



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102316897 B

(45) 授权公告日 2014. 11. 05

(21) 申请号 200980126470. X

(22) 申请日 2009. 07. 08

(30) 优先权数据

61/079, 095 2008. 07. 08 US

61/112, 701 2008. 11. 07 US

61/112, 699 2008. 11. 07 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2011. 01. 07

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2009/003994 2009. 07. 08

(87) PCT国际申请的公布数据

W02010/005566 EN 2010. 01. 14

(83) 生物保藏信息

PTA-9547 2008. 10. 15

PTA-10170 2009. 07. 06

(73) 专利权人 昂考梅德药品有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 奥斯丁·L·格尼

蒂莫西·查尔斯·霍伊

爱德华·特恩·图恩范德霍斯特

阿龙·肯·萨拓 刘远程

莫林·菲奇·布鲁恩斯

约翰·A·莱维茨基

(74) 专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司

11127

代理人 丁香兰 庞东成

(51) Int. Cl.

A61K 39/395(2006. 01)

审查员 周洋

权利要求书2页 说明书93页 附图29页

(54) 发明名称

Notch 结合剂和拮抗剂及其应用方法

(57) 摘要

本发明涉及 Notch 结合剂和 Notch 拮抗剂以及使用上述试剂和 / 或拮抗剂治疗诸如癌等疾病的方法。本发明提供与一种以上人类 Notch 受体 (例如 Notch2 和 / 或 Notch3) 的胞外域的非配体结合区特异性结合、并抑制肿瘤生长的抗体。本发明还提供治疗癌的方法, 所述方法包括施用治疗有效量的与人类 Notch 受体的胞外域的非配体结合区特异性结合、并抑制肿瘤生长的抗体。

1. 一种分离的抗体,所述抗体特异性结合人类Notch2和人类Notch3的胞外域,其中所述抗体包含:

(a) 含有 SSSGMS(SEQ ID NO :5) 的重链 CDR1、含有 VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO :6) 的重链 CDR2 和含有 SIFYTT(SEQ ID NO :51) 或 GIFFAI (SEQ ID NO :7) 的重链 CDR3 ;和

(b) 含有 RASQSVRSNYLA(SEQ ID NO :8) 的轻链 CDR1、含有 GASSRAT(SEQ ID NO :9) 的轻链 CDR2 和含有 QQYSNFPI (SEQ ID NO :10) 的轻链 CDR3。

2. 如权利要求 1 所述的抗体,其中所述抗体包含:

(a) 含有 SSSGMS(SEQ ID NO :5) 的重链 CDR1、含有 VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO :6) 的重链 CDR2 和含有 SIFYTT(SEQ ID NO :51) 的重链 CDR3 ;和

(b) 含有 RASQSVRSNYLA(SEQ ID NO :8) 的轻链 CDR1、含有 GASSRAT(SEQ ID NO :9) 的轻链 CDR2 和含有 QQYSNFPI (SEQ ID NO :10) 的轻链 CDR3。

3. 如权利要求 1 所述的抗体,其中所述抗体包含:

(a) 含有 SSSGMS(SEQ ID NO :5) 的重链 CDR1、含有 VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO :6) 的重链 CDR2 和含有 GIFFAI (SEQ ID NO :7) 的重链 CDR3 ;和

(b) 含有 RASQSVRSNYLA(SEQ ID NO :8) 的轻链 CDR1、含有 GASSRAT(SEQ ID NO :9) 的轻链 CDR2 和含有 QQYSNFPI (SEQ ID NO :10) 的轻链 CDR3。

4. 如权利要求 1 所述的抗体,其中所述抗体包含:

(a) 重链可变区 SEQ ID NO :50、SEQ ID NO :14 或 SEQ ID NO :20 ;和

(b) 轻链可变区 SEQ ID NO :13 或 SEQ ID NO :19。

5. 如权利要求 4 的抗体,所述抗体包含:

(a) 重链可变区 SEQ ID NO :50 ;和

(b) 轻链可变区 SEQ ID NO :13。

6. 如权利要求 4 的抗体,所述抗体包含:

(a) 重链可变区 SEQ ID NO :14 ;和

(b) 轻链可变区 SEQ ID NO :13。

7. 一种抗体,所述抗体由保藏在 ATCC 的保藏号为 PTA-9547 的多核苷酸编码。

8. 一种抗体,所述抗体由保藏在 ATCC 的保藏号为 PTA-10170 的多核苷酸编码。

9. 如权利要求 1 ~ 8 中任一项所述的抗体,所述抗体是人类 Notch2 和 / 或 Notch3 的拮抗剂。

10. 如权利要求 1 ~ 8 中任一项所述的抗体,所述抗体抑制配体与人类 Notch2 和 / 或人类 Notch3 的结合。

11. 如权利要求 1 ~ 7 中任一项所述的抗体,所述抗体是重组抗体、单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体、人类抗体、双特异性抗体、单特异性抗体、抗体片段、IgG1 抗体或 IgG2 抗体。

12. 如权利要求 1 ~ 8 中任一项所述的抗体,其中所述抗体与人类 Notch2 的表皮生长因子重复 10 内的序列 HKGAL (SEQ ID NO :28) 的至少一部分结合。

13. 如权利要求 1 ~ 8 中任一项所述的抗体,其中所述抗体与人类 Notch3 的表皮生长因子重复 9 内的序列 HEDAI (SEQ ID NO :29) 的至少一部分结合。

14. 如权利要求 1 ~ 8 中任一项所述的抗体,其中所述抗体与人类 Notch2 的表皮生长

因子重复 10 内的序列 HKGAL (SEQ ID NO :28) 的至少一部分以及与人类 Notch3 的表皮生长因子重复 9 内的序列 HEDAI (SEQ ID NO :29) 的至少一部分结合。

15. 一种分离的多核苷酸,所述分离的多核苷酸编码权利要求 1~8 中任一项所述的抗体。

16. 一种载体,所述载体包含权利要求 15 所述的多核苷酸。

17. 一种细胞,所述细胞包含权利要求 15 所述的多核苷酸。

18. 一种细胞,所述细胞包含权利要求 16 所述的载体。

19. 一种细胞,所述细胞包含权利要求 1~14 中任一项所述的抗体。

20. 一种细胞,所述细胞产生权利要求 1~14 中任一项所述的抗体。

21. 一种药物组合物,所述药物组合物包含权利要求 1~14 中任一项所述的抗体。

22. 权利要求 1~14 中任一项所述的抗体在制备用于癌症治疗的药物中的应用,其中所述癌症是结直肠癌、乳癌、胰腺癌或黑色素瘤。

23. 如权利要求 22 所述的应用,其中所述癌症治疗包括施用所述抗体和第二治疗剂。

24. 如权利要求 23 所述的应用,其中所述第二治疗剂是化学治疗剂。

25. 如权利要求 23 所述的应用,其中所述第二治疗剂是第二抗体。

26. 如权利要求 23 所述的应用,其中所述第二治疗剂是抗血管发生剂。

27. 权利要求 1~14 中任一项所述的抗体在制备用于抑制肿瘤生长的药物中的应用,其中所述肿瘤是结直肠肿瘤、乳肿瘤、胰腺肿瘤或黑色素瘤。

28. 权利要求 1~14 中任一项所述的抗体在制备用于减少肿瘤的致瘤性的药物中的应用,其中所述肿瘤是结直肠肿瘤、乳肿瘤、胰腺肿瘤或黑色素瘤。

29. 如权利要求 28 所述的应用,其中所述肿瘤中癌干细胞的频率减少。

30. 权利要求 1~14 中任一项所述的抗体在制备用于抑制受试对象中肿瘤血管发生的药物中的应用,其中所述肿瘤是结直肠肿瘤、乳肿瘤、胰腺肿瘤或黑色素瘤。

Notch 结合剂和拮抗剂及其应用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及包含结合人类 Notch 受体的试剂的组合物和使用所述组合物来治疗癌和其它疾病的方法。更具体而言,本发明提供了例如与人类 Notch 受体的胞外域的非配体结合区特异性结合,并抑制肿瘤生长的抗体。本发明还提供了癌的治疗方法,所述方法包括施用治疗有效量的抗体,所述抗体与人类 Notch 受体蛋白的胞外域的非配体结合区特异性结合,并抑制肿瘤生长。

背景技术

[0002] Notch 信号传导途径是胚胎模式形成、胚后组织维持和干细胞生物学的几种关键调节方式之一。更特别的是,Notch 信号传导参与相邻细胞命运之间的侧抑制过程,并且在不对称细胞分裂其间在细胞命运确定中起重要作用。失调的 Notch 信号传导与许多人类癌有关,在这些癌中 Notch 信号传导可以改变肿瘤细胞的发育命运,将其维持在未分化的增殖状态 (Brennan 和 Brown, 2003, Breast Cancer Res. 5 :69)。因此,由于篡夺控制着正常发育和由干细胞群进行的组织修复的体内平衡机制,可以导致癌形成 (Beachy 等, 2004, Nature 432 :324)。

[0003] Notch 受体首先在果蝇突变体中鉴定出,所述果蝇突变体患有单倍不足,导致翅缘处的缺刻,而功能丧失型产生胚胎致死“神经性”表型,该表型中表皮的细胞命运转变成神经组织 (Moohr, 1919, Genet. 4 :252 ;Poulson, 1937, PNAS 23 :133 ;Poulson, 1940, J. Exp. Zool. 83 :271)。Notch 受体是单跨膜的跨膜受体,在大胞外域中含有许多串联的表皮生长因子 (EGF)- 样重复和三个富含半胱氨酸的 Notch/LIN-12 重复 (Wharton 等, 1985, Cell 43 :567 ;Kidd 等, 1986, Mol. Cell. Biol. 6 :3094 ;Artavanis 等的综述, 1999, Science 284 :770)。已经鉴定出 4 种哺乳动物 Notch 蛋白 (Notch1、Notch2、Notch3 和 Notch4), 这些受体中的突变总是导致发育异常和人类病变,所述发育异常和人类病变包括如以下详细描述的几种癌症 (Gridley, 1997, Mol. Cell Neurosci. 9 :103 ;Joutel & Tournier-Lasserre, 1998, Semin. Cell Dev. Biol. 9 :619-25)。

[0004] Notch 受体受 Delta, Serrated, Lag-2 (DSL) 家族的单次跨膜配体激活。哺乳动物中存在 5 种已知的 Notch 配体 :Delta- 样 1 (DLL1)、Delta- 样 3 (DLL3)、Delta- 样 4 (DLL4)、Jagged 1 (JAG1) 和 Jagged 2 (JAG2), 其特征在 DSL 域和在胞外域内的串联的 EGF- 样重复。Notch 受体的胞外域与通常位于相邻细胞上的其配体的胞外域相互作用,导致 Notch 的 2 个蛋白水解切割,一个由 ADAM (A Disintegrin And Metallopeptidase, 解整合素 - 金属肽酶) 蛋白酶介导的胞外切割和一个由 γ 分泌酶介导的跨膜域内的切割。后一切割产生 Notch 胞内域 (ICD), 该 Notch 胞内域然后进入细胞核,在细胞核中其激活 CBF1, Suppressor of Hairless [Su(H)], Lag-2 (CSL) 家族的转录因子,上述家族的转录因子作为主要下游效应子增加 Hairy 和 Split 增强子 [E(sp1)] 家族的细胞核碱性螺旋 - 环 - 螺旋转录因子的转录 (Artavanis 等, 1999, Science 284 :770 ;Brennan 和 Brown, 2003, Breast Cancer Res. 5 :69 ;Iso 等, 2003, Arterioscler. Thromb. Vase. Biol. 23 :543)。哺乳动物中还可以存在涉

及果蝇中鉴定出的胞质蛋白 Deltex 的替代性细胞内途径 (Martinez 等, 2002, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12 :524-33), 并且该 Deltex- 依赖性途径可以起到抑制 Wnt 靶基因表达的作用 (Brennan 等, 1999, *Curr. Biol.* 9 :707-710 ;Lawrence 等, 2001, *Curr. Biol.* 11 :375-85)。

[0005] 哺乳动物 Notch 受体经过切割以形成成熟受体, 然后进行配体结合从而激活下游的信号传导。成熟期间弗林 (furin)- 样蛋白酶切割 Notch 受体, 从而产生近膜异二聚体, 该近膜异二聚体包含结合在一起处于自身抑制状态的非共价连接的胞外亚基和跨膜亚基。配体结合解除了这种抑制并且诱导 Notch 受体被 ADAM- 型金属蛋白酶和 γ - 分泌酶切割, 其中 γ - 分泌酶将胞内域 (ICD) 释放到细胞质中, 使得其易位到细胞核从而激活基因转录。ADAM 进行的切割发生在位于近膜负调节区内的非配体结合切割域内。

[0006] 造血干细胞 (HSC) 是体内了解最清楚的干细胞, 并且 Notch 信号传导涉及其正常维持以及白血病转化 (Kopper & Hajdu, 2004, *Pathol. Oncol. Res.* 10 :69-73)。HSC 是稀少的细胞群体, 存在于成体骨髓内的间质小生境 (stromal niche) 中。这些细胞的特征在于独特的基因表达图谱和连续产生更加分化的祖细胞以重建整个造血系统的能力。HSC 和祖细胞中的 Notch1 信号传导的组成型激活在体外和在长期重建测试中建立了同时产生淋巴样细胞和骨髓细胞的永生细胞系 (Varnum-Finney 等, 2000, *Nat. Med.* 6 :1278-81), 并且 Jagged1 的存在增加了 HSC 富集的人类骨髓细胞群的移植 (Karanu 等, 2000, *J. Exp. Med.* 192 :1365-72)。最近, 已经在体内于 HSC 中证明了 Notch 信号传导, 并且其显示参与抑制 HSC 分化。另外, Notch 信号传导似乎是 Wnt- 介导的 HSC 自我更新所需要的 (Duncan 等, 2005, *Nat. Immunol.* 6 :314)。

[0007] Notch 信号传导途径还在神经干细胞的维持中起关键作用, 并且涉及其正常维持和脑癌 (Kopper & Hajdu, 2004, *Pathol. Oncol. Res.* 10 :69-73 ;Purow 等, 2005, *Cancer Res.* 65 :2353-63 ;Hallahan 等, 2004, *Cancer Res.* 64 :7794-800)。神经干细胞在发育期间产生哺乳动物神经系统中的所有神经元细胞和神经胶质细胞, 并且最近已经在成体脑中得到鉴定 (Gage, 2000, *Science* 287 :1433-8)。Notch1 缺陷型小鼠、Notch 靶基因 Hes1、3 和 5 缺陷型小鼠 ;和 Notch 信号传导早衰蛋白 1 (PS1) 的调节子缺陷型小鼠显示胚胎神经干细胞数量减少。另外, 在 PS1 杂合小鼠脑中成体神经干细胞减少 (Nakamura 等, 2000, *J. Neurosci.* 20 :283-93 ;Hitoshi 等, 2002, *Genes Dev.* 16 :846-58)。神经干细胞的减少似乎是由于其过早分化成神经元 (Hatakeyama 等, 2004, *Dev.* 131 :5539-50), 表明 Notch 信号传导调节神经干细胞分化和自我更新。

[0008] 异常 Notch 信号传导涉及许多人类癌。人类中的 Notch1 基因首次在 T- 细胞急性淋巴母细胞白血病亚类中鉴定为可导致 Notch 途径激活的易位的基因座 (Ellisen 等, 1991, *Cell* 66 :649-61)。小鼠模型中 T 细胞内的 Notch1 信号传导的组成型激活类似地产生 T- 细胞淋巴瘤, 表明了发病原因 (Robey 等, 1996, *Cell* 87 :483-92 ;Pear 等, 1996, *J. Exp. Med.* 183 :2283-91 ;Yan 等, 2001, *Blood* 98 :3793-9 ;Bellavia 等, 2000, *EMBO J.* 19 :3337-48)。还已经发现, 产生异常 Notch1 信号传导的 Notch1 点突变、插入和缺失经常存在于儿童和成体 T 细胞急性淋巴母细胞白血病 / 淋巴瘤中 (Pear & Aster, 2004, *Curr. Opin. Hematol.* 11 :416-33)。

[0009] 小鼠乳腺癌病毒在乳腺癌的 Notch1 和 Notch4 基因座中的频繁插入以及所导致的活化 Notch 蛋白片段首先涉及乳癌中的 Notch 信号传导 (Gallahan & Callahan, 1987,

J. Virol. 61 :66-74 ;Brennan & Btown, 2003, Breast Cancer Res. 5 :69, Politi 等, 2004, Semin Cancer Biol. 14 :341-7)。转基因小鼠中的进一步研究已经确认了 Notch 在正常乳腺发育期间的导管分支 (ductal branching) 中的作用, 并且在乳房上皮细胞中 Notch4 的组成型激活形式抑制上皮分化和导致肿瘤发生 (Jhappan 等, 1992, Genes & Dev. 6345-5 ; Gallahan 等, 1996, Cancer Res. 56 :1775-85, Smith 等, 1995, Cell Growth Differ. 6 : 563-77, Soriano 等, 2000, Int. J. Cancer 86 :652-9, Uyttendaele 等, 1998, Dev. Biol. 196 : 204-17 ;Politi 等, 2004, Semin. Cancer Biol. 14 :341-7)。表明 Notch 受体在乳癌中的表达及其与临床结果的关联性的数据 Notch 在人类乳癌中的作用提供了证据 (Weijzen 等, 2002, Nat. Med. 8 :979-86, Parr 等, 2004, Int. J. Mol. Med. 14 :779-86)。另外, 在宫颈癌 (Zagouras 等, 1995, PNAS 92 :6414-8)、肾细胞癌 (Rae 等, 2000, Int. J. Cancer 88 :726-32)、头颈鳞状细胞癌 (Leethanakul 等, 2000, Oncogene 19 :3220-4)、子宫内膜癌 (Suzuki 等, 2000, Int. J. Oncol. 17 :1131-9) 和神经母细胞瘤 (vanLimpt 等, 2000, Med. Pediatr. Oncol. 35 :554-8) 中已经观察到 Notch 途径的过表达, 表明 Notch 在许多赘生物的发生中具有潜在作用。令人感兴趣的是, Notch 信号传导可能在结肠的 Ape- 突变赘生性细胞的未分化状态的维持中起作用 (van Es & Clevers, 2005, Trends in Mol. Med. 11 :496-502)。

[0010] Notch 途径还涉及血管发育的多个方面, 包括增殖、迁移、平滑肌分化、血管发生和动脉-静脉分化 (Iso 等, 2003, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 23 :543)。例如, 在动脉发育和卵黄囊血管形成中, Notch1/4 和 Jagged1 的纯合型无效突变以及 DLL4 的杂合丧失导致严重但是可变的缺陷。另外, DLL1- 缺陷和 Notch2- 减效小鼠胚胎显示出血, 这可能是由于血管结构的不良发育 (Gale 等, 2004, PNAS, 101 :15949-54 ;Krebs 等, 2000, Genes Dev. 14 : 1343-52 ;Xue 等, 1999, Hum. Mol. Genet. 8 :723-30 ;Hrabe de Angelis 等, 1997, Nature 386 : 717-21 ;McCright 等, 2001, Dev. 128 :491-502)。人类中, Jagged 1 的突变与阿拉吉耶综合征 (Alagille syndrome, 一种包括血管缺陷的发育障碍) 相关, Notch 3 的突变是遗传性血管性痴呆 (Cadasil) (其中血管体内平衡有缺陷) 的原因 (Joutel 等, 1996, Nature 383 : 707-10)。

[0011] 之前已经报道了抗 Notch 抗体及其作为抗癌治疗剂的可能应用。例如参见美国专利申请公开第 2008/0131434 号, 本文通过参考并入其全部内容。还参见国际申请公开 WO 2008/057144 和 WO 2008/076960, 以及美国专利申请公开第 2008/0226621、2008/0118520 和 2008/0131908 号。

发明内容

[0012] 本发明提供了新型 Notch 结合剂和一种或多种人类 Notch 受体的新型拮抗剂, 以及使用所述试剂和拮抗剂的方法。本发明还提供新型多肽, 例如结合一种或多种人类 Notch 受体的抗体, 所述抗体的片段, 和与所述抗体相关的其它多肽。在特定实施方式中, 本发明提供人类 Notch2 和 / 或人类 Notch3 的拮抗剂, 包括但不限于, 特异性结合人类 Notch2 和 / 或人类 Notch3 的抗体。如本文所用, 短语“Notch2 和 / 或 Notch3”表示“Notch2”、“Notch3”或“Notch2 和 Notch3 二者”。在特定实施方式中, 所述抗体或其它拮抗剂与在配体结合域 (例如, Notch2 的 EGF10 或 Notch3 的 EGF9) 外的 Notch 受体的区域结合。在特定实施方式中, 所述抗体特异性结合人类 Notch2。在特定实施方式中, 所述抗体特异性结

合人类 Notch2 和人类 Notch3。在某些实施方式中,所述抗体特异性结合人类 Notch3。还提供了包含编码所述多肽的核酸序列的多核苷酸,以及包含所述多核苷酸的载体。还提供包含本发明多肽和 / 或多核苷酸的细胞。还提供包含所述新型 Notch 拮抗剂的组合物(例如,药物组合物)。还提供使用所述试剂和拮抗剂的方法,例如使用所述 Notch 拮抗剂来抑制肿瘤生长、减少肿瘤的致癌性、抑制血管发生、和 / 或治疗癌或其它与血管发生相关的疾病的方法。

[0013] 在一方面,本发明提供与一种或多种人类 Notch 受体的 EGF10 域(或 EGF10 域的等效物)特异性结合的试剂(例如,抗体)。在特定实施方式中,所述试剂是抗体。在特定实施方式中,所述试剂是拮抗剂。在特定实施方式中,所述试剂与人类 Notch2 的 EGF10 和 / 或人类 Notch3 的 EGF9 特异性结合。EGF9 是人类 Notch3 内的 EGF,其对应于其它人类 Notch 受体 Notch1、Notch2 和 Notch4 中的 EGF10。在某些实施方式中,所述试剂与 Notch 2 的 EGF10 特异性结合。在某些实施方式中,所述试剂可与 Notch 2 的 EGF10 特异性结合,并且可与 Notch 3 的 EGF9 特异性结合。在某些实施方式中,所述试剂与 Notch3 的 EGF9 特异性结合。在其它实施方式中,所述试剂与位于 Notch2 EGF10 内的序列 HKGAL (SEQ ID NO :28) 的至少一部分结合。在某些实施方式中,所述试剂与位于 Notch3 EGF9 内的序列 HEDAI (SEQ ID NO :29) 的至少一部分结合。

[0014] 在上述方面或实施方式、以及本文别处所述其它方面和 / 或实施方式的每一特定实施方式中,所述试剂抑制配体与人类 Notch2 和 / 或 Notch3 的结合。在某些实施方式中,所述试剂抑制配体与人类 Notch2 的结合。在某些实施方式中,所述试剂抑制配体与 Notch2 和 Notch3 的结合。在其他实施方式中,所述试剂抑制配体与 Notch3 的结合。在特定实施方式中,所述配体是 DLL4、JAG1 或 JAG2。在其它实施方式中,所述试剂抑制人类 Notch2 和 / 或 Notch3 的信号传导。在某些实施方式中,所述试剂抑制人类 Notch2 的信号传导。在某些实施方式中,所述试剂抑制 Notch2 和 Notch3 的信号传导。在其它实施方式中,所述试剂抑制 Notch3 的信号传导。在某些实施方式中通过 DLL4、JAG1 或 JAG2 诱导 Notch2 和 / 或 Notch3 信号传导。还提供包含所述试剂的药物组合物,和将上述试剂用于诸如抑制血管发生、抑制肿瘤生长、减少肿瘤的致癌性和 / 或治疗癌等应用上的方法。

[0015] 在另一方面,本发明提供特异性结合人类 Notch2 和 / 或 Notch3 的抗体,其中所述抗体包含 (a) 含有 SSSGMS (SEQ ID NO :5) 的重链 CDR1、含有 VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO :6) 的重链 CDR2 和 / 或含有 SIFYTT (SEQ ID NO :51) 的重链 CDR3 ;和 / 或 (b) 含有 RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO :8) 的轻链 CDR1、含有 GASSRAT (SEQ ID NO :9) 的轻链 CDR2 和 / 或含有 QQYSNFPI (SEQ ID NO :10) 的轻链 CDR3。在某些实施方式中,所述抗体包含 (a) 含有 SSSGMS (SEQ ID NO :5) 的重链 CDR1,或包含 1 个、2 个、3 个或 4 个保守性氨基酸取代的其变体 ;含有 VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO :6) 的重链 CDR2,或包含 1 个、2 个、3 个或 4 个保守性氨基酸取代的其变体 ;和 / 或含有 SIFYTT (SEQ ID NO :51) 的重链 CDR3,或包含 1 个、2 个、3 个或 4 个保守性氨基酸取代的其变体 ;和 / 或 (b) 含有 RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO :8) 的轻链 CDR1,或包含 1 个、2 个、3 个或 4 个保守性氨基酸取代的其变体 ;含有 GASSRAT (SEQ ID NO :9) 的轻链 CDR2,或包含 1 个、2 个、3 个或 4 个保守性氨基酸取代的其变体 ;和 / 或含有 QQYSNFPI (SEQ ID NO :10) 的轻链 CDR3,或包含 1 个、2 个、3 个或 4 个保守性氨基酸取代的其变体。还提供包含所述抗体的药物组合物,和将所述抗体用于诸如抑制血管发生、抑制

肿瘤生长、减少肿瘤的致瘤性和 / 或治疗癌等应用上的方法。

[0016] 在另一方面,本发明提供特异性结合人类 Notch2 和 / 或 Notch3 的抗体,其中所述抗体包含 (a) 含有 SSSGMS (SEQ ID NO :5) 的重链 CDR1、含有 VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO :6) 的重链 CDR2 和 / 或含有 GIFFAI (SEQ ID NO :7) 的重链 CDR3 ;和 / 或 (b) 含有 RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO :8) 的轻链 CDR1、含有 GASSRAT (SEQ ID NO :9) 的轻链 CDR2 和 / 或含有 QQYSNFPI (SEQ ID NO :10) 的轻链 CDR3。在特定实施方式中,所述抗体特异性结合 Notch2。在某些实施方式中,所述抗体包含 (a) 含有 SSSGMS (SEQ ID NO :5) 的重链 CDR1,或包含 1 个、2 个、3 个或 4 个保守性氨基酸取代的其变体 ;含有 VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO :6) 的重链 CDR2,或包含 1 个、2 个、3 个或 4 个保守性氨基酸取代的其变体 ;和 / 或含有 GIFFAI (SEQ ID NO :7) 的重链 CDR3,或包含 1 个、2 个、3 个或 4 个保守性氨基酸取代的其变体 ;和 / 或 (b) 含有 RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO :8) 的轻链 CDR1,或包含 1 个、2 个、3 个或 4 个保守性氨基酸取代的其变体 ;含有 GASSRAT (SEQ ID NO :9) 的轻链 CDR2,或包含 1 个、2 个、3 个或 4 个保守性氨基酸取代的其变体 ;和 / 或含有 QQYSNFPI (SEQ ID NO :10) 的轻链 CDR3,或包含 1 个、2 个、3 个或 4 个保守性氨基酸取代的其变体。还提供包含所述抗体的药物组合物,和将所述抗体用于诸如抑制血管发生、抑制肿瘤生长、减少肿瘤的致瘤性和 / 或治疗癌等应用上的方法。

[0017] 在其它方面,本发明提供特异性结合人类 Notch2 和 / 或 Notch3 的抗体,其中所述抗体包含 (a) 含有 SSSGMS (SEQ ID NO :5) 的重链 CDR1、含有 VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO :6) 的重链 CDR2 和 / 或含有 (G/S) (I/S)F (F/Y) (A/P) (I/T/S/N) (SEQ ID NO :30) 的重链 CDR3 ;和 / 或 (b) 含有 RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO :8) 的轻链 CDR1、含有 GASSRAT (SEQ ID NO :9) 的轻链 CDR2 和 / 或含有 QQYSNFPI (SEQ ID NO :10) 的轻链 CDR3。在某些实施方式中,所述抗体包含含有 SIFYPT (SEQ ID NO :22) 的重链 CDR3。在某些实施方式中,所述抗体包含含有 SSSFFAS (SEQ ID NO :23) 的重链 CDR3。在其它实施方式中,所述抗体包含含有 SSFYAS (SEQ ID NO :24) 的重链 CDR3。在特定实施方式中,所述抗体包含含有 SSFFAT (SEQ ID NO :25) 的重链 CDR3。在某些实施方式中,所述抗体包含含有 SIFYPS (SEQ ID NO :26) 的重链 CDR3。在其它实施方式中,所述抗体包含含有 SSFFAN (SEQ ID NO :27) 的重链 CDR3。还提供包含所述抗体的药物组合物,和将上述抗体用于诸如抑制血管发生、抑制肿瘤生长、减少肿瘤的致瘤性和 / 或治疗癌等应用上的方法。

[0018] 在另一方面,本发明提供一种多肽,所述多肽包含 : (a) 与 SEQ ID NO :50、SEQ ID NO :14、SEQ ID NO :40、SEQ ID NO :52、SEQ ID NO :53、SEQ ID NO :54、SEQ ID NO :55、SEQ ID NO :56、SEQ ID NO :57 或 SEQ ID NO :20 (带有或不带有信号序列) 具有至少约 80% 序列同一性的多肽 (例如,重链可变区) ;和 / 或 (b) 与 SEQ ID NO :13、SEQ ID NO :19 或 SEQ ID NO :39 (带有或不带有信号序列) 具有至少约 80% 序列同一性的多肽 (例如,轻链可变区)。在特定实施方式中,所述多肽是抗体。在特定实施方式中,所述多肽特异性结合人类 Notch2 和 / 或 Notch3。在某些实施方式中,所述多肽与人类 Notch2 特异性结合。在某些实施方式中,所述多肽与 Notch2 和 Notch3 结合。在其它实施方式中,所述多肽与 Notch3 结合。在特定实施方式中,所述多肽包含与 SEQ ID NO :14、SEQ ID NO :13 或 SEQ ID NO :50 具有至少约 85%, 至少约 90%, 至少约 95%, 至少约 98% 或约 100% 序列同一性的多肽。还提供包含所述多肽的药物组合物,和将上述多肽用于诸如抑制血管发生、抑制肿瘤生长、减少肿瘤的致瘤性

和 / 或治疗癌等应用上的方法。

[0019] 在还另一方面,本发明提供一种多肽(例如,抗体或抗体的重链或轻链),所述多肽包含:(a)与SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:2(带有或不带有信号序列)具有至少约80%序列同一性的多肽;和/或(b)与SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:4(带有或不带有信号序列)具有至少约80%序列同一性的多肽。在特定实施方式中,所述多肽包含与SEQ ID NO:39或SEQ ID NO:40具有至少约85%,至少约90%,至少约95%,至少约98%或约100%序列同一性的多肽。还提供了包含所述抗体的药物组合物和治疗癌的方法,所述方法包括施用治疗有效量的所述抗体。

[0020] 在另一方面,本发明提供一种多肽(例如,抗体或抗体的重链或轻链),所述多肽包含:(a)与SEQ ID NO:50具有至少约80%序列同一性的多肽;和/或(b)与SEQ ID NO:13具有至少约80%序列同一性的多肽。在特定实施方式中,所述多肽包含与SEQ ID NO:50或SEQ ID NO:13具有至少约85%,至少约90%,至少约95%,至少约98%或约100%序列同一性的多肽。在特定实施方式中,所述多肽是结合人类Notch2和/或人类Notch3的抗体。还提供了包含所述抗体的药物组合物和治疗癌的方法,所述方法包括施用治疗有效量的所述抗体。

[0021] 在另一方面,本发明提供包含59R1 IgG2抗体的抗体、由59R1 IgG2抗体组成的抗体或基本上由59R1 IgG2抗体组成的抗体,所述59R1 IgG2抗体包含分别为SEQ ID NO:16和18(带有或不带有信号序列)的重链和轻链,或由DNA编码,所述DNA于2008年10月15日根据布达佩斯条约的规定保藏在美国典型培养物保藏中心(ATCC),10801 University Boulevard, Manassas, VA, USA,并赋予保藏号PTA-9547。还提供包含所述抗体的药物组合物,和将上述抗体用于诸如抑制血管发生、抑制肿瘤生长、减少肿瘤的致瘤性和/或治疗癌等应用上的方法。

[0022] 在另外方面,本发明提供包含59R5 IgG2抗体的抗体、由59R5 IgG2抗体组成的抗体或基本上由59R5 IgG2抗体组成的抗体,所述59R5 IgG2包含分别为SEQ ID NO:49和SEQ ID NO:18(带有或不带有信号序列)的重链和轻链,或由DNA编码,所述DNA于2009年7月6日保藏在ATCC,并赋予保藏号[...]。还提供包含所述抗体的药物组合物,和将上述抗体用于诸如抑制血管发生、抑制肿瘤生长、减少肿瘤的致瘤性和/或治疗癌等应用上的方法。

[0023] 在另一方面,本发明提供与包含含有SEQ ID NO:14的重链可变区和含有SEQ ID NO:13的轻链可变区的抗体竞争对人类Notch2和/或Notch3的特异性结合的抗体。在特定实施方式中,所述抗体与59R1 IgG2抗体竞争特异性结合,所述59R1 IgG2抗体包含分别为SEQ ID NO:16和18(带有或不带有信号序列)的重链和轻链,或由DNA编码,所述DNA于2008年10月15日保藏在ATCC,并赋予保藏号PTA-9547。在某些实施方式中,所述抗体竞争与人类Notch2的结合。在某些实施方式中,所述抗体竞争与人类Notch2和Notch3的结合。在某些实施方式中,所述抗体竞争与人类Notch3的结合。还提供包含所述抗体的药物组合物,和将上述抗体用于诸如抑制血管发生、抑制肿瘤生长、减少肿瘤的致瘤性和/或治疗癌等应用上的方法。

[0024] 在另一方面,所述抗体与包含含有SEQ ID NO:50的重链可变区和含有SEQ ID NO:13的轻链可变区的抗体竞争对人类Notch2和/或Notch3的特异性结合。在特定实施方式中,所述抗体与59R5抗体竞争特异性结合,所述59R5抗体包含分别为SEQ ID NO:49和18的

重链和轻链,或由 DNA 编码,所述 DNA 于 2009 年 7 月 6 日保藏在 ATCC,并赋予保藏号 [...]。在某些实施方式中,所述抗体竞争与人类 Notch2 的结合。在某些实施方式中,所述抗体竞争与人类 Notch2 和 Notch3 的结合。在某些实施方式中,所述抗体竞争与人类 Notch3 的结合。还提供包含所述抗体的药物组合物,和将上述抗体用于诸如抑制血管发生、抑制肿瘤生长、减少肿瘤的致癌性和 / 或治疗癌等应用上的方法。

[0025] 在特定的其它方面,本发明提供一种多肽(带有或不带有信号序列)以及编码所述多肽的多核苷酸,所述多肽包含选自由 SEQ ID NO :2、SEQ ID NO :4、SEQ ID NO :16、SEQ ID NO :18、SEQ ID NO :13、SEQ ID NO :14、SEQ ID NO :39、SEQ IDNO :40、SEQ ID NO :19、SEQ ID NO :20、SEQ ID NO :49、SEQ ID NO :50、SEQID NO :52、SEQ ID NO :53、SEQ ID NO :54、SEQ ID NO :55、SEQ ID NO :56 和 SEQ ID NO :57 组成的组的序列。在特定实施方式中,所述多肽是抗体。在特定实施方式中,所述抗体与人类 Notch2 和 / 或人类 Notch3 特异性结合。在特定实施方式中,所述抗体与 Notch2 特异性结合。在特定实施方式中,所述抗体与人类 Notch2 和人类 Notch3 特异性结合。在特定实施方式中,所述抗体与 Notch3 特异性结合。在另一方面,本发明提供一种多核苷酸,所述多核苷酸包含选自由 SEQ ID NO :1、SEQID NO :3、SEQ ID NO :15、SEQ ID NO :17、SEQ ID NO :47、SEQ ID NO :48、SEQ ID NO :58、SEQ ID NO :59 和 SEQ ID NO :60 组成的组的序列。

[0026] 在另一方面,本发明提供调节受试对象中(例如,在受试对象中的肿瘤或其它异常血管发生位置处)周细胞和 / 或血管平滑肌细胞的功能的方法。在特定实施方式中,所述方法包括对所述受试对象施用有效量的特异性结合人类 Notch2 和 / 或人类 Notch3 的试剂。在特定实施方式中,所述试剂是抗体。在某些实施方式中,所述试剂是在上述方面或实施方式、以及本文所述其它方面和 / 或实施方式中任一所述的抗体。在特定实施方式中,所述试剂是拮抗剂。在特定实施方式中,所述试剂与人类 Notch3 特异性结合,并且是人类 Notch3 的拮抗剂。在特定实施方式中,周细胞和 / 或血管平滑肌细胞的功能的调节对导致血管发生和 / 或肿瘤生长的抑制。

[0027] 在另一方面,本发明提供抑制受试对象中血管发生(例如,肿瘤血管发生)的方法。在特定实施方式中,所述方法包括对所述受试对象施用有效量的特异性结合人类 Notch2 和 / 或人类 Notch3 的试剂。在特定实施方式中,所述试剂是拮抗剂。在某些实施方式中,所述试剂与人类 Notch2 特异性结合,并且是人类 Notch2 的拮抗剂。在特定实施方式中,所述试剂与人类 Notch3 特异性结合,并且是人类 Notch3 的拮抗剂。在某些实施方式中,所述试剂是 Notch2 和 Notch3 二者的拮抗剂。在某些实施方式中,所述拮抗剂是抗体。在特定实施方式中,所述试剂是抗体。在某些实施方式中,所述试剂是在上述方面或实施方式、以及本文所述其它方面和 / 或实施方式中任一所述的抗体。在某些实施方式中,所述拮抗剂不是抗体。在某些实施方式中,抑制血管发生的方法还包括对所述受试对象施用血管内皮细胞生长因子(VEGF)的拮抗剂或 VEGF 受体的拮抗剂。在特定实施方式中,所述方法是通过调节周细胞和 / 或血管平滑肌细胞的功能从而抑制血管发生的方法。

[0028] 在另一方面,本发明提供抑制受试对象中肿瘤生长的方法。在特定实施方式中,所述方法包括对所述受试对象施用治疗有效量的人类 Notch2 和 / 或人类 Notch3 的拮抗剂。在特定实施方式中,所述拮抗剂是特异性结合人类 Notch2 的抗体。在某些实施方式中,所述拮抗剂是特异性结合人类 Notch2 和人类 Notch3 的抗体。在特定实施方式中,所述拮

抗剂是特异性结合人类 Notch3 的抗体。在某些实施方式中,所述拮抗剂是在上述方面或实施方式、以及本文所述其它方面和 / 或实施方式中任一所述的抗体。在特定实施方式中,所述肿瘤包含磷酸酶和张力蛋白 (tensin) 同源物 (PTEN) 基因的缺失或其它突变。在特定实施方式中,所述肿瘤是乳肿瘤。

[0029] 在另一方面,本发明提供选择受试对象以用于使用人类 Notch2 和 / 或人类 Notch3 拮抗剂进行治疗的方法。在特定实施方式中,所述方法包括 (a) 确定所述肿瘤是否包含磷酸酶和张力蛋白同源物 (PTEN) 基因中的缺失或突变;和 (b) 如果所述肿瘤包含所述缺失或突变,则选择所述受试对象以用于使用 Notch2 和 / 或 Notch3 拮抗剂进行治疗。在某些实施方式中,使用 Notch2 拮抗剂治疗所述受试对象。在某些实施方式中,使用 Notch2 和 Notch3 的拮抗剂治疗所述受试对象。在某些实施方式中,使用 Notch3 的拮抗剂治疗所述受试对象。在某些实施方式中,所述拮抗剂是抗体。在特定实施方式中,所述肿瘤是乳肿瘤。

[0030] 在另一方面,本发明提供与至少一种人类 Notch 受体 (例如,Notch 受体 1、2、3 或 4) 的胞外域的非配体结合区特异性结合的抗体。在特定实施方式中,所述非配体结合区包括人类 Notch 受体的 EGF 重复 10 (或 EGF10 的等效物,例如人类 Notch3 的 EGF9),或由人类 Notch 受体的 EGF 重复 10 (或 EGF10 的等效物,例如人类 Notch3 的 EGF9) 组成。在某些实施方式中,所述抗体抑制肿瘤生长。在某些实施方式中,所述抗体抑制配体与 Notch 受体的结合。在特定实施方式中,所述抗体抑制通过所述 Notch 受体进行的信号传导。在某些实施方式中,所述 Notch 受体是人类 Notch1、Notch2、Notch3 或 Notch4 受体。在特定实施方式中,所述抗体与 Notch2 (例如,Notch2 的 EGF10) 特异性结合。在特定实施方式中,所述抗体与 Notch2 和至少一种其它 Notch 受体特异性结合。在特定实施方式中,所述其它 Notch 受体是 Notch3。还提供了包含所述抗体的药物组合物和治疗癌的方法,所述方法包括施用治疗有效量的所述抗体。

[0031] 在另外方面,本发明提供与两种以上 (即,至少两种或两种、三种或四种) 人类 Notch 受体特异性结合的抗体。在特定实施方式中,所述抗体与两种以上人类 Notch 受体的胞外域的非配体结合区特异性结合。在特定实施方式中,如果所述两种以上人类 Notch 受体包含 Notch1、Notch2 或 Notch4,则所述抗体与 Notch1、Notch2 或 Notch4 的 EGF10 结合,如果所述两种以上人类 Notch 受体包含 Notch3,则所述抗体与 Notch3 的 EGF9 结合。在特定实施方式中,所述非配体结合区不是 EGF4。在特定实施方式中,所述两种以上人类 Notch 受体包含 Notch2。在特定实施方式中,所述两种以上人类 Notch 受体包含 Notch3。在另外的实施方式中,所述两种以上人类 Notch 受体包含 Notch2 和 Notch3。在特定实施方式中,所述抗体是所述两种以上人类 Notch 受体的拮抗剂。在特定实施方式中,所述抗体抑制肿瘤生长。还提供了包含所述抗体的药物组合物和治疗癌的方法,所述方法包括施用治疗有效量的所述抗体。

[0032] 在另一方面,本发明提供一种分离的抗体,所述分离的抗体与人类 Notch2 受体的胞外域的非配体结合区特异性结合并且抑制肿瘤生长,其中所述非配体结合区包含人类 Notch2 受体的 EGF 重复 10 (例如,SEQ ID NO :36),或由人类 Notch2 受体的 EGF 重复 10 (例如,SEQ ID NO :36) 组成。在某些实施方式中,所述抗体不与 EGF 重复 10 外的人类 Notch2 的任何区域结合。在特定实施方式中,所述抗体还与至少一种其它人类 Notch 受体的 EGF 重复 10 (或等效物) (例如,Notch3 的 EGF9) 特异性结合。在某些实施方式中,所述抗体与

人类 Notch2 EGF10 和 Notch3 EGF9 结合。还提供了包含所述抗体的药物组合物和治疗癌的方法,所述方法包括施用治疗有效量的所述抗体。

[0033] 在另一方面,本发明提供一种分离的抗体,所述分离的抗体与人类 Notch3 受体的胞外域的非配体结合区特异性结合并且抑制肿瘤生长,其中所述非配体结合区包含人类 Notch3 受体的 EGF 重复 9(其它 Notch 受体中的 EGF10 的等效物),或由人类 Notch3 受体的 EGF 重复 9(其它 Notch 受体中的 EGF10 的等效物)组成。在某些实施方式中,所述抗体不与 EGF 重复 9 外的人类 Notch3 的任何区域结合。在特定实施方式中,所述抗体还与至少一种其它人类 Notch 受体的 EGF 重复 10 特异性结合。在某些实施方式中,所述抗体与 Notch3 EGF9 和人类 Notch2 EGF10 结合。还提供了包含所述抗体的药物组合物和治疗癌的方法,所述方法包括施用治疗有效量的所述抗体。

[0034] 在其它方面,本发明提供一种抗体,所述抗体结合人类 Notch 受体的胞外域的非配体结合区,并且包含 (a) 含有 SSSGMS(SEQ ID NO :5) 的重链 CDR1、含有 VIASSGSNTYYADSVKG(SEQ ID NO :6) 的重链 CDR2 和 / 或含有 GIFFAI(SEQ IDNO :7) 的重链 CDR3 ;和 / 或 (b) 含有 RASQSVRSNYLA(SEQ ID NO :8) 的轻链 CDR1、含有 GASSRAT(SEQ ID NO :9) 的轻链 CDR2 和 / 或含有 QQYSNFPI(SEQ ID NO :10) 的轻链 CDR3。在特定实施方式中,所述人类 Notch 受体是 Notch2。在特定实施方式中,所述抗体与人类 Notch2 受体的 EGF10 和 / 或人类 Notch3 受体的 EGF9 结合。在另外方面,本发明提供在竞争结合检测中与所述抗体竞争对 Notch2 的胞外域的非配体结合区的特异性结合的抗体。还提供了包含所述抗体的药物组合物和治疗癌的方法,所述方法包括施用治疗有效量的所述抗体。还提供抑制血管发生的方法,所述方法包括施用所述组合物。

[0035] 在另一方面,本发明提供一种抗体,所述抗体结合人类 Notch 受体的胞外域的非配体结合区,并且包含 (a) 含有 SSSGMS(SEQ ID NO :5) 的重链 CDR1、含有 VIASSGSNTYYADSVKG(SEQ ID NO :6) 的重链 CDR2 和 / 或含有 SIFYTT(SEQ IDNO :51) 的重链 CDR3 ;和 / 或 (b) 含有 RASQSVRSNYLA(SEQ ID NO :8) 的轻链 CDR1、含有 GASSRAT(SEQ ID NO :9) 的轻链 CDR2 和 / 或含有 QQYSNFPI(SEQ ID NO :10) 的轻链 CDR3。在特定实施方式中,所述人类 Notch 受体是 Notch2。在某些实施方式中,所述抗体与人类 Notch2 和 Notch3 受体结合。在特定实施方式中,所述抗体与人类 Notch2 受体的 EGF10 和 / 或人类 Notch3 受体的 EGF9 结合。在另一实施方式中,本发明提供在竞争结合检测中与所述抗体竞争对 Notch2 的胞外域的非配体结合区的特异性结合的抗体。还提供了包含所述抗体的药物组合物和治疗癌的方法,所述方法包括施用治疗有效量的所述抗体。还提供抑制血管发生的方法,所述方法包括施用所述组合物。

[0036] 在上述方面或实施方式、以及本文别处所述其它方面和 / 或实施方式中每一特定实施方式中,所述抗体与人类 Notch2 和人类 Notch3 特异性结合。

[0037] 在上述方面或实施方式、以及本文别处所述其它方面和 / 或实施方式中每一特定实施方式中,所述抗体是重组抗体。在特定实施方式中,所述抗体是单克隆抗体。在特定实施方式中,所述抗体是嵌合抗体。在特定实施方式中,所述抗体是人源化抗体。在特定实施方式中,所述抗体是人类抗体。在某些实施方式中,所述抗体是单价的、双价的或多价的。在特定实施方式中,所述抗体是单特异性抗体。在特定实施方式中,所述抗体的各抗原 - 结合位点结合 (或能够结合) 超过一种人类 Notch 受体 (例如,Notch2 和 Notch3) 的胞外域的

非配体结合区。在某些替代性实施方式中,所述抗体是双特异性抗体。在特定实施方式中,所述抗体是 IgG1 抗体。在特定实施方式中,所述抗体是 IgG2 抗体。在特定实施方式中,所述抗体与细胞毒性基团 (cytotoxic moiety) 缀合。在特定实施方式中,所述抗体是分离的。在其它实施方式中,所述抗体基本上是纯化的。

[0038] 在上述方面或实施方式、以及本文别处所述其它方面和 / 或实施方式中每一特定实施方式中,用所述抗体治疗的癌或肿瘤是乳腺、结直肠、肺、胰腺、前列腺或头颈癌或肿瘤。在特定实施方式中,所述癌或肿瘤是黑色素瘤。在特定实施方式中,所述癌或肿瘤是乳癌或乳肿瘤。在特定实施方式中,所述癌或肿瘤是结直肠癌或结直肠肿瘤。在特定实施方式中,所述癌或肿瘤是胰腺癌或胰腺肿瘤。在特定实施方式中,所述癌或肿瘤是前列腺癌或前列腺肿瘤。

[0039] 在上述方面或实施方式、以及本文别处所述其它方面和 / 或实施方式中每一特定实施方式中,治疗癌的方法包括抑制肿瘤生长。在特定实施方式中,治疗癌的方法包括(例如,通过减少癌干细胞在肿瘤中的频率)减少肿瘤的致瘤性。

[0040] 在上述方面或实施方式、以及本文别处所述其它方面和 / 或实施方式中每一特定实施方式中,将所述拮抗剂或抗体与用于癌的有关治疗对受试对象组合施用。在特定实施方式中,所述用于癌的有关治疗包括放射治疗、化学治疗和 / 或其它抗体治疗剂。在某些实施方式中,所述其它用于癌的治疗包括化学治疗剂。在特定实施方式中,所述化学治疗包括紫杉醇(例如, TAXOL)、伊立替康、吉西他滨和 / 或奥沙利铂。在特定实施方式中,所述其它抗体治疗剂是特异性结合人类 Notch 受体(例如, Notch1、2、3 或 4) 或人类 Notch 受体配体(例如, DLL4 或 JAG1) 的抗体。在某些实施方式中,所述其它抗体治疗剂是抗 DLL4 抗体。在某些替代性实施方式中,所述其它抗体治疗剂是特异性结合血管内皮细胞生长因子 (VEGF) 的抗体。在特定实施方式中,其它治疗剂结合 VEGF 受体。

[0041] 在上述方面或实施方式、以及本文别处所述其它方面和 / 或实施方式中每一特定实施方式中,将所述抗体与第二治疗剂组合施用于受试对象,所述第二治疗剂是抗血管发生剂。

[0042] 本发明还提供包含或产生本文所述抗体或其它多肽的细胞系(例如,杂交瘤细胞系)。还提供包含本文所述多核苷酸的多核苷酸(例如,载体),包括编码本文所述多肽、或者抗体的轻链可变区或重链可变区的多核苷酸,以及包含所述多核苷酸的细胞系。

[0043] 在特定实施方式中,本发明提供治疗癌的方法,其中所述癌包含癌干细胞,所述方法包括对所述受试对象施用治疗有效量的结合 Notch 受体的抗体。在更具体的方面,本发明提供治疗癌的方法,其中所述癌包含表达一种或多种 Notch 受体家族成员的干细胞,所述方法包括对所述受试对象施用治疗有效量的结合这些 Notch 受体家族成员的抗体。本发明提供与人类 Notch 受体的胞外域的非配体结合域结合并且对于癌是治疗有效的抗体。因此,在特定实施方式中,本发明提供与人类 Notch 受体的胞外域的非配体结合区特异性结合并且抑制肿瘤生长的抗体。在特定实施方式中,本发明还提供治疗癌的方法,所述方法包括施用治疗有效量的抗体,所述抗体与人类 Notch 受体蛋白的胞外域的非配体结合区特异性结合并且抑制肿瘤生长。

[0044] 本文涉及使用可结合 Notch 受体家族成员或这些 Notch 受体的配体的抗体治疗这些癌症的各种优点。在某些实施方式中,某些 Notch 受体在某些实体瘤中(例如乳肿瘤或

结肠肿瘤中) 高度表达, 并且这提供活性药物的汇点 (sink), 其中所述药物与 Notch 受体结合。据预期, 结合过表达 Notch 受体的抗体比目前可获得的化学治疗药物具有更安全的特性。

[0045] 本发明还提供一种治疗人类癌症的方法, 其中包含癌干细胞的癌的特征不在于癌干细胞的一种或多种 Notch 受体的过表达, 所述方法包括对人施用治疗有效量的抗体, 所述抗体与 Notch 受体结合并且阻断 Notch 受体的配体激活。

[0046] 本发明还提供一种治疗人类癌症的方法, 所述方法包括对人施用治疗有效量的 (a) 结合 Notch 受体并抑制过表达 Notch 受体的癌干细胞的生长或增殖的第一抗体, 和 (b) 结合 Notch 受体并阻断 Notch 受体的配体激活的第二抗体。

[0047] 本发明还提供一种治疗癌的方法, 其中所述癌选自自由乳癌、结肠癌、直肠癌和结直肠癌组成的组, 所述方法包括施用治疗有效量的结合 Notch 的抗体。本发明还提供了另一治疗癌的方法, 其中所述癌选自自由乳癌、结肠癌、胰腺癌、前列腺癌、肺癌、直肠癌和结直肠癌组成的组, 所述方法包括施用治疗有效量的阻断 Notch 受体的配体激活的抗体。本发明还提供了另一治疗癌的方法, 其中所述癌选自自由乳癌、结肠癌、胰腺癌、前列腺癌、肺癌、直肠癌和结直肠癌组成的组, 所述方法包括施用治疗有效量的结合 Notch 的抗体和阻断 Notch 受体的配体激活的抗体。

[0048] 在另外的实施方式中, 本发明提供用于 (尤其在) 在上述方法中使用的制造品 (article)。例如, 本发明提供一种制造品, 所述制造品包括容器和容器中容纳的组合物, 其中所述组合物包含结合 Notch 的抗体, 还包含表明所述组合物可用于治疗包含癌干细胞的癌的药品说明书。在某些实施方式中, 本发明提供一种制造品, 所述制造品包括容器和容器中容纳的组合物, 其中所述组合物包含结合 Notch 的抗体, 还包含表明所述组合物可用于治疗包含癌干细胞的癌的药品说明书, 所述癌干细胞表达一种或多种 Notch 受体。

[0049] 在特定实施方式中, 本发明另外涉及一种制造品, 所述制造品包括容器和容器中容纳的组合物, 其中所述组合物包含结合 Notch 受体并且阻断 Notch 受体的配体激活的抗体, 还包含表明所述组合物可用于治疗癌的药品说明书, 其中所述癌包含特征不在于所述 Notch 受体的过表达的癌干细胞。

[0050] 在特定实施方式中, 提供一种制造品, 所述制造品包括 (a) 其中容纳组合物的第一容器, 其中所述组合物包含结合 Notch 受体并且抑制包含过表达 Notch 的癌干细胞的癌细胞的生长的第一抗体; 和 (b) 其中容纳组合物的第二容器, 其中所述组合物包含结合 Notch 并且阻断 Notch 受体的配体激活的第二抗体。

[0051] 在某些实施方式中, 提供另一种制造品, 所述制造品包括容器和容器中容纳的组合物, 其中所述组合物包含结合 Notch 并且阻断 Notch 受体的配体激活的抗体, 并且还包含表明所述组合物可用于治疗癌的药品说明书, 其中所述癌选自自由结肠癌、胰腺癌、前列腺癌、肺癌、直肠癌和结直肠癌组成的组。

[0052] 本发明另外提供: 结合 Notch 并且阻断 Notch 受体的配体激活的抗体 (例如, 人类抗体或人源化抗体); 包含所述抗体和药学上可接受的载体的组合物; 和包含缀合有细胞毒性剂的抗体的免疫缀合物。

[0053] 在一方面, 本发明提供一种分离的多核苷酸, 所述分离的多核苷酸编码上述方面以及本文别处所述其它方面 / 实施方式的任何抗体和 / 或多肽。在某些实施方式中, 本发

明提供包含所述多核苷酸的载体。在某些实施方式中,宿主细胞包含所述多核苷酸或所述载体。在其它实施方式中,生产所述抗体的方法包括培养包含所述多核苷酸的宿主细胞,从而表达所述多核苷酸,并且可选的是,所述方法还包括从宿主细胞培养物(例如,从宿主细胞培养基)回收所述抗体。

[0054] 另外,本发明提供编码上述实施方式或方面以及本文别处所述其它实施方式或方面所述的人源化抗体或人类抗体的分离的多核苷酸;包含所述多核苷酸的载体;包含所述多核苷酸或所述载体的宿主细胞;以及生产所述抗体的方法,所述方法包括培养包含所述多核苷酸的宿主细胞,从而表达所述多核苷酸,并且可选的是,所述方法还包括从宿主细胞培养物(例如,从宿主细胞培养基)回收所述抗体。

[0055] 本发明还涉及包含与一种或多种加利车霉素分子缀合的结合 Notch 的抗体的免疫缀合物,和所述缀合物在治疗表达 Notch 的癌,例如其中癌干细胞过表达 Notch 的癌中的应用。

[0056] 在根据马库什组或可选择要素的其它分组(包括以“和/或”或“或”隔开的可选择要素的组)描述了本发明的方面或实施方式的情况下,本发明不仅包括作为整体列出的整个组,还个别包括所述组的各成员和主要组的所有可能亚组,以及缺少一个或多个成员的主要组。本发明还设想到明确排除要求保护的发明中任何组成员中的一个或多个。例如,诸如“X 和 / 或 Y”等语言包括单独“X”、单独“Y”以及“在一起的 X”和“Y”。

附图说明

[0057] 图 1:59R1 抗体和变体结合人类 Notch2 并且阻断配体结合。(A)59R1Fab 与人类 Notch2 结合的 FACS 分析。“克隆 1”是显示与位于稳定转染的 HEK293 细胞上的人类 Notch2 结合的 59R1Fab。“克隆 5”是从噬菌体文库中分离的不结合 Notch2 的不同克隆的 Fab。(B)通过 59R1Fab 阻断配体(JAG1)结合的 FACS 分析。“克隆 1”是显示阻断 hJagged1 ECD-Fc 融合物与位于稳定转染的 HEK293 细胞上的人类 Notch2 结合的 59R1 Fab。“克隆 5”是从噬菌体文库中分离的在检测中不阻断配体结合的不同克隆的 Fab。(C)59R1 IgG2 抗体与位于稳定转染的 HEK293 细胞上的人类 Notch2 结合的 FACS 分析。59R1 IgG2 抗体显示与位于稳定转染的 HEK293 细胞上的人类 Notch2 结合。(D)通过 59R1IgG2 抗体阻断配体(DLL4)结合的 FACS 分析。59R1IgG2 抗体显示阻断 hDLL4ECD-Fc 融合物与位于稳定转染的 HEK293 细胞上的人类 Notch2 的结合。(E)用于 59R1 的重链 CDR3 亲和成熟策略。59R1 的重链 CDR3 的亲本序列示于框中。可行的残基改变示于该图中的亲本序列之下。(F)亲和成熟的 59R1 序列的 JAG1 阻断能力的筛选。改善的变体用箭头指出。

[0058] 图 2:59R1IgG2 抗体与四种人类 Notch 同源物的交叉反应性的 FACS 分析。发现 59R1 结合位于瞬时转染的 HEK-293 细胞上的 hNotch2 和 hNotch3,但是未发现其展示与相同细胞上的 hNotch1 和 hNotch4 的明显结合。

[0059] 图 3:59R1 抗体的表位作图。(A)抗 Notch2/3 抗体 59R1 与人类 Notch2 的 EGF 重复 10 结合。将来自表达重组 Notch2-Fc 融合蛋白的 HEK 293 细胞的上清液用于以抗 Notch2/3 抗体 59R1 进行的 ELISA,所述融合蛋白具有在 1 至 12(x 轴)的指出的 Notch2 的 EGF 重复。OD(y 轴)表示抗体仅与包含 EGF 重复 10 的 Notch2 融合蛋白结合(阴影线棒)。(该图显示分别示于上图和下图的从两个单独实验获得的数据。)(B)EGF 重复 11 和 12 不参与

抗 Notch2/3 抗体 59R1 与全长 hNotch2 的结合。用绿色荧光蛋白 (GFP) (x 轴) 单独 (左上) 转染或用 GFP 与全长完整 Notch2 共转染或用 GFP 与缺失 EGF 重复 11 (Δ EGF11) 或缺失 EGF 重复 12 (Δ EGF12) 的全长 Notch 2 共转染的 HEK 293 细胞的 FACS 分析。对于在 GFP- 表达细胞中的所有三种 Notch2 蛋白,沿 y 轴 (PE) 表示 59R1 的结合。(C)EGF 重复 10 参与抗 Notch2/3 抗体 59R1 与全长 hNotch2 的结合,但不参与配体结合。通过与 hNotch2 的 EGF 1-4 结合的抗 Notch2 抗体 59M70 进行的结合表示为“抗 Notch2 结合”。通过 DLL4 进行的结合表示为“配体结合”。

[0060] 图 4:抗 Notch2/3 抗体 59R1 抑制荧光素酶报告子检测中的 Notch2 信号传导。(A)59R1 阻断 hDLL4- 诱导的 Notch2 报告子活性。(B)59R1 阻断 hJAG1- 诱导的 Notch2 报告子活性。(C)59R1 阻断 hJAG2- 诱导的 Notch2 报告子活性。

