gln	Gly	Ala
	1595						1600						1605		
	Trp	Leu	Gly	Cys	Pro	Glu	Pro	Trp	Glu	Pro	Leu	Leu	Asp	Gly	Gly
	1610						1615						1620		
	Ala	Cys	Pro	Gln	Ala	His	Thr	Val	Gly	Thr	Gly	Glu	Thr	Pro	Leu
	1625						1630						1635		
25	His	Leu	Ala	Ala	Arg	Phe	Ser	Arg	Pro	Thr	Ala	Ala	Arg	Arg	Leu
	1640						1645						1650		
	Leu	Glu	Ala	Gly	Ala	Asn	Pro	Asn	Gln	Pro	Asp	Arg	Ala	Gly	Arg
	1655						1660						1665		
30	Thr	Pro	Leu	His	Ala	Ala	Val	Ala	Ala	Asp	Ala	Arg	Glu	Val	Cys
	1670						1675						1680		
	Gln	Leu	Leu	Leu	Arg	Ser	Arg	Gln	Thr	Ala	Val	Asp	Ala	Arg	Thr
	1685						1690						1695		
	Glu	Asp	Gly	Thr	Thr	Pro	Leu	Met	Leu	Ala	Ala	Arg	Leu	Ala	Val
	1700						1705						1710		
35	Glu	Asp	Leu	Val	Glu	Glu	Leu	Ile	Ala	Ala	Gln	Ala	Asp	Val	Gly
	1715						1720						1725		
	Ala	Arg	Asp	Lys	Trp	Gly	Lys	Thr	Ala	Leu	His	Trp	Ala	Ala	Ala
	1730						1735						1740		
40	Val	Asn	Asn	Ala	Arg	Ala	Ala	Arg	Ser	Leu	Leu	Gln	Ala	Gly	Ala
	1745						1750						1755		
	Asp	Lys	Asp	Ala	Gln	Asp	Asn	Arg	Glu	Gln	Thr	Pro	Leu	Phe	Leu
	1760						1765						1770		
	Ala	Ala	Arg	Glu	Gly	Ala	Val	Glu	Val	Ala	Gln	Leu	Leu	Leu	Gly
	1775						1780						1785		
45	Leu	Gly	Ala	Ala	Arg	Glu	Leu	Arg	Asp	Gln	Ala	Gly	Leu	Ala	Pro
	1790						1795						1800		
	Ala	Asp	Val	Ala	His	Gln	Arg	Asn	His	Trp	Asp	Leu	Leu	Thr	Leu
	1805						1810						1815		

RU 2 720 280 C2

	Leu Glu Gly Ala Gly Pro Pro	Glu Ala Arg His Lys	Ala Thr Pro
	1820	1825	1830
	Gly Arg Glu Ala Gly Pro Phe	Pro Arg Ala Arg Thr	Val Ser Val
	1835	1840	1845
5	Ser Val Pro Pro His Gly Gly	Gly Ala Leu Pro Arg	Cys Arg Thr
	1850	1855	1860
	Leu Ser Ala Gly Ala Gly Pro	Arg Gly Gly Gly Ala	Cys Leu Gln
	1865	1870	1875
10	Ala Arg Thr Trp Ser Val Asp	Leu Ala Ala Arg Gly	Gly Gly Ala
	1880	1885	1890
	Tyr Ser His Cys Arg Ser Leu	Ser Gly Val Gly Ala	Gly Gly Gly
	1895	1900	1905
	Pro Thr Pro Arg Gly Arg Arg	Phe Ser Ala Gly Met	Arg Gly Pro
	1910	1915	1920
15	Arg Pro Asn Pro Ala Ile Met	Arg Gly Arg Tyr Gly	Val Ala Ala
	1925	1930	1935
	Gly Arg Gly Gly Arg Val Ser	Thr Asp Asp Trp Pro	Cys Asp Trp
	1940	1945	1950
20	Val Ala Leu Gly Ala Cys Gly	Ser Ala Ser Asn Ile	Pro Ile Pro
	1955	1960	1965
	Pro Pro Cys Leu Thr Pro Ser	Pro Glu Arg Gly Ser	Pro Gln Leu
	1970	1975	1980
	Asp Cys Gly Pro Pro Ala Leu	Gln Glu Met Pro Ile	Asn Gln Gly
	1985	1990	1995
25	Gly Glu Gly Lys Lys		
	2000		
	<210>	2	
	<211>	12	
	<212>	ДНК	
30	<213>	Искусственная последовательность	
	<220>		
	<223>	Описание искусственной последовательности: Синтетический праймер	
	<400>	2	
	acatcactcc	gt	12
35	<210>	3	
	<211>	50	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная последовательность	
	<220>		
40	<223>	Описание искусственной последовательности: Синтетический праймер	
	<400>	3	
	acggagtgat	gtccgctcgac gtatctctgc gttgatactt cagcgtagct	50
	<210>	4	
	<211>	26	
45	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная последовательность	
	<220>		
	<223>	Описание искусственной последовательности: Синтетический праймер	

<400> 4
 agctacgctg aagtatcaac gcagag 26
 <210> 5
 <211> 20
 5 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический праймер
 <400> 5
 10 gccagtgat agactgatgg 20
 <210> 6
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 15 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический праймер
 <400> 6
 gatggataca gttggtgcag c 21
 <210> 7
 20 <211> 115
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид
 25 <400> 7
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 30 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Leu Val
 35 40 45
 Ala Thr Ile Asn Ser Asn Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 35 65 70 75 80
 Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Gln Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 40 Val Ser Ala
 115
 <210> 8
 <211> 107
 <212> БЕЛОК
 45 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид
 <400> 8

RU 2 720 280 C2

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala
 20 25 30
 5 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
 10 65 70 75 80
 Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105
 15 <210> 9
 <211> 345
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 20 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полинуклеотид
 <400> 9
 gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc cctgaaactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatggca tgtcttgggt tcgccagact 120
 ccagacaaga ggctggagtt ggctcgcaacc attaatagta atggtggtag aacctattat 180
 25 ccagacagtg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240
 ctgcaaatga gcagtctgaa gtctgaggac acagccatgt attactgtgc aagagaccag 300
 ggttttgctt actggggcca agggactctg gtcactgtct ctgca 345
 <210> 10
 <211> 321
 30 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полинуклеотид
 <400> 10
 35 gacattgtga tgaccagtc tcacaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 60
 atcacctgca aggccagtca ggatgtgggt actgctgtag cctggtatca acagaaacca 120
 gggcaatctc ctaaactact gatttactgg gcatccacc ggcaactgg agtccctgat 180
 cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccattagcaa tgtgcagtct 240
 gaagacttgg cagattatct ctgtcagcaa tatagcagct atccgtggac gttcgggtgga 300
 40 ggcaccaagc tggaaatcaa a 321
 <210> 11
 <211> 441
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 45 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид
 <400> 11
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