[0061] 图 5:Notch2/3 受体抗体 59R1 体内抑制肿瘤形成和生长。(A) 抗 Notch2/3 (59R1) 抑制 PE13 乳肿瘤的形成。PE13 乳瘤细胞注射两天后,用对照抗体 (正方形) 或抗 Notch2/3 抗体 59R1 (空心三角) 治疗注射有 PE13 乳瘤细胞的 NOD/SCID 小鼠,并且测定肿瘤随时间 (x 轴,细胞注射后天数) 的体积 (y 轴,mm³)。与对照相比,用 59R1 抗体进行的治疗显著抑制肿瘤形成 ($p < 0.001$)。(B) 抗 Notch2/3 (59R1) 抑制 T3 乳瘤的形成。T3 乳瘤细胞注射两天后,用对照抗体 (正方形) 或抗 Notch2/3 抗体 59R1 (空心三角) 治疗注射有 T3 乳瘤细胞的 NOD/SCID 小鼠,并且测定肿瘤随时间 (x 轴,细胞注射后天数) 的体积 (y 轴,mm³)。与对照相比,用 59R1 抗体进行的治疗显著抑制肿瘤形成 ($p < 0.001$)。(C) 抗 Notch2/3 (59R1) 抑制 Colo-205 结肠瘤的生长。肿瘤体积达到 65mm³ ~ 200mm³ 的尺寸后,用对照抗体 (正方形) 或抗 Notch2/3 抗体 59R1 (菱形) 治疗用 Colo-205 结肠瘤细胞注射的 6 ~ 8 周大的免疫缺陷 bg/nu XID 雌性小鼠,所述小鼠具有 Swiss CD-1 背景。测定随时间 (x 轴,细胞注射后天数) 的平均肿瘤体积 (y 轴,mm³)。与对照相比,用 59R1 抗体进行的治疗抑制肿瘤生长 (40 天后 *** $p < 0.001$)。(D) 抗 Notch2/3 (59R1) 抑制 PN4 胰腺瘤的生长。肿瘤体积达到 65mm³ ~ 200mm³ 的尺寸后,用对照抗体 (正方形) 或抗 Notch2/3 抗体 59R1 (菱形) 治疗注射有 PN4 胰腺瘤细胞的 NOD/SCID 小鼠。测定随时间 (x 轴,细胞注射后天数) 的平均肿瘤体积 (y 轴,mm³)。与对照相比,用 59R1 抗体进行的治疗抑制肿瘤生长 (70 天后 *** $p < 0.001$)。(E) 抗 Notch2/3 (59R1) 抑制 PE13 乳瘤的生长。肿瘤体积达到 65mm³ ~ 200mm³ 的尺寸后,用对照抗体 (正方形) 或抗 Notch2/3 抗体 59R1 (菱形) 治疗注射有 PE13 乳瘤细胞的 NOD/SCID 小鼠。测定随时间 (x 轴,细胞注射后天数) 的平均肿瘤体积 (y 轴,mm³)。与对照相比,用 59R1 抗体进行的治疗抑制肿瘤生长 (57 天后 * $p < 0.05$)。(F) 抗 Notch2/3 (59R1) 抑制 T3 乳瘤的生长。肿瘤体积达到 65mm³ ~ 200mm³ 的尺寸后,用对照抗体 (实心柱) 或抗 Notch2/3 抗体 59R1 (空心柱) 治疗注射有 T3 乳瘤细胞的 NOD/SCID 小鼠。在细胞注射后第 18、25、39 和 42 天测定平均肿瘤体积。与对照相比,用 59R1 抗体进行的治疗抑制肿瘤生长 (在第 42 天 *** $p < 0.001$)。

[0062] 图 6:抗 Notch2/3 抗体 59R1 延迟紫杉醇治疗后的乳瘤复发。

[0063] 图 7:抗 Notch2/3 抗体 59R1 减少 B51 乳瘤中癌干细胞的频率。

[0064] 图 8:与吉西他滨组合,抗 Notch2/3 抗体 59R1 抑制 PN4 胰腺瘤的生长。

[0065] 图 9:抗 Notch2/3 抗体 59R1 抑制 M4 黑色素瘤异种移植物模型中的肿瘤生长。

[0066] 图 10:抗 Notch2/3 抗体 59R1 可单独抑制 C28 结肠瘤的生长,也可与伊立替康组

合抑制 C28 结肠瘤的生长。

[0067] 图 11 :59R1IgG2 抗体显著抑制体内已建立的人类肿瘤异种移植物的肿瘤生长。每周一次以 15mg/kg 的标出的抗体 (1B711, LZ-1 对照抗体, 黑色正方形 ;59R1, 黑色三角形 ;阿瓦斯汀, 黑色圆形 ;阿瓦斯汀 +59R1, 黑色菱形) 治疗已建立的 Colo-205 (A)、C8 (B)、PN8 (C)、B34 (D)、B39 (E)、B44 (F)、PE-13 (G) 和 T1 (H) 肿瘤 (皮下, $n = 10/$ 组)。肿瘤体积 (x 轴) 相对于时间 (y 轴) 绘图。在 Colo-205 异种移植模型中, 59R1 与 AVASTIN 的组合治疗比任一抗体单独治疗显著地更有效。图 11B 至 11H 中, 星号表示在所示天时的显著肿瘤生长抑制 :*, $P < 0.05$;**, $P < 0.01$;***, $P < 0.001$, 学生 t 检验 ;符号 (Symbols), 平均值 ;误差棒, SEM。

[0068] 图 12 :在各种异种移植肿瘤模型中 59R1 治疗显著调节了所选择基因的相对表达水平。从之前测试的异种移植模型通过TaqMan®分析单独测试 HEYL (A)、Notch3 (B)、RGS5 (C)、ANGPT1 (D) 和 ANGPT2 (E) 的表达水平。值得注意的是, 缺乏雌激素 (ne) 终止了 59R1 在减少携带有 T1 的小鼠的宿主间质中的 ANGPT1 和 ANGPT2 表达方面的作用。空心圆对应于所分析的各种肿瘤。水平线, 平均值。

[0069] 图 13 :肿瘤抑制子 PTEN 基因在许多 59R1 显示出抗肿瘤功效的乳瘤中缺失。显示了 PTEN 外显子、Affymetrix 探针分布和染色体 10 中 PTEN 基因的缺失。深灰和浅灰阴影条分别表示染色体片段的纯合缺失和杂合缺失。

[0070] 图 14. 59R1 抗体的表位作图。(A) 人类 Notch 同源物的蛋白比对。通过 CloneManager 软件进行所述比对。所示的是人类 Notch1、Notch2 和 Notch4 的 EGF 10 重复以及人类 Notch3 中的等效 EGF。框区表示含有一个或多个氨基酸的区域, 所述一个或多个氨基酸组成通过 59R1 IgG2 抗体与 hNotch2 H385N AL 388-89SN 突变体 (图 14B) 和与其中 aa 382-386 已经突变成对应 hNotch2 序列的 hNotch1 构建体 (图 14C) 的 FACS 结合定义的 59R1 表位的至少一部分。(B) 59R1 IgG2 抗体与 hNotch2 结合, 但不与其中某些 EGF 10 残基已突变成 hNotch1 残基的突变体 hNotch2 (H385N AL 388-89SN) 结合。(C) 59R1 IgG2 抗体不与 hNotch1 结合, 但与其中某些 EGF 10 残基 (aa382-387) 已突变成匹配 hNotch2 残基 385-389 的突变体 hNotch1 结合。

[0071] 图 15. 59R5 的体外表征。(A) 图 15A 显示抗体 59R5 能够阻断 Notch2 和 Notch3 的配体 - 诱导的信号传导。对 PC3 肿瘤细胞用人类或小鼠 Notch 受体 (hN2, 人类 Notch2 ; mN2, 鼠类 Notch2 ; hN3, 人类 Notch3 ; mN3, 鼠类 Notch3) 和 GFP 诱导型报告子构建体瞬时转染。使经转染细胞与不同浓度的抗体 59R1 和 59R5 在被动固定的 DLL4Fc 的存在下一起温育。(B) 图 15B 显示 59R5 结合与 59R1 类似的表位。对 HEK 293 细胞用编码人类 Notch2、人类 Notch1 或残基 382-386 突变成相应的人类 Notch2 残基的人类 Notch1 的表达载体瞬时转染。还用编码绿色荧光蛋白 (GFP) 的质粒对细胞进行共转染, 从而标记接受所转染质粒的那些细胞。使细胞与 59R1 或 59R5 以及荧光第二抗体一起温育, 然后通过 FACS 进行检查。通过框突出显示的区域表明用所示 Notch 表达载体转染的细胞能够与 59R1 或 59R5 结合。

[0072] 图 16. Notch 受体抗体 59R5 抑制体内肿瘤形成和生长。图 16A 显示使用抗体 59R5 对 PE13 乳瘤细胞进行的体内治疗。图 16B 显示使用抗体 59R5 对 C28 结肠细胞进行的体内治疗。图 16C 显示使用抗体 59R5 对 Colo205 结肠细胞进行的体内治疗。

[0073] 图 17. 组合治疗中使用 Notch2/3 抗体 59R5 对肿瘤的体内治疗。(A) 用 PN8 胰腺瘤细胞注射小鼠。使肿瘤生长 33 天直到它们达到 120mm^3 的平均体积。将对照 Ab(正方形)、59R1(三角形)或 59R5(圆形)与每周一次 $20\text{mg}/\text{kg}$ 的吉西他滨组合治疗所述动物 4 周。(B) 用 PE13 乳瘤细胞注射小鼠。开始治疗前使肿瘤生长 40 天。每周两次用 $15\text{mg}/\text{kg}$ 的紫杉醇加上对照抗体(正方形)或 59R5(圆形)治疗所述动物 5 周。5 周后,停止紫杉醇治疗,继续抗体治疗。

[0074] 图 18. 用抗体 59R5 治疗后肿瘤中基因表达的调节。图 18 显示用 59R1、59R5 或对照抗体治疗后,所选择基因在间质细胞中的表达水平和所选择人类基因在 PE13 肿瘤细胞中的表达水平。

[0075] 图 19. 59R1 对 PE13 乳癌干细胞频率的降低。(A) 用对照抗体、紫杉醇加上对照抗体,59R1 或紫杉醇加上 59R1 治疗已建立的肿瘤。治疗 3 周后收获肿瘤,进行处理,并将来自四个治疗组中每一组的连续滴定的细胞移植到新的小鼠组(每细胞剂量 $n = 10$)中。75 天后确定肿瘤生长速率。利用 L-calc 程序(Stem Cell Technologies, Inc.) 使用生长 75 天后的肿瘤生长速率来计算 CSC 频率。(B) 用 59R1 和 / 或紫杉醇治疗后癌干细胞在 PE13 乳瘤中的频率。(C) 用 59R1 和 / 或吉西他滨治疗后癌干细胞在 PN4 胰腺瘤中的频率。(D) 用 59R5 和 / 或紫杉醇治疗后癌干细胞在 PE13 乳瘤中的频率。单星号表示相对于对照抗体治疗组的统计学显著差异 ($p < 0.05$), 双星号表示相对于紫杉醇和对照抗体治疗组的显著差异。

具体实施方式

[0076] 本发明提供了与一种或多种人类 Notch 受体(例如 Notch2 和 / 或 Notch3)结合的新型试剂,包括但不限于诸如抗体等多肽。所述 Notch 结合剂包括人类 Notch 受体的拮抗剂。还提供了相关的多肽和多核苷酸,包含 Notch 结合剂的组合物,以及制备 Notch 结合剂的方法。还提供了使用所述新型 Notch 结合剂的方法,例如抑制肿瘤生长、抑制血管发生和 / 或治疗癌或其它血管发生相关疾病的方法。

[0077] 本发明还鉴定了与人类 Notch 受体的胞外域的非配体结合区特异性结合并抑制体内肿瘤生长的分子(例如抗体)。已经将是配体结合充要条件的 Notch 的配体结合区,鉴定为 EGF 重复 11 和 12,表明 Notch 受体的该区在 Notch 信号传导和肿瘤发生中是重要的(Rebay 等,1991,Cell67:687;Lei 等,2003,Dev. 130:6411;Hambleton 等,2004,Structure 12:2173)。预料之外的是,已经发现在人类 Notch 受体的胞外域的配体结合域的外部结合的抗体抑制体内肿瘤细胞生长(参见美国专利公开第 2008/0131434 号,通过引用将其整体并入本文)。因此,在一种或多种人类 Notch 受体 Notch1、Notch2、Notch3 和 Notch4- 的胞外域的配体结合域外部结合的抗体具有作为潜在的癌治疗剂的价值。

[0078] 已经鉴定出与含有人类 Notch2 的 EGF 重复 10 内的残基的表位特异性结合的抗体(实施例 1 和 3 以及图 3A-3C)。抗体 59R1 抑制配体与 Notch2 的结合(实施例 1 和图 1A-1D),并且抑制配体诱导的 Notch2 信号传导(实施例 4 和图 4A-4C),不过可与 Notch2 在配体结合区外的区域中结合。59R1 还特异性结合人类 Notch3(实施例 2 和图 2)。已经发现所述抗体可单独地或与第二抗癌剂组合时防止或抑制各种不同的异种移植模型中的体内肿瘤细胞生长(实施例 5、6、7 和 9 以及图 5A-F、6、8-10 和 11A-H)。所述抗体还通过

减少癌干细胞的频率而显示出减少多种异种移植物模型中体内肿瘤的致瘤性（实施例 8 和 23 以及图 7 和 19A-C）。另外，发现使用 59R1 的治疗下调 RGS5（一种周细胞和 / 或血管平滑肌细胞的标记物）、Notch3 和 HeyL 在各种肿瘤的间质中的表达（实施例 10 和图 12A-E），和上调乳瘤和结肠瘤中的缺氧（实施例 11）。不受理论限制，这些数据表明 59R1 抗体对肿瘤血管发生具有抑制效果，这至少部分是由于对周细胞和 / 或血管平滑肌细胞的功能的调节。还发现使用 59R1 的治疗调节乳瘤中的其它基因。发现 59R1 下调了细胞周期基因途径、myc- 激活基因和几种干细胞基因集（实施例 22）。

[0079] 还开发出另外的人类抗体 59R5。59R5 具有与 59R1 相似的性质，例如与 Notch2 和 Notch3 相似的结合亲和性和它们表位的相似性或重叠（实施例 13 和图 15B）。已经显示抗体 59R5 在阻断 Notch2 和 Notch 3 信号传导方面具有与 59R1 相似的活性（实施例 13 和图 15A）。还显示该 59R5 抗体可单独地或与第二抗癌剂组合时抑制几种异种移植物模型中体内肿瘤生长（实施例 14 和 15 以及图 16A-C 和 17A-B）。另外，已经发现使用 59R5 进行的治疗与使用 59R1 的治疗类似，下调各种肿瘤的间质中 RGS5、Notch3 和 HeyL 的表达，并且还发现 59R5 治疗将肿瘤细胞中人类基因 ID4、EDNRA 和 EGLN3 的表达调节至与 59R1 相似的程度（实施例 16）。59R5 还显示通过减少癌干细胞的频率而减少异种移植物模型中的体内致瘤性（实施例 23 和 19D）。

[0080] 定义

[0081] Notch 受体的“拮抗剂”是包括部分或全部阻断、抑制或中和 Notch 途径的生物学活性的任何分子的术语。合适的拮抗剂分子特别包括拮抗性抗体或抗体片段。

[0082] 使用术语“抗体”来指通过至少一个位于免疫球蛋白分子的可变区内的抗原识别位点，识别和特异性结合诸如蛋白、多肽、肽、糖类、多核苷酸、脂质或上述物质的组合等靶标的免疫球蛋白分子。如本文所用，该术语包括完整的多克隆抗体、完整的单克隆抗体、抗体片段（例如 Fab、Fab'、F(ab')₂ 和 Fv 片段）、单链 Fv (scFv) 突变体、由至少两个完整抗体产生的诸如双特异性抗体等多特异性抗体、包含抗体部分的融合蛋白和任何其它包含抗原识别位点的经修饰免疫球蛋白分子，只要所述抗体显示所需的生物活性。基于分别称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 的抗体重链恒定域的同源性，抗体可以是五个主要种类免疫球蛋白中的任一种：IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM，或其亚类（同型）（例如，IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2）。不同种类的免疫球蛋白具有不同的众所周知的亚基结构和三维构造。抗体可以是裸露的或与诸如毒素、放射性同位素等其它分子缀合。

[0083] 如本文所用，术语“抗体片段”表示完整抗体的一部分，和表示完整抗体的抗原性决定可变区。抗体片段的实例包括，但不限于 Fab、Fab'、F(ab')₂ 和 Fv 片段、线性抗体、单链抗体和由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0084] “Fv 抗体”是指含有完整抗原识别和抗原结合位点的最小抗体片段，可以是其中一个重链和一个轻链可变域形成非共价二聚体的双链，也可以是其中一个重链和一个轻链可变域通过柔性肽连接子共价连接的单链 (scFv)，从而使得 2 条链以类似的二聚结构连接。在该构造中各可变域的互补决定区 (CDR) 相互作用从而限定出 Fv 二聚体的抗原结合特异性。作为选择，可以使用单可变域（或 Fv 的一半）来识别和结合抗原，虽然通常而言亲和性较低。

[0085] 本文所用的“单克隆抗体”是指涉及高度特异性识别和结合单抗原决定簇（或

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

[0086] 如本文所用,术语“人源化抗体”是指非人类(例如鼠类)抗体的形式,其为含有最小非人类序列的特异性免疫球蛋白链、嵌合免疫球蛋白或其片段。通常而言,人源化抗体是其中互补决定区(CDR)的残基被非人类物种(例如小鼠、大鼠、兔、仓鼠等)的具有所需特异性、亲和性和能力的CDR的残基置换的人类免疫球蛋白。在某些情况下,人类免疫球蛋白的Fv框架区(FR)残基被来自非人类物种的具有所需特异性、亲和性和能力的抗体中的相应残基置换。可以通过在Fv框架区中和/或在经置换的非人类残基内取代另外的残基而进一步修饰所述人源化抗体,从而改善和优化抗体特异性、亲和性和/或能力。通常,人源化抗体会包含基本上不少于(all of)至少一个,通常两个或三个可变域,所述可变域含有所有,或基本上所有的与非人类免疫球蛋白对应的CDR区,而所有,或基本上所有的FR区是人类免疫球蛋白共有序列的FR区。所述人源化抗体还可以包含免疫球蛋白(通常为人类免疫球蛋白)恒定区或域(Fc)的至少一部分。用于产生人源化抗体的方法的实例描述于美国专利第5,225,539号,通过参考将其并入本文。

[0087] 抗体的“可变区”是指单独的或组合的抗体轻链的可变区和/或抗体重链的可变区。重链和轻链的可变区各由通过三个还称为高变区的互补决定区(CDR)连接的四个框架区(FR)组成。各链中的CDR通过FR邻近(in close proximity)保持在一起,并且与来自另一链的CDR帮助形成抗体的抗原结合位点。至少有两种用于确定CDR的技术:(1)基于跨物种序列变异性的方法(即,Kabat等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,(第5版,1991,National Institutes of Health,Bethesda Md.));和(2)基于抗原-抗体复合物的晶体学研究的方法(Al-lazikani等,1997,J.Molec.Biol.273:927-948)。另外,本领域有时使用这两种方法的组合来确定CDR。

[0088] 本文使用的术语“人类抗体”是指由人类产生的抗体或通过使用本领域已知的任何技术制备的具有与由人类产生的抗体相应的氨基酸序列的抗体。人类抗体的该定义包括完整或全长抗体、其片段和/或包含至少一个人类重链和/或轻链多肽的抗体,例如,包含鼠类轻链和人类重链多肽的抗体。

[0089] “杂交抗体”是其中将来自具有不同抗原决定簇区域的重链和轻链对组装在一起,从而使得所得四聚体可以识别和结合两个不同的表位或两个不同的抗原的免疫球蛋白分子。

[0090] 术语“嵌合抗体”是指其中免疫球蛋白分子的氨基酸序列源自两个以上物种的抗体。通常而言,轻链和重链的可变区对应于源自一个哺乳动物物种(例如,小鼠、大鼠、兔等)的具有所需特异性、亲和性和/或能力的抗体的可变区,而恒定区与源自另一物种(通常是人类)的抗体中的序列具有同源性,从而避免引发该物种中的免疫应答。

[0091] 术语“表位”或“抗原决定簇”在本文中可相互替换地使用,并且是指抗原的能够被特定抗体识别和特异性结合的那部分。当抗原是多肽时,表位可由连续的氨基酸形成和由通过蛋白的三级折叠而并置的不连续氨基酸形成。当蛋白变性时通常会保留由连续的氨

氨基酸形成的表位,而当蛋白变性时通常会失去通过三级折叠形成的表位。在单独空间构象中表位通常包括至少 3 个,或更经常至少 5 个或 8 个至 10 个氨基酸。

[0092] 通过其中所研究的免疫球蛋白抑制参照抗体与通用抗原的特异性结合的检测来确定抗体之间的竞争。已知许多类型的竞争性结合检测,例如:固相直接或间接放射免疫检测(RIA)、固相直接或间接酶免疫检测(EIA)、夹心竞争检测(参见 Stahh 等,1983, *Methods in Enzymology* 9:242-253);固相直接生物素-亲和素 EIA(参见 Kirkland 等, *J. Immunol.* 1986,137:3614-3619);固相直接标记的检测、固相直接标记的夹心检测(参见 Harlow 和 Lane,1988, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press);使用 I-125 标签的固相直接标记 RIA(参见 Morel 等,1988, *Molec. Immunol.* 25(1):7-15);固相直接生物素-亲和素 EIA(Cheung 等,1990, *Virology* 176:546-552);和直接标记的 RIA(Moldenhauer 等,1990, *Scand. J Immunol.*, 1990,32:77-82)。通常而言,所述检测包括使用与固体表面或携带未标记的测试免疫球蛋白和经标记的参照免疫球蛋白中任一细胞结合的经纯化抗原。通过确定在测试免疫球蛋白的存在下与固体表面或细胞结合的标签的量来测定竞争性抑制。通常测试免疫球蛋白是过量存在的。通过竞争检测鉴定出的抗体(竞争性抗体)包括与参照抗体结合相同表位的抗体,和与相邻表位结合的抗体,该相邻表位与参照抗体所结合的表位足够近,从而使得出现空间位阻。通常而言,当竞争性抗体过量存在时,其会将参照抗体与通用抗原的特异性结合抑制至少 50% 或 75%。

[0093] 抗体与表位或受体“选择性结合”或“特异性结合”是指抗体与该表位或受体的反应或结合比与其它物质(包括不相关蛋白)的反应或结合更频繁、更迅速、持久性更高、亲和性更高或上述情况的某些组合。“选择性结合”或“特异性结合”例如是指,抗体与蛋白结合的 K_D 为约 0.1mM 以下,更通常为约 1 μ M 以下。“选择性结合”或“特异性结合”有时是指,抗体与蛋白结合的 K_D 为约 0.1mM 以下,有时为约 1 μ M 以下,有时为约 0.1 μ M 以下,有时为约 0.01 μ M 以下或有时为约 1nM 以下。由于不同物种中同源性蛋白之间的序列同一性,特异性结合可以包括识别超过一个物种中 Notch 受体的抗体。类似地,由于不同 Notch 受体(例如,Notch2 和 Notch3)之间在受体的多肽序列的特定区中的同源性,特异性结合可以包括识别超过一种 Notch 受体的抗体。应该理解,在特定实施方式中,与第一靶标特异性结合的抗体或结合部分可以与第二靶标特异性结合或不与第二靶标特异性结合。这样,“特异性结合”不必然地需要(尽管其可以包括)专一性结合,即,与单个靶标结合。因此,在特定实施方式中,抗体可以与超过一个靶标(例如,人类 Notch2 和 Notch3)特异性结合。在特定实施方式中,多种靶标可以被所述抗体上的相同抗原结合位点结合。例如,在特定情况下,抗体可以包含两个相同的抗原结合位点,其每一个位点特异性结合两种以上人类 Notch 受体(例如,人类 Notch2 和 Notch3)。在某些替代性实施方式中,抗体可以具有双特异性,并且包含至少两个具有不同特异性的抗原结合位点。借助于非限制性实例,双特异性抗体可以包含识别位于一种 Notch 受体(例如人类 Notch2)上的表位的一个抗原结合位点,并且还包含识别位于另一种 Notch 受体(诸如人类 Notch3)上的不同表位的另一不同抗原结合位点。通常而言,但不是必然地,本文“结合”是指“特异性结合”。

[0094] 如本文所用,当提到抗体与蛋白或肽的相互作用而使用时术语“非特异性结合”和“背景结合”,是指不依赖于特定结构的存在的相互作用(即,所述抗体一般性地与蛋白结合而不是与诸如表位等特定结构结合)。

[0095] 术语“分离的”或“纯化的”是指实质上或基本上不含在该材料的天然状态下通常附带的组分材料。通常使用诸如聚丙烯酰胺凝胶电泳或高效液相色谱等分析化学技术确定纯度和均一性。作为制剂中存在的主要物种 (species) 的蛋白 (例如抗体) 或核酸是基本上纯的。特别地, 将分离的核酸与开放阅读框分离, 所述开放阅读框天然地位于所述基因侧翼并且编码除了由所述基因编码的蛋白之外的蛋白。将分离的抗体与其它非免疫球蛋白和其它具有不同抗原结合特异性的免疫球蛋白分离。其还可以指核酸或蛋白具有至少 85% 的纯度、具有至少 95% 的纯度和在某些实施方式中, 具有至少 99% 的纯度。

[0096] 如本文所用, 术语“癌 (cancer)”或“癌性的 (cancerous)”是指或描述其中一群细胞的特征在于失调的细胞生长的哺乳动物中的生理状况。癌的实例包括, 但不限于, 癌、淋巴瘤、母细胞瘤、肉瘤和白血病。更特别地, 所述癌的实例包括: 鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌、肺鳞状细胞癌、腹膜癌、肝细胞癌、胃肠癌、胰腺癌、成胶质细胞瘤、子宫颈癌、卵巢癌、肝脏癌 (liver cancer)、膀胱癌、肝细胞瘤、乳癌、结肠癌、结直肠癌、子宫内膜或子宫癌、唾液腺癌、肾癌、肝脏癌 (liver cancer)、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌 (hepatic carcinoma) 和各种类型的头颈癌。

[0097] 术语“增殖性障碍”和“增殖性疾病”是指与异常细胞增殖有关的障碍, 如癌。

[0098] 本文所用的“肿瘤”和“赘生物”是指任何由过度的细胞生长或增殖导致的组织的团块, 其可以是良性的 (非癌的) 或恶性的 (癌的), 包括癌前病变。

[0099] 本文所用的“转移”是指癌从原始位置扩散或转移到身体的其它区域的过程, 并且伴随着位于新位置处的类似的癌病变的发生。“转移”或“转移性”细胞是失去与相邻细胞的粘附接触并且经由血流或淋巴从疾病的原发位置迁移从而侵袭邻近的身体结构的细胞。

[0100] 如本文所用, 术语“受试对象”是指任何动物 (例如, 哺乳动物), 包括但不限于人、非人灵长类动物和啮齿类动物等, 其是特定治疗的接收者。通常而言, 对于人类受试对象, 术语“受试对象”和“患者”在本文中可相互替换地使用。

[0101] 术语“癌干细胞”或“肿瘤干细胞”或“实体瘤干细胞”在本文中可相互替换地使用, 并且指具有以下性质的实体瘤的细胞群: (1) 具有广泛的增殖能力; (2) 能够进行不对称细胞分裂从而产生增殖或发育潜能减少的一种以上分化子代; 和 (3) 能够进行对称分裂以用于自我更新或自我维持。当连续移植到免疫妥协小鼠时, 与不能形成肿瘤的大多数肿瘤细胞相比, “癌干细胞”或“肿瘤干细胞”或“实体瘤干细胞”的这些性质赋予这些癌干细胞以形成可察觉的肿瘤的能力。癌干细胞以无序方式进行自我更新而不是分化, 从而形成具有异常细胞类型的肿瘤, 当发生突变时所述异常细胞类型可以随时间而改变。

[0102] 术语“癌细胞”或“肿瘤细胞”和语法等效物是指源自肿瘤的全部细胞群体, 包括占肿瘤细胞群大部分的非致瘤性细胞和致瘤性干细胞 (癌干细胞)。

[0103] 如本文所用, “致瘤性的”是指实体瘤干细胞的功能特征, 包括自我更新 (产生另外的致瘤性癌干细胞) 的性质和增殖以产生所有其它肿瘤细胞 (产生分化的因而非致瘤性的肿瘤细胞) 的性质, 从而使实体瘤干细胞形成肿瘤。

[0104] 如本文所用, 肿瘤的“致瘤性”是指当连续移植到免疫妥协小鼠时, 来自肿瘤的细胞的随机样品形成可察觉的肿瘤的能力。

[0105] 如本文所用, 术语“干细胞癌标记”或“癌干细胞标记”或“肿瘤干细胞标记”或“实体瘤干细胞标记”是指基因, 或由基因表达的蛋白、多肽或肽, 与非致瘤性细胞相比, 所述基

因的表达水平（单独或与其它基因组合）与致瘤性癌细胞的存在相关。该相关可以涉及基因的表达增加或减少（例如，mRNA 或由所述基因编码的肽的水平增加或减少）。

[0106] 术语“癌干细胞基因标签”或“肿瘤干细胞基因标签”或“癌干细胞标签”在本文中可相互替换地使用，来指包含与其它细胞或细胞群体（例如正常乳腺上皮组织）相比在癌干细胞中差异性表达的基因的基因标签。在某些实施方式中癌干细胞基因标签包含与正常乳腺上皮相比在癌干细胞中差异性表达的基因，所述表达差异成倍变化，例如表达减少 / 或增加 2 倍，并且还通过统计学分析，例如根据多个样品间的 t 检验的 P 值来进一步限制。在另一实施方式中，将在癌干细胞中差异性表达的基因基于其表达与所选择基因的相关性以及表达改变的倍数或百分比，分成各种癌干细胞基因标签。癌干细胞标签是临床变化方面（包括但不限于转移和死亡）是可回顾和前瞻性预期的。

[0107] 如本文所用术语“遗传测试”是指对患者或患者肿瘤样品的遗传组成进行分析的程序。该分析可以包括检测 DNA、RNA、染色体、蛋白或代谢物，从而检测可遗传的或与身体疾病相关的基因型或核型以用于临床目的。

[0108] 如本文所用，术语“活检样”或“活检组织”是指出于确定所述样品是否含有癌组织的目的而从受试对象中取得的组织或流体的样品。在某些实施方式中，由于受试对象疑似患有癌而获得活检组织或流体。然后检查活检组织或流体是否存在癌。

[0109] 如本文所用，“可接受的药物载体”是指当与药物组合物的活性成分（例如抗体）组合时，允许所述抗体例如保留其生物活性的任何材料。另外，“可接受的药物载体”在接受者受试对象中不触发免疫应答。实例包括，但不限于任何标准的药物载体，例如磷酸盐缓冲的盐水溶液、水、各种油 / 水乳液。某些用于气溶胶或胃肠外施用的稀释剂是磷酸盐缓冲的盐水或生理（0.9%）盐水。

[0110] 术语“治疗有效量”是指对于“治疗”受试对象或哺乳动物中的疾病或障碍有效的抗体、多肽、多核苷酸、小有机分子或其它药物的量。在癌的情况下，治疗有效量的药物可以减少癌细胞的数量；减少肿瘤尺寸；抑制或停止癌细胞向周围器官中的浸润；抑制和停止肿瘤转移；抑制和停止肿瘤生长；某种程度上减轻与癌有关的一种或多种症状；或所述效应的组合。在药物阻止生长和 / 或杀死现有的癌细胞的情况下，可将其称为具有细胞抑制性和 / 或细胞毒性。

[0111] 诸如“治疗”或“处理”或“要治疗”或“缓解”或“要缓解”等术语是指 1) 治愈、减慢、减轻诊断的病理性状况或障碍的症状，和 / 或使诊断的病理性状况或障碍的进展停止的治疗措施；和 2) 防止或减缓所靶向的病理性状况或障碍的发展的预防性或防备性措施。因此需要治疗的受试对象包括已经患有疾病的受试对象；有倾向患疾病的受试对象和要预防疾病的受试对象。如果所述患者显示出以下情况的一种或多种，则根据本发明的方法成功地“治疗”了受试对象：癌细胞的数量减少或完全不存在、肿瘤尺寸的减少；对癌细胞向外围器官的浸润（包括癌向软组织和骨的扩散）的抑制或不存在；肿瘤转移的抑制或不存在；肿瘤生长的抑制或不存在；减轻一种或多种与特定癌相关的症状；发病率和致死率减少；和生活质量改善。因此，在特定实施方式中，癌的治疗包括受试对象中肿瘤生长的抑制。

[0112] 如本文所用，术语“多核苷酸”或“核酸”是指由许多经由磷酸二酯键连接的核苷酸单元（核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸或相关的结构变体）组成的聚合物，包括但不限于，DNA 或 RNA。该术语包括含有 DNA 和 RNA 的任何已知碱基类似物的序列，所述碱基类似物包

括但不限于,4-乙酰胞嘧啶、8-羟基-N6-甲基腺苷、吡丙啶基胞嘧啶、假异胞嘧啶、5-(羧基羟甲基)尿嘧啶、5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-羧基甲基氨基甲基-2-硫尿嘧啶、5-羧基甲基氨基甲基尿嘧啶、二氢尿嘧啶、肌苷、N6-异戊烯基腺嘌呤、1-甲基腺嘌呤、1-甲基假尿嘧啶、1-甲基鸟嘌呤、1-甲基肌苷、2,2-二甲基鸟嘌呤、2-甲基腺嘌呤、2-甲基鸟嘌呤、3-甲基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、N6-甲基腺嘌呤、7-甲基鸟嘌呤、5-甲基氨基甲基尿嘧啶、5-甲氧基氨基甲基-2-硫尿嘧啶、 β -D-甘露糖基 Q 苷、S'-甲氧基羰基甲基尿嘧啶、5-甲氧基尿嘧啶、2-甲基硫代-N6-异戊烯基腺嘌呤、尿嘧啶-5-氧乙酸甲基酯、尿嘧啶-5-氧乙酸、氧丁苷 (oxybutoxosine)、假尿嘧啶、Q 苷、2-硫胞嘧啶、5-甲基-2-硫尿嘧啶、2-硫尿嘧啶、4-硫尿嘧啶、5-甲基尿嘧啶、N-尿嘧啶-5-氧乙酸甲酯、尿嘧啶-5-氧乙酸和 2,6-二氨基嘌呤。

[0113] 术语“基因”是指包含产生多肽、前体或 RNA (例如, rRNA, tRNA) 所需的编码序列的核酸 (例如 DNA) 序列。多肽可由全长编码序列或由所述编码序列的任何部分编码, 只要保留全长多肽或片段的所需活性或功能性质 (例如酶促活性、配体结合、信号转导、免疫原性等)。该术语还包括结构基因的编码区和在任一端以约 1kb 以上的距离与 5' 和 3' 末端的编码区相邻的序列, 从而使得所述基因对应于全长 mRNA 的长度。位于编码区的 5' 并且存在于 mRNA 上的序列是指 5' 非翻译序列。位于编码区的 3' 或下游并且存在于 mRNA 上的序列是指 3' 非翻译序列。术语“基因”包括 cDNA 和基因的基因组形式。基因的基因组形式或克隆含有由被称为“内含子”或“间隔区”和“间隔序列”的非编码序列打断的编码区。内含子是转录成核 RNA (hnRNA) 的基因的区段; 内含子可以含有诸如增强子等调节元件。从核或初始转录物中除去或“剪接下”内含子; 因此内含子在信使 RNA (mRNA) 转录物中不存在。翻译中 mRNA 起到规定新生多肽中氨基酸的序列或顺序的作用。除了含有内含子之外, 基因的基因组形式还可以包括位于存在于 RNA 转录物上的序列的 5' 和 3' 末端的序列。这些序列还称为“侧翼”序列或区域 (这些侧翼序列位于存在于 mRNA 转录物上的非翻译序列的 5' 或 3')。5' 侧翼序列可以含有控制或影响基因的转录的诸如启动子和增强子等调节序列。3' 侧翼区可以含有指导转录终止、转录后切割和多腺苷酸化的序列。

[0114] 当关于细胞、核酸、蛋白或载体使用时, 术语“重组”是指已经通过导入异源核酸或蛋白、改变天然核酸或蛋白而对所述细胞、核酸、蛋白或载体进行修饰, 或所述细胞源自如此修饰的细胞。因此, 例如重组细胞表达在天然 (非重组) 形式的细胞内未发现的基因或表达过表达或异常表达 (例如表达为非天然存在的片段或剪接变体) 的基因。本文的术语“重组核酸”是指以自然中正常未发现的形式、通常通过例如使用聚合酶和内切核酸酶操作核酸, 最初在体外形成的核酸。以此方式, 实现了不同序列的可操作连接。因此, 线性形式的分离的核酸, 或通过通常不接合的 DNA 分子进行连接而在体外形成的表达载体, 都认为是用于本发明目的的重组体。应该理解, 一旦制得重组核酸并将其导入宿主细胞或生物体中, 其会非重组 (即使用宿主细胞的体内细胞机构而不是体外操作) 地复制; 但是, 所述核酸一旦重组地产生, 虽然随后进行非重组地复制, 仍然被认为是用于本发明目的的重组体。类似地, “重组蛋白”是使用重组技术 (即, 通过上述重组核酸的表达) 制备的蛋白。

[0115] 如本文所用, 使用术语“载体”来指将 DNA 区段从一个细胞转移到另一细胞的核酸分子。术语“载剂”有时与“载体”相互替换地使用。载体通常源自质粒、噬菌体或植物病毒或动物病毒。

[0116] 如本文所用,术语“基因表达”是指下述过程:通过基因的“转录”(例如经由 RNA 聚合酶的酶促作用)将基因中编码的遗传信息转化成 RNA(例如,mRNA、rRNA、tRNA 或 snRNA),并且对于编码蛋白的基因,通过 mRNA 的“翻译”转化成蛋白。可以在该过程中的许多阶段对基因表达进行调节。“上调”或“激活”是指增加基因表达产物(例如, RNA 或蛋白)的产生的调节,而“下调”或“抑制”是指减少产生的调节。参与上调或下调的分子(例如转录因子)通常分别称为“激活子”和“抑制子”。

[0117] 术语“多肽”或“肽”或“蛋白”或“蛋白片段”在本文中可相互替换地使用,来指氨基酸残基的聚合物。该术语适用于其中一种或多种氨基酸残基为相应天然存在的氨基酸的人工化学模拟物的氨基酸聚合物,以及天然存在的氨基酸聚合物和非天然存在的氨基酸聚合物。

[0118] 术语“氨基酸”是指天然存在和合成的氨基酸,以及与天然存在的氨基酸功能类似的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸是由遗传密码编码的氨基酸以及稍后经过修饰的那些氨基酸,例如羟脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸和 O-磷酸丝氨酸。“氨基酸类似物”是指与天然存在的氨基酸具有相同的基本化学结构(例如与氢、羧基、氨基和 R 基团结合的 α 碳)的化合物,例如高丝氨酸、正亮氨酸、蛋氨酸亚砷、蛋氨酸甲基硫。所述类似物可具有经修饰的 R 基团(例如正亮氨酸)或经修饰的肽主链,但是保持与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构。氨基酸模拟物是指具有与氨基酸的通常化学结构不同的结构,但与天然存在的氨基酸功能类似的化合物。

[0119] “保守性修饰变体”适用于氨基酸和核酸序列。“氨基酸变体”是指氨基酸序列。对于特定的核酸序列,保守性修饰变体是指编码相同或基本上相同的氨基酸序列的那些核酸,或当所述核酸不编码氨基酸序列时,是指基本上相同或相关(例如天然连续)的序列。由于遗传编码的简并性,大量功能上相同的核酸编码大多数蛋白。例如,密码子 GCA、GCC、GCG 和 GCU 都编码氨基酸丙氨酸。因此,在每个由密码子规定丙氨酸的位置,该密码子可以改变成所述相应密码子中的另一个而不会改变所编码的多肽。所述核酸变化是“沉默变化”,其是保守性修饰变化的一种。编码多肽的本文的每个核酸序列也描述了核酸的沉默变化。认识到的是,在某些背景下可以对核酸中的各密码子(除了通常是蛋氨酸的唯一密码子的 AUG,和通常是色氨酸的唯一密码子的 TGG)进行修饰以产生功能相同的分子。因此,编码多肽的核酸的沉默变化涉及关于表达产物的所述序列,而不是关于实际的探针序列的所述序列。关于氨基酸序列,认识到的是,在所编码序列中改变、添加或缺失单个氨基酸或小百分比的氨基酸的、对核酸、肽、多肽或蛋白序列进行的各取代、缺失或添加,是“保守性修饰变体”,包括其中改变导致氨基酸被化学上相似的氨基酸取代。所述保守性修饰变体是除了本发明的多态变体、种间同源物和等位基因之外但不排除其的变体。提供用于保守性氨基酸取代的功能相似氨基酸的表是本领域众所周知的。通常而言保守性取代包括:1) 丙氨酸(A)、甘氨酸(G);2) 天冬氨酸(D)、谷氨酸(E);3) 天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q);4) 精氨酸(R)、赖氨酸(K);5) 异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、蛋氨酸(M)、缬氨酸(V);6) 苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W);7) 丝氨酸(S)、苏氨酸(T);和8) 半胱氨酸(C)、蛋氨酸(M)(参见,例如,Creighton, Proteins(1984))。(还参见本文表 1)。

[0120] 如本说明书和权利要求所用,单数形式的“a”、“an”和“the”包括复数形式,除非上下文明确指出。

[0121] 应该理解每当在本文用词汇“包含”来描述实施方式时,还提供以“由.....组成”和/或“基本上由.....组成”描述的其它类似实施方式。

[0122] 本发明的特定实施方式

[0123] 本发明提供了用于研究、诊断、表征和治疗癌的组合物和方法。特别地,在特定实施方式中,本发明提供了结合 Notch 受体的试剂(包括拮抗剂)和使用所述试剂或拮抗剂来抑制肿瘤生长和治疗人类患者的癌症和其它疾病的方法。在特定实施方式中,所述拮抗剂是特异性识别一种或多种人类 Notch 受体的抗体。

[0124] 在一个方面,本发明提供与人类 Notch 受体的胞外域的非配体结合区特异性结合的抗体。在某些实施方式中,与人类 Notch 受体的胞外域的非配体结合区特异性结合的抗体抑制肿瘤生长。在特定实施方式中,与人类 Notch 受体的胞外域的非配体结合区特异性结合并且抑制肿瘤生长的抗体,与至少两种 Notch 受体家族成员的胞外域的非配体结合区特异性结合。在特定实施方式中,所述抗体与 Notch2 和/或 Notch3 受体的胞外域的非配体结合区结合。在某些实施方式中,所述抗体与人类 Notch2 的非配体结合区结合。在某些实施方式中,所述抗体与 Notch2 和 Notch3 的胞外域的非配体结合区结合。在某些实施方式中,所述抗体与人类 Notch3 的非配体结合区结合。在某些实施方式中,所述抗体与 Notch1 和/或 Notch4 结合。

[0125] 在特定实施方式中,与人类 Notch 受体的胞外域的非配体结合区特异性结合并且抑制肿瘤生长的抗体是单克隆抗体。在特定实施方式中,与人类 Notch 受体的胞外域的非配体结合区特异性结合并且抑制肿瘤生长的抗体是嵌合抗体。在特定实施方式中,与人类 Notch 受体的胞外域的非配体结合区特异性结合并且抑制肿瘤生长的抗体是人源化抗体。在特定实施方式中,与人类 Notch 受体的胞外域的非配体结合区特异性结合并且抑制肿瘤生长的抗体是人类抗体。在特定实施方式中,与人类 Notch 受体的胞外域的非配体结合区特异性结合并且抑制肿瘤生长的抗体是单特异性抗体。在特定实施方式中,与人类 Notch 受体的胞外域的非配体结合区特异性结合并且抑制肿瘤生长的抗体是双特异性抗体。在特定实施方式中,本发明提供产生与人类 Notch 受体的胞外域的非配体结合区特异性结合并且抑制肿瘤生长的抗体的杂交瘤。

[0126] 在特定实施方式中,本发明提供与人类 Notch 受体的胞外域的包含 EGF 重复 1-10 的非配体结合区特异性结合并且抑制肿瘤生长的抗体。在特定实施方式中,本发明提供与人类 Notch 受体的胞外域的包含 EGF 重复 10(或等效物)的非配体结合区特异性结合并且抑制肿瘤生长的抗体。在特定实施方式中,本发明提供与人类 Notch 受体的胞外域的包含 EGF 重复 13-36 的非配体结合区特异性结合并且抑制肿瘤生长的抗体。某些实施方式提供与人类 Notch 受体的胞外域的包含 EGF 重复 4 的非配体结合区特异性结合并且抑制肿瘤生长的抗体。某些实施方式提供与人类 Notch 受体的胞外域的包含 EGF 重复 13 的非配体结合区特异性结合并且抑制肿瘤生长的抗体。在特定实施方式中,所述抗体与包含 LNR-HD 域的非配体结合区特异性结合并且抑制肿瘤生长。

[0127] 在特定实施方式中,本发明提供了对需要治疗癌症的受试对象进行癌症治疗的方法,所述方法包括对所述受试对象施用治疗有效量的与人类 Notch 受体蛋白的胞外域的非配体结合区特异性结合并且抑制所述受试对象中肿瘤生长的抗体。在特定实施方式中,所述治疗癌症的方法包括施用治疗有效量的与至少两种 Notch 受体家族成员特异性结合并

且抑制肿瘤生长的抗体。在特定实施方式中,所述对需要治疗癌症的受试对象进行癌症治疗的方法包括对所述受试对象施用治疗有效量的与 Notch2 和 / 或 Notch3 受体的胞外域的非配体结合区特异性结合并且抑制肿瘤生长的抗体。

[0128] 在特定实施方式中,所述治疗癌的方法包括施用治疗有效量的与人类 Notch 受体的胞外域的非配体结合区特异性结合并且抑制肿瘤生长的单克隆抗体。在特定实施方式中,所述治疗癌的方法包括施用治疗有效量的与人类 Notch 受体的胞外域的非配体结合区特异性结合并且抑制肿瘤生长的嵌合抗体。在特定实施方式中,所述治疗癌的方法包括施用治疗有效量的与人类 Notch 受体的胞外域的非配体结合区特异性结合并且抑制肿瘤生长的人源化抗体。在特定实施方式中,所述治疗癌的方法包括施用治疗有效量的与人类 Notch 受体的胞外域的非配体结合区特异性结合并且抑制肿瘤生长的人类抗体。在某些实施方式中,所述抗体是单特异性抗体。在某些实施方式中,所述抗体是双特异性抗体。

[0129] 在特定实施方式中,所述治疗癌的方法包括施用治疗有效量的与包含 EGF 重复 1-10 的人类 Notch 受体的胞外域的非配体结合区特异性结合并且抑制肿瘤生长的抗体。在特定实施方式中,所述治疗癌的方法包括施用治疗有效量的与包含 EGF 重复 10 (或如果是 Notch3 的话则是其等效物) 的人类 Notch 受体的胞外域的非配体结合区特异性结合并且抑制肿瘤生长的抗体。在特定实施方式中,所述治疗癌的方法包括施用治疗有效量的与包含 EGF 重复 13-36 的人类 Notch 受体的胞外域的非配体结合区特异性结合并且抑制肿瘤生长的抗体。在特定实施方式中,所述治疗癌的方法包括施用治疗有效量的与包含 EGF 重复 4 的人类 Notch 受体的胞外域的非配体结合区特异性结合并且抑制肿瘤生长的抗体。在特定实施方式中,所述治疗癌的方法包括施用治疗有效量的与包含 EGF 重复 4 的人类 Notch 受体的胞外域的非配体结合区特异性结合并且抑制肿瘤生长的抗体。在某些其它实施方式中,施用的抗体与人类 Notch 受体的 LNR-HD 域特异性结合。

[0130] 在特定实施方式中,所述治疗癌的方法包括施用治疗有效量的与人类 Notch 受体的胞外域的非配体结合区特异性结合并且抑制肿瘤生长的与细胞毒性基团 (cytotoxic moiety) 缀合的抗体。在特定实施方式中,所述治疗癌的方法包括与放射治疗组合施用治疗有效量的与人类 Notch 受体的胞外域的非配体结合区特异性结合并且抑制肿瘤生长的抗体。在特定实施方式中,所述治疗癌的方法包括与化学治疗组合施用治疗有效量的与人类 Notch 受体的胞外域的非配体结合区特异性结合并且抑制肿瘤生长的抗体。在特定实施方式中,所述治疗癌的方法包括施用治疗有效量的与人类 Notch 受体的胞外域的非配体结合区特异性结合并且抑制肿瘤生长的抗体,所述肿瘤生长来自乳肿瘤、结直肠肿瘤、肺肿瘤、胰腺肿瘤、前列腺肿瘤或头颈肿瘤。

[0131] 在特定实施方式中,所述治疗癌的方法包括使用遗传测试鉴定可使用抗体进行治疗的患者,所述抗体与人类 Notch 受体的胞外域的非配体结合区特异性结合;和施用治疗有效量的与人类 Notch 受体的胞外域的非配体结合区特异性结合并且抑制肿瘤生长的抗体。在特定实施方式中,所述治疗癌的方法包括使用检测癌干细胞标签的遗传测试鉴定可使用抗体进行治疗的患者,所述抗体与人类 Notch 受体的胞外域的非配体结合区特异性结合;和施用治疗有效量的与人类 Notch 受体的胞外域的非配体结合区特异性结合并且抑制肿瘤生长的抗体。

[0132] 在特定实施方式中,本发明提供鉴定与人类 Notch 受体的胞外域的非配体结合区

结合并且抑制肿瘤生长的分子的方法,所述方法包括:i)使所述分子与人类 Notch 受体的胞外域的非配体结合域一起温育;ii)确定所述分子是否与人类 Notch 受体的胞外域的非配体结合区结合;和 iii)确定所述分子是否抑制肿瘤生长。在特定实施方式中,本发明提供鉴定与人类 Notch 受体的胞外域的非配体结合区结合并且抑制肿瘤生长的分子的方法,所述方法包括:i)使所述分子与包含 EGF 重复 1-10 的人类 Notch 受体的胞外域的非配体结合域一起温育;ii)确定所述分子是否与包含 EGF 重复 1-10 的人类 Notch 受体的胞外域的非配体结合区结合;和 iii)确定所述分子是否抑制肿瘤生长。在特定实施方式中,本发明提供鉴定与人类 Notch 受体的胞外域的非配体结合区结合并且抑制肿瘤生长的分子的方法,所述方法包括:i)使所述分子与包含 EGF 重复 10(或如果是 Notch3 则是等效物)的人类 Notch 受体的胞外域的非配体结合域一起温育;ii)确定所述分子是否与包含 EGF 重复 10(或如果是 Notch3 则是等效物)的人类 Notch 受体的胞外域的非配体结合区结合;和 iii)确定所述分子是否抑制肿瘤生长。在特定实施方式中,本发明提供鉴定与人类 Notch 受体的胞外域的非配体结合区结合并且抑制肿瘤生长的分子的方法,所述方法包括:i)使所述分子与包含 EGF 重复 13-36 的人类 Notch 受体的胞外域的非配体结合域一起温育;ii)确定所述分子是否与包含 EGF 重复 13-36 的人类 Notch 受体的胞外域的非配体结合区结合;和 iii)确定所述分子是否抑制肿瘤生长。

[0133] 在特定实施方式中,本发明提供包含抗体的药物组合物,所述抗体与人类 Notch 受体的胞外域的非配体结合区特异性结合并且抑制肿瘤生长。

[0134] 在特定实施方式中,本发明提供制备抗体的方法,所述抗体与人类 Notch 受体的胞外域的非配体结合区特异性结合并且抑制肿瘤生长。

[0135] 在特定实施方式中,本发明提供编码抗体的分离的核酸,所述抗体与人类 Notch 受体的胞外域的非配体结合区特异性结合并且抑制肿瘤生长。

[0136] 在某些实施方式中,本发明提供与一种或多种人类 Notch 受体的 EGF10 域(或如果是 Notch3 的话则是 EGF10 域的等效物)特异性结合的试剂(例如,抗体)。在特定实施方式中,所述试剂是抗体。在特定实施方式中,所述试剂是拮抗剂。在特定实施方式中,所述试剂与人类 Notch2 的 EGF10 和/或人类 Notch3 的 EGF9 特异性结合。EGF9 是人类 Notch3 内的 EGF,其等效于其它人类 Notch 受体 Notch1、Notch2 和 Notch4 中的 EGF10。在特定实施方式中,所述试剂特异性结合人类 Notch2。在特定实施方式中,所述试剂特异性结合人类 Notch2 和 Notch3。在特定实施方式中,所述试剂特异性结合人类 Notch3。

[0137] 在一方面,本发明提供 59R1 抗体,所述 59R1 抗体包含分别在 SEQ ID NO:16 和 18(带有或不带有信号序列)中提供的重链和轻链序列,或由 DNA 编码,所述 DNA 于 2008 年 10 月 15 日保藏在 ATCC,并赋予保藏号 PTA-9547。本发明还提供包含所述 59R1 抗体的重链可变区(例如,SEQ ID NO:14)和/或轻链可变区(例如,SEQ ID NO:13)的多肽或抗体。本发明还提供包含所述 59R1 抗体的 1 个或多个(例如 1 个、2 个或 3 个)重链 CDR 和/或 1 个或多个轻链 CDR 的多肽或抗体。在另外的实施方式中,本发明提供了所结合表位与 59R1 抗体相同的抗体或与 59R1 抗体竞争对人类 Notch2 和/或 Notch3 的特异性结合的抗体。

[0138] 在另一方面,本发明提供 59R5 抗体,所述 59R5 抗体包含分别在 SEQ ID NO:49 和 18(带有或不带有信号序列)中提供的重链和轻链序列,或由 DNA 编码,所述 DNA 于 2009 年 7 月 6 日保藏在 ATCC,并赋予保藏号[...]。本发明还提供包含重链可变区和/或轻链可变

区序列 SEQ ID NO :50 和 / 或 SEQ ID NO :13 的多肽或抗体。本发明还提供包含 59R5 抗体的 1 个或多个 (例如 1 个、2 个或 3 个) 重链 CDR 和 / 或 1 个或多个轻链 CDR 的多肽或抗体。在另外的实施方式中, 本发明提供了所结合表位与 59R5 抗体相同的抗体或与 59R5 抗体竞争对人类 Notch2 和 / 或 Notch3 的特异性结合的抗体。

[0139] 在某些其它实施方式中, 本发明提供了与两种以上 (即, 至少两种或者两种、三种或四种) 人类 Notch 受体特异性结合的抗体。在特定实施方式中, 所述抗体与两种以上人类 Notch 受体的胞外域的非配体结合区特异性结合。在特定实施方式中, 所述抗体是与两种以上人类 Notch 受体的胞外域的非配体结合区特异性结合的单特异性抗体。在特定实施方式中, 所述抗体与 Notch1、Notch2 或 Notch4 的 EGF10、和 / 或 Notch3 的 EGF9 结合。在特定实施方式中, 所述抗体结合的非配体结合区不是 EGF4 或不包含 EGF4。在特定实施方式中, 所述两种以上人类 Notch 受体包括 Notch2 和 / 或 Notch3。在特定实施方式中, 所述两种以上人类 Notch 受体包括 Notch2 和 Notch3。在特定实施方式中, 所述抗体是所述两种以上人类 Notch 受体的拮抗剂。

[0140] 本发明还提供调节受试对象中周细胞和 / 或血管平滑肌细胞的功能的方法, 其中所述方法包括对受试对象施用有效量的特异性结合人类 Notch2 和 / 或人类 Notch3 的试剂。在特定实施方式中, 所述试剂是抗体。在特定实施方式中, 所述试剂是拮抗剂。

[0141] 本发明还提供抑制受试对象中血管发生的方法, 所述方法包括对所述受试对象施用有效量的特异性结合人类 Notch2 和 / 或人类 Notch3 的试剂的步骤。在特定实施方式中, 所述试剂是抗体。在特定实施方式中, 所述试剂是拮抗剂。在特定实施方式中, 所述拮抗剂是 Notch2 的拮抗剂。在特定实施方式中, 所述拮抗剂是 Notch3 的拮抗剂。在特定实施方式中, 所述拮抗剂是 Notch2 和 Notch3 的拮抗剂。在某些实施方式中, 所述抑制血管发生的方法包括调节周细胞和 / 或血管平滑肌细胞的功能。在某些实施方式中, 所述血管发生是肿瘤血管发生。

[0142] 在特定实施方式中, 所述 Notch 结合剂是与人类 Notch 受体特异性结合的拮抗剂。在某些替代性实施方式中, 所述 Notch 结合剂是与人类 Notch 受体特异性结合的激动剂。

[0143] 在特定实施方式中, 与一种或多种 Notch 受体特异性结合并且是所述一种或多种 Notch 受体的拮抗剂的试剂抑制所结合 Notch 受体的一种或多种活性的至少约 10%、至少约 20%、至少约 30%、至少约 50%、至少约 75%、至少约 90% 或约 100%。

[0144] 在特定实施方式中, 所述一种或多种人类 Notch 受体 (例如, Notch2 和 / 或 Notch3) 的拮抗剂具有一种或多种以下效果 : 抑制一种或多种人类 Notch 受体的配体结合, 抑制一种或多种人类 Notch 受体的配体诱导的信号传导 ; 抑制肿瘤细胞的增殖 ; 通过减少癌细胞在肿瘤中的频率而减少肿瘤的致癌性 ; 抑制肿瘤生长 ; 增加存活、触发肿瘤细胞的细胞死亡 ; 抑制血管发生 ; 或防止肿瘤细胞的转移。

[0145] 在特定实施方式中, 所述拮抗剂具有一种或多种以下效果 : 干扰 Notch 受体的表达 ; 通过例如空间上抑制 Notch 受体和一种或多种其配体之间的相互作用、或与人类 Notch 受体结合而干扰 Notch 受体信号转导途径的激活和触发细胞死亡或抑制细胞增殖。

[0146] 在特定实施方式中, 针对诸如 Notch2 或 Notch3 等 Notch 受体的拮抗剂在胞外对 Notch 受体起作用, 或抑制所述 Notch 受体的功能。在特定实施方式中, 拮抗剂是与 Notch 受体的胞外域结合的小分子。在特定实施方式中, Notch 受体的拮抗剂是蛋白质性的

(proteinaceous)。在某些实施方式中,Notch 受体的蛋白质性拮抗剂是与 Notch 受体的细胞外表位特异性结合的抗体。针对 Notch 受体的拮抗剂的细胞外结合通过抑制 Notch 受体的固有激活(例如激酶活性)和/或通过空间上抑制例如 Notch 受体与其配体之一的相互作用,从而能够抑制 Notch 受体的信号传导。另外,针对 Notch 受体的拮抗剂的细胞外结合通过例如使 Notch 受体内化和/或减少 Notch 受体的细胞表面运输,从而能够下调 Notch 受体的细胞表面表达。

[0147] 在特定实施方式中,所述 Notch 结合剂或拮抗剂(例如,抗体)与至少一种人类 Notch 受体的胞外域的非配体结合区特异性结合,其中所述非配体结合区包含 EGF 重复 10(或如果是 Notch3 的话则是其等效物)。在特定实施方式中,所述试剂或拮抗剂与 Notch2 特异性结合。在特定实施方式中,所述试剂或拮抗剂与 Notch3 特异性结合。在特定实施方式中,所述试剂或拮抗剂与人类 Notch2 和人类 Notch3 特异性结合。

[0148] 在特定实施方式中,所述 Notch 结合剂或拮抗剂(例如,抗体)与人类 Notch2 的 EGF10 域特异性结合。在特定实施方式中,所述 Notch 结合剂或拮抗剂不与 EGF10 域外的人类 Notch2 的任何区域结合。在某些替代性实施方式中,与人类 Notch2 的 EGF10 域特异性结合的 Notch 结合剂或拮抗剂还与人类 Notch2 的另一区域结合。换言之,在某些实施方式中,所述试剂或拮抗剂的全部表位落入 EGF10 中。在某些其它实施方式中,与人类 Notch2 结合的试剂或拮抗剂的表位与 EGF10 部分重叠。在特定实施方式中,所述试剂或拮抗剂与位于人类 Notch2EGF10 内的序列 HKGAL (SEQ ID NO :28) 的至少一部分结合。在特定实施方式中,所述试剂或拮抗剂还与人类 Notch2EGF10 内的其它氨基酸结合(例如,抗 Notch2 抗体的完整表位不必全部包含于序列 HKGAL 内)。在特定实施方式中,所述 Notch 结合剂或拮抗剂还与至少一种其它人类 Notch 受体(例如,Notch1、Notch3 或 Notch4) 特异性结合。在特定实施方式中,与人类 Notch2 的 EGF10 结合的 Notch 结合剂或拮抗剂还与人类 Notch1 的 EGF10 域、人类 Notch3 的 EGF9 域和/或人类 Notch4 的 EGF10 域结合。在特定实施方式中,所述其它人类 Notch 受体是人类 Notch3。

[0149] 在特定实施方式中,所述 Notch 结合剂或拮抗剂(例如,抗体)与人类 Notch3 的 EGF9 域结合。从人类 Notch2 和人类 Notch3 的胞外域的序列之间的同源性明显看出,在人类 Notch3 中 EGF9 是 Notch2EGF10 的功能/结构等效物。在特定实施方式中,所述 Notch 结合剂或拮抗剂不与 EGF9 外的人类 Notch3 的任何区域结合。在特定实施方式中,所述试剂或拮抗剂与位于人类 Notch3EGF9 域内的序列 HEDAI (SEQ ID NO :29) 的至少一部分结合。HEDAI (SEQ ID NO :29) 是与人类 Notch2EGF10 内的序列 HKGAL (SEQ ID NO :28) 相对应的 Notch3 EGF9 域内的序列。在特定实施方式中,所述试剂或拮抗剂还与人类 Notch3 EGF9 内的其它氨基酸结合。在特定实施方式中,所述 Notch 结合剂或拮抗剂还与至少一种其它人类 Notch 受体(例如,Notch1、Notch2 和/或 Notch4) 的 EGF10 域特异性结合。在特定实施方式中,所述其它人类 Notch 受体是人类 Notch2,例如与人类 Notch2 的 EGF10 域结合的试剂或拮抗剂。在特定实施方式中,所述 Notch 结合剂或拮抗剂不与 EGF10 外的人类 Notch2 的任何区域结合。在特定实施方式中,所述试剂或拮抗剂与位于人类 Notch2EGF 10 内的序列 HKGAL (SEQ ID NO :28) 的至少一部分结合。在某些实施方式中,所述试剂或拮抗剂是与 Notch2 中的序列 HKGAL (SEQ ID NO :28) 的至少一部分结合并且还与 Notch3 中的序列 HEDAI (SEQ ID NO :29) 的至少一部分结合的单特异性抗体。

[0150] 在某些替代性实施方式中,所述 Notch 结合剂或拮抗剂与除了 EGF10 之外的区域的 Notch1、Notch2 或 Notch4 受体的胞外域的非配体结合区的至少一部分结合,或与除了 EGF9 之外的区域的 Notch3 受体的胞外域的非配体结合区的至少一部分结合。例如,在特定实施方式中,所述试剂或拮抗剂与一种或多种 Notch 受体的 LNR-HD 域结合。在特定实施方式中,所述试剂或拮抗剂与一种或多种 Notch 受体的胞外域的 EGF1、EGF2、EGF3、EGF4、EGF5、EGF6、EGF7、EGF9、EGF10、EGF13、EGF14、EGF15、EGF16、EGF17、EGF18、EGF19、EGF20、EGF21、EGF22、EGF23、EGF24、EGF25、EGF26、EGF27、EGF28、EGF29、EGF30、EGF31、EGF32、EGF33、EGF34、EGF35 和 / 或 EGF36 结合。

[0151] 在特定实施方式中,所述 Notch 结合剂或拮抗剂与一种或多种人类 Notch 受体的胞外域的配体结合区结合。因此,在特定实施方式中,所述 Notch 结合剂或拮抗剂可以与 Notch1、2 或 4 的 EGF11 和 / 或 EGF12 结合 (Rebay 等,1991, Cell167 :687 ;Lei 等,2003, Dev. 130 :6411 ;Hambleton 等,2004, Structure 12 :2173) 或与 Notch3 的 EGF10 和 / 或 EGF11 结合 (Peters 等,2004, Experimental Cell Research, 299 :454-464)。

[0152] 在特定实施方式中,所述 Notch 结合剂(例如,抗体)与两种以上人类 Notch 受体(例如,Notch1、Notch2、Notch3 和 / 或 Notch4) 特异性结合。换言之,在特定实施方式中,所述试剂或抗体结合至少两种人类 Notch 受体(即,两种、三种或四种人类 Notch 受体)。所涵盖的有与两种人类 Notch 家族受体(例如,Notch2 和 Notch3、Notch1 和 Notch2、Notch1 和 Notch3、Notch1 和 Notch4、Notch2 和 Notch4,或 Notch3 和 Notch4) 特异性结合的试剂和抗体。还设想了与三种人类 Notch 受体家族成员特异性结合的试剂和抗体(例如,与 Notch1、Notch2 和 Notch3 ;Notch1、Notch2 和 Notch4 ;或 Notch2、Notch3 和 Notch4 特异性结合的试剂和抗体),以及与四种人类 Notch 受体家族成员特异性结合的试剂和抗体(例如,与 Notch1、Notch2、Notch3 和 Notch4 特异性结合的试剂和抗体)。在特定实施方式中,所述试剂或抗体与人类 Notch2 和 Notch3 特异性结合。在某些替代性实施方式中,所述试剂或抗体与人类 Notch1 和 Notch2 特异性结合。在某些实施方式中,所述试剂或抗体与人类 Notch1 和 Notch3 特异性结合。在另外实施方式中,所述试剂或抗体与人类 Notch1 和 Notch4 特异性结合。在特定实施方式中,所述试剂或抗体是所述两种以上人类 Notch 受体的拮抗剂。

[0153] 在特定实施方式中,所述 Notch 结合剂或拮抗剂与 Notch 受体(例如,Notch2 和 / 或 Notch3) 结合的解离常数是约 $1\ \mu\text{M}$ 以下、约 100nM 以下、约 40nM 以下、约 20nM 以下或约 10nM 以下。在特定实施方式中,所述试剂或拮抗剂与一种或多种人类 Notch 受体(例如人类 Notch2 和 / 或人类 Notch3) 结合的 K_D 为 1nM 以下。在某些实施方式中,所述 Notch 结合剂是与 Notch2 结合的 K_D 为约 1nM 以下的抗体。在某些实施方式中,所述 Notch 结合剂是与 Notch3 结合的 K_D 为约 1nM 以下的抗体。在特定实施方式中,相对于特定 Notch 受体的试剂或拮抗剂的解离常数是使用固定在 Biacore 芯片上的包含 Notch 胞外域和 / 或包含 EGF10 的胞外域的一部分的 Notch-Fc 融合蛋白确定的解离常数。

[0154] 在特定实施方式中,所述拮抗剂与人类 Notch3 特异性结合并且抑制配体(例如, DLL4、JAG1 和 / 或 JAG2) 与人类 Notch3 的结合和 / 或抑制人类 Notch3 的信号传导。在特定实施方式中,所述拮抗剂与人类 Notch2 特异性结合并且抑制配体(例如, DLL4、JAG1 和 / 或 JAG2) 与人类 Notch2 的结合和 / 或抑制人类 Notch2 的信号传导。在特定实施方式中,所

述拮抗剂抑制 DLL4 诱导的 Notch2 信号传导。在特定实施方式中,所述拮抗剂抑制 DLL4 诱导的 Notch3 信号传导。在特定实施方式中,所述拮抗剂抑制 JAG2 诱导的 Notch2 信号传导。在特定实施方式中,所述拮抗剂抑制 JAG2 诱导的 Notch3 信号传导。在特定实施方式中,由 Notch2 和 / 或 Notch3 进行的信号传导被减少至少约 10%、至少约 25%、至少约 50%、至少约 75%、至少约 90% 或至少约 95%。在特定实施方式中,一种或多种配体与 Notch2 和 / 或 Notch3 的结合被减少至少约 10%、至少约 25%、至少约 50%、至少约 75%、至少约 90% 或至少约 95%。

[0155] 在某些实施方式中,针对 Notch 受体的拮抗剂与 Notch 受体结合并且具有一种或多种以下效果:抑制肿瘤细胞的增殖、直接在肿瘤细胞中触发细胞死亡或防止肿瘤细胞转移。在特定实施方式中,Notch 受体的拮抗剂经由缀合毒素、化学治疗剂、放射性同位素或其它此类试剂触发细胞死亡。例如,针对 Notch 受体的抗体与通过蛋白内化而在表达 Notch 受体的肿瘤细胞中激活的毒素缀合。在其它实施方式中,Notch 受体的拮抗剂经由抗体依赖性细胞的细胞毒性 (ADCC) 而介导表达 Notch 受体的细胞的细胞死亡。ADCC 涉及通过识别抗体的 Fc 部分的效应细胞进行的细胞裂解。例如,许多淋巴细胞、单核细胞、组织巨噬细胞、粒细胞和嗜酸性粒细胞具有 Fc 受体并且能够介导细胞溶解 (Dillman, 1994, J. Clin. Oncol. 12 :1497)。在某些实施方式中,Notch 受体的拮抗剂是通过激活补体 - 依赖性细胞毒性 (CDC) 触发表达 Notch 受体的细胞的细胞死亡的抗体。CDC 参与针对抗体的 Fc 部分的血清补体的结合和补体蛋白级联的随后激活,导致细胞膜损伤和最终的细胞死亡。在很大程度上,已知抗体的生物活性由抗体分子的恒定域或 Fc 区确定 (Uananie 和 Benacerraf, 教科书 Immunology, 第 2 版, Williams & Wilkins, 第 218 页 (1984))。不同类别和亚类的抗体在该方面有所不同,正如相同亚类但来自不同物种的抗体一样。人类抗体中, IgM 是结合补体最有效类别的抗体,然后是 IgG1、IgG3 和 IgG2, 而 IgG4 在激活补体级联方面似乎非常不足 (Dillman, 1994, J. Clin. Oncol. 12 :1497 ; Jefferis 等, 1998, Immunol. Rev. 163 :59-76)。根据本发明,制备了具有所需生物活性的这些类别的抗体。

[0156] 可以测定针对 Notch 受体的任何特定抗体通过补体激活和 / 或 ADCC 介导靶细胞的裂解的能力。使目的细胞在体外生长和进行标记;向细胞培养物添加所述抗体以及通过抗原抗体复合物而激活的血清补体或免疫细胞。例如通过来自被裂解的细胞的标记的释放检测靶细胞的细胞溶解。事实上,可以使用患者自身血清作为补体和 / 或免疫细胞的来源对抗体进行筛选。然后可以将将在体外测试中能够激活补体或介导 ADCC 的抗体治疗性用于该特定患者。

[0157] 在特定实施方式中,Notch 结合剂或拮抗剂是不具有一种或多种效应子功能的抗体。例如,在某些实施方式中,所述抗体不具有抗体依赖性细胞的细胞毒性 (ADCC) 活性,和 / 或不具有补体依赖性细胞毒性 (CDC) 活性。在特定实施方式中,所述抗体不与 Fc 受体和 / 或补体因子结合。在特定实施方式中,所述抗体不具有效应子功能。

[0158] 在其它实施方式中,Notch 受体的拮抗剂通过抑制血管发生可间接触发细胞死亡。血管发生是通过新血管从已有脉管形成的过程,并且是在例如胚胎发育、伤口愈合和排卵反应期间的正常生长所需的基础过程。大于 $1\text{mm}^2 \sim 2\text{mm}^2$ 的实体瘤生长也需要血管发生来供应营养物和氧,否则肿瘤细胞就会死亡。因此在特定实施方式中,Notch 受体的拮抗剂靶向表达 Notch 受体的血管细胞,例如内皮细胞、平滑肌细胞或血管组装所需的细胞外基质

的组分。在特定实施方式中, Notch 受体(例如, Notch2 和 / 或 Notch3) 的拮抗剂靶向周细胞和 / 或血管平滑肌细胞。在其它实施方式中, Notch 受体的拮抗剂抑制血管细胞募集(recruitment)、组装、维持或存活所需的生长因子信号传导。在特定实施方式中, 所述拮抗剂调节周细胞和 / 或血管平滑肌细胞的功能。

[0159] 在特定实施方式中, 所述 Notch 结合剂或拮抗剂(例如, 抗体) 单独地或与第二治疗剂组合时能够抑制肿瘤生长。在特定实施方式中, 所述 Notch 结合剂或拮抗剂能够抑制体内(例如, 在异种移植物小鼠模型中和 / 或在患有癌症的人类中) 肿瘤生长。在特定实施方式中, 在异种移植物模型中在给定时间点所述 Notch 结合剂或拮抗剂能够将肿瘤生长抑制至少约 10%、至少约 25%、至少约 50%、少约 75%、少约 90%。在特定实施方式中, 所述 Notch 结合剂或拮抗剂预防肿瘤生长。在特定实施方式中, 所述 Notch 结合剂或拮抗剂抑制肿瘤复发。

[0160] 在特定实施方式中, 所述 Notch 结合剂能够减少肿瘤的致瘤性。在特定实施方式中, 所述试剂或抗体能够减少诸如小鼠异种移植物模型等动物模型中包含癌干细胞的肿瘤的致瘤性。在特定实施方式中, 肿瘤中癌干细胞的数量或频率减少至少约 2 倍、约 3 倍、约 5 倍、约 10 倍、约 50 倍、约 100 倍或约 1000 倍(例如, 在异种移植物模型中)。在特定实施方式中, 通过使用动物模型进行有限稀释检测确定了癌干细胞频率的减少。以下在实施例 8 中提供用于测试抗 Notch 抗体的功效的有限稀释检测的实例。关于使用有限稀释检测来确定肿瘤中癌干细胞的数量和频率的减少的其它实例和指南可以发现于例如国际公开 WO 2008/042236、美国专利申请公开第 2008/0064049 和 2008/0178305 号, 本文通过参考并入每一篇的全文。

[0161] 本发明提供各种多肽, 包括但不限于抗体或抗体的片段。在特定实施方式中, 所述多肽是分离的。在某些替代性实施方式中, 所述多肽基本上是纯的。

[0162] 在特定实施方式中, 本发明的多肽可以是包含序列 SEQ ID NO :2、4、13、14、16、18、19、20、39、40、49、50、52、53、54、55、56 或 57(带有或不带有指出的信号序列) 的重组多肽、天然多肽或合成多肽, 以及包含由多核苷酸 SEQ IDNO :1、3、15、17、47、48、58、59 或 60(带有或不带有指出的信号序列) 编码的多肽的多肽。

[0163] 本发明提供了包含分别在 SEQ ID NO :16 和 / 或 SEQ ID NO :18 中提供的 59R1 的重链和 / 或轻链的多肽。在特定实施方式中, 所述多肽是抗体。在特定实施方式中, 所述多肽特异性结合 Notch2 和 / 或 Notch3。在某些实施方式中, 所述多肽特异性结合 Notch2 和 Notch3。

[0164] 本发明提供了包含分别在 SEQ ID NO :49 和 / 或 SEQ ID NO :18 中提供的 59R5 的重链和 / 或轻链的多肽。在特定实施方式中, 所述多肽是抗体。在特定实施方式中, 所述多肽特异性结合 Notch2 和 / 或 Notch3。在某些实施方式中, 所述多肽特异性结合 Notch2 和 Notch3。

[0165] 本发明还提供包含 SEQ ID NO :13 和 / 或 SEQ ID NO :14 的多肽。在特定实施方式中, 所述多肽包含含有 SEQ ID NO :13 的可变轻链序列和 / 或含有 SEQ ID NO :14 的可变重链序列。在某些实施方式中, 所述多肽包含含有 SEQ ID NO :13 的可变轻链序列和含有 SEQ ID NO :14 的可变重链序列。在特定实施方式中, 所述多肽包含含有 SEQ ID NO :13 的可变轻链序列和 / 或含有 SEQ ID NO :50 的可变重链序列。在某些实施方式中, 所述多肽包含含有

SEQ ID NO :13 的可变轻链序列和含有 SEQ IDNO :50 的可变重链序列。在特定实施方式中,所述多肽包含含有 SEQ ID NO :13 的可变轻链序列和 / 或含有 SEQ ID NO :52 的可变重链序列。在特定实施方式中,所述多肽包含含有 SEQ ID NO :13 的可变轻链序列和 / 或含有 SEQ ID NO :53 的可变重链序列。在特定实施方式中,所述多肽包含含有 SEQ ID NO :13 的可变轻链序列和 / 或含有 SEQ ID NO :54 的可变重链序列。在特定实施方式中,所述多肽包含含有 SEQ ID NO :13 的可变轻链序列和 / 或含有 SEQ ID NO :55 的可变重链序列。在特定实施方式中,所述多肽包含含有 SEQ ID NO :13 的可变轻链序列和 / 或含有 SEQ ID NO :56 的可变重链序列。在特定实施方式中,所述多肽包含含有 SEQ ID NO :13 的可变轻链序列和 / 或含有 SEQ ID NO :57 的可变重链序列。在特定实施方式中,所述多肽是抗体。在特定实施方式中,所述多肽特异性结合 Notch2 和 / 或 Notch3。在某些实施方式中,所述多肽特异性结合 Notch2 和 Notch3。在某些实施方式中,所述多肽特异性结合人类 Notch2。在某些实施方式中,所述多肽特异性结合人类 Notch3。

[0166] 本领域承认可以对本发明的某些氨基酸序列进行变化而不会显著影响蛋白的结构或功能。如果关注序列上的所述差异,应该记得在蛋白上存在确定活性的关键区域。因此,本发明还包括显示基本活性的多肽的改变。此类突变包括缺失、插入、倒置、重复和类型取代。可以在 Bowie 等,Deciphering the Message in Protein Sequences :Tolerance to Amino Acid Substitutions,1990,Science 247 :1306-1310 中发现关于哪一种氨基酸变化可能是表型上沉默的指南。

[0167] 因此,本发明多肽的片段、衍生物或类似物可以是:(i) 其中一个或多个氨基酸残基被保守性或非保守性氨基酸残基(经常是保守性氨基酸残基)取代的多肽的片段、衍生物或类似物,并且这种取代的氨基酸残基可以是或可以不是由遗传密码所编码的氨基酸;或(ii) 其中一个或多个氨基酸残基包括取代基的多肽的片段、衍生物或类似物;或(iii) 其中成熟多肽与另一化合物融合的多肽的片段、衍生物或类似物,所述化合物例如是增加所述多肽的半衰期的化合物(例如聚乙二醇);或(iv) 其中另外的氨基酸与成熟多肽融合的多肽的片段、衍生物或类似物,例如前导序列或分泌序列或用于对成熟多肽或前蛋白序列进行纯化的序列。这种片段、衍生物或类似物被视为在本文教导的范围之内。

[0168] 特别感兴趣的是带电氨基酸被另一带电氨基酸和被中性或带负电氨基酸取代。后者产生正电荷减少的蛋白质。蛋白的正电荷减少可导致蛋白聚集,而防止凝集是高度期望的。蛋白的凝集不仅导致活性丧失,由于其具有免疫原性,在制备药物制剂时也有问题。(Pinckard 等,1967, Clin. Exp. Immunol. 2 :331-340, Robbins 等,1987, Diabetes 36 :838-845 ;Cleland 等,1993, Crit. Rev Therapeutic Drug Carrier Systems 10 :307-377)。

[0169] 如所示,氨基酸变化通常对于微小的性质,例如不显著影响蛋白的折叠或活性的保守性氨基酸取代(参见表 1)。

[0170] 表 1. 保守性氨基酸取代

[0171]

起始氨基酸	示例性的保守性取代
丙氨酸	缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甘氨酸、丝氨酸

精氨酸	赖氨酸、组氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺
天冬酰胺	谷氨酰胺、组氨酸、赖氨酸、精氨酸
天冬氨酸	谷氨酸、天冬酰胺
半胱氨酸	丝氨酸、丙氨酸、蛋氨酸
谷氨酰胺	天冬酰胺
谷氨酸	天冬氨酸、谷氨酰胺
甘氨酸	脯氨酸、丙氨酸
组氨酸	天冬酰胺、谷氨酰胺、赖氨酸、精氨酸
异亮氨酸	亮氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、丙氨酸、苯丙氨酸、正亮氨酸
亮氨酸	正亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、丙氨酸、苯丙氨酸
赖氨酸	丙氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸
蛋氨酸	亮氨酸、苯丙氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、半胱氨酸

[0172]

苯丙氨酸	亮氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、丙氨酸、酪氨酸
脯氨酸	丙氨酸、甘氨酸
丝氨酸	苏氨酸
苏氨酸	丝氨酸
色氨酸	酪氨酸、苯丙氨酸
酪氨酸	色氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸、丝氨酸
缬氨酸	异亮氨酸、蛋氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、丙氨酸、正亮氨酸

[0173] 当然,进行的氨基酸取代的数量取决于许多因素,包括上文所述的那些。在特定实施方式中,对于任何给定的多肽,取代的数量不超过 50 个、40 个、30 个、25 个、20 个、15 个、10 个或 3 个。

[0174] 在特定实施方式中,本发明的多肽和多核苷酸以分离形式提供,并且有时经纯化以使其具有均一性。

[0175] 本发明的多肽包括 SEQ ID NO :2、4、13、14、16、18、19、20、39、40、49、50、52、53、54、55、56 或 57 的多肽,和与 SEQ ID NO :2、4、13、14、16、18、19、20、39、40、49、50、52、53、54、55、

56 或 57 的多肽具有至少 90% 相似性（在某些时候具有至少 90% 序列同一性）的多肽，和与 SEQ ID NO :2、4、13、14、16、18、19、20、39、40、49、50、52、53、54、55、56 或 57 的多肽具有至少 95% 相似性（在某些时候具有至少 95% 序列同一性）的多肽，以及在其它实施方式中，与 SEQ IDNO :2、4、13、14、16、18、19、20、39、40、49、50、52、53、54、55、56 或 57 的多肽具有至少 96%、97%、98% 或 99% 相似性（在某些时候具有至少 96%、97%、98% 或 99% 序列同一性）的多肽。本领域已知，通过将多个多肽的氨基酸序列和其保守性氨基酸取代与第二多肽的序列进行比较来确定两个多肽之间的“相似性”。

[0176] 使用本发明多肽的片段或部分可以通过肽合成来生产相应的全长多肽；因此可以将所述片段用作生产全长多肽的中间体。本发明多核苷酸的片段或部分可用于合成本发明的全长多核苷酸。

[0177] 在特定实施方式中，本发明蛋白的片段是能够与 Notch1 受体蛋白结合的蛋白的部分或全部。该片段对 Notch 受体或 Notch 受体的配体具有高亲和性。融合蛋白的某些片段是包含与免疫球蛋白的至少部分恒定区融合的所述多肽试剂或拮抗剂的至少部分 Notch 结合域的蛋白片段。亲和性通常为约 10^{-11}M ~ 10^{-12}M ，不过亲和性可以随着片段尺寸的不同而从 10^{-7}M ~ 10^{-13}M 显著变化。在某些实施方式中，所述片段长度为约 10 ~ 110 个氨基酸，并且包含与免疫球蛋白的至少部分恒定区连接的多肽试剂或拮抗剂的 Notch 结合域。

[0178] 可以对所述多肽和类似物进一步进行修饰以含有正常情况下不是所述蛋白部分的其它化学基团 (chemical moieties)。这些衍生的基团可以改善蛋白的溶解度、生物半衰期和 / 或吸附。该基团还可以减少或消除所述蛋白的任何不期望的副作用等。可以在雷明顿药典 (Remington's Pharmaceutical Sciences), 第 20 版, Mack Publishing Co., Easton, PA (2000) 中发现关于化学基团的综述。

[0179] 可以通过本领域已知的任何合适的方法生产本文所述的分离的多肽。所述方法从直接蛋白合成方法，到构建编码分离的多肽序列的 DNA 序列并在合适的经转化宿主中表达这些序列。

[0180] 在重组方法的某些实施方式中，通过分离或合成编码野生型目的蛋白的 DNA 序列来构建 DNA 序列。可选的是，可以通过位点特异性突变来对所述序列进行诱变从而提供其功能类似物。参见，例如 Zoeller 等, 1984, Proc. Nat Acad. Sci. USA 81 :5662-5066 和美国专利第 4, 588, 585 号。另一构建编码目的多肽的 DNA 序列的方法通过使用寡核苷酸合成仪的化学合成进行。可以基于所需多肽的氨基酸序列和选择在会产生重组目的多肽的宿主细胞中受偏爱的那些密码子来设计所述寡核苷酸。

[0181] 可以应用标准方法来合成编码分离的目的多肽的分离的多核苷酸序列。例如，可以使用完整氨基酸序列来构建反译 (back-translated) 基因。另外，可以合成含有编码特定分离的多肽的核苷酸序列的 DNA 寡聚物。例如，可以合成几种编码所需多肽的各部分的小型寡核苷酸并将其连接。各寡核苷酸通常含有 5' 或 3' 突出端以用于互补组装。

[0182] 一旦进行组装（通过合成、定点突变或另一方法），则将编码特定的分离的目的多肽的突变 DNA 序列插入表达载体中并可操作地连接至适合在所需宿主中表达蛋白的表达控制序列。可以通过核苷酸测序、限制酶作图和合适宿主中表达生物活性多肽来确认合适的组装。如本领域众所周知，为了在宿主中获得转染基因的高表达水平，将该基因可操作地连接至转录和翻译表达控制序列，该表达控制序列在所选表达宿主中具有功能。

[0183] 可以使用重组表达载体来扩增和表达编码多肽的 DNA。重组表达载体是可复制的 DNA 构建体,其具有编码 Notch 受体融合物或生物等效类似物的合成或 cDNA 来源的 DNA 片段,所述 DNA 片段与源自哺乳动物、微生物、病毒或昆虫基因的合适的转录或翻译调节元件可操作地连接。如以下详细描述,转录单元通常包括以下组件的组装体:(1) 在基因表达中具有调节作用的遗传元件,例如,转录启动子或增强子,(2) 转录为 mRNA 并且翻译成蛋白的结构或编码序列,和 (3) 合适的转录和翻译启动和终止序列。所述调节元件可以包括用于控制转录的操作子序列。可以另外引入通常赋予在宿主中复制的能力的复制原点,和便于识别转化体的选择基因。当 DNA 区域相互功能上相关时,将它们可操作地连接。例如,如果信号肽(分泌前导)的 DNA 表达为参与多肽分泌的前体,则信号肽(分泌前导)的 DNA 可操作地与多肽的 DNA 可操作地连接;如果启动子控制编码序列的转录,则启动子与编码序列可操作地连接;或如果核糖体结合位点经定位而允许翻译,则核糖体结合位点与编码序列可操作地连接。通常,“可操作地连接”意味着是连续的,并且在分泌前导区的情况下,意味着连续并且在阅读框中。旨在在酵母表达系统中使用的结构元件包括能够使宿主细胞将翻译蛋白分泌到胞外的前导序列。作为选择,当表达不具有前导序列或转运序列的重组蛋白时,其可以包括 N 末端蛋氨酸残基。可选地是可以随后从表达重组蛋白中切割下该残基以提供最终产物。

[0184] 表达控制序列和表达载体的选择取决于宿主的选择。可以使用各种表达宿主/载体组合。对于真核宿主有用的表达载体包括,例如,包含来自 SV40、牛乳头状瘤病毒、腺病毒和巨细胞病毒的表达控制序列的载体。对于细菌宿主有用的表达载体包括已知的细菌质粒,例如包括 pCR1、pBR322、pMB9 和其衍生物等在内的来自大肠杆菌的质粒,以及诸如 M13 和丝状单链 DNA 噬菌体等广宿主范围质粒。

[0185] 用于在合适启动子的控制下表达多肽的合适的宿主细胞包括原核生物、酵母、昆虫或高级真核细胞。原核生物包括革兰氏阴性生物体或革兰氏阳性生物体,例如大肠杆菌或杆菌。高级真核细胞包括本文所述哺乳动物来源的已建立细胞系。还可以使用无细胞翻译系统。Pouwels 等描述了与细菌、真菌、酵母和哺乳动物细胞宿主一起使用的合适的克隆和表达载体 (Cloning Vectors :A Laboratory Manual, Elsevier, N. Y., 1985), 在此通过参考并入其相关内容。

[0186] 有利的是还使用各种哺乳动物或昆虫细胞培养系统来表达重组蛋白。可以在哺乳动物细胞中进行重组蛋白的表达,因为所述蛋白通常正确地折叠、合适地修饰和具有完全功能。合适的哺乳动物宿主细胞系的实例包括 Gluzman 1981, Cell 23 :175 所述的猴肾细胞的 COS-7 系,和能够表达合适载体的其它细胞系,包括例如 L 细胞、C127、3T3、中国仓鼠卵巢 (CHO)、HeLa 和 BHK 细胞系。哺乳动物表达载体可以包含与待表达基因连接的诸如复制原点、合适的启动子和增强子等非转录元件和其它 5' 或 3' 侧翼非转录序列,以及诸如必需的核糖体结合位点、聚腺苷酸化位点、剪接供体和受体位点以及转录终止序列等 5' 或 3' 非翻译序列。用于在昆虫细胞中产生异源性蛋白的杆状病毒系统由 Luckow 和 Summers, 1988, Bio/Technology, 6 :47 综述。

[0187] 可以根据任何合适的方法对由经转化宿主产生的蛋白进行纯化。所述标准方法包括色谱(例如离子交换色谱、亲和色谱和分级柱(sizing column)色谱)、离心、差别溶解度或通过用于蛋白纯化的任何其它标准方法。诸如六聚组氨酸、麦芽糖结合域、流感病毒外

壳序列和谷胱甘肽-S-转移酶等亲和标签可以与蛋白连接,从而允许通过合适的亲和柱容易地进行纯化。使用诸如蛋白水解、核磁共振和 X-射线晶体学也可以物理地表征分离的蛋白。

[0188] 例如,可以首先使用商购的蛋白浓缩过滤器,例如 Amicon 或 Milhpore Pellicon 超滤装置对来自将重组蛋白分泌到培养基中的系统的上清液进行浓缩。浓缩步骤后,将浓缩物施加到合适的纯化基质。作为选择,可以使用阴离子交换树脂,例如具有下垂的二乙氨基乙基 (DEAE) 基团的基质或基底。所述基质可以是丙烯酰胺、琼脂糖、葡聚糖、纤维素或蛋白纯化中常用的其它种类。作为选择,可以使用阳离子交换步骤。合适的阳离子交换器包括各种含有磺丙基或羧甲基的不溶性基质。最后,可以使用一种或多种反相高效液相色谱 (RP-HPLC) 步骤来进一步纯化癌干细胞蛋白-Fc 组合物,所述反相高效液相色谱步骤采用诸如具有下垂甲基或其它脂肪族基团的硅胶等疏水性 RP-HPLC 介质。还可以以各种组合使用上述纯化步骤中的一些或全部,从而提供均一性的重组蛋白。

[0189] 细菌培养物中产生的重组蛋白通常通过起始提取从细胞团块中分离,然后是一步或多步浓缩、盐析、水性离子交换或尺寸排阻色谱步骤。对于最后的纯化步骤可以使用高效液相色谱 (HPLC)。可以通过任何常规方法破坏重组蛋白表达中所用的微生物细胞,包括冷冻-解冻循环、超声处理、机械破坏或是使用细胞裂解剂。

[0190] 在特定实施方式中,所述 Notch 结合剂或拮抗剂包含抗体。在特定实施方式中,所述抗体是分离的。在特定实施方式中,所述抗体基本上是纯的。

[0191] 本发明提供了这样的抗体:该抗体与包含含有 SEQ ID NO:14 的重链可变区和含有 SEQ ID NO:13 的轻链可变区的抗体竞争对人类 Notch2 和 / 或 Notch3 的特异性结合。本发明还提供了这样的抗体:该抗体与包含 59R1 IgG2 的抗体、由 59R1 IgG2 组成的抗体或基本上由 59R1 IgG2 组成的抗体竞争对人类 Notch2 和 / 或 Notch3 的特异性结合,59R1 IgG2 抗体包含分别为 SEQ ID NO:16 和 18 (带有或不带有信号序列) 的重链和轻链,或由 DNA 编码,所述 DNA 于 2008 年 10 月 15 日保藏在 ATCC,并赋予保藏号 PTA-9547。

[0192] 本发明还提供与一种或多种 Notch 受体特异性结合的抗体,所述抗体包含 SEQ ID NO:5 至 10、22 至 27、30 或 51 的 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个和 / 或 6 个 CDR,每个 CDR 具有最多 4 (即,0、1、2、3 或 4) 个保守性氨基酸取代 (例如见表 1)。本发明还提供与一种或多种 Notch 受体特异性结合的抗体,所述抗体包含 59R1 的 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个和 / 或 6 个 CDR (即,SEQ ID NO:5 至 10),每个 CDR 具有最多 4 个保守性氨基酸取代。因此,本发明提供与一种或多种 Notch 受体特异性结合的抗体,所述抗体包含 59R1 的 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个和 / 或 6 个 CDR。在特定实施方式中,所述抗体包含具有最多 4 个保守性氨基酸取代的 59R1 的重链 CDR3 和 / 或具有最多 4 个保守性氨基酸取代的 59R1 的轻链 CDR3。在某些实施方式中,所述抗体包含 (a) 含有 SSSGMS (SEQ ID NO:5) 的重链 CDR1,或包含 1 个、2 个、3 个或 4 个保守性氨基酸取代的其变体;含有 VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:6) 的重链 CDR2,或包含 1 个、2 个、3 个或 4 个保守性氨基酸取代的其变体;和 / 或含有 GIFFAI (SEQ ID NO:7) 的重链 CDR3,或包含 1 个、2 个、3 个或 4 个保守性氨基酸取代的其变体;和 / 或 (b) 含有 RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:8) 的轻链 CDR1,或包含 1 个、2 个、3 个或 4 个保守性氨基酸取代的其变体;含有 GASSRAT (SEQ ID NO:9) 的轻链 CDR2,或包含 1 个、2 个、3 个或 4 个保守性氨基酸取代的其变体;和 / 或含有 QQYSNFPI (SEQ ID NO:10) 的轻链 CDR3,或包含 1 个、2 个、3

个或 4 个保守性氨基酸取代的其变体。

[0193] 本发明还提供与一种或多种 Notch 受体特异性结合的抗体,所述抗体包含 59R5 的 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个和 / 或 6 个 CDR(即,SEQ ID NO :5、6、8 至 10、51),每个 CDR 具有最多 4 个保守性氨基酸取代。在特定实施方式中,所述抗体包含具有最多 4 个保守性氨基酸取代的 59R5 的重链 CDR3 和 / 或具有最多 4 个保守性氨基酸取代的 59R5 的轻链 CDR3。在某些实施方式中,所述抗体包含 (a) 含有 SSSGMS(SEQ ID NO :5) 的重链 CDR1,或包含 1 个、2 个、3 个或 4 个保守性氨基酸取代的其变体;含有 VIASSGSNTYYADSVKG(SEQ ID NO :6) 的重链 CDR2,或包含 1 个、2 个、3 个或 4 个保守性氨基酸取代的其变体;和 / 或含有 SIFYTT(SEQ ID NO :51) 的重链 CDR3,或包含 1 个、2 个、3 个或 4 个保守性氨基酸取代的其变体;和 / 或 (b) 含有 RASQSVRSNYLA(SEQ ID NO :8) 的轻链 CDR1,或包含 1 个、2 个、3 个或 4 个保守性氨基酸取代的其变体;含有 GASSRAT(SEQ ID NO :9) 的轻链 CDR2,或包含 1 个、2 个、3 个或 4 个保守性氨基酸取代的其变体;和 / 或含有 QQYSNFPI(SEQ ID NO :10) 的轻链 CDR3,或包含 1 个、2 个、3 个或 4 个保守性氨基酸取代的其变体。在特定实施方式中,所述抗体包含含有 SSSGMS(SEQ ID NO :5) 的重链 CDR1、含有 VIASSGSNTYYADSVKG(SEQ ID NO :6) 的重链 CDR2 和 / 或含有 SIFYTT(SEQ ID NO :51) 的重链 CDR3。

[0194] 还提供的是特异性结合人类 Notch2 和 / 或 Notch3 的抗体,其中所述抗体包含含有 SSSGMS(SEQ ID NO :5) 的重链 CDR1、含有 VIASSGSNTYYADSVKG(SEQ ID NO :6) 的重链 CDR2 和 / 或含有 (G/I) (I/S) F(F/Y) (A/P) (I/T/S/N) (SEQ ID NO :30) 的重链 CDR3。在特定实施方式中,所述重链 CDR3 选自 SIFYPT(SEQ ID NO :22)、SSFFAS(SEQ ID NO :23)、SSFYAS(SEQ ID NO :24)、SSFFAT(SEQ ID NO :25)、SIFYPS(SEQ ID NO :26) 和 SSFFAN(SEQ ID NO :27) 组成的组。在特定实施方式中,所述抗体包含含有 SSSGMS(SEQ ID NO :5) 的重链 CDR1、含有 VIASSGSNTYYADSVKG(SEQ ID NO :6) 的重链 CDR2、和 / 或含有 GIFFAI(SEQ ID NO :7) 的重链 CDR3。在特定实施方式中,所述重链 CDR 位于抗体重链的可变区内。在特定实施方式中,所述抗体还包含含有 RASQSVRSNYLA(SEQ ID NO :8) 的轻链 CDR1、含有 GASSRAT(SEQ ID NO :9) 的轻链 CDR2 和 / 或含有 QQYSNFPI(SEQ ID NO :10) 的轻链 CDR3。在特定实施方式中,所述轻链 CDR 位于抗体轻链的可变区内。在特定实施方式中,对所述重链 CDR 和 / 或轻链 CDR 通过 1 个、2 个、3 个或 4 个保守性氨基酸取代进行修饰。在特定实施方式中,通过不超过 1 至 2 个保守性氨基酸取代对各 CDR 进行修饰。

[0195] 例如,在特定实施方式中,本发明提供特异性结合人类 Notch2 和 / 或 Notch3 的抗体,其中所述抗体包含:(a) 含有 SSSGMS(SEQ ID NO :5) 的重链 CDR1、含有 VIASSGSNTYYADSVKG(SEQ ID NO :6) 的重链 CDR2 和含有 GIFFAI(SEQ ID NO :7) 的重链 CDR3;和 / 或 (b) 含有 RASQSVRSNYLA(SEQ ID NO :8) 的轻链 CDR1、含有 GASSRAT(SEQ ID NO :9) 的轻链 CDR2 和含有 QQYSNFPI(SEQ ID NO :10) 的轻链 CDR3。在某些实施方式中,所述抗体同时包含所指出的轻链 CDR 和重链 CDR。

[0196] 在某些实施方式中,本发明提供特异性结合人类 Notch2 和 / 或 Notch3 的抗体,其中所述抗体包含 (a) 含有 SSSGMS(SEQ ID NO :5) 的重链 CDR1、含有 VIASSGSNTYYADSVKG(SEQ ID NO :6) 的重链 CDR2 和含有 SIFYTT(SEQ ID NO :51) 的重链 CDR3;和 / 或 (b) 含有 RASQSVRSNYLA(SEQ ID NO :8) 的轻链 CDR1、含有 GASSRAT(SEQ ID NO :9) 的轻链 CDR2 和含有 QQYSNFPI(SEQ ID NO :10) 的轻链 CDR3。在特定实施方式中,所述抗体同时包含所指出的轻

链 CDR 和重链 CDR。

[0197] 本发明还提供特异性结合人类 Notch2 和 / 或 Notch3 的抗体,其中所述抗体包含含有 RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO :8) 的轻链 CDR1、含有 GASSRAT (SEQ ID NO :9) 的轻链 CDR2 和 / 或含有 QQYSNFPI (SEQ ID NO :10) 的轻链 CDR3。

[0198] 本发明还提供特异性结合人类 Notch2 和 / 或 Notch3 的抗体,其中所述抗体包含 : (a) 与 SEQ ID NO :14 或 SEQ ID NO :20 具有至少约 80%、至少约 85%、至少约 90%、至少约 95%或至少约 98%序列同一性的多肽 ;和 / 或 (b) 与 SEQ ID NO :13 或 SEQ IDNO :19 具有至少约 80%、至少约 85%、至少约 90%、至少约 95%或至少约 98%序列同一性的多肽。因此,在特定实施方式中,所述抗体包含 (a) 与 SEQ ID NO :14 具有至少约 95%序列同一性的重链可变区 ;和 / 或 (b) 与 SEQ ID NO :13 具有至少约 95%序列同一性的轻链可变区。在特定实施方式中,所述抗体包含 : (a) 包含 SEQ ID NO :14 或 SEQ ID NO :20 的多肽 (例如,重链可变区) ;和 / 或 (b) 包含 SEQ ID NO :13 或 SEQ ID NO :19 的多肽 (例如,轻链可变区)。

[0199] 本发明还提供特异性结合人类 Notch2 和 / 或 Notch3 的抗体,其中所述抗体包含 : (a) 与 SEQ ID NO :50 具有至少约 80%、至少约 85%、至少约 90%、至少约 95%或至少约 98%序列同一性的多肽 ;和 / 或 (b) 与 SEQ ID NO :13 具有至少约 80%、至少约 85%、至少约 90%、至少约 95%或至少约 98%序列同一性的多肽。因此,在特定实施方式中,所述抗体包含 (a) 与 SEQ ID NO :50 具有至少约 95%序列同一性的重链可变区 ;和 / 或 (b) 与 SEQ ID NO :13 具有至少约 95%序列同一性的轻链可变区。在特定实施方式中,所述抗体包含 : (a) 包含 SEQ ID NO :50 的多肽 (例如,重链可变区) ;和 / 或 (b) 包含 SEQ ID NO :13 的多肽 (例如,轻链可变区)。

[0200] 在特定实施方式中,所述拮抗剂是可以接到补体依赖性细胞毒性或抗体依赖性细胞的细胞毒性从而杀死表达靶抗原的肿瘤的抗体。在某些替代性实施方式中,所述抗体与毒素或放射性同位素直接缀合从而介导肿瘤细胞杀死。另外,肿瘤存活取决于新血管化形成,并且在特定实施方式中,所述抗体具有抗血管发生效果。

[0201] 本发明提供针对诸如人类 Notch2 和 / 或 Notch3 等 Notch 受体的分离的抗体。所述抗体或抗体片段可以是特异性识别所述 Notch 受体的任何单克隆抗体或多克隆抗体。在某些实施方式中,本发明提供与本文所述 Notch 受体特异性结合的单克隆抗体或其片段。在某些实施方式中,所述单克隆抗体或其片段是与本文所述的 Notch 受体的胞外域特异性结合的嵌合抗体或人源化抗体。在其它实施方式中,所述单克隆抗体或其片段是与本文所述的 Notch 受体的胞外域特异性结合的人类抗体。在特定实施方式中,所述抗体是 IgG1 或 IgG2 抗体。

[0202] 发现针对 Notch 受体的抗体可用于本文所述的实验、诊断和治疗方法。在特定实施方式中,使用本发明的抗体来检测生物样品中 Notch 受体的表达,所述生物样品例如患者组织活检物、胸腔积液或血液样品。可以对组织活检物进行切片并且使用例如免疫荧光或免疫组织化学法检测蛋白。作为选择,分离来自样品的个体细胞,并通过 FACS 分析在固定细胞或活细胞上检测蛋白表达。另外,可以在蛋白阵列上使用所述抗体来检测例如肿瘤细胞上、细胞裂解物中或其它蛋白样品中的 Notch 受体的表达。在其它实施方式中,在体外基于细胞的检测中或在体内动物模型中,通过使肿瘤细胞与本发明的抗体接触,从而使用本发明的抗体来抑制肿瘤细胞的生长。在其它实施方式中,通过施用治疗有效量的针对

Notch 受体的抗体,从而使用所述抗体来治疗人类患者中的癌。

[0203] 可以通过任何已知方法制备多克隆抗体。通过用相关抗原(经纯化的肽片段、全长重组蛋白、融合蛋白等)的多次皮下或腹膜内注射对动物(例如兔、大鼠、小鼠、羊、驴等)进行免疫来产生多克隆抗体,所述相关抗原可选地与匙孔血蓝蛋白(KLH)、血清白蛋白等缀合、稀释于无菌盐水并与佐剂(例如完全或不完全弗氏佐剂)组合以形成稳定的乳液。然后从如此免疫的动物的血液和腹水等中回收多克隆抗体。使收集的血液凝固,滗析血清,通过离心使其澄清,并且测定抗体滴度。可以根据本领域的标准方法从血清或腹水中纯化多克隆抗体,所述标准方法包括亲和色谱、离子交换色谱、凝胶电泳、透析等。

[0204] 使用杂交瘤方法制备单克隆抗体,所述杂交瘤方法例如 Kohler 和 Milstein, 1975, Nature 256 :495 中所述的方法。使用所述杂交瘤方法,如上所述对小鼠、仓鼠或其它合适的宿主动物进行免疫,从而引起淋巴细胞产生会与免疫抗原特异性结合的抗体。作为选择,可以在体外对淋巴细胞进行免疫。免疫后,分离淋巴细胞,并使用例如聚乙二醇将其与合适的骨髓瘤细胞系融合,从而形成杂交瘤细胞,然后将该杂交瘤细胞从未融合的淋巴细胞和骨髓瘤细胞中选择出。然后可以使用标准方法(Goding, Monoclonal Antibodies : Principles and Practice, Academic Press, 1986)进行体外培养或在动物中体内地作为腹水肿瘤使产生特异性针对所选择抗原的单克隆抗体的杂交瘤增殖,所述所选择抗原通过免疫沉淀、免疫印迹,或通过诸如放射免疫检测(RIA)或酶联免疫吸附检测(ELISA)等体外结合检测确定。然后可以按照关于以上多克隆抗体所述从培养基或腹水流体中对单克隆抗体进行纯化。

[0205] 作为选择还可以使用美国专利第 4, 816, 567 号中所述的重组 DNA 方法制备单克隆抗体。例如通过 RT-PCR 使用特异性扩增编码所述抗体的重链和轻链的基因的寡核苷酸引物,从成熟 B 细胞或杂交瘤细胞中分离编码单克隆抗体的多核苷酸,并且使用常规方法确定其序列。然后将编码重链和轻链的分离的多核苷酸克隆到合适的表达载体中,当其被转染到宿主细胞中时就在宿主细胞中表达单克隆抗体,所述宿主细胞未被转染时就不产生免疫球蛋白,例如大肠杆菌细胞、猿 COS 细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或骨髓瘤细胞。另外,例如如本文所述,可以从噬菌体展示文库中分离所需物种的重组单克隆抗体或其片段。

[0206] 可以使用重组 DNA 技术以多种不同的方式对编码单克隆抗体的多核苷酸进行进一步修饰,从而产生替代性的抗体。在某些实施方式中,例如小鼠单克隆抗体的轻链和重链的恒定域可以被:1) 被例如人类抗体的那些区域取代从而产生嵌合抗体或 2) 被非免疫球蛋白多肽取代从而产生融合抗体。在其它实施方式中,将所述恒定区截短或除去从而产生单克隆抗体的所需抗体片段。另外,可使用可变区的定点突变或高密度突变发生来优化单克隆抗体的特异性、亲和性等。

[0207] 通常而言,可以从任何抗体获得或衍生出可用于本发明的修饰抗体。另外,用于产生所述经修饰抗体的亲本抗体或前体抗体,或其片段,可以是鼠类的、人类的、嵌合的、人源化的、非人灵长类的或灵长源化的。在其它实施方式中,本发明的经修饰抗体可以包括具有本文所述的经改变的恒定域的单链抗体构建体(例如美国专利第 5, 892, 019 号中公开的,通过参考将其并入本文)。因此,根据本文教导修饰的这些类型抗体中的任何抗体都与本发明相容。

[0208] 根据本发明,使技术适于生产对本发明的多肽具有特异性的单链抗体(参见美国

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

[0209] 双特异性抗体也在本发明的范围之内。双特异性抗体是对至少两个不同抗原(或,在特定实施方式中,对同一抗原上的至少两个不同表位)具有结合特异性的单克隆抗体,优选是人类或人源化抗体。在本案中,结合特异性之一针对本发明的抗原性多肽(Notch,或其片段),而第二结合靶标是任何其它抗原,并且有利地是细胞表面蛋白,或受体或受体亚基。还提供包含特异性结合一种人类 Notch 受体(例如,Notch2)的一个抗原结合位点并且还包含特异性结合第二人类 Notch 受体(例如,Notch3)的第二个不同的抗原结合位点的双特异性抗体。

[0210] 本领域已知制备双特异性抗体的方法。常规上双特异性抗体的重组生产是基于两个免疫球蛋白重链/轻链对的共表达,其中两个重链具有不同的特异性(Milstein 和 Cuello, Nature 1983, 305 :537-539)。由于免疫球蛋白重链和轻链的随机分配,这些杂交瘤(四源杂交瘤)产生十种不同抗体分子的潜在混合物,其中仅一种具有正确的双特异性结构。通常通过亲和和色谱实现对正确分子的纯化。

[0211] 作为选择,在特定实施方式中,本文所述抗体可以是单特异性的。例如,在特定实施方式中,抗体含有的一个或多个抗原结合位点中的每个都结合或能够结合相同的一种或多种人类 Notch 受体(例如,Notch2、Notch3、或在 Notch2 和 Notch3 上的同源性表位)。在特定实施方式中,本文所述的单特异性抗体的抗原结合位点结合或能够结合人类 Notch3 的 EGF 重复 9 和 Notch2 的 EGF 重复 10。

[0212] 可以将具有所需结合特异性的抗体可变域与免疫球蛋白恒定域序列融合。融合物具有免疫球蛋白重链恒定域,包括至少部分铰链、CH2 和 CH3 区。含有轻链结合所需位点的第一重链恒定区(CH1)可以存在于至少一个融合物中。将编码免疫球蛋白重链融合物和如果需要的话,免疫球蛋白轻链的 DNA,插入到单独的表达载体中,并将其共转染到合适的宿主生物体中。在 Suresh 等,1986, Methods in Enzymology, 121 :210 中可以发现产生双特异性抗体的更详细描述。

[0213] 可以将双特异性抗体制备成全长抗体或抗体片段。在该文献中已经描述了用于从抗体片段产生双特异性抗体的技术。例如,可以使用化学键制备双特异性抗体。另外, Brennan 等,1985, Science, 229 :81 描述了其中将完整抗体进行蛋白水解切割以产生 $F(ab')_2$ 片段的步骤。

[0214] 另外,可以直接从大肠杆菌回收 Fab' 片段,并对其进行化学偶联以形成双特异性抗体(Shalaby 等, J. Exp. Med. 1992, 175 :217-225)。这些方法可用于生产全长人源化双特异性抗体 $F(ab')_2$ 分子。

[0215] 还涉及具有超过两价的抗体。例如,可以制备三特异性抗体(Tutt 等,1991, J. Immunol. 147 :60)。

[0216] 示例性的双特异性抗体可以与两个不同的表位结合,其中至少一个表位源自本发

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

[0217] 异源偶联抗体(Heteroconjugate antibody)也在本发明的范围之内。异源偶联抗体由两个共价结合的抗体组成。例如,已经提出所述抗体可使免疫细胞靶向不想要的细胞(美国专利 4,676,980)。设想的是可以使用合成蛋白质化学中的已知方法在体外制备所述抗体,所述合成蛋白质化学包括涉及交联剂的合成蛋白质化学。例如,可以利用二硫键交换反应或通过形成硫醚键来构建免疫毒素。用于该目的合适试剂的实例包括亚氨基硫醇盐(或酯)(iminothiolate)和甲基-4-巯基丁亚氨酸盐(或酯)。

[0218] 为了本发明的目的,应该意识到经修饰抗体可以包括任何类型的可变区,所述可变区提供所述抗体与 Notch 多肽的结合。在这点上,所述可变区可以包括或源自任何类型的哺乳动物,可以诱导所述哺乳动物发动体液应答和产生针对所需肿瘤相关抗原的免疫球蛋白。因此,经修饰抗体的可变区可以是例如人类、鼠类、非人灵长类(如食蟹猴、猕猴等)或狼来源。在某些实施方式中经修饰免疫球蛋白的可变区和恒定区是人类的。在其它实施方式中,可以对相容性抗体的可变区(通常源自非人类来源)进行工程化或特异性剪裁,从而改善结合性质或减少所述分子的免疫原性。在这点上,可以对本发明所用的可变区进行人源化,或通过包含所引入的氨基酸序列而进行改变。

[0219] 在本发明的某些实施方式中,针对 Notch 受体的单克隆抗体是人源化抗体。人源化抗体是在可变区内含有来自非人类(例如鼠类)抗体的最小序列的抗体。当对人类受试对象施用所述抗体时,治疗学上使用所述抗体来减少免疫原性和 HAMA(人抗鼠抗体)应答。实际上,人源化抗体通常是具有最小非人类序列至不含非人类序列的人类抗体。人类抗体是由人类产生的抗体或具有与由人类产生的抗体相应的氨基酸序列的抗体。

[0220] 可以使用本领域已知的各种技术生产人源化抗体。可以通过用具有所需特异性、亲和性和/或能力的非人类抗体(例如小鼠、大鼠、兔、仓鼠等)的 CDR 取代人类抗体的 CDR 而使抗体人源化(Jones 等,1986, Nature, 321 :522-525 ;Riechmann 等,1988, Nature, 332 :323-327 ;Verhoeyen 等,1988, Science, 239 :1534-1536)。可以通过在 Fv 框架区中和/或在已置换的非人类残基内取代另外的残基而进一步对所述人源化抗体进行修饰,从而改善和优化抗体特异性、亲和性和/或能力。

[0221] 作为人源化的替代性方案,可以产生人类抗体。可以使用包括转基因动物、噬菌体文库和体外活化的人类 B 细胞在内的本领域已知的各种技术制备人类抗体。

[0222] 例如,可以生产含有人类免疫球蛋白基因座的转基因动物(例如小鼠),当免疫时,在不存在内源性免疫球蛋白产生下所述人类免疫球蛋白基因座能够产生全部指令集(repertoire)的人类抗体。例如,已经描述了在嵌合的种系突变小鼠中使抗体重链连接区(JH)基因的纯合缺失导致完全抑制内源性抗体的产生。将人类种系免疫球蛋白基因阵列转移到所述种系突变小鼠中会导致当抗原挑战时人类抗体的产生。参见,例如, Jakobovits 等,1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90 :2551 ;Jakobovits 等,1993, Nature, 362 :255-258 ; Bruggemann 等,1993, Year in Immunol. 7 :33 ;美国专利第 5,545,806 ;第 5,569,825 号 ;第

5, 591, 669 号 ;第 5, 545, 807 号 ;第 5, 545, 807 号 ;第 5, 625, 126 号 ;第 5, 633, 425 号和 WO 97/17852。

[0223] 作为选择,可以使用噬菌体展示技术来体外从来自未经免疫供体的免疫球蛋白可变(V)域基因指令集(repertoire)中生产人类抗体和抗体片段。根据该技术,将抗体V域基因在框架内克隆到诸如M13或fd等丝状噬菌体的主要或次要外壳蛋白基因中,并且作为功能抗体片段展示在噬菌体颗粒的表面上。由于丝状颗粒含有噬菌体基因组的单链DNA拷贝,基于抗体的功能性质的选择还导致编码展示这些性质的抗体的基因的选择。因此,该噬菌体模拟B细胞的某些性质。可以以各种形式进行噬菌体展示。对于噬菌体展示可使用几种来源的V-基因区段。已经从源自经免疫小鼠的脾的V基因的小随机组合文库中分离出抗噁唑酮抗体的各种阵列。可以构建来自未经免疫人类供体的V基因的指令集,并且可以分离针对抗原(包括自体抗原)的各种阵列的抗体。从表达人类抗体的噬菌体文库选择人类抗体的方法是本领域众所周知的(Vaughan等,1996, Nature Biotechnology 14 :309-314 ; Sheets等,1998, PNAS95 :6157-6162 ;Hoogenboom和Winter,1991, J. Mol. Biol. 227 :381 ; McCafferty等,1990, Nature348 :552-554 ;Clackson等,1991, Nature 352 :624-628 ;和Marks等,1991, J. Mol. Biol. ,222 :581-597)。用于产生和使用抗体噬菌体文库的技术还描述于美国专利第5,969,108号 ;第6,172,197号 ;第5,885,793号 ;第6,521,404号 ;第6,544,731号 ;第6,555,313号 ;第6,582,915号 ;第6,593,081号 ;第6,300,064号 ;第6,653,068号 ;第6,706,484 ;和第7,264,963号 ;以及Rothe等,2008, J. Mol. Bio. 376 :1182-1200(通过参考并入每一篇的全文)。诸如链改组等亲和熟化策略(Marks等,1992, Bio/Technology 10 :779-783,通过参考并入其全文)是本领域已知的,并且可用于产生高亲和性人类抗体。

[0224] 可以使用本领域已知的各种技术直接制备人类抗体。可以产生体外免疫的或分离自经免疫个体的永生化人B淋巴细胞,所述经免疫个体产生针对靶抗原的抗体(参见,例如,Cole等,1985, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss,第77页 ; Boemer等,1991, J. Immunol. ,147(1)86-95 ;和美国专利第5,750,373号 ;第5,567,610号 ;和第5,229,275号)。

[0225] 应该意识到将整个非人类可变域移植到人类恒定区会产生“经典”嵌合抗体。在本申请的情况下,术语“嵌合抗体”用来指其中免疫反应区或位点获自或源自第一物种,并且恒定区(根据本发明其可以是完整、部分或经修饰的)获自第二物种的任何抗体。在某些实施方式中,抗原结合区或位点会来自非人类来源(例如小鼠),并且恒定区是人类的。虽然可变区的免疫原性特异性通常不受其来源影响,与来自非人类来源的恒定区相比,人类恒定区更不可能引发人类受试对象的免疫应答。

[0226] 通过至少部分置换一个或多个CDR,以及必要时通过部分框架区置换和序列改变,可改变重链和轻链中的可变区。虽然所述CDR可以源自与框架区所源自的抗体相同类别或甚至相同亚类的抗体,可以设想所述CDR源自不同类别的抗体,并且优选源自不同物种的抗体。必须强调为了将一个可变域的抗原结合能力转移到另一个可变域,不需要将全部CDR用来自供体可变区的完整CDR置换。相反,可以仅需要转移对于维持抗原结合位点活性所必需的那些残基。根据美国专利第5,585,089号、第5,693,761号和第5,693,762号中提出的解释,在本领域内可以很好地通过进行常规实验或通过试错试验以获得免疫原性降低

的功能抗体。

[0227] 虽然对可变区进行了改变,但应该意识到本发明的经修饰抗体会包含下述抗体或其免疫反应性片段:其中一个或多个恒定区结构域的至少一部分已经缺失或改变从而提供所需生化和/或生物学特性,例如当与包含天然或未经改变恒定区的免疫原性近似相同的抗体相比,肿瘤定位增加或血清半衰期减少。在某些实施方式中,经修饰抗体的恒定区会包含人类恒定区。与本发明相容的对恒定区的修饰包括在一个或多个域中的一个或多个氨基酸的添加、缺失或取代。即,本文所述的经修饰抗体可以包含对三个重链恒定区(CH1、CH2或CH3)和/或轻链恒定区(CL)中的一个或多个进行改变或修饰。在本发明的某些实施方式中涉及其中一个或多个域部分或完全缺失的经修饰恒定区。在其它实施方式中经修饰抗体会包含其中除去整个CH2域的域缺失构建体或变体(Δ CH2构建体)。在其它实施方式中省略的恒定区域会被短的氨基酸间隔子(例如10个残基)置换,所述间隔子提供通常由缺失的恒定区赋予的某些分子柔性。

[0228] 除了其构造之外,本领域已知恒定区介导几种效应子功能。例如,补体的C1组分与抗体的结合激活补体系统。补体的激活在细胞病原体的调理作用和裂解中是重要的。补体的激活还刺激炎症反应,并且还可以涉及自体免疫超敏性。另外,抗体经由Fc区与细胞结合,伴随着位于抗体Fc区上的Fc受体位点与位于细胞上的Fc受体(FcR)结合。存在许多对不同种类的抗体具有特异性的Fc受体,包括IgG(γ 受体)、IgE(ϵ 受体)、IgA(α 受体)和IgM(μ 受体)。抗体与位于细胞表面上Fc受体的结合触发许多重要的各种生物应答,包括抗体包被颗粒的内吞和破坏、免疫复合物的清除、抗体包被靶细胞被杀伤细胞裂解(称为抗体依赖性细胞介导的细胞毒性,或ADCC)、炎症介体的释放、胎盘转移和免疫球蛋白产生的控制。虽然已经对各种Fc受体和受体位点研究到一定程度,关于其定位、结构和功能仍然存在许多未知。

[0229] 虽然不限制本发明的范围,据信包含本文所述进行修饰的恒定区的抗体提供经改变的效应子功能,这进而影响所施用抗体的生物特征。例如,恒定区结构域的缺失或失活(通过点突变或其它方式)可以减少Fc受体与循环的经修饰抗体的结合,由此增加肿瘤定位。在其它情况下,可以的是,与本发明相容的恒定区修饰缓和补体结合并且由此减少血清半衰期和缀合细胞毒素的非特异性结合。还可使用恒定区的其它修饰来消除双硫键或寡糖基团,从而由于抗原特异性或抗体柔性增加而增强定位。类似地,使用众所周知的生化或分子生物工程化技术可以容易地进行根据本发明对恒定区的修饰。

[0230] 应该注意可以对经修饰抗体进行工程化以将CH3域直接融合到各经修饰抗体的铰链区。在其它构建体中理想的是在铰链区和经修饰CH2和/或CH3域之间提供肽间隔子。例如,可以表达相容性构建体,所述构建体中CH2域已经缺失,并且剩余的CH3域(经修饰或未经修饰)与具有5~20个氨基酸的间隔子的铰链区结合。例如,可以添加所述间隔子,从而确保恒定域的调节元件保持自由并且是可接触的,或确保铰链区保持柔性。但是,应该注意在某些情况下,可以证明氨基酸间隔子具有免疫原性,并且引发不想要的针对所述构建体的免疫应答。因此,如果可以维持经修饰抗体的所需生化和/或生物学质量,则向构建体添加的任何间隔子应是相对非免疫原性的,甚至可以一起省略。

[0231] 除了缺失整个恒定区结构域之外,应意识到可以通过几个甚至单个氨基酸的部分缺失或取代来提供本发明的抗体。例如,在CH2域的所选区域中单个氨基酸的突变可能足

以实质地减少 Fc 结合并由此增加肿瘤定位。类似地,理想的是可简单地缺失一个或多个控制待调节的效应子功能(例如补体 C1q 结合)的恒定区结构域的部分。恒定区的所述部分缺失可以改善抗体的所选特性(血清半衰期),同时使与受试对象恒定区结构域有关的其它所需功能保持完整。另外,如上所述,可以通过增强所得构建体性质的一个或多个氨基酸的突变或取代而对所公开抗体的恒定区进行修饰。在这点上,可以破坏由保守结合位点提供的活性(例如 Fc 结合),同时基本上保持经修饰抗体的构造和免疫原性特征。其它实施方式还包括将一个或多个氨基酸添加到恒定区,从而增强诸如效应子功能等所需特性或提供更多的细胞毒素或糖类粘附。在所述实施方式中可以期望插入或复制源自所选恒定区结构域的特异性序列。