RU 2 720 280 C2

	1			5					10				15			
	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
				20					25				30			
	Gly	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Thr	Pro	Asp	Lys	Arg	Leu	Glu	Leu	Val
5			35					40					45			
	Ala	Thr	Ile	Asn	Ser	Asn	Gly	Gly	Arg	Thr	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Ser	Val
			50				55						60			
	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
	65					70						75			80	
10	Leu	Gln	Met	Ser	Ser	Leu	Lys	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys
				85						90					95	
	Ala	Arg	Asp	Gln	Gly	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr
				100						105				110		
	Val	Ser	Ala	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro
15			115					120					125			
	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val
	130						135						140			
	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala
	145					150						155			160	
20	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly
				165						170					175	
	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly
				180						185				190		
	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys
25			195					200						205		
	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Cys	Cys	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys
	210						215					220				
	Pro	Ala	Pro	Pro	Ala	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys
	225					230					235				240	
30	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val
				245							250				255	
	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr
				260						265				270		
	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu
35			275					280					285			
	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Val	His
	290						295					300				
	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys
	305					310						315			320	
40	Gly	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln
				325							330				335	
	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met
				340							345			350		
	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro
45			355					360					365			
	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn
	370						375					380				
	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu

	<400>	13							
			gaggtgcagc	tgggtggagtc	tgggggaggc	ttagtgcagc	ctggagggtc	cctgaaactc	60
			tctctgtcag	cctctggatt	cactttcagt	agctatggca	tgtcttgggt	tcgccagact	120
			ccagacaaga	ggctggagtt	ggctcgcaacc	attaatagta	atggtggtag	aacctattat	180
5			ccagacagtg	tgaagggccg	attcaccatc	tccagagaca	atgccaagaa	caccctgtac	240
			ctgcaaatga	gcagtctgaa	gtctgaggac	acagccatgt	attactgtgc	aagagaccag	300
			ggttttgctt	actggggcca	agggactctg	gtcactgtct	ctgcagctag	cacaaaaggc	360
			ccctctgtct	tccctctggc	tccctgtctc	cgtctccact	ccgagtccac	tgccgctctg	420
			ggctgtctgg	tcaaggatta	cttccctgag	ccagtcactg	tgagtggaa	ctcaggcgcc	480
10			ctgaccagcg	gagtccacac	atctcccgtc	gtgctgcaga	gctccggcct	gtactccctg	540
			tctagtgtgg	tcaccgtgcc	ttcaagcaat	ttcgggactc	agacctatac	atgcaacgtg	600
			gaccataagc	catctaatac	taaggtcgat	aaaaccgtgg	agcgaaaatg	ctgctggaag	660
			tgcccacctt	gtcctgtctc	accagccgct	gcaccaagcg	tgctcctggt	tctccaaag	720
			cccaaagaca	cactgatgat	cagcagaact	cctgaggtca	cctgctgggt	cgtggacgtg	780
15			tcccacgagg	atcccgaagt	ccagtttaac	tggtacgtgg	atggggtcga	agtgcataat	840
			gcaaagacta	aacctcggga	ggaacagttc	aactctacct	ttagagtcgt	gagtgtgctg	900
			acagtcgtgc	accaggactg	gctgaacgga	aaggagtata	agtgcaaagt	gtctaataag	960
			ggcctgcccg	cccctatcga	gaaaacaatt	agtaagacta	aaggccagcc	aagggaacc	1020
			caggtgtaca	cactgcccc	tagtcgag	gaaatgacaa	agaaccaggt	ctcactgact	1080
20			tgtctggtga	aagggttcta	tccatccgac	attgccgtgg	agtgggaatc	taatggacag	1140
			cccgaaaaca	attacaagac	cacaccacc	atgctggaca	gcgatggatc	cttctttctg	1200
			tattcaaagc	tgaccgtgga	taaaagccgg	tggcagcagg	gcaatgtctt	ttcctgtctt	1260
			gtgatgcacg	aagccctgca	caaccactac	actcagaagt	ccctgtccct	gtctcctggc	1320
			aaatga						1326
25			<210>	14					
			<211>	645					
			<212>	ДНК					
			<213>	Искусственная последовательность					
			<220>						
30			<223>	Описание искусственной последовательности: Синтетический полинуклеотид					
			<400>	14					
			gacattgtga	tgaccagtc	tcacaaattc	atgtccacat	cagtaggaga	cagggtcagc	60
			atcacctgca	aggccagtc	ggatgtgggt	actgctgtag	cctggatatca	acagaaacca	120
			gggcaatctc	ctaaactact	gatttactgg	gcatccacc	ggcacactgg	agtcctctgat	180
35			cgcttcacag	gcagtggatc	tgggacagat	ttcactctca	ccattagcaa	tgtgcagtct	240
			gaagacttgg	cagattatct	ctgtcagcaa	tatagcagct	atccgtggac	gttcggtgga	300
			ggcaccaagc	tggaaatcaa	acgtacggtc	gccgccccct	ccgtgtttat	tttctctcca	360
			tctgacgaac	agctgaagag	tgggaccgcc	tccgtggtgt	gcctgctgaa	caatttctac	420
			ccccgggagg	ccaaggtgca	gtggaaaagtc	gacaacgctc	tgcagtctgg	caatagtcag	480
40			gagtcagtga	ctgaacagga	cagcaaggat	tccacctatt	ctctgagctc	caccctgaca	540
			ctgagcaaa	cagattacga	aaagcacaaa	gtctatgcct	gcgaagtgac	ccaccagggg	600
			ctgagcagtc	cagtgacca	gtcctttaa	aggggagagt	gttga		645
			<210>	15					
			<211>	5					
45			<212>	БЕЛОК					
			<213>	Искусственная последовательность					
			<220>						
			<223>	Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид					

<400> 15
 Ser Tyr Gly Met Ser
 1 5
 <210> 16
 5 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид
 10 <400> 16
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met Ser
 1 5 10
 <210> 17
 <211> 17
 15 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид
 <400> 17
 20 Thr Ile Asn Ser Asn Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 18
 <211> 10
 25 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид
 <400> 18
 30 Thr Ile Asn Ser Asn Gly Gly Arg Thr Tyr
 1 5 10
 <210> 19
 <211> 6
 <212> БЕЛОК
 35 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид
 <400> 19
 Asp Gln Gly Phe Ala Tyr
 40 1 5
 <210> 20
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 45 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид
 <400> 20
 Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala Val Ala