[0232] 本发明还包含特异性识别 Notch 受体的双特异性抗体。双特异性抗体是能够特异性识别和结合至少两个不同表位的抗体。不同的表位可以位于同一分子(例如同一个 Notch 受体多肽)内或位于不同的分子上。例如所述抗体可以特异性识别和结合 Notch 受体,以及,例如 1) 白细胞上的效应分子,例如 T 细胞受体(如 CD3)或 Fc 受体(如 CD64、CD32 或 CD 16)或 2) 本文详细描述过的细胞毒性剂。双特异性抗体可以是完整抗体或抗体片段。用于制备双特异性抗体的技术是本领域常见的(Millstein 等,1983, Nature, 305 : 537-539 ;Brennan 等,1985, Science, 229 :81 ;Suresh 等,1986, Methods in Enzymol. , 121 : 120 ;Trauneker 等,1991, EMBO J. , 10 :3655-3659 ;Shalaby 等,1992, J. Exp. Med. , 175 : 217-225 ;Kostelny 等,1992, J. Immunol. , 148 :1547-1553 ;Gruber 等,1994, J. Immunol. , 152 :5368 ;和美国专利第 5, 731, 168 号)。

[0233] 在本发明的特定实施方式中,可以期望使用抗体片段而不是完整抗体,来例如增加肿瘤渗透。已知用于生产抗体片段的各种技术。常规上,这些片段经由蛋白水解消化完整抗体衍生(例如 Morimoto 等,1993, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24 :107-117 和 Brennan 等,1985, Science, 229 :81)。但是,现在这些片段通常通过本文所述的重组宿主细胞直接产生。因此 Fab、Fv 和 scFv 抗体片段可以都在大肠杆菌或其它宿主细胞中表达和分泌,从而允许生产大量的这些片段。作为选择,可以从本文讨论的抗体噬菌体文库中分离所述抗体片段。所述抗体片段还可以例如是美国专利第 5, 641, 870 号中所述的线性抗体,并且可以是单特异性或双特异性的。用于生产抗体片段的其它技术是显而易见的。

[0234] 特别在抗体片段的情况下,还可以期望对抗体进行修饰从而增加其血清半衰期。这可以通过下述方式实现:例如通过在抗体片段中合适区域的突变从而将补救受体(salvage receptor)结合表位引入到抗体片段中,或通过将所述表位引入到肽标签中,然后所述肽标签与在任一端或在中间的抗体片段融合(例如通过 DNA 或肽合成)。

[0235] 本发明还包括与本文提出的嵌合抗体、人源化抗体和人类抗体,或其抗体片段基本上同源的变体或等效物。这些可以含有例如,保守性取代突变,即一个或多个氨基酸被类似的氨基酸取代。例如,保守性取代是指氨基酸被同一总种类的另一氨基酸取代,例如,一个酸性氨基酸被另一酸性氨基酸取代,一个碱性氨基酸被另一碱性氨基酸取代或一个中性氨基酸被另一中性氨基酸取代。保守性氨基酸取代所指含义是本领域众所周知的。

[0236] 本发明还涉及包含与细胞毒性剂缀合的免疫缀合物。细胞毒性剂包括化学治疗剂、生长抑制剂、毒素(例如细菌、真菌、植物或动物来源的酶促活性毒素,或其片段)、放射

性同位素（即放射缀合物）等。用于产生此类免疫缀合物的化学治疗剂包括，例如，氨甲蝶呤、阿霉素、多柔比星、美法仑、丝裂霉素 C、苯丁酸氮芥、道诺红菌素或其它嵌入剂。可以使用的酶促活性毒素和其片段包括白喉 A 链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素 A 链、蓖麻毒蛋白 A 链、相思豆毒蛋白 A 链、莨菪根毒蛋白 A 链、 α -八叠球菌素、油桐 (*Aleurites fordii*) 蛋白、石竹素蛋白、美国商陆蛋白 (PAPI、PAPII 和 PAP-S)、苦瓜 (*Momordica charantia*) 抑制剂、麻风树毒素、巴豆毒素、肥皂草 (*Saponaire officinalis*) 抑制剂、白树毒素、有丝分裂毒素 (mitogellin)、局限曲菌素、酚霉素、依诺霉素和新月毒素。可以使用各种双官能蛋白偶联剂制备抗体和细胞毒性剂的缀合物，所述双功能蛋白偶联剂例如 N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶二硫代)丙酸酯 (SPDP)、亚氨基硫烷 (IT)、亚氨酸酯的双官能衍生物（例如二甲基己二亚氨基酯 HCL）、活性酯（例如二琥珀酰亚胺辛二酸酯）、醛（例如戊二醛）、双叠氮化合物（例如双（对叠氮苯甲酰）己二胺）、双重氨基衍生物（例如双（对重氮苯甲酰）-乙二胺）、二异氰酸酯（例如亚甲苯 2,6-二异氰酸酯）和双活性氟化合物（例如 1,5-二氟-2,4-二硝基苯）。还可以使用抗体与一种或多种小分子毒素的缀合物，所述小分子毒素例如加利车霉素、美登醇、单端孢霉烯 (trichothene) 和 CC1065，以及具有毒素活性的这些毒素的衍生物。

[0237] 缀合抗体由两个共价结合的抗体组成。例如，已经提出所述抗体可使免疫细胞靶向不想要的细胞（美国专利 4,676,980）。设想的是可以使用合成蛋白质化学中的已知方法在体外制备所述抗体，所述合成蛋白质化学包括涉及交联剂的合成蛋白质化学。例如，可以利用二硫键交换反应或通过形成硫醚键来构建免疫毒素。用于该目的的合适试剂的实例包括亚氨基硫醇盐（或酯）(iminothiolate) 和甲基-4-巯基丁亚氨酸盐（或酯）。

[0238] 在某些实施方式中，本发明的抗体含有人类 Fc 区，所述人类 Fc 区经修饰以增强效应子功能，例如抗原依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 和 / 或补体依赖性细胞毒性 (CDC)。这可以通过在所述抗体的 Fc 区中引入一个或多个氨基酸取代来实现。例如，将半胱氨酸残基引入 Fc 区从而可在该区链内形成二硫键，从而改善补体介导的细胞杀死和抗体依赖性细胞的细胞毒性 (ADCC) (Caron 等, 1992, *J. Exp Med.* 176 :1191-1195 ;Shopes, 1992, *Immunol.* 148 :2918-2922)。还可以使用如 Wolff 等, 1993, *Cancer Research* 53 :2560-2565 中所述的异双功能交联剂制备具有增强抗肿瘤活性的同型二聚抗体。作为选择，可以工程化具有双 Fc 区的抗体 (Stevenson 等, 1989, *Anti-Cancer Drug Design* 3 :219-230)。

[0239] 无论如何获得可用量，本发明的抗体可以以许多缀合（即免疫缀合物）或未缀合形式中的任一种使用。本发明抗体可以以未缀合或“裸”形式使用，从而利用受试对象的天然防御机制以消除恶性细胞，所述天然防御机制包括补体依赖性细胞毒性 (CDC) 和抗体依赖性细胞毒性 (ADCC)。在某些实施方式中，可以使用许多众所周知的螯合剂或直接标记法使所述抗体与放射性同位素缀合，所述放射性同位素包括但不限于 ^{90}Y 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{123}I 、 ^{111}In 、 ^{212}Bi 、 ^{105}Rh 、 ^{153}Sm 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{166}Ho 、 ^{177}Lu 、 ^{186}Re 和 ^{188}Re 等。在其它实施方式中，所公开的组合物可以包含与药物、前药、或生物应答修饰剂如氨甲蝶呤、阿霉素，和诸如干扰素等淋巴因子偶联的抗体。本发明的其它实施方式包括使用与诸如蓖麻毒蛋白或白喉毒素等特定生物毒素缀合的抗体。在其它实施方式中经修饰抗体可以与其它免疫活性配体（例如抗体或其片段）络合，其中所得分子与瘤细胞和诸如 T 细胞等效应细胞都结合。选择何种缀合或未缀合的经修饰抗体来使用取决于癌的种类和阶段、附加治疗（例如化学治疗或外部辐射）的

使用和患者情况。应该意识到,根据本文的教导能够容易地进行所述选择。

[0240] 抗 Notch 抗体的制备和表征还教导于例如美国专利申请公开第 2008/0131434 号, 本文通过参考并入其全文。

[0241] 在特定实施方式中,所述 Notch 结合剂或拮抗剂为不是抗体的多肽。本领域已知用于鉴定和生产与蛋白靶标高亲和性地结合的非抗体多肽的各种方法。参见,例如, Skerra, 2007, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 18 :295-304 ;Hosse 等, 2006, *Protein Science*, 15 : 14-27 ;Gill 等, 2006, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 17 :653-658 ;Nygren, 2008, *FEBS J.*, 275 : 2668-76 ;和 Skerra, 2008, *FEBS J.*, 275 :2677-83, 本文通过参考并入每一篇的全文。在特定实施方式中,已经使用噬菌体展示技术来鉴定 / 生产所述 Notch 结合多肽。在特定实施方式中,所述多肽包含种类是选自蛋白 A、脂钙蛋白 (lipocalin)、纤连蛋白域、锚蛋白通用重复域和硫氧还蛋白组成的组中的蛋白支架。

[0242] 在某些实施方式中,所述试剂是非蛋白分子。在特定实施方式中,所述试剂是小分子。对本领域技术人员而言用于鉴定非蛋白 Notch 结合剂的组合化学文库和技术是已知的。参见,例如, Kennedy 等, 2008, *J. Comb. Chem.*, 10 :345-354 ;Dolle 等, 2007, *J. Comb. Chem.*, 9 :855-902 ;和 Bhattacharyya, 2001, *Curr. Med. Chem.*, 8 :1383-404, 本文通过参考并入每一篇的全文。在其它特定实施方式中,所述试剂是糖类、糖胺聚糖、糖蛋白或蛋白聚糖。

[0243] 在特定实施方式中,所述试剂是核酸适体。适体是基于其与另一分子结合的能力而选择(例如,从随机库或诱变库中选择)的多核苷酸分子。在某些实施方式中,所述适体包含 DNA 多核苷酸。在某些替代性实施方式中,所述适体包含 RNA 多核苷酸。在特定实施方式中,所述适体包含一个或多个经修饰的核酸残基。产生和筛选与蛋白结合的核酸适体的方法是本领域众所周知的。参见,例如,美国专利第 5, 270, 163 ;5, 683, 867 ;5, 763, 595 ; 6, 344, 321 ;7, 368, 236 ;5, 582, 981 ;5, 756, 291 ;5, 840, 867 ;7, 312, 325 ; 和 7, 329, 742 号 ;国际专利公开 W002/077262 ;W003/070984 ;美国专利申请公开第 2005/0239134 ; 2005/0124565 ;和 2008/0227735 号, 本文通过参考并入每一篇的全文。

[0244] 可以通过本领域已知的任何方法检测本发明抗体的免疫特异性结合。可以使用的免疫检测包括,但不限于使用下述技术的竞争性和非竞争性检测系统:如 Biacore 分析、FACS 分析、免疫荧光、免疫细胞化学、蛋白质印迹分析、放射免疫检测、ELISA、“夹心”免疫检测、免疫沉淀检测、沉淀素反应、凝胶扩散沉淀素反应、免疫扩散检测、凝集检测、补体固定检测、免疫放射度检测、荧光免疫检测和蛋白 A 免疫检测。所述检测在本领域中是常规的并且是众所周知的(参见,例如 Ausubel 等, eds, 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, 第 1 卷, John Wiley & Sons, Inc., New York, 本文通过参考并入其全文)。

[0245] 在本发明的某些实施方式中,使用 ELISA 确定针对 Notch 受体的抗体的免疫特异性。ELISA 检测包括:制备抗原,用抗原包被 96 孔微量滴定板的孔,向所述孔中添加与诸如酶的底物(例如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶)等可检测化合物缀合的针对 Notch 受体的抗体,温育一段时间,并且检测所述抗原的存在。作为选择,针对 Notch 受体的抗体不与可检测化合物缀合,而是向所述孔中添加识别针对 Notch 受体的抗体的第二缀合抗体。另外,代替用抗原包被所述孔的是,可以用针对 Notch 受体的抗体包被所述孔,并且在向经包被的孔中添加抗原后添加与可检测化合物缀合的第二抗体。本领域中已知经改编而可以增

加检出信号的参数,并且本领域还已知 ELISA 的其它变化形式(参见例如 Ausubel 等, eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, 第 1 卷, John Wiley & Sons, Inc., New York at 11.2.1)。

[0246] 可以通过竞争结合检测确定抗体与 Notch 受体的结合亲和力和抗体抗原相互作用的解离率(off-rate)。竞争结合检测的一个实例是放射免疫检测,所述放射免疫检测包括在增加量的未标记抗原的存在下使经标记抗原(例如 ^3H 或 ^{125}I)或其片段或变体与目的抗体一起温育,然后检测与经标记抗原结合的抗体。可以从根据斯卡恰特作图分析获得的数据确定针对 Notch 受体的抗体的亲和力和结合解离率。在某些实施方式中,使用 Biacore 动力学分析来确定针对 Notch 受体的抗体的结合速率和解离率。Biacore 动力学分析包括分析抗体与表面上固定有 Notch 抗原的芯片的结合和解离。

[0247] 本发明提供编码多肽 SEQ ID NO :2、4、13、14、16、18、19、20、39、40、49、50、52、53、54、55、56 或 57 的分离的多核苷酸,以及多核苷酸 SEQ ID NO :1、3、15、17、47 或 48。本发明的多核苷酸可以是 RNA 形式或 DNA 的形式,其中 DNA 包括 cDNA、基因组 DNA 和合成 DNA。所述 DNA 可以是双链或单链的,并且如果是单链的话,所述 DNA 可以是编码链或非编码(反义)链。因此,术语“编码多肽的多核苷酸”包括仅含有所述多肽的编码序列的多核苷酸以及含有另外的编码和/或非编码序列的多核苷酸。在某些实施方式中,本发明提供与编码多肽 SEQ ID NO :2、4、13、14、16、18、19、20、39、40、49、50、52、53、54、55、56 或 57 的多核苷酸杂交的多核苷酸。在某些实施方式中,所述多核苷酸与多核苷酸 SEQ ID NO :1、3、15、17、47、48、58、59 或 60 杂交。在某些实施方式中,所述多核苷酸在严谨杂交条件下杂交。

[0248] 如本文所用,术语“杂交”或“选择性杂交”或“特异性杂交”是指当特定的核苷酸序列存在于复杂混合物(例如, DNA 或 RNA 的文库)中时,分子仅与该特定的核苷酸序列在严谨杂交条件下结合或形成双链(duplexing)。参见,例如 Andersen(1998) Nucleic Acid Hybridization Springer-Verlag ; Ross(1997 年编辑) Nucleic Acid Hybridization Wiley。

[0249] 如本文所用,短语“严谨杂交条件”是指探针或其它多核苷酸与其靶亚序列(subsequence)或其它互补序列通常以核酸的复杂混合物形式杂交,但通常不与其它序列杂交的条件。严谨条件是序列依赖性的,并且在不同环境下是不同的。较长的序列在较高的温度下特异性杂交。在 Tijssen, Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Probes, " Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays" (1993) 中可发现核酸杂交的详尽指南。通常而言,在规定的离子强度下将严谨条件选择成比特定序列的热熔解温度(T_m)低约 $5^\circ\text{C} \sim 10^\circ\text{C}$ 。 T_m 是(在规定的离子强度、pH 和核酸浓度下)在该温度下平衡时 50% 的与靶标互补的探针与靶序列杂交时的温度(因为靶序列过量存在,在 T_m 下,平衡时 50% 的探针被占据)。严谨条件是 pH 为 7.0 ~ 8.3 时盐浓度低于约 1.0M 钠离子,通常是约 0.01M ~ 1.0M 钠离子浓度(或其它盐),对于短探针(例如 10 ~ 50 个核苷酸)温度是至少约 30°C ,对于长探针(例如,大于 50 个核苷酸)温度是至少约 60°C 。还可以添加诸如甲酰胺等去稳定剂来实现严谨条件。对于高严谨杂交,阳性信号是背景的至少两倍,或背景杂交的 10 倍。示例性的高严谨性或严谨杂交条件包括:50% 甲酰胺, $5\times\text{SSC}$ 和 1% SDS, 在 42°C 温育或 $5\times\text{SSC}$ 和 1% SDS 在 65°C 下温育,在 $0.2\times\text{SSC}$ 和 0.1% SDS 中于 65°C 下洗涤。对于 PCR,对于低严谨扩增温度通常是约 36°C ,不过根据引物长度退火温度可以是约

32°C~约 48°C。对于高严谨 PCR 扩增,温度通常是约 62°C,不过根据引物长度和特异性高严谨退火温度可以是约 50°C~约 65°C。用于高严谨扩增和低严谨扩增的典型循环条件包括 90°C~95°C 的变性阶段 30 秒~120 秒,退火阶段持续 30 秒~120 秒,以及约 72°C 延伸阶段 1 分钟~2 分钟。

[0250] 本发明还涉及编码片段、类似物和衍生物的上文所述多核苷酸的变体。所述多核苷酸的变体可以是所述多核苷酸的天然存在的等位变体或所述多核苷酸的非天然存在的变体。

[0251] 如上文指出,所述多核苷酸可以具有编码序列,所述编码序列是所公开多肽的编码序列的天然存在的等位变体。本领域已知,等位变体是具有一个或多个核苷酸的取代、缺失或添加的多核苷酸序列的替代形式,其基本上不改变所编码多肽的功能。

[0252] 本发明还包括多核苷酸,所述多核苷酸中成熟多肽的编码序列融合在有助于多肽表达和从宿主细胞分泌的多核苷酸的同一阅读框中,所述有助于多肽表达和从宿主细胞分泌的多核苷酸例如有前导序列,其充当用于控制所述细胞的多肽的转运的分泌序列。具有前导序列的多肽是前蛋白 (preprotein),并且可以使前导序列被宿主细胞切割,从而形成所述多肽的成熟形式。所述多核苷酸还可以编码蛋白原 (proprotein),所述蛋白原是成熟蛋白加上另外的 5' 氨基酸残基。具有序列原 (prosequence) 的成熟蛋白是蛋白原,并使是蛋白的失活形式。序列原被切割时,保留活性成熟蛋白。

[0253] 因此,例如,本发明的多肽可以编码成熟蛋白,或编码具有序列原的蛋白,或编码同时具有序列原和前序列 (presequence, 前导序列) 的蛋白。

[0254] 本发明的多核苷酸还可以具有与标记物序列框内融合的编码序列,所述标记物序列允许对本发明的多肽进行纯化。例如,所述标记物序列可以是 pQE-9 载体提供的六聚组氨酸标签,从而在细菌宿主的情况下提供对与所述标记物融合的成熟多肽的纯化。或例如,当使用诸如 COS-7 细胞等哺乳动物宿主时,所述标记物序列可以是血凝素 (HA) 标签。所述 HA 标签对应于源自流感病毒血凝素蛋白的表位 (Wilson 等,1984, Cell 37 :767)。

[0255] 本发明的另外实施方式包括分离的核酸分子,所述核酸分子包含具有与 SEQ ID NO :1、3、15、17、47、48、58、59 或 60 具有至少 90% 同一性、95% 同一性和在某些实施方式中具有至少 96%、97%、98% 或 99% 同一性的核苷酸序列的多核苷酸。在某些实施方式中,包含具有至少 90% 同一性、95% 同一性和在某些实施方式中具有至少 96%、97%、98% 或 99% 同一性的核苷酸序列的所述多核苷酸与多核苷酸 SEQ ID NO :1、3、15、17、47、48、58、59 或 60 杂交。在某些实施方式中,包含具有至少 90% 同一性、95% 同一性和在某些实施方式中具有至少 96%、97%、98% 或 99% 同一性的核苷酸序列的所述多核苷酸与多核苷酸 SEQ ID NO :58、59 或 60 杂交。在某些实施方式中,所述多核苷酸在严谨杂交条件下杂交。在某些实施方式中,所述多核苷酸与多核苷酸 SEQ ID NO :58、59 或 60 在严谨杂交条件下杂交。提到具有与参照核苷酸序列具有至少例如 95% “同一性”的核苷酸序列的多核苷酸,是指该多核苷酸的核苷酸序列与参照序列相似,不同之处在于该多核苷酸序列可以在参照核苷酸序列的每 100 个核苷酸中包括最多 5 个点突变。换言之,为了获得具有与参照核苷酸序列具有至少 95% 同一性的核苷酸序列的多核苷酸,参照序列中最多 5% 的核苷酸可以缺失或被其他核苷酸取代,或数量最多是参照序列中总核苷酸 5% 的核苷酸可以插入参照序列中。参照序列的这些突变可以出现在参照核苷酸序列的氨基或羧基末端位置,或这些末端位置

之间的任何地方,单独散布在参照序列内的核苷酸中,或位于参照序列内的一个或多个连续基团中。

[0256] 实际上,常规上使用诸如 Bestfit 程序等已知的计算机程序可以确定任何特定的核酸分子是否与参照序列具有特定的百分比序列同一性(例如,与参照序列具有至少约 80%、至少约 90%、至少约 95%或至少约 97%序列同一性,或与参照序列具有 95%、96%、97%、98%或 99%同一性)(Wisconsin Sequence Analysis Package,用于 Unix 的第 8 版本,Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711)。Bestfit 使用 Smith 和 Waterman, 1981, *Advances in Applied Mathematics* 2: 482-489 的局部同源性算法,来发现两个序列之间的同源性最佳区段。当然,当使用 Bestfit 或任何其它序列比对程序来确定特定序列是否与本发明的参照序列具有例如 95%同一性时,对参数进行设定,使得在参照核苷酸序列的全长上计算同一性百分比,并且允许同源性的空位最多是参照序列中核苷酸总数的 5%。

[0257] 多核苷酸变体可以含有编码区和/或非编码区的改变。在某些实施方式中多核苷酸变体含有产生沉默取代、添加或缺失,但不改变所编码多肽的性质或活性。在某些实施方式中,由于遗传编码的简并性通过沉默取代而产生核苷酸变体。可以出于各种原因生产多核苷酸变体,从而例如对特定宿主优化密码子表达,例如将人类 mRNA 中的密码子改变为诸如大肠杆菌等细菌宿主偏好的密码子)。

[0258] 本发明还提供包含靶向 Notch 受体的拮抗剂(例如,抗体)的药物组合物。发现这些药物组合物可用于抑制肿瘤细胞生长和治疗人类患者中的癌。

[0259] 通过将本发明的经纯化 Notch 结合剂或拮抗剂(例如,抗体)与药学上可接受的载体、赋形剂和/或稳定剂组合,制备无菌冻干粉磨、水溶液等形式的用于贮存和使用的制剂(Remington, *The Science and Practice of Pharmacy*, 第 20 版, Mack Publishing, 2000)。合适的载体、赋形剂或稳定剂包括:诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸等无毒缓冲剂;诸如氯化钠等盐;诸如抗坏血酸和蛋氨酸等抗氧化剂;防腐剂,如十八烷基二甲基苄基氯化铵、六甲氯铵、苯扎氯铵、苄索氯铵、苯酚、丁醇或苯甲醇、诸如尼泊金甲酯或尼泊金丙酯等尼泊金烷基酯、儿茶酚、间苯二酚、环己醇、3-戊醇和间甲酚;低分子量多肽(小于约 10 个氨基酸);诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白等蛋白;诸如聚乙烯吡咯烷酮等亲水性聚合物;诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸和赖氨酸等氨基酸;诸如单糖、二糖、葡萄糖、甘露糖、糊精等糖类;诸如 EDTA 等螯合剂;诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇等糖;诸如钠等成盐对离子;诸如 Zn-蛋白复合物等金属复合物;和/或诸如吐温或聚乙二醇(PEG)等非离子表面活性剂。

[0260] 可以以用于局部治疗或系统性治疗的任何方式施用本发明的药物组合物。施用可以是局部的(例如施用至黏膜,包括阴道递送和直肠递送),诸如透皮贴剂、膏剂、洗剂、霜剂、凝胶、滴剂、栓剂、喷剂、液体剂和粉末剂;(例如包括通过喷雾器在内的通过吸入或吹入粉末或气溶胶;气管内、鼻内、表皮和透皮)等肺递送;口服;包括静脉内、动脉内、皮下、腹膜内、肿瘤内或肌肉内注射或输注等胃肠外递送;或颅内(例如鞘内或心室内)施用。

[0261] 治疗制剂可以是单位剂量形式。所述制剂包括用于口服、胃肠外或直肠施用或用于通过吸入施用的片剂、丸剂、胶囊剂、粉末剂、颗粒剂、水中或非水性介质中的溶液或悬浮液、或栓剂。在诸如片剂等固体组合物中主要活性成分与药物载体混合。常规的制片成分

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

[0262] 药物制剂包括与脂质体复合的本发明的拮抗剂（例如抗体）(Epstein 等, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82 :3688 ;Hwang 等, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77 :4030, 和美国专利第 4, 485, 045 和 4, 544, 545 号)。具有延长循环时间的脂质体公开于美国专利第 5, 013, 556 号。可以利用脂质组合物通过反相蒸发生产某些脂质体，脂质组合物包含磷脂酰胆碱、胆固醇和 PEG- 衍生的磷脂酰乙醇胺 (PEG-PE)。将脂质体通过规定孔径的过滤器挤出，从而产生具有所需直径的脂质体。

[0263] 还可以将所述拮抗剂（例如，抗体）包埋在微胶囊中。例如根据 Remington' s, The Science and Practice of Pharmacy, 第 20 版, Mack Publishing (2000) 所述，在胶体药物递送系统（例如，脂质体、白蛋白微球、微乳液、纳米颗粒和纳米胶囊）中或在大乳液中分别通过凝聚技术或通过界面聚合，从而制备所述微胶囊，例如羟甲基纤维素或明胶 - 微胶囊或聚 - (甲基丙烯酸甲酯) 微胶囊。

[0264] 另外可以制备缓释制剂。缓释制剂的合适实例包括含有抗体的由固体疏水性聚合物制成的半透性基质，所述基质是成型物的形式（例如膜或微胶囊）。缓释基质的实例包括聚酯、诸如聚 (2- 羟乙基 - 甲基丙烯酸酯) 或聚 (乙烯醇) 等水凝胶、聚交酯（美国专利第 3, 773, 919 号），L- 谷氨酸和 7 乙基 -L- 谷氨酰胺的共聚物、不可降解乙烯 - 乙酸乙烯酯、诸如 Lupron Depot（由乳酸乙醇酸共聚物以及乙酸亮丙瑞林组成的可注射微球）等可降解乳酸 - 乙醇酸共聚物、蔗糖乙酸异丁酸酯和聚 -D(-)-3- 羟基丁酸。

[0265] 在特定实施方式中，所述药物组合物包含所述 Notch 结合剂或拮抗剂以及第二治疗剂。在特定实施方式中，第二治疗剂是抗癌剂和 / 或抗血管发生剂。

[0266] 本发明提供用于使用本文所述 Notch 受体拮抗剂抑制表达 Notch 受体的致瘤性细胞的生长或增殖的方法。在某些实施方式中，所述方法包括使用任何一种本文所述抗体或多肽抑制表达 Notch2 和 / 或 Notch3 受体的致瘤性细胞的生长。在某些实施方式中，所述抑制表达 Notch 受体的致瘤性细胞的生长的方法包括使所述细胞与针对 Notch 受体的拮抗剂体外接触。例如，在添加有与 Notch2 和 / 或 Notch3 特异性结合并且抑制细胞生长的抗体的培养基中培养表达 Notch 受体的永生化细胞系或癌细胞系。或从诸如组织活检样、胸腔积液或血液样品等患者样品分离肿瘤细胞和 / 或肿瘤干细胞，并将其在添加有与 Notch2 和 / 或 Notch3 特异性结合并且抑制细胞生长的抗体的培养基中培养。在某些实施方式中，所述拮抗剂是特异性识别 Notch2 和 / 或 Notch3 受体的表位的抗体。

[0267] 在某些实施方式中，所述抑制表达 Notch 受体的致瘤性细胞的生长或增殖的方法包括使所述细胞与针对 Notch 受体的拮抗剂（例如，Notch2 和 / 或 Notch3 的拮抗剂）体内接触。在特定实施方式中，在动物模型中使致瘤性细胞与针对 Notch 受体的拮抗剂接触。

例如,使表达 Notch 受体的异种移植物在免疫妥协小鼠(例如,NOD/SCID 小鼠)中生长。对所述小鼠施用针对 Notch 受体的拮抗剂以抑制肿瘤生长。作为选择,从诸如组织活检样、胸腔积液或血液样品等患者样品分离表达 Notch 受体的癌干细胞,并将其注入免疫妥协小鼠中。然后对所述小鼠施用针对 Notch 受体的拮抗剂以抑制肿瘤细胞生长。在某些实施方式中,在将致瘤性细胞导入动物的同时,或稍后不久施用 Notch 受体的拮抗剂从而预防肿瘤生长。在其它实施方式中,在致瘤性细胞已经生长至规定尺寸之后施用作为治疗剂的 Notch 受体的抗体。在某些实施方式中,所述拮抗剂是与 Notch 受体特异性结合的 Notch 受体蛋白融合物。在特定实施方式中,所述拮抗剂是特异性识别 Notch 受体的表位的抗体。在某些实施方式中,所述抗体是任何一种本文所述抗体或多肽。

[0268] 在特定实施方式中,致瘤性细胞与针对 Notch 受体的拮抗剂的接触在诊断患有癌的人类患者中发生。在某些实施方式中,所述拮抗剂是与 Notch 受体特异性结合的抗体。在其它实施方式中,所述拮抗剂是特异性识别 Notch 受体的表位的抗体。例如,本发明提供抑制受试对象中肿瘤生长的方法,所述方法包括对所述受试对象施用治疗有效量的人类 Notch2 和 / 或 Notch3 的拮抗剂。在某些实施方式中,所述拮抗剂是与 Notch2 结合的抗体。在某些实施方式中,所述拮抗剂是与 Notch3 结合的抗体。在某些实施方式中,所述拮抗剂是与 Notch2 和 Notch3 结合的抗体。在某些实施方式中,所述拮抗剂是在上述方面或实施方式、以及本文所述任何其它方面或实施方式中任一所述的抗体或多肽。在特定实施方式中,所述肿瘤包含磷酸酶和张力蛋白同源物 (PTEN) 基因中的失活缺失或突变。

[0269] 本发明还提供抑制细胞中 Notch 信号传导(例如,Notch2 和 / 或 Notch3)的方法,所述方法包括使所述细胞与有效量的 Notch 拮抗剂接触。这些方法可以是体内方法或体外方法。在某些实施方式中,所述 Notch 拮抗剂是抗体。在某些实施方式中,所述方法包括抑制细胞中 Notch2 信号传导,包括使所述细胞与有效量的上述方面或实施方式、以及本文所述任何其它方面或实施方式中的任何一种抗体或多肽接触。在某些实施方式中,所述 Notch 拮抗剂是抗体。在某些实施方式中,所述方法包括抑制细胞中 Notch3 信号传导,包括使所述细胞与有效量的上述方面或实施方式、以及本文所述任何其它方面或实施方式中的任何一种抗体或多肽接触。

[0270] 本发明还提供调节周细胞和 / 或血管平滑肌细胞的功能的方法,所述方法包括对受试对象施用有效量的人类 Notch3 的拮抗剂。在某些实施方式中,所述方法通过调节周细胞和 / 或血管平滑肌细胞的功能抑制血管发生。在某些实施方式中,所述拮抗剂是在上述方面或实施方式、以及本文所述任何其它方面或实施方式中任一所述的抗体或多肽。在特定实施方式中,受抑制的血管发育是异常血管发育。在特定实施方式中,受抑制的血管发育在肿瘤中。在特定实施方式中,所述方法还包括对所述受试对象施用 VEGF 的拮抗剂或 VEGF 受体的拮抗剂。

[0271] 另外,本发明提供抑制受试对象中血管发生或血管发育的方法,所述方法包括对所述受试对象施用有效量的 Notch 拮抗剂。在特定实施方式中,所述 Notch 拮抗剂是 Notch3 拮抗剂。在特定实施方式中,所述 Notch 拮抗剂是 Notch2 拮抗剂。在特定实施方式中,所述拮抗剂是 Notch2 和 / 或 Notch3 的拮抗剂。在某些实施方式中,所述拮抗剂是抗 Notch2/3 抗体。在某些实施方式中,抑制血管发生的方法包括施用上述方面或实施方式、以及本文所述任何其它方面或实施方式中任一的抗体或多肽。在特定实施方式中,所述血管发生是肿

瘤血管发生。在特定实施方式中,所述血管发育位于肿瘤位置。在某些替代性实施方式中,所述血管发生不是肿瘤血管发生。在特定实施方式中,血管发生或血管发育的抑制至少部分是由于周细胞和 / 或血管平滑肌细胞的功能的调节。在特定实施方式中,所述方法还包括对所述受试对象施用血管内皮细胞生长因子 (VEGF) 的拮抗剂或 VEGF 受体的拮抗剂。

[0272] 还提供减少肿瘤 (例如包含癌干细胞的肿瘤) 的致瘤性的方法。在特定实施方式中,所述方法包括对有需要的受试对象 (例如,具有肿瘤的受试对象) 施用治疗有效量的 Notch 拮抗剂。在特定实施方式中,所述 Notch 拮抗剂是结合 Notch2 的抗体。在特定实施方式中,所述 Notch 拮抗剂是结合 Notch3 的抗体。在特定实施方式中,所述 Notch 拮抗剂是结合 Notch2 和 Notch3 的抗体。在特定实施方式中,所述 Notch 拮抗剂是上述方面或实施方式、以及本文他处所述任何其它方面或实施方式中任一所述的抗体或多肽。在特定实施方式中,通过施用所述抗体减少所述肿瘤中癌干细胞的频率。在某些实施方式中,所述肿瘤是结直肠肿瘤、乳肿瘤、胰腺肿瘤或黑色素瘤。

[0273] 还设想可以使用本发明的试剂和拮抗剂来治疗特征在于 Notch 受体的表达和 / 或细胞对 Notch 受体的应答性增加的各种疾病。本发明提供治疗增殖性疾病如癌、与血管发生相关的疾病 (例如,血管发生依赖性疾病) 和其中 Notch 信号传导的上调或下调起作用的疾病的方法。

[0274] 在特定实施方式中使用 Notch 结合剂或拮抗剂要治疗的疾病是 Notch 相关疾病。在特定实施方式中,所述疾病的特征在于 Notch 信号传导 (例如,Notch2 和 / 或 Notch3 信号传导) 的上调或下调。在特定实施方式中,所述疾病或肿瘤是 Notch2 和 / 或 Notch3- 依赖性的。

[0275] 具体而言,设想使用针对 Notch 受体的拮抗剂 (例如,抗体) 来治疗增殖性疾病,所述疾病包括但不限于,肾、肝、膀胱、乳腺、胃、卵巢、结肠、直肠、前列腺、肺、外阴、甲状腺、头颈、脑 (成胶质细胞瘤、星形细胞瘤、成髓细胞瘤等)、血液和淋巴 (白血病和淋巴瘤) 的良性肿瘤和恶性肿瘤。在特定实施方式中,使用 Notch 结合剂或拮抗剂治疗的增殖性疾病是结直肠癌、乳腺癌、胰腺癌或黑色素瘤。在特定实施方式中,所述癌包含癌干细胞。

[0276] 在特定实施方式中,所治疗的肿瘤是实体瘤。可以使用本发明的治疗组合物 (例如,结合 Notch 的抗体) 治疗的实体瘤的实例包括,但不限于肉瘤和癌,例如纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、骨源性肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤因氏瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝癌、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎性癌、维尔姆斯瘤、宫颈癌、睾丸癌、肺癌、小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神经胶质瘤、星形细胞瘤、成神经管细胞瘤、颅咽管瘤、室鼓膜瘤、松果体瘤、成血管细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质瘤、脑膜瘤、黑色素瘤、成神经细胞瘤和成视网膜细胞瘤。本发明适用于肉瘤和上皮癌,例如卵巢癌和乳腺癌。在特定实施方式中,所述肿瘤是结直肠癌、乳腺癌、胰腺癌或黑色素瘤。在特定实施方式中,所述肿瘤是卵巢癌。在特定实施方式中,所述肿瘤是成神经管细胞瘤。在特定实施方式中,所述肿瘤包含癌干细胞。

[0277] 在特定实施方式中,用所述 Notch 结合剂或拮抗剂要治疗的疾病是与血管发生相关的疾病。在特定实施方式中,所述疾病是癌。在某些其它实施方式中,所述疾病不是癌性

疾病。例如,所述疾病可以是视网膜黄斑变性 (wet macular degeneration)、年龄相关性黄斑变性、糖尿病性视网膜病变、血管瘤、类风湿性关节炎、银屑病、新生血管性青光眼、多囊卵巢病、子宫内膜异位和炎症性肠病。

[0278] 在特定实施方式中,所述肿瘤表达 Notch 结合剂或拮抗剂靶向的一种或多种 Notch 受体。在特定实施方式中,所述肿瘤表达 Notch2 和 / 或 Notch3。在特定实施方式中,所述肿瘤过表达 Notch2 和 / 或 Notch3。在特定实施方式中,所述肿瘤取决于与施用的抗体特异性结合的一种或多种 Notch 受体。例如,在特定实施方式中,可以使用特异性结合 Notch2(或 Notch2 和 Notch3) 的抗体来抑制所述生长或靶向 Notch2 依赖性肿瘤。在特定实施方式中,可以使用特异性结合 Notch3(或 Notch2 和 Notch3) 的抗体来抑制所述生长或靶向 Notch3 依赖性肿瘤。在特定实施方式中,所述肿瘤包含癌干细胞。

[0279] 在特定实施方式中,对于编码肿瘤抑制子磷酸酶和张力蛋白同源物 (PTEN) 的基因中的失活缺失或突变,所述肿瘤是纯合性或杂合性的。在特定实施方式中,包含缺失或突变的肿瘤是乳癌。

[0280] 根据已知的方法将所述拮抗剂作为合适的药物组合物对人类患者施用。合适的施用方法包括作为推注的静脉内施用或通过连续输注一段时间,通过肌肉内、腹膜内、静脉内、肿瘤内、动脉内、脑脊髓内、皮下、关节内、滑膜内、鞘内、口服、局部或吸入途径施用。

[0281] 在特定实施方式中,除了施用 Notch 拮抗剂之外,所述方法或治疗还包括(在施用所述 Notch 拮抗剂之前、同时和 / 或之后)施用第二治疗剂。在特定实施方式中,所述第二治疗剂是抗癌剂和 / 或抗血管发生剂。还提供包含所述 Notch 拮抗剂和第二治疗剂的药物组合物。

[0282] 应意识到可以以任何顺序或同时施用 Notch 拮抗剂(例如,抗体)和第二治疗剂的组合。在所选实施方式中,对之前已经接受第二抗癌剂治疗的患者施用 Notch 拮抗剂。在某些其它实施方式中,可以基本上同时或并行施用所述 Notch 拮抗剂和第二治疗剂。例如,受试对象可以被给予 Notch 拮抗剂,同时经受使用第二治疗剂进行治疗的过程(例如化学治疗)。在特定实施方式中,在使用第二治疗剂进行治疗 1 年内施用所述 Notch 拮抗剂。在某些替代性实施方式中,在使用第二治疗剂进行任何治疗的 10 个月、8 个月、6 个月、4 个月或 2 个月之内施用所述 Notch 拮抗剂。在某些其它实施方式中,在使用第二治疗剂进行任何治疗的 4 周、3 周、2 周或 1 周之内施用所述 Notch 拮抗剂。在某些实施方式中,在使用第二治疗剂进行任何治疗的 5 天、4 天、3 天、2 天或 1 天之内施用所述 Notch 拮抗剂。还应意识到可以在大约几小时或几分钟之内(即,基本上同时)对所述受试对象施用两种试剂或治疗。

[0283] 可用类别的抗癌剂包括,例如抗微管蛋白剂、敖瑞斯汀 (auristatins)、DNA 小沟结合剂、DNA 复制抑制剂、烷基化剂(铂复合物如,诸如顺铂、单(铂)、双(铂)和三核铂复合物以及卡铂)、蒽环霉素 (anthracycline)、抗生素、抗叶酸盐、抗代谢药、化学治疗敏感剂、倍癌霉素 (duocarmycins)、足叶乙甙、氟化嘧啶、离子载体、莱希特平 (lexitropsins)、亚硝基脲、顺铂 (platinols)、执行化合物 (performing compounds)、嘌呤抗代谢物、嘌呤霉素、放射敏感剂、类固醇、紫杉烷、拓扑异构酶抑制剂或长春花生物碱等。在特定实施方式中,所述第二抗癌剂是抗代谢药、拓扑异构酶抑制剂或血管发生抑制剂。

[0284] 可以与 Notch 拮抗剂组合施用的抗癌剂包括化学治疗剂。因此,在某些实施方式

中,所述治疗包括组合施用本发明的拮抗剂和化学治疗剂或多种不同的化学治疗剂的混合物。可以在施用化学治疗剂之前、与其同时或在其之后进行使用拮抗剂的治疗。本发明涉及的化学治疗剂包括本领域已知并且为商购可得的化学物质或药物,例如多柔比星、5-氟尿嘧啶、胞嘧啶阿拉伯糖苷("Ara-C")、环磷酰胺、噻替派、白消安、胞毒素(cytoxin)、紫杉醇、氨甲蝶呤、顺铂、美法仑、长春碱和卡铂。组合施用可以包括以单一药物制剂或使用分开制剂的共施用,或以任何顺序但通常在一段时间内的连续施用,从而使得所有活性剂可以同时发挥其生物活性。可以根据制造商说明书或根据经验确定,来使用用于所述化学治疗剂的制剂和给药方案。用于所述化学治疗的制剂和给药方案还描述于 Chemotherapy Service Ed., M. C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, Md. (1992)。

[0285] 用于本发明的化学治疗剂还包括,但不限于,诸如噻替派和环磷酰胺(CYTOXAN)等烷基化剂;诸如白消安、英丙舒凡和哌泊舒凡等烷基磺酸酯;诸如苯佐替派(benzodopa)、卡波醌、美妥替哌(meturedopa)和乌瑞替派(uredopa)等氮丙啶;包括六甲蜜胺、三亚乙基蜜胺、三亚乙基磷酰胺(trietylenephosphoramidate)、三亚乙基硫代磷酰胺(triethylenethiophosphoramidate)和三羟甲蜜胺(trimethylolomelamime)氮芥在内的乙烯亚胺和甲基蜜胺(methylamelamines),所述三羟甲蜜胺(trimethylolomelamime)氮芥例如苯丁酸氮芥、萘氮芥、氯代环磷酰胺、雌氮芥、异环磷酰胺、氮芥、盐酸甲氧氮芥、美法仑、新氮芥、胆甾醇对苯乙酸氮芥、泼尼氮芥、曲磷胺、尿嘧啶氮芥;诸如卡莫司汀、氯脲霉素(chlorozotocin)、福莫司汀、洛莫司汀、尼莫司汀、雷莫司汀等亚硝基脲;诸如阿克拉霉素、放线菌素、安曲霉素(authramycin)、重氮丝氨酸、博来霉素、放线菌素C、加利车霉素、卡柔比星(carubicin)、洋红霉素(caminomycin)、嗜癌素、色霉素、更生霉素、道诺红菌素、地托比星(detorubicin)、6-重氮-5-氧-L-正亮氨酸、多柔比星、表柔比星、依索比星、伊达比星、麻西罗霉素、丝裂霉素、霉酚酸、诺加霉素、橄榄霉素、培洛霉素、紫菜霉素、嘌呤霉素、三铁阿霉素、罗多比星、链黑菌素、链佐星、杀结核菌素、乌苯美司、净司他丁、佐柔比星等抗生素;诸如氨甲蝶呤和5-氟尿嘧啶(5-FU)等抗代谢药;诸如二甲叶酸、氨甲蝶呤、蝶罗呤、三甲曲沙等叶酸类似物;诸如氟达拉滨、6-巯基嘌呤、硫咪嘌呤、硫鸟嘌呤等嘌呤类似物;诸如安西他滨、阿扎胞苷、6-阿扎尿苷、卡莫氟、阿糖胞苷、二脱氧尿苷、去氧氟尿苷、依诺他滨、氟尿苷、5-FU等嘧啶类似物;诸如卡鲁睾酮、丙酸甲雄烷酮、环硫雄醇、美雄烷、睾内酯等雄激素;诸如氨鲁米特、米托坦、曲洛司坦等抗肾上腺药;诸如亚叶酸(frolic acid)等叶酸补充剂;醋葡醛内酯;醛磷酰胺糖苷;氨基乙酰丙酸;安吡啶;百托布(bestrabucil);比山群;依达曲沙、得福安(defofamine);脱羧秋水仙碱;地吡醌;艾福敏(elformithine);依利醋铵(elliptiniumacetate);依托格鲁;硝酸镓;羟基脲;香菇多糖;氯尼达明;米托胍脲;米托蒽醌;莫派达醇;二胺硝吡啶;喷司他丁;蛋氨酸;吡柔比星;鬼臼酸;2-乙基酰肼;丙卡巴肼;PSK.;雷佐生;西索菲兰(sizofuran);锗螺胺;细交链孢菌酮酸;三亚胺醌;2,2',2''-三氯三乙胺;乌拉坦;长春地辛;达卡巴嗪;甘露氮芥;二溴甘露醇;二溴卫矛醇;哌泊溴烷;加胞嘧啶(gacytosine);阿拉伯糖苷("Ara-C")、环磷酰胺、噻替派;诸如紫杉醇(TAXOL)和多西他赛(Taxotere)等紫杉烷;苯丁酸氮芥;吉西他滨;6-巯鸟嘌呤;巯基嘌呤;氨甲蝶呤;诸如顺铂和卡铂等铂类似物;长春碱;铂;足叶乙甙(VP-16);异环磷酰胺;丝裂霉素C;米托蒽醌;长春新碱;长春瑞滨;异长春花碱;诺消灵(novantrone);替尼泊苷;道诺霉素;氨蝶呤;希罗达;伊班膦酸盐;CPT 11;拓扑异构酶

抑制剂 RFS 2000 ;二氟甲基鸟氨酸 (DMFO) ;视黄酸 ;埃斯波霉素 ;卡培他滨 ;和上述任何一种的药学上可接受的盐、酸或衍生物。化学治疗剂还包括用于调节或抑制激素,如抗雌激素剂,对肿瘤的作用的抗激素剂,包括例如,三苯氧胺、雷洛昔芬 (raloxifene)、芳香化酶抑制性 4(5)-咪唑、4-羟基三苯氧胺、曲沃昔芬、雷洛昔芬盐酸盐 (keoxifene)、LY 117018、奥那司酮和托瑞米芬 (Fareston) ;以及抗雄激素剂,如氟他米特、尼鲁米特、比卡鲁胺、亮丙瑞林和戈舍瑞林 ;和上述任何一种的药学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0286] 在特定实施方式中,所述化学治疗剂是拓扑异构酶抑制剂。拓扑异构酶抑制剂是干扰拓扑异构酶 (例如拓扑异构酶 I 或 II) 作用的化学治疗剂。拓扑异构酶抑制剂包括,但不限于,盐酸多柔比星,道诺红菌素柠檬酸盐、盐酸米托蒽醌、放线菌素 D、足叶乙甙、盐酸托泊替康、替尼泊昔 (VM-26) 和伊立替康。在特定实施方式中,所述第二抗癌剂是伊立替康。在特定实施方式中,要治疗的肿瘤是结直肠癌,并且所述第二抗癌剂是诸如伊立替康等拓扑异构酶抑制剂。

[0287] 在特定实施方式中,所述化学治疗剂是抗代谢药。抗代谢药是具有以下结构的化学药品,所述结构与正常生化反应所需的代谢物类似,但是不同之处足够干扰细胞的一种或多种正常功能,例如细胞分裂。抗代谢药包括,但不限于,吉西他滨、氟尿嘧啶、卡培他滨、氨甲蝶呤钠、雷替曲塞 (ralitrexed)、培美曲塞、喃氟啶、胞嘧啶阿拉伯糖苷、硫鸟嘌呤、5-氮胞苷、6-巯基嘌呤、咪唑硫嘌呤、6-巯鸟嘌呤、喷司他丁、氟达拉滨磷酸盐和克拉屈滨,以及这些中任何一种的药学上可接受的盐、酸或衍生物。在特定实施方式中,所述第二抗癌剂是吉西他滨。在特定实施方式中,要治疗的肿瘤是胰腺瘤,并且所述第二抗癌剂是抗代谢药 (例如,吉西他滨)。

[0288] 在其它实施方式中,所述治疗包括将本发明的拮抗剂与放射治疗组合施用。可以在施用放射治疗之前、与其同时或在其之后使用抗体进行治疗。可以使用用于所述放射治疗的任何给药方案。

[0289] 在其它实施方式中,所述治疗包括组合施用本发明的抗体以及针对与另外肿瘤相关的抗原的其它抗体,所述抗体包括,但不限于,与 EGF 受体 (EGFR) (Erbbitux®)、erbB2 受体 (HER2) (Herceptin®) 和血管内皮生长因子 (VEGF) (Avastin®) 结合的抗体。

[0290] 在某些替代性实施方式中,所述第二抗癌剂包含与人类 DLL4 或 Notch 受体的其它配体特异性结合的抗体或与另外的人类 Notch 受体特异性结合的抗体。举例而言,抗 DLL4 抗体例如描述于美国专利申请公开第 US 2008/0187532 号,本文通过参考并入其全文。另外的抗 DLL4 抗体描述于例如国际专利公开 W02008/091222 和 W02008/0793326, 和美国专利申请公开 US 2008/0014196、US 2008/0175847 ;US2008/0181899 ;和 US 2008/0107648, 本文通过参考并入每一篇的全文。示例性的抗 Notch 抗体例如描述于美国专利申请公开 US 2008/0131434, 本文通过参考并入其全文。在特定实施方式中,所述第二抗癌剂是 Notch 信号传导的抑制剂。在特定实施方式中,所述第二抗癌剂是作为血管发生抑制剂的抗体 (例如,抗 VEGF 抗体)。在特定实施方式中,所述第二治疗剂是特异性结合 VEGF 受体的抗体。在特定实施方式中,所述第二治疗剂是 AVASTIN(贝伐单抗)、HERCEPTIN(曲妥珠单抗)、VECTIBIX(帕尼单抗) 或 ERBITUX(西妥昔单抗)。组合施用可以包括在单一药物制剂中或使用分开制剂的共施用,或以任何顺序但通常在一段时间内的连续施用,从而使得所有活性剂可以同时发挥其生物活性。

[0291] 另外,治疗可以包括施用一种或多种细胞因子(例如,淋巴因子、白介素、肿瘤坏死因子和/或生长因子),或可以伴随有外科手术除去癌细胞或治疗医师确信必须的任何其它治疗。

[0292] 对于所述疾病的治疗,本发明的拮抗剂的合适剂量取决于待治疗疾病的类型,疾病的严重性和进展,疾病的应答性,是否为了治疗或预防目的施用所述抗体、之前的治疗、患者临床史等,所有这些都由治疗医师判断。所述拮抗剂可以施用一次,或在持续几天到几个月的一系列治疗中施用,或直到治愈,或直到达到疾病状态消退(例如肿瘤尺寸减少)。最佳给药方案可以由对患者体内的累积药物的测定来计算,并且可以根据各拮抗剂的相对效力而变化。施用医师可以容易地确定最佳剂量、给药方法和重复速率。通常,剂量为 $0.01 \mu\text{g} \sim 100\text{mg}/\text{千克体重}$,并且可以每天、每周、每月或每年给予1次或多次。治疗医师可以基于体液或组织中药物测定的停留时间和浓度估算给药的重复速率。

[0293] 在特定实施方式中,在用所述 Notch 拮抗剂进行治疗之前,对考虑进行 Notch 拮抗剂治疗的患者进行筛选。在特定实施方式中,对患者中的肿瘤或已经从患者取出的肿瘤测试癌干细胞的存在。在特定实施方式中,对所述肿瘤测试与所述拮抗剂结合的一种或多种 Notch 受体(例如,Notch2 和/或 Notch3)的表达。在特定实施方式中,对所述肿瘤测试编码肿瘤抑制子磷酸酶和张力蛋白同源物(PTEN)的基因中的失活缺失或突变的存在。在特定实施方式中,所测试的肿瘤是乳癌。

[0294] 例如,本发明提供了选择受试对象用于使用 Notch2 和/或 Notch3 拮抗剂进行治疗的方法,其中所述受试对象具有肿瘤或已移除肿瘤。在特定实施方式中,所述方法包括(a)确定所述肿瘤是否包含 PTEN 基因中的缺失或突变;和(b)如果所述肿瘤包含所述缺失或突变,则选择所述受试对象以用于使用 Notch3 拮抗剂进行治疗。

[0295] 在本发明的某些替代性实施方式中,经由遗传测试对经筛查存在结肠腺瘤或息肉的患者测试等位基因损失和体细胞突变。在某些实施方式中,所述遗传测试筛选 Wnt 途径中的损失或突变,包括,例如在 APC、Axin2 或 β -连环蛋白中的损失或突变。

[0296] 在另一方面,本发明提供可用于执行本文所述方法的试剂盒。在某些实施方式中,试剂盒在一个或多个容器中包括对 Notch 受体具有特异性的抗体、经纯化抗体。在某些实施方式中,试剂盒还包括基本上分离的 Notch 受体,不与所述 Notch 受体反应的对照抗体和/或用于检测抗体与 Notch 受体结合的工具(means)(例如,与针对 Notch 受体的抗体或与识别针对 Notch 受体的抗体的第二抗体缀合的荧光生色团、酶底物、放射活性化合物或发光化合物),所述基本上分离的 Notch 受体包含与试剂盒里包括的所述抗体具有特异性免疫反应性的表位。在其它实施方式中,试剂盒包含对于一种或多种 Notch 受体的 mRNA 或 cDNA(例如,寡核苷酸探针或引物)检测具有特异性的试剂。在某些实施方式中,所述试剂盒含有所有对执行检测测试而言必须和/或充分的组分,包括所有对照、执行测试的指导和用于分析和呈现结果的任何必需的软件。

[0297] 区室试剂盒(compartment kit)包括其中试剂容纳在分开的容器中的任何试剂盒。所述容器包括小型玻璃容器、塑料容器或塑料条或纸条。所述容器允许有效地将试剂从一个区室转移到另一区室,从而使得所述样品和试剂不交叉污染,并且可以以定量方式将各容器的试剂或溶液从一个区室添加到另一区室。所述容器可包括接收测试样品的容器、含有本方法中所用抗体或探针的容器、含有洗涤试剂(例如磷酸盐缓冲的盐水、Tris- 缓

冲液等)的容器和含有用于检测结合的抗体或探针的试剂的容器。可容易地意识到的是,可以容易地将本发明公开的多核苷酸、多肽和抗体并入本领域公知的已建立的试剂盒形式中。

[0298] 在某些实施方式中,本发明还提供包括 Notch 结合剂或拮抗剂和第二治疗剂的试剂盒。在特定实施方式中,所述 Notch 结合剂或拮抗剂是与 Notch2 和 / 或 Notch3 特异性结合的抗体。在特定实施方式中,所述 Notch 结合剂或拮抗剂是与 Notch2 和 Notch3 特异性结合的抗体。在特定实施方式中,所述第二治疗剂是抗癌剂和 / 或抗血管发生剂。

[0299] 在一方面,本发明提供鉴定与人类 Notch 受体的胞外域的非配体结合区结合并且抑制肿瘤生长的分子的方法,所述方法包括:i)使所述分子与人类 Notch 受体的胞外域的非配体结合域一起温育;ii)确定所述分子是否与人类 Notch 受体的胞外域的非配体结合区结合;和iii)确定所述分子是否抑制肿瘤生长。特异性结合人类 Notch 受体的胞外域的非配体结合区的分子包括,但不限于,小有机分子、多肽和抗体。

[0300] 可以使用本领域已知的任何合适的方法进行筛选。在特定实施方式中,筛选在体外进行。在某些实施方式中,使表达人类 Notch 受体的胞外域的非配体结合区的细胞与经标记的分子一起温育,并且通过 FACS 分析确定经标记的分子与人类 Notch 受体的胞外域的非配体结合区的特异性结合。在某些实施方式中,通过噬菌体展示表达人类 Notch 受体的胞外域的非配体结合区,并且鉴定与人类 Notch 受体的胞外域的非配体结合区特异性结合的分子。用于鉴定与人类 Notch 受体的非配体结合区特异性结合的分子的其它适合的方法包括,但不限于,ELISA、蛋白质(或免疫)印迹和酵母双杂交。

[0301] 然后测试与人类 Notch 受体的胞外域的非配体结合区特异性结合的分子对肿瘤细胞生长的抑制。可以使用本领域已知的任何合适的方法进行测试。在特定实施方式中,对与人类 Notch 受体的胞外域的非配体结合区特异性结合的分子测试体外抑制肿瘤生长的能力。在某些实施方式中,使与人类 Notch 受体的胞外域的非配体结合区特异性结合的分子与培养物中的肿瘤细胞一起温育,在与人类 Notch 受体的胞外域的非配体结合区特异性结合的分子的存在下确定肿瘤细胞的增殖,并且将其与非结合对照分子一起温育的肿瘤细胞进行比较。在特定实施方式中,对与人类 Notch 受体的胞外域的非配体结合区特异性结合的分子测试体内抑制肿瘤生长的能力。在特定实施方式中,将与人类 Notch 受体的胞外域的非配体结合区特异性结合的分子注入动物异种移植物模型,确定在用与人类 Notch 受体的胞外域的非配体结合区特异性结合的分子治疗的动物中肿瘤的生长,并且将其与用非结合对照分子治疗的动物进行比较。

实施例

[0302] 应该理解本文所述实施例和实施方式仅是用于举例目的,根据这些实施例和实施方式本领域技术人员会提出各种改变或变化,并且这些改变或变化包括在本申请的精神和范围内。

[0303] 实施例 1

[0304] 针对 Notch2 的人类抗体的制备

[0305] 使用噬菌体展示技术分离特异性识别 Notch2 受体的胞外域的非配体结合部分的人类抗体。对含有人类抗体可变域的合成抗体文库进行 Notch2 受体的特异性和高亲和性

识别的筛选。

[0306] 简言之,在第1轮使 2×10^{13} 个 Fab 展示噬菌体颗粒与被动固定的重组 Notch2Fc 融合蛋白 (SEQ ID NO :21) 温育,所述 Notch2Fc 融合蛋白包含 Notch2 的胞外配体结合位点和周围的 EGF 重复 (EGF 1-12)。洗掉非特异性噬菌体,然后用 DTT 洗脱特异性噬菌体。使用洗脱产物来感染 TG1 F+ 细菌,用辅助噬菌体进行援助 (rescue),然后用 IPTG (0.25mM) 诱导 Fab 展示。将该过程重复另外两轮,然后在针对被动固定的重组 Notch2 (EGF1-12) Fc 融合物 (5 μ g/ml) 的 ELISA 中筛选第3轮。

[0307] 鉴定出特定的 Fab (59R1),所述 Fab 结合人类 Notch2 受体并阻断 Jagged 1 与人类 Notch2 的结合。使用过表达人类 Notch2 (hN2) 的稳定的人细胞系 HEK-293 通过 FACS 测试验证 59R1 Fab 与人类 Notch2 的结合 (图 1A)。通过藻红蛋白 (PE)-缀合的山羊抗-人 Fab (Jackson Immunochemicals) 检测 Fab 结合。59R1 Fab (图 1A 中称为克隆 1) 显示与 hN2 的良好结合。在使用相同的稳定细胞系的结合检测中,59R1 Fab 还显示针对 Notch 配体人 Jagged1 的良好阻断活性 (图 1B)。通过使与人类 Fc 恒定区融合的 hJagged1 胞外域 (ECD) 与细胞和选自噬菌体文库的 Fab 一起温育并使用用于检测的 PE-缀合的山羊抗人 Fc γ 特异性抗体 (Jackson Immunochemicals),从而确定配体结合和阻断。

[0308] 59R1 Fab 的 VH 和 VL 的序列分别提供于 SEQ ID NO :11 和 SEQ ID NO :12 (包括当分泌时切割去的 N-末端细菌信号序列) 中。59R1 Fab 的 CDR 如以下表 2 所示。

[0309] 表 2. 59R1 人类 Fab 和 IgG 抗体的 CDR

前导	重链			轻链		
	CDR1	CDR2	CDR3	CDR1	CDR2	CDR3
59R1	SSSGMS (SEQ ID NO:5)	VIASSGSNTYYADSVK (SEQ ID NO:6)	GIFFAI (SEQ ID NO:7)	RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:8)	GASSRAT (SEQ ID NO:9)	QQYSNFPPI (SEQ ID NO:10)

[0311] 基于 59R1 Fab 的 CDR 的可变区克隆到 Ig 表达载体中,所述 Ig 表达载体含有用于在中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞中表达的人类 IgG2 重链和 κ 轻链以及它们各自的哺乳动物信号序列。提供分别作为 SEQ ID NO :13 和 SEQ ID NO :14 的 59R1 IgG 抗体的 VH 和 VL。提供分别作为 SEQ ID NO :16 和 SEQ ID NO :18 的 59R1 IgG 抗体的重链和轻链的氨基酸序列 (包括信号序列)。位于各链的氨基酸序列的 N 末端处的信号序列当分泌时被切割下。提供分别作为 SEQ ID NO :1 和 SEQ ID NO :3 的编码 59R1 IgG 抗体的重链和轻链的核酸序列。利用蛋白 A 纯化来纯化所述抗体。含有编码所述 59R1 IgG 抗体 DNA 的重链和轻链的合成 DNA 插入物的细菌质粒 DNA 作为“59R1”于 2008 年 10 月 15 日根据布达佩斯条约的规定保藏在 ATCC, 10801 University Boulevard, Manassas, VA, USA, 并赋予保藏号 PTA-9547。

[0312] 另外,通过 FACS 分析对所述 59R1 IgG2 抗体的阻断 DLL4 与人类 Notch 2 受体结合的能力进行检测。使稳定过表达人类 Notch2 的 HEK-293 细胞与各种浓度的抗体一起温育,然后通过 PE-缀合的山羊抗人 Fc γ 特异性抗体检测 hNotch2 结合 (图 1C),或检测配体阻断活性 (图 1D)。通过使所述细胞与标记有兔 Fc 恒定区的人类 DLL4 ECD 以及一个浓度范围内的 59R1 抗体温育,然后通过 PE-缀合的驴抗兔抗体检测所述 hDLL4,从而确定配体阻断。对于 59R1 IgG2 抗体如此确定 hNotch2 的结合和配体阻断活性。

[0313] 还表达和纯化了 59R1 的种系变体 (称为“59RGV”)。提供分别作为 SEQ ID NO :19 和 SEQ ID NO :20 的 59RGV 抗体的 VH 和 VL。提供分别作为 SEQ ID NO :2 和 SEQ ID NO :4 的

59RGV 抗体的重链和轻链的氨基酸序列（包括信号序列）。位于各链的氨基酸序列的 N 末端处的信号序列当分泌时被切割下。提供分别作为 SEQ ID NO :15 和 SEQ ID NO :17 的编码 59RGV 抗体的重链和轻链的核酸序列。

[0314] 在某些情况下，高度疏水性 CDR 有可能允许抗体进行不利的非特异性结合。由于 59R1 的重链 CDR3 的氨基酸序列不寻常程度的疏水特性，因此制备了含有疏水特性降低的重链 CDR3 序列的 59R1 的变体。如图 1E 所示，通过允许从亲本序列 (GIFFAI ;SEQ ID NO :7) 进行有限性变化，从而进行重链 CDR3 亲和性熟化。使位于各位置处的容许氨基酸从亲本残基改变成图 1E 中所示的残基。如图 1F 所示（用箭头表示），通过对变体的改善的 JAG1 阻断能力进行筛选来分离得到改善的变体。简言之，使 Fab (1 μ g/ml 和 10 μ g/ml) 与 hJAG1-rb Fc (使 5 μ g/ml 与 2 μ l/ml PE- 缀合的驴抗 - 兔抗体预成簇 (preclustered)) 混合，然后将其添加至 hNotch2 稳定转染的 293 细胞。然后使用流式细胞法评估 hJAG1 结合。分离出 6 个改善的变体（相对于 59R1 Fab），它们的 HCCDR3 序列如下：SIFYPT (SEQ ID NO :22)、SSFFAS (SEQ ID NO :23)、SSFYAS (SEQ ID NO :24)、SSFFAT (SEQ ID NO :25)、SIFYPS (SEQ ID NO :26) 和 SSFFAN (SEQ ID NO :27)。这些变体的重链可变区的序列是序列 SEQ ID NO :52、SEQ ID NO :53、SEQ ID NO :54、SEQ ID NO :55、SEQ ID NO :56 和 SEQ ID NO :57。

[0315] 实施例 2

[0316] 抗 Notch2/359R1 抗体的交叉反应性和结合亲和性。

[0317] 使用人类 Notch1、Notch2、Notch3 或 Notch4 表达质粒和作为转染对照的绿色荧光蛋白 (GFP) 瞬时转染的 HEK-293 细胞，通过 FACS 检测确定 59R1 IgG2 抗体与其它 Notch 受体的交叉反应能力。GFP 阳性细胞表明转基因的表达。向所述细胞添加 2 μ g/ml 的 59R1 IgG2，并且通过 PE- 缀合的山羊抗 - 人 Fc γ 特异性 (Jackson Immunochemicals) 对其进行检测。所有 Notch 构建体都是全长的。结果示于图 2。如图 2 所示，59R1 IgG2 抗体与人类 Notch3 和人类 Notch2 都特异性结合，但不与全长人类 Notch1 或人类 Notch4 显著结合。

[0318] 使用 Biacore 2000 仪器确定人类和小鼠 Notch1、Notch2、Notch3 和 Notch4 的亲和性。简言之，使用标准的基于胺的化学 (NHS/EDC) 将重组人类和小鼠 Notch 蛋白 (Notch1, 2, & 4 的 EGF 10-15 ;Notch3 的 EGF9-14) 固定在 CM5 芯片上。对于 hNotch2，还测试 EGF1-12 的结合。将不同浓度的抗体 (1nM ~ 100nM) 注射在蛋白表面上，并且收集动力学随时间的数据。使用同步全拟合方程 (simultaneous global fit equation) 对数据进行拟合，从而生成各 Notch 的解离常数 (K_D , nM) (表 3)。

[0319] 表 3

[0320]

59R1 IgG 解离常数(K_D)								
Ab	mNotch1	hNotch1	mNotch2	hNotch2	hNotch2	mNotch3	hNotch3	hNotch4
	(nM)	(nM)	(nM)	(nM)*	(nM)**	(nM)	(nM)	(nM)
59R1	>10	86.4	0.35	<0.1	<0.1	0.13	0.12	NB

[0321] *N2 (EGF1-12)

[0322] **N2 (EGF10-155)

[0323] 实施例 3

[0324] 抗 Notch2/3 抗体 59R1 的表位作图

[0325] 为了鉴定可识别 Notch 受体胞外域的特异性非配体结合区的抗体,进行表位作图。

[0326] 通过 ELISA 测试抗 Notch2/3 抗体与来自 HEK 293 细胞的上清的结合,所述 HEK293 细胞转染有编码重组人类 Notch2 Fc 融合蛋白的序列,所述序列包括全长人类 Notch2 蛋白或各种含有 EGF 重复 1 ~ 12 的各种缺失的人类 Notch2 缺失构建体。参见以下表 4。用带有编码与人类 IgG 的恒定区 (hFc) 融合的所示氨基酸的 hNotch2 cDNA 的 pcDNA 3.1 (Invitrogen) 瞬时转染 HEK-293 细胞。48 小时后收获上清液。为了捕获 hN2-hfc 蛋白,首先在 4° 下用在碳酸氢钠缓冲液中的 100ng/ 孔的山羊抗 - 人 Fc γ 特异性 IgG (Jackson Immunochemicals, #109-006-098) 包被 96 孔板过夜。对板进行洗涤和在 5% 牛血清 / PBS-Tween-20 中进行封闭。向板添加上清液并在室温下温育 1 小时。在 PBS-T 中洗涤板。添加 5% 血清 / PBS-T 中的 10 μ g/ml 的 59R1 Fab,并在室温下温育 1 小时。在 PBS-T 中洗涤板。通过以 1 : 5000 稀释于 5% 血清 / PBS-T 中的与辣根过氧化物酶 (Thermo, #31414) 缀合的山羊抗 - 人 Fab 特异性抗体在室温下 1 小时检测 Fab 结合。对板进行洗涤和用 1Step Ultra TMB (Thermo, #34028) 显色。在 Perkin Elmer Victor 1420 读板仪上对板进行读数。抗 Notch2/3 59R1 抗体仅与来自表达包含 EGF10 的重组 Notch2 蛋白的细胞的上清液结合 (图 3A),所述 EGF10 由人类 Notch 2 的氨基酸 375 至 417 组成。

[0327] 表 4. 人类 Notch2 缺失构建体

[0328]

构建体	氨基酸
hN2 1-3	1-144
hN2 1-4	1-181
hN2 1-5	1-221
hN2 1-6	1-263
hN2 1-7	1-301
hN2 1-8	1-341
hN2 1-9	1-378
hN2 1-10	1-417
hN2 1-11	1-456
hN2 1-12	1-493
hN2 8-12	296-493
hN2 9-12	326-493

hN2 10-12	375-493
hN2 11-12	413-493
hN2 12-12	454-493

[0329] 另外, FACS 分析显示, 当 EGF 11 或 EGF 12 从由 HEK 293 细胞表达的全长 Notch2 重组蛋白中缺失时, 59R1Fab 抗体结合得以保留 (图 3B)。在 Notch2 融合蛋白的 EGF10 内进行点突变, 并且通过 FACS 分析确定 59R1 与各 EGF10 突变体的结合。用所示 Notch 表达质粒和作为转染对照的 GFP 瞬时转染 HEK-293 细胞。GFP 阳性细胞表明转基因的表达。向所述细胞添加 10 μ g/ml 的所述 59R1 Fab 抗体, 并且通过 PE- 缀合的山羊抗 - 人 (Jackson Immunochemicals) 对其进行检测。

[0330] 为了验证 EGF 重复 10 的丧失不干扰配体结合, 产生了失去氨基酸 375-412 的突变体 hNotch2 并且测试其与 59R1、针对 EGF 1-4 的 hNotch2 单克隆 59M70 的结合, 以及与配体人类 DLL4 的结合 (图 3C)。对用所示 Notch 表达质粒和作为转染对照的 GFP 瞬时转染的 HEK-293 细胞进行 FACS 分析。GFP 阳性细胞表明转基因的表达。添加 20 μ g/ml 的抗 Notch2 (59M70), 并且通过 PE- 缀合的山羊抗 - 鼠 (Caltag, #3004-4) 对其进行检测。向所述细胞添加 2 μ g/ml 的 59R1 (IgG2), 并且通过 PE- 缀合的山羊抗 - 人 Fc γ 特异性 (Jackson Immunochemicals) 对其进行检测。通过使所述细胞与 5 μ g/ml 的与兔 IgG 恒定区融合的人类 DLL4 胞外域 (ECD) 一起温育确定配体结合, 并且通过 PE- 缀合的驴抗 - 兔抗体进行检测。如图 3C 所示, 在不存在 EGF 10 时, 配体和 59M70 都与 hNotch2 结合, 但 59R1 不结合。

[0331] 进行人类 Notch1、Notch2 和 Notch4 的 EGF 10 区域与人类 Notch3 的 EGF 9 区域 (其它 Notch 受体中的 EGF 10 的等效物) 的比较分析从而确定 59R1 的可能结合位点 (图 14A)。作为分析的结果, 在全长 Notch2 内生成几个点突变, 将 EGF10 内的残基转换成人类 Notch1 中的相应氨基酸。另外, 相反地, 在 hNotch1EGF 10 中进行点突变, 将残基转换成相应的 hN2 残基。通过 QuikChange® 突变法 (Stratagene) 产生全长 Notch 序列的突变体, 并通过测序进行验证。通过 FACS 分析确定与突变体的结合 (图 14B 和 14C)。通过 PE- 缀合的山羊抗 - 人 Fc γ 特异性抗体 (Jackson Immunochemicals, #109-116-170) 对 59R1 进行检测。因此确定对于 59R1 与 hNotch 2 结合所需的氨基酸是组氨酸 385、丙氨酸 388 和亮氨酸 389 (位于图 14A 中所示的加框 hNotch2 序列中的残基)。hNotch3 中相应的残基是组氨酸 361、丙氨酸 364 和异亮氨酸 365。

[0332] 实施例 4

[0333] 抗 Notch2/3 抗体 59R1 抑制 Notch2 信号传导。

[0334] 使用荧光素酶报告子检测来测试 59R1 抗体阻断 hDLL4-, hJAG1- 和 hJAG2- 诱导的 Notch2 信号传导的能力。

[0335] 用具有合成 8X CBS 启动子的萤火虫荧光素酶 (Ong 等, 2006, J. of Biological Chemistry, 281 :5106-5119)、pSPORT6 MAML-1 和作为转染对照的 Renilla 荧光素酶 -CMV 瞬时转染稳定过表达人类 Notch2 的 HeLa 细胞。使细胞与 100ng 用所示抗体固定的 hDLL4 (R&D 系统) 一起温育 16 小时, 然后使用 Dual-Glo (Promega) 根据制造商说明进

行检测。对照抗体的浓度为 $40 \mu\text{g/ml}$ 。滴定 59R1 IgG2 抗体, 在 $40 \mu\text{g/ml}$ 开始, 然后稀释四分之一。使用 $1 \mu\text{M}$ 的 γ 分泌酶抑制剂 (GSI) 二苯并氮卓 (DBZ) 作为对照。如图 4A 中所示, 发现 59R1 抗体抑制 hDLL4- 诱导的 Notch2 报告子活性。

[0336] 用具有合成 8X CBS 启动子的萤火虫荧光素酶、pSPORT6 MAML-1 和作为转染对照的 Renilla 荧光素酶 -CMV 瞬时转染稳定过表达人类 Notch2 的 HeLa 细胞。使细胞与用 200ng 的经固定 hJAG1 (R&D 系统) 或 hJAG2 (R&D 系统) 一起温育 16 小时, 然后使用 Dual-Glo (Promega) 根据制造商说明进行检测。59R1 IgG2 抗体的浓度为 $40 \mu\text{g/ml}$ 。使用 $1 \mu\text{M}$ 的 γ 分泌酶抑制剂 (GSI) 二苯并氮卓 (DBZ) 作为对照。分别如图 4B 和 4C 中所示, 发现 59R1 抗体抑制 hJAG1- 和 hJAG2- 诱导的 Notch2 报告子活性。

[0337] 实施例 5

[0338] 抗 Notch2/3 抗体 59R1 预防体内肿瘤生长。

[0339] 该实施例描述使用结合 Notch 受体的非配体结合区 (Notch2 的 EGF10 和 Notch3 的 EGF10) 的抗 Notch2/3 受体抗体 (59R1) 来预防异种移植物模型中的肿瘤生长。

[0340] 在特定实施方式中, 注射有 50,000 PE13 或 T3 乳瘤细胞的 NOD/SCID 小鼠在细胞注射两天后, 用抗 Notch2/3 抗体 59R1 或对照抗体 1B7.11 进行治疗。以 10mg/kg 每周两次给药抗体。与对照相比, 抗 Notch2/3 抗体 59R1 显著地减少 PE13 (图 5A) 和 T3 (图 5B) 肿瘤生长。

[0341] 实施例 6

[0342] 使用抗 Notch 2/3 抗体 59R1 体内治疗肿瘤。

[0343] 该实施例描述使用抗 Notch 2/3 抗体来治疗异种移植物模型中的癌。

[0344] 在一个实验中, 将 1×10^7 的活 Colo-205 结肠瘤细胞注入在 Swiss CD-1 背景下的 6 ~ 8 周大的免疫妥协 bg/nu XID 雌性小鼠中。使肿瘤生长至 $65\text{mm}^3 \sim 200\text{mm}^3$ 的尺寸, 然后对小鼠进行随机分组 (每实验组 $n = 10$), 并且开始抗体施用。每周一次用 15mg/kg 的对照 1B7.11 抗体或抗 Notch2/3 59R1 抗体治疗动物。对肿瘤尺寸每周测定两次, 如 (参见 Michieli 等, 2004, Cancer Cell, 6 :61-73) 所述计算肿瘤体积。与对照相比, 抗 Notch2/3 抗体 59R1 显著地减少 Colo-205 肿瘤生长 (图 5C)。

[0345] 在另一实验中, 测试抗 Notch2/3 抗体对胰腺瘤生长的作用。用 30,000 个 PN4 胰腺瘤细胞皮下 (sub-cu) 在右肋腹注射 NOD/SCID 小鼠, 使肿瘤生长直到它们达到 100mm^3 的平均体积。使动物随机化并开始抗 Notch2/3 抗体 59R1 或对照抗体 1B711 的给药。以 15mg/kg 每周一次给药抗体。与对照相比, 抗 Notch2/3 抗体 59R1 显著地减少 PN4 肿瘤生长 (图 5D)。

[0346] 在另一实验中, 测试抗 Notch2/3 抗体对乳瘤生长的作用。用 50,000 个 PE13 或 T3 乳瘤细胞注射 NOD/SCID 小鼠, 使肿瘤生长达到 $65\text{mm}^3 \sim 200\text{mm}^3$ 的尺寸, 然后使小鼠随机分组 (每实验组 $n = 10$), 并且开始抗体施用。每周两次用 15mg/kg 的对照 1B7.11 抗体或抗 Notch2/3 59R1 抗体治疗动物。对肿瘤尺寸每周测定两次, 如 (参见 Michieli 等, 2004) 所述计算肿瘤体积。与对照相比, 抗 Notch2/3 抗体 59R1 显著地减少 PE13 (图 5E) 和 TE (图 5E) 肿瘤的生长 (图 5F)。

[0347] 抗体治疗的终点时, 可收获肿瘤以用于进一步分析。在某些实施方式中, 通过免疫荧光分析肿瘤的一部分, 从而评估抗体向肿瘤中的渗透和肿瘤应答。将来自抗 Notch2/3 抗体治疗的小鼠和对照抗体治疗的小鼠的各收获的肿瘤的一部分在液氮中新鲜冷冻, 包埋在

O. C. T. 中并且在低温保持器上切成在载玻片上的 10um 切片。作为选择,对各肿瘤的一部分进行福尔马林固定、石蜡包埋和在切片机上切成在载玻片上的 10um 切片。对切片进行后固定并与特异性识别所注射抗体的生色团标记抗体一起温育,从而检测在肿瘤活检样中存在的抗 Notch2/3 抗体或对照抗体。另外,可以使用检测不同肿瘤和肿瘤募集细胞 (recruited cell) 类型的抗体来评价抗体治疗对血管发生、肿瘤生长和肿瘤形态的影响,所述检测不同肿瘤和肿瘤募集细胞类型的抗体例如有检测血管内皮细胞的抗 -VE 钙粘蛋白 (CD 144) 或抗 -PECAM-1 (CD31) 抗体、检测血管平滑肌细胞的抗 -平滑肌 α - 肌动蛋白抗体、检测增殖细胞的抗 -Ki67 抗体、检测死细胞的 TUNEL 检测和检测 Notch 信号传导的抗 -胞内域 (ICD) Notch 片段抗体。

[0348] 还可以评估抗 Notch2/3 抗体治疗对肿瘤细胞基因表达的影响。从来自 Notch2/3 抗体治疗的小鼠和对照抗体治疗的小鼠的各收获肿瘤的一部分提取总 RNA,并用于进行定量 RT-PCR。相对于作为内部对照的持家基因 GAPDH,分析 Notch2/3 的表达水平、Notch2 和 / 或 Notch3 信号传导途径的组分,以及包括例如 CD44 等在内的癌干细胞标记物。由此确定当 Notch2/3 抗体治疗时肿瘤细胞基因表达上的变化。

[0349] 另外,可以评价抗 Notch2/3 抗体治疗对肿瘤中癌干细胞的存在的影 响。将来自 Notch 2/3 抗体治疗的小鼠以及相对的对照抗体治疗的小鼠的肿瘤样品切成小块,使用无菌刀片完全切碎,并且通过酶促消化和机械破坏获得单细胞悬浮液。然后通过 FACS 分析对解离的肿瘤细胞分析致瘤性癌干细胞的存在,所述致瘤性癌干细胞基于如上详细所述的 ESA+, CD44+, CD24-/low, Lin- 表面细胞标记物表达。

[0350] 然后评估在抗 Notch2/3 抗体治疗后基于 ESA+, CD44+, CD24-/low, Lin- 表达分离的细胞的致瘤性。在一个实验中,将 5,000、1,000、500 和 100 个来自 Notch 2/3 抗体治疗的小鼠以及相对的对照抗体治疗的小鼠的分离的 ESA+, CD44+, CD24-/low, Lin- 癌干细胞皮下再注入 NOD/SCID 小鼠的乳腺脂肪垫中。基于持续肿瘤形成所需注射细胞的数量,由此确定癌干细胞的致瘤性。

[0351] 实施例 7

[0352] 抗 Notch 2/3 抗体 59R1 延迟紫杉醇治疗后体内肿瘤复发。

[0353] 将 B51 乳瘤细胞 (每只小鼠 50,000 个细胞) 皮下注入 NOD/SCID 小鼠的乳腺脂肪垫中。使肿瘤生长 50 天直到它们达到 $\sim 100\text{mm}^3$ 的平均体积。使动物随机分组 ($n = 10$ /组) 并开始治疗。一组接受每周两次的 10mg/kg 的对照抗体 (1B711) 和每周两次的 15mg/kg 的紫杉醇 (Taxol), 另一组接受每周两次的 10mg/kg 的 59R1 和每周两次的 15mg/kg 的紫杉醇。在指定日期测定肿瘤体积。治疗进行 38 天直到肿瘤体积消退到 $\sim 50\text{mm}^3$, 然后停止紫杉醇治疗, 在实验的持续时间内继续抗体治疗。

[0354] 结果示于图 6。观察到与用 59R1 治疗的组相比, 对照组中复发更迅速。

[0355] 实施例 8

[0356] 抗 Notch 2/3 抗体 59R1 减少体内肿瘤中癌干细胞的频率。

[0357] 可以使用有限稀释检测 (LDA) 来评估 Notch 结合剂对实体瘤癌干细胞的影响和对包含癌干细胞的肿瘤的致瘤性的影响。可以使用上述检测来确定用 Notch 结合剂或其它试剂治疗的动物的肿瘤中癌干细胞的频率, 并与对照动物的肿瘤中癌干细胞的频率进行比较。

[0358] 使用 LDA 来评估如以上实施例 7 中所述的用对照抗体 (1B711) 加上紫杉醇 (Taxol) 的组合进行治疗的或用 59R1 和紫杉醇的组合治疗的 B51 乳瘤的致瘤性的影响。另外, 还通过 LDA 确定用单独的对照抗体或单独的 59R1 治疗 B51 乳瘤的效果。关于以上其它两个治疗组, 对照抗体组和 59R1 组的抗体和紫杉醇的剂量以及给药方案与实施例 7 中所述相同。3 剂的抗体和 / 或紫杉醇后, 收获肿瘤, 对其处理并解离成单细胞。通过在冰上与生物素化的小鼠抗体 (1 : 200 稀释的 α -小鼠 CD45-生物素和 1 : 100 稀释的大鼠 α -小鼠 H2Kd-生物素, BioLegend, San Diego, CA) 温育 30 分钟, 然后添加链亲和素-标记的磁珠并且在磁体的帮助下除去小鼠细胞, 从而由异种移植物肿瘤细胞中分离人类肿瘤细胞。收获悬浮液中的人类细胞并对其计数。

[0359] 将来自四个治疗组中每组的连续滴定细胞 (30、90、270 和 810 个细胞) 于 FACS 缓冲液和基质胶 (Matrigel) 的 1 : 1 (v/v) 混合物中注入新的 NOD-SCID 小鼠组 ($n = 10$ /组)。使肿瘤生长 72 天。在所有组中确定具有可检测肿瘤的小鼠的百分比。然后使用 L-Calculon™ 软件 (StemCell Technologies Inc.; 可从 www.stemcell.com/search/default.asp 下载) 计算癌干细胞频率。

[0360] 结果示于图 7。对照-治疗的小鼠 (“对照”) 的肿瘤中癌干细胞的频率经确定为 1 : 66。紫杉醇-治疗的小鼠 (“紫杉醇”) 的肿瘤中癌干细胞的频率显示为 1 : 25, 表明与对照相比用紫杉醇进行治疗实际上使肿瘤中癌干细胞的频率增加超过两倍。另一方面, 使用单独的 59R1 抗体 (“59R1”) 或 59R1 抗体与紫杉醇组合 (“紫杉醇 +59R1”) 进行治疗, 减少肿瘤中癌干细胞的频率。与对照相比, 单独的 59R1 抗体使肿瘤中癌干细胞的频率减少超过两倍。使用 59R1 抗体和紫杉醇的组合进行治疗使肿瘤中癌干细胞的频率相对于单独的 59R1 进行治疗减少约两倍 ($p < 0.0001$), 相对于用对照抗体进行治疗减少约 4.5 倍, 相对于单独的紫杉醇的治疗减少约 12 倍。这些结果表明, 无论是单独给予还是与紫杉醇组合给予, 使用 59R1 抗体进行治疗在减少乳瘤的致瘤性上是有效的, 不过使用单独的紫杉醇进行治疗具有相反作用。

[0361] 实施例 9

[0362] 另外的使用抗 Notch 2/3 抗体 59R1 体内治疗肿瘤。

[0363] 将 PN4 胰腺瘤细胞 (每只小鼠 50,000 个细胞) 皮下注入 Nod-Scid 小鼠的肋腹区域。使肿瘤生长 27 天直到它们达到 $\sim 120\text{mm}^3$ 的平均体积。使动物随机分为 4 个治疗组 ($n = 10$ /组) 并开始治疗。一组接受每周两次的 10mg/kg 的对照抗体 (1B711); 一组接受每周一次的 40mg/kg 的吉西他滨加上每周两次的 10mg/kg 的对照抗体; 一组接受每周两次的 10mg/kg 的 59R1, 第四组接受每周两次的 10mg/kg 的 59R1 与每周一次的 40mg/kg 的吉西他滨的组合。在指定日期测定肿瘤体积。结果示于图 8。发现 59R1 和吉西他滨的组合抑制肿瘤生长 ($p < 0.001$)。

[0364] 将 M4 黑色素瘤细胞 (每只小鼠 10,000 个细胞) 皮下注入 NOD-SCID 小鼠的肋腹区域。使肿瘤生长 25 天直到它们达到 $\sim 80\text{mm}^3$ 的平均体积。使动物随机分为治疗组 ($n = 10$ /组) 并开始治疗。一组接受每周两次的 10mg/kg 的对照抗体 (1B711), 一组接受每周两次的 10mg/kg 的 59R1。在指定日期测定肿瘤体积。结果示于图 9。发现 59R1 抑制肿瘤生长。

[0365] 将 C28 结肠瘤细胞 (每只小鼠 10,000 个细胞) 皮下注入 NOD-SCID 小鼠的肋腹

区域。使肿瘤生长 24 天直到它们达到 $\sim 130\text{mm}^3$ 的平均体积。使动物随机分为 4 个治疗组 ($n = 10/\text{组}$) 并开始治疗。一组接受每周两次的 $10\text{mg}/\text{kg}$ 的对照抗体 (1B711); 一组接受每周一次的 $7.5\text{mg}/\text{kg}$ 的伊立替康加上每周两次的 $10\text{mg}/\text{kg}$ 的对照抗体; 一组接受每周两次的 $10\text{mg}/\text{kg}$ 的 59R1, 第四组接受每周两次的 $10\text{mg}/\text{kg}$ 的 59R1 与每周一次的 $7.5\text{mg}/\text{kg}$ 的伊立替康的组合。在指定日期测定肿瘤体积。结果示于图 10。发现, 与对照抗体组相比单独的 59R1 抑制肿瘤生长, 与伊立替康组相比 59R1 和伊立替康的组合抑制肿瘤生长。

[0366] 还在乳瘤异种移植物系 OMP-B34、OMP-B39、OMP-B44、PE13 和 UM-T1, 胰腺瘤异种移植物系 OMP-PN8, 和结肠瘤异种移植物系 OMP-C8 中体内测试了 59R1 IgG2 抗体。根据 Al-Hajj 等, 2003, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100 :3983-3988 中所述步骤建立这些肿瘤异种移植物系。7 ~ 10 周大的雌性 NOD/SCID 免疫妥协小鼠用于建立乳瘤异种移植物, 雄性 NOD/SCID 小鼠用于 OMP-Pn8 和 OMP-C8 肿瘤模型 (Harlan, Indianapolis, Indiana)。还在 Colo-205 结肠瘤异种移植物模型中体内测试了 59R1 IgG2 抗体。Swiss CD-1 背景下的雌性免疫缺陷性 bg/nu XID 小鼠用于 Colo-205 异种移植物肿瘤模型。在乳癌模型的情况下, 必须植入缓释雌激素团块 (0.36mg)。分别用在 PBS (不含镁或钙) 和基质胶的比例为 1:1 的混合物中的 50,000 个 (OMP-B34、OMP-B39、OMP-B44、PE13 和 UM-T1) 或 1×10^7 个 (Colo-205) 活细胞在右肋腹对小鼠进行皮下注射。每只小鼠的注射总体积是 $200 \mu\text{l}$, 50% 是基质胶。一旦肿瘤达到 $65\text{mm}^3 \sim 200\text{mm}^3$ 的尺寸, 使小鼠随机化。每周施用抗体, 并且每周两次测定肿瘤。LZ1 (识别溶菌酶的人类抗体) 或 1B711 (识别半抗原三硝基苯酚的鼠类 IgG1 抗体) 用作各肿瘤类型治疗的对照抗体。如 Al-Hajj 等 (2003) 所述计算肿瘤体积。数据表示为平均值和平均值 \pm S. E. M. 使用学生双尾非配对 t 检验比较组平均值。< 0.05 的概率 (P) 值解释为显著差异。使用 Microsoft EXCEL 和 Graph Pad PRISM 进行所有统计分析。

[0367] Colo205、C8、PNA、B34、B39、B44、PE13 和 T1 异种移植物模型的另外的体内实验结果分别示于图 11A ~ 11H。如图 11A 中所示, 与对照抗体 (LZ1) 相比使用 59R1 抗体的单一疗法显著抑制 Colo205 肿瘤的生长 ($p < 0.01$)。59R1 加上抗 VEGF 抗体贝伐单抗 (AVASTIN) 的组合疗法提供了比单独的 59R1 或单独的贝伐单抗更大的对肿瘤生长的抑制 ($p < 0.001$)。在另一结直肠异种移植物模型 C8 中, 与对照抗体相比 59R1 同样也显示抑制肿瘤生长 (图 11B)。类似地, 发现在 PN8 异种移植物模型中 59R1 抑制胰腺瘤生长 (相对于对照抗体) (图 11C)。在五个乳癌异种移植物模型 B34 (图 11D)、B39 (图 11E)、B44 (图 11F) 和 PE13 (图 11G) 的每个模型中, 相对于对照抗体, 59R1 也显示抑制乳癌生长。同样发现 59R1 抗体在 T1 乳癌模型 (图 11H) 中对于抑制肿瘤生长也是有效的, 虽然其仅在雌激素的存在下有效, 尽管 T1 是雌激素受体阴性肿瘤。

[0368] 实施例 10

[0369] 在异种移植物肿瘤模型中使用抗 Notch2/3 抗体 59R1 进行的治疗对基因调节的影响

[0370] 通过微阵列分析对用 59R1 IgG2 抗体治疗的各种异种移植物肿瘤模型中的基因表达水平进行分析。在 Affymetrix HG-U133 plus 2.0 microarray (Affymetrix, Santa Clara, CA) 上进行全基因表达图谱分析。根据制造商说明, 分离来自对照组和治疗组的异种移植

物全肿瘤的三个独立 RNA 样品, 并使其与所述微阵列杂交。使用开源 bioconductor 软件 (www.bioconductor.org) 中的 GCRMA 算法进行扫描阵列背景调整和信号强度标准化。通过对对照 (CTRL) 组和治疗 (59R1) 组中样品的 z- 分数转换, 使各基因的表达水平标准化。用 Bayesian t 检验 (Baldi 等, 2001, *Bioinformatics*, 17 :509-519) 鉴定两个组之间差异表达 ($p < 0.05$ 并且倍数变化 > 2.0) 的基因。在所选肿瘤异种移植物模型 (Co1o205、B44、PE13 和 T1) 中所选相关差异调节的基因的表达模式示于以下表 5。各基因的 P 值 (PVal) 是使用 Bayesian t 检验的由 59R1 偶然地对所述基因进行显著调节的概率。相对于对照小鼠, 在 59R1 治疗的小鼠的间质中许多基因显示被显著下调, 所述基因包括编码 G- 蛋白信号传导 5 的调节子 (RGS5)、Notch3 和与 YRPW 基序相关的多毛 / 分裂增强子 - 样 (HEYL) 蛋白的基因。(相反, 未发现编码 RGS5、Notch3 和 HEYL 的这些特定基因在人类肿瘤细胞中显著下调)。

[0371] 表 5. 在 59R1 治疗的肿瘤的间质中差异表达的基因

[0372]

基因	Colo205		B44		PE13		T1	
	倍数	pVal	倍数	pVal	倍数	pVal	倍数	pVal
1420942_s_at (Rgs5)	-5.52	7.65E-07	-2.43	5.59E-04	-4.23	2.86E-05	-1.18	9.82E-04
1417466_at (Rgs5)	-3.39	6.62E-07	-2.22	3.11E-04	-4.03	1.31 E-10	-1.99	4.11E-04
1420941_at (Rgs5)	-5.10	1.66E-03	-2.09	1.18E-03	-2.99	1.35E-05	-1.97	2.07E-03
1421964_at (Notch3)	-3.26	3.70E-06	-2.03	2.30E-03	-1.91	1.67E-03	-1.01	8.86E-01
1416286_at (Rgs4)	-3.08	2.69E-03	-1.57	3.84E-02	-1.83	6.71E-05	-1.13	4.47E-01
1434141_at (Gucyl3)	-2.49	2.87E-03	-1.74	1.07E-02	-4.18	1.49E-07	1.20	5.95E-01
1459713_s_at (Tmem16a)	-1.90	1.90E-03	-1.70	1.01E-02	-7.28	9.89E-10	-2.14	1.79E-04
1420872_at (Gucylb3)	-1.94	1.90E-02	-1.65	7.68 E-03	-3.06	8.52E-10	-1.01	7.13E-01
1422789_at (Aldh1a2)	-1.73	1.20E-02	-4.92	2.42E-08	-2.17	1.58E-04	-2.16	9.27E-04
1419302_at (Heyl)	-3.28	5.61 E-03	-1.12	2.36E-01	-1.77	5.72E-04	-1.07	2.39E-02
1451501_a at (Ghr)	-1.83	1.69E-02	-2.24	2.71E-04	-1.66	8.90E-04	-1.12	3.38E-01
1417714_x_at (Hba- al/Hba-a2)	-8.37	2.49E-02	-2.56	4.63E-04	-1.92	1.06E-02	1.42	9.24E-01

[0373]

1428361_x_at (Hba- al/Hba-a2)	-8.91	1.93E-02	-2.42	1.08E-03	-1.73	4.27E-02	1.73	4.67E-01
1452590_a at (Plac9)	-1.61	1.07E-02	-1.64	1.22E-02	-1.62	6.17E-03	1.20	7.36E-01
1449632_s_at (Fkbp10)	-1.72	1.69E-02	-1.57	1.12E-02	-1.63	1.80E-04	1.07	5.97E-01
1449280_at (Esml)	2.07	1.06E-02	1.55	3.48E-02	1.56	4.35E-02	1.18	2.44E-01
1418829_a at (Eno2)	1.79	2.92E-02	1.71	1.02E-02	1.54	5.43E-03	1.29	9.92E-02

[0374] 通过TaqMan®分析对来自异种移植模型 Colo205、B29、B34、B44、PE13、T1(未用雌激素处理)、T1(用雌激素处理)、C8和PN8的间质中所选择基因(hey1、notch3、rgs5、angpt1和angpt2)的表达水平进行进一步分析,所述所选择基因已经在微阵列分析中鉴定为受59R1治疗调节。结果示于图12A(hey1)、12B(notch3)、12C(rgs5)、12D(angpt1)和12E(angpt2)。

[0375] TaqMan®分析的结果确认各种肿瘤类型中每个类型的间质中notch3和rgs5响应于使用59R1进行的治疗(相对于对照)而下调(图12B和图12C)。RGS5是周细胞和血管平滑肌细胞的众所周知的标记物(Berger等,2005, Blood, 105 :1094-1101 ;Lovschall等,2007, Int. J. Dev. Biol., 51 :715-721 ;Cho等,2003, FASEB J., 17 :440-2)。Notch3已经鉴定为在血管发生期间在周细胞中与RGS5共表达,并且在周细胞和血管平滑肌细胞的命运调节中起重要作用(Lovschall等,2007, Int. J. Dev. Biol., 51 :715-721 ;Domenga等,2004, Genes & Dev., 18 :2730-2735 ;Sweeney等,2004, FASEB J., 18 :1421-3 ;Morrow等,2005, Am. J. Physiol. Cell Physiol., 289 :C1188-C1196)。

[0376] 另外,还确认hey1在除了B34之外的每个异种移植模型的间质中下调(图12A)。HeyL属于Notch信号传导的下游转录因子的Hey家族(Hey1、Hey2和HeyL)。hey1通过59R1的下调表明59R1抗体通过使hey1下调直接影响Notch信号传导。

[0377] 还确定血管生成素-1(angiotensin-1, angpt1)和血管生成素-2(angiotensin-1, angpt2)在许多乳癌模型的间质中下调(图12D和12E)ANGPT1和2(血管生成素-1和血管生成素-2)是TIE1和2受体的配体。类似VEGF的TIE受体,是新血管发生过程中的关键信号传导分子(Jones等,2001, Nature Reviews, 2 :257-267)。

[0378] 但是,值得注意的是,在使用雌激素治疗时(使用59R1进行的治疗有效对抗肿瘤生长的条件下)的T1模型("T1e")的间质中angpt1和angpt2下调,但在不存在雌激素治疗(使用59R1进行的治疗对于肿瘤生长无效的条件下)的相同模型("T1ne")的间质中不下调(如上,参见实施例9)。因此,在T1肿瘤的间质中59R1对血管生成素-1和血管生成素-2的下调的作用在不存在雌激素治疗时消除。该作用的一种可能解释是,在不存在雌激素治疗时,T1间质中生长因子血管生成素-1和血管生成素-2的水平对于提供当使用59R1抗体进行治疗时表达水平的可测定降低而言不足够高。已经显示雌激素对肿瘤微环境具有显著影响(Banka等,2006, Cancer Res. 66 :3667-3672)。该数据的一种可能解释是雌激素导致肿瘤对ANGPT2信号传导的依赖,其然后导致对59R1治疗的敏感性。

[0379] 实施例11

[0380] 抗Notch2/3抗体59R1显著诱导结肠瘤和乳瘤中缺氧。

[0381] 在已经用59R1IgG2抗体或用1B711对照抗体治疗的Colo-205结肠瘤和PE-13乳瘤中进行对缺氧区的染色。如Ridgway等,2006, Nature 444 :1083-1087中所述进行染色。简言之,为了测定缺氧,在杀死之前1小时将盐酸哌莫硝唑(HypoxyProbe, NPI, Burlington, MA)以60mg/kg腹膜内注射,所述盐酸哌莫硝唑在氧分压小于约10mm Hg时形成寿命长的蛋白加合物。然后对肿瘤进行处理以用于组织学分析,按照制造商策略(NPI)使用抗-哌莫硝唑抗体对肿瘤切片进行染色。使用BX51显微镜(Olympus, Center Valley, PA)拍摄照片。

[0382] 如相对均匀和稠密的DAPI染色所示,发现活肿瘤细胞相等地存在于1B711治疗

的和 59R1 治疗的肿瘤中（数据未示出）。CD31- 阳性细胞的数量也保持不变，表明内皮细胞数量不受 59R1 治疗影响。但是，在 59R1- 治疗的 Colo-205 和 PE13 肿瘤中，缺氧区（如通过抗- 哌莫硝唑抗体检测）比在 1B711 治疗的肿瘤中显著更明显（数据未示出）。使用 AF594- 缀合的山羊抗- 大鼠 F(ab')₂ 来检测抗-CD31 抗体，并且使用 FITC- 缀合的山羊抗- 兔抗体来检测抗- 哌莫硝唑抗体。

[0383] 实施例 12

[0384] 包含 PTEN 肿瘤抑制子基因缺失的乳癌对使用 59R1 进行的治疗具有应答性。

[0385] 从异种移植物乳癌的肿瘤细胞制备 DNA 样品。DNA 分离前，使用缀合有小鼠细胞特异性抗体的磁珠使异种移植物肿瘤中的小鼠间质细胞耗尽。根据制造商说明，使经纯化 DNA 样品与 Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0 基因芯片 (Affymetrix, Santa Clara, CA) 杂交，所述基因芯片具有超过 946,000 个探针用于检测拷贝数量变化 (CNV)。通过各样品的隐马尔可夫模型 (HMM) 评估拷贝数量状态变化，并使用 Hapmap270 作为基线通过等级分割 (rank segmentation) 获得它们的变化 (CNV)。由于阵列中的固有噪音，使用 -0.5 与 $-1.0 \log_2$ 比值作为在显著阈值 $< 1.0 \times 10^{-6}$ 和每区段的探针最小值 = 5 下的杂合缺失和纯合缺失的截止点。

[0386] 图 13 显示染色体 10 中磷酸酶和张力蛋白同源物 (PTEN) 基因的外显子、Affymetrix 探针分布和缺失。发现 B29、B34、B37、B40、B51、T2、T3 和 T6 乳癌在其基因组中具有完整的 PTEN 基因。确定 B39 肿瘤中 PTEN 基因携带有纯合缺失，而确定 B44、PE13 和 T1 肿瘤具有该基因的杂合缺失。如上讨论，确定 59R1 对这四种包含 PTEN 的纯合缺失或杂合缺失的乳癌中的每一种都具有抗- 肿瘤功效。这些结果表明，因携带纯合性或杂合性 PTEN 缺失的肿瘤，特别是乳癌，可能特别适于使用诸如 59R1 等抗 Notch2/3 抗体进行的治疗。

[0387] 实施例 13

[0388] 59R5 抗体的表征

[0389] 鉴定出特异性结合人类 Notch 2 和人类 Notch 3 的另外的人类抗体 59R5。提供分别作为 SEQ ID NO :49 和 SEQ ID NO :18 的重链序列和轻链序列。重链可变区在 SEQ ID NO :50 中提供，轻链可变区在 SEQ ID NO :13 中提供。59R5 的重链 CDR3 包含 SIFYTT, SEQ ID NO :51。59R5 的其它 CDR 序列与 59R1 的具有同一性。对 59R1 和 59R5 结合亲和性进行的 Biacore 分析表明，59R5 与 Notch2 和 Notch3 的结合性质与 59R1 类似。两种抗体都结合人类和鼠类 Notch2 和 Notch3 受体，具有亚纳摩尔的亲和性（参见表 6）。

[0390] 表 6

		IgG 解离常数 (K_D , nM)					
	m-Notch1	h-Notch1	m-Notch2	h-Notch2	m-Notch3	h-Notch3	h-Notch4
[0391] 59R1	>10	>10	0.65	0.05	0.32	0.19	NB
59R5	>10	>10	0.26	0.05	0.29	0.22	NB

[0392] 确定了 59R5 在阻断 Notch2 和 Notch3 信号传导上与 59R1 具有相似的活性。在基于荧光素酶的检测中确定了受体激活。对 PC3 肿瘤细胞用人类或小鼠 Notch 受体（人类 Notch2、鼠类 Notch2、人类 Notch3 或鼠类 Notch3）和 GFP 诱导型报告子构建体进行瞬时转染。使经转染细胞与不同浓度的 59R1 或 59R5 抗体在被动固定的 DLL4-Fc 蛋白的存在下一起温育。通过测定荧光素酶活性确定 Notch 受体激活。如图 15A 所示，59R5 以与 59R1 类似

的水平阻断人类 Notch2、鼠类 Notch2、人类 Notch3 和鼠类 Notch3 受体信号传导的配体-诱导的激活。

[0393] 确定 59R5 的结合表位。对于抗体 59R1 的分析如实施例 3 中所述,在全长 Notch1 内形成几个点突变,将 EGF10 内的残基转换成人类 Notch2 中的相应氨基酸。通过 QuikChange® 突变法 (Stratagene) 产生全长 Notch 序列中的突变,并通过测序进行验证。用编码人类 Notch2、人类 Notch1 或残基 382-386 突变成相应的人类 Notch2 残基的人类 Notch1 的表达载体对 HEK 293 细胞进行瞬时转染。对细胞还用编码绿色荧光蛋白 (GFP) 的质粒共转染,从而标记接受所转染质粒的那些细胞。使细胞与 59R1 或 59R5 以及荧光第二抗体一起温育,然后通过 FACS 进行检查。通过 PE-缀合的山羊抗-人 Fc γ 特异性抗体 (Jackson Immunochemicals, #109-116-170) 检测 59R1 和 59R5。如图 15B 所示,59R5 与 Notch2 结合并且不与 Notch1 结合。但是,当将对应于 Notch2 氨基酸 385-389 的氨基酸取代到 Notch1 中时,59R5 能够与突变的 Notch1 结合。这表明对于 59R5 与人类 Notch 2 结合必需的至少一个或多个氨基酸位于氨基酸 385-389 内 (在图 14A 中所示的加框 hNotch2 序列中的残基),并且表明 59R5 与 59R1 结合相同的表位,或与 59R1 的表位类似的表位,或与 59R1 的表位重叠的表位。

[0394] 实施例 14

[0395] 使用 Notch2/3 抗体 59R5 的肿瘤体内治疗

[0396] 在一个实施方式中,用 PE13 乳瘤细胞注射 NOD/SCID 小鼠。用抗 Notch2/3 抗体 59R1、抗 Notch2/3 抗体 59R5 或对照抗体治疗所述小鼠。当细胞注射后两天开始给药时,以“预防性”模式每周一次以 15mg/kg 给药抗体。图 16A 显示,与使用 59R1 看到的效果类似,59R5 治疗对肿瘤生长的抑制大于 80%。

[0397] 在另一实施方式中,用 C28 结肠瘤细胞注射 NOD/SCID 小鼠。用抗 Notch2/3 抗体 59R1、抗 Notch2/3 抗体 59R5 或对照抗体治疗所述小鼠。当细胞注射后两天开始给药时,以“预防性”模式每周一次以 15mg/kg 给药抗体。图 16B 显示 59R1 和 59R5 都抑制 C28 结肠瘤的生长。

[0398] 在另一实施方式中,用 Co1o205 结肠瘤细胞注射 NOD/SCID 小鼠。用抗 Notch2/3 抗体 59R1、抗 Notch2/3 抗体 59R5 或对照抗体治疗所述小鼠。肿瘤已经建立后,每周一次以 15mg/kg 给药抗体。图 16C 显示 59R1 和 59R5 都以类似的水平抑制 Co1o208 结肠瘤的生长。

[0399] 实施例 15

[0400] 组合治疗中使用 Notch2/3 抗体 59R5 对肿瘤进行的体内治疗

[0401] 在一个实施方式中,用 PN8 胰腺瘤细胞注射 NOD/SCID 小鼠。使肿瘤生长约 33 天直到它们达到 150mm³ 的平均肿瘤体积。与对照抗体、抗 Notch2/3 抗体 59R1 或抗 Notch2/3 抗体 59R5 组合,用 20mg/kg 的吉西他滨每周一次治疗所述小鼠 4 周。如图 17A 所示,抗体 59R5 以与抗体 59R1 类似的水平抑制肿瘤生长,并且该组合治疗延长的肿瘤复发时间比单独的吉西他滨更长。

[0402] 在一个实施方式中,为了评价 59R5 对癌干细胞的作用,在 PE13 乳瘤模型中进行肿瘤复发研究。用 PE13 乳瘤细胞注射 NOD/SCID 小鼠。开始治疗前使肿瘤生长 40 天。与对照抗体或抗 Notch 2/3 抗体 59R5 组合,每周两次用 15mg/kg 的紫杉醇治疗小鼠 5 周。5 周

后,停止紫杉醇治疗,并且继续抗体治疗。观察到 59R5 显著地延迟了高剂量的紫杉醇治疗后的肿瘤复发(图 17B)。这些结果表明 59R5 治疗减少癌干细胞频率。

[0403] 此前实施方式中描述的 59R1 和 59R5 的体内活性的总结示于表 7。各实验的肿瘤体积和 p 值相对于对照组显示。如实施例 14 中所述进行 PE13、C28 和 Colo205 研究。如上所述进行 PN8 研究。对于 PN8 实验,对照是单独的吉西他滨,而 59R1 和 59R5 的值是与吉西他滨的组合。对于所有实验而言,以 15mg/kg 每周一次给药抗体。

[0404] 表 7

[0405]

	PE13		C28		Colo205		PN8	
	肿瘤体积	p 值	肿瘤体积	p 值	肿瘤体积	p 值	肿瘤体积	p 值
59R1	0.25	<0.0001	0.29	<0.0001	0.68	0.003	0.27	0.026
59R5	0.18	<0.0001	0.38	<0.0001	0.61	0.001	0.11	0.036

[0406] 实施例 16

[0407] 59R5 治疗后肿瘤中的基因表达的调节

[0408] 为了确定 59R5 和 59R1 是否通过相同的机制在体内起作用,检查肿瘤细胞和肿瘤间质中关键靶基因的表达。在 PE13 肿瘤细胞和间质细胞中通过定量 PCR 检测基因表达。相对于对照抗体治疗组的基因表达水平示于图 18。59R1 和 59R5 将鼠类 HeyL、Notch3 和 RGS5 在间质细胞中的表达调节到类似的程度(左框图)。在 C28 肿瘤中观察到相同模式的调节(数据未示出)。因此,59R5 保留对于肿瘤脉管系统和周细胞的功能而言关键的、在肿瘤间质中调节基因方面之前对于 59R1 鉴定出的作用机制。类似地,59R5 和 59R1 将肿瘤细胞中的人类基因 ID4、EDNRA 和 EGLN3 的表达调节到相同的程度(右框图)。

[0409] 与该基因家族的其它成员不同,ID4 通常在肿瘤中表达不足,并且已经显示 ID4 是乳腺癌中的肿瘤抑制剂,其经常通过甲基化而被沉默。ID4 表达的损失与乳腺癌患者中的不良预后相关(Noetzel 等,2008, BMC Cancer 8 :154)。因此, ID4 在 PE13 乳腺癌细胞中的上调可以是抗 Notch2/3 的抗肿瘤机制的一部分。EDNRA 是编码内皮素受体的基因,所述内皮素受体促进内皮细胞和肿瘤细胞生长并且刺激肿瘤细胞的转移活性(Bagnato 和 Rosano 2008, Int. J. Biochem. Cell. Biol. 40 :1443-51)。EGLN3(还称为 HIF-3 α)是缺氧诱导型基因。抗 Notch2/3 对 EGLN3 的诱导与所治疗肿瘤中功能性脉管系统的破坏一致。这些数据表明 59R1 和 59R5 的生物活性和作用机制非常类似。

[0410] 表 8 显示对经 59R1 和 59R5 治疗的 PE13 肿瘤进行微阵列分析的结果。数值是治疗动物相对于对照动物的平均差异表达值,每组 3 只动物。

[0411] 表 8

[0412]

59R1		59R5			
倍数	p 值	倍数	p 值	符号	基因名称
-5.10	3.21E-05	-3.00	1.10E-03	Foxc2	叉头框 C2
-4.40	1.26E-05	-2.46	7.45E-04	Hey2	与 YRPW 基序 2 相关的多毛/ 分裂增强子
-4.32	8.03E-06	-2.14	1.00E-04	Rgs5	G 蛋白信号传导的调节子 5
-3.33	5.59E-04	-2.79	3.18E-03	Hey1	与 YRPW 基序-样相关的多毛 /分裂增强子
-2.71	4.80E-04	-2.90	1.02E-04	Rgs4	G 蛋白信号传导的调节子 4
-2.10	2.17E-04	-1.86	4.33E-05	Notch3	Notch 基因同源物 3(果蝇)
-1.92	3.16E-02	-2.35	3.43E-03	Mmp9	基质金属肽酶 9
2.36	3.06E-02	4.97	3.35E-02	Pdcdllg2	程序化细胞死亡 1 配体 2
7.42	6.25E-07	2.80	2.07E-03	Gzma	颗粒酶 A

[0413] 微阵列分析揭示,如通过基因表达(例如, Foxc2、Hey2、Hey1、Notch3)测定,59R5 显著抑制 Notch 途径 ($p < 0.01$)。这些结果与 59R1 相当。Foxc2 是 Hedgehog 途径的下游靶标,并且参与细胞分化。在 59R1 和 59R5 之间,参与凋亡(例如,颗粒酶 A)和肿瘤相关组织重塑(MMP-9)的其它基因也类似地表达。这些数据表明 59R1 和 59R5 的生物活性和作用机制非常类似。

[0414] 实施例 17

[0415] 另外的 Notch2 和 / 或 Notch3 抗体的制备

[0416] 抗原制备

[0417] 在特定实施方式中,产生人类 Notch2 或人类 Notch3 胞外域的重组多肽片段作为用于制备抗体的抗原。例如可以使用标准重组 DNA 技术来分离编码 Notch2 的氨基酸 1-493 的多核苷酸(SEQ ID NO :33),其包括 EGF 1-12。将该多核苷酸框架内 N 末端地连接至人类 Fc 标签或组氨酸标签,并且克隆到转移质粒载体中,以用于在昆虫细胞中进行杆状病毒-介导的表达。使用标准转染、感染和细胞培养策略来产生表达相应 Notch2 多肽(SEQ ID NO :34)的重组昆虫细胞(O' Reilly 等,1994,Baculovirus Expression Vectors :A Laboratory Manual, Oxford :Oxford University Press)。

[0418] 使用切割预测软件 SignalP 3.0 估计人类 Notch2 的内源性信号序列的切割,但是实际的体内切割点可以在任一方向相差几个氨基酸。Notch2 的预测切割位于氨基酸 1 和 26 之间,因此 Notch2 抗原蛋白包含约氨基酸 27 ~氨基酸 493。可以使用蛋白 A 和 Ni^{++} -螯合亲和色谱从昆虫细胞条件培养基中纯化抗原蛋白。然后对经纯化的抗原蛋白以 PBS(pH = 7)进行透析,浓缩至约 1mg/ml,并且在免疫用制剂中无菌过滤。

[0419] 免疫

[0420] 使用标准技术以经纯化 Notch2 或 Notch3 抗原蛋白对小鼠进行免疫。使用 ELISA 和 FACS 分析在初始免疫后约 70 天就抗原识别对来自个体小鼠的血液进行筛选(以下详细描述)。然后选择具有最高抗体滴度的动物以用于最终的抗原增强,其后分离脾细胞以用于杂交瘤制备。在 96 孔板中将杂交瘤细胞以每孔 1 个细胞铺板,针对抗原蛋白通过 ELISA 和 FACS 分析来筛选各孔的上清液。选择几株具有高抗体滴度的杂交瘤,并且以静态瓶培养扩增。使用蛋白 A 或蛋白 G 琼脂糖色谱从杂交瘤上清液中对抗体进行纯化,通过如下所述的

FACS 测试抗体。

[0421] FACS 分析

[0422] 为了选择由杂交瘤（可识别天然细胞-表面 Notch2（和 / 或 Notch3）蛋白的克隆）产生的单克隆抗体，使用了 FACS 分析。以编码 Notch2 的全长 cDNA 克隆和转染标记 GFP 的表达载体对 HEK293 细胞进行共转染。转染后 24 小时 ~ 48 小时，收集悬浮液中的细胞，使其在冰上与抗 Notch2（或抗 Notch3 或抗 Notch2/3）抗体或用于检测背景抗体结合的对照 IgG 一起温育。洗涤细胞，使用与荧光发色团缀合的抗-鼠二抗检测一抗。然后通过 FACS 分选经标记的细胞，从而鉴定特异性识别天然细胞表面 Notch2 和 / 或 Notch3 蛋白的细胞表面表达的抗 Notch2、抗 Notch3 或抗 Notch2/3 抗体。

[0423] 嵌合抗体

[0424] 在鉴定出特异性识别 Notch 受体的非配体结合域的单克隆抗体后，对这些抗体进行修饰，从而克服当使用啮齿动物抗体作为治疗剂时的人类抗-鼠抗体（HAMA）免疫应答。通过 RT-PCR 从杂交瘤细胞分离所选择单克隆抗体的重链和轻链的可变区，并将其在哺乳动物表达载体中分别框架内连接至人类 IgG1 重链和 κ 轻链恒定区。作为选择，使用诸如 TCAE 5.3 等人类 Ig 表达载体，该表达载体在同一质粒中含有人类 IgG1 重链和 κ 轻链恒定区基因（Preston 等，1998，*Infection & Immunity* 66:4137-42）。然后将编码嵌合重链和轻链的表达载体共转染到中国仓鼠卵巢（CHO）细胞，以用于嵌合抗体生产。通过 ELISA 和 FACS 将嵌合抗体的免疫反应性和亲和性与亲本鼠类抗体比较。

[0425] 人源化抗体

[0426] 由于嵌合抗体治疗剂仍然经常具有抗原性，产生人类抗-嵌合抗体（HACA）免疫应答，可能需要对针对 Notch2 或 Notch3 受体的嵌合抗体进一步进行人源化。为了产生人源化抗体，使用重组 DNA 技术将上述嵌合抗体重链和轻链可变域的三个短的高可变区，或互补决定区（CDR）分别工程化到人类重链和轻链序列的可变域框架中，然后克隆到哺乳动物表达载体中以用于在 CHO 细胞中表达。通过 ELISA 和 FACS 将人源化抗体的免疫反应性和亲和性与亲本嵌合抗体比较。另外，可利用可变区的定点或高密度突变来优化人源化抗体的特异性、亲和性等。

[0427] 实施例 18

[0428] 评价针对 Notch 受体的抗体的其它体外检测

[0429] 该实施例描述测试针对 Notch2 和 / 或 Notch3 受体产生的抗体对细胞增殖和细胞毒性的活性的体外检测方法。

[0430] 增殖检测

[0431] 使用基于 BrdU 的检测针对 Notch2 和 / 或 Notch3 的抗体测试其对体外肿瘤细胞生长的影响。使新鲜解离的、Lin⁻ 耗尽乳瘤细胞在低氧中培养 2 ~ 5 天。然后将细胞以 20,000 个细胞 / 孔与 2.5 μ g/mL 或 5.0 μ g/mL 抗 Notch 抗体、对照非特异性鼠类 IgG 或不与抗体一起培养 3 天，然后进行 18 小时的 BrdU 标记。以多个重复进行所有实验。然后确定与对照抗体相比，抗 Notch 抗体抑制细胞增殖的能力。

[0432] 补体依赖性细胞毒性检测

[0433] 使用表达 Notch2 受体和 / 或 Notch3 受体的癌细胞系，或作为选择使用在免疫妥协小鼠中作为异种移植物传代的从患者样品中分离的癌干细胞，来测定由针对 Notch2 和 /

或 Notch3 受体的抗体介导的补体依赖性细胞毒性 (CDC)。将细胞以 10^6 细胞 /ml 悬浮于补充有抗生素和 5% FBS 的 200 μ l RPMI 1640 培养基中。然后一式三份地使悬浮的细胞与 200 μ l 具有针对 Notch2 和 / 或 Notch3 受体的抗体或对照抗体的血清或热灭活血清混合。使细胞混合物在 37°C 下在 5% CO₂ 中温育 1 ~ 4 小时。然后收集经处理的细胞,使其再悬浮在 100 μ l 稀释于培养基中的 FITC- 标记的膜联蛋白 V,并在室温下温育 10 分钟。添加 100ml 稀释于 HBSS 中的碘化丙啶溶液 (25 μ g/ml),并在室温下温育 5 分钟。收集细胞,使其再悬浮于培养基中并通过流式细胞法进行分析。FITC 染色细胞的流式细胞分析提供总细胞计数,并且使用被作为总细胞数的百分比的死细胞摄入的碘化丙啶来测定在血清和针对 Notch2 和 / 或 Notch3 受体的抗体的存在下相对于在热灭活血清和对照抗体的存在下的细胞死亡。因而确定抗 Notch2/3 抗体介导补体依赖性细胞毒性的能力。

[0434] 抗体依赖性细胞的细胞毒性检测

[0435] 使用表达 Notch2 受体和 / 或 Notch3 受体的癌细胞系,或作为选择使用在免疫妥协小鼠中作为异种移植物传代的从患者样品中分离的癌干细胞 (以下详细描述),来测定由针对 Notch2 和 / 或 Notch3 受体的抗体介导的抗体依赖性细胞的细胞毒性 (ADCC)。将细胞以 10^6 细胞 /ml 悬浮于补充有抗生素和 5% FBS 的不含酚红的 200 μ l RPMI 1640 培养基中。通过 Ficoll-Paque 密度梯度离心从肝素化的外周血中分离外周血单核细胞 (PBMC),以用作效应细胞。然后使靶细胞 (T) 与 PBMC 效应细胞 (E) 以 25 : 1, 10 : 1 和 5 : 1 的 E/T 比在 96 孔板中在 Notch2 或 Notch3 受体或对照抗体的存在下混合。对照包括在抗体的存在下温育单独的靶细胞和单独的效应细胞。使细胞混合物在 37°C 下在 5% CO₂ 中温育 1 ~ 6 小时。然后通过比色检测 (例如, CytoTox96 Non-radioactive Cytotoxicity Assay ; Promega ; Madison, WI) 测定释放的乳酸脱氢酶 (LDH), 其是当细胞裂解时释放的一种稳定的胞浆酶。用标准 96 孔板读板仪收集 490nm 下的吸光度数据并进行背景校对。特定细胞毒性的百分比根据以下公式计算: % 细胞毒性 = $100 \times (\text{实验 LDH 释放} - \text{效应子自发 LDH 释放} - \text{靶标自发性 LDH 释放}) / (\text{靶标最大 LDH 释放} - \text{靶标自发性 LDH 释放})$ 。由此确定针对 Notch2 和 / 或 Notch3 受体的抗体介导抗体依赖性细胞的细胞毒性的能力。