1 5 10
 <210> 21
 <211> 7
 <212> БЕЛОК
 5 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид
 <400> 21
 Trp Ala Ser Thr Arg His Thr
 10 1 5
 <210> 22
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 15 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид
 <400> 22
 Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
 1 5
 20 <210> 23
 <211> 15
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 25 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид
 <400> 23
 agctatggca tgtct 15
 <210> 24
 <211> 30
 30 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид
 <400> 24
 35 ggattcactt tcagtagcta tggcatgtct 30
 <210> 25
 <211> 51
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 40 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид
 <400> 25
 accattaata gtaatggtgg tagaacctat tatccagaca gtgtgaaggg c 51
 <210> 26
 45 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид
 <400> 26
 accattaata gtaatggtgg tagaacctat 30
 <210> 27
 5 <211> 18
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид
 10 <400> 27
 gaccaggggtt ttgcttac 18
 <210> 28
 <211> 33
 <212> ДНК
 15 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид
 <400> 28
 aaggccagtc aggatgtggg tactgctgta gcc 33
 20 <210> 29
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 25 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид
 <400> 29
 tgggcatcca cccggcacac t 21
 <210> 30
 <211> 27
 30 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид
 <400> 30
 35 cagcaatata gcagctatcc gtggacg 27
 <210> 31
 <211> 115
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 40 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид
 <400> 31
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 45 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Val
 35 40 45

RU 2 720 280 C2

Ser Thr Ile Asn Ser Asn Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

5 Leu Gln Met Gly Ser Leu Arg Ala Glu Asp Met Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Gln Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

10 Val Ser Ser
115

<210> 32
<211> 345
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

15 <220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полинуклеотид
<400> 32

gaggtgcagc tggtcgagag cggagggggg ctggtgcagc caggagggtc tctgaggctg 60
agttgcgccg cttcaggctt caccttcagc tcctacggga tgtcttgggt gcgccaggct 120
20 ccaggggaagg gactggagta tgtcagcacc atcaactcca atggaggccg aacatactat 180
cctgactccg tgaagggccg gttcactatc tctagagata acagtaagaa caccctgtac 240
ctgcagatgg gcagcctgag agcagaagac atggccgtct actattgtgc aagggatcag 300
ggattcgc at actgggggaca gggaactctg gtgaccgtct caagc 345

<210> 33

25 <211> 115
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

30 <400> 33

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

35 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Leu Val
35 40 45

Ser Thr Ile Asn Ser Asn Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
40 65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Gln Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

45 Val Ser Ser
115

<210> 34
<211> 345

<212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полинуклеотид
 5 <400> 34
 gaagtgcagc tggtcgagag cgggggaggg ctggtgcagc caggagggtc tctgaggctg 60
 agttgcgccg cttcaggctt caccttcagc tcctacggga tgtcctgggt gcgccaggct 120
 ccagggaagg gactggagct ggtcagcacc atcaactcca atggaggccg aacatactat 180
 cctgactccg tgaagggccg gttcactatc tctagagata acagtaagaa caccctgtat 240
 10 ctgcagatgg gcagcctgag agcagaagac atggccgtct actattgtgc ccgagatcag 300
 gggttcgctt attggggaca ggggacactg gtgaccgtga gcagc 345
 <210> 35
 <211> 115
 <212> БЕЛОК
 15 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид
 <400> 35
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 20 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Leu Val
 35 40 45
 25 Ala Thr Ile Asn Ser Asn Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Gly Ser Leu Lys Ala Glu Asp Met Ala Val Tyr Tyr Cys
 30 85 90 95
 Ala Arg Asp Gln Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser
 115
 35 <210> 36
 <211> 345
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 40 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полинуклеотид
 <400> 36
 gaagtgcagc tggtcgagag tgggggaggg ctggtgcagc caggagggtc tctgaggctg 60
 agttgcgccg cttcaggctt caccttcagc tcctacggga tgtcctgggt gcgccaggct 120
 ccagggaag gactggagct ggtcgccacc atcaactcta atggaggccg aacatactat 180
 45 cctgacagtg tgaagggccg gttcactatt agcagagata actccaaaaa taccctgtat 240
 ctgcagatgg gcagcctgaa ggcagaagac atggccgtct actattgtgc tcgggatcag 300
 gggttcgctt attgggggca ggggactctg gtcactgtct cttcc 345
 <210> 37

<211> 115
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 5 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид
 <400> 37
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 10 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Val
 35 40 45
 Ser Thr Ile Asn Ser Asn Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asn Ser Val
 50 55 60
 15 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Gly Ser Leu Arg Ala Glu Asp Met Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Gln Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 20 100 105 110
 Val Ser Ser
 115
 <210> 38
 <211> 345
 25 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полинуклеотид
 <400> 38
 30 gaagtgcagc tggtcgaaac tggggggggga ctggtgcagc caggaggggc tctgaggctg 60
 agttgcgccg cttcaggcctt caccttcagc tcctacggga tgtcttgggt gcgccaggct 120
 cctgggaagg gactggagta tgtcagcacc atcaactcca atggaggccg aacatactat 180
 gccaaactccg tgaagggccg gttcactatc tctagagaca acagtaagaa caccctgtac 240
 ctgcagatgg gcagcctgag agcagaagat atggccgtct actattgtgc tcgggatcag 300
 35 ggctttgctt attgggggaca ggggacactg gtcaccgtct cctcc 345
 <210> 39
 <211> 115
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 40 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид
 <400> 39
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 45 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Leu Val
 35 40 45

RU 2720280 C2

Ser Thr Ile Asn Ser Asn Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asn Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

5 Leu Gln Met Gly Ser Leu Arg Ala Glu Asp Met Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Gln Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
10 115

<210> 40
<211> 345
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

15 <220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полинуклеотид
<400> 40

gagggtgcagc tggtcgaatc cggggggggg ctggtgcagc caggagggtc tctgaggctg 60
agttgcgccg cttcaggctt caccttcagc tcctacggga tgtcttgggt gcgccaggct 120
20 cctgggaagg gactggagct ggtcagcacc atcaactcca atggaggccg aacatactat 180
gccaaactccg tgaagggccg gttcactatc tctagagaca acagtaagaa caccctgtat 240
ctgcagatgg gcagcctgag agcagaagat atggccgtct actattgtgc tcgggatcag 300
ggcttcgcct actgggggca gggaacactg gtcaccgtct cctca 345

<210> 41
25 <211> 107
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид
30 <400> 41

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala
20 25 30

35 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
40 65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

45 <210> 42
<211> 321
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полинуклеотид
 <400> 42
 gacattcaga tgacacagag cccttcacatct ctgagtgcac cagtgggaga cagggtcacc 60
 5 atcacatgca aagccagcca ggatgtggga accgcagtcg cttggtacca gcagaagccc 120
 gggaaagtgc ctaagctgct gatctactgg gctagtacac ggcacactgg cgtcccatcc 180
 agattcagcg gctccggggtc tggaaccgac tttactctga ccatcagctc cctgcagccc 240
 gaggatgtgg ccacatacta ttgccagcag tattcatcct atccttggac cttcggacag 300
 ggaacaaaag tggaaatcaa a 321
 10 <210> 43
 <211> 107
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 15 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид
 <400> 43
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala
 20 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 25 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Val Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 30 100 105
 <210> 44
 <211> 321
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 35 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полинуклеотид
 <400> 44
 gatattcaga tgactcagag ccctcctct ctgagtgcac cagtgggaga cagggtcacc 60
 atcacatgca aagccagcca ggatgtggga accgcagtcg cttggtacca gcagaagccc 120
 40 gggaaagtgc ctaagctgct gatctactgg gctagtacac ggcacactgg cgtcccatcc 180
 agattcagcg gctccggggtc tggaaccgac tttactctga ccatcagctc cctgcagccc 240
 gaggatgtgg ccacatactt ctgccagcag tattcatcct atccttggac cttcggacag 300
 ggaactaaag tggagattaa g 321
 <210> 45
 45 <211> 107
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид
 <400> 45