[0436] 实施例 19

[0437] 针对 Notch 受体的 EGF10 (或等效的 EGF) 的抗体的制备

[0438] 特异性结合 Notch2 的第 10EGF 重复和 Notch3 的相应 EGF 重复 (第 9EGF 重复) 并且减少动物中肿瘤生长的抗体的鉴定表明了非配体结合域,特别是 EGF 重复 10 (或其等效物) 对于有效癌治疗的重要性。为了靶向 Notch 受体家族成员中的 EGF 重复 10 (或等效 EGF), 制备并分析了针对 Notch1、Notch2 或 Notch4 的 EGF10 或针对 Notch3 的 EGF9 的抗体。特别地,用包含 Notch1 (SEQ ID NO :35) ; Notch2 (SEQ ID NO :36) 或 Notch4 (SEQ ID NO :38) 的第 10EGF 重复或 Notch3 (SEQ ID NO :37) 的第 9EGF 重复的抗原对小鼠进行免疫。对以上详细所述的用各 Notch 受体转染的 HEK 293 细胞使用 FACS 分析,从而鉴定了识别特异性 Notch 受体的抗体以及识别四种 Notch 受体的不同组合的抗体。设想识别两个 Notch 受体家族成员的第 10EGF 重复 (或等效 EGF) 的抗体 (例如识别 Notch1 EGF10 和 Notch2 EGF10 ; Notch1 EGF10 和 Notch3 EGF9 ; Notch1 EGF10 和 Notch4 EGF10 ; Notch2 EGF10 和 Notch3 EGF9 ; Notch2 EGF10 和 Notch4 EGF10 ; 或者 Notch3 EGF9 和 Notch4 EGF10 的抗体)。同样构想了识别三个 Notch 受体家族成员的第 10EGF 重复 (或等效 EGF) 的抗体 (例如, 识别 Notch1 EGF10、Notch2

EGF10 和 Notch3 EGF9 ;Notch1 EGF10、Notch2 EGF10 和 Notch4EGF10 ;或者 Notch2 EGF10、Notch3 EGF9 和 Notch4 EGF10 的抗体)。设想识别四个 Notch 受体家族成员的第 10EGF 重复(或等效 EGF)的抗体(例如,识别 Notch1 EGF10、Notch2 EGF10、Notch3 EGF9 和 Notch4 EGF10 的抗体)。

[0439] 实施例 20

[0440] 使用抗 Notch 受体抗体对人类癌进行的治疗

[0441] 该实施例描述使用针对 Notch 受体的抗体以靶向包含癌干细胞和 / 或肿瘤细胞的肿瘤而治疗癌的方法,所述癌干细胞和 / 或肿瘤细胞中已经检测出 Notch 受体表达。

[0442] 可以首先从肿瘤活检样中确定癌干细胞标记物表达的存在。在无菌条件下移取来自诊断患癌的患者活检样的肿瘤细胞。在某些实施方式中,将组织活检样在液氮中新鲜冷冻,包埋在 O. C. T. 中,并且在低温保持器上切成在载玻片上的 10 μ m 切片。作为选择,对组织活检样进行福尔马林固定、石蜡包埋和在切片机上切成在载玻片上的 10 μ m 切片。使切片与针对 Notch 受体的抗体一起温育以检测蛋白表达。另外,可以确定癌干细胞的存在。将组织活检样品切成小块,使用无菌刀片完全切碎,并且使细胞经受酶促消化和机械破坏,从而获得单细胞悬浮液。然后使解离的肿瘤细胞与抗 -ESA, -CD44, -CD24 和 -Lin 抗体一起温育以检测癌干细胞,通过如上详细所述的流式细胞法确定 ESA+, CD44+, CD24-/low, Lin- 肿瘤干细胞的存在。

[0443] 用抗 Notch 受体抗体治疗诊断其肿瘤表达 Notch 受体的癌症患者。对如上所述产生的人源化或人类单克隆抗 Notch 受体抗体进行纯化,并与合适的药物载体一起配制在注射用 PBS 中。每周 1 次用 Notch 抗体治疗患者,持续至少 10 周,但在某些情况下每周 1 次持续至少约 14 周。抗体每次施用应该为约 2mg/ml ~ 约 100mg/ml 的药学有效剂量,在某些情况下为约 5mg/ml ~ 约 40mg/ml。施用抗体可以在标准放射治疗方案或化学治疗方案之前、与其同时或在其之后,所述化学治疗方案使用一种或多种化学治疗剂,例如紫杉醇、吉西他滨、伊立替康、奥沙利铂、氟尿嘧啶、甲酰四氢叶酸或链佐星。例如基于肿瘤消退、新肿瘤发生率的减少、肿瘤抗原表达下降、癌干细胞的数量下降或评价疾病预后的其它手段,对患者进行监视以确定所述治疗是否导致抗肿瘤应答。

[0444] 实施例 21

[0445] 针对 Notch1、Notch2、Notch3 和 / 或 Notch4 EGF 重复 4 的抗体的制备

[0446] 为了靶向 Notch 受体家族成员中的 EGF 重复 4, 制备并分析了针对 Notch1、Notch2、Notch3 和 / 或 Notch4 EGF 重复 4 的抗体。特别地,用包含 Notch1 (SEQ ID NO :41)、Notch2 (SEQ ID NO :42)、Notch3 (SEQ ID NO :43) 或 Notch4 (SEQ ID NO :44) 的第 4EGF 重复的抗原对小鼠进行免疫。对以上详细所述的用各 Notch 受体转染的 HEK 293 细胞使用 FACS 分析,鉴定识别特异性 Notch 受体的抗体以及识别四种 Notch 受体的不同组合的抗体。设想识别两个 Notch 受体家族成员的第 4EGF 重复的抗体(例如识别 Notch1 和 Notch2 ;Notch1 和 Notch3 ;Notch1 和 Notch4 ;Notch2 和 Notch3 ;Notch2 和 Notch4 ;或者 Notch3 和 Notch4 的第 4EGF 重复的抗体)。设想识别三个 Notch 受体家族成员的第 4EGF 重复的抗体(例如识别 Notch1、Notch2 和 Notch3 ;Notch1、Notch2 和 Notch4 ;或者 Notch2、Notch3 和 Notch4 的第 4EGF 重复的抗体)。设想识别四个 Notch 受体家族成员的第 4EGF 重复的抗体(例如识别 Notch1、Notch2、Notch3 和 Notch4 的第 4EGF 重复的抗体)。

[0447] 可结合 Notch1 的 EGF4 的单克隆抗体, 13M57 的示例性制备和表征的描述可见于美国专利申请公开第 2008/0131434, 本文通过参考并且其全文。

[0448] 实施例 22

[0449] 在用 59R1 治疗的肿瘤细胞中的其它基因表达检测

[0450] 鉴定在异种移植物模型内的肿瘤细胞中响应于 59R1 治疗的基因表达的改变。

[0451] 使用 Gene Set Enrichment Analysis (Mootha 等, 2003, Nature Genetics 34 : 267-73 ; Subramanian 等, 2005, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 : 15545-50) 在乳癌 T1、PE13 和 B51 中鉴定出在肿瘤细胞中受抗体 59R1 调节的几种途径 / 基因集合 (表 9)。值得注意的是, 在该分析中 59R1 下调细胞周期基因途径、myc- 激活基因和几个干细胞基因集合。已经显示 cMyc 是 Notch 途径的直接靶标 (Weng 等, 2006, Genes Dev. 20 : 2096-109)。通过 59R1 下调的干细胞基因集合源自来源于五个独特群体的分子标签: 人胎造血干细胞 (HCS)、鼠胎和成体 HSC、神经干细胞 (NSC) 和胚胎干细胞 (ESC) (Ivanova 等, 2002, Science 298 : 601-604), 和最近描述的核 ESC 基因集合 (Ben-Porath 等, 2008, Nature Genetics 40 : 499-507) 以及其下调引起分化的 ESC 自我更新基因集合 (Hu 等, 2009, Genes Dev. 23 : 837-48)。

[0452] 表 9

[0453]

名称	尺寸	FDR	描述
NGUYEN KERATO UP NOTCH	27	0.0774	小鼠和人类原代角质形成细胞中受激活的 Notch1 伴随调节的基因-上
CELLCYCLEPATHWAY	22	0.0798	细胞周期蛋白与细胞周期蛋白-依赖性激酶相互作用, 形成调节进展 thr 的活性激酶复合物
YU CMYC UP	28	0.0884	Myc-激活基因
HSC STHSC FETAL	27	0.0885	在来自胎肝的小鼠短期功能性造血干细胞中上调(ST-HSC 共有)
HSC STHSC SHARED	27	0.0907	来自成体骨髓 an 的小鼠短期功能性造血干细胞中上调
WEINBERG ESC EXP2	30	0.1001	根据 8 个特征研究的荟萃分析在 hES 细胞中特异性过表达的 40 个基因(Natu
ESC SELF RENEWAL	30	0.1087	通过全基因组 RNAI 筛选鉴定出的基因, 其下调引起 mESC 分化
BRENTANI REPAIR	33	0.1122	参与 DNA 修复的癌相关基因

[0454] FDR < 15%

[0455] 实施例 23

[0456] 通过 Notch2/3 抗体减少癌干细胞频率

[0457] 使用与实施例 8 中所述类似的实验, 在 PE13 乳癌细胞中进行通过有限稀释分析对癌干细胞频率进行的分析。用对照抗体、紫杉醇加上对照抗体、59R1、或紫杉醇加上 59R1 对携带 PE13 乳癌的动物进行持续 3 周的治疗。3 个周后收获肿瘤, 分析所治疗肿瘤中的 CSC 频率。将来自四个治疗组中每组的连续滴定人类细胞移植入新的小鼠组 (每细胞剂量 n = 10)。利用 L-calc 程序 (Stem Cell Technologies, Inc.), 用生长 75 天后的肿瘤生长速率 (图 19A) 来计算 CSC 频率。对照抗体治疗的肿瘤经确定具有 1 : 74 的肿瘤起始细胞频率。

用紫杉醇单独进行治疗将 CSC 频率增加至 1 : 30。相反,用 59R1 进行治疗将 CSC 频率减少至 1 : 179,59R1 加上紫杉醇的组合将 CSC 频率减少至 1 : 319(图 19B)。单星号表示相对于对照抗体治疗组的统计学显著差异 ($p < 0.05$),双星号表示相对于紫杉醇和对照抗体治疗组的显著差异。该实验表明,59R1 作为单独试剂对 PE13 乳瘤的治疗使 CSC 频率减少,59R1 在与紫杉醇组合时对 PE13 乳瘤的治疗使 CSC 频率更显著地减少。相反,用紫杉醇单独进行治疗,虽然有效地减少肿瘤体积,但是增加了所治疗肿瘤的 CSC 频率,这表明肿瘤起始细胞优先对该化学治疗剂的作用具有抗性。

[0458] 除了研究 59R1 在肿瘤中的影响和对 CSC 频率的影响之外,还在与紫杉醇组合的 59R1 治疗后研究基因变化。在 PE13 乳瘤中进行该实验,所述 PE13 乳瘤中之前已经观察到(并且本文已经能够描述了)用 59R1 单独进行治疗或 59R1 加上紫杉醇治疗后 CSC 频率降低。对来自进行了 PE13 的有限稀释分析以用于 CSC 定量的相同实验的肿瘤进行微阵列分析(图 19)。在收获以用于微阵列分析之前,用 59R1 加上紫杉醇、对照和紫杉醇对携带 PE13 乳瘤的动物进行 3 周治疗。计算紫杉醇相对于对照和 59R1 加紫杉醇相对于紫杉醇治疗的动物(每组 3 只动物)的平均差异表达值。严格来自,在基因表达微阵列数据中,据发现与紫杉醇组合的 59R1 以与使用单独紫杉醇后观察到的基因改变相反的倍数方向影响凋亡、缺氧、分化和干细胞相关基因(表 10),这与这些化合物对 CSC 频率的影响一致。

[0459] 表 10

[0460]

紫杉醇相对于对照		59R1 紫杉醇相对于紫杉醇		符号	名称
倍数	p 值	倍数	p 值		
10.2	6.8E-03	-4.3	2.3E-01	BMPR1B	骨形态生成蛋白受体, IB 型
-2.1	4.2E-05	1.8	6.9E-05	BNIP3	BCL2/腺病毒 E1B 19kDa 相互作用蛋白 3
-21.1	1.0E-02	11.9	3.9E-04	EGLN3	egl 9 同源物 3
13.4	5.9E-05	-1.8	1.2E-01	HSPB6	热休克蛋白, α -晶体蛋白相关, B6
2.2	1.5E-02	-2.5	1.9E-03	ITGAM	整联蛋白, α M
4.6	3.6E-03	-4.4	5.2E-03	LHX8	LIM 同源盒 8
-9.0	2.0E-06	6.4	1.8E-05	NDRG1	N-myc 下游调节基因 1

[0461]

6.4	6.9E-06	-2.2	7.4E-03	RARRES1	视黄酸受体反应子 1
2.6	3.5E-04	-1.7	1.1E-03	RARRES3	视黄酸受体反应子 3
4.8	3.9E-05	-2.2	1.6E-02	RBP2	视黄醇结合蛋白 2, 细胞的
10.6	1.3E-10	-1.5	5.9E-02	XAF1	XIAP 相关因子 1

[0462] 在该数据集中调节的凋亡-相关基因包括 BNIP3、NDRG1 HSPB6 和 XAF1。BNIP3(Bcl-2/E1B 19kDa 相互作用蛋白)是在肿瘤的缺氧区表达的 Bcl-2 家族的促凋亡成员(Kothari 等,2003, Oncogene 22 :4734-44)。BNIP3 被单独的紫杉醇下调和被组合治疗上调,表明 59R1 加上紫杉醇可以促进凋亡。与该想法一致的是观察到:HSPB6 在紫杉醇

治疗的肿瘤中下调;HSPB6 过表达可以在某些生物系统中防止凋亡 (Fan 等,2005, Trends Cardiovasc. Med. 15 :138-41)。在组合治疗中上调的 NDRG1 (N-myc 下游调节基因 1),对于 p53- 依赖性凋亡是必需的 (Stein 等,2004, J. Biol. Chem. 279 :48930-40)。令人感兴趣的是, NDRG1 还是结直肠癌转移的推定抑制剂。其表达增加与前列腺癌和乳癌中存活改善有关 (Shah 等,2005, Clin. Cancer Res. 11 :3296-302)。另外, NDRG1 参与促进分化。已经显示 NDRG1 的表达在良好分化的胰腺癌细胞中高度表达,但在分化较差的肿瘤细胞中不表达 (Angst 等,2006, Br. J. Cancer 95 :307-13)。还观察到诸如 BMPR1B 和同源盒包含基因 LHX8 等其它干细胞相关基因,被单独的紫杉醇上调,然后被与紫杉醇组合的 59R1 治疗下调。

[0463] 与推定的干细胞标记物 ALDH1a1 功能类似的、参与类视色素 (retinoid) 代谢的几个基因 (RARRES1、RARRES3、RBP2),被紫杉醇上调,然后被紫杉醇加上 59R1 治疗下调。已经显示视黄酸信号传导与细胞分化相关 (Appel 和 Eisen,2003, Neuron 40 :461-4)。总之,这些数据表明 59R1 对 PE13 乳瘤细胞中的基因表达具有显著影响,并且可以开始阐明作为所观察到的用 59R1 和紫杉醇组合疗法进行治疗后该肿瘤中癌干细胞频率下降基础的某些机制。

[0464] 在另一实施方式中,使用 PN4 胰腺瘤模型来测试用 59R1 治疗后癌干细胞频率的减少。对 PN4 胰腺瘤用对照抗体、抗 Notch2/3 59R1、吉西他滨或者 59R1 和吉西他滨的组合进行治疗 3 周。抗体以 10mg/kg 每周两次给药,吉西他滨以 50mg/kg 每周两次给药。收获来自各组的肿瘤,并且经处理获得单细胞悬浮液。分离异种移植中的人类肿瘤细胞并对其计数。将滴定的细胞 (30、90 或 210 个细胞) 再注入 NOD-SCID 小鼠 (每组 n = 10)。在第 84 天检测肿瘤生长,由肿瘤获得比率 (tumor take rate) 计算肿瘤起始细胞频率。对照抗体治疗的肿瘤经确定具有 1 : 137 的肿瘤起始细胞频率。用吉西他滨单独治疗将 CSC 频率增加至 1 : 61。相反,用 59R1 进行治疗将 CSC 频率减少至 1 : 281,59R1 加上吉西他滨的组合将 CSC 频率减少至 1 : 675 (图 19C)。单星号表示相对于对照抗体治疗组的统计学显著差异 ($p < 0.05$),双星号表示相对于吉西他滨和对照抗体治疗组的显著差异。

[0465] 在另一实施方式中,使用 PE13 乳瘤模型来测试用 59R5 治疗后癌干细胞频率的减少。对 PE13 乳瘤用对照抗体、抗 Notch2/3 59R5、紫杉醇或者 59R5 和紫杉醇的组合进行治疗 3 周。抗体以 20mg/kg 每周一次给药,紫杉醇以 15mg/kg 每周两次给药。收获来自各组的肿瘤,并且经处理获得单细胞悬浮液。分离异种移植中的人类肿瘤细胞并对其计数。将滴定的细胞 (50、150 或 450 个细胞) 再注入 NOD-SCID 小鼠 (每组 n = 10)。在第 39 天检测肿瘤生长,从肿瘤获得比率 (tumor take rate) 计算肿瘤起始细胞频率。对照抗体治疗的肿瘤经确定具有 1 : 70 的肿瘤起始细胞频率。用紫杉醇单独治疗将 CSC 频率增加至 1 : 30。相反,用 59R5 进行治疗将 CSC 频率减少至 1 : 202,59R5 加上紫杉醇的组合将 CSC 频率减少至 1 : 382 (图 19D)。单星号表示相对于对照抗体治疗组的统计学显著差异 ($p < 0.05$),双星号表示相对于紫杉醇和对照抗体治疗组的显著差异。

[0466] 如其它实验中所观察到的,这些结果表明作为单一试剂,59R1 对 PN4 胰腺瘤的治疗和 59R5 对 PE13 乳瘤的治疗减少 CSC 频率,或 59R1 在分别与吉西他滨或紫杉醇治疗组合时对 PN4 胰腺瘤的治疗和对 PE13 乳瘤的治疗更显著地减少 CSC 频率。相反,用紫杉醇或吉西他滨单独进行治疗,虽然有效地减少肿瘤体积,但是增加了所治疗肿瘤的 CSC 频率,这表明肿瘤起始细胞优先对这些化学治疗剂的作用具有抗性。

[0467] 通过参考方式将以上说明书所提及的所有出版物和专利并入本文。对本领域技术人员而言,对本发明所述方法和系统作出各种改进和变化是显而易见的,且并不背离本发明的范围和精神。虽然已经结合具体实施方式描述了本发明,但应该理解,要求保护的本发明不应不适当地限于所述具体实施方式。实际上,对相关领域技术人员而言显而易见的对用于实施本发明的所述模式作出的各种改进也所附权利要求的范围之内。

[0468] 序列

[0469] 人类抗 Notch2/3 抗体序列

[0470] SEQ ID NO :1 :编码抗 Notch2/3IgG259R1 重链的核苷酸序列,加上信号序列。编码信号序列的序列加下划线。

[0471] ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTCCCTGTCCCAG

[0472] GTGCAATTGGTGGAAAGCGGCGGCCTGGTGCAACCGGGCGGCAGCCTGCGTCTGAGC

[0473] TGCGCGGCCTCCGGATTTACCTTTTCTTCTTCTGGTATGTCTTGGGTGCGCCAAGCCCCCT

[0474] GGGAAAGGTCTCGAGTGGGTGAGCGTTATCGCTTCTTCTGGTAGCAATACCTATTATGCG

[0475] GATAGCGTGAAAGGCCGTTTTACCATTTACGTGATAATTCGAAAAACCCCTGTATCTG

[0476] CAAATGAACAGCCTGCGTGCAGGAAGATACGGCCGTGATTATTGCGCGCGTGGTATTTTTT

[0477] TTTGCTATTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCAGCCAGCACAAAAGGCCCT

[0478] AGCGTCTTCCCTCTGGCTCCCTGCAGCAGGAGCACCAGCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGC

[0479] TGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCTCTG

[0480] ACCAGCGCGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTACAGTCCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGC

[0481] AGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGAT

[0482] CACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAAATGTTGTGTCGAGTGC

[0483] CCACCGTGCCCAGCACACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCTTCCCCCAAAAACCC

[0484] AAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGC

[0485] CACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC

[0486] AAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTTCAGCGTCCCTCACC

[0487] GTTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAAGGC

[0488] CTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAG

[0489] GTGTACACCCTGCCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGC

[0490] CTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCG

[0491] GAGAACAACACTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTAC

[0492] AGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTG

[0493] ATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

[0494] TGA

[0495] SEQ ID NO :16 :抗 Notch2/359R1 IgG2 重链的预测蛋白序列,加上信号序列。所述信号序列加下划线。

[0496] MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIA

[0497] SSGSNTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGIFFAIWGQGLTVTVSSASTKGPSV

[0498] FPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQ

[0499] TYTCNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECPAPPVAVGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP

- [0500] EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQ
- [0501] PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVD
- [0502] KSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
- [0503] SEQ ID NO :3 :编码抗 Notch2/3 59R1 轻链的核苷酸序列,加上信号序列。编码信号序列的序列加下划线。
- [0504] ATGGTGTTCAGACCCAGGTCTTCATTTCTCTGTTGCTCTGGATCTCTGGTGCCTACGGG
- [0505] GATATCGTGCTGACCCAGAGCCCAGGCGACCTGAGCCTGTCTCCGGGCGAACGTGCGACC
- [0506] CTGAGCTGCAGAGCGAGCCAGTCTGTTCTGTTCTAATTATCTGGCTTGGTACCAGCAGAAA
- [0507] CCAGGTCAAGCACCAGCGTCTATTAATTTATGGTGCTTCTTCTCGTGCAACTGGGGTCCCG
- [0508] GCGCGTTTTAGCGGCTCTGGATCCGGCACGGATTTTACCCTGACCATTAGCAGCCTGGAA
- [0509] CCTGAAGACTTTGCGGTTTATTATTGCCAGCAGTATTCTAATTTTCTATTACCTTTGGC
- [0510] CAGGGTACGAAAGTTGAAATTAACCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCG
- [0511] CCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGTGAATAACTTC
- [0512] TATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC
- [0513] CAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTG
- [0514] ACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAG
- [0515] GGCCTGAGCTCGCCCGTCAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG
- [0516] SEQ ID NO :18 :抗 Notch2/3 59R1 轻链的预测蛋白序列,加上信号序列。所述信号序列加下划线。
- [0517] MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSNYLAWYQQKPGQAPRLLIYG
- [0518] ASSRATGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQYSNFPITFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS
- [0519] DEQLKSGTASVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVY
- [0520] ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
- [0521] SEQ ID NO :5 :59R1 重链 CDR1
- [0522] SSSGMS
- [0523] SEQ ID NO :6 :59R1 重链 CDR2
- [0524] VIASSGSNTYYADSVKG
- [0525] SEQ ID NO :7 :59R1 重链 CDR3
- [0526] GIFFAI
- [0527] SEQ ID NO :8 :59R1 轻链 CDR1
- [0528] RASQSVRSNYLA
- [0529] SEQ ID NO :9 :59R1 轻链 CDR2
- [0530] GASSRAT
- [0531] SEQ ID NO :10 :59R1 轻链 CDR3
- [0532] QQYSNFPIT
- [0533] SEQ ID NO :11 :59R1 Fab 的 59R1 轻链 VL 加上信号序列。所述信号序列加下划线。
- [0534] MKKTAAIAIAVALAGFATVAQADIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSNYLAWYQQKPGQAPRLLIY
- [0535] GASSRATGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQYSNFPITFGQGTKVEIKR
- [0536] SEQ ID NO :12 :59R1 Fab 的 59R1 重链 VH 加上信号序列。所述信号序列加下划线。

- [0537] MKQSTIALALLPLLFTPVTKAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSV
- [0538] IASSGSNTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGIFFAIWGQGLVTVSSA
- [0539] SEQ ID NO :13 :59R1 IgG 抗体的 59R1 轻链 VL
- [0540] DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSNYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGVPARFSGSGSGTD
- [0541] FTLTISSLEPEDFAVYYCQQYSNFPITFGQGTKVEIKR
- [0542] SEQ ID NO :14 :59R1 IgG 抗体的 59R1 重链 VH
- [0543] QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYYADSVKGRFTIS
- [0544] RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGIFFAIWGQGLVTVSSA
- [0545] SEQ ID NO :39 :59R1 轻链 VL 加上哺乳动物信号序列 (加下划线)
- [0546] MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSNYLAWYQQK
- [0547] PGQAPRLLIYGASSRATGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQYSNFPITFG
- [0548] QGTKVEIKR
- [0549] SEQ ID NO :40 :59R1 重链 VH 加上哺乳动物信号序列 (加下划线)
- [0550] MKHLWFFLLLVAAPRWLSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAP
- [0551] GKGLEWVSVIASSGSNTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGIF
- [0552] FAIWGQGLVTVSSA
- [0553] SEQ ID NO :15 :编码抗 Notch2/359RGV IgG2 抗体 (59R1 的种系变体) 的重链的核
苷酸序列,加上信号序列。编码信号序列的序列加下划线。
- [0554] ATGAAGCACCTGTGGTCTTTCTGCTGCTGGTCGCCGCTCCTAGATGGGTGCTGTCCGAG
- [0555] GTGCAGCTGGTCGAGTCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCTCCCTGAGACTGTCC
- [0556] TGCGCTGCCTCCGGCTTCACCTTCTCCTCCTCCGGCATGTCCTGGGTGCGCCAGGCTCCC
- [0557] GGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGTCCGTGATCGCCTCCAGCGGCTCCAACACCTACTACGCC
- [0558] GACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGACAACCTCCAAGAACACCCTGTACCTG
- [0559] CAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTA CTACTGCGCCAGGGGCATCTTC
- [0560] TTCGCCATCTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGTCTCCGCTCCACCAAGGGCCCT
- [0561] TCCGTGTTCCCTCTGGCCCCCTTGCTCCCGGTCCACCTCCGAGTCCACCGCCGCTCTGGGC
- [0562] TGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACAGTGTCTGGAACTCTGGCGCCCTG
- [0563] ACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCTGCCGTGTGACAGTCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCC
- [0564] TCCGTGGTGACAGTGCCTTCTCCAACCTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTGGAC
- [0565] CACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGACCGTGGAGCGGAAGTGCTGCGTGGAGTGC
- [0566] CCTCCTTGCCCTGCCCTCCTGTGGCTGGCCCTAGCGTGTCTCTGTTCCCTCCTAAGCCT
- [0567] AAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCC
- [0568] CACGAGGACCCTGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCC
- [0569] AAGACCAAGCCTCGGGAGGAACAGTTCAACTCCACCTTCCGGGTGGTGTCCGTGCTGACC
- [0570] GTGGTGCACAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGCAAAGTCTCCAACAAGGGC
- [0571] CTGCCTGCCCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGACCAAGGGCCAGCCTCGCGAGCCTCAG
- [0572] GTGTACACCCTGCCTCCATCCAGGGAGGAAATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGT
- [0573] CTGGTGAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGTCCAACGGCCAGCCT
- [0574] GAGAACAACCTACAAGACCACCCCTCCTATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTGTAC

- [0575] TCCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTG
- [0576] ATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGAGCCCTGGCAAAG
- [0577] TAG
- [0578] SEQ ID NO :2 :抗 Notch2/3 59RGV (59R1 的种系变体) 的重链的预测蛋白序列, 加上信号序列。所述信号序列加下划线。
- [0579] MKHLWFFLLLVAAPRWLSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIA
- [0580] SSGSNTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGIFFAIWGQGLVTVSSASTKGPSV
- [0581] FPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQ
- [0582] TYTCNVDPKPSNTKVDKTKVERKCCVECPAPPVAVGAPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDP
- [0583] EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQ
- [0584] PREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVD
- [0585] KSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
- [0586] SEQ ID NO :17 :抗 Notch2/3 59RGV 抗体 (59R1 的种系变体) 的核苷酸序列, 加上信号序列。编码信号序列的序列加下划线。
- [0587] ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGCCTACGGC
- [0588] GAGATCGTGCTGACCCAGTCCCCTGCCACACTGAGCCTGAGCCCTGGCGAGAGAGCCACC
- [0589] CTGAGCTGCAGGCGGGCCTCCAGTCCGTGCGGTCCAACACTGCTTGGTATCAGCAG
- [0590] AAACCCGGACAGGCCCTCGGCTGCTGATCTACGGCGCCTCCTCCCGGGCTACCGGCATC
- [0591] CCTGCCCGGTTCTCCGGCTCCGGCAGCGGCACCGACTTACCCTGACCATCTCCTCCCTG
- [0592] GAGCCTGAGGACTTCGCCGTGTA TACTACTGCCAGCAGTACTCCAAC TCCCTATCACCTTC
- [0593] GGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAGCGGACCGTGGCCGCTCCTTCCGTGTTTCATCTTC
- [0594] CCCCCTTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTGCTGCTGAACAAC
- [0595] TTCTACCCTCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAAC
- [0596] TCCCAGGAATCCGTACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCTCCACC
- [0597] CTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCTGCGAGGTGACCCAC
- [0598] CAGGGCCTGTCCAGCCCTGTGACCAAGTCCTTCAACCGGGGCGAGTGCTAG
- [0599] SEQ ID NO :4 :抗 Notch2/359RGV 抗体 (59R1 的种系变体) 的轻链的预测蛋白序列, 加上信号序列。所述信号序列加下划线。
- [0600] MVLQTQVFISLLLWISGAYGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSNYLAWYQQKPGQAPRLLIY
- [0601] GASSRATGIPARFSGSGSGLTFLTITSSLEPEDFAVYYCQQYSNFPITFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP
- [0602] SDEQLKSGTASVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYKHKV
- [0603] YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
- [0604] SEQ ID NO :19 :59RGV 抗体 (59R1 的种系变体) 的 59R1 轻链 VL
- [0605] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSNYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPARFSGSGSGT
- [0606] DFTLTITSSLEPEDFAVYYCQQYSNFPITFGQGTKVEIKR
- [0607] SEQ ID NO :20 :59RGV 抗体 (59R1 的种系变体) 的 59R1 重链 VH
- [0608] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYYADSVKGRFTIS
- [0609] RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGIFFAIWGQGLVTVSSA
- [0610] SEQ ID NO :22 (替代性重链 CDR3)

- [0611] SIFYPT
- [0612] SEQ ID NO :23 (替代性重链 CDR3)
- [0613] SSFFAS
- [0614] SEQ ID NO :24 (替代性重链 CDR3)
- [0615] SSFYAS
- [0616] SEQ ID NO :25 (替代性重链 CDR3)
- [0617] SSFFAT
- [0618] SEQ ID NO :26 (替代性重链 CDR3)
- [0619] SIFYPS
- [0620] SEQ ID NO :27 (替代性重链 CDR3)
- [0621] SSFFAN
- [0622] SEQ ID NO :30 (重链 CDR3 共有序列) :
- [0623] (G/S) (I/S)F (F/Y) (A/P) (I/T/S/N)
- [0624] SEQ ID NO :47 :59R5 轻链核苷酸序列 (不带有信号序列)
- [0625] GACATCGTGCTGACCCAGTCCCCCGCCACACTGTCCCTGTCTCCCGGCGAGAGAGCCACC
- [0626] CTGAGCTGTCCGGCCTCCCAGTCCGTGCGGTCCAACACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAG
- [0627] CCCGGCCAGGCCCTCGGCTGCTGATCTACGGCGCCTCCTCCAGGGCTACCGGCGTGCCT
- [0628] GCCCGGTTCTCCGGCTCCGGCTCTGGCACCAGACTTCACCCTGACCATCTCCAGCCTGGAG
- [0629] CCTGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTACTCCAACCTCCCTATCACCTTCGGC
- [0630] CAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAGCGGACCGTGGCCGCTCCTTCCGTGTTTCATCTTCCCC
- [0631] CCTTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCCTCCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACCTTC
- [0632] TACCCTCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCC
- [0633] CAGGAGTCCGTCAACCAGCAGGACTCCAAGGACTCTACCTACTCCCTGTCTCCACCCTG
- [0634] ACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAG
- [0635] GGCCTGTCTCTCCCGTGACCAAGTCCCTTCAACCGGGGCGAGTGC
- [0636] SEQ ID NO :48 :59R5 重链核苷酸序列 (不带有信号序列)
- [0637] GAGGTGCAGCTGGTTCGAGTCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCTCCCTGAGACTG
- [0638] TCCTGCGCCGCTTCCGGCTTCACTTCTCCTCCAGCGGCATGTCTGGGTGCGCCAGGCA
- [0639] CCTGGCAAAGGACTCGAGTGGGTGTCCGTGATCGCCTCCTCCGGCTCCAACACCTACTAC
- [0640] GCCGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGACAACCTCCAAGAACACCCTGTAC
- [0641] CTGCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACCGCGTGTACTACTGCGCCCGGTCCATC
- [0642] TTCTACACCACCTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGTCTCCGCCTCCACCAAGGGC
- [0643] CCCTCCGTGTTCCCTCTGGCCCTTGTCCCGGTCCACCTCTGAGTCTACCGCCGCTCTG
- [0644] GGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTGTCTGGAACTCTGGCGCC
- [0645] CTGACCTCTGGCGTGACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCTCCGGCTGTACTCCCTG
- [0646] TCCTCCGTGGTGACCGTGCCTTCCCTCCAACCTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTG
- [0647] GACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGACCGTGGAGCGGAAGTGCTGCGTGGAG
- [0648] TGCCCTCCTTGTCTCTCCTCTGTGGCTGGCCCTTCTGTGTTCCCTGTTCCCTCCTAAG
- [0649] CCTAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGACGTG

- [0650] TCCCACGAGGACCCTGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAAC
[0651] GCCAAGACCAAGCCTCGGGAGGAACAGTTCAACTCCACCTTCCGGGTGGTGTCTGTGCTG
[0652] ACCGTGGTGACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAG
[0653] GGCCTGCCTGCCCCTATCGAAAAGACCATCTCTAAGACCAAGGGCCAGCCTCGCGAGCCT
[0654] CAGGTCTACACCCTGCCTCCTAGCCGGGAGGAAATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACC
[0655] TGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGTCTAACGGCCAG
[0656] CCTGAGAACAACACTACAAGACCACCCTCCTATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTG
[0657] TACTCCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCC
[0658] GTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGTCTCCTGGC
[0659] AAG
[0660] SEQ ID NO :49 :59R5 重链
[0661] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYY
[0662] ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSIFYTTWGQGLTLTVSSASTKG
[0663] PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
[0664] SSVVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPK
[0665] PKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVL
[0666] TVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
[0667] CLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
[0668] VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
[0669] SEQ YD NO :50 :59R5 重链可变区
[0670] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYY
[0671] ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSIFYTTWGQGLTLTVSSAST
[0672] SEQ ID NO :51 :59R5 重链 CDR3
[0673] SIFYTT
[0674] SEQ ID NO :52 :变体 59R1 重链可变区
[0675] QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYYADSVKGRFTIS
[0676] RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSIFYPTWGQGLTLTVSSA
[0677] SEQ ID NO :53 :变体 59R1 重链可变区
[0678] QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYYADSVKGRFTIS
[0679] RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSSFFASWGQGLTLTVSSA
[0680] SEQ ID NO :54 :变体 59R1 重链可变区
[0681] QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYYADSVKGRFTIS
[0682] RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSSFYASWGQGLTLTVSSA
[0683] SEQ ID NO :55 :变体 59R1 重链可变区
[0684] QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYYADSVKGRFTIS
[0685] RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSSFFATWGQGLTLTVSSA
[0686] SEQ ID NO :56 :变体 59R1 重链可变区
[0687] QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYYADSVKGRFTIS
[0688] RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSIFYPSWGQGLTLTVSSA

- [0689] SEQ ID NO :57 :变体 59R1 重链可变区
- [0690] QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYYADSVKGRFTIS
- [0691] RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSSFFANWGQGLVTVSSA
- [0692] SEQ ID NO :58 :59R5 重链可变区核苷酸序列 (不带有信号序列)
- [0693] GAGGTGCAGCTGGTTCGAGTCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCTCCCTGAGACTG
- [0694] TCCTGCGCCGCTTCCGGCTTACCTTCTCCTCCAGCGGCATGTCTGGGTGCGCCAGGCA
- [0695] CCTGGCAAAGGACTCGAGTGGGTGTCCGTGATCGCCTCCTCCGGCTCCAACACCTACTAC
- [0696] GCCGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGACAACTCCAAGAACACCCGTGAC
- [0697] CTGCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGACTACTGCGCCCGGTCCATC
- [0698] TTCTACACCACCTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGTCTCCGCCTCCACC
- [0699] SEQ ID NO :59 :59R1 轻链可变区核苷酸序列 (不带有信号序列)
- [0700] GATATCGTGCTGACCCAGAGCCCCGGCGACCCTGAGCCTGTCTCCGGGCGAACGTGCGACC
- [0701] CTGAGCTGCAGAGCGAGCCAGTCTGTTCTAATTATCTGGCTTGGTACCAGCAGAAA
- [0702] CCAGGTCAAGCACCGGTCTATTAATTTATGGTGCTTCTTCTCGTCAACTGGGGTCCCG
- [0703] GCGCGTTTTAGCGGCTCTGGATCCGGCACGGATTTTACCCTGACCATTAGCAGCCTGGAA
- [0704] CCTGAAGACTTTGCGGTTTATTATTGCCAGCAGTATTCTAATTTTCTATTACCTTTGGC
- [0705] CAGGGTACGAAAGTTGAAATTAACGT
- [0706] SEQ ID NO :60 :59R1 重链可变区核苷酸序列 (不带有信号序列)
- [0707] CAGGTGCAATTGGTGAAAGCGGCGGCGCCTGGTGCAACCGGGCGGCAGCCTGCGTCTG
- [0708] AGCTGCGCGCCTCCGGATTTACCTTTTCTTCTTCTGGTATGTCTTGGGTGCGCCAAGCC
- [0709] CCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGTTATCGCTTCTTCTGGTAGCAATACCTATTAT
- [0710] GCGGATAGCGTGAAAGGCCGTTTTACCATTTACGTGATAATTCGAAAAACACCCGTGAT
- [0711] CTGCAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGCCGTGATTATTGCGCGCGTGGTATT
- [0712] TTTTTTGCTATTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCAGCC
- [0713] 人类 Notch 相关序列:
- [0714] SEQ ID NO :21 :Notch2 (EGF 1-12)Fc 融合蛋白氨基酸序列
- [0715] MPALRPALLWALLALWCCAAPAHALQCRDGYEPCVNEGMCVTYHNGTYCKCPEGLGEYCQHRDPCEKN
- [0716] RCQNGGTCVAQAMLGKATCRCASGFTGEDCQYSTSHPCFVSRPCLNGGTCHMLSRDTYECTCQVGTGKEC
- [0717] QWTDACLSHPCANGSTCTTVANQFSCKCLTGFTGQKCEDVNECDIPGHCCQHGGLCLNLPGSYQCQCPQGF
- [0718] TGQYCDSLYVPCAPSPCVNGGTCRQTGDFTFECNCLPGFEGSTCERNIDDCPNHRCQNGGVCVDGVNTYNC
- [0719] RCPQWTGQFCTEDVDECLLQPNACQNGGTCANRNGGYGCVNNGWSGDDCSENIDDCAFASCTPGSTCID
- [0720] RVASFSCMPEGKAGLLCHLDDACISNPCHKGALCDTNPLNGQYICTCPQGYKGADCTEDVDECAMANSNP
- [0721] CEHAGKCVNTDGAHFCECLKGYAGPRCEMDINECHSDPCQNDATCLDKIGGFTCLCMPGFKGVHCELGRAD
- [0722] KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
- [0723] EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV
- [0724] SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHN
- [0725] HYTQKSLSLSPGK
- [0726] SEQ ID NO :28 (人类 Notch2 的 EGF10 内的 59R1 结合位点的潜在组成):HKGAL
- [0727] SEQ ID NO :29 (与人类 Notch2EGF10 内的 59R1 结合位点的潜在组成相对应的人类

Notch3EGF9 内的位点):HEDA1

- [0728] SEQ ID NO :45 :hNotch1
- [0729] 氨基酸 1 至 1732 胞外域, (加下划线)
- [0730] 氨基酸 372 至 414EGF 重复 10 (双下划线并且斜体)
- [0731] MPPLLAPLLCLALLPALAARGPRCSQPGETCLNGGKCEAANGTEACVCGGAFVGPQRCDPNPCLSTPCKNA
- [0732] GTCHVVDRRGVADYACSCALGFSGLCLTPLDNACLTNPCRNGGTCDLLTLTEYKCRCPPGWSGKSCQQAD
- [0733] PCASNPCANGGQCLPFEASYICHCPPSFHGPTCRQDVNECGQKPGLCRHGGTCHNEVGSYRCVCRATHTGP
- [0734] NCERPYPVPCSPSPCQNGGTCTRPTGDTVTHEACPLPGFTGQNCENIDDCPGNNCKNGGACVDGVNTYNCRCP
- [0735] PEWTGQYCTEDVDECQLMPNACQNGGTCHNTHGGYNCVNVNGWTGEDCSENIDDCASAACFHGATCHDRVA
- [0736] SFYCECPHGRTGLLCH *LNDACISNPCNEGSNCDTNPVNGKAICTCPSGYTGPAQSQDVD* ECISLGANPCEHA
- [0737] GKCINTLGSFECQCLQGYTGPRCEIDVNECVSNPCQNDATCLDQIGEFQCI CMPGYEGVHCEVNTDECASS
- [0738] PCLHNGRCLDKINEFQCEPTGFTGHLQCYDVDECASTPCKNGAKCLDGPNTYTCVCTEGYTGTHCEVDID
- [0739] ECDPDPCHYGSKDGVATFTCLCRPGYTGHHCEETNINECSSQPCRHHGGTCQDRDNAYLCFCLKGTTGPNCE
- [0740] INLDDCASSPCDSGTCLDKIDGYECACEPGYTGSMCNINIDECAGNPCHNGGTCEDEINGFTCRCPEGYHD
- [0741] PTCLSEVNECNSNPCVHGACRDSLNGYKCDPVGSGTNCIDINNECESNPCVNGGTCKDMTSGYVCTCRE
- [0742] GFSGPNCQTNINECASNPCLNQGTCIDDVAGYKCNCLLPYTGATCEVVLAPCAPSPCRNGGECRQSEDIYES
- [0743] FSCVCPTGWQGGTCEVDINECVLSPCRHGASCQNTGGYRCHCQAGYSGRNCEIDDCRPNPCHNGGSCT
- [0744] DGINTAFCDCLPGFRGTFCEEDINECASDPCRNGANCTDCVDSYCTCPAGFSG IHCENTPDCTESSCFN
- [0745] GGTCVDGINSFTCLCPPGFTGSYQCQHDVNECDSQPCLHGGTCQDGGCSYRCTCPQGYTGPNQNLVHWCDS
- [0746] SPCKNGGKCVQTHQYRCECPSGWTGLYCDVPSVSCEVAAQRQGVVARLCQHGGLCVDAGNTHHCRCQAG
- [0747] YTGSYCEDLVDECSPSPCQNGATCTDYLGYSCKCVAGYHGVNCSSEIDECLSHPCQNGGTCLDLNPTYKC
- [0748] SCPRGTQGVHCEINVDCCNPPVDPVSRSPKCFNNGTCVDQVGGYSCTCPPGFVGERCEGDVNECLSNPCDA
- [0749] RGTQNCVQRVNDHFCECRAGHTGRRCESVINGCKGKPKNGGTCAVASNTARGFICKCPAGFEGATCENDA
- [0750] RTCGSLRCLNNGGTCSGPRSPPTCLCLGPFTGPECQFPASSPCLGGNPCYNQGTCEPTSESPFYRCLCPAKF
- [0751] NGLLCHI IDYSFGGGAGRDIPPLIEEACELPECQEDAGNKVCSLQCNNHACGWDGGDCSLNFNDPWKNCT
- [0752] QSLQCWKYFSDGHCDSSQNSAGCLFDGFDQRAEQCNPLYDQYCKDHFSDGHCDQGCNSAECEWDGLDCA
- [0753] EHVPERLAAGTLVVVVLMPPEQLRNSSFHFLRELSRVLHTNVVFKRDAHGGQMIFFPYYGREEELRKHP IKR
- [0754] AAEGWAAPDALLGQVKASLLPGGSEGRRRRELDPMDVRGSI VYLEIDNRQCVQASSQCFQSATDVA AFLG
- [0755] ALASLGS LNIPYKIEAVQSE'TVEPPPPAQLHFMYVAAA FVLLFFVCGVLLSRKRRRQHGQLWFPEGFV
- [0756] SEASKKKRREPLGEDSVGLKPLKNASD GALMDDNQNEWGDEDELETKKFRFEEPVVL PDLDDQTDHRQWTQQ
- [0757] HLDAADLRMSAMAPTPPQGEVDADCMDVNVVRGPDGFTPLMIASCSGGGLETGNSEEEEDAPAVISDFIYQG
- [0758] ASLHNQTDRTGETALHLAARYSRSDAAKRLLEASADANIQDNMGRTP LHAAVSADAQGVFQILIRNRATDL
- [0759] DARMHDGTTPLILAARLAVEGMLEDLINSHAEVNAVDDLKGSALHWA AVNVDAAVLLKNGANKDMQNN
- [0760] REETPLFLAAREGSYETAKVLLDHFANRDI TDHMDRLPRDIAQERMHHDIVRLLDEYNLVRSPQLHGAPLG
- [0761] GTPTLSPPLCSPNGYLGS LKPGVQGGKVKRKPSSKGLACGSKEAKDLKARRKKSQDGKGLLDSSGMLSPVD
- [0762] SLESPHGYLSDVASPPLLPSPFQSPSVPLNHLPGMPDTHLGI GHLNVAAPKEMAALGGGGRLAFETGPPR
- [0763] LSHLPVASGTSTVLGSSSGALNFTVGGSTSLNGQCEWLSRLQSGMVPNQYNPLRGSVAPGPLSTQAPSLQ
- [0764] HGMVGPLHSSLAASALSQMSYQGLPSTRLATQPHLVQTQQVQPQNLQMQQQNLQPANIQQQQSLQPPPPP
- [0765] PQPHLVGSSAASGHLGRSFLSGEPSQADVQPLGPSSLAVHTILPQESPALPTSLPSSLVPPVTAQAFLTPP

- [0766] SQHSYSSPVDNTPSHQLQVPEHPFLTPSPESPDQWSSSSPHSNVSDWSEGVSSPPTSMQSQIARIPEAFK
- [0767] SEQ ID NO :31 :人类 Notch2
- [0768] 氨基酸 1 至 1677 :胞外域 (加下划线)
- [0769] 氨基酸 375 至 417 :EGF 重复 10 (双下划线并且斜体)
- [0770] MPALRPALLWALLALWLCCAAPAHALQCRDGYEPCVNEGMCVTYHNGTG YCKCPEGFLGEYQCHRDPCEKN
- [0771] RCQNGGTCVAQAMLGKATCRCASGFTGEDCQYSTSHPCFVSRPCLNGGTCHMLSRDTYECTCQVGFTGKEC
- [0772] QWTDACLSHPCANGSTCTTVANQFCKCLTGFTGQKCETDVNECDIPGHCQHGGTCLNLPGSYQCQCPQGF
- [0773] TGQYCDSLYVPCAPSPCVNGGTCRQTGDFTFECNCLPGFEGSTCERNIDDCPNHRCQNGGVCVDGVNTYNC
- [0774] RCPPQWTGQFCTEDVDECLLQPNACQNGGTCANRNGGYGCVCVNGWSGDDCSENIDDCAFASCTPGSTCID
- [0775] RVASFSCMCPEGKAGLLCH *LDDACISNPCHKGALCDTNPLNGOYICTCPQGYKGADCTEDVD* ECAMANSNP
- [0776] CEHAGKCVNTDGAHFCECLKGYAGPRCEMDINECHSDPCQNDATCLDKIGGFTCLCMPGFKGVHCELEINE
- [0777] CQSNPCVNNGQCVDKVNRFQCLCPPGFTGPVCQIDIDDCSSTPCLNGAKCIDHPNGYECQCATGFTGVLCE
- [0778] ENTDNCDDPDPCHHGQCQDGIDSYTICNPGYMGATCSDQIDECYSSPCLNDGRCIDLVNGYQCNCQPGTSG
- [0779] VNCEINFDDCASNPCTHGICMDGINRYSCVCSPGFTGQRCNIDIDECASNPCRKGATCTINGVNGFRCTCPE
- [0780] GPHHPSCYSQVNECLSNPCTHGNCTGGLSGYKCLCDAGVWGINCEVDKNECLSNPCQNGGTCNDLVNGYRC
- [0781] TCKKGFKGYNCQVNIDECASNPCLNQGTCFDDISGYTCHCVLPYTGKNCQTVLAPCSPNPCENAAVCKESP
- [0782] NFESYTCLCAPGWQQRCTIDIDECTSKPCMNHGLCHNTQGSYMCECPPGFSGMDCEEDIDDCLANPCQNG
- [0783] GSCMDGVNTFSCCLCPGFTGDKCQTDMNECLSEPCKNGGTCSDYVNSYTCKCQAGFDGVHCENINECTES
- [0784] SCFNGGTCVDGINSFSCLCPVGFTGSFLHEINECSSHPCLNEGTCVDGLGTYRCSCPLGYTGKNCQTLVN
- [0785] LCSRSPCKNKGTCVQKKAESQCLCPSGWAGAYCDVNVSCDIAASRRGVLVEHLCQHSGVCTINAGNTHYQC
- [0786] CPLGYTGSYCEEQLDECASNPCQHGATCSDFIGGYRCECVPGYQGVNCEYEVEDECQNPQNGGTCIDLVN
- [0787] HFKCSCPPGTRGLLCEENIDDCARGPHCLNGGQCMDRIGGYSCRCLPGFAGERCEGDINECLSNPCSSEGS
- [0788] LDCTQLTNDYLCVCRSAFTGRHCETFVDVCPQMPCLNGGTCAVASNMPDGFICRCPGFSGARCQSSCGQV
- [0789] KCRKGEQCVHTASGPRCFPSPRDCESGCASSPCQHGGSCHPQRQPPYYSQCAPPFSGSRCELYTAPPST
- [0790] PPATCLSQYCADKARDGVCEACNSHACQWDGGDCSLTMENPWANCSSPLPCWDYINNQCDELNTVECLF
- [0791] DNFECQGNSKTCKYDKYCADHFKNHCDQGCNSEECGWDGLDCAADQPENLAEGTLVIVVLMPEQLLQDA
- [0792] RSPLRALGTLLHTNLRIRKRSQGELMVYPYGEKSAAMKKQRMTRRSLPGEQEVEVAGSKVFLEIDNRQCV
- [0793] QDSDHCFKNTDAAAALLASHATQGTLSYPLVSVVSESLTPERTQLLYLLAVAVVILFILLGVIMAKRRR
- [0794] KHGSLWLPEGFTLRRDASNHRREPVGQDAVGLKNLSVQVSEANLIGTGTSEHWVDDEGPQPKKVAEDEA
- [0795] LLSEEDDPIDRRPWTQQHLEAADIRRTPSLALTPPQAEQEVLDVNVVRGPDGCTPLMLASLRGGSSDLS
- [0796] EDEDAEDSSANIITDLVYQGASLQAQTDRTGEMALHLAARYSRADAAKRLLDAGADANAQDNMGRCLHAA
- [0797] VAADAQGVFQILIRNRVTDLDARMNDGTTPLILAAARLAVEGMVAELINCQADVNAVDDHGKSALHWAAVN
- [0798] NVEATLLLLKNGANRDMQDNKEETPLFLAAREGSYEAAILLDHFANRDTDHMDRLPRDVARDRMHHDIV
- [0799] RLLDEYNVTPSPPGTVLTSALSPVICGPNRSFLSLKHTPMGKKSRRPSAKSTMP TSLPNLAKEAKDAKGSR
- [0800] RKKSLSEKVQLESESVTLSPVDSLESPTHYVSDTTSSPMITSPGILQASPNMLATAAPPAPVHAQHALS
- [0801] SNLHEMQPLAHGASTVLPVSQQLSHHHIVSPGSGSAGSLRSLHPVVPADWMMNRMEVNETQYNEMFGMVL
- [0802] APAEGTHPGIAPQSRPPEGKHITTPREPLPIIVTFQLIPKGSIAQPAGAPQPQSTCPPAVAGPLPTMYQIP
- [0803] EMARLPSVAFPTAMMPQQDGQVAQTILPAYHPFPASVGKYPTPPSQHSYASSNAAERTPSHSHGLQGEHPY
- [0804] LTPSPESPDQWSSSSPHSASDWSVDTTSPTPGGAGGGQRGPGTHMSEPPHNMQVYA

- [0805] SEQ ID NO :32 :人类 Notch3
- [0806] 氨基酸 1 至 1640 :胞外域 (加下划线)
- [0807] 氨基酸 351 至 393 :EGF 重复 9 (双下划线并且斜体)
- [0808] MGPARGRRRRRRRMSPPPPPPVRLPLLLLLAGPGAAAPPCLDGLSPCANGGRCTQLPSREAACLPPGW
- [0809] VGERCQLEDPCHSGPCAGRGVCQSSVVAGTARFSCRCRGRFRGPDCLPCLSSPCAHGARCSVGPDRF
- [0810] LCSCPPGYQGRSCRSDVDECRVGEPCRHHGTCLNTPGSFRCCPAGYTGPLCENPAVPCAPSPCRNGGTCR
- [0811] QSGDLTYDCACLPGFEGQNCENVDDCPGHRCLNGGTCVDGVNTYNCQCPPEWTGQFCTEDVDECQLQPN
- [0812] CHNGGTCFNTLGGHSCVCVNGWTGESCSQNTIDDCATAVCFHGATCHDRVASFYCACPMGKTGLLCH *LDDAC*
- [0813] *VSNPCHEDAICDTNPVNGRAICTCPPPGFTGGACDQD*VD ECSIGANPCEHLGRCVNTQGSFLCQCGRGYTGP
- [0814] RCETDVNECLSGPCRNQATCLDRIGQFTCTCMAGFTGTGYCEVDIDECCQSSPCVNGGVCKDRVNGFSCTCPS
- [0815] GFSGSTCQLDVDECASTPCRNGAKCVDQPDGYECRAEGFEGTLCDRNVDDCSPDPCHHGRCVDGIASFSC
- [0816] ACAPGYTGTRCESQVDECRSQPCRHHGKCLDLVDKYLRCRPSGTTGVNCEVNIDDCASNPTFGVCRDGIN
- [0817] RYDCVCQPGFTGPLCNVEINECASSPCGEGGSCVDGENGFRCLCPPGSLPPLCLPPSHPCAHEPCSHGICY
- [0818] DAPGGFRVCCEPGWSGPRCSQSLARDACESQPCRAGGTCSSDGMGFHCTCPPGVQGRQCELLSPCTPNPCE
- [0819] HGGRCESAPGQLPVCSCPQGWQGRPCQDQDVEDECAGPAPCGPHGICTNLGFSFCTCHGGYTGPSCDQDIND
- [0820] CDPNPCLNGGSCQDGVGFSFSCSLPGFAGPRCARDVDECLSNPCGPGTCTDHVASFTCTCPPGYGGFHCEQ
- [0821] DLPDCSPSSCFNGGTCVDGVNSFSLCRPGYTGAHCQHEADPCLSRPCLHGGVCSAAHPGRFCTCLESFTEG
- [0822] PQCQTLVDWCSRQPCQNGGRVCQTGAYCLCPPGWSGRLCDIRSLPCREAAAQIGVRLEQLCQAGGQCVDED
- [0823] SSHVCVCEPGRGTSHCEQEVDPCLAQPCQHGGTCRGYMGGYMCECLPGYNGDNCEDDVDECASQPCQHGGSS
- [0824] CTDLVARYLCSCPPGTGLVLCENEDDCGPGPPLDSGPRCLHNGTCVDLVGGFRCTCPPGYTGLRCEADIN
- [0825] ECRSGACHAAHTRDCLQDPGGGFRCLCHAGFSGPRCQTVLSPCESQPCQHGGQCRPSPGGGGLTFTCHCA
- [0826] QPFWGPCCERVARSCRELQCPVGVPCQQTTPRGPRCACPPGLSGPSCRSFPGSPPGASNASCAAAPCLHGGSS
- [0827] CRPAPLAPFFRCACAQGTGPRCEAPAAAEVSEEPRCPRACQAKRGDQRCDRECNSPGCGWDGGDCSLS
- [0828] VGDPWRQCEALQCWRLFNNRCDPACSSPACLYDNFDCHAGGRERTCNPVYEKCADHFADGRCDQGCNTE
- [0829] ECGWDGLDCASEVPALLARGVLVLTVLLPPEELLRSSADFLQRLSAILRSLRFRLDAHQAAMVFPYHRPS
- [0830] PGSEPRARRELAPEVIGSVVMLEIDNRLCLQSPENDHCFPDAQSAADYLGALSAVERLDFPYPLRDVRGEP
- [0831] LEPPEPSVPLPLLVAGAVLLLVLVLVGMVARRKREHSTLWFPEGFSLHKDVASGHKGRREPVGQDALGM
- [0832] KNMAKGESLMGEVATDWMDETEPEAKRLKVEEPMGAEAEVDCRQWTQHHLVAADIRVAPAMALTPPQGD
- [0833] DADGMDVNVVRGPDGFTPLMLASFCCGALEPMPTEEDEADDTASIIISDLICQGAQLGARTDRTGETALHLA
- [0834] ARYARADAAKRLLDAGADTNAQDHSGRTPHTAVTADAQGVFQILIRNRSTDLARMADGSTALILAARLA
- [0835] VEGMVEELIASHADVNAVDELGKSALHWAANNVEATLALLKNGANKDMQDSKEETPLFLAAREGSYEA
- [0836] KLLLDHFANREITDHLDRLPDVAQERLHQDIVRLLDQPSGPRSPPGPHGLGPLLCPGAFPLPGLKAAQSG
- [0837] SKKSRRPPGKAGLGPQGRGRGKLTLCAPGLADSSVTLSPVDSLSPRPFPGPPASPGGFPLEGPYAAA
- [0838] TATAVSLAQLGGPGRAGLGRQPPGGCVLSLGLLNPVAVPLDWARLPPPAPPGPSFLLPLAPGPQLLNP
- [0839] VSPQERPPPYLAVPGHGEYVAGAHSSPPKARFLRVPSEHPYLTPSPESPEHWASPPPSLSDWSESTPS
- [0840] PATATGAMATTTGALPAQPLPLSVSSLAQAQTQLGPQPEVTPKRQVLA
- [0841] SEQ ID NO :46 :hNotch4
- [0842] 氨基酸 1 至 1444 胞外域 (加下划线)
- [0843] 氨基酸 392 至 434EGF 重复 10 (双下划线并且斜体)

- [0844] MQPPSLLLLLLLLLLLLCVSVVRPRGLLCGSFPEPCANGGTCLSLSLGQGTCCAPGFLGETCQFPDPCQNA
- [0845] QLCQNGGSCQALLPAPLGLPSSPSPLTPSFLCTCLPGFTGERCQAKLEDPCPPSFCSKRGRCHIQASGRPQ
- [0846] CSCMPGWTGEQCQLRDFCSANPCVNGGVCLATYPQIQCHCPPGFEGHACERDVNECFQDPGPCPKGTSCHN
- [0847] TLGSFQCLCPVQGEGPRCELRAGPCPPRGCSNGGTCQLMPEKDSTFHLCLCPPGFIGPDCEVNPDCVSHQ
- [0848] CQNGGTCQDGLDITYTCLCPETWTGWDCSEDVDECETQPPHCRNGGTCQNSAGSFHCVCVSWGWTSCSEN
- [0849] LDDCIAATCAPGSTCIDRVGSFSCLCPPGRTGLLCH LEDMCLSQPCHGDAQCSTNPLTGSTLCLCQPGYSG
- [0850] PTCHQDLL ECLMAQQGPSPCEHGGSCLNTPGSFNCLCPPGYTGSRCEADHNECLSQPCHPGSTCLDLLATF
- [0851] HCLCPPGLEGLCEVETNECASAPCLNHADCHDLLNGFQCICLPGFSGTRCEEDIDECRSSPCANGGQCQD
- [0852] QPGAFHCKCLPGFEGPRCQTEVDECLSDPCVGASCLDLPGAFFCLCPSGFTGQLCEVPLCAPNLQPKQI
- [0853] CKDQKDKANCLCPDGSPGCAPPEDNCTCHHGHCQRSSCVCDVGTGPECEAELGGCTSAPCAHGGTCYPQP
- [0854] SGYNCTCPTGYTGPTCSEEMTACHSGPLNGGSCNPSGGYYCTCPPSHTGPQCQTSTDYCVSAPCFNGGT
- [0855] CVNRPGTFSCLCAMGFQGRCEGKLRPCADSPCRNRATCQDSPQGPRCLCPTGYTGGSQTLMDLCAQKP
- [0856] CPRNSHCLQTGPSFHCLCLQGWTGPLCNLPLSSCQKAALSQGIDVSSILCHNGGLCVDSGSPYFCHCPPGFQ
- [0857] GSLCQDHVNPCESRPCQNGATCMAQPSGYLCCAPGYDGNCSKELDACQSQPCHNHGTCTPKPGGFHCAC
- [0858] PPGFVGLRCEGDVDECLDQPCHPTGTAAACHSLANAFYCQCLPGHTGQWCEVEIDPCHSQPCFHGGTCEATA
- [0859] GSPLGFICHCPKGFEGPTCSHRAPSCGFHHCHHGGLCLPSPKPGFPPRCACLSGYGGPDCLTPPAPKCGCP
- [0860] PSPCLYNGSCSETTGLGGPGFRCSCHSSPGPRCQKPGAKGCEGRSGDGACDAGCSGPGGNWDGGDCSLGV
- [0861] PDPWKGCPSHSRCWLLFRDGGQCHPQCDSEECLFDGYDCETPPACTPAYDQYCHDFHNGHCEKGCNTAECG
- [0862] WDGGDCRPEDGDPEWGPSLALLVVLSPALDQQLFALARVLSLTLRVGLWVRKDRDRDMVYPYPGARAE
- [0863] KLGGTRDPTYQERAAPQTQPLGKETDSLSAGFVVVMGVDLSRCGPDHPASRCPWDPGLLLRFLAAMAAVGA
- [0864] LEPLLPGLLAVHPHAGTAPPANQLPWPVLCSPVAGVILLALGALLVLQLIRRRRREHGALWLPPGFTRRP
- [0865] RTQSAPHRRRPPLGEDSIGLKALKPKAEVDEDGVVMCSGPEEGEEVGQAEETGPPSTCQLWLSGGCGALP
- [0866] QAAMLTPQESEMEAPDLDRGPDGVTPLMSAVCCGEVQSGTFQGAWLGCPEPWEPLLDGGACPQAHTVGT
- [0867] GETPLHLAARFSRPTAARRLLEAGANPNQPDRAGRTPLHAAVAADAREVCQLLLRSRQTAVDARTEDGTTP
- [0868] LMLAARLAVEDLVEELIAAQADVGARDKWKTALHWAAVNNARAARSLLQAGADKDAQDNREQTPLFLAA
- [0869] REGAVEVAAQLLLGLGAARELRDQAGLAPADVAHQRNHWDLTLLEGAGPPEARHKATPGREAGPFPRARTV
- [0870] SVSVPPHGGGALPRCRTLSAGAGPRGGGACLQARTWSVDLAARGGGAYSHCRSLSGVGAGGGPTPRRRFS
- [0871] AGMRGPRPNPAIMRGRYVAAGRGRVSTDDWPCDWALGACGSASNIPIPPPCLTPSPERGSPQLDCGPP
- [0872] ALQEMPINQGGEGKK
- [0873] SEQ ID NO :33 :编码人类 Notch2EGF 1-12 的多核苷酸序列
- [0874] ATGCCCGCCCTGCGCCCCGCTCTGCTGTGGGCGCTGCTGGCGCTCTGGCTGTGCTGCGCG
- [0875] GCCCCGCGCATGCATTGCAGTGTGAGATGGCTATGAACCCTGTGTAATGAAGGAATG
- [0876] TGTGTTACCTACCACAATGGCACAGGATACTGCAAATGTCCAGAAGGCTTCTTGGGGGAA
- [0877] TATTGTCAACATCGAGACCCCTGTGAGAAGAACCGCTGCCAGAATGGTGGGACTTGTGTG
- [0878] GCCCAGGCCATGCTGGGGAAAGCCACGTGCCGATGTGCCCTCAGGGTTTACAGGAGAGGAC
- [0879] TGCCAGTACTCAACATCTCATCCATGCTTTGTGTCTCGACCCTGCCTGAATGGCGGCACA
- [0880] TGCCATATGCTCAGCCGGGATACCTATGAGTGCACCTGTCAAGTCGGGTTTACAGGTAAG
- [0881] GAGTGCCAATGGACGGATGCTGCTGCTCATCCCTGTGCAAATGGAAGTACCTGTACC
- [0882] ACTGTGGCCAACCAGTTCTCCTGCAAATGCCTCACAGGCTTACAGGGCAGAAATGTGAG

- [0883] ACTGATGTCAATGAGTGTGACATTCCAGGACACTGCCAGCATGGTGGCACCTGCCTCAAC
- [0884] CTGCCTGGTTCCCTACCAGTGCCAGTGCCCTCAGGGCTTACAGGCCAGTACTGTGACAGC
- [0885] CTGTATGTGCCCTGTGCACCCTCACCTTGTGTCAATGGAGGCACCTGTCGGCAGACTGGT
- [0886] GACTTCACTTTTGTAGTGCAACTGCCTTCCAGGTTTTGAAGGGAGCACCTGTGAGAGGAAT
- [0887] ATTGATGACTGCCCTAACCCACAGGTGTCAGAATGGAGGGGTTTGTGTGGATGGGGTCAAC
- [0888] ACTTACAACCTGCCGCTGTCCCCACAATGGACAGGACAGTTCTGCACAGAGGATGTGGAT
- [0889] GAATGCCTGCTGCAGCCCAATGCCTGTCAAAATGGGGGCACCTGTGCCAACCGCAATGGA
- [0890] GGCTATGGCTGTGTATGTGTCAACGGCTGGAGTGGAGATGACTGCAGTGAGAACATTGAT
- [0891] GATTGTGCCTTCGCTCCTGTACTCCAGGCTCCACCTGCATCGACCGTGTGGCCTCCTTC
- [0892] TCTTGCATGTGCCAGAGGGGAAGGCAGGTCTCCTGTGTCACTGTGGATGATGCATGCATC
- [0893] AGCAATCCTTGCCACAAGGGGGCACTGTGTGACACCAACCCCTAAATGGGCAATATATT
- [0894] TGCACCTGCCACAAGGCTACAAAGGGGCTGACTGCACAGAAGATGTGGATGAATGTGCC
- [0895] ATGGCCAATAGCAATCCTTGTGAGCATGCAGGAAAATGTGTGAACACGGATGGCGCCTTC
- [0896] CACTGTGAGTGTCTGAAGGGTTATGCAGGACCTCGTTGTGAGATGGACATCAATGAGTGC
- [0897] CATTGACACCCCTGCCAGAATGATGCTACCTGTCTGGATAAGATTGGAGGCTTCACATGT
- [0898] CTGTGCATGCCAGGTTTCAAAGGTGTGCATTGTGAATTA
- [0899] SEQ ID NO :34 :人类 Notch2 EGF 1-12 多肽序列
- [0900] MPALRPALLWALLALWLCCAAPAHALQCRDGYEPCVNEGMCVTYHNGTGYCKCPEGFLGE
- [0901] YCQHRDPCEKNRCQNGGTCVAQAMLGKATRCASGFTGEDCQYSTSHPCFVSRPCLNGGT
- [0902] CHMLSRDYEECTCQVGFTEGKECQWTDACLSHPCANGSTCTTVANQFSCCKLTGFTGQKCE
- [0903] TDVNECDIPGHQCQHGGLCLNLPQSYQCQCPQGGFTGQYCDLSLYPCAPSPCVNGGTCRQGT
- [0904] DFTFECNCLPGFEGSTCERNIDDCPNHRCQNGGVCVDGVNTYNCRCPPQWTGQFCTEDVD
- [0905] ECLLQPNACQNGGTCANRNGGYGCVVNGWSGDDCSENIDDCAFASCTPGSTCIDRVASF
- [0906] SCMCPEGKAGLLCHLDDACISNPCHKGALCDTNPLNGQYICTCPQGYKGADCTEDVDECA
- [0907] MANSNPCEHAGKCVNTDGAFFHCECLKGYAGPRCEMDINECHSDPCQNDATCLDKIGGFTC
- [0908] LCMPGFKGVHCEL
- [0909] SEQ ID NO :35 :人类 Notch1 EGF10
- [0910] LNDACISNPCNEGSNCDTNPVNGKAICTCPSGYTGPAQSDVD
- [0911] SEQ ID NO :36 :人类 Notch2EGF10
- [0912] LDDACISNPCHKGALCDTNPLNGQYICTCPQGYKGADCTEDVD
- [0913] SEQ ID NO :37 :人类 Notch3EGF9 (EGF9 是人类 Notch3 中的 EGF, 其对应于包括 Notch2 在内的其它 Notch 受体的 EGF10)
- [0914] LDDACVSNPCHEDAICDTNPVNGRAICTCPPGFTGGACDQDVD
- [0915] SEQ ID NO :38 :人类 Notch4EGF10
- [0916] LEDMCLSQPCHGDAQCSTNPLTGSTLCLCQPGYSGPTCHQDL
- [0917] SEQ ID NO :41 :Notch1EGF 重复 4
- [0918] QADPCASNPCANGGQCLPFEASYICHCPPSFHGPTCRQ
- [0919] SEQ ID NO :42 :Notch2EGF 重复 4
- [0920] TDACLSHPCANGSTCTTVANQFSCCKLTGFTGQKCE

[0921] SEQ ID NO :43 :Notch3EGF 重复 4

[0922] SDVDECRVGEPCRHHGTCLNTPGSRFCQCPAGYTGPLCEN

[0923] SEQ ID NO :44 :Notch4EGF 重复 4

[0924] RDFCSANPCVNGGVCLATYPQIQCHCPPGFEGHACER

[0925]

申请人或代理人档案号 2293.049PC03	国际申请号 PCT/US2009/003994
-------------------------	-------------------------

[0926] 关于微生物保藏的说明

[0927] (细则 13 之二)

[0928]

A.对说明书第 9、36 页，第 ____ 行所述的已保藏的微生物或其他生物材料的说明	
B. 保藏事项	更多的保藏在附加页说明 <input type="checkbox"/>
保藏单位名称 美国典型培养物保藏中心	
保藏单位地址 (包括邮政编码和国名) 10801 University Boulevard Manassas Virginia 20110-2209 美国	
保藏日期 2009 年 7 月 6 日	保藏号 PTA-10170
C.补充说明(必要时)	更多信息在附加页中 <input type="checkbox"/>
含有人类 DNA 插入物 59R5 的从大肠杆菌中分离的质粒	
D.本说明是为下列指定国作的(如果说明不是为所有指定国而作的)	
E.补充说明(必要时)	
下列说明将随后向国际局提供(写出说明的类别,例如:“保藏的编号”)	

由受理局填写
<input type="checkbox"/> 本页已经和国际申请一起收到
授权官员 TYETTA STATON

由国际局填写
<input type="checkbox"/> 国际局收到本页日期
授权官员

[0929] PCT/R0/134 表(1998 年 7 月,2004 年 1 月再版)

[0930] 澳大利亚

[0931] 申请人在此提醒,在授予专利权之前、或者本申请失效、被驳回或撤回之前,只向与本发明无利益关联的本领域收信人提供微生物样品(澳大利亚专利细则的细则 3.25(3))。

[0932] 加拿大

[0933] 申请人在此要求,在已经基于本申请授予加拿大专利权,或本申请被驳回、或放弃并且不再进行恢复,或撤回之前,只向专利委员会指定的独立专家提供本申请涉及的保藏的生物材料样品。

[0934] 克罗地亚

[0935] 申请人在此要求,在本申请公开和授予专利权之前,应该只对独立专家提供本申请涉及的保藏的生物材料样品。只有请求所保藏生物材料样品的人承诺以下条款,才能够获得该样品:在专利有效期间,不得将该生物材料或其衍生的任何材料提供给第三方、不得将该生物材料或其衍生的任何材料用于实验目的或研究目的之外,除非适用时申请人或专利权人明确放弃该承诺。

[0936] 丹麦

[0937] 申请人在此要求,除非本申请已经对公众查阅(通过丹麦专利局)公开,或由丹麦专利局最终决定不对公众查阅公开,只对本领域专家提供该样品。第三方提出的供应样品的任何请求应该指定要使用的专家。该专家可以是进入丹麦专利局起草承认的专家名单中的任何人,或在个案中申请人批准的任何人。

[0938] 芬兰

[0939] 申请人在此要求,除非已经由芬兰国家专利与注册委员会授予专利权公开,或如果芬兰国家专利与注册委员会最终决定不对本申请授予专利权则从申请日起 20 年,只对本领域专家提供该样品。第三方提出的供应样品的任何请求应该指定要使用的专家。该专家可以是进入芬兰国家专利与注册委员会起草承认的专家名单中的任何人,或在个案中申请人批准的任何人。

[0940] 德国

[0941] 申请人在此要求,除非授予专利权或如果本申请被驳回或撤回则从申请日起 20 年,只对申请人指定的独立专家提供样品。

[0942] 冰岛

[0943] 申请人在此要求,除非授予专利权或冰岛专利局作出最终决定本申请不授予专利权,只对本领域专家提供样品。第三方提出的供应样品的任何请求应该指定要使用的专家。该专家可以是进入冰岛专利局起草承认的专家名单中的任何人,或在个案中申请人批准的任何人。

[0944] 挪威

[0945] 申请人在此要求,除非本申请已经对公众查阅(通过挪威专利局)公开,或由挪威专利局最终决定不对公众查阅公开,只对本领域专家提供该样品。第三方提出的供应样品的任何请求应该指定要使用的专家。该专家可以是进入挪威专利局起草承认的专家名单中的任何人,或在个案中申请人批准的任何人。

[0946] 新加坡

[0947] 申请人在此要求,只对专家提供微生物样品。

[0948] 西班牙

[0949] 申请人在此要求,除非授予西班牙专利权公开或如果本申请被驳回或撤回则从申请日起 20 年,关于样品问题,按照西班牙专利法第 45 条的规定只对独立专家提供生物材料。

[0950] 瑞典

[0951] 申请人在此要求,除非由瑞典专利和注册局授予专利权或作出最终决定本申请不授予专利权,只对本领域专家提供样品。同样情况还适用于从申请日起 20 年内本申请被驳

回或撤回。

[0952] 瑞士

[0953] 申请人在此要求,对第三方提供样品必须满足条件该第三方向保藏机构表明其名称和向保藏人信息目的的地址,并且承诺:(a)不得将保藏的培养物或从其衍生的培养物提供给第三方;(b)不得非法使用培养物;(c)如有争议,提出未违反条款(a)和(b)的义务的证据。

[0954] 前南斯拉夫马其顿共和国

[0955] 申请人在此要求,对第三方提供样品必须满足条件该第三方:(a)具有要求提供活生物或微生物材料样品的权利;(b)承诺保证在指定的专利有效期过期之前,未经申请人批准,不得将活生物或微生物材料样品提供给第三方。

[0956] 联合王国

[0957] 申请人在此要求,只对本领域专家提供微生物样品。

[0958] 欧洲专利局

[0959] 申请人在此要求,除非授予欧洲专利权公开或如果本申请被驳回或撤回则从申请日起20年,关于样品的问题,根据EPC细则28(3)的规定,只对请求方指定的专家提供生物材料(EPC细则28(4))。

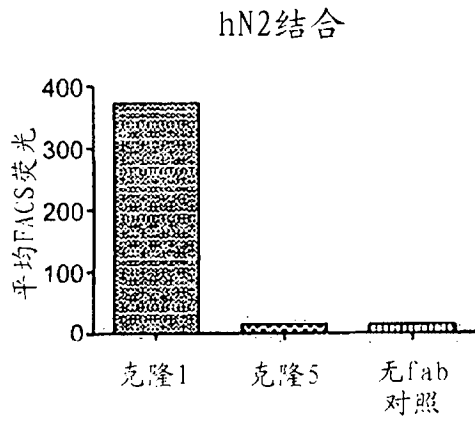


图 1A

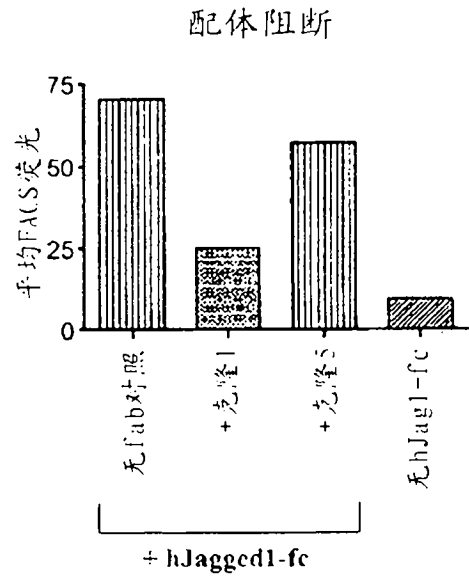


图 1B

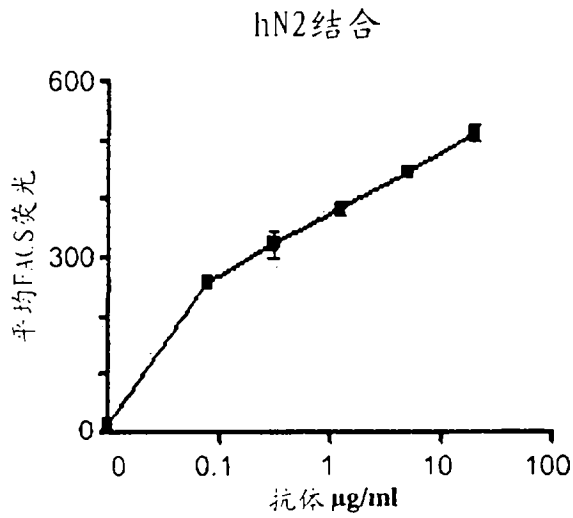


图 1C

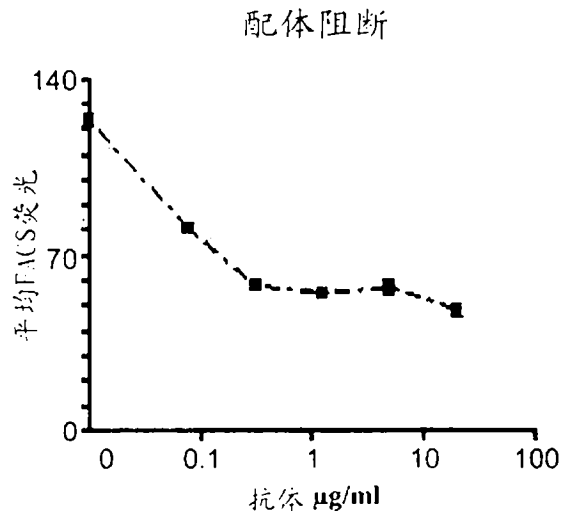


图 1D

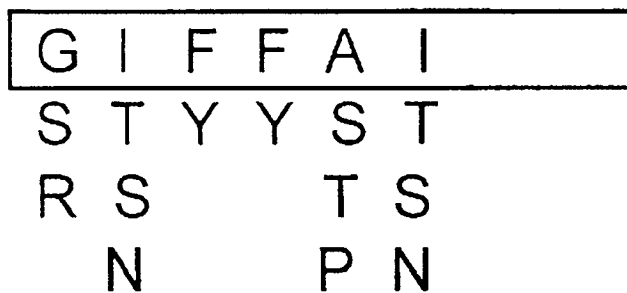


图 1E

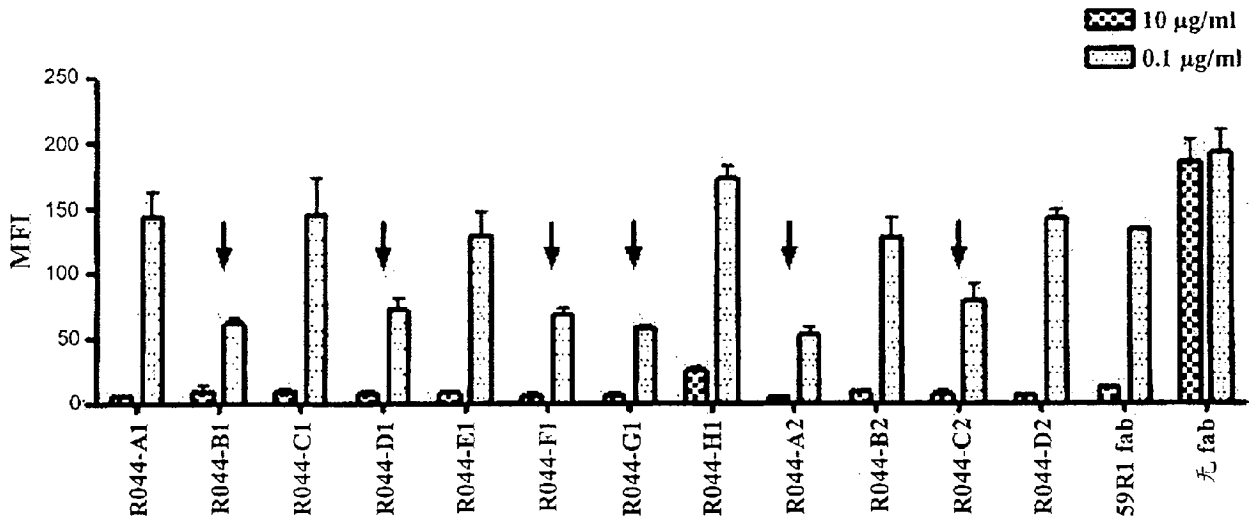


图 1F

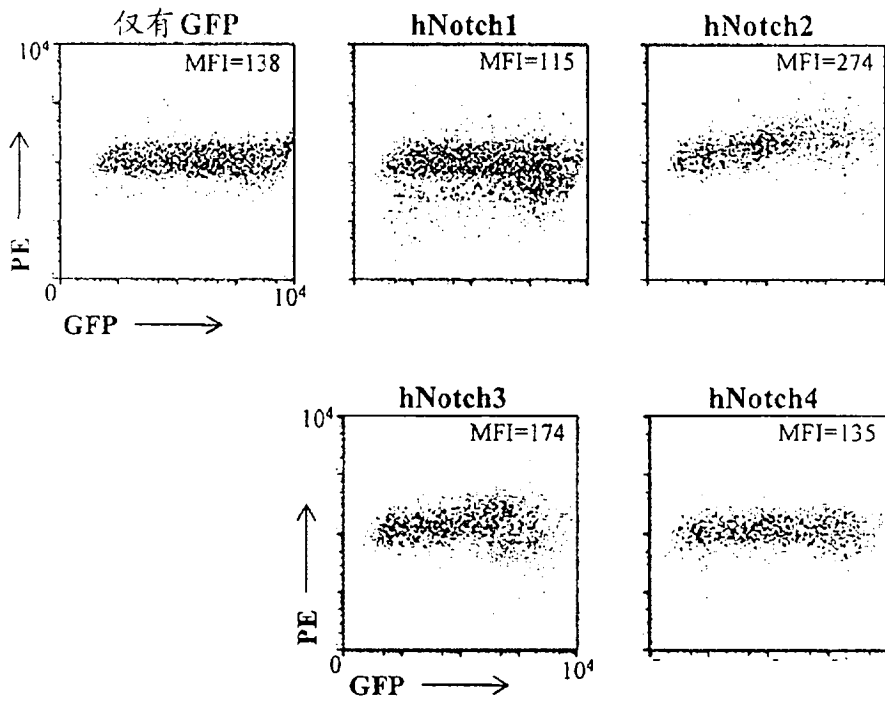


图 2

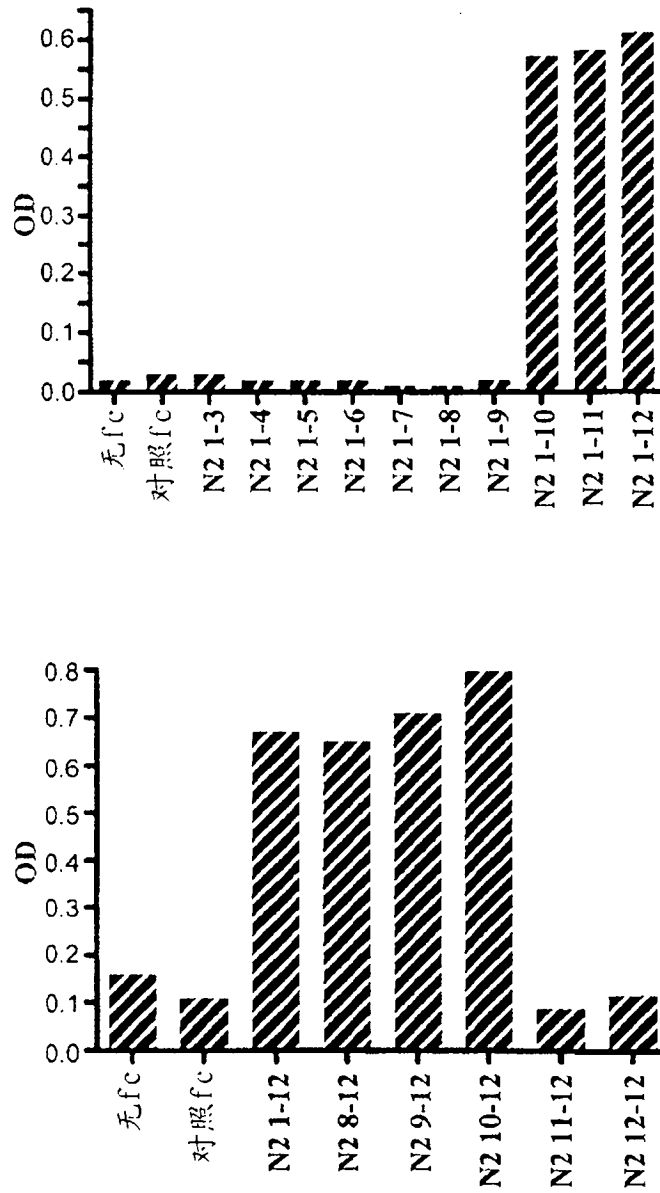


图 3A

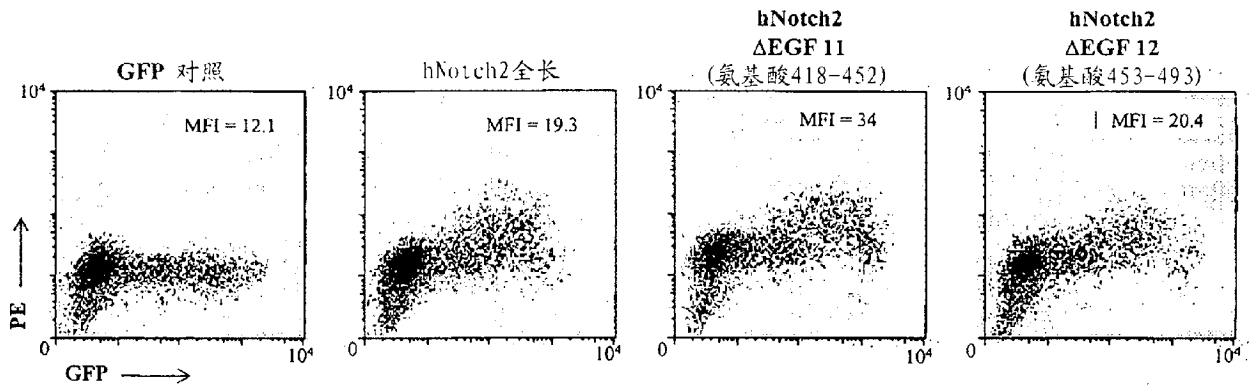


图 3B

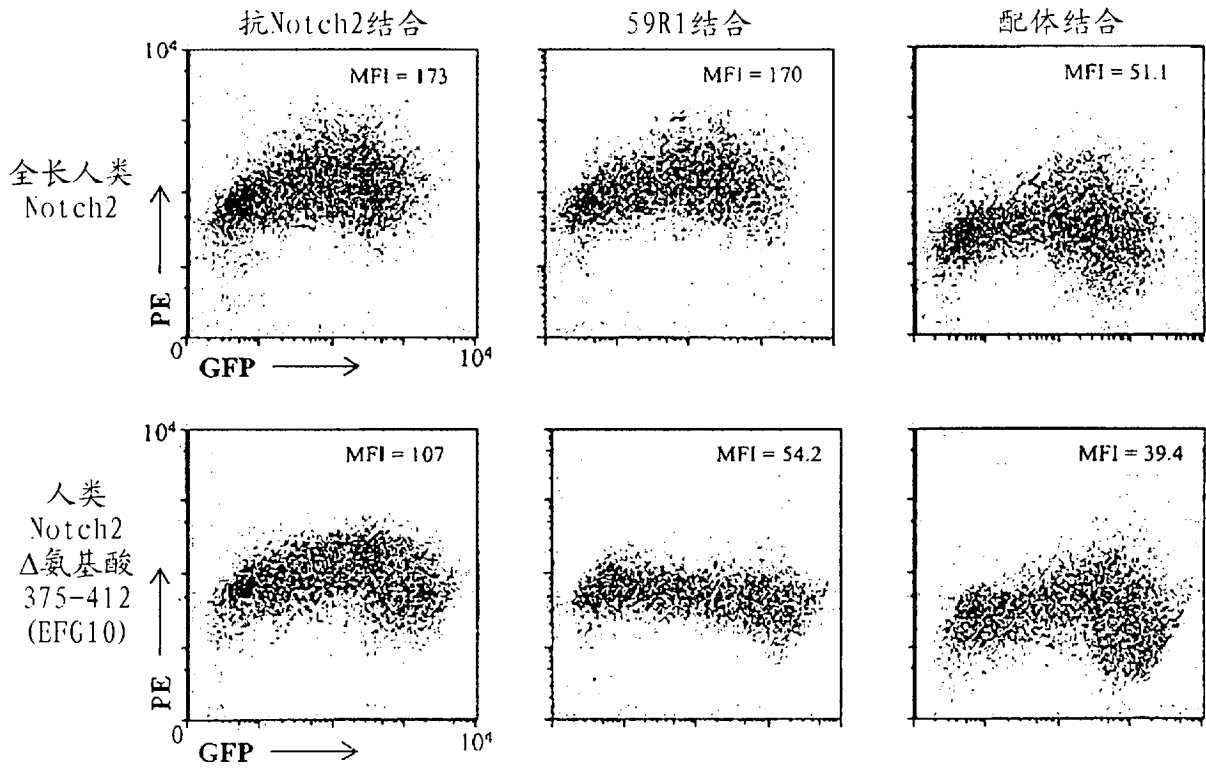


图 3C

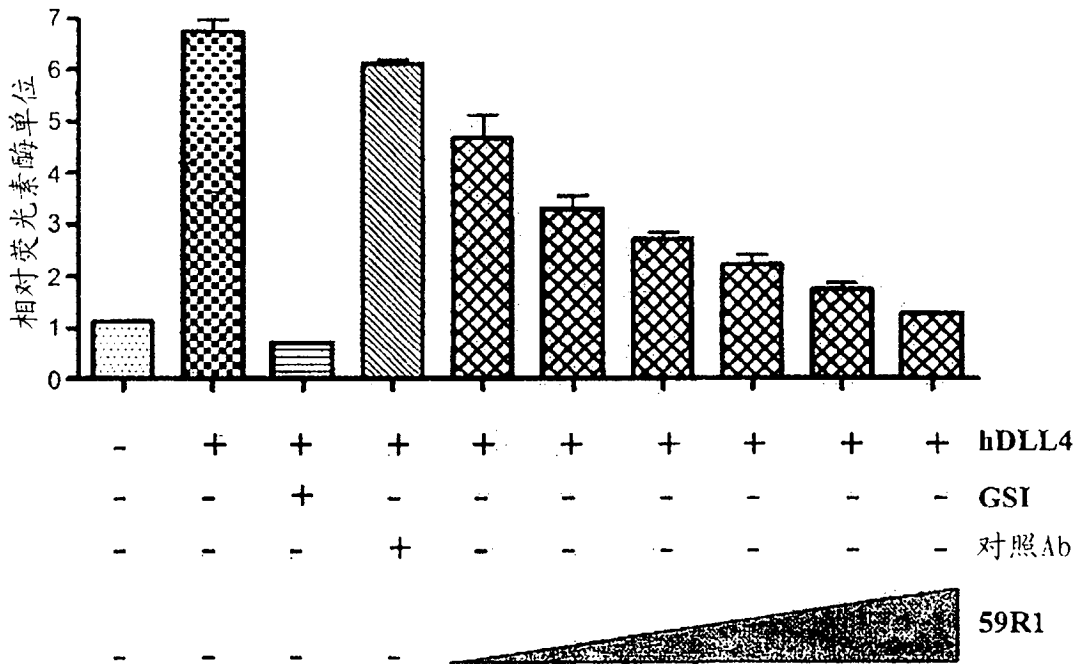


图 4A

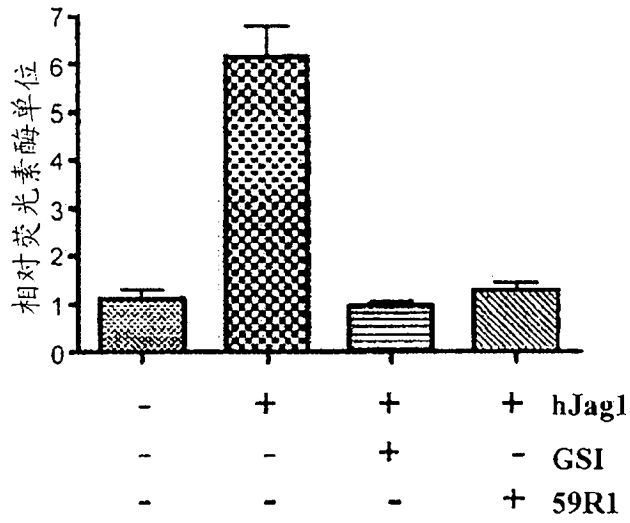


图 4B

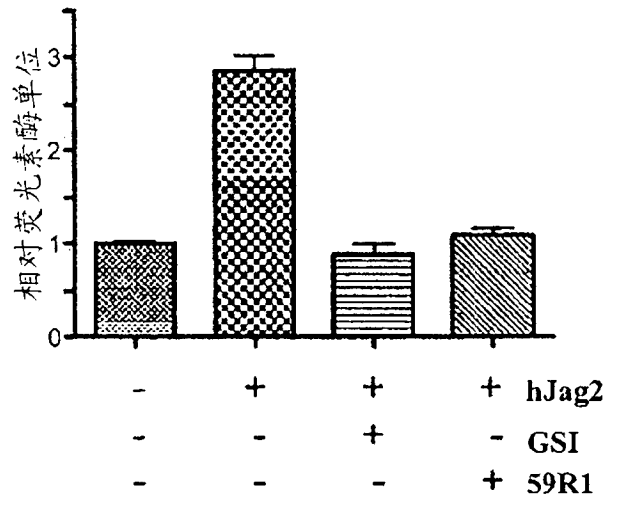


图 4C

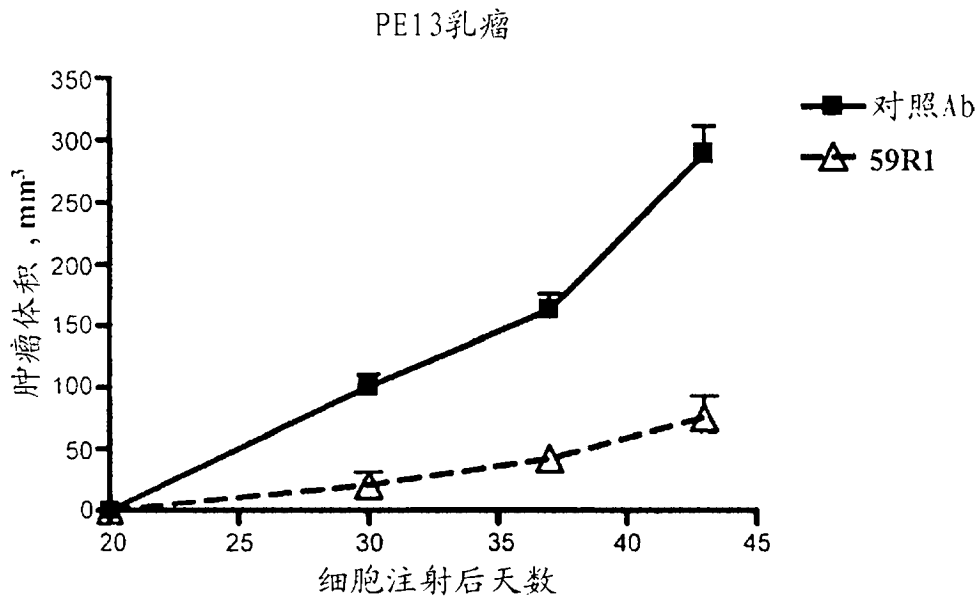


图 5A

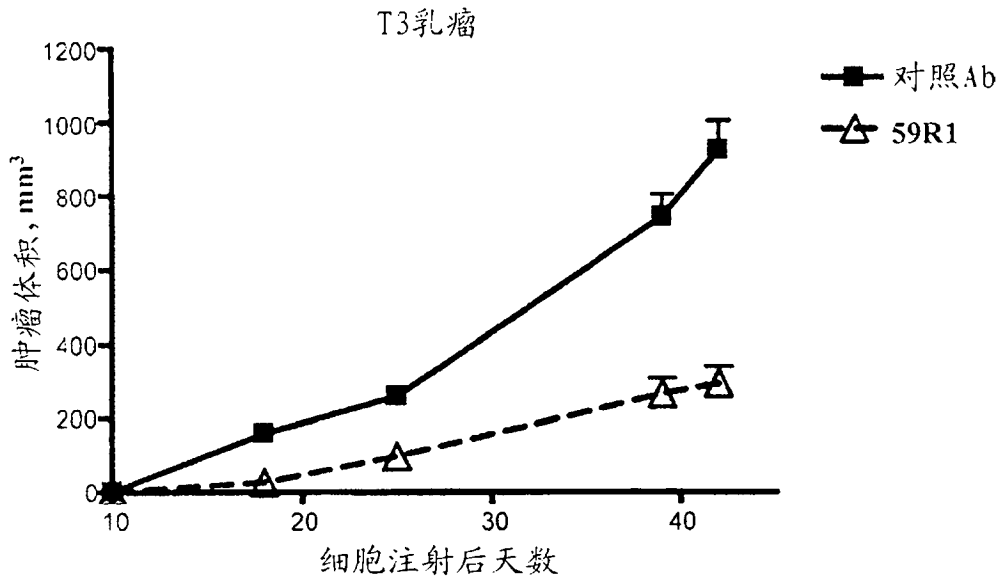
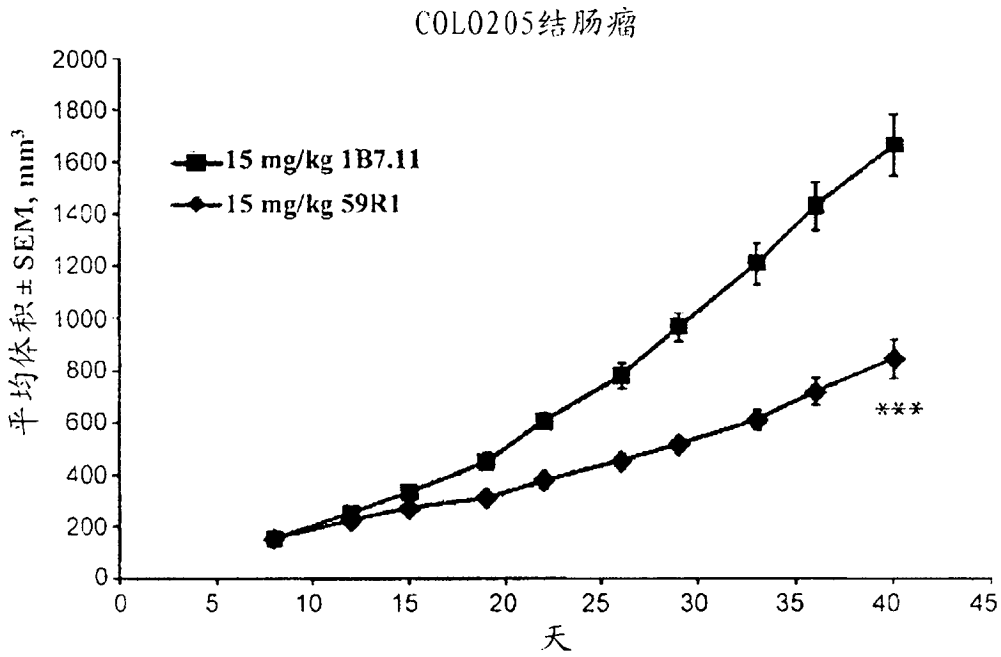


图 5B



*** p < 0.001, 59R1 相对于 1B7.11

图 5C

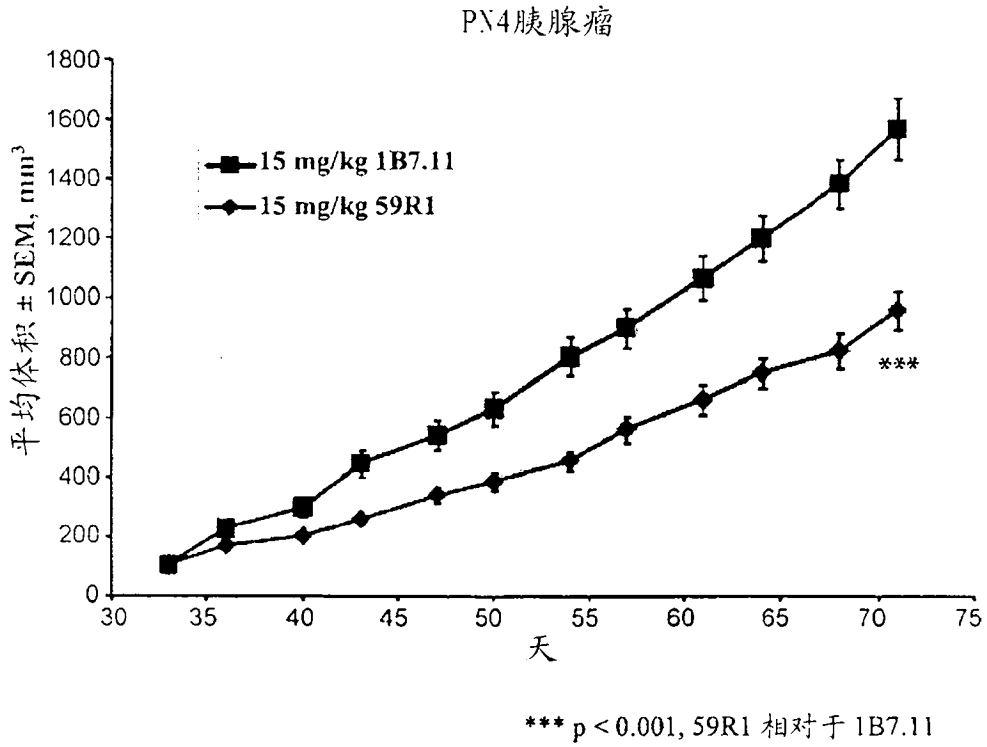


图 5D

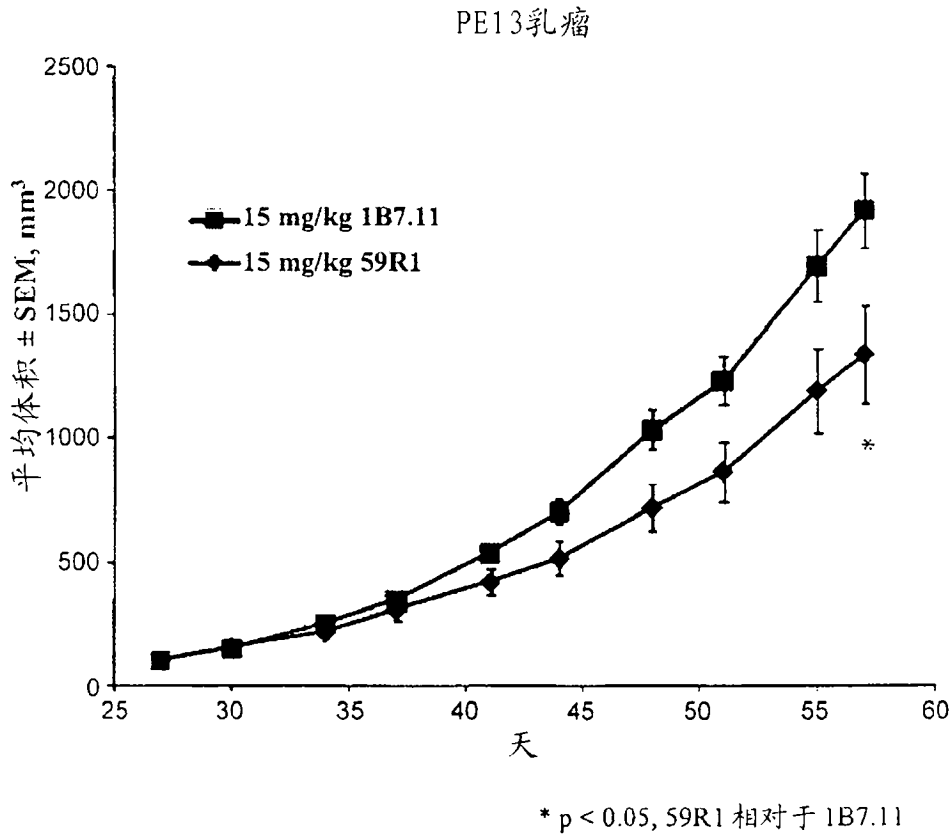
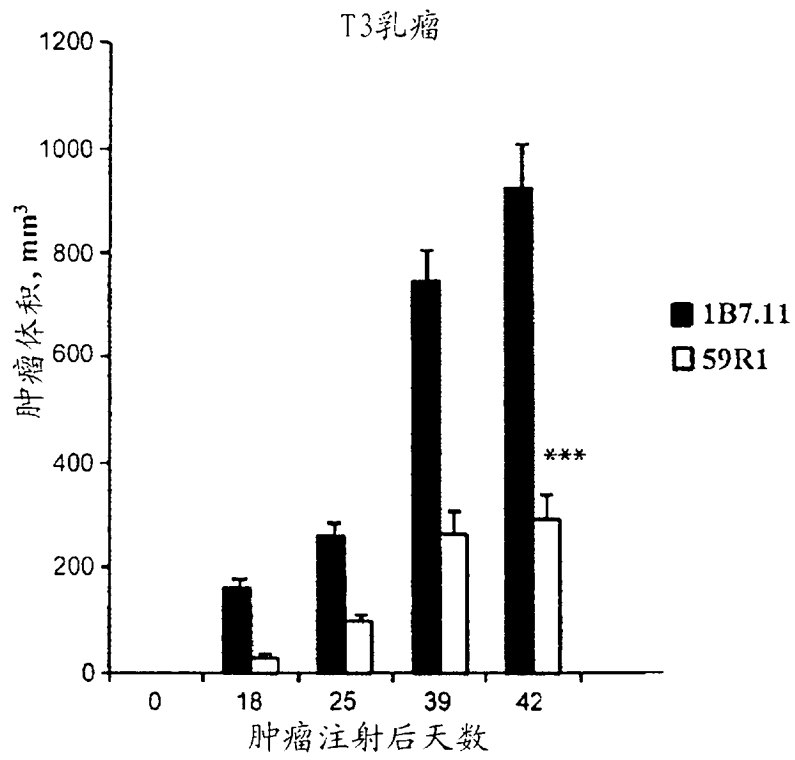


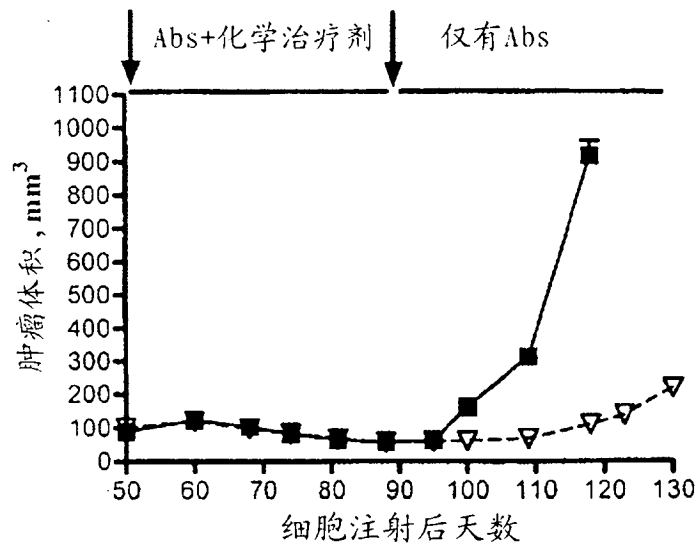
图 5E



*** p < 0.001, 59R1 相对于 1B7.11

图 5F

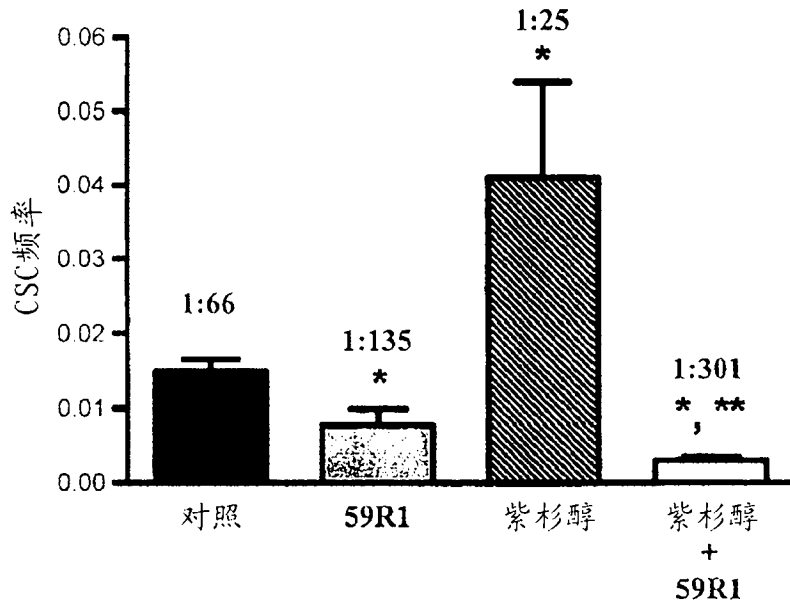
B51乳癌



■ 对照Ab+紫杉醇->对照Ab
▽ 抗-Notch2/3+紫杉醇->抗-Notch2/3

图 6

B51乳癌生长(第72天)



*相对于对照p<0.05
**相对于紫杉醇p<0.05

图 7

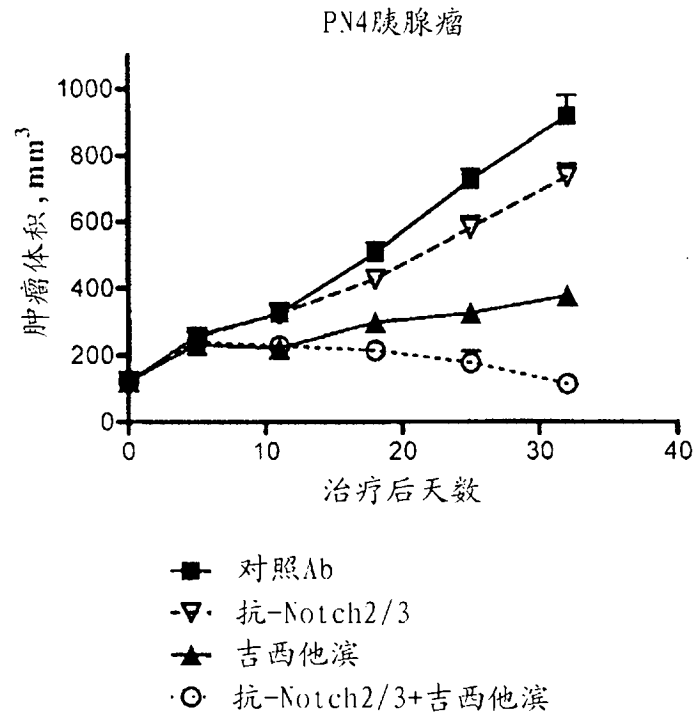


图 8

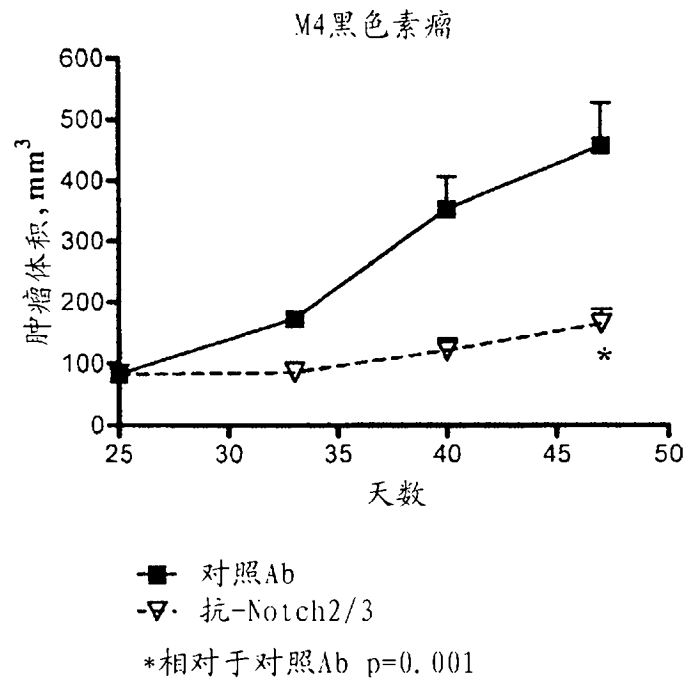
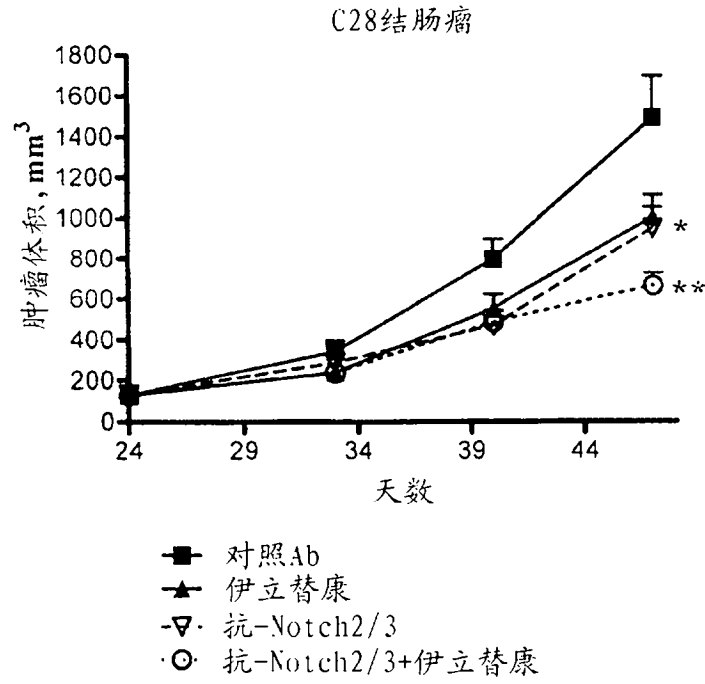