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

<210> 46

<211> 321

<212> ДНК

20 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полинуклеотид

<400> 46

gaaattgtga tgaccagtc tcccgccaca ctgtctgtga gtccaggaga gagggcaact 60
 25 ctgtcttgca aggccagtca ggacgtggga accgcagtcg cttggtacca gcagaaacc 120
 gggcaggctc ctcggctgct gatctattgg gcatcactc ggacaccgg cattcccgcc 180
 agattctcag gcagcgggtc cggaacagag tttaccctga caatcagctc cctgcagagc 240
 gaagatttcg ctgtctacta ttgccagcag tattctagtt atccttggac attcggccag 300
 ggaacaaaag tggaaatcaa a 321

30 <210> 47

<211> 107

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

35 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 47

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 48

<211> 321

5 <212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полинуклеотид

<400> 48

10 gaaatcgtga tgaccscagag ccccgcaaca ctgtctgtga gtccaggaga gagggcaact 60
 ctgtcttgca aggccagtca ggacgtggga accgcagtcg cttggtacca gcagaaaccc 120
 gggcaggctc ctcggctgct gatctattgg gcatccactc ggcacaccgg cattcccgcc 180
 agattctcag gcagcggggtc cggaacagag tttaccctga caatcagctc cctgcagagc 240
 gaagatttcg ctgtctactt ttgccagcag tattcatcct atccttggac cttcggacag 300
 15 ggaacaaaaag tggaaatcaa a 321

<210> 49

<211> 107

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

20 <220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 49

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

25 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

30 Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Trp
 85 90 95

35 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 50

<211> 321

<212> ДНК

40 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полинуклеотид

<400> 50

45 gatatccaga tgaccscagtc cccaagctcc ctgtccgcat ctgtgggca cggggtcacc 60
 attacatgta aagccagtca ggatgtggga acagccgtcg cttggtacca gcagaagccc 120
 ggcaaatctc ctaagctgct gatctattgg gcttccacac ggcacactgg cgtgccctct 180
 agattcagtg gctcagggag cggaacagac tttactctga ccatttctag tctgcagcca 240
 gaggatgtgg caacttactt ctgccagcag tactcaagct atccttggac ctttggccag 300

gggacaaaaag tcgaaatcaa g

<210> 51
 <211> 107
 <212> БЕЛОК
 5 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид
 <400> 51

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

<210> 52
 <211> 321
 25 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полинуклеотид
 <400> 52

30 gaaatcgtga tgaccagag ccccgcaaca ctgtctgtga gtccaggaga gagggcaact 60
 ctgtcttgca aggccagtca ggacgtggga accgcagtcg cttggtacca gcagaaacc 120
 gggcagtctc ctcggctgct gatctattgg gcatccactc ggcacaccgg cattcccgcc 180
 agattctcag gcagcggggtc cggaacagag tttaccctga caatcagctc cctgcagagc 240
 gaagatttcg ctgtctactt ttgccagcag tattcatcct atccttggac cttcggacag 300
 35 ggaacaaaaag tggaaatcaa a 321

<210> 53
 <211> 326
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 40 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид
 <400> 53

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 45 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

RU 2 720 280 C2

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 5 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Pro Ala Ala Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 10 115 120 125
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 130 135 140
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 145 150 155 160
 15 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
 165 170 175
 Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
 180 185 190
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
 20 195 200 205
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 210 215 220
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 225 230 235 240
 25 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 245 250 255
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 260 265 270
 Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 30 275 280 285
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 290 295 300
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 305 310 315 320
 35 Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325

<210> 54

<211> 981

<212> ДНК

40 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полинуклеотид

<400> 54

gctagcaca aaggccctc tgtcttcct ctggctcct gctcccgtc cacctccgag 60
 45 tccactgcc ctctgggctg tctggtcaag gattacttcc ctgagccagt cactgtgagt 120
 tggaactcag gcgccctgac cagcggagtc cacacatttc ccgctgtgct gcagagctcc 180
 ggctgtact ccctgtctag tgtggtcacc gtgccttcaa gcaatttcgg gactcagacc 240
 tatacatgca acgtggacca taagccatct aataactaagg tcgataaac cgtggagcga 300

RU 2 720 280 C2

aaatgctgcg tggaatgccc accttgtcct gctccaccag ccgctgcacc aagcgtgttc 360
 ctgtttcctc caaagcccaa agacacactg atgatcagca gaactcctga ggtcacctgc 420
 gtggctgtgg acgtgtccca cgaggatccc gaagtccagt ttaactggta cgtggatggg 480
 gtcgaagtgc ataatgcaaa gactaaacct cgggaggaac agttcaactc tacctttaga 540
 5 gtcgtgagtg tgctgacagt cgtgcaccag gactggctga acggaagga gtataagtgc 600
 aaagtgtcta ataagggcct gcccgcccct atcgagaaaa caattagtaa gactaaaggc 660
 cagccaaggg aaccccaggt gtacacactg cccctagtc gcgaggaaat gacaagaac 720
 caggtctcac tgacttgtct ggtgaaaggg ttctatccat ccgacattgc cgtggagtgg 780
 gaatctaattg gacagcccga aaacaattac aagaccacac cacccatgct ggacagcgat 840
 10 ggatccttct ttctgtattc aaagctgacc gtggataaaa gccggtggca gcagggcaat 900
 gtcttttctc gctctgtgat gcacgaagcc ctgcacaacc actacactca gaagtcctcg 960
 tcctgtctc ctggcaaatg a 981

<210> 55

<211> 325

15 <212> БЕЛЮК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 55

20 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 25 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 30 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Pro Ala Ala Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 35 115 120 125
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 130 135 140
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 145 150 155 160
 40 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
 165 170 175
 Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
 180 185 190
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
 45 195 200 205
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 210 215 220
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn

RU 2 720 280 C2

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60
 5 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 10 100 105
 <210> 58
 <211> 324
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 15 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полинуклеотид
 <400> 58
 cgtacggtcg ccgccccctc cgtgtttatt tttcctccat ctgacgaaca gctgaagagt 60
 gggaccgcct ccgtgggtg cctgctgaac aatttctacc cccgggaggc caaggtgcag 120
 20 tggaaagtcg acaacgctct gcagtctggc aatagtcagg agtcagtgac tgaacaggac 180
 agcaaggatt ccacctattc tctgagctcc accctgacac tgagcaaagc agattacgaa 240
 aagcacaaaag tctatgcctg cgaagtgacc caccaggggc tgagcagtc agtgaccaag 300
 tcctttaaca ggggagagtg ttga 324
 <210> 59
 25 <211> 1323
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полинуклеотид
 30 <400> 59
 gaagtgcagc tggtcgaatc tgggggggggt ctggtgcagc caggcggatc cctgagactg 60
 agctgcgccg cttctgggtt cacattttcc agctacggca tgtcctgggt ccgccaggct 120
 ccaggcaagg gactggagct ggtgagtaca atcaactcaa atgggggtcg aacttactat 180
 cccgactccg tgaagggcag gttcactatt tcccgggata acagcaaaaa taccctgtac 240
 35 ctgcagatgg ggtccctgcg agctgaagac atggcagtg actattgtgc ccgtgatcag 300
 ggtttcgctt attgggggca ggtactctg gtcaccgtgt ctagtgttc taccaagga 360
 ccatccgtgt tcccactggc accatgctcc cggagcatat ctgagagtac tgcagccctg 420
 ggctgtctgg tgaaggacta tttccctgaa ccagtcacag tgagctggaa ctctggcgca 480
 ctgacaagcg gagtccacac tttcctgcc gtgctgcagt catccggcct gtactctctg 540
 40 agctctgtgg tcaactgtccc cagttcaa at ttcggaactc agacctatac atgcaacgtg 600
 gaccataagc ctagcaatac caaggtcgat aaaacagtgg agcgtaaatg ctgctgggaa 660
 tgcccacctt gtccagcacc accagctgca gcccttccg tgttcctgtt tcctccaaag 720
 ccaaaagaca ccctgatgat ctctagaacc cccgaggtca catgctgggt cgtggacgtg 780
 agtcacgagg atcctgaagt ccagtttaac tggtagctgg atggcgtcga agtgcataat 840
 45 gccaaagaca aaccaagaga ggaacagttc aactcaacct ttcgctcgt gtccgtgctg 900
 acagtcgtgc accaggattg gctgaacggc aaggagtata agtgcaaagt gtccaataag 960
 ggactgcccg ctctatcga gaaaactatt tccaagacca aaggacagcc tagggaacca 1020
 cagggtgtaca ctctgcccc tttcccgggag gaaatgacta agaaccaggt cagcctgacc 1080

	tgtctggtga aagggttcta tcctagtgac attgccgtgg agtgggaatc aaatggtcag	1140
	ccagagaaca attacaaagac cacaccaccc atgctggaca gtgatggctc attctttctg	1200
	tatagcaagc tgaccgtcga taaatctagg tggcagcagg gaaacgtggt ctctgtctcc	1260
	gtgatgcacg aagcactgca caaccattac acccagaaat ccctgagcct gtccccggc	1320
5	tga	1323
	<210> 60	
	<211> 1323	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
10	<220>	
	<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полинуклеотид	
	<400> 60	
	gaggtgcagc tggctcagtc cggggggggg ctggtgcagc caggaggatc cctgaggctg	60
	agctgcgccg cttctggggt cacatthttcc agctacggca tgcctgggt ccggcaggca	120
15	ccaggcaagg gactggagct ggtggccaca atcaacagta atggggtag aacttactat	180
	cccgactcag tgaagggcag gttcactatt agtcgggata actcaaaaaa taccctgtac	240
	ctgcagatgg ggtccctgaa ggctgaagac atggcagtgt actattgtgc ccgcatcag	300
	ggtttcgctt attgggggca gggactctg gtcaccgtgt ctagtgcctc caccaaagg	360
	cccagcgtgt ttccactggc tccctgtctc cgaagcacat ctgagagtac tgcagccctg	420
20	ggctgtctgg tgaaggacta tttccctgaa ccagtcacag tgagctggaa ctctggcgct	480
	ctgacatctg gagtccacac ttttctgca gtgctgcagt catccggcct gtactcctg	540
	agctctgtgg tcaactgtccc cagttcaaat ttcggaactc agacctatac atgcaacgtg	600
	gaccataaac ctagcaatac caaggctgat aaaacagtgg agcgggaagt ctgtgtggaa	660
	tgcccacctt gtccagctcc accagctgca gcccttctg tgttctggt tcctccaaag	720
25	ccaaaagaca ccctgatgat cagcaggacc cccgaggatc catgtgtggt cgtggacgtg	780
	tctcacgagg atcctgaagt ccagtttaac tggtagctgg atggcgtcga agtgcataat	840
	gcaaagacaa aaccaagaga ggaacagttc aactctacct ttcgcgtcgt gagggtgctg	900
	acagtcgtgc accaggattg gctgaacggc aaggagtata agtgcaaagt gtccaataag	960
	ggactgcccg cccctatcga gaaaactatt agcaagacca aaggacagcc tcgagaacca	1020
30	cagggtgtaca ctctgcccc tagtcgtgag gaaatgacta agaaccagggt ctccctgacc	1080
	tgtctggtga aagggttcta tcctagcgac attgccgtgg agtgggaatc taatggtcag	1140
	ccagagaaca attacaaagac cacaccaccc atgctggaca gtgatggctc attctttctg	1200
	tattcaaagc tgaccgtcga taaatccagg tggcagcagg gaaatgtggt ttcatgctcc	1260
	gtgatgcacg aagccctgca caaccattac acccagaaga gcctgtccct gagccccggc	1320
35	tga	1323
	<210> 61	
	<211> 1323	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
40	<220>	
	<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полинуклеотид	
	<400> 61	
	gaagtgcagc tggctcagtc tggggggggg ctggtgcagc ctggcggatc cctgagactg	60
	agctgcgccg cttctggggt cacatthttcc agctacggca tgcctgggt ccgccaggca	120
45	ccaggcaagg gactggagct ggtgagtaca atcaactcaa atgggggtcg aacttactat	180
	gtaactccg tgaagggcag gttcactatt tcccgggaca acagcaaaaa taccctgtac	240
	ctgcagatgg ggtccctgca agctgaagac atggcagtgt actattgtgc ccgtgatcag	300
	ggtttcgctt attgggggca gggactctg gtcaccgtgt ctagtgcctc taccaagggg	360

	cccagtgtgt	ttccactggc	accctgctcc	cggagcacat	ctgagagtac	tgacagccctg	420
	ggctgtctgg	tgaaggatta	ttccctgaa	ccagtcacag	tgagctggaa	ctctggcgca	480
	ctgacaagcg	gagtccacac	ttttcctgcc	gtgctgcagt	catccggcct	gtactctctg	540
	agctctgtgg	tcactgtccc	cagttcaaat	ttcggaaactc	agacctatac	atgcaacgtg	600
5	gaccataagc	ctagcaatac	caaggtcgat	aaaacagtgg	agcgtaaagt	ctgtgtggaa	660
	tgccccacctt	gtccagctcc	accagctgca	gccccttctg	tgttcctggt	tcctccaaag	720
	ccaaaagaca	cctgatgat	ctctagaacc	cccgaggtca	catgtgtggg	cgtaggacgtc	780
	agtcacgagg	atccagaagt	ccagtttaac	tggtacgtgg	atggcgtcga	agtgcataat	840
	gcaaagacaa	aaccagaga	ggaacagttc	aactcaacct	ttcgcgtcgt	gtccgtgctg	900
10	acagtcgtgc	accaggactg	gctgaacggc	aaggagtata	agtgcaaagt	gtccaataag	960
	ggactgccccg	cccctatcga	gaaaactatt	tccaagacca	aaggacagcc	tagggaacca	1020
	caggtgtaca	ctctgcccc	ttcccgggag	gaaatgacta	agaaccaggt	cagcctgacc	1080
	tgtctggtga	aagggttcta	tcctagtgc	attgccgtgg	agtgggaatc	aaatggctcag	1140
	ccagagaaca	attacaagac	cacaccacc	atgctggaca	gtgatggctc	attctttctg	1200
15	tatagcaagc	tgaccgtcga	taaactctagg	tggcagcagg	gaaatgtggt	ttcatgctcc	1260
	gtgatgcacg	aagccctgca	caaccactac	acacagaaaa	gcctgagcct	gagccccggc	1320
	tga						1323
	<210>	62					
	<211>	645					
20	<212>	ДНК					
	<213>	Искусственная последовательность					
	<220>						
	<223>	Описание искусственной последовательности: Синтетический полинуклеотид					
	<400>	62					
25	gaaatcgtga	tgactcagtc	ccccgctaca	ctgagcgtgt	ctcccggaga	gagagctact	60
	ctgtcttgca	aggcaagtca	ggacgtggga	actgcagtcg	cctggtacca	gcagaaacca	120
	ggacaggcac	cacgactgct	gatctattgg	gctagtacaa	ggcacactgg	cattcctgcc	180
	cggttcagtg	gctcaggatc	cgggacagag	tttaccctga	caatctccag	cctgcagtcc	240
	gaagatthcg	ctgtgtacta	ttgccagcag	tactctagtt	atccttggac	ctttggctcag	300
30	ggcacaaaagg	tcgagatcaa	acgaaccgtg	gccgctccaa	gcgtcttcat	ttttccccct	360
	tctgacgaac	agctgaagtc	aggtacagcc	tccgtggtct	gtctgctgaa	caatttctac	420
	ccaagggagg	caaaggtgca	gtggaaaagtc	gataacgccc	tgacagagcgg	caattctcag	480
	gagagtgtga	ctgaacagga	ctcaaaggat	tccacctata	gcctgtcatc	caactctgacc	540
	ctgagcaaaag	ctgactacga	aaagcataaa	gtgtatgcat	gtgaagtcac	acaccaggg	600
35	ctgagttctc	cagtcaccaa	atcttttaat	agaggcagtg	gctga		645
	<210>	63					
	<211>	645					
	<212>	ДНК					
	<213>	Искусственная последовательность					
40	<220>						
	<223>	Описание искусственной последовательности: Синтетический полинуклеотид					
	<400>	63					
	gaaatcgtga	tgaccagtc	tcctgctaca	ctgagcgtgt	ctcccggaga	gagagctact	60
	ctgtcttgca	aggcaagtca	ggacgtggga	actgcagtcg	cctggtacca	gcagaaacca	120
45	ggacaggcac	cacgactgct	gatctattgg	gctagtacaa	ggcacactgg	cattcctgcc	180
	cggttcagtg	gctcaggatc	cgggacagag	tttaccctga	caatctccag	cctgcagtcc	240
	gaagatthcg	ctgtgtactt	ttgccagcag	tactctagtt	atccttggac	cttcggctcag	300
	ggcacaaaagg	tcgagatcaa	acgaaccgtg	gccgctccaa	gcgtcttcat	ttttccccct	360

	tctgacgaac agctgaagtc aggtacagcc tccgtggtct gtctgctgaa caatthtttac	420
	ccaagggagg caaaggtgca gtggaaagtc gataacgccc tgcaagcgg caattctcag	480
	gagagtgtga ctgaacagga ctcaaaggat tccacctata gcctgtcatc cactctgacc	540
	ctgagcaaaag ctgactacga aaagcataaaa gtgtatgcat gtgaagtcac acaccaggg	600
5	ctgtccagtc cagtcaccaaa atcctttaa	645
	<210> 64	
	<211> 645	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
10	<220>	
	<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полинуклеотид	
	<400> 64	
	gatattcaga tgaccagtc tccttccagc ctgtctgcaa gtgtgggaga cagggtcacc	60
	atcacatgca aagcctccca ggatgtggga accgcagtcg cctggtagca gcagaagcca	120
15	gggaaaagcc ccaagctgct gatctactgg gcttctacca ggcaacagc cgtgccaagt	180
	cggttctcag gctccggaag cgggaccgac tttactctga ccatctccag cctgcagcct	240
	gaggatgtgg caacatactt ctgccagcag tactctagtt atccatggac ttttggctcag	300
	ggcaccaaaag tcgagatcaa gagaactgtg gccgctccct ccgtcttcat ttttccccct	360
	agcgacgaac agctgaagag tggtagcagc tcagtgggtct gtctgctgaa caatthtttac	420
20	cctagggagg ctaaagtgca gtggaaggtc gataacgcac tgcaagcgg caatagtcag	480
	gagtcagtgca cagaacagga ctccaaaagat agcacttatt ctctgtcatc cacactgact	540
	ctgtctaagg ccgactacga aaagcataaaa gtgtatgctt gtgaggtcac acaccaggg	600
	ctgagcagtc cagtcaccaaa gagctttaa	645
	<210> 65	
25	<211> 645	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полинуклеотид	
30	<400> 65	
	gaaatcgtga tgaccagtc tcctgctaca ctgagcgtgt ctcccggaga gagagctact	60
	ctgtcttgca aggcaagtca ggacgtggga actgcagtcg cctggtagca gcagaaacca	120
	gggcagagtc cccgcctgct gatctattgg gcctccacaa ggcaactgg cattcctgct	180
	cggttcagtg gctcaggatc cgggacagag tttaccctga caatctccag cctgcagagc	240
35	gaagatthtcg ccgtgtactt ttgccagcag tactctagtt atccttggac cttcggctcag	300
	ggcacaaaag tcgagatcaa acgaaccgtg gccgctccaa ccgtcttcat ttttccccct	360
	tctgacgaac agctgaagtc aggtacagct tccgtggtct gtctgctgaa caatthtttac	420
	ccaagggagg caaaggtgca gtggaaagtc gataacgccc tgcaagcgg caattctcag	480
	gagagtgtga ctgaacagga ctcaaaggat tccacctata gcctgtcatc cactctgacc	540
40	ctgtctaag ctgactacga aaagcataaaa gtgtatgcat gtgaagtcac ccaccaggg	600
	ctgagtagtc cagtcaccaaa gagthttaa	645

(57) Формула изобретения

1. Анти-Notch4 антитело, или его Notch4-связывающий фрагмент, где указанное антитело, или его Notch4-связывающий фрагмент, содержит тяжелую и легкую цепи и

выбрано из любого из следующих подпунктов (i)-(vii):

(i) антитела, в котором

вариабельный участок указанной тяжелой цепи содержит аминокислотную

последовательность SEQ ID NO:33 и

вариабельный участок указанной легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:45,

(ii) антитела, в котором

5 вариабельный участок указанной тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:35 и

вариабельный участок указанной легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:45,

(iii) антитела, в котором

10 вариабельный участок указанной тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33 и

вариабельный участок указанной легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:47,

(iv) антитела, в котором

15 вариабельный участок указанной тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:35 и

вариабельный участок указанной легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:49,

(v) антитела, в котором

20 вариабельный участок указанной тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33 и

вариабельный участок указанной легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:51,

(vi) антитела, в котором

25 вариабельный участок указанной тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:39 и

вариабельный участок указанной легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:45, и

(vii) антитела, в котором

30 вариабельный участок указанной тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:35 и

вариабельный участок указанной легкой цепи содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:47.