图 9



*相对于对照Ab p=0.03
**相对于伊立替康 p=0.01

图 10

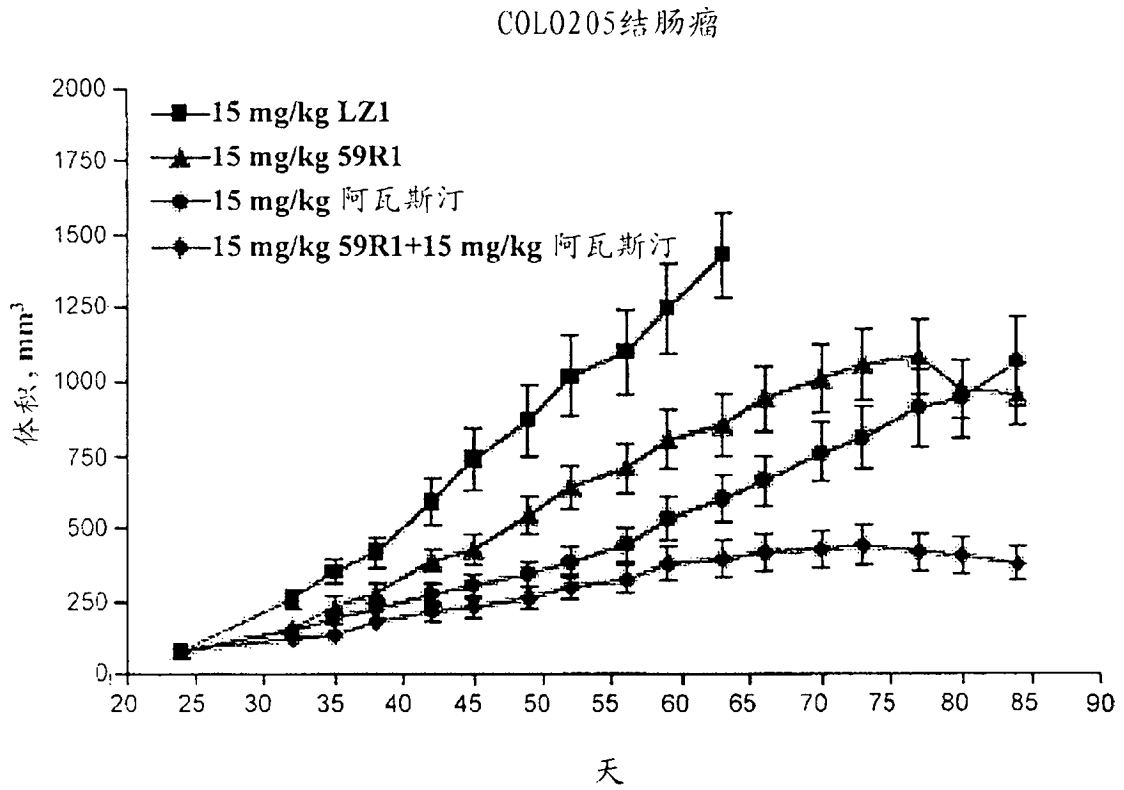


图 11A

C8结肠癌

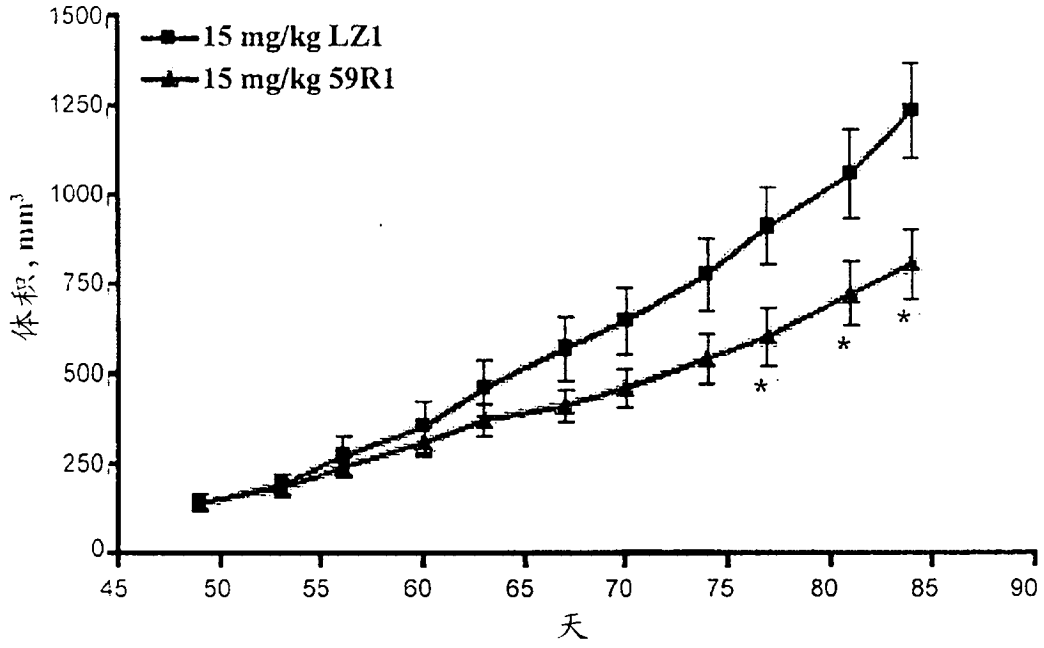


图 11B

PX8胰腺瘤

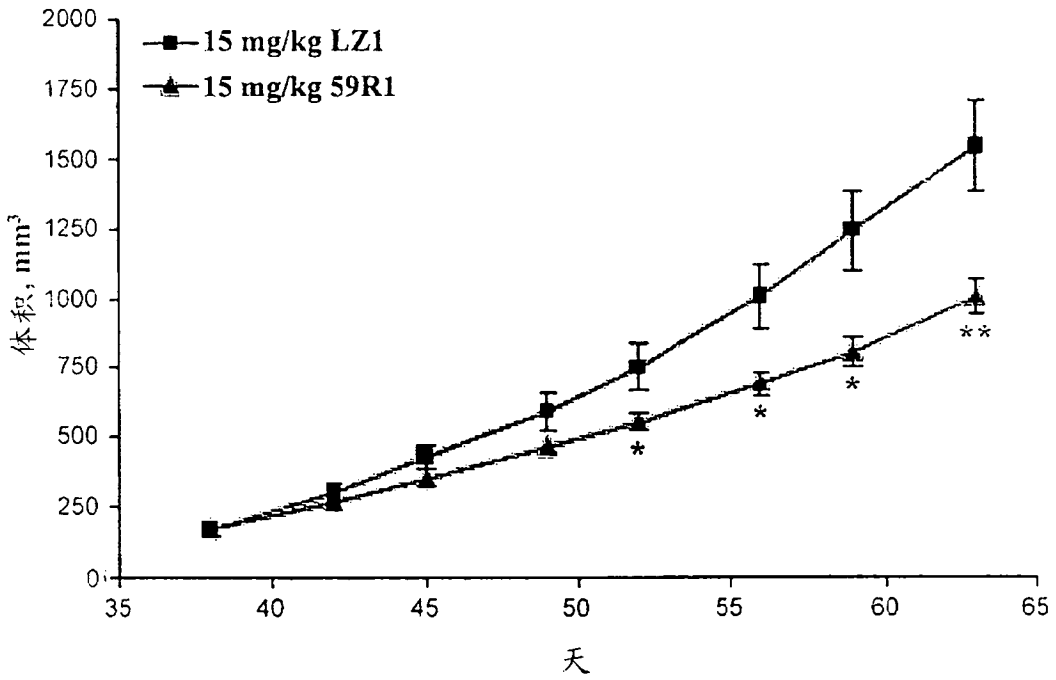


图 11C

B34乳瘤

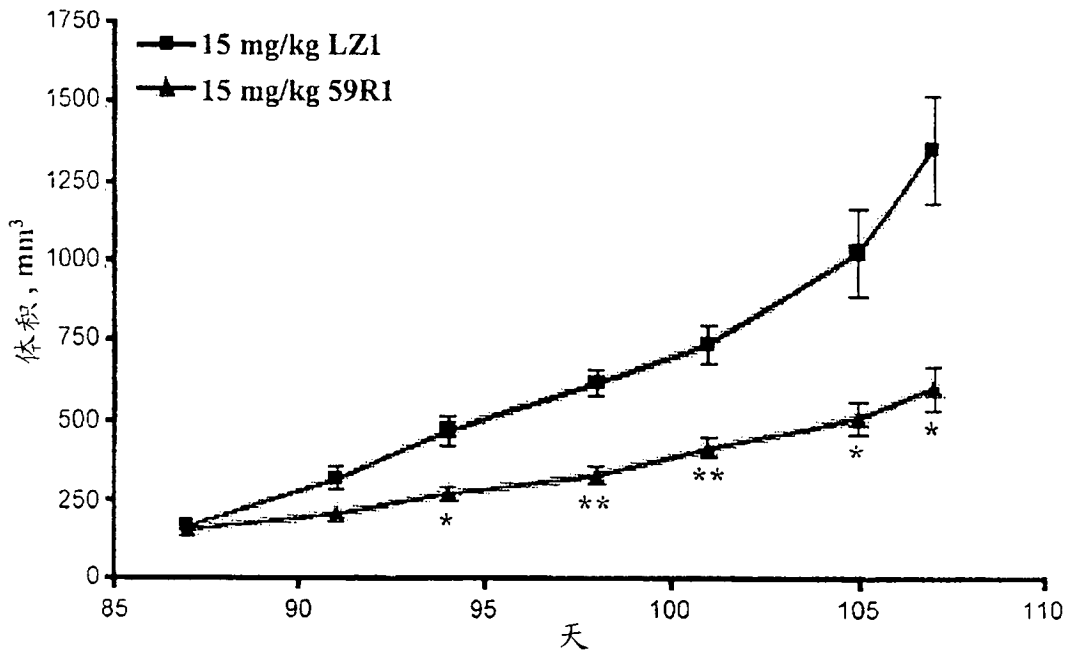


图 11D

B39乳瘤

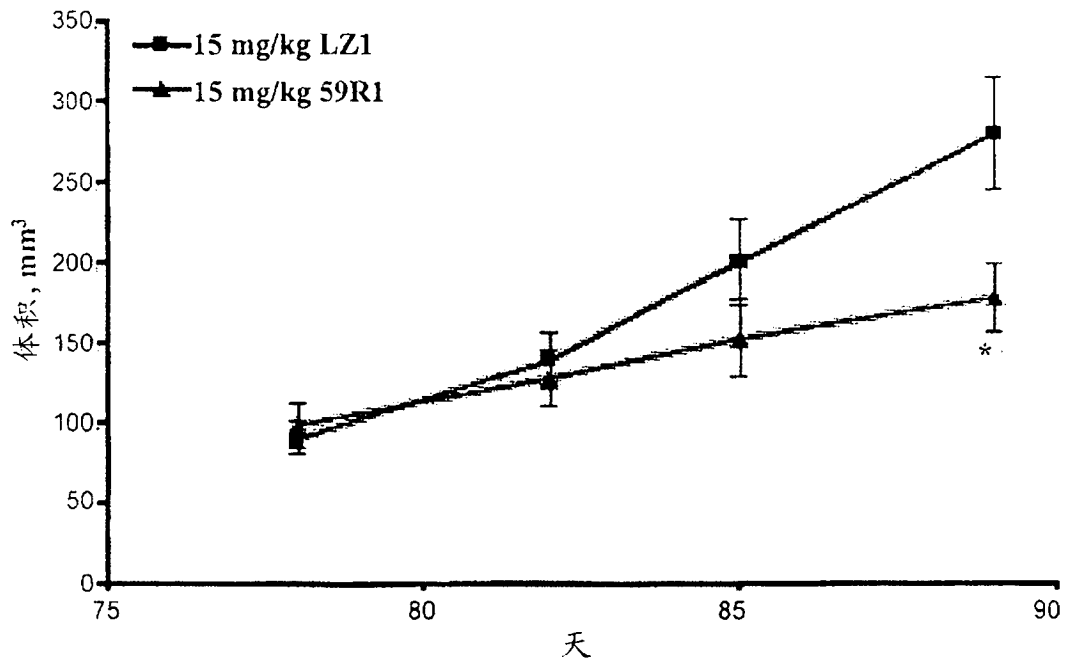


图 11E

B44乳瘤

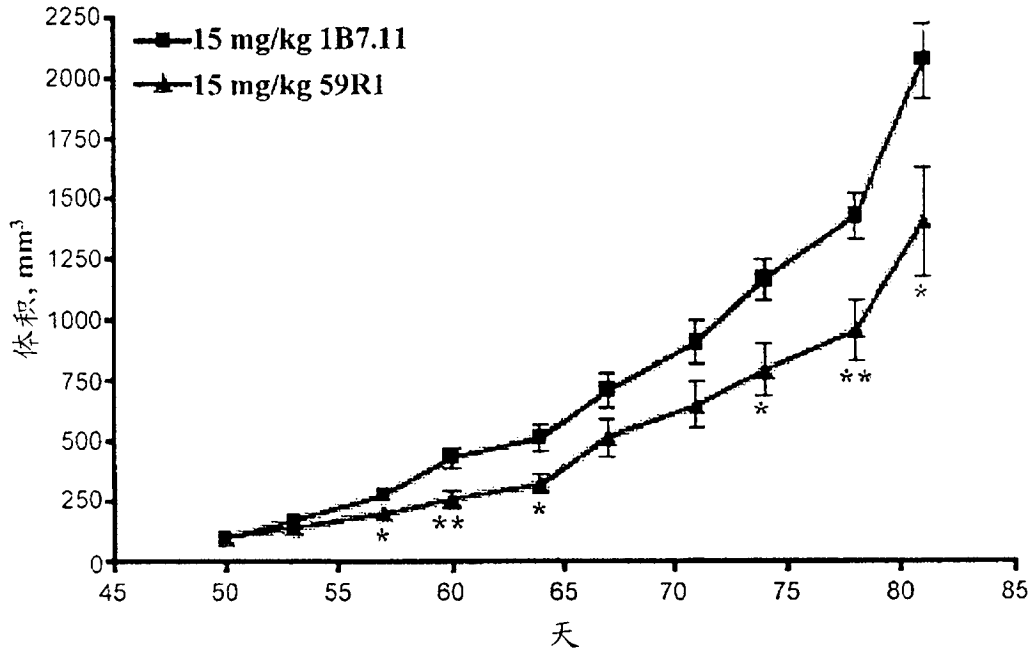


图 11F

PE13乳瘤

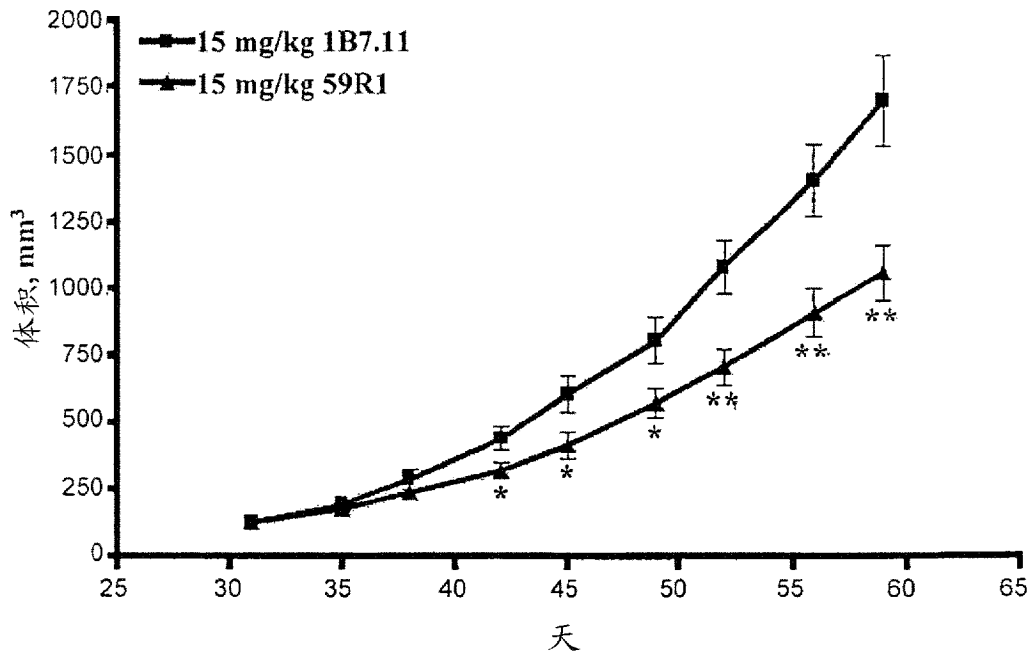


图 11G

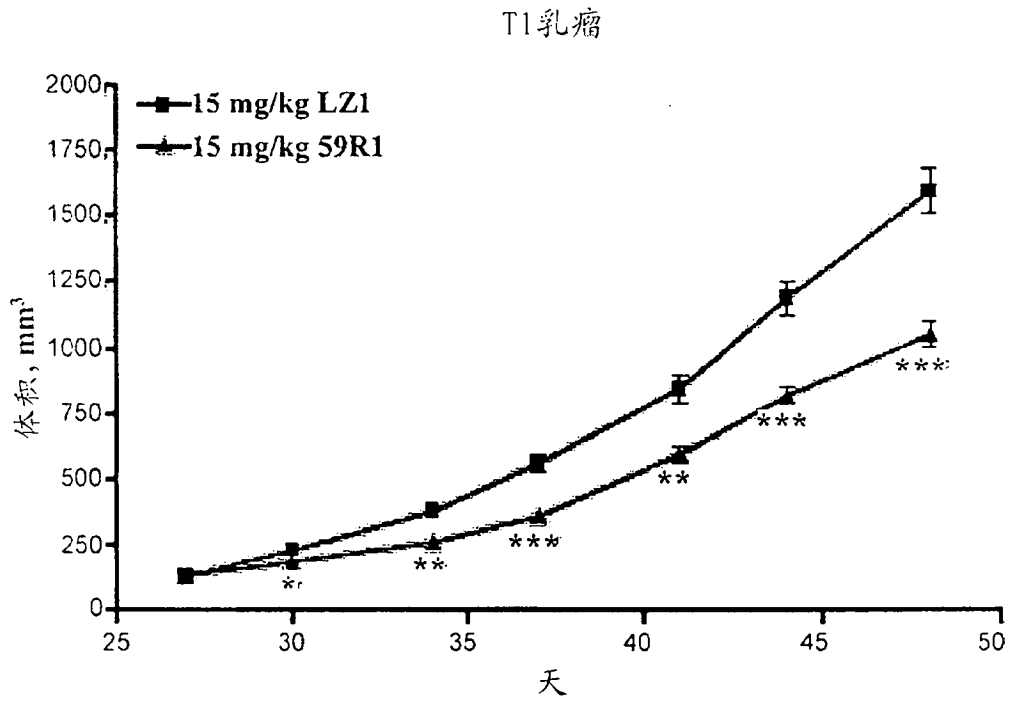


图 11H

HEYL

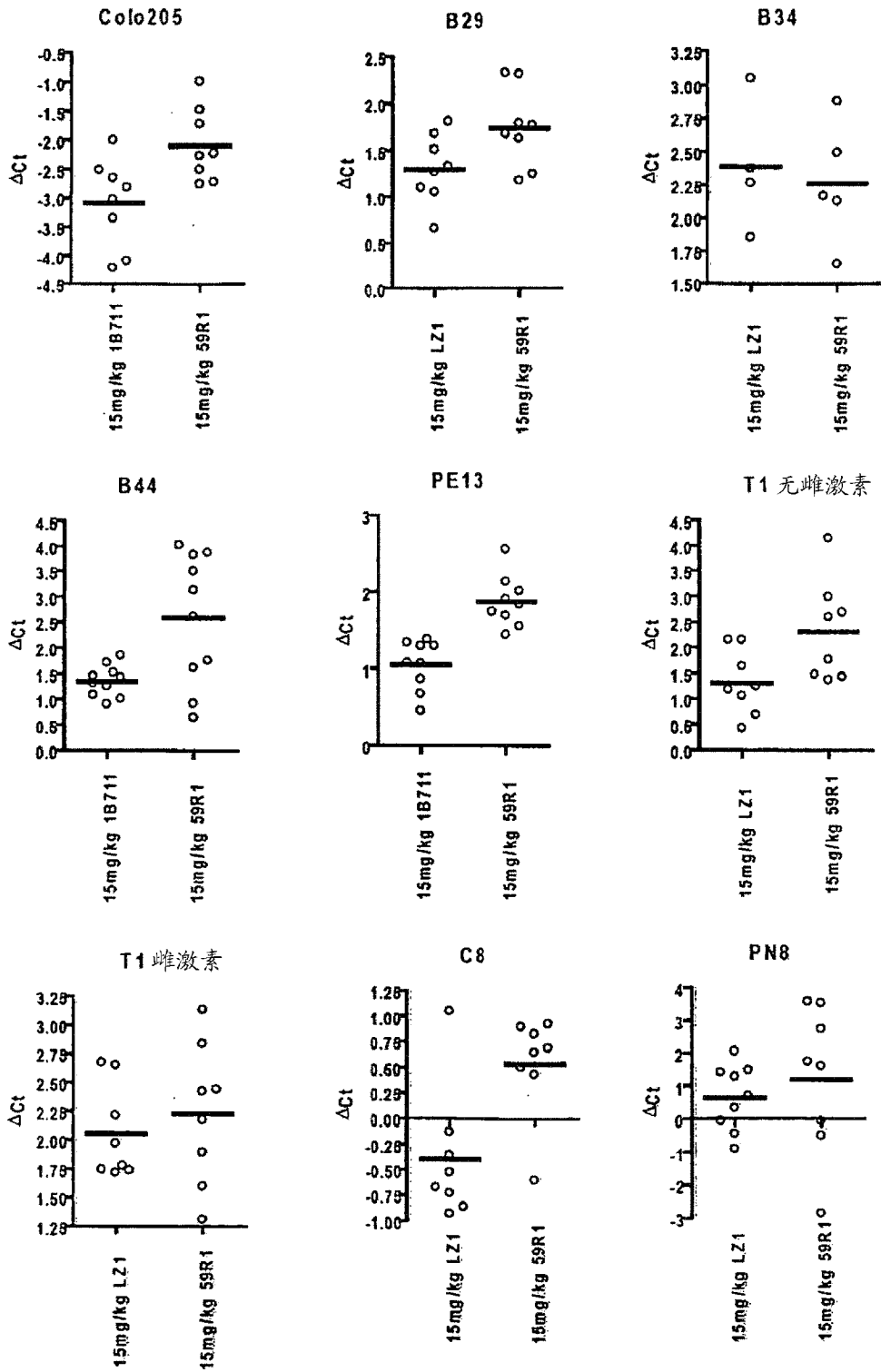


图 12A

NOTCH3

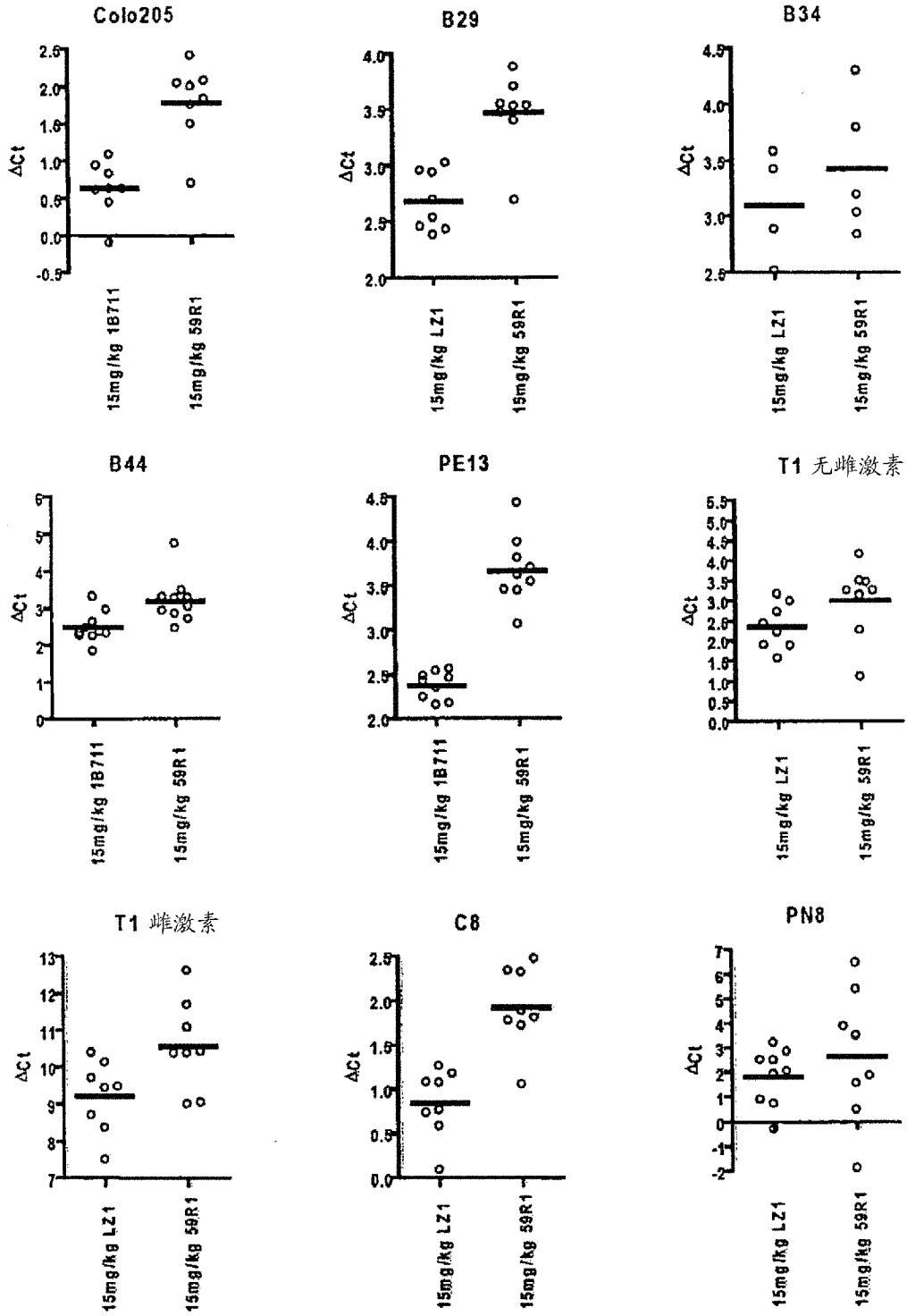


图 12B

RGS5

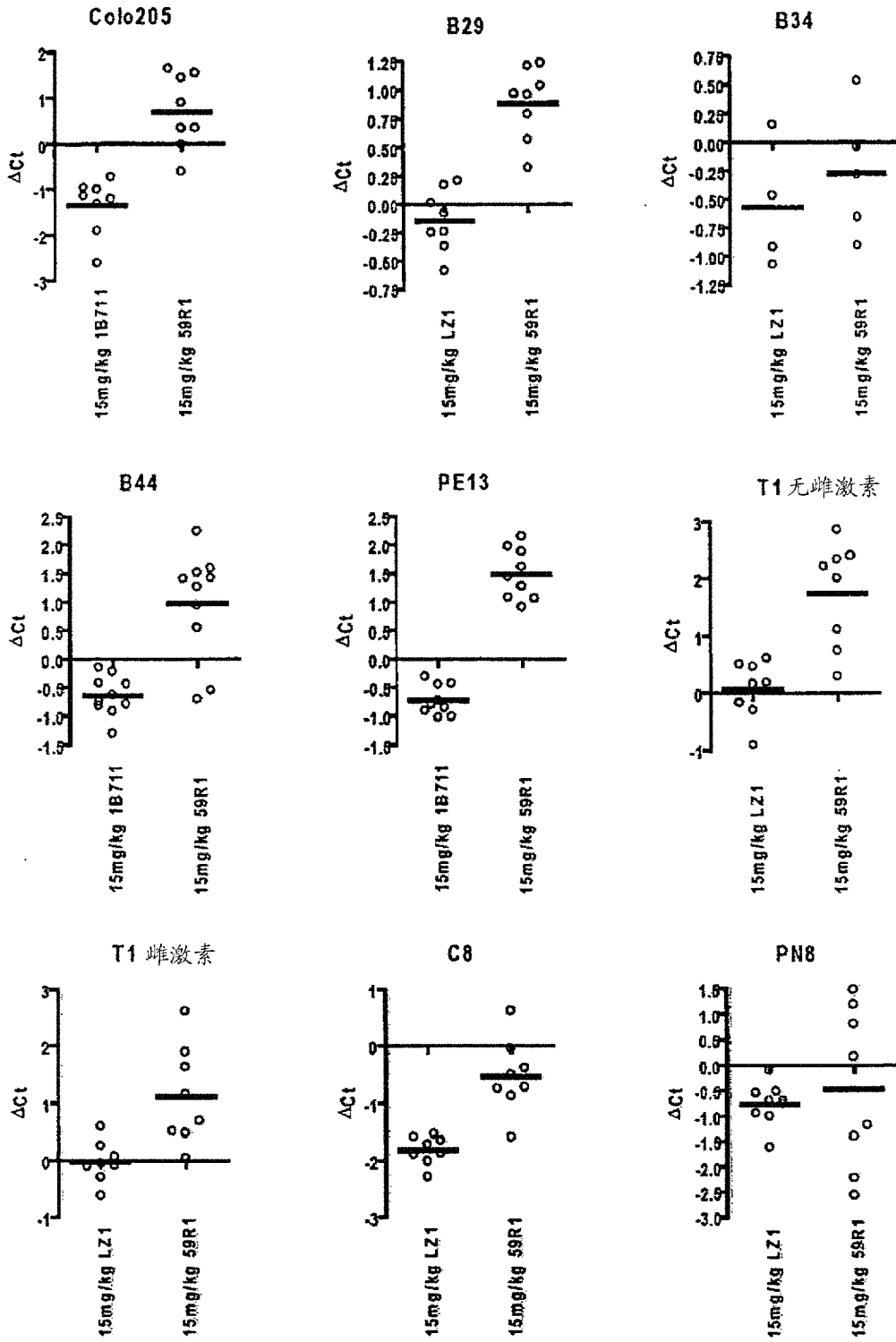


图 12C

ANGPT1

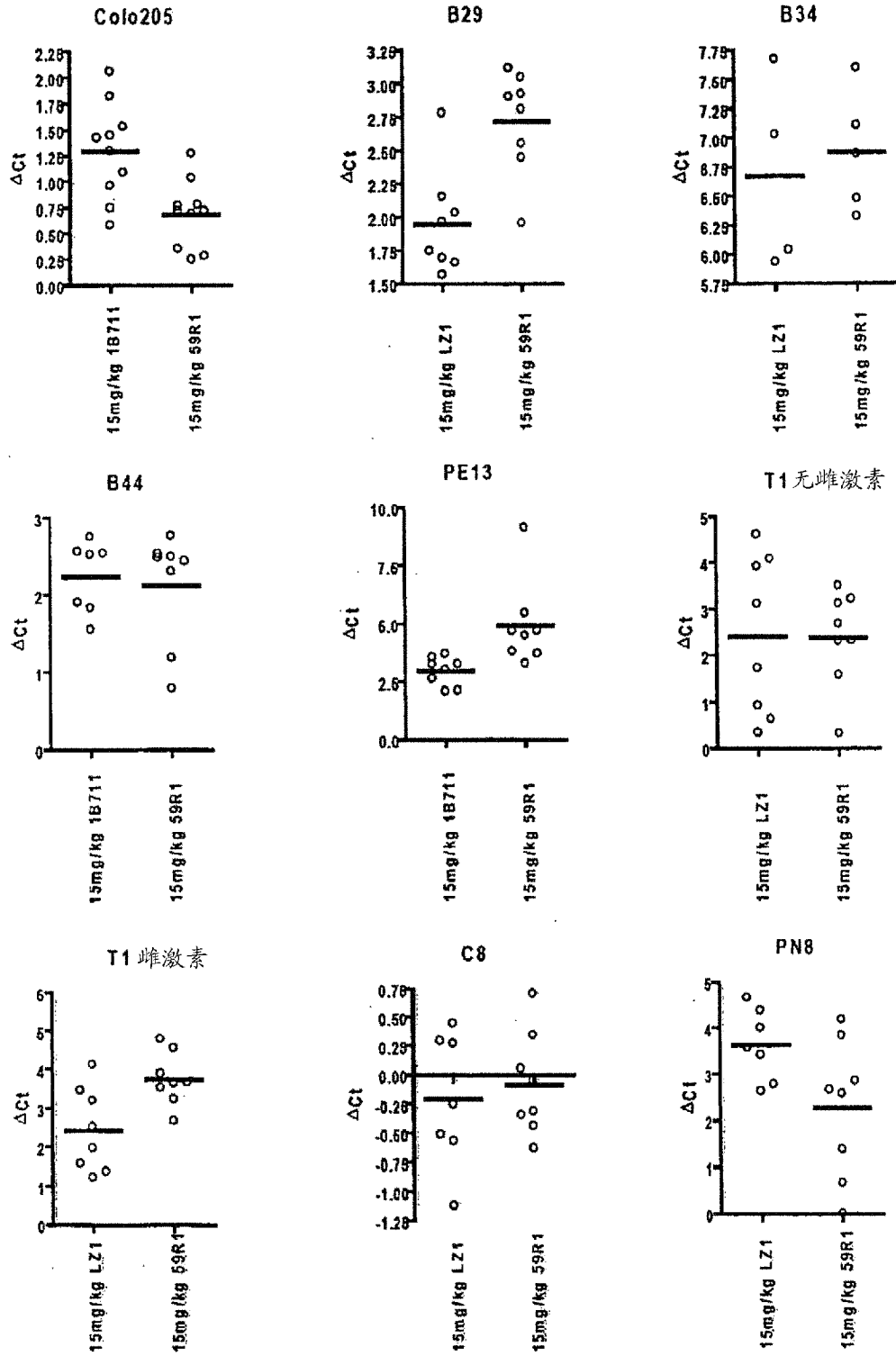


图 12D

ANGPT2

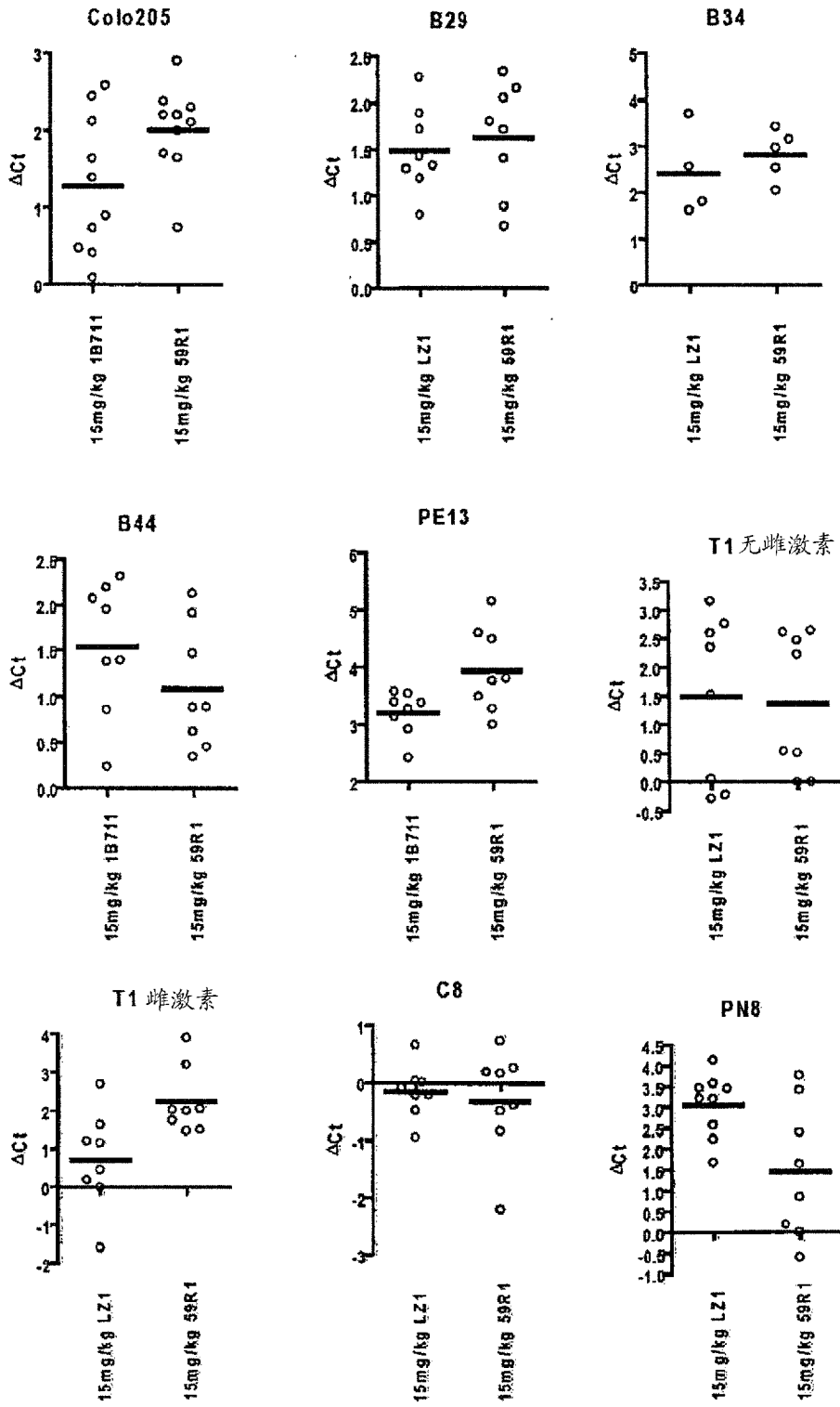


图 12E

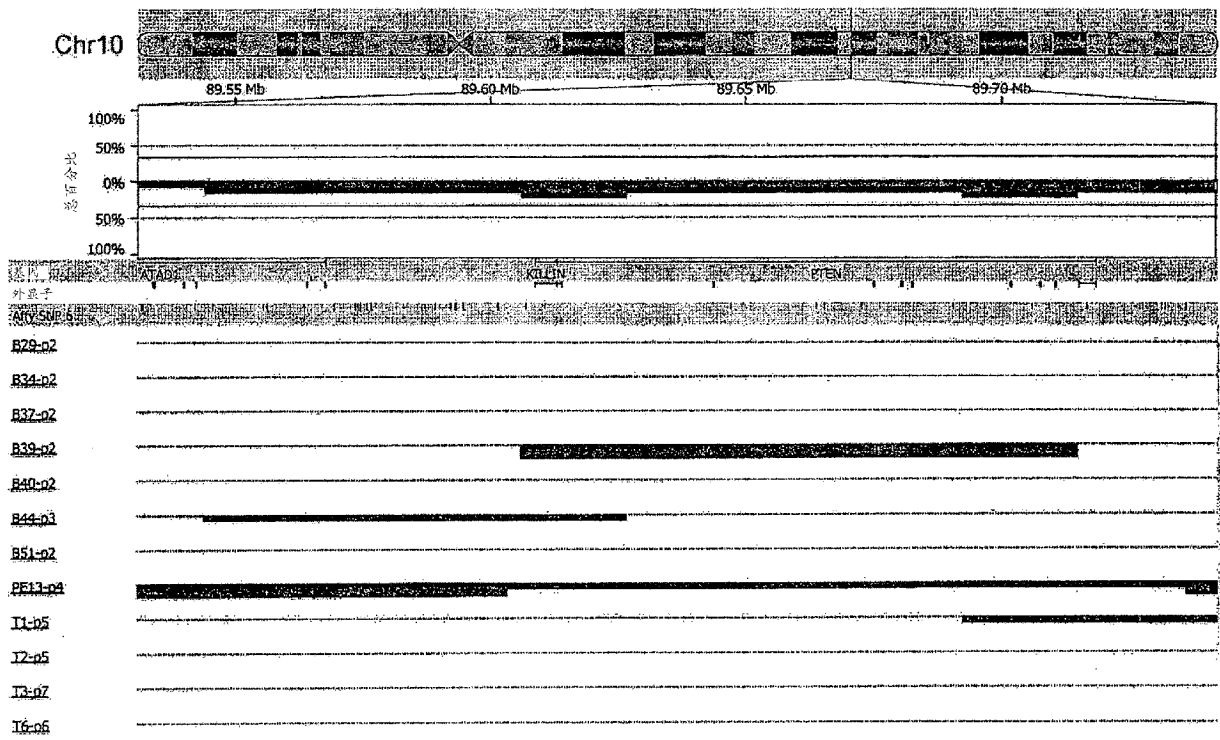


图 13

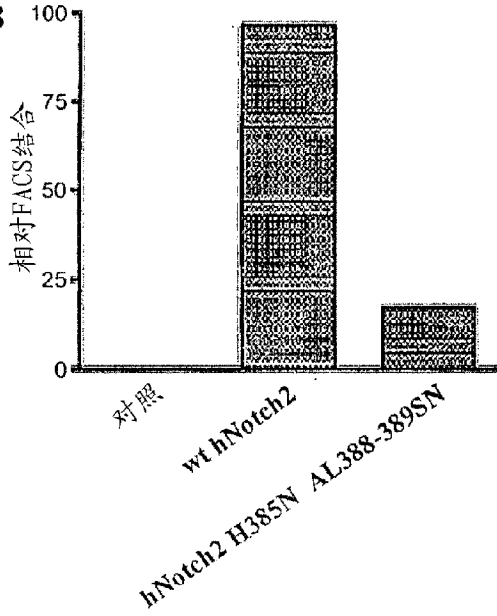
14A

h-NOTCH1
h-NOTCH2
h-NOTCH3
h-NOTCH4

356 sfycecpghrtgllchldacisnpehkgaledtnplngqyictcpqykgadctedvdecsl-
359 sfscmcpegkagllchlddacisnpehkgaledtnplngqyictcpqykgadctedvdecam-
335 sfycecpmgtgllchlddacvsnpchedaictdnvngraictcppeftggacdqdvdecsl-
376 sfscldppgrtollchledmcisqphgdaqcsinpltgatlcicqpvsgptchqdldecma

EGF10 (或等效物)

14B



14C

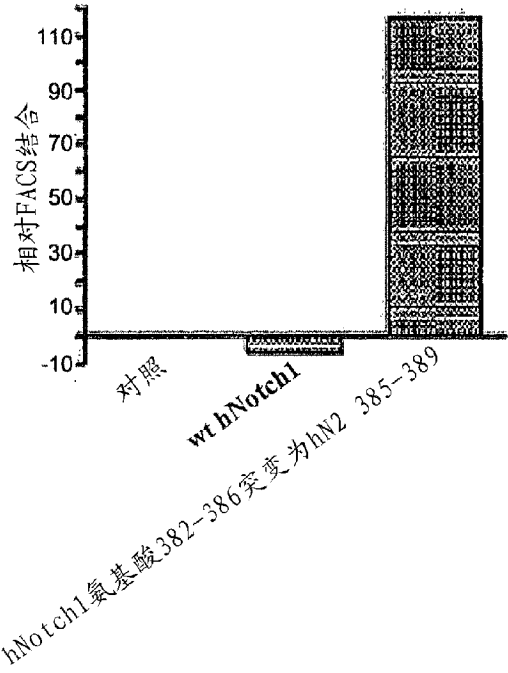


图 14

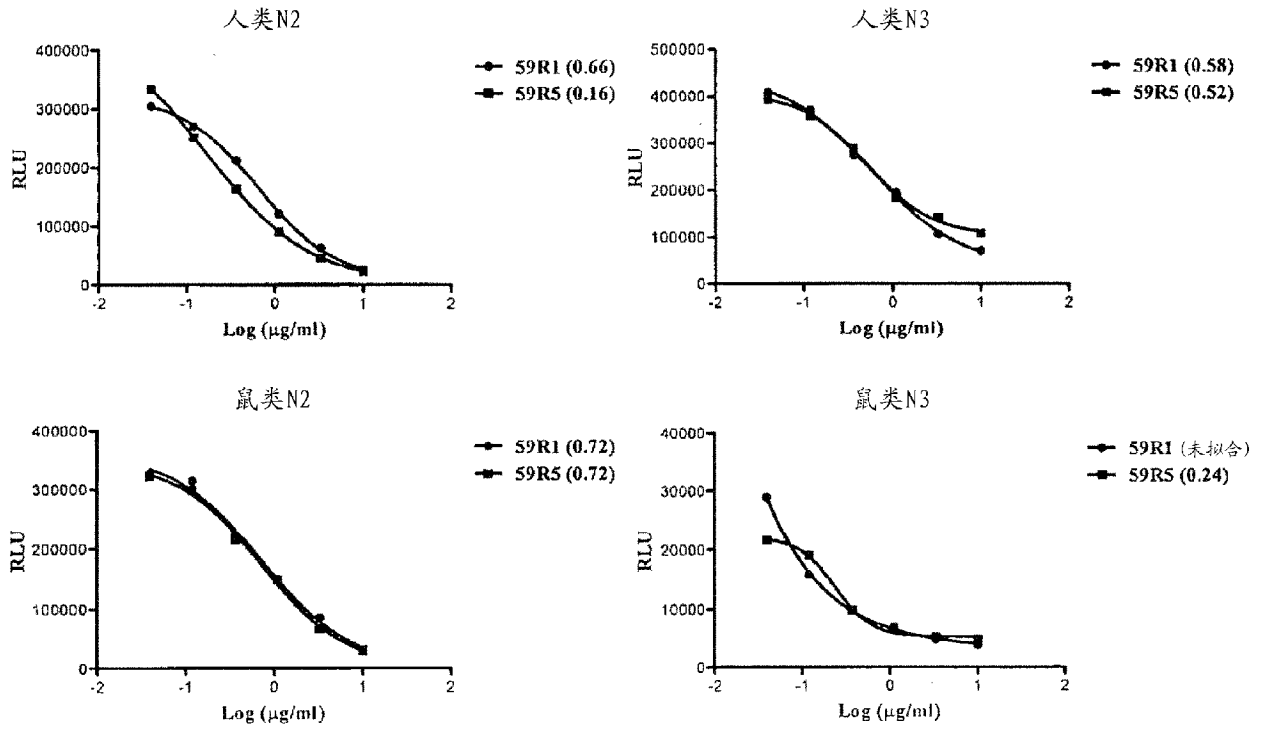


图 15A

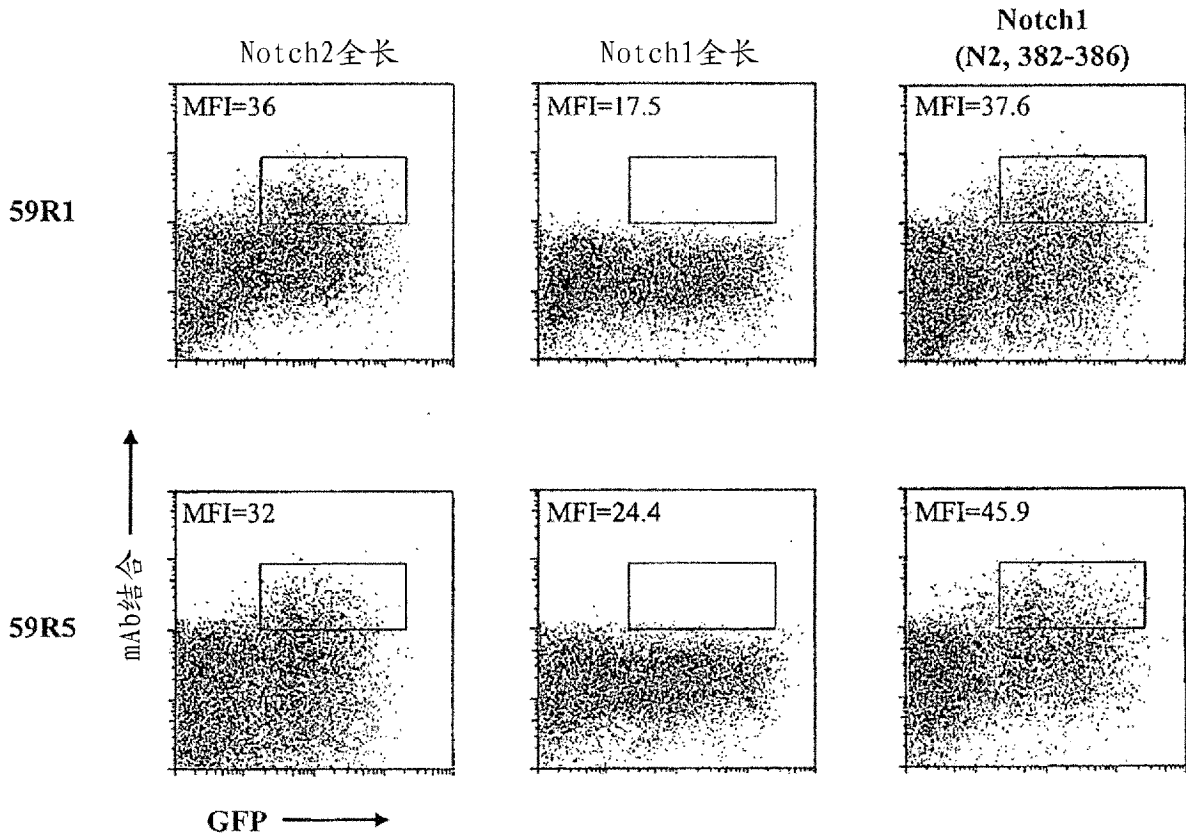
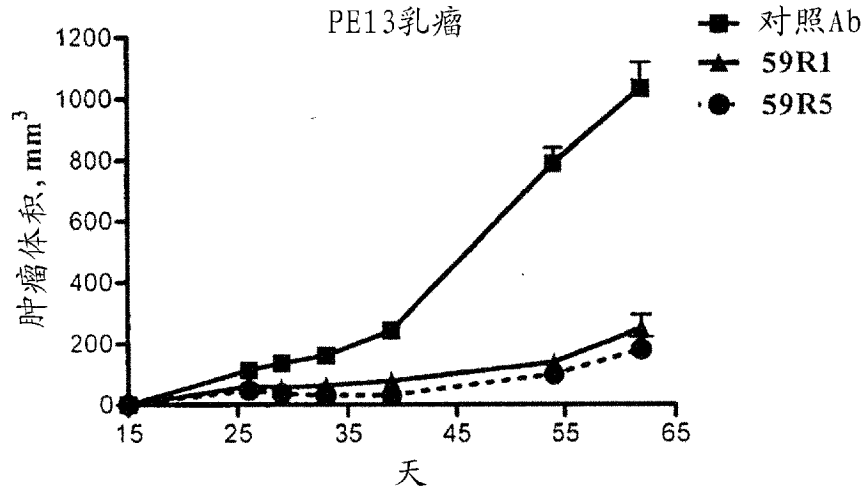


图 15B

16A



16B

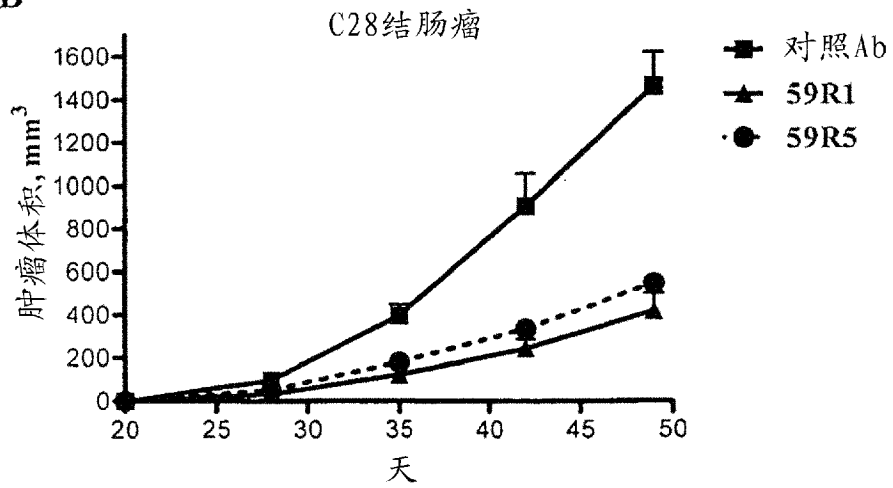


图 16

16C

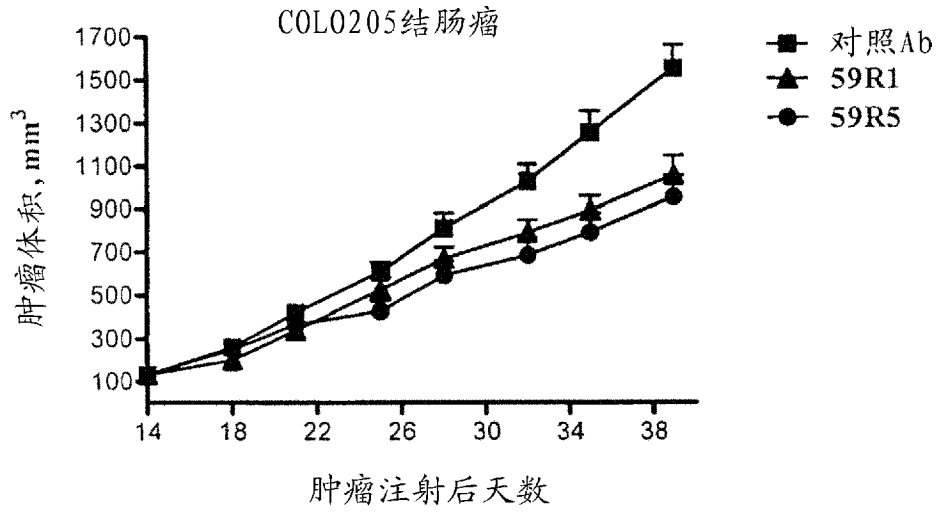
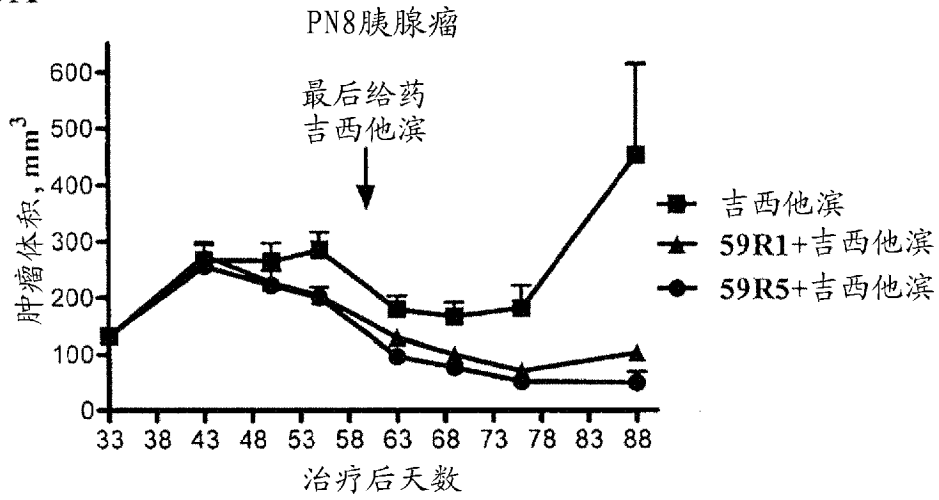


图 16

17A



17B

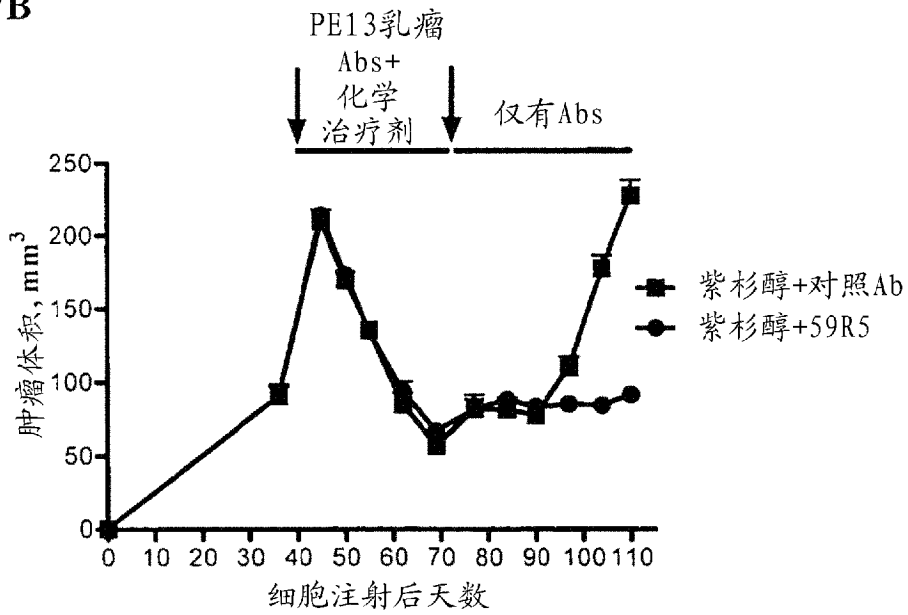


图 17

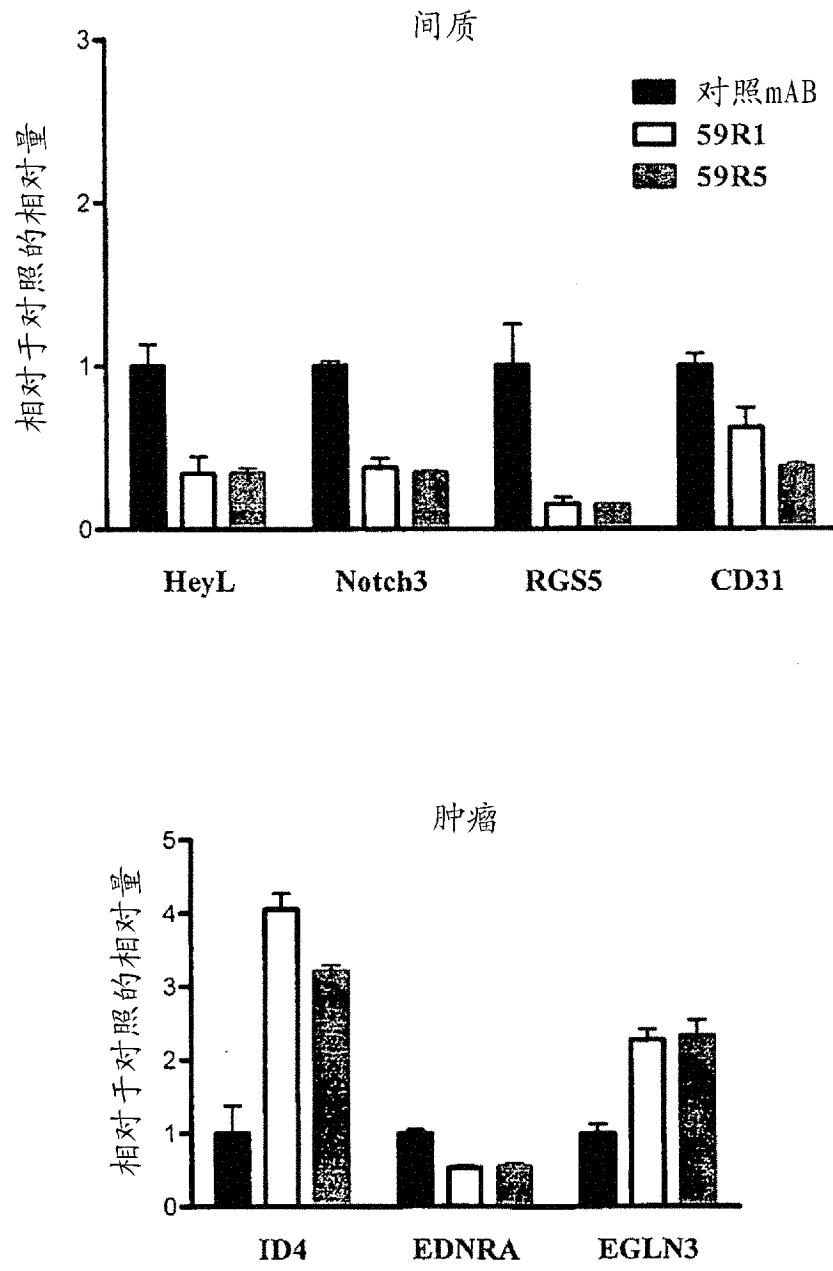


图 18

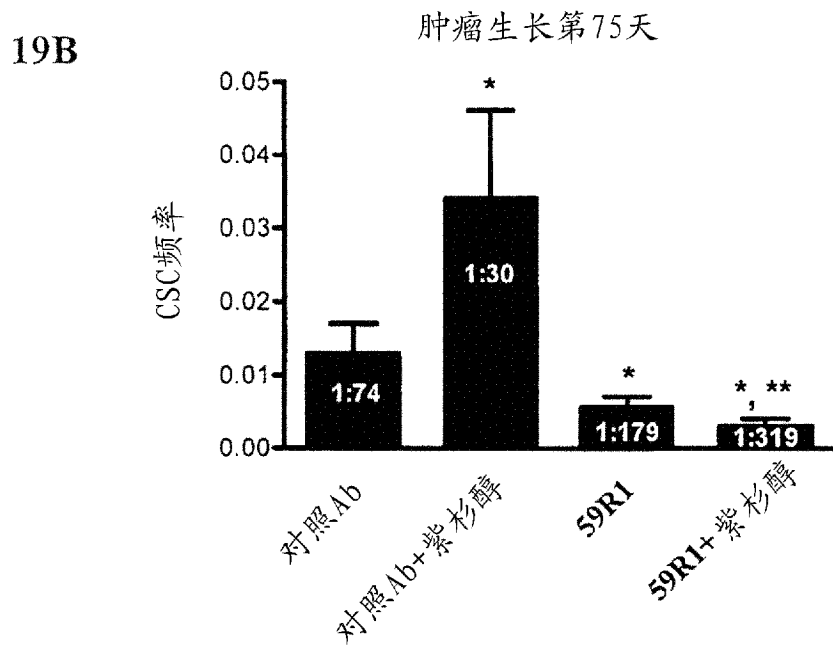
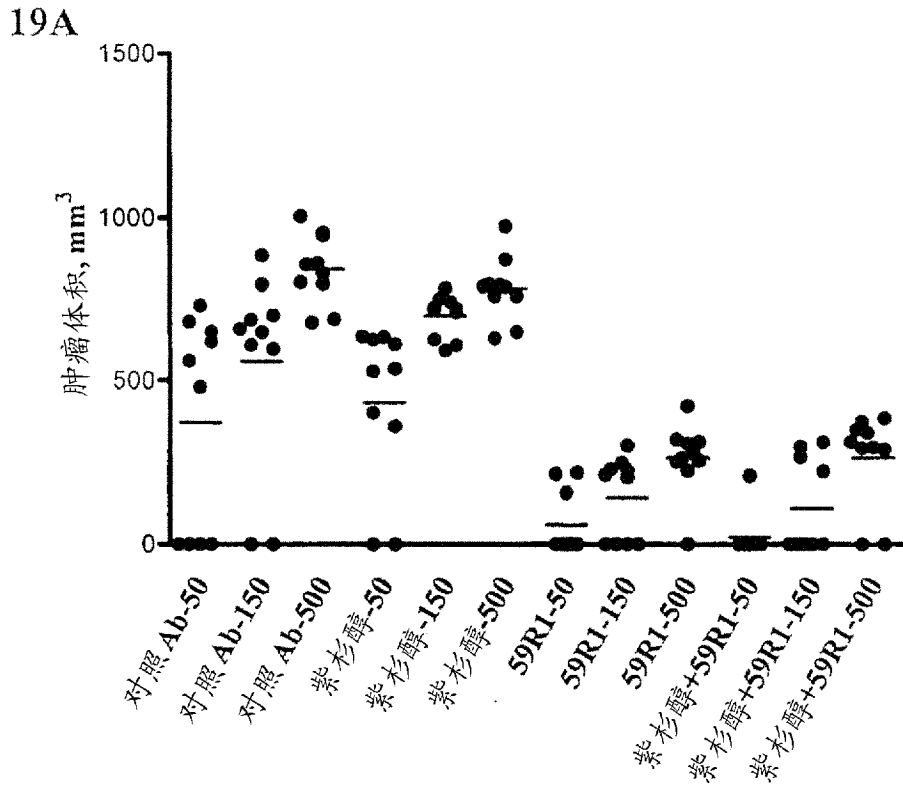


图 19

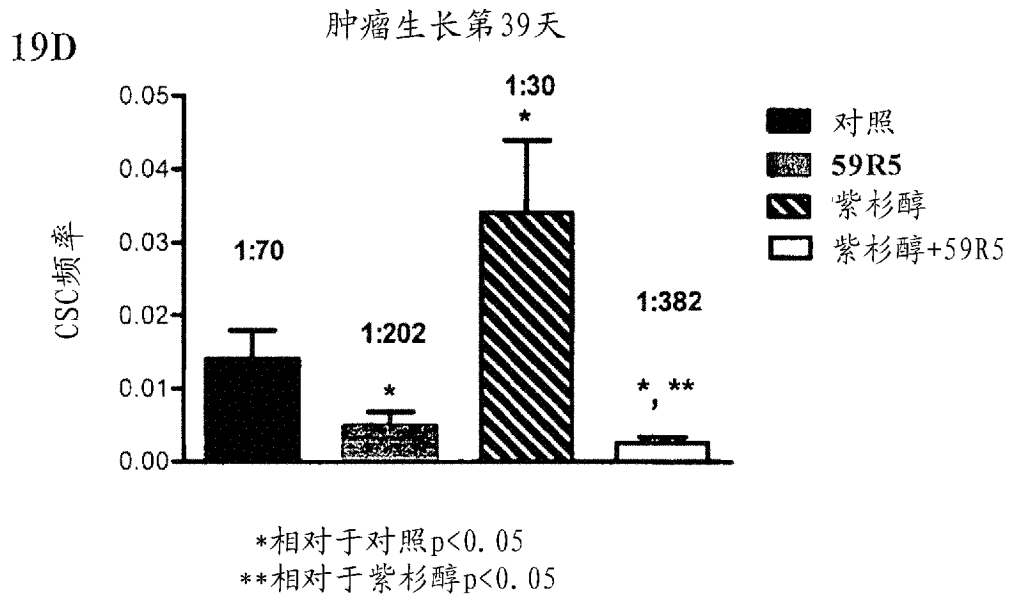
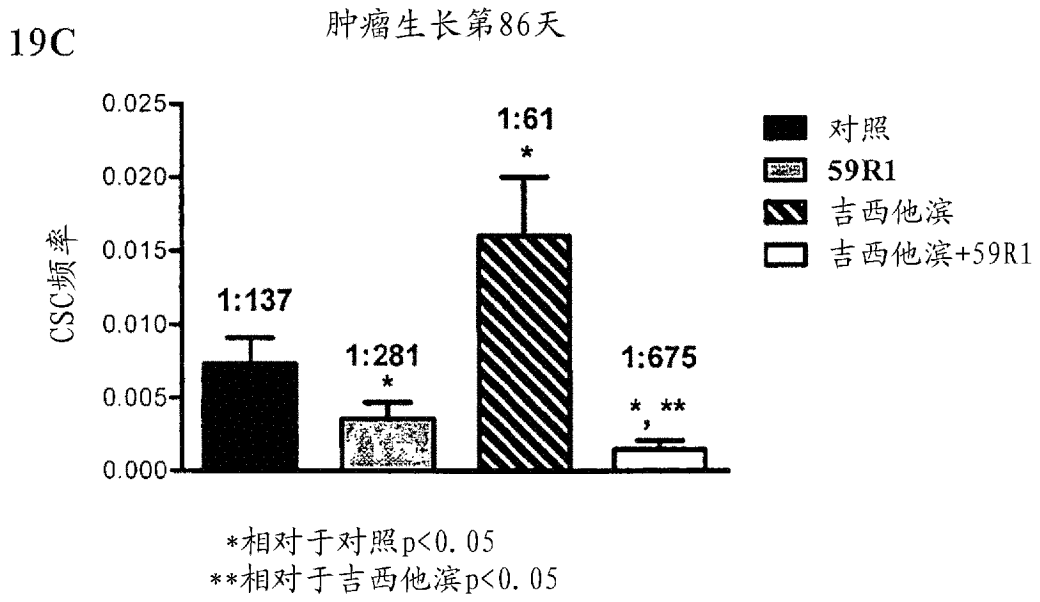


图 19