2. Анти-Notch4 антитело, или его Notch4-связывающий фрагмент, по п.1, где

35 вариабельный участок указанной тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33 и

вариабельный участок указанной легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:45.

3. Анти-Notch4 антитело, или его Notch4-связывающий фрагмент, по п.1, где

40 вариабельный участок указанной тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:35 и

вариабельный участок указанной легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:45.

4. Анти-Notch4 антитело, или его Notch4-связывающий фрагмент, по п.1, где

45 вариабельный участок указанной тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33 и

вариабельный участок указанной легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:47.

5. Анти-Notch4 антитело, или его Notch4-связывающий фрагмент, по п.1, где переменный участок указанной тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:35 и переменный участок указанной легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:49.
6. Анти-Notch4 антитело, или его Notch4-связывающий фрагмент, по п.1, где переменный участок указанной тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33 и переменный участок указанной легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:51.
7. Анти-Notch4 антитело, или его Notch4-связывающий фрагмент, по п.1, где переменный участок указанной тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:39 и переменный участок указанной легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:45.
8. Анти-Notch4 антитело, или его Notch4-связывающий фрагмент, по п.1, где переменный участок указанной тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:35 и переменный участок указанной легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:47.
9. Анти-Notch4 антитело, или его Notch4-связывающий фрагмент, по любому из пп.1-8, где константный участок указанной тяжелой цепи и константный участок указанной легкой цепи содержат последовательность, полученную из антитела человека.
10. Анти-Notch4 антитело, или его Notch4-связывающий фрагмент, по п.9, где константный участок указанной тяжелой цепи содержит константный участок IgG человека.
11. Анти-Notch4 антитело, или его Notch4-связывающий фрагмент, по п.10, где указанный константный участок IgG человека представляет собой константный участок IgG2 человека.
12. Анти-Notch4 антитело, или его Notch4-связывающий фрагмент, по п.11, где указанный константный участок IgG2 человека имеет мутацию V234A и/или G237A.
13. Анти-Notch4 антитело, или его Notch4-связывающий фрагмент, по любому из пп.9-12, где остаток лизина на карбоксильном конце константного участка указанной тяжелой цепи удален искусственным путем.
14. Анти-Notch4 антитело, или его Notch4-связывающий фрагмент, по любому из пп.9-13, где константный участок указанной легкой цепи содержит константный участок Igk человека.
15. Фармацевтическая композиция для лечения заболевания, связанного с Notch, содержащая эффективное количество анти-Notch4 антитела, или его Notch4-связывающего фрагмента, по любому из пп.1-14.
16. Фармацевтическая композиция по п.15, которая дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель.
17. Фармацевтическая композиция по п.15 или 16, которая применяется для лечения немелкоклеточного рака легкого.
18. Фармацевтическая композиция по п.15 или 16, которая применяется для лечения рака щитовидной железы.
19. Фармацевтическая композиция по п.15 или 16, которая применяется для лечения рака предстательной железы.

20. Фармацевтическая композиция по п.15 или 16, которая применяется для лечения гепатоцеллюлярной карциномы.

5

10

15

20

25

30

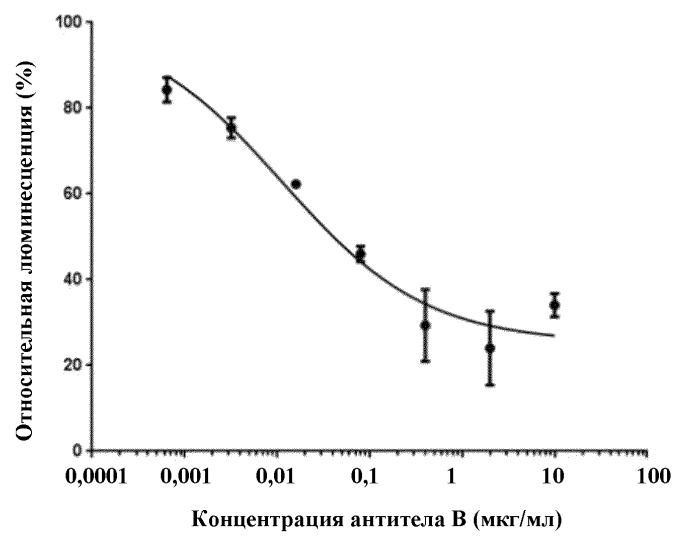
35

40

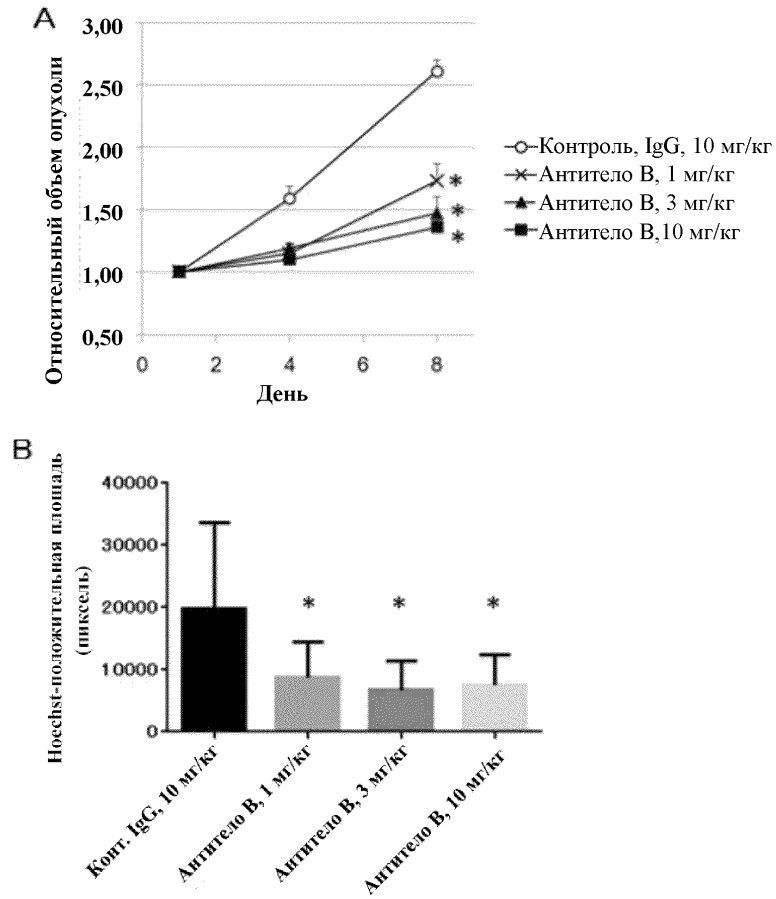
45

1/8

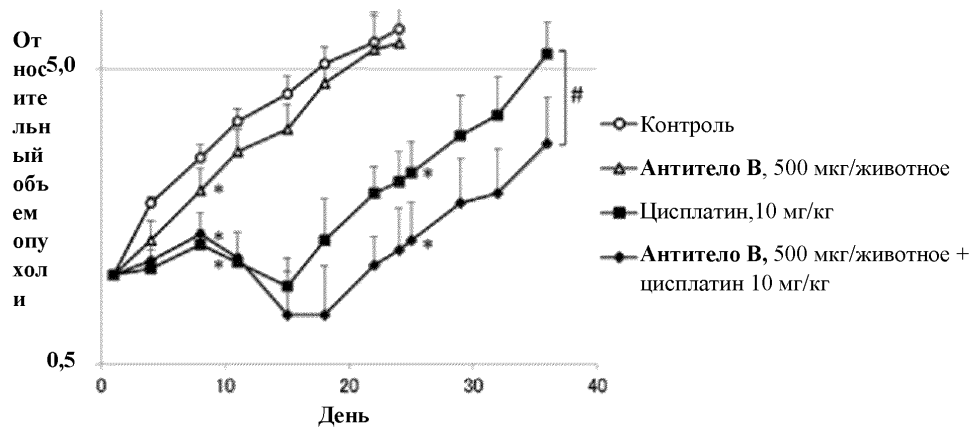
Фиг. 1



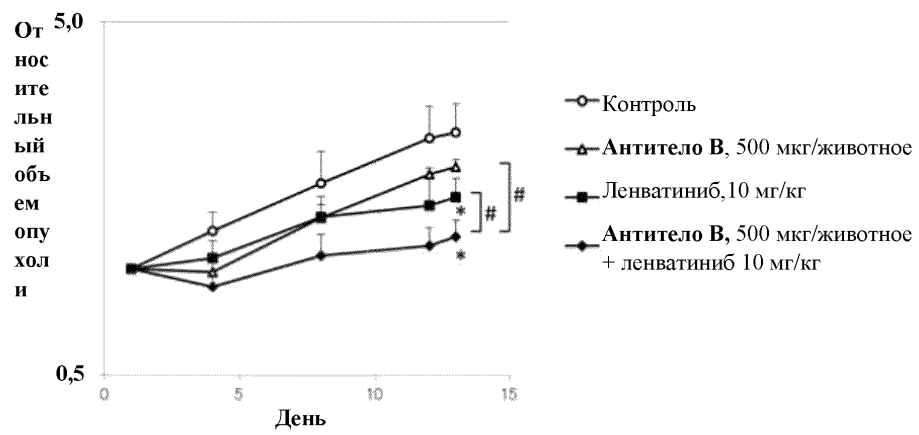
Фиг. 2



Фиг. 3

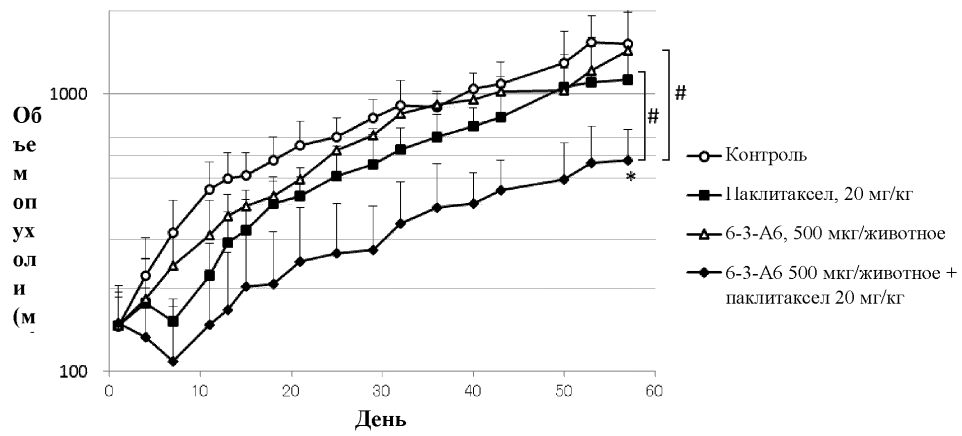


Фиг. 4

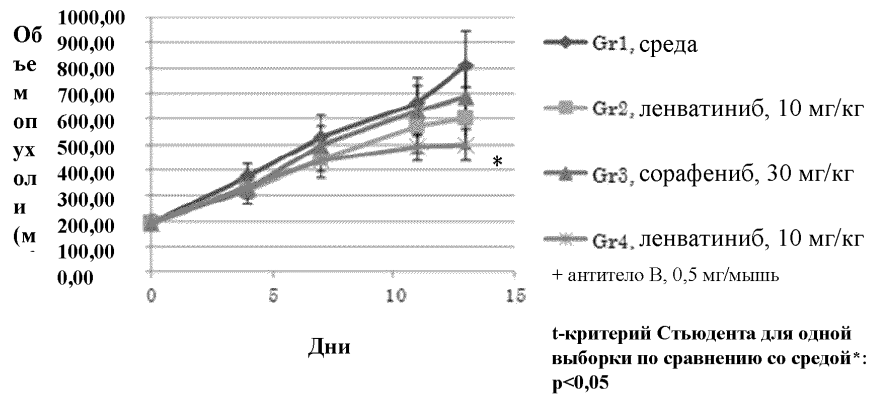


5/8

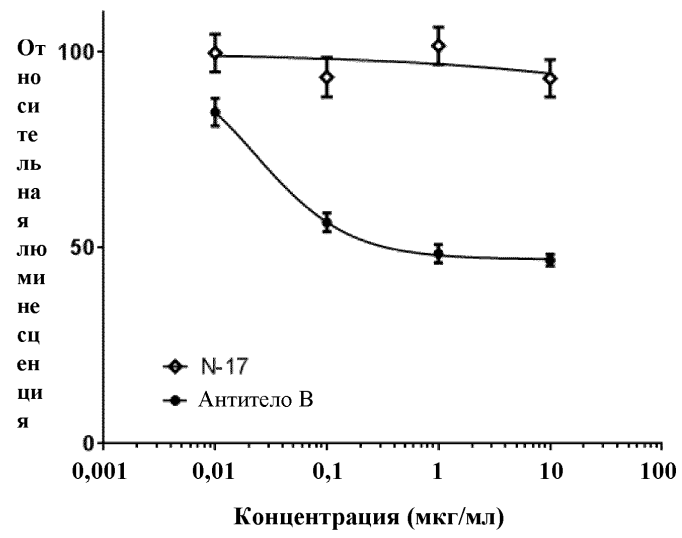
Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8